



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA
AFRO-BRASILEIRA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE ENGENHARIAS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIA E AMBIENTE**

DEIVID DOS SANTOS DIAS

**IMOBILIZAÇÃO DA PAPAÍNA EM HIDROGEL DE TAMARINDO:
AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL E *IN SILICO* DA EFICIÊNCIA CATALÍTICA
E DO POTENCIAL DE LIBERAÇÃO CONTROLADA**

REDENÇÃO – CE

2026

DEIVID DOS SANTOS DIAS

IMOBILIZAÇÃO DA PAPAÍNA EM HIDROGEL DE TAMARINDO: AVALIAÇÃO
EXPERIMENTAL E *IN SILICO* DA EFICIÊNCIA CATALÍTICA E DO POTENCIAL
DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia e Ambiente, do Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Energia e Ambiente.

Linha de Pesquisa 1: Processos Sustentáveis, Inovação e Difusão Tecnológica. **Subárea:** Processos Químicos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Cristiane Martins de Souza

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Gisele Rocha Aguiar

REDENÇÃO – CE

2026

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Dias, Deivid Dos Santos.

D541i

Imobilização da papaína em hidrogel de tamarindo: avaliação experimental e in silico da eficiência catalítica e do potencial de liberação controlada / Deivid Dos Santos Dias. - Redenção, 2026. 121f: il.

Dissertação - Curso de Mestrado Acadêmico Em Energia E Ambiente, Programa De Pós-graduação Em Energia E Ambiente, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2026.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Cristiane Martins de Souza.
Coorientador: Prof.^a Dr.^a Gisele Rocha Aguiar.

1. Papaína. 2. Tamarindo. 3. Imobilização enzimática. 4. Hidrogel. 5. Dinâmica molecular. I. Título

CE/UF/BSCA

CDD 615.35

DEIVID DOS SANTOS DIAS

**IMOBILIZAÇÃO DA PAPAÍNA EM HIDROGEL DE TAMARINDO:
AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL E *IN SILICO* DA EFICIÊNCIA CATALÍTICA
E DO POTENCIAL DE LIBERAÇÃO CONTROLADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia e Ambiente, do Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Energia e Ambiente.

Aprovada em: 16 / 04 / 2026

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria Cristiane Martins de Souza (Orientadora)
Universidade da Integração da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof.^a Dr.^a Gisele Rocha Aguiar (Coorientadora)
Universidade da Integração da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos (Interno)
Universidade da Integração da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof.^a Dr.^a Janaina Maria Martins Vieira (Externo)
Universidade da Integração da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

*A Deus, aos meus pais José e Simões, as
minhas irmãs Monica e Munique, a minha
sobrinha Sophia, aos meus grandes amigos
e companheiros de jornada*

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de toda sabedoria e força. Em cada passo desta jornada, senti Sua mão a me guiar e Sua luz a dissipar as incertezas. Nada do que realizei seria possível sem a Sua infinita misericórdia, que me capacitou a chegar onde, por vezes, duvidei que meus pés alcançariam.

Aos meus pais, Dona Simones e Seu José, exemplos inabaláveis. Tuas histórias de lutas para nos educar é o alicerce da minha perseverança. Agradeço por ter plantado em mim a semente do conhecimento. Às minhas irmãs, Monica e Munique, companheiras de vida e de sonhos, agradeço por serem meu suporte emocional e por cada sorriso que tornou o peso desta pesquisa mais leve. Esta conquista carrega o nome de nossa família.

Aos meus amigos do curso de Engenharia de Alimentos, em especial à Jucilma, Láysa e Guilherme Diniz, que me apoiaram e incentivaram durante todo o percurso. Vocês foram fundamentais para que eu conseguisse caminhar firme conciliando todos os afazeres. Também, aos colegas do Laboratório de Biomassa, pela convivência harmoniosa e pelo auxílio mútuo. A troca de experiências e os momentos de descontração foram fundamentais para que a rotina experimental fosse não apenas produtiva, mas genuinamente agradável.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Maria Cristiane Martins de Souza, pela confiança em mim depositada. Tua condução firme e partilha generosa de conhecimento foram a bússola que deu norte a esta pesquisa.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Gisele Rocha Aguiar, pela clareza de pensamento e pelo apoio técnico indispensável. Teus direcionamentos foram essenciais para o amadurecimento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos, Prof.^a Dr.^a Janaina Maria Martins Vieira, Prof.^a Ma. Viviane de Castro Bizerra, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições que certamente elevarão a qualidade deste estudo.

À Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB) e ao PGEA, pelo espaço de crescimento.

Por fim, agradeço a mim mesmo. Pela coragem de enfrentar o desconhecido, pelas noites de estudo e pela resiliência em não desistir. Reconhecer o próprio esforço é o primeiro passo para honrar a trajetória percorrida.

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

Guimarães Rosa

RESUMO

A pesquisa em imobilização enzimática busca produzir biocatalisadores robustos, reutilizáveis e economicamente atrativos. Nesse sentido, foi desenvolvido um sistema para imobilização covalente da enzima papaína em uma matriz de hidrogel de tamarindo. O estudo iniciou-se com uma análise bibliométrica que destacou o crescimento exponencial das publicações no tema e o papel estratégico do Brasil em redes internacionais de colaboração. Posteriormente, procedeu-se à ativação e reticulação do hidrogel com glutaraldeído, visando à imobilização da papaína. Foram utilizados parâmetros otimizados de pH (7), temperatura ambiente e tempo de reação controlado, a fim de preservar a atividade enzimática e minimizar a desnaturação induzida pelo agente reticulante. A caracterização por espectroscopia no infravermelho evidenciou o aparecimento de bandas associadas à formação de acetais, confirmando a ocorrência de ligações covalentes estáveis entre a papaína e a matriz polimérica, o que demonstra a eficiência do glutaraldeído como agente de acoplamento químico. Ensaio de atividade enzimática mostraram que a papaína imobilizada manteve sua atividade ao longo do tempo, com redução significativa dos processos de autólise quando comparada à enzima livre. Enquanto a papaína livre apresentou intensa autoproteólise, com perda expressiva de atividade catalítica em curto período, o sistema imobilizado preservou sua integridade funcional, evidenciando o efeito protetor do microambiente fornecido pelo hidrogel. Para fundamentar a avaliação experimental, empregaram-se ferramentas de modelagem computacional. Simulações de dinâmica molecular permitiram analisar a estabilidade conformacional da papaína, nas quais simulações de longa duração indicaram equilíbrio termodinâmico do sistema, com baixos desvios estruturais e manutenção da área de superfície acessível ao solvente, sugerindo ausência de desnaturação ao longo do tempo. Além disso, as abordagens computacionais contribuíram para a compreensão do potencial terapêutico da papaína na modulação de processos inflamatórios. Estudos de *docking* proteína-proteína identificaram orientações energeticamente favoráveis entre a papaína e a ciclooxigenase-2 (COX-2), enquanto análises das interações não covalentes, como ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos, demonstraram a estabilidade do complexo formado. Ensaio adicionais indicaram perfis de liberação controlada da enzima, com elevados percentuais de eficiência, reforçando o potencial do sistema para aplicações biotecnológicas e biomédicas. De forma integrada, os resultados evidenciam que hidrogéis de tamarindo constituem matrizes sustentáveis, de baixo custo e alto desempenho para a imobilização enzimática, proporcionando microambiente controlado e possibilitando o reuso eficiente da papaína. O estudo reforça a importância da integração de metodologias bibliométricas, experimentais e computacionais no desenvolvimento de biocatalisadores inovadores obtidos a partir de biomassa do semiárido nordestino, contribuindo para a economia circular regional e evidenciando o papel de biomateriais vegetais na promoção de processos biotecnológicos mais sustentáveis.

Palavras-chave: Papaína, Tamarindo, Imobilização Enzimática, Hidrogel, Dinâmica Molecular.

ABSTRACT

Research in enzyme immobilization aims to produce robust, reusable, and economically attractive biocatalysts. In this context, a system for the covalent immobilization of the enzyme papain in a tamarind hydrogel matrix was developed. The study began with a bibliometric analysis that highlighted the exponential growth of publications in this field and the strategic role of Brazil in international collaboration networks. Subsequently, the hydrogel was activated and crosslinked with glutaraldehyde for papain immobilization. Optimized parameters of pH (7), room temperature, and controlled reaction time were employed in order to preserve enzymatic activity and minimize denaturation induced by the crosslinking agent. Characterization by infrared spectroscopy revealed the appearance of bands associated with acetal formation, confirming the occurrence of stable covalent bonds between papain and the polymeric matrix, thereby demonstrating the efficiency of glutaraldehyde as a chemical coupling agent. Enzymatic activity assays showed that immobilized papain maintained its activity over time, with a significant reduction in autolysis processes compared to the free enzyme. While free papain exhibited intense autolysis, with a marked loss of catalytic activity over a short period, the immobilized system preserved its functional integrity, evidencing the protective effect of the hydrogel-provided microenvironment. To support the experimental evaluation, computational modeling tools were employed. Molecular dynamics simulations enabled the analysis of papain's conformational stability, in which long-term simulations indicated thermodynamic equilibrium of the system, with low structural deviations and maintenance of the solvent-accessible surface area, suggesting the absence of denaturation over time. In addition, computational approaches contributed to the understanding of papain's therapeutic potential in the modulation of inflammatory processes. Protein-protein *docking* studies identified energetically favorable orientations between papain and cyclooxygenase-2 (COX-2), while analyses of non-covalent interactions, such as hydrogen bonds and hydrophobic contacts, demonstrated the stability of the formed complex. Additional assays indicated controlled enzyme release profiles with high efficiency percentages, reinforcing the system's potential for biotechnological and biomedical applications. Overall, the results demonstrate that tamarind hydrogels are sustainable, low-cost, and high-performance matrices for enzyme immobilization, providing a controlled microenvironment and enabling the efficient reuse of papain. The study highlights the importance of integrating bibliometric, experimental, and computational methodologies in the development of innovative biocatalysts derived from biomass of Brazil's northeastern semi-arid region, contributing to the regional circular economy and underscoring the role of plant-based biomaterials in promoting more sustainable biotechnological processes.

Keywords: Papain, Tamarind, Enzyme Immobilization, Glutaraldehyde, Hydrogel, Molecular Dynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da estratégia de busca, refinamento dos resultados e análise bibliométrica sobre imobilização de enzimas em matriz de hidrogel.....	31
Figura 2 - Tendência global de publicações e citações anuais relacionadas à pesquisa sobre imobilização de enzimas em matriz de hidrogel de 2015 a abril de 2025.....	33
Figura 3 - Distribuição mundial de pesquisas sobre imobilização enzimática em matriz de hidrogel de 2015 a abril de 2025. A densidade de publicação é representada por uma escala de cores.....	34
Figura 4 - Classificação dos dez países com maior número de publicações na área de imobilização de enzimas em matrizes de hidrogel de 2015 a abril de 2025.....	35
Figura 5 - Classificação dos dez países com maior frequência de citações de suas publicações na área de imobilização enzimática em matrizes de hidrogel de 2015 a abril de 2025.....	35
Figura 6 - Distribuição e cooperação internacional de países/regiões envolvidos na imobilização de enzimas em matrizes de hidrogel de 2015 a abril de 2025.....	36
Figura 7 - Mapas bibliométricos do campo de imobilização enzimática em matrizes de hidrogel: (A) mapa de cocitação entre países/regiões, evidenciando as conexões e a influência relativa entre polos geográficos de pesquisa; (B) mapeamento da rede de citações entre instituições, indicando relações de influência e intercâmbio científico com base nas publicações na área.....	36
Figura 8 - Classificação dos dez autores com mais publicações sobre imobilização enzimática em matrizes de hidrogel entre 2015 e abril de 2025.....	37
Figura 9 - Mapa de rede de coautoria e colaboração de autores sobre imobilização de enzimas em matrizes de hidrogel entre 2015 e abril de 2025. Linhas e cores representam os graus de cooperação.....	37
Figura 10 - Análise de nuvem de palavras sobre imobilização enzimática em matriz de hidrogel para frequências de palavras. Número de palavras = 50.....	39
Figura 11 - Visualizações bibliométricas das tendências temáticas em pesquisas sobre imobilização enzimática em matrizes de hidrogel: (A) análise de coocorrência de palavras-chave, destacando os principais agrupamentos conceituais; (B) visualização em overlay, evidenciando a evolução temporal e o surgimento de temas recentes; (C) mapa de densidade de palavras-chave gerado no VOSviewer, indicando os hotspots e os pontos críticos de maior concentração de pesquisa na área.....	40

Figura 12 - Gráfico de três campos (diagrama de Sankey) mostrando a relação entre palavras-chave (centro), afiliação (esquerda) e países (direita) em pesquisas sobre imobilização enzimática em matriz de hidrogel. Número de itens representados = 20.....	41
Figura 13 - Gráfico mostrando o número de patentes por ano.....	54
Figura 14 - Hidrogel de Tamarindo.....	68
Figura 15 - Esquema visual da lavagem do TH.....	68
Figura 16 - Ensaio de coagulação do leite: (A) solução de leite desnatado; (B) leite acrescido de solução tampão; (C) leite acrescido de solução tampão e solução de papaína.....	72
Figura 17 - Atividade enzimática da papaína pura em 24h.....	73
Figura 18 - Espectros de FTIR das amostras: (a) PPN - papaína pura; (b) TH+PPN – papaína + Hidrogel de Tamarindo; (c) TH – Hidrogel de Tamarindo lavado; (d) TH+GLU – hidrogel de tamarindo funcionalizadas com glutaraldeído.....	78
Figura 19 - Complexo COX-2/papaína obtido por docking molecular. No topo, estruturas antes e após o acoplamento (papaína em magenta e COX-2 em verde). Abaixo, ampliação da interface destacando resíduos e interações principais: ligações de hidrogênio, hidrofóbicas e π - π , responsáveis pela estabilidade do complexo.....	96
Figura 20 - Variação da energia potencial durante a minimização do complexo receptor Cox-2 e a enzima papain. Observa-se queda rápida inicial e estabilização em ~1000–1200 ps, com diferenças finais pequenas entre os ligantes. As curvas são sobrepostas, indicando ausência de tensões locais relevantes após o preparo dos sistemas.....	99
Figura 21 - Perfil de temperatura do complexo proteína–proteína durante a etapa de equilíbrio em ensemble NVT. Observa-se um breve regime transiente inicial, seguido por oscilações estáveis em torno de 300 K, indicando controle térmico eficiente e equilíbrio adequado do sistema antes das etapas de NPT e produção.....	100
Figura 22 - Perfil da pressão do complexo proteína–proteína durante a etapa de equilíbrio em ensemble NPT. Observam-se flutuações iniciais associadas ao ajuste do volume do sistema, seguidas por oscilações estáveis em torno de 1 atm, indicando controle pressórico eficiente e adequado relaxamento do sistema antes da simulação de produção.....	101

- Figura 23** - Evolução temporal do RMSD (nm) do complexo proteína–proteína ao longo de 100 ns de dinâmica molecular de produção. Após um período inicial de acomodação estrutural, o RMSD permanece estável, com flutuações dentro de um intervalo típico de sistemas proteicos estáveis, indicando manutenção da integridade conformacional do complexo.....**103**
- Figura 24** - Perfil de RMSF (nm) dos resíduos do complexo proteína–proteína ao longo da simulação de dinâmica molecular de 100 ns. Observa-se baixa flutuação na maior parte da estrutura, especialmente na região de interface, enquanto picos mais elevados concentram-se em regiões de loop e nas extremidades N- e C-terminais, refletindo flexibilidade conformacional local típica de regiões expostas ao solvente.....**105**
- Figura 25** - Evolução temporal da Área de Superfície Acessível ao Solvente (SASA) do complexo proteína–proteína ao longo de 100 ns de simulação de dinâmica molecular. Após um período inicial de acomodação estrutural, o sistema apresenta valores estáveis de SASA, indicando equilíbrio conformacional e manutenção da compactação estrutural ao longo da trajetória.....**106**
- Figura 26** - Deslocamento das distribuições de liberação entre 24 horas e 30 dias.....**110**
- Figura 27** - Evolução temporal da liberação média para os três modelos.....**111**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - As 10 principais revistas científicas que mais publicaram sobre imobilização enzimática entre 2015 e abril de 2025.....	38
Tabela 2 - Ranking das vinte palavras-chave mais relevantes mencionadas nos artigos analisados. TLS: Total Link Strength (Força Total do Link).....	41
Tabela 3 - Principais técnicas de imobilização enzimática aplicadas à papaína: princípios, vantagens, desvantagens e exemplos de suportes.....	47
Tabela 4 – Parâmetros experimentais e resultado do rendimento de imobilização da papaína.....	74
Tabela 5 - Principais interações intermoleculares identificadas no <i>docking</i> molecular entre a enzima COX-2 (receptor) e a papaína (ligante), indicando os resíduos envolvidos e as respectivas distâncias interatômicas (Å). Distâncias inferiores a 3.5 Å sugerem interações fortes, enquanto valores entre 3.5 e 5.0 Å indicam contatos de van der Waals ou interações eletrostáticas de menor intensidade.....	95
Tabela 6 - Viabilidade paramétrica nos cenários de 24 horas e 30 dias.....	108
Tabela 7 - Estatísticas descritivas de liberação em 24 horas.....	109
Tabela 8 - Tempos característicos medianos e janela terapêutica.....	110

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: Introdução e objetivos.....	17
1.1 INTRODUÇÃO.....	18
1.2 OBJETIVOS.....	22
1.2.1 Objetivo geral.....	22
1.2.2 Objetivos específicos.....	22
REFERÊNCIAS.....	23
CAPÍTULO II: Revisão Bibliométrica: Imobilização de papaína em matrizes de hidrogel para aplicações biotecnológicas.....	27
2.1 INTRODUÇÃO.....	28
2.2 METODOLOGIA.....	30
2.2.1 Estratégia de busca e seleção da literatura.....	30
2.2.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	31
2.2.3 Processo de triagem e organização dos dados.....	31
2.2.4 Análise quantitativa e mapeamento temático.....	32
2.2.5 Abordagem de engenharia e síntese crítica.....	32
2.3 ANÁLISE DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA E EVOLUÇÃO DA PESQUISA.....	33
2.3.1 Evolução temporal das publicações.....	33
2.3.2 Distribuição geográfica e principais atores científicos.....	34
2.3.3 Análise de palavras-chave e <i>clustering</i> temático.....	37
2.3.4 Integração entre materiais, métodos e desempenho.....	40
2.4 VISÃO GERAL DA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA PAPAÍNA EM MATRIZES DE HIDROGEL.....	42
2.4.1 Papaína: origem, extração, estrutura e propriedades funcionais.	42
2.4.2 Hidrogéis: conceito, classificação, propriedades e adequação como suporte.....	44
2.4.3 Técnicas de imobilização aplicadas à papaína.....	45
2.4.4 Fatores que afetam a eficiência da imobilização.....	49
2.4.5 Caracterização físico-química e desempenho do sistema imobilizado.....	50
2.4.6 Aplicações industriais e biomédicas da papaína imobilizada.....	51

2.4.7	Desafios de engenharia e critérios para o dimensionamento de sistemas de imobilização.....	52
2.4.8	Lacunas de pesquisa e necessidades de padronização.....	52
2.4.9	Implicações de engenharia e direções futuras.....	53
2.5	ANÁLISE PATENTÁRIA.....	53
2.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
	REFERÊNCIAS.....	57
CAPÍTULO III: Imobilização da papaína em hidrogel de tamarindo: preparo e avaliação da atividade enzimática.....		65
3.1	INTRODUÇÃO.....	66
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
3.2.1	Materiais.....	67
3.2.2	Métodos.....	68
3.2.2.1	Preparação do suporte de hidrogel de tamarindo.....	68
3.2.2.2	Ativação do suporte com Glutaraldeído (GLU).....	69
3.2.2.3	Determinação da atividade enzimática da papaína livre.....	69
3.2.2.4	Imobilização enzimática.....	70
3.2.2.5	Determinação atividade enzimática após imobilização.....	70
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
3.3.1	Estabilidade da papaína livre.....	71
3.3.2	Rendimento de imobilização no hidrogel de tamarindo.....	73
3.3.3	Caracterização por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	76
3.4	CONCLUSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS.....	80
CAPÍTULO IV: Estudo <i>in silico</i> da interação da papaína e análise computacional da liberação controlada.....		84
4.1	INTRODUÇÃO.....	85
4.2	METODOLOGIA.....	87
4.2.1	Docking molecular e análise de interações.....	87
4.2.2	Preparação das proteínas.....	87

4.2.2.1 Docking molecular.....	88
4.2.2.1.1 Análise das interações proteína-enzima.....	88
4.2.2.1.2 Dinâmica molecular.....	89
4.2.2.2 Ensaio in silico de liberação controlada.....	89
4.2.2.2.1 Modelos matemáticos de liberação controlada.....	90
4.2.2.2.2 Simulação Computacional, Análise de Sensibilidade e Critérios de Validação.....	92
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
4.3.1 Análise das interações entre os resíduos do receptor e do ligante...	92
4.3.2 Dinâmica molecular.....	97
4.3.2.1 Minimização de energia inicial.....	98
4.3.2.2 Equilibração 1 – Temperatura (NVT).....	99
4.3.2.3 Equilibração 2 – Pressão (NPT).....	100
4.3.2.4 Análise de Root Mean Square Deviation (RMSD)	102
4.3.2.5 Análise de Root Mean Square Fluctuation (RMSF)	103
4.3.3 Área de superfície acessível ao solvente (SASA).....	105
4.3.4 Ensaio in silico de liberação controlada.....	107
4.3.4.1 Viabilidade paramétrica dos modelos matemáticos.	107
4.3.4.2 Distribuições de liberação em 24 horas.....	108
4.3.4.3 Tempos característicos e janela terapêutica.....	109
4.3.4.4 Comparação entre cenários temporais.....	110
4.3.4.5 Síntese crítica dos resultados e implicações para a aplicação.....	111
4.4 CONCLUSÃO.....	111
REFERÊNCIAS.....	113
CAPÍTULO V: Considerações finais.....	119
5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	120

CAPÍTULO 1

Introdução e objetivos

1.1 INTRODUÇÃO

A imobilização de enzimas em matrizes poliméricas é uma estratégia bem estabelecida e amplamente empregada em biotecnologia porque melhora a estabilidade e a reutilização do catalisador. Em condições industriais, enzimas livres podem sofrer desativação devido a variações de temperatura, pH ou presença de solventes; a imobilização em materiais sólidos minimiza esses efeitos, mantendo a eficiência catalítica e facilitando a recuperação (Maghraby et al., 2023). A biocatálise, definida como o uso de moléculas biológicas (como enzimas) para acelerar e direcionar reações químicas, permite realizar processos sob condições de baixa temperatura e pressão, com alta seletividade e geração reduzida de resíduos, além de possibilitar o aproveitamento de recursos renováveis (Milagre, 2023). Esses atributos consolidam a biocatálise como parte central da engenharia bioquímica, área que impulsiona avanços científicos e tecnológicos ao propor soluções sustentáveis para a indústria (Florêncio; Oliveira Junior; Abud, 2021).

Nesse sentido, os hidrogéis emergem por serem derivados de polímeros naturais onde representam uma alternativa promissora dentro das aplicações biotecnológicas modernas (Florêncio; Oliveira Junior; Abud, 2021; Yuan et al., 2025). Tais materiais são formados por redes tridimensionais de macromoléculas capazes de absorver grandes quantidades de água sem se dissolver, graças a ligações cruzadas que mantêm a integridade do gel (Abreu et al., 2024). Essa estrutura confere propriedades próximas às de tecidos biológicos e permite ajustar características mecânicas, degradação, porosidade e resposta a estímulos (De Castro Bizerra, 2024). Como resultado, hidrogéis naturais são biocompatíveis, biodegradáveis e versáteis, podendo ser utilizados em sistemas de liberação controlada de fármacos, engenharia de tecidos, curativos para cicatrização e biossensores (Yuan et al., 2025). Logo, a busca por materiais sustentáveis, como as biomassas, vem intensificando o desenvolvimento de hidrogéis a partir de fontes renováveis, capazes de substituir polímeros sintéticos e melhorar o desempenho dos sistemas de engenharia bioquímica (Berradi et al., 2023).

Assim, entre as biomassas exploradas para obtenção de polímeros naturais, o tamarindo (*Tamarindus indica L.*) destaca-se por ser um fruto com ocorrência predominantemente em regiões tropicais e semiáridas, apresentando capacidade de crescer em diferentes solos e tolerância à seca (Raj; Lee, 2024). Na África e na Ásia, o tamarindo fornece frutos para alimentação e medicina popular, enquanto suas sementes e outras partes geram renda para comunidades rurais. Além de sua importância

socioeconômica, a árvore possui sistema radicular profundo que contribui para a adaptação em ambientes áridos, por isso, seu cultivo é indicado para programas de reflorestamento em áreas semiáridas (Zelek et al., 2021).

No contexto do semiárido nordestino brasileiro, o aproveitamento da biomassa do tamarindo, especialmente das sementes, subproduto da indústria de polpa, representa uma oportunidade de integrar a agricultura familiar aos princípios da economia circular, contribuindo para o melhor aproveitamento de resíduos agroindustriais e para o fortalecimento de cadeias produtivas locais (Geissdoerfer et al., 2017). A economia circular pode ser entendida como um modelo econômico que busca manter produtos, componentes e materiais em uso pelo maior tempo possível por meio de estratégias como reutilização, reparo e remanufatura de modo a reduzir a geração de resíduos e a extração de novos recursos naturais (Kirchherr; Reike; Hekkert, 2017).

Ainda, o extrato das folhas e frutos de tamarindo apresentam elevada capacidade antioxidante e baixa toxicidade, característica atribuída à presença de flavonoides e ácidos fenólicos capazes de sequestrar radicais livres (Nasser e Masmali, 2022). Estudos de toxicidade oral indicam que doses elevadas desses extratos não causam efeitos adversos em modelos animais (Sookying et al., 2022), reforçando seu potencial para aplicações alimentícias e farmacêuticas. As sementes, por sua vez, são ricas em proteínas, carboidratos e lipídios, e constituem importante fonte de minerais como cálcio, magnésio e potássio (De Castro Bizerra, 2024; Raj; Lee, 2024). O aproveitamento dessas sementes, muitas vezes descartadas após a extração da polpa, abre caminho para valorizar um resíduo agroindustrial e enriquecer a dieta de comunidades locais (Raj; Lee, 2024; Chinta et al., 2025).

O principal componente das sementes de tamarindo é o polissacarídeo xiloglucano, um polímero hidrofílico capaz de formar géis mucilaginosos. Esse polissacarídeo apresenta tendência à autoagregação em solução aquosa por meio de pontes de hidrogênio entre suas cadeias laterais, permitindo atingir a concentração crítica de micelas mais rapidamente que xiloglucanos de outras plantas (El-Gazzar, 2024). A partir dessa estrutura, a goma de tamarindo exibe comportamento pseudoplástico, formando soluções coloidais viscosas e hidrogéis com grande capacidade de alta hidratação (Sri et al., 2025). Essas propriedades, somadas à biocompatibilidade e baixa toxicidade, fazem do xiloglucano um agente espessante, gelificante, emulsificante e estabilizante de interesse para alimentos, cosméticos e fármacos (Geethalaxmi et al., 2024). Além disso, a goma apresenta atividade mucoadesiva e mucomimética, que

apresentam, respectivamente, a capacidade de aderir a superfícies mucosas e de imitar as propriedades naturais do muco, características estas que são fundamentais para aumentar o tempo de residência e a absorção de medicamentos em mucosas, conforme demonstrado em formulações oftálmicas que empregaram o polissacarídeo para prolongar a permanência de antibióticos na córnea (Ghelardi, et al., 2004).

Para tal, o desenvolvimento de hidrogéis de tamarindo aproveita a capacidade dessa goma de formar matrizes biodegradáveis e estruturalmente estáveis de modo a servir como excipientes farmacêuticos e como suportes para imobilização de biomoléculas, permitindo a liberação controlada de fármacos e enzimas (Ghelardi, et al., 2004). Ao transformar as sementes em hidrogéis, agrega-se valor a um resíduo da agroindústria, reforçando princípios de economia circular e sustentabilidade regional (Geissdoerfer et al., 2017). No semiárido nordestino, essa abordagem é particularmente relevante, pois combina a utilização de uma biomassa abundante com a criação de produtos de alto valor agregado, incentivando cadeias produtivas locais e a valorização de resíduos agroindustriais (Mirabella; Castellani; Sala, 2014). Nesse contexto, a utilização desses hidrogéis como matrizes para imobilização de enzimas destaca-se como uma estratégia promissora para ampliar suas aplicações biotecnológicas e farmacêuticas (Ghelardi, et al., 2004).

Assim, as enzimas são tidas como catalisadores biológicos eficientes; sua especificidade e capacidade de atuar sob condições brandas tornam-nas fundamentais em processos biológicos e industriais (Bat-Ozmatara; Ünlü; Gevrek, 2023). Entre elas, destaca-se a papaína, protease extraída do látex do mamão (*Carica papaya*), que apresenta amplo intervalo de pH e temperatura de atividade (ótimo entre 4–9 de pH e 40–80 °C) e mantém elevada eficiência catalítica segundo descrito por Bat-Ozmatara; Ünlü; Gevrek (2023); Feng et al (2022) e Salehipoor et al (2023). Por essas características, a papaína é empregada na indústria alimentícia (clarificação de bebidas, amaciamento de carnes), farmacêutica (formulação de medicamentos para feridas e distúrbios digestivos) e cosmética (produtos esfoliantes e cicatrizantes), visto que, proteases desse tipo participam de processos fisiológicos em plantas e animais e são alvos estratégicos no desenvolvimento de fármacos (Petushkova, 2024). Diante dessa ampla aplicabilidade, torna-se fundamental empregar métodos confiáveis para avaliar sua atividade catalítica e desempenho enzimático (Tacias-Pascacio et al., 2021).

Para avaliar a atividade catalítica de proteases como a papaína, a coagulação do leite constitui um ensaio clássico (Hafid et al., 2020). Nessa abordagem, a capacidade da

enzima de hidrolisar as caseínas é medida pela formação de coágulos, onde nesse método, uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima necessária para coagular 1 mL de leite desnatado em 40 min a 35 °C (Borella et al., 2016). O método é amplamente utilizado na indústria de alimentos para comparar a eficiência de enzimas livres e imobilizadas e para monitorar possíveis alterações de desempenho decorrentes de processos de imobilização (Zhang et al., 2024).

Ainda, no tange à imobilização de enzimas, imobilizar papaína em matrizes poliméricas aumenta a estabilidade térmica e operacional e facilita sua recuperação e reutilização (Tacias-Pascacio et al., 2021). Estudos de imobilização covalente de proteases demonstraram que a fixação em suportes sólidos confere maior resistência à desativação e permite modulação de propriedades catalíticas (Cahyaningrum et al., 2008). Entre os suportes estudados, hidrogéis de goma de tamarindo combinam biocompatibilidade, baixo custo e capacidade de reter e liberar a enzima de forma sustentada, sendo opções atrativas para processos biocatalíticos em meio aquoso ou pouco aquoso (Tang; Oku; Matsuda, 2024).

Além das abordagens experimentais, ferramentas computacionais, como o *docking* molecular, têm sido utilizadas para investigar interações entre enzimas e suportes (Bhattacharjee; Alonso-Cotchico; Lucas, 2023). Essas simulações fornecem informações sobre afinidade de ligação, estabilidade conformacional e restrições estruturais impostas pela matriz, auxiliando na interpretação de resultados e na otimização de sistemas de imobilização (Madadi; Khoee; Layegh, 2024). Ao integrar experimentos de imobilização de papaína em hidrogéis de tamarindo com estudos *in silico*, espera-se compreender melhor os mecanismos de interação enzima/matriz e projetar sistemas de liberação controlada com desempenho superior (Bhattacharjee; Alonso-Cotchico; Lucas, 2023; Madadi; Khoee; Layegh, 2024).

Neste estudo, foi proposto avaliar a eficiência de um biocatalisador baseado em papaína imobilizada em hidrogel de tamarindo. Foram investigadas a manutenção da atividade catalítica e a estabilidade da enzima após a imobilização, utilizando a metodologia de coagulação do leite como ensaio modelo. Paralelamente, empregaremos *docking* molecular para elucidar as interações entre a papaína e a rede de xiloglucano, contribuindo para o entendimento dos mecanismos de imobilização. Além do avanço científico, a utilização de sementes de tamarindo, biomassa abundante no semiárido nordestino, como matéria-prima promove a economia circular regional e oferece novas aplicações industriais para recursos locais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho catalítico e o potencial de liberação controlada da papaína imobilizada em hidrogel de tamarindo, integrando ensaios experimentais e análises *in silico*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Preparar hidrogéis da semente de tamarindo reticulados com glutaraldeído;
- Imobilizar covalentemente a papaína na matriz polimérica, avaliando a eficiência do processo;
- Caracterizar estruturalmente o hidrogel e o biocatalisador por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
- Avaliar a atividade catalítica da papaína livre e imobilizada por meio do ensaio de coagulação do leite;
- Investigar, por *docking* molecular, as interações proteína-proteína;
- Modelar *in silico* o potencial perfil de liberação da papaína a partir do hidrogel.

REFERÊNCIAS

CARDOSO, Gustavo Luiz Bueno; OLIVEIRA, Ivone Regina de. **Produção de hidrogéis naturais e sintéticos e suas aplicações na engenharia biomédica**: revisão de literatura. São José dos Campos, SP: Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, 2024. Disponível em: https://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2024/anais/arquivos/0737_0981_01.pdf. Acesso em: 5 out. 2025.

BAT-OZMATARA, Merve; ÜNLÜ, Aişe; GEVREK, Tugce Nihal. Preparation of isocyanate-containing hydrogel films as antibacterial enzyme immobilization matrices. **Reactive and Functional Polymers**, v. 192, p. 105695, 1 nov. 2023.

BERRADI, Achraf; AZIZ, Faissal; EL ACHABY, Mounir; OUZZANI, Naaila; MANDI, Laila. A comprehensive review of polysaccharide-based hydrogels as promising biomaterials. **Polymers**, v. 15, n. 13, p. 2908, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym15132908>.

BHATTACHARJEE, N.; ALONSO-COTCHICO, L.; LUCAS, M. F. Enzyme immobilization studied through molecular dynamic simulations. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 11, p. 1-15, 2023. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1200293. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2023.1200293>. Acesso em: 3 jan. 2026.

BIZERRA, Viviane de Castro. **Imobilização da Lipase Eversa® Transform 2.0 em Hidrogel de Tamarindo e sua aplicação na síntese de ésteres**: butirato de metila e butirato de etila. 2024. 97p. Dissertação (Mestrado em Energia e Ambiente) - Programa de Pós-graduação em Energia e Ambiente (PGEA), Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB, Redenção, 2024.

BORELLA, Júlio César; SIMÕES, Renata Filiettaz; PUGA, Robison Leandro Aparecido; STEVANATO, Marise C. Bastos. Avaliação da estabilidade e da atividade enzimática de soluções de papaína utilizadas no desbridamento e cicatrização de feridas. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 28, n. 3, p. 179–184, 2016. DOI: 10.14450/2318-9312.v28.e3.a2016.pp179-184. Disponível em: <https://revistas.cff.org.br/infarma/article/view/1735>. Acesso em: 2 out. 2025.

CAHYANINGRUM, Sari Edi et al. Imobilização de papaína em quitosana. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 372–376, jun. 2010. Disponível em: <https://journal.ugm.ac.id/ijc/article/view/21609/14314>. Acesso em: 5 out. 2025. DOI: 10.22146/ijc.21609.

CHINTA, M. L.; GANDAM, P. K.; SIVASANKAR, M. V.; PARCHA, S. R. Tamarind (Tamarindus indica L.) Seed Polysaccharide: A promising biopolymer for drug delivery, wound healing, tissue engineering and beyond. **Carbohydrate Research**, v. 552, p. 109454, 2025.

EL-GAZZAR, N. S. Composição química e atividades biológicas do gênero Tamarind. **Natural Product Research**, v. 39, n. 4, p. 935–947, 2024. Disponível em: <https://doi.org.ez373.periodicos.capes.gov.br/10.1080/14786419.2024.2323531>.

FENG, Yuxiao et al. Hierarchical micro- and mesoporous ZIF-8 with core-shell superstructures using colloidal metal sulfates as soft templates for enzyme immobilization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 610, p. 709–718, 15 mar. 2022.

FLORÊNCIO, M. N. S.; OLIVEIRA JUNIOR, A. M.; ABUD, A. K. S. Desenvolvimento tecnológico da biotecnologia para a saúde no Brasil. **International Journal of Innovation**, v. 8, n. 3, p. 541–563, 2021. DOI: 10.5585/iji.v8i3.17928.

GEETHALAXMI, M. et al. Physicochemical and bioactive characterization of Tamarindus indica seeds: a potential source for polysaccharide extraction and hydrogel formation. **Food & Function**, 2024. DOI: 10.1039/D4FB00224E.

GEISSDOERFER, Martin; SAVAGET, Paulo; BOCKEN, Nancy M. P.; HULTINK, Erik Jan. The Circular Economy – A new sustainability paradigm? **Journal of Cleaner Production**, v. 143, p. 757–768, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.048>.

GHELARDI, Emilia et al. A mucoadhesive polymer extracted from tamarind seed improves the intraocular penetration and efficacy of rifloxacin in topical treatment of experimental bacterial keratitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 9, p. 3396–3401, 2004. DOI: 10.1128/AAC.48.9.3396-3401.2004.

HAFID, K. et al. One-step recovery of latex papain from Carica papaya using three-phase partitioning and its use as milk-clotting and meat-tenderizing agent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 798–806, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.048>.

KIRCHHERR, Julian; REIKE, Denise; HEKKERT, Marko. Conceptualizing the circular economy: An analysis of 114 definitions. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 127, p. 221–232, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.09.005>.

MADADI, Mozhdeh; KHOEE, Sepideh; LAYEGH, Hesam. Experimental and molecular docking studies on enzyme-driven biohybrid-inspired micromotors based on amylose-b-(PEG-co-PBA) inclusion complexes. **Langmuir**, [s. l.], v. 40, n. 10, p. 5214–5227, mar. 2024. DOI: 10.1021/acs.langmuir.3c03440. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c03440>. Acesso em: 3 jan. 2026.

MAGHRABY, Y. R.; EL-SHABASY, R. M.; IBRAHIM, A. H.; AZZAZY, H. M. E. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. **ACS Omega**, v. 8, n. 6, p. 5184–5196, 31 jan. 2023. DOI: 10.1021/acsomega.2c07560.

MILAGRE, Cíntia Duarte de Freitas. **Biocatálise**: a escolha por uma estratégia mais sustentável. Araraquara: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Química, 2023. Texto de Livre Docência. Disponível em:

<https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/5904a5c8-2454-4cd1-b8d4-92607d6ab7a4/content>. Acesso em: 7 out. 2025.

MIRABELLA, Nadia; CASTELLANI, Valentina; SALA, Serenella. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 65, p. 28–41, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.10.051>.

NASSER, R. M.; MASMALI, N. M. A eficácia dos extratos de Tamarindus Indica como inibidor de corrosão de metais em diversas circunstâncias. **Métodos e Materiais Anticorrosivos**, v. 69, n. 3, p. 224-233, 2022.

PETUSHKOVA, Anastasiia I.; SAVVATEEVA, L. V.; ZAMYATNIN, A. A. Jr. Structure determinants defining the specificity of papain-like cysteine proteases. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 20, p. 6552–6569, 2022. DOI: [10.1016/j.csbj.2022.11.040](https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.11.040).

RAJ, V.; LEE, S. Progresso de ponta no polissacarídeo da semente de tamarindo (Tamarindus indica) e suas diversas aplicações potenciais, uma revisão com insights. **Carbohydrate Polymers**, v. 331, 121847, 2024.

SALEHIPOUR, Masoud et al. Recent advances in preparation of polymer hydrogel composites and their applications in enzyme immobilization. **Polymer Bulletin**, v. 80, n. 6, p. 5861–5896, 16 jun. 2023.

SOOKYING, S.; DUANGJAI, A.; SAOKAEW, S.; PHISALPRAPA, P. Aspectos botânicos, fitoquímicos e toxicidade da folha de Tamarindus indica e uma revisão sistemática das capacidades antioxidantes dos extratos da folha de T. indica. **Frontiers in nutrition**, v. 9, 977015, 2022.

SRI, R.; GHOSH, T.; BV, B.; LP, P. Formulações à base de polímeros de semente de tamarindo: avanços e aplicações na ciência biomédica. **Journal of Biomaterials Science, Edição Polímero**, v. 36, n. 14, p. 2085–2108, 2025. Disponível em: <https://doi.org/ez373.periodicos.capes.gov.br/10.1080/09205063.2025.2491604>.

TACIAS-PASCACIO, V. G. et al. Immobilization of papain: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 188, p. 94-113, 2021.

TANG, Zhongyao; OKU, Yuri; MATSUDA, Tomoko. Application of immobilized enzymes in flow biocatalysis for efficient synthesis. **Organic Process Research & Development**, v. 28, n. 5, p. 1308–1326, 17 maio 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.3c00405>. Acesso em: 7 out. 2025.

YUAN, Zhong-Zhu et al. A bibliometric analysis of hydrogel research in various fields: the trends and evolution of hydrogel application. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 23, n. 1, p. 70, 2025. DOI: [10.1186/s12951-025-03090-x](https://doi.org/10.1186/s12951-025-03090-x).

ZELEKE, Gizachew et al. Land-use impact on stand structure and fruit yield of Tamarindus indica L. in the drylands of southeastern Ethiopia. **Life**, Basel, v. 11, n. 5, p. 408, 2021. DOI: [10.3390/life11050408](https://doi.org/10.3390/life11050408).

ZHANG, L.; WU, G.; LI, D.; HUANG, A.; WANG, X. Isolation and identification of milk-clotting proteases and their application in cheese processing. **Food Research International**, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114225>

CAPÍTULO 2

Revisão Bibliométrica: Imobilização de papaína em matrizes de hidrogel para aplicações biotecnológicas

RESUMO

A imobilização de enzimas em suportes poliméricos é essencial para aumentar a estabilidade, a reutilização e o desempenho catalítico em processos biotecnológicos. A papaína, uma protease amplamente utilizada na indústria, destaca-se nesse contexto, sendo as matrizes de hidrogel atrativas devido à sua biocompatibilidade e versatilidade estrutural. Este estudo analisa a evolução científica da imobilização de papaína em hidrogéis (2015–2025), com foco em materiais, métodos e aplicações sob uma perspectiva de engenharia. A análise, baseada em um levantamento estruturado na Web of Science, revela crescimento consistente na produção científica, com predominância de hidrogéis de alginato, quitosana, gelatina e polímeros acrílicos. Estratégias recorrentes incluem encapsulamento, adsorção física e ligação covalente. O desempenho catalítico é fortemente influenciado pela porosidade, grau de reticulação e estabilidade mecânica da matriz. A análise crítica destaca desafios como perda de atividade em ciclos sucessivos, lixiviação enzimática, limitações de transferência de massa e falta de padronização nas avaliações. Além disso, identifica-se uma lacuna na escalabilidade dos sistemas e na integração entre engenharia de materiais e engenharia de processos. Conclui-se que os avanços na área dependem do desenho racional das matrizes, da adoção de sistemas híbridos e de testes em condições industriais reais. Em síntese, este estudo oferece uma visão integrada das tendências e desafios, fornecendo bases técnicas para o desenvolvimento de sistemas biocatalíticos mais robustos e escaláveis para a biotecnologia.

Palavras-chave: Papaína; Imobilização enzimática; Matrizes de hidrogel; Aplicações biotecnológicas; Desempenho catalítico.

2.1 INTRODUÇÃO

O uso de enzimas como catalisadores em processos industriais tem crescido de forma consistente devido à sua alta especificidade, eficiência catalítica e operação sob condições brandas de temperatura e pH, características estas que contribuem para o desenvolvimento de processos mais sustentáveis e energeticamente eficientes (Bat-Ozmatara; Ünlü; Gevrek, 2023; Feng et al., 2022; Salehipour et al., 2023). Sua aplicação prática remonta à antiguidade na produção de alimentos e têxteis, mas atualmente elas consolidaram sua presença em setores de alta tecnologia (Maghraby et al., 2023). Entre essas biomoléculas, a papaína, uma protease cisteínica extraída do látex de *Carica papaya*, destaca-se por sua ampla aplicabilidade em setores como alimentos, farmacêutico, cosmético, biomateriais e biotecnologia ambiental, devido à sua alta atividade proteolítica, custo relativamente baixo e disponibilidade comercial (Salehipour et al., 2023).

Apesar de suas vantagens catalíticas, a aplicação direta da papaína em sistemas industriais é limitada por fatores como instabilidade estrutural, sensibilidade a variações

de pH e temperatura, autólise, dificuldade de recuperação do meio reacional e perda progressiva de atividade durante o uso (Feng et al., 2022; Maghraby et al., 2023). Esses desafios comprometem a viabilidade operacional e econômica do processo, especialmente em sistemas contínuos ou de múltiplos ciclos, tornando necessária a adoção de estratégias que aumentem a robustez e a reutilização da enzima (Bat-Ozmatara; Ünlü; Gevrek, 2023).

Nesse contexto, a imobilização enzimática, definida como a fixação de uma enzima a uma fase sólida distinta do substrato, consolidou-se como uma abordagem fundamental para superar essas limitações (Wahab et al., 2020). Essa técnica permite melhorias na estabilidade térmica e operacional, facilita a separação do biocatalisador, amplia o tempo de prateleira e viabiliza a aplicação em escala industrial (Maghraby et al., 2023). A escolha do suporte exerce papel decisivo no desempenho do sistema, pois influencia diretamente a acessibilidade do sítio ativo, a difusão do substrato e a integridade estrutural da enzima (Wahab et al., 2020).

Entre os diferentes suportes disponíveis, as matrizes de hidrogel têm recebido atenção crescente. Compostas por redes poliméricas tridimensionais altamente hidrofílicas, os hidrogéis oferecem um microambiente aquoso favorável à manutenção da atividade catalítica (Bat-Ozmatara; Ünlü; Gevrek, 2023; Salehipour et al., 2023). Sua biocompatibilidade, flexibilidade estrutural e a possibilidade de ajuste fino de propriedades físico-químicas, como porosidade e responsividade a estímulos, tornam-nos ideais para aplicações que vão de biossensores à biocatálise industrial (Park et al., 2015; Salehipour et al., 2023). Hidrogéis naturais e sintéticos, incluindo alginato, quitosana e sistemas híbridos, têm sido investigados como matrizes para imobilização de papaína, empregando estratégias como encapsulamento ou ligação covalente.

Sob a perspectiva da engenharia de materiais, o desempenho da papaína imobilizada está intimamente relacionado à interação entre a enzima e a matriz polimérica. Avanços recentes no desenvolvimento dessas redes reticuladas permitiram mitigar problemas de desnaturação e limitações difusionais (Salehipour et al., 2023). Entretanto, observa-se fragmentação do conhecimento na literatura, com foco restrito em aplicações isoladas. Nesse cenário, o uso de análises bibliométricas avançadas torna-se essencial, pois permite sintetizar atividades científicas, identificar tendências (“hotspots”) e mapear a evolução do campo por métodos matemático-estatísticos (De Castro Bizerra et al., 2024; Neto et al., 2023). Tais ferramentas possibilitam comparar contribuições entre

países, instituições e autores, além de prever direções futuras de pesquisa (Rodrigues et al., 2023; Sales et al., 2023).

Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo conduzir uma análise bibliométrica abrangente e inédita da evolução científica e tecnológica da imobilização de papaína em matrizes de hidrogel (de 2015 a abril de 2025). Ao integrar a análise sistemática da produção científica com uma discussão orientada pela engenharia, este estudo busca fornecer suporte técnico para o desenvolvimento de sistemas mais robustos, respondendo às seguintes questões de pesquisa:

- **RQ1.** Como evoluiu a produção científica relacionada à imobilização de enzimas em matrizes de hidrogel?
- **RQ2.** Quais autores se destacam nas pesquisas sobre imobilização enzimática?
- **RQ3.** Quais subáreas emergentes se desenvolveram em torno da imobilização de papaína em hidrogéis, segundo a literatura recente?
- **RQ4.** Quais são os principais hotspots utilizados na busca bibliográfica.

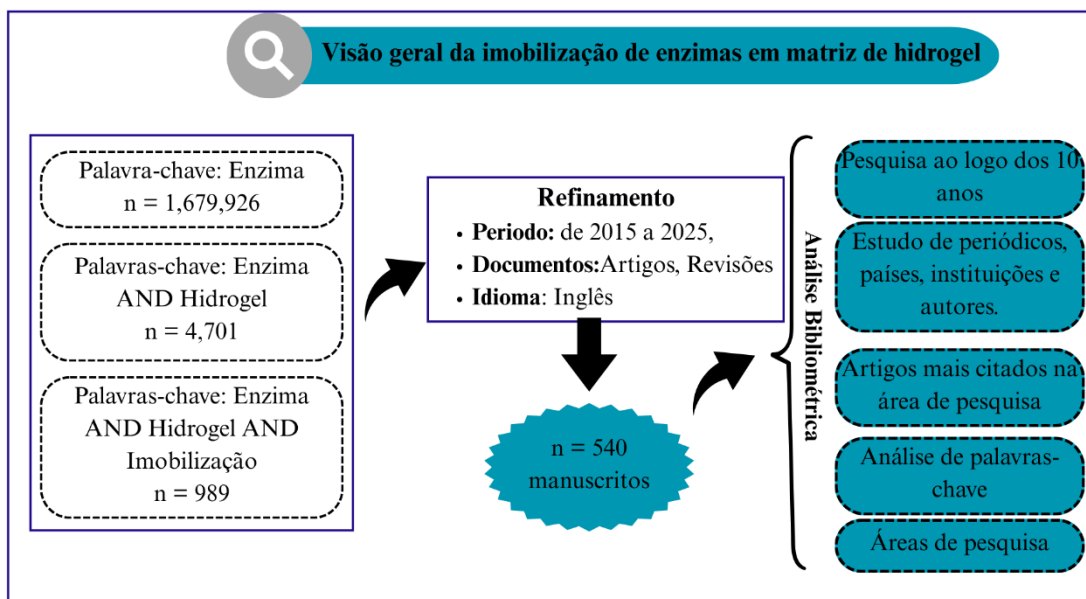
2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Estratégia de busca e seleção da literatura

Este estudo foi conduzido com base em uma abordagem estruturada para análise da literatura científica, combinando princípios de revisão sistemática com técnicas quantitativas para analisar a produção científica. A base Web of Science Core Collection foi adotada como principal fonte de informação devido à sua ampla cobertura de periódicos de alto impacto nas áreas de engenharia, biotecnologia e ciência dos materiais, sendo reconhecida como uma base de interesse acadêmico amplo (Dari et al., 2024; Sales et al., 2023).

A busca bibliográfica abrangeu o período de 2015 a 2025, considerando a consolidação recente de pesquisas envolvendo a imobilização de papaína em matrizes de hidrogel e o avanço de novos materiais e estratégias de engenharia para suportes poliméricos. Os termos de busca foram definidos por combinações de palavras-chave relacionadas ao tema central, incluindo papaína, imobilização enzimática, hidrogel, matrizes de hidrogel e biocatálise, aplicadas aos campos de título, resumo e palavras-chave dos registros indexados. O fluxo sistemático de seleção está detalhado na figura 1.

Figura 1- Fluxograma da estratégia de busca, refinamento dos resultados e análise bibliométrica sobre imobilização de enzimas em matriz de hidrogel.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

2.2.2 Critérios de inclusão e exclusão

Os estudos recuperados na etapa inicial de busca passaram por um processo de triagem em múltiplas fases. Foram incluídos artigos científicos revisados por pares publicados em periódicos que abordassem explicitamente a imobilização de papaína em matrizes de hidrogel, independentemente do método de imobilização ou da aplicação final, desde que apresentassem informações relevantes sobre materiais, desempenho catalítico ou aplicações biotecnológicas.

Foram excluídos trabalhos duplicados, publicações sobre outras enzimas sem menção direta à papaína, estudos que tratassem apenas de hidrogéis sem aplicação em imobilização enzimática, bem como documentos como resumos de congresso, patentes, capítulos de livros e trabalhos sem acesso ao texto completo. Artigos que mencionassem papaína apenas de forma tangencial, sem análise experimental ou técnica relevante, também foram descartados.

2.2.3 Processo de triagem e organização dos dados

A triagem dos estudos foi realizada em três etapas consecutivas: (i) análise do título; (ii) leitura do resumo; e (iii) avaliação do texto completo.

Após a aplicação dos critérios de elegibilidade, os registros selecionados foram organizados em um banco de dados próprio (Microsoft Excel 365), contendo informações bibliográficas (ano de publicação, autores, países, periódicos), bem como dados técnicos relacionados aos tipos de hidrogéis utilizados, métodos de imobilização, propriedades avaliadas e áreas de aplicação. Esse processo de organização manual visa garantir a confiabilidade dos resultados (Alaeddini; Hajizadeh; Reaidy, 2023).

2.2.4 Análise quantitativa e mapeamento temático

A análise da produção científica foi conduzida por métodos quantitativos, incluindo a avaliação da evolução temporal das publicações, a identificação dos principais países, instituições, periódicos e autores atuantes no campo, bem como análise de coocorrência de palavras-chave. Para construir redes de interação e clusters, foi utilizado o software VOSviewer, permitindo identificar padrões de crescimento com base na métrica de Força Total de Ligação (Total Link Strength – TLS) (De Castro Bizerra et al., 2024; Neto et al., 2023). Além disso, o pacote Bibliometrix (R) foi empregado para fornecer análises estatísticas avançadas e tendências do campo.

Adicionalmente, foi realizada uma análise temática orientada pela engenharia, na qual os estudos selecionados foram classificados conforme: (i) tipo de matriz de hidrogel (natural, sintética ou híbrida); (ii) método de imobilização da papaína; (iii) parâmetros de desempenho catalítico e estabilidade; e (iv) aplicações biotecnológicas reportadas.

2.2.5 Abordagem de engenharia e síntese crítica

Além da análise quantitativa, foi realizada uma síntese crítica dos estudos selecionados sob a perspectiva de engenharia de materiais e de processos. Foram analisados aspectos recorrentes relacionados à estabilidade operacional da papaína imobilizada, limitações de transferência de massa, resistência mecânica dos hidrogéis, lixiviação enzimática e desafios de escalabilidade (Rodrigues et al., 2023).

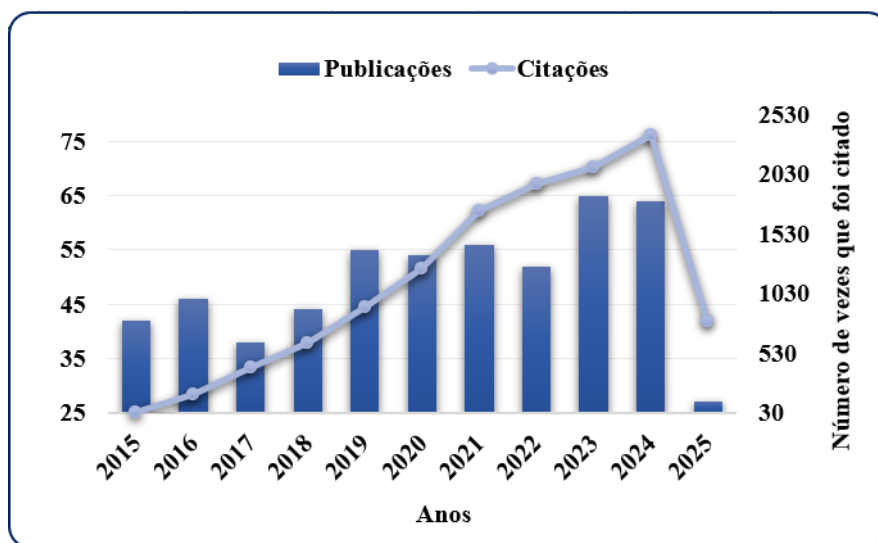
A combinação de análise quantitativa da literatura com avaliação qualitativa orientada pela engenharia permitiu identificar lacunas tecnológicas, limitações metodológicas e oportunidades de avanço no desenvolvimento de sistemas de imobilização de papaína em matrizes de hidrogel, fornecendo base sólida para as discussões e conclusões apresentadas neste trabalho (Sales et al., 2023).

2.3 ANÁLISE DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA E EVOLUÇÃO DA PESQUISA

2.3.1 Evolução temporal das publicações

A evolução temporal da produção científica relacionada à imobilização de papaína em matrizes de hidrogel mostra crescimento consistente ao longo do período analisado (2015–2025), refletindo o crescente interesse em sistemas biocatalíticos mais estáveis, reutilizáveis e adaptáveis a diferentes aplicações biotecnológicas (Bat-Ozmatara; Ünlü; Gevrek, 2023). Conforme ilustrado na figura 2, observa-se aumento moderado no número de publicações — de 42 em 2015 para mais de 60 em 2024 — enquanto o impacto das citações saltou de menos de 40 para quase 2.400 no mesmo período. Nos primeiros anos do intervalo avaliado, observa-se número relativamente pequeno de publicações, concentradas principalmente em estudos exploratórios envolvendo hidrogéis naturais e métodos simples de encapsulamento.

Figura 2 - Tendência global de publicações e citações anuais relacionadas à pesquisa sobre imobilização de enzimas em matriz de hidrogel de 2015 a abril de 2025.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

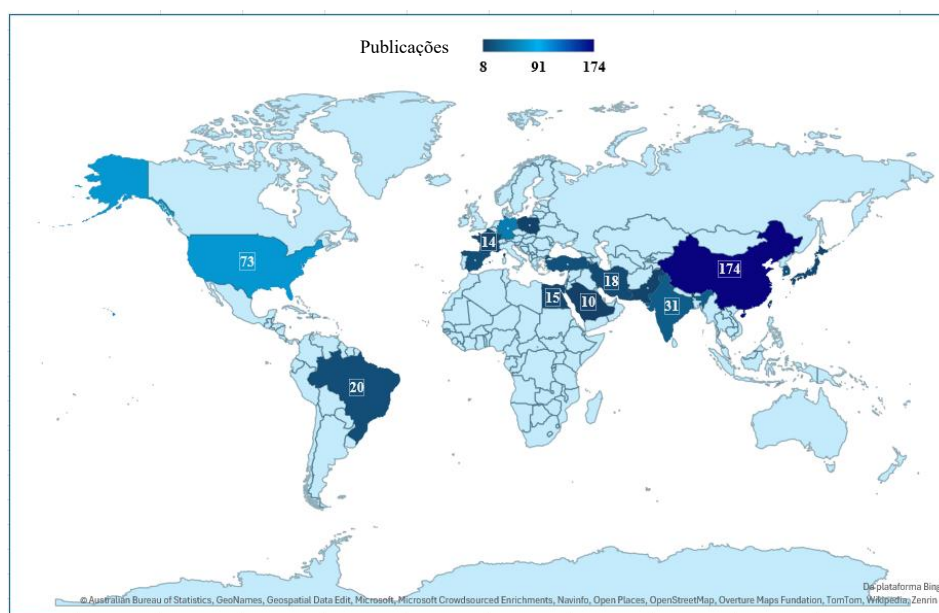
A partir de aproximadamente 2018, há aumento mais acentuado no volume de artigos publicados, coincidindo com o avanço de novos materiais poliméricos, o desenvolvimento de hidrogéis híbridos e o fortalecimento da engenharia de biomateriais aplicada à imobilização enzimática (Feng et al., 2022). Esse crescimento tornou-se ainda mais significativo nos últimos anos, indicando a consolidação do tema como uma área de pesquisa madura e interdisciplinar, com contribuições da engenharia química, de materiais, biomédica e de processos. Essa tendência sugere uma transição do uso de

papaína imobilizada em estudos de prova de conceito para aplicações mais complexas, incluindo sistemas multifuncionais, materiais responsivos a estímulos e estratégias voltadas à melhoria do desempenho catalítico e da estabilidade operacional (Salehipour et al., 2023).

2.3.2 Distribuição geográfica e principais atores científicos

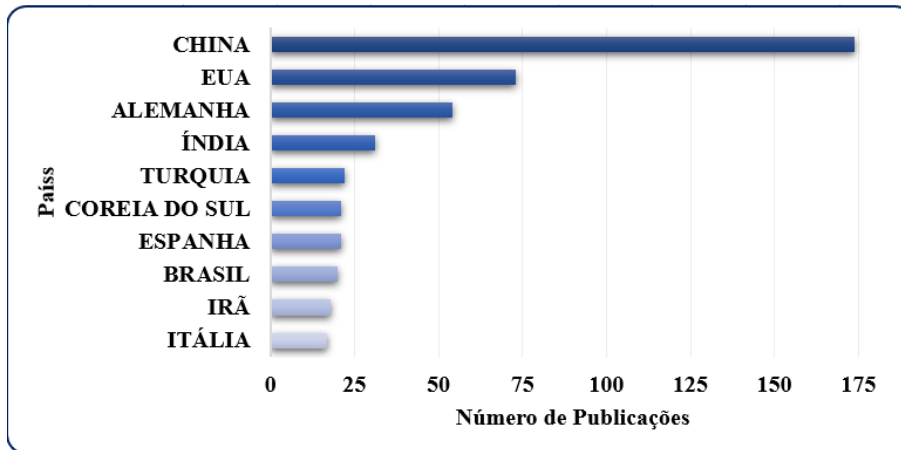
A análise da distribuição geográfica das publicações revela forte concentração da produção científica em países com tradição consolidada em biotecnologia e ciência dos materiais. Nações como China, Índia, Brasil e Estados Unidos aparecem como os principais polos de pesquisa, refletindo investimentos contínuos em biocatálise, biomateriais e aplicações industriais baseadas em enzimas, conforme mostrado no mapeamento global da figura 3 e no ranking de produtividade da figura 4.

Figura 3 - Distribuição mundial da pesquisa sobre imobilização de enzimas em matriz de hidrogel de 2015 a abril de 2025. A densidade de publicação é representada por uma escala de cores.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

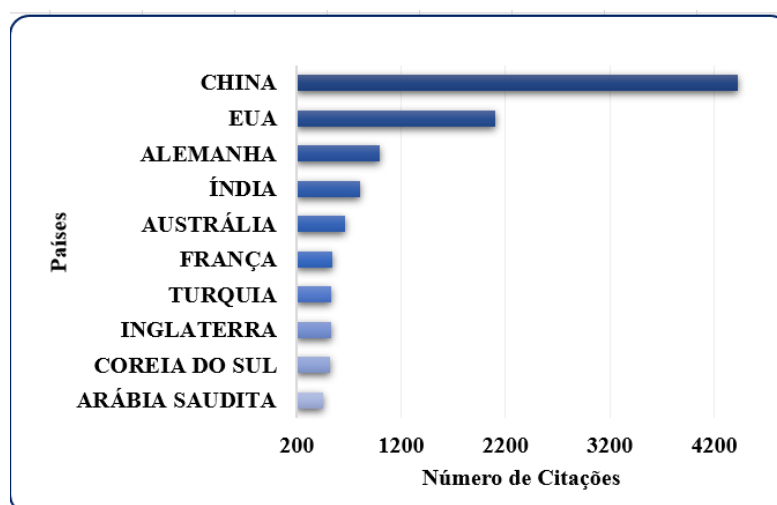
Figura 4 - Classificação dos dez países com o maior número de publicações na área de imobilização de enzimas em matrizes de hidrogel de 2015 a abril de 2025.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

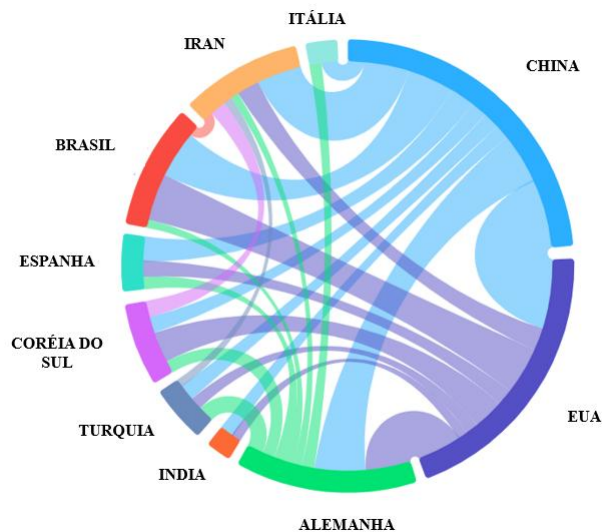
A China destaca-se como líder absoluta em volume e impacto, alcançando mais de 4.000 citações (Figura 5). Instituições acadêmicas lideram o desenvolvimento de novas matrizes, com destaque para os clusters de cooperação na figura 7(B), liderados pela Chinese Academy of Sciences. A rede de cooperação internacional (Figura 6) e o mapa de cocitação entre países (Figura 7(A)) reforçam que China, Estados Unidos e Alemanha atuam como colaboradores-chave na articulação de parcerias globais (Rodrigues et al., 2023).

Figura 5 - Classificação dos dez países com maior frequência de citações de suas publicações na área de imobilização de enzimas em matrizes de hidrogel de 2015 a abril de 2025.



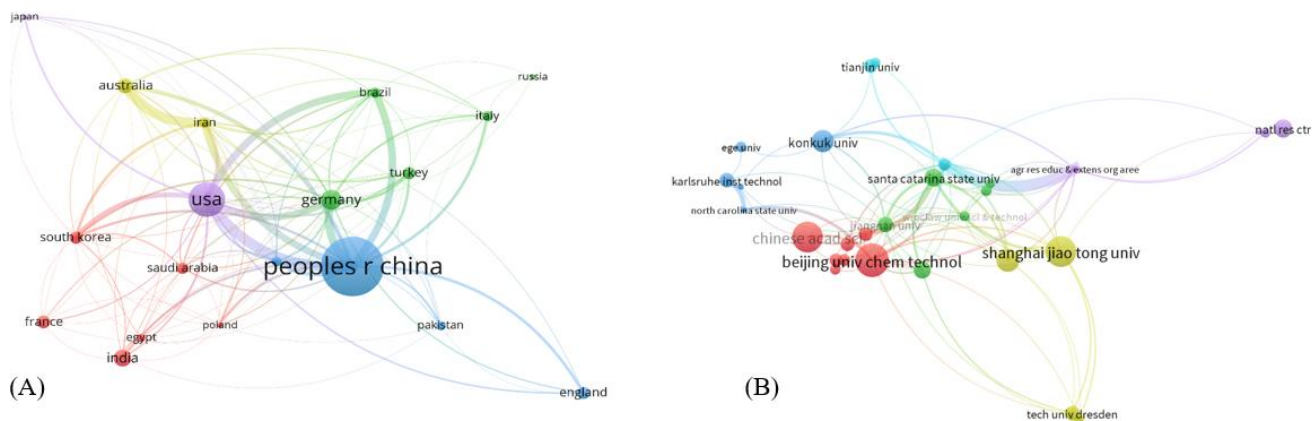
Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Figura 6 - Distribuição e cooperação internacional de países/regiões envolvidos na imobilização de enzimas em matrizes de hidrogel de 2015 a abril de 2025.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Figura 7- Mapas bibliométricos do campo de imobilização enzimática em matrizes de hidrogel: (A) mapa de cocitação entre países/regiões, evidenciando as conexões e a influência relativa entre polos geográficos de pesquisa; (B) mapeamento da rede de citações entre instituições, indicando relações de influência e intercâmbio científico com base nas publicações na área.

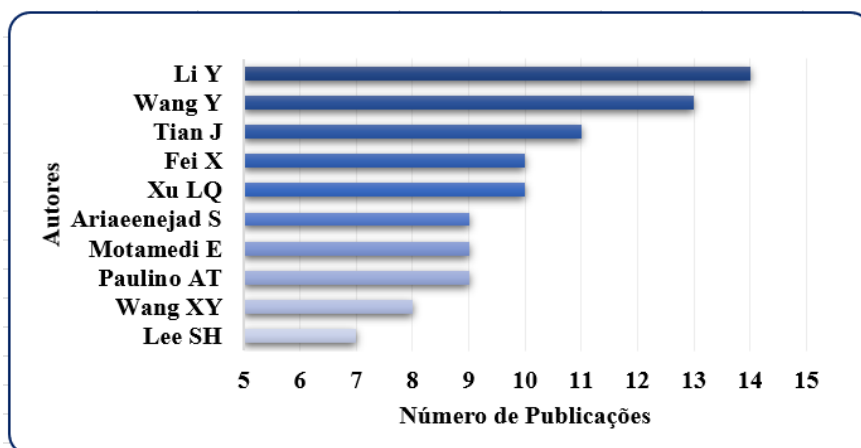


Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Quanto aos autores, a figura 8 identifica os dez nomes mais influentes, enquanto a figura 9 ilustra a rede de colaboração entre eles, destacando a centralidade de pesquisadores como Jing Tian, Yi Wang e Alexandre Tadeu Paulino na conexão de múltiplas redes de conhecimento. Sob uma perspectiva de engenharia, essa distribuição

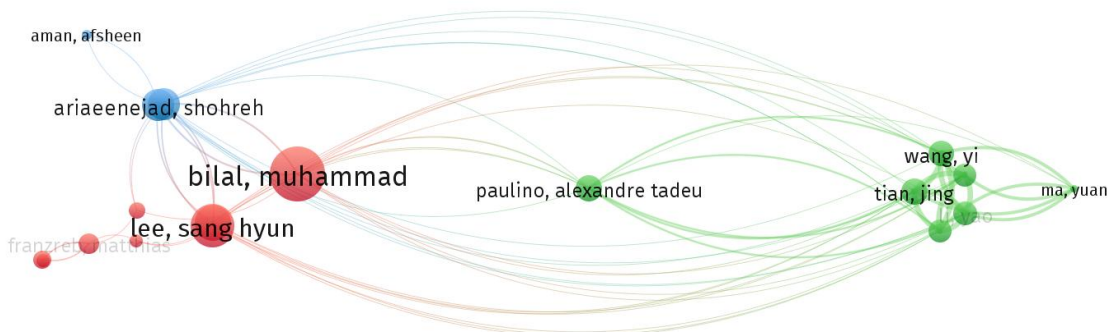
demonstra que os avanços na imobilização de papaína em hidrogéis estão diretamente associados à capacidade de integrar conhecimentos em síntese de materiais, caracterização físico-química e avaliação de desempenho catalítico.

Figura 8 - Classificação dos dez autores com o maior número de publicações sobre imobilização de enzimas em matrizes de hidrogel entre 2015 e abril de 2025.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Figura 9 - Mapa da rede de coautoria e colaboração de autores sobre imobilização de enzimas em matrizes de hidrogel entre 2015 e abril de 2025. As linhas e cores representam os graus de cooperação.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

2.3.3 Análise de palavras-chave e *clustering* temático

A análise de coocorrência de palavras-chave permite identificar os principais eixos temáticos que estruturam as pesquisas sobre imobilização de papaína em matrizes de hidrogel. Os termos mais recorrentes, como imobilização enzimática, hidrogéis, biocatálise, estabilidade, encapsulamento e aplicações biomédicas, detalhados na Tabela 1, indicam que a literatura se organiza em torno de três núcleos principais: materiais, métodos e aplicações. Essa hierarquia visual é confirmada pela nuvem de palavras na figura 10.

Tabela 1 - As 10 principais revistas científicas que mais publicaram sobre imobilização de enzimas entre 2015 e abril de 2025.

Posição	Título do periódico	Número de publicações	Percentual (%)	Citação	Fator de impacto (FI)	Quartil na categoria	Índice H
1	International Journal of Biological	33	6.1	788	9.2	Q1	147
2	ACS Applied materials & interfaces	18	3.3	553	8.33	Q1	311
3	Chemical Engineering Journal	14	2.6	214	16.89	Q1	309
4	Biosensors & Bioelectronics	11	2.0	505	10.7	Q1	239
5	Catalysts	11	2.0	192	3.77	Q2	90
6	Carbohydrate Polymers	10	1.8	439	11.64	Q1	274
7	Sensors and Actuators B-Chemical	9	1.6	460	9.22	Q1	236
8	Gels	9	1.6	75	5.04	Q2	47
9	Journal of Materials Chemistry	8	1.5	168	7.57	Q1	148
10	RSC Advances	8	1.5	144	3.9	Q2	210

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

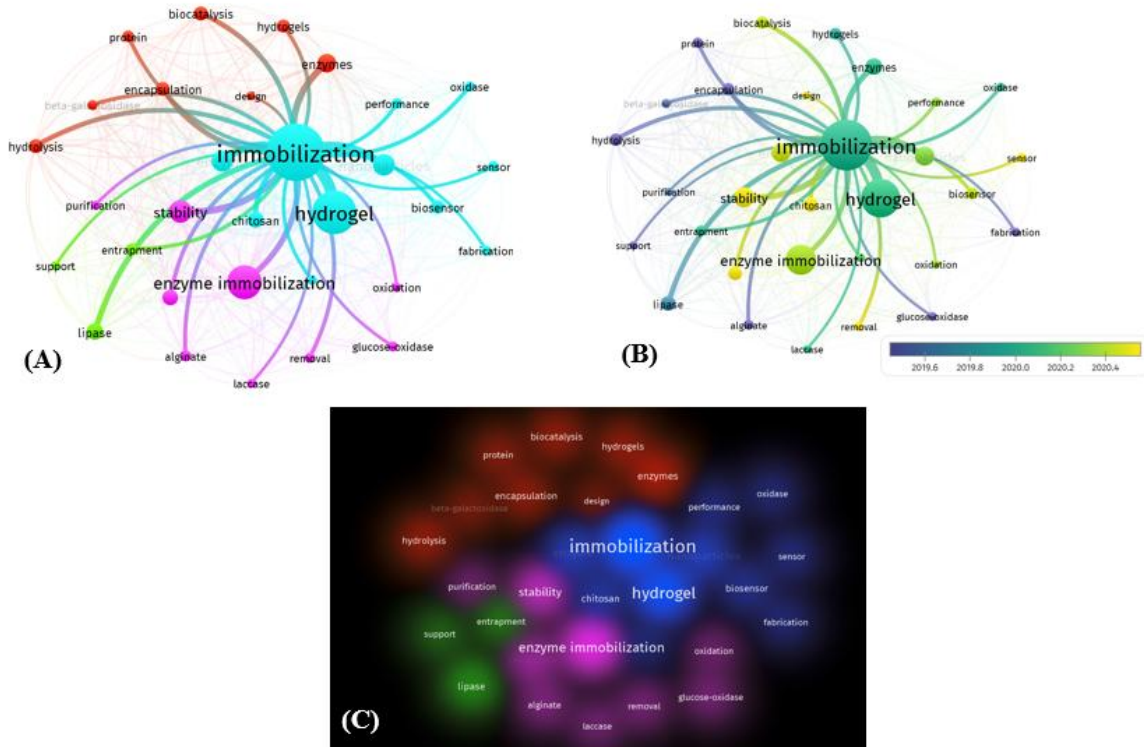
Figura 10 - Análise de nuvem de palavras sobre imobilização de enzimas em matriz de hidrogel para frequência de palavras. Número de palavras = 50.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

O mapeamento de coocorrência (Figura 11(A)) e a análise temporal de sobreposição (Figura 11(B)) mostram a evolução de temas consolidados para tendências emergentes. O mapa de densidade (Figura 11(C)) evidencia zonas de alta frequência e hotspots críticos de pesquisa (De Castro Bizerra et al., 2024; Neto et al., 2023). O primeiro núcleo está relacionado ao desenvolvimento de matrizes de hidrogel, com ênfase em polímeros naturais e sintéticos, estratégias de reticulação e modificação superficial. O segundo núcleo foca em métodos de imobilização, abrangendo encapsulamento, adsorção física e ligação covalente, frequentemente avaliados quanto à eficiência de imobilização e retenção de atividade. O terceiro núcleo envolve aplicações biotecnológicas, incluindo biocatálise industrial, processamento de alimentos, sistemas farmacêuticos e biomateriais.

Figura 11 - Visualizações bibliométricas das tendências temáticas em pesquisas sobre imobilização enzimática em matrizes de hidrogel: (A) análise de coocorrência de palavras-chave, destacando os principais agrupamentos conceituais; (B) visualização em overlay, evidenciando a evolução temporal e o surgimento de temas recentes; (C) mapa de densidade de palavras-chave gerado no VOSviewer, indicando os hotspots e os pontos críticos de maior concentração de pesquisa na área.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Essa estrutura temática evidencia que a pesquisa evoluiu de abordagens predominantemente empíricas para estratégias mais orientadas por engenharia, nas quais a relação entre estrutura do material e desempenho catalítico assume papel central.

2.3.4 Integração entre materiais, métodos e desempenho

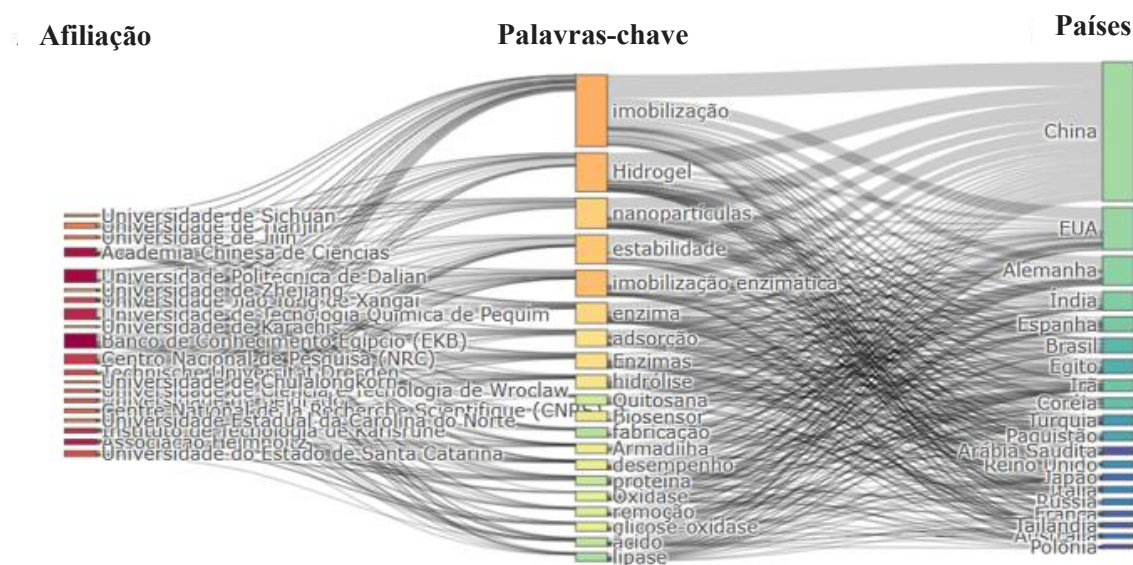
A análise integrada dos estudos selecionados demonstra que o desempenho da papaína imobilizada é fortemente condicionado pela sinergia entre o tipo de hidrogel empregado e o método de imobilização adotado. Periódicos de alto impacto, como os listados na Tabela 2, reforçam que hidrogéis com alta porosidade favorecem a difusão, mas podem comprometer a estabilidade mecânica. O fluxo dessas relações entre instituições, termos e países é consolidado no diagrama de Sankey da Figura 12 (Sales et al., 2023).

Tabela 2 - Ranking das vinte palavras-chave mais relevantes mencionadas nos artigos analisados. TLS: Total Link Strength (Força Total do Link).

Posição	Palavra-chave	Ocorrência	TLS	Posição	Palavra-chave	Ocorrência	TLS
1	Imobilização	245	941	11	Biocatalysis	38	145
2	Hydrogel	206	805	12	Encapsulation	36	173
3	Imobilização	125	434	13	Biosensor	36	135
4	enzyme	122	524	14	Entrapment	32	176
5	Stability	72	351	15	Protein	30	132
6	Nanoparticles	68	285	16	Alginate	28	138
7	Lipase	56	230	17	Sensor	27	89
8	Chitosan	48	223	18	Performance	26	110
9	Adsorption	44	184	19	Removal	25	114
10	Hydrolysis	39	207	20	Oxidase	25	112

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Figura 12 - Gráfico de três campos (diagrama de Sankey) mostrando a relação entre Palavras-chave (centro), Afiliação (esquerda) e Países (direita) na pesquisa sobre imobilização de enzimas em matriz de hidrogel. Número de itens representados = 20.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Sob a perspectiva da engenharia, observa-se esforço crescente no desenvolvimento de hidrogéis híbridos e compósitos capazes de equilibrar esses efeitos, combinando estabilidade mecânica, controle de porosidade e manutenção da atividade catalítica. Essa tendência reflete a busca por sistemas mais robustos, adequados a aplicações repetidas e condições operacionais mais severas.

2.4 VISÃO GERAL DA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA PAPAÍNA EM MATRIZES DE HIDROGEL.

A imobilização enzimática tem se consolidado como estratégia essencial para ampliar a estabilidade, a reutilização e a viabilidade operacional de biocatalisadores em processos industriais e biomédicos. Embora a catálise enzimática ofereça seletividade elevada, condições reacionais brandas e menor impacto ambiental em comparação a rotas químicas tradicionais, sua aplicação em escala depende do controle de limitações como perda de atividade, instabilidade em variações de pH e temperatura, e dificuldades de recuperação da enzima em processos contínuos (Galanie; Entwistle; Lalonde, 2020; Nazor; Liu; Huisman, 2021; Sheldon; Basso; Brady, 2021; Stepankova et al., 2013). Nesse contexto, os hidrogéis se destacam como matrizes promissoras por fornecerem um microambiente predominantemente aquoso, com porosidade e grau de reticulação ajustáveis, favorecendo a preservação conformacional de enzimas e a modulação de desempenho catalítico (Meyer; Meyer; Kara, 2022a; Thiele et al., 2014).

Nesse sentido, entre as enzimas que vêm sendo estudadas em sistemas de imobilização, a papaína se destaca pelo elevado potencial de aplicação e pela ampla utilização em diferentes áreas industriais (Babalola et al., 2021). Além disso, apresenta boa atividade catalítica e capacidade de atuar em diferentes condições reacionais, o que tem contribuído para o aumento do interesse em sua imobilização, especialmente em matrizes de hidrogel (Hobisch et al., 2020).

2.4.1 Papaína: origem, extração, estrutura e propriedades funcionais.

A papaína é uma enzima proteolítica pertencente à classe das cisteína-proteases, obtida principalmente do látex presente na casca do mamão verde (*Carica papaya*), espécie da família Caricaceae originária da região caribenha da América Central e amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais (Babalola et al., 2021; Biswal et al., 2022). Além da relevância do látex como fonte de proteases, diferentes partes do mamoeiro — folhas, frutos, sementes, casca e raízes — são descritas como aplicáveis em usos nutricionais, medicinais e farmacêuticos, indicando a diversidade de compostos bioativos associados à espécie (Adetobi et al., 2022; Otunba et al., 2021; Santana et al., 2019).

O látex do mamoeiro é um fluido leitoso produzido por células especializadas chamadas laticíferos e constitui uma mistura complexa composta predominantemente por

água e proteínas, além de alcaloides e compostos fenólicos, contendo também enzimas hidrolíticas — com destaque para hidrolases, lipases e proteases, incluindo papaína e quimopapaína (Castillo Apaza, 2024; Babalola; Adegboyega, 2024; Thangavel; Albratty, 2023). Funcionalmente, trata-se de um sistema defensivo, associado à proteção da planta contra herbívoros e infecções, o que explica a presença de enzimas capazes de promover degradação proteica eficiente.

Quanto à extração, o látex não é componente predominante do fruto maduro e se concentra em tecidos específicos do fruto verde, casca, folhas e caule, não sendo detectado na polpa. Assim, a obtenção da papaína ocorre por incisões no epicarpo de frutos verdes, sendo frequentemente relatado que frutos mais imaturos fornecem extratos com maior atividade enzimática, aspecto relevante para rendimento e desempenho do biocatalisador (Babalola; Adegboyega, 2024; Zahra et al., 2024). Por se tratar de um material associado a látex, também existem evidências de reatividade cruzada entre látex de frutas e látex natural de borracha, sugerindo potencial de reação em indivíduos sensibilizados; contudo, a relação ainda demanda investigação clínica específica (Gromek et al., 2024).

Estruturalmente, a papaína na forma precursora (pro-papaína, zimogênio) apresenta aproximadamente 345 aminoácidos, enquanto a forma madura e ativa contém 212 aminoácidos, com massa molecular em torno de 24.500 Da (Amri; Mamboya, 2012; Báez-Santos; St. John; Mesecar, 2015; Castillo Apaza, 2024; Babalola; Adegboyega, 2024; Thangavel; Albratty, 2023). A estrutura tridimensional é discutida com base no código PDB 1PPN, frequentemente associada à organização de domínios e ao posicionamento do sítio catalítico, sustentando interpretações sobre especificidade de substrato e estabilidade conformacional (Báez-Santos; St. John; Mesecar, 2015; Thangavel; Albratty, 2023). A presença de pontes dissulfeto e de grupos essenciais à catálise contribui para a integridade estrutural e para sua resistência relativa a condições que tendem a desnaturar proteínas menos estabilizadas.

Do ponto de vista funcional, a papaína apresenta ampla atividade proteolítica e cliva ligações peptídicas adjacentes a aminoácidos hidrofóbicos e/ou básicos, como lisina e arginina, o que amplia seu espectro de aplicações biotecnológicas (Babalola et al., 2021; Benjamin A; Gboyega E; Samuel E, 2021; Channamade et al., 2021). A literatura frequentemente descreve faixa de pH favorável entre 4,5 e 6,7, com relatos de manutenção de atividade em condições próximas a pH 8 em sistemas específicos, além de resistência em ureia 8 M e metanol 70% (Ayodipupo Babalola et al., 2024a; Babalola; Adegboyega,

2024). Em termos térmicos, a atividade tende a ser descrita como mais elevada entre 50 °C e 60 °C, com manutenção de atividade até cerca de 70 °C em formas estabilizadas, o que é particularmente relevante para aplicações industriais e para estratégias de imobilização voltadas ao aumento de estabilidade operacional (Marković et al., 2021). Apesar de robusta em vários contextos, a papaína pode apresentar sensibilidade a variações ambientais e a determinadas condições químicas, reforçando a necessidade de estratégias de estabilização e reutilização, como a imobilização (Borella et al., 2016; Meyer; Meyer; Kara, 2022a).

2.4.2 Hidrogéis: conceito, classificação, propriedades e adequação como suporte.

A catálise enzimática tem papel central no desenvolvimento de síntese orgânica e bioprocessos por aliar seletividade, eficiência e operação em condições brandas, reduzindo impacto ambiental quando comparada a rotas tradicionais (Galanie; Entwistle; Lalonde, 2020; Nazor; Liu; Huisman, 2021). Em paralelo, a evolução do campo ampliou o espectro de aplicação de enzimas e biocatalisadores, incluindo sistemas com células inteiras, indicando maturidade tecnológica e aumento de possibilidades industriais (Bell et al., 2021; Faber; Fessner; Turner, 2019; Wohlgemuth, 2021; Yi et al., 2021). Contudo, limitações de estabilidade e de viabilidade operacional em processos contínuos permanecem como barreiras relevantes, motivando o desenvolvimento de estratégias que controlem o microambiente catalítico e preservem a estrutura funcional das enzimas (Meyer; Meyer; Kara, 2022a; Sheldon; Basso; Brady, 2021; Stepankova et al., 2013).

Hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais hidratadas capazes de reter grandes quantidades de água sem se dissolver, devido à presença de reticulações físicas e/ou químicas. Em termos funcionais, comportam-se como matrizes porosas que podem acomodar biomoléculas e oferecer um microambiente compatível com proteínas, reduzindo estresses mecânicos e contribuindo para preservação conformacional (Thiele et al., 2014; Hobisch et al., 2020; Meyer; Meyer; Kara, 2022a). A adequação de hidrogéis como suportes decorre da combinação entre elevada hidratação, biocompatibilidade (especialmente em matrizes naturais), e possibilidade de ajustar propriedades como porosidade, grau de reticulação e responsividade a estímulos (pH, temperatura, luz), o que permite modular desempenho catalítico e estabilidade operacional (Thiele et al., 2014; Meyer; Meyer; Kara, 2022a).

Quanto à classificação, hidrogéis podem ser categorizados pela origem dos polímeros (naturais, sintéticos ou híbridos/semisintéticos) e pelo tipo de reticulação

(física ou química). Hidrogéis naturais, baseados em polissacarídeos e proteínas, tendem a apresentar biocompatibilidade elevada e baixa toxicidade, favorecendo aplicações biomédicas e alimentares; entretanto, podem sofrer variação de lote, baixa resistência mecânica e maior risco de lixiviação, o que impulsiona o uso de hidrogéis sintéticos ou híbridos para maior controle estrutural e robustez (Nie et al., 2021; Thiele et al., 2014; Meyer; Meyer; Kara, 2022a). Assim, o desenho de um sistema enzima–hidrogel exige equilíbrio entre capacidade de acomodação (inchaço), retenção enzimática, difusão de substratos e integridade mecânica, sendo a seleção do polímero e da química de reticulação determinantes para viabilidade e desempenho (Nie et al., 2021).

2.4.3 Técnicas de imobilização aplicadas à papaína

A imobilização enzimática é uma abordagem amplamente utilizada para aumentar estabilidade, permitir reutilização e facilitar separação da enzima do meio reacional, reduzindo custos e viabilizando processos contínuos (Kim et al., 2016; Selvaraj et al., 2016; Kim et al., 2020). No entanto, a imobilização também pode induzir alterações conformacionais, interações descontroladas e perda de atividade catalítica, exigindo seleção criteriosa de técnica, suporte e condições de processamento (Renata; Wang; Arnold, 2015; Tacias-Pascacio et al., 2021). No caso da papaína, destacam-se como estratégias recorrentes adsorção física, ligação covalente, aprisionamento/encapsulamento, agregados enzimáticos reticulados (CLEAs) e imobilização em nanomateriais.

A adsorção física baseia-se em interações não covalentes (forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio), apresentando simplicidade e baixo custo, mas sendo limitada por risco de lixiviação sob variações de pH, força iônica e temperatura (Gao et al., 2019; Tacias-Pascacio et al., 2021; Razzaq et al., 2019). A ligação covalente promove maior estabilidade e reduz significativamente a lixiviação, porém pode reduzir a atividade catalítica se houver comprometimento do sítio ativo ou restrição estrutural excessiva, além de exigir preparo mais complexo do suporte (Contesini; Melo; Sato, 2018; Sheng et al., 2018). O aprisionamento/encapsulamento mantém a enzima fisicamente confinada em uma matriz porosa, preservando a estrutura nativa e favorecendo biocompatibilidade, mas pode impor resistência difusional e apresentar liberação gradual da enzima dependendo da porosidade (Barbosa et al., 2015; Boutureira; Bernardes, 2015; Tacias-Pascacio et al., 2021). CLEAs consistem em agregados enzimáticos reticulados por agentes como glutaraldeído, sem suporte

adicional, permitindo alta carga enzimática e estabilidade térmica; contudo, podem apresentar limitações difusionais e perda de atividade se as condições de reticulação não forem otimizadas (Khan, 2021; Tacias-Pascacio et al., 2021). Por fim, a imobilização em nanomateriais oferece alta área superficial e, em alguns casos, recuperação facilitada, mas pode envolver custos elevados e complexidade de preparação, além de restrições regulatórias em aplicações sensíveis (Akhgari et al., 2023; Li et al., 2021).

Tabela 3 – Principais técnicas de imobilização enzimática aplicadas à papaína: princípios, vantagens, desvantagens e exemplos de suportes.

Técnica de Imobilização	Princípio	Vantagens	Desvantagens	Exemplos de Suportes	Ref.
Adsorção Física	Fixação da enzima por interações fracas (hidrofóbicas, eletrostáticas, van der Waals)	Simples, barata, não danifica a enzima	Baixa estabilidade	Sílica, carvão ativado, argila modificada, quitosana	(Baidamshina et al., 2021b)
Ligação Covalente	Ligação química da enzima a grupos funcionais do suporte	Alta estabilidade	Pode inativar a enzima, preparo mais complexo	Agarose ativada, nanopartículas funcionalizadas, quitosana com glutaraldeído	(Sheng et al., 2018)
Entrapamento/ Encapsulamento	Inclusão da enzima em uma matriz polimérica porosa	Preserva a atividade da enzima, biocompatível	Difusão limitada, risco de liberação da enzima	Alginato, hidrogel de tamarindo, quitosana	(Channamade et al., 2021)

Reticulação Enzimática (CLEAs)	Agregação e reticulação de enzimas entre si, sem suporte sólido	Alta concentração enzimática, estabilidade térmica	Pode ter baixa atividade se mal otimizado	Glutaraldeído como agente reticulante (sem suporte externo)	(Sogawa; Katashima; Numata, 2020)
Imobilização em Nanomateriais	Fixação da enzima em superfícies nanoestruturadas (magnéticas, condutoras etc.)	Alta área superficial, controle do ambiente enzimático, fácil recuperação	Custo elevado, mais técnicas complexas	Nanopartículas magnéticas, nanocelulose, nanotubos de carbono	(Akhgari et al., 2023)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Além disso, é essencial diferenciar agentes ativadores (que tornam o suporte reativo) de agentes reticulantes (que conectam enzimas entre si ou reforçam ligações enzima–suporte). O glutaraldeído pode exercer ambos os papéis, explicando seu uso recorrente em sistemas covalentes e em CLEAs, embora exija controle cuidadoso para evitar inativação da enzima (Tacias-Pascacio et al., 2021).

2.4.4 Fatores que afetam a eficiência da imobilização.

A eficiência da imobilização depende de parâmetros que influenciam a química de ligação, a conformação enzimática e a arquitetura do suporte (Baidamshina et al., 2021b). O pH é determinante por controlar a ionização de grupos funcionais envolvidos na ligação e por influenciar diretamente atividade e estabilidade (Zhang et al., 2023). A literatura distingue pH ótimo (máxima atividade em curto prazo) e estabilidade ao pH (manutenção após exposição prolongada), conceito essencial para interpretar desempenho sob condições industriais (Zhang et al., 2023). Em sistemas com quitosana, por exemplo, há relatos de maior eficiência de imobilização em pH alcalino, sugerindo favorecimento da reatividade de grupos envolvidos na ligação covalente; contudo, esse comportamento depende da matriz e requer otimização específica (Lei et al., 2004; Baidamshina et al., 2021b; Holyavka; Goncharova; Artyukhov, 2025).

A temperatura também exerce papel duplo: pode acelerar reações de fixação, mas em excesso pode desnaturar a enzima. Assim, durante imobilização, deve-se equilibrar integridade estrutural e eficiência de ligação, evitando temperaturas elevadas e, ao mesmo tempo, prevenindo temperaturas muito baixas que reduzam a cinética de ligação e a eficiência de carga (Borella et al., 2016; Furlani et al., 2020; Wahba, 2023). O tempo de imobilização deve ser suficiente para formação de ligações estáveis, mas não excessivo para evitar exposição prolongada a condições que favoreçam inativação; tempos como 24 h têm sido descritos como adequados em sistemas específicos (Li et al., 2021; Furlani et al., 2020). A concentração enzimática requer controle, pois valores muito baixos reduzem carga, enquanto valores elevados podem favorecer aglomeração e limitar difusão do substrato, reduzindo atividade aparente, sobretudo em suportes com porosidade limitada (Da Silva Melo et al., 2023).

Por fim, o tipo e a concentração de reticulante influenciam diretamente a estabilidade do sistema e a atividade final. O glutaraldeído é amplamente usado por formar pontes covalentes com grupos amino, mas seu excesso pode modificar regiões

críticas e reduzir atividade, exigindo otimização fina para equilibrar retenção e preservação catalítica (Gür; İdil; Aksöz, 2018; Tacias-Pascacio et al., 2020, 2021; Wahba, 2023).

2.4.5 Caracterização físico-química e desempenho do sistema imobilizado.

A caracterização físico-química e funcional é essencial para confirmar o sucesso da imobilização, compreender interações enzima-suporte e verificar preservação da atividade catalítica e estabilidade operacional (Jain, 2020; Tacias-Pascacio et al., 2021). Técnicas espectroscópicas como Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) permitem identificar alterações em bandas associadas a ligações e interações após imobilização, fornecendo evidências de acoplamento e mudanças no microambiente químico. Medeiros (2023) relatou alterações em espectros após imobilização de papaína em laponita, sugerindo interações físico-químicas entre grupos funcionais da enzima e do suporte (Medeiros, 2023). Técnicas morfológicas como Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permitem observar modificações superficiais e preenchimento de poros. Petersohn Junior (2022) descreveu alteração topográfica e preenchimento de poros em membranas de nanocelulose bacteriana após adsorção de papaína, corroborando o processo de fixação (Petersohn Junior, 2022).

Análises térmicas como Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Termogravimétrica (TGA) permitem avaliar estabilidade térmica e comportamento de degradação do sistema. Moreira Filho (2019) observou aumento da temperatura de desnaturação e maior resistência à degradação térmica para papaína imobilizada em alginato de cálcio, sugerindo estabilização pela matriz (Moreira Filho, 2019). No âmbito funcional, a atividade residual quantifica a fração da atividade original preservada após imobilização (Homaei, 2015). Petersohn Junior (2022) reportou manutenção de cerca de 81% da atividade após incubação a 75 °C por duas horas em sistema adsorvido, enquanto a enzima livre apresentou perda mais acentuada, indicando proteção térmica conferida pelo suporte.

A estabilidade operacional frente a variações de pH, temperatura e solventes é componente-chave para aplicação. Medeiros (2023) descreveu manutenção elevada de atividade em diferentes condições de pH para papaína imobilizada em laponita, contrastando com perdas mais significativas da forma livre. A reusabilidade é outro indicador central, pois viabiliza uso em múltiplos ciclos. Mishra et al. (2021) observaram manutenção de aproximadamente 81% da atividade após cinco ciclos em sistema baseado

em nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas e fixadas por glutaraldeído, evidenciando que método e suporte impactam diretamente durabilidade do biocatalisador (Mishra et al., 2021). Em aplicações biomédicas, Melo (2023) descreveu curativos de quitosana com papaína imobilizada com liberação controlada (modelo de Higuchi), estabilidade térmica e biocompatibilidade, demonstrando relevância translacional (Melo, 2023). Em síntese, a integração entre técnicas analíticas e ensaios funcionais fornece base robusta para comparar sistemas e orientar desenho racional (da Silva Melo et al., 2023; Medeiros, 2023; Moreira Filho, 2019).

2.4.6 Aplicações industriais e biomédicas da papaína imobilizada

A papaína é valorizada por sua versatilidade catalítica e ampla aplicabilidade em setores industriais e biomédicos (Tacias-Pascacio et al., 2021; Lima et al., 2024). Na indústria de alimentos, destaca-se como agente amaciador de carnes, promovendo degradação de proteínas miofibrilares e colagenosas e melhorando textura. Também é utilizada no pré-tratamento de pescados, auxiliando na remoção de proteínas associadas a odores e alterações de textura (Ribeiro et al., 2023; Yu et al., 2023). No setor lácteo, pode contribuir para coagulação do leite e produção de queijos, funcionando como alternativa a enzimas de origem animal (Li et al., 2022; Hao et al., 2024; Kaur; Huppertz; Vasiljevic, 2024). Na indústria cervejeira, a papaína pode atuar na degradação de proteínas turbidogênicas, contribuindo para estabilidade coloidal e clareza (Kheder et al., 2024).

No setor biomédico, a papaína é amplamente discutida em aplicações de desbridamento enzimático em feridas e queimaduras, removendo tecido necrosado de maneira seletiva e favorecendo cicatrização (Dutra et al., 2017; Jurkevicz et al., 2024; Dos Santos et al., 2023; Lima et al., 2024). A imobilização em hidrogéis e membranas pode contribuir para estabilizar a enzima, modular liberação e reduzir perda de atividade, o que é especialmente relevante em sistemas de curativos e materiais bioativos (Vicentine, 2017; Melo, 2023). Em paralelo, estudos discutem propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e anti-biofilme, fomentando aplicações em cosméticos funcionais e biomateriais (Baidamshina et al., 2021b; Blanco et al., 2023; Vasconcelos et al., 2024; Venetikidou et al., 2025).

2.4.7 Desafios de engenharia e critérios para o dimensionamento de sistemas de imobilização.

A implementação de sistemas de papaína imobilizada em hidrogéis enfrenta desafios de engenharia que determinam a viabilidade em escala. Um dos principais é a transferência de massa: a difusão de substratos e produtos pode ser limitada pela estrutura do hidrogel, reduzindo a taxa aparente de reação, especialmente em matrizes densamente reticuladas ou quando se utilizam substratos de maior tamanho molecular (Meyer; Meyer; Kara, 2022a; Stepankova et al., 2013). Em processos contínuos, essas limitações se intensificam devido à formação de gradientes de concentração no interior da matriz, comprometendo produtividade e previsibilidade.

A lixiviação enzimática é outro problema crítico, particularmente em sistemas de adsorção e encapsulamento, pois reduz atividade ao longo dos ciclos e pode contaminar o produto final, o que é sensível em aplicações alimentícias e farmacêuticas (Tacias-Pascacio et al., 2021). Estratégias de ligação covalente, reticulantes multifuncionais e modificações superficiais podem reduzir lixiviação, mas exigem controle para evitar inativação do sítio ativo e resíduos indesejáveis (Contesini; Melo; Sato, 2018; Sheng et al., 2018).

A integridade mecânica do hidrogel é determinante, sobretudo em reatores com agitação ou operação contínua. Hidrogéis pouco reticulados tendem a favorecer difusão, porém são mais suscetíveis a deformação e degradação; já hidrogéis altamente reticulados aumentam resistência e retenção, mas podem intensificar limitações difusionais. Assim, o projeto deve buscar equilíbrio entre porosidade, rigidez e estabilidade de longo prazo, considerando a configuração do reator, o regime de escoamento e o modo de recuperação do biocatalisador (Meyer; Meyer; Kara, 2022a; Shouket et al., 2020).

2.4.8 Lacunas de pesquisa e necessidades de padronização.

Apesar do avanço, persistem lacunas que limitam a consolidação tecnológica. Muitos estudos reportam atividade inicial elevada e poucos ciclos de reutilização, sem testar condições prolongadas ou regimes próximos ao uso industrial, dificultando inferência sobre durabilidade e custo-benefício (Moreira Filho, 2019; Tacias-Pascacio et al., 2021). Também há ausência de padronização em protocolos para medir atividade residual, estabilidade operacional e reuso, o que impede comparação direta entre sistemas. Diferenças em substratos, condições de ensaio e formas de cálculo de “atividade relativa” geram variabilidade e fragilizam conclusões comparativas (Tacias-Pascacio et al., 2021).

Além disso, há escassez de estudos em escala piloto e de análises tecnoeconômicas e de sustentabilidade, limitando avaliação real de viabilidade industrial e transferência tecnológica (Sales et al., 2023). Por fim, ainda são raras abordagens integradas que correlacionem quantitativamente propriedades estruturais do hidrogel, cinética enzimática e desempenho operacional, lacuna crítica para o avanço do desenho racional sob perspectiva de engenharia (Stepankova et al., 2013).

2.4.9 Implicações de engenharia e direções futuras.

O avanço da imobilização de papaína em hidrogéis demanda abordagem integrada que combine engenharia de materiais, cinética enzimática e engenharia de processos. Do ponto de vista de materiais, hidrogéis híbridos e compósitos podem equilibrar biocompatibilidade e controle estrutural, permitindo modular porosidade, reticulação e microambiente catalítico (Nie et al., 2021; Yoon et al., 2019). Redes interpenetrantes e sistemas responsivos a estímulos (pH, temperatura, luz) têm potencial para mitigar limitações difusionais, controlar liberação/retensão e adaptar desempenho a condições variáveis, embora ainda exijam validação em contextos mais próximos do industrial (Thiele et al., 2014; Stepankova et al., 2013).

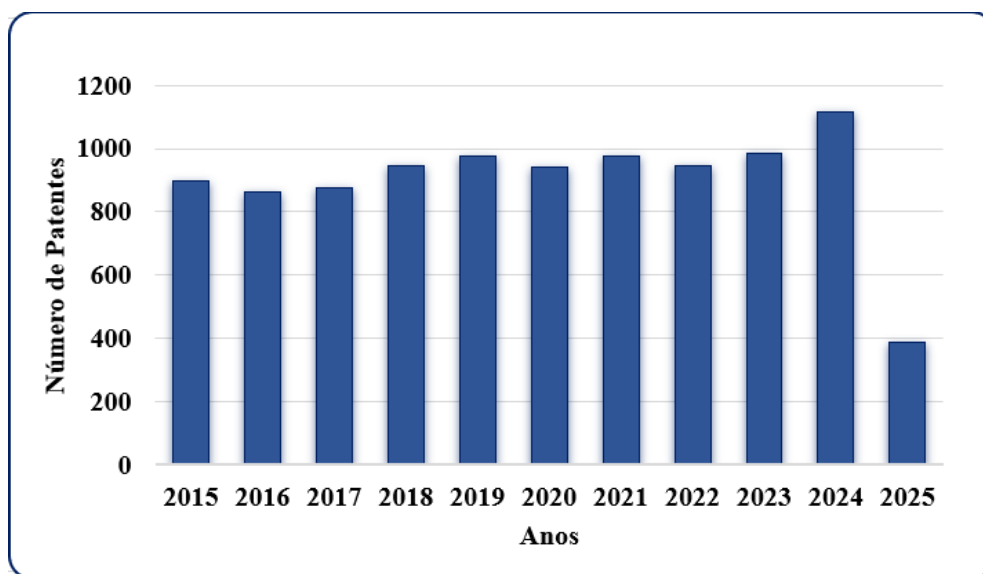
No âmbito de processos, estudos futuros devem priorizar testes de longa duração, condições operacionais realistas, integração em configurações de reatores e padronização de métricas, além de análises tecnoeconômicas e de sustentabilidade que permitam avaliar viabilidade e impacto (Selvaraj et al., 2016; Stepankova et al., 2013; Salehipour et al., 2023). Em síntese, a transição de abordagens exploratórias para desenho racional guiado por critérios de engenharia é a via mais consistente para consolidar sistemas de papaína imobilizada em hidrogéis como soluções robustas e escaláveis.

2.5 ANÁLISE PATENTÁRIA.

A produção de patentes relacionadas à imobilização enzimática em hidrogéis reflete a crescente relevância do tema e funciona como indicador de maturidade tecnológica: enquanto estudos iniciais tendem a gerar publicações científicas, avanços com potencial de aplicação e transferência tecnológica são frequentemente protegidos, visando inovação e competitividade (Almeida et al., 2024). Neste trabalho, foi realizada análise patentária no período de 2015 a abril de 2025 com foco em tecnologias envolvendo imobilização de enzimas em matrizes de hidrogel, buscando identificar volume de depósitos, distribuição institucional e interpretação do cenário tecnológico.

A pesquisa foi conduzida na base Scopus – Elsevier BV, considerando registros associados a escritórios internacionais consolidados: United States Patent and Trademark Office (USPTO), European Patent Office (EPO), World Intellectual Property Organization (WIPO) e United Kingdom Intellectual Property Office (UKIPO). No total, foram identificadas 9.910 patentes relacionadas ao escopo de imobilização de enzimas em hidrogéis no período analisado. A Figura 13 apresenta a evolução anual do número de registros, evidenciando crescimento contínuo das aplicações da tecnologia.

Figura 13 - Gráfico mostrando o número de patentes por ano.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

A distribuição por escritório indica forte concentração de depósitos no USPTO, com aproximadamente 88,47% dos registros, seguido pelo EPO com cerca de 11%, enquanto WIPO e UKIPO apresentam percentuais menores (0,35% e 0,25%, respectivamente). Esse panorama sugere que América do Norte e Europa concentram maior atividade tecnológica no tema, liderando o desenvolvimento de soluções em biotecnologia e materiais funcionais. Em termos interpretativos, essa concentração reforça que a imobilização enzimática em hidrogéis possui relevância que transcende o interesse acadêmico, configurando-se como tecnologia estratégica para desafios industriais, ambientais e biomédicos, especialmente na busca por processos mais limpos, eficientes e reutilizáveis em diferentes setores.

2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Este estudo apresentou uma análise bibliométrica abrangente da evolução científica e tecnológica relacionada à imobilização de papaína em matrizes de hidrogel no período de 2015 a abril de 2025, integrando evidências quantitativas (produção, citações, países, autores, periódicos e coocorrência de palavras-chave) com uma síntese crítica orientada pela engenharia de materiais e de processos. Os resultados indicam crescimento consistente do campo, acompanhado por aumento expressivo do impacto em citações, o que sugere não apenas expansão do volume de pesquisas, mas também consolidação do tema como área interdisciplinar madura, conectando biocatálise, biomateriais, engenharia química e aplicações biomédicas.

A análise temática evidenciou que a literatura se organiza em três eixos centrais: (i) desenvolvimento e modificação de hidrogéis (naturais, sintéticos e híbridos) para controle de porosidade, reticulação e microambiente catalítico; (ii) estratégias de imobilização — com predominância de encapsulamento, adsorção e ligação covalente — avaliadas em termos de eficiência de carga, retenção de atividade e estabilidade; e (iii) aplicações biotecnológicas crescentes, com destaque para usos industriais (alimentos, cervejaria, têxtil e tratamento de efluentes) e biomédicos (curativos e sistemas de liberação), refletindo o potencial translacional do tema. Em conjunto, esses achados confirmam que a imobilização em hidrogéis constitui uma rota promissora para mitigar limitações clássicas da papaína livre, como autólise, sensibilidade a variações de pH/temperatura e dificuldades de recuperação e reutilização.

Contudo, a síntese crítica aponta que a transição do laboratório para aplicações robustas ainda é condicionada por desafios de engenharia recorrentes. Limitações de transferência de massa em redes densamente reticuladas, lixiviação enzimática em matrizes altamente hidratadas e problemas de integridade mecânica em regimes operacionais severos permanecem como gargalos para processos contínuos e de longa duração. Soma-se a isso a fragmentação metodológica observada em parte da literatura, com diferenças significativas em substratos modelo, condições de ensaio, métricas de atividade residual e protocolos de reuso, dificultando comparações diretas e a identificação de “melhores práticas” entre sistemas distintos.

Diante desse panorama, conclui-se que os avanços futuros dependem de uma abordagem de desenho racional baseada em critérios de engenharia: seleção de matrizes (incluindo hidrogéis híbridos e compósitos), modulação de porosidade/reticulação para equilibrar difusão e retenção, incorporação de estratégias de fixação mais controladas e

validação em condições mais próximas do uso industrial (testes prolongados, operação em reatores, avaliação de estabilidade operacional real). Além disso, há necessidade urgente de padronização de protocolos e métricas de desempenho (atividade residual, estabilidade ao pH e à temperatura, lixiviação, reuso e produtividade), bem como de estudos em escala piloto e análises tecnoeconômicas e de sustentabilidade, para apoiar decisões de viabilidade e transferência tecnológica.

Por fim, o panorama patentário discutido no recorte 2015–abril/2025 reforça a maturidade tecnológica crescente do campo e a relevância estratégica da imobilização enzimática em hidrogéis como plataforma para processos mais limpos, reutilizáveis e eficientes. Assim, este trabalho contribui ao mapear tendências, atores, hotspots e lacunas, oferecendo uma base objetiva para orientar pesquisas futuras e acelerar o desenvolvimento de sistemas de papaína imobilizada em hidrogéis com desempenho reprodutível, escalável e alinhado às demandas industriais e biomédicas.

REFERÊNCIAS

- ADETOBI, Emmanuel T. *et al.* In silico Evaluation of the Inhibitory Potential of Cymbopogonol from *Cymbopogon citratus* Towards Falcipain-2 (FP2) Cysteine Protease of *Plasmodium falciparum*. **Tropical Journal of Natural Product Research**, v. 6, n. 10, p. 1687–1694, out. 2022.
- AKHGARI, Mahdi *et al.* A magnetic nano-sorbent incorporating antimicrobial papain for the rapid and efficient removal of levofloxacin and Pb(ii) from aqueous systems. **Environmental Science: Water Research & Technology**, v. 9, n. 8, p. 2112–2127, 2023.
- ALAEDDINI, Morteza; HAJIZADEH, Maryam; REAIDY, Paul. A Bibliometric Analysis of Research on the Convergence of Artificial Intelligence and Blockchain in Smart Cities. **Smart Cities**, v. 6, n. 2, p. 764–795, mar. 2023.
- ALMEIDA, Cinthia Silva *et al.* Enhancing Lipase Immobilization via Physical Adsorption: Advancements in Stability, Reusability, and Industrial Applications for Sustainable Biotechnological Processes. **ACS Omega**, v. 9, n. 47, p. 46698–46732, nov. 2024. DOI: 10.1021/acsomega.4c07088.
- AMRI, Ezekiel; MAMBOYA, Florence. Papain, a plant enzyme of biological importance: A review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, 2012.
- BABALOLA, Benjamin Ayodipupo *et al.* Computational Study of the Therapeutic Potential of Novel Heterocyclic Derivatives against SARS-CoV-2. **COVID**, v. 1, n. 4, p. 757–774, dez. 2021.
- BABALOLA, Benjamin Ayodipupo *et al.* Therapeutic benefits of *Carica papaya*: A review on its pharmacological activities and characterization of papain. **Arabian Journal of Chemistry**, 1 jan. 2024a.
- BABALOLA, Benjamin Ayodipupo; ADEGBOYEGA, Abayomi Emmanuel. Computational Discovery of Novel Imidazole Derivatives as Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease: An Integrated Approach Combining Molecular Dynamics and Binding Affinity Analysis. **COVID**, v. 4, n. 6, p. 672–695, jun. 2024.
- BÁEZ-SANTOS, Yahira M.; ST. JOHN, Sarah E.; MESECAR, Andrew D. The SARS-coronavirus papain-like protease: Structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. **Antiviral Research**, 1 mar. 2015.
- BAIDAMSHINA, D. R. *et al.* Biochemical properties and anti-biofilm activity of chitosan-immobilized papain. **Marine Drugs**, v. 19, n. 4, p. 197, 2021.
- BARBOSA, O. *et al.* Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 435–456, 2015.

BAT-OZMATARA, Merve; ÜNLÜ, Aişe; GEVREK, Tugce Nihal. Preparation of isocyanate-containing hydrogel films as antibacterial enzyme immobilization matrices. **Reactive and Functional Polymers**, v. 192, p. 105695, 1 nov. 2023.

BELL, Elizabeth L. *et al.* Biocatalysis. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 1, n. 1, p. 46, jun. 2021.

BENJAMIN A, Babalola; GBOYEGA E, Adebami; SAMUEL E, Akinsuyi. Mechanistic basis for Cancer Immune Evasion and role of immune checkpoint blockades in Immuno-Oncology. **Global Journal of Cancer Therapy**, p. 035–042, maio 2021.

BISWAL, Akshaya Kumar *et al.* Maize Lethal Necrosis disease: review of molecular and genetic resistance mechanisms, socio-economic impacts, and mitigation strategies in sub-Saharan Africa. **BMC Plant Biology**, 1 dez. 2022.

BLANCO, María *et al.* Production and Partial Characterization of Bioactive Compounds from Underutilized Marine Bioresources for a Cosmetic Formulation: Cytotoxicity and Bioactivity Evaluation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 20, out. 2023.

BORELLA, Júlio César *et al.* Avaliação da estabilidade e da atividade enzimática de soluções de papaína utilizadas no desbridamento e cicatrização de feridas. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 28, n. 3, p. 179–184, 2016. DOI: 10.14450/2318-9312.v28.e3.a2016.pp179-184.

BOUTUREIRA, Omar; BERNARDES, Gonçalo J. L. Advances in Chemical Protein Modification. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 5, p. 2174–2195, mar. 2015.

CASTILLO APAZA, Paola Sol. **Propiedades farmacotécnicas y farmacológicas de la papaína**: una revisión sistemática. 2024. Tesis (Título Profesional de Química Farmacéutica) – Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, Universidad Católica de Santa María, Arequipa, 2024.

CHANNAMADE, Chandan *et al.* Promise Approach on Chemical Stability Enhancement of Papain by Encapsulation System: A Review. **Journal of Young Pharmacists**, v. 13, n. 3, p. 201–204, set. 2021.

CONTESINI, Fabiano Jares; MELO, Ricardo Rodrigues de; SATO, Hélia Harumi. An overview of Bacillus proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 321–334, abr. 2018.

DARI, Dayana Nascimento *et al.* An Updated Review of Recent Applications and Perspectives of Hydrogen Production from Biomass by Fermentation: A Comprehensive Analysis. **Biomass**, v. 4, n. 1, p. 132–163, mar. 2024.

DE CASTRO BIZERRA, V. *et al.* Opportunities for cleaner leather processing based on protease enzyme: current evidence from an advanced bibliometric analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 191, p. 114162, 2024.

DUTRA, J. A. P. *et al.* Papain wound dressings obtained from poly(vinyl alcohol)/calcium alginate blends as new pharmaceutical dosage form: Preparation and preliminary evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 113, p. 11–23, abr. 2017.

FABER, Kurt; FESSNER, Wolf-Dieter; TURNER, Nicholas J. Biocatalysis: Ready to Master Increasing Complexity. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 361, n. 11, p. 2373–2376, jun. 2019.

FENG, Yuxiao *et al.* Hierarchical micro- and mesoporous ZIF-8 with core–shell superstructures using colloidal metal sulfates as soft templates for enzyme immobilization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 610, p. 709–718, mar. 2022.

FURLANI, I. L. *et al.* Enzyme immobilization: concepts and effects on proteolysis. **Química Nova**, v. 43, n. 4, p. 463–473, 2020.

GALANIE, Stephanie; ENTWISTLE, David; LALONDE, James. Engineering biosynthetic enzymes for industrial natural product synthesis. **Natural Product Reports**, v. 37, n. 8, p. 1122–1143, 2020.

GAO, Hui *et al.* NADH oxidase from *Lactobacillus reuteri*: A versatile enzyme for oxidized cofactor regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 629–636, fev. 2019.

GROMEK, W. *et al.* Revisitando a Síndrome Látex-Fruta após 30 Anos de Pesquisa: Uma Revisão Abrangente da Literatura e Descrição de Dois Casos. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 14, 4222, 2024. DOI: 10.3390/jcm13144222.

GÜR, Sinem Diken; İDİL, Neslihan; AKSÖZ, Nilüfer. Optimization of Enzyme Co-Immobilization with Sodium Alginate and Glutaraldehyde-Activated Chitosan Beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 2, p. 538–552, fev. 2018.

HAO, Lingshen *et al.* Enzymatic Hydrolysis Optimization of Yak Whey Protein Concentrates and Bioactivity Evaluation of the Ultrafiltered Peptide Fractions. **Molecules**, v. 29, n. 6, mar. 2024.

HOBISCH, Markus *et al.* Solvent-Free Photobiocatalytic Hydroxylation of Cyclohexane. **ChemCatChem**, v. 12, n. 16, p. 4009–4013, ago. 2020.

HOLYAVKA, Marina G.; GONCHAROVA, Svetlana S.; ARTYUKHOV, Valeriy G. Various Options for Covalent Immobilization of Cysteine Proteases—Ficin, Papain, Bromelain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 2, p. 547, jan. 2025.

HOMAEI, Ahmad Abolpour. Enhanced activity and stability of papain immobilized on CNBr-activated sepharose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 373–377, abr. 2015. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.01.055.

JAIN, Jatin. REVIEW ON ISOLATION AND PURIFICATION OF PAPAIN ENZYME FROM PAPAYA FRUIT. **International Journal of Engineering Applied Sciences and Technology**, v. 5, n. 6, p. 193–197, out. 2020.

JURKEVICZ, Carolina Stiegler *et al.* Papain Covalent Immobilization in Bacterial Cellulose Films as a Wound Dressing. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 113, n. 2, p. 427–433, fev. 2024.

KAUR, S.; HUPPERTZ, T.; VASILJEVIC, T. Plant proteases and their application in dairy systems. **International Dairy Journal**, v. 154, p. 105925, jul. 2024.

KHAN, Mohammad Rafiq. Immobilized enzymes: a comprehensive review. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 45, p. 207, dez. 2021. DOI: 10.1186/s42269-021-00649-0.

KHEDER, Synda Boulahia *et al.* Valorization of brewery waste as bait attractant for the Mediterranean Fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, dez. 2024.

KIM, Jung-Soo *et al.* Phe-140 Determines the Catalytic Efficiency of Arylacetonitrilase from *Alcaligenes faecalis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 7859, out. 2020.

KIM, Tae-Su *et al.* A highly efficient sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* G624 and improvement of its stability through immobilization. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 33438, set. 2016.

LEI, Han *et al.* The preparation and catalytically active characterization of papain immobilized on magnetic composite microspheres. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 1, p. 15–21, jul. 2004.

LI, Chunzhi *et al.* Non-covalent and covalent immobilization of papain onto Ti3C2 MXene nanosheets. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 148, p. 109817, ago. 2021.

LI, L. *et al.* Modeling the Structure and Interactions of Intrinsically Disordered Peptides with Multiple Replica, Metadynamics-Based Sampling Methods and Force-Field Combinations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 18, p. 1915–1928, 2022.

LIMA, Aline Magalhães de *et al.* Ureia aumenta a atividade antimicrobiana da papaína. **Caderno Pedagógico**, v. 21, n. 12, p. e10619, nov. 2024.

MAGHRABY, Y. R. *et al.* Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. **ACS Omega**, v. 8, n. 6, p. 5184–5196, jan. 2023. DOI: 10.1021/acsomega.2c07560.

MARKOVIĆ, Srđan *et al.* One-step purification and freeze stability of papain at acidic pH values. **Archives of Biological Sciences**, v. 73, n. 1, p. 57–64, 2021.

MEDEIROS, Kaline de Araújo. **Desenvolvimento de um sistema híbrido nanoestruturado de Laponita® e Papaína**. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêutica) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2023.

MELO, A. E. C. da Silva *et al.* Immobilization of papain in chitosan membranes as a potential alternative for skin wounds. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 12, p. 2649, 2023.

MELO, Anne Emmanuelle Câmara da Silva. **Desenvolvimento e avaliação biológica de novo curativo à base de quitosana e papaína como alternativa para o tratamento de úlceras em diabéticos**. 2023. 109f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.

MEYER, J.; MEYER, L.-E.; KARA, S. Enzyme immobilization in hydrogels: a perfect liaison for efficient and sustainable biocatalysis. **Engineering in Life Sciences**, v. 22, n. 3-4, p. 165-177, 2022.

MISHRA, Pragati *et al.* The quest for reusability: The facile and stable immobilization of papain on cysteine functionalized iron oxide nanoparticles activated glass surface. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 58, n. 2, p. 163–170, abr. 2021.

MOREIRA FILHO, Raimundo Nonato Fernandes. **Caracterização e avaliação de membranas de alginato de cálcio com papaína imobilizada para o uso como curativo bioativo**. 2019.

NAZOR, Jovana; LIU, Joyce; HUISMAN, Gjalt. Enzyme evolution for industrial biocatalytic cascades. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 182–190, jun. 2021.

NETO, Francisco Simão *et al.* Research Progress and Trends on Utilization of Lignocellulosic Residues as Supports for Enzyme Immobilization via Advanced Bibliometric Analysis. **Polymers**, v. 15, n. 9, p. 2057, abr. 2023.

OTUNBA, Ahmed Adebisi *et al.* Genomic, biochemical and microbial evaluation of probiotic potentials of bacterial isolates from fermented sorghum products. **Heliyon**, v. 7, n. 12, 1 dez. 2021.

PARK, Saerom *et al.* Wood mimetic hydrogel beads for enzyme immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 223–229, jan. 2015.

PETERSOHN JUNIOR, Egon. **Imobilização de papaína em membranas de nanocelulose bacteriana**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2022.

RAZZAQ, Abdul *et al.* Microbial Proteases Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, jun. 2019.

RENATA, Hans; WANG, Z. Jane; ARNOLD, Frances H. Expanding the Enzyme Universe: Accessing Non-Natural Reactions by Mechanism-Guided Directed Evolution. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, n. 11, p. 3351–3367, mar. 2015.

RIBEIRO, Wanessa Oliveira *et al.* Evaluating different levels of papain as texture modifying agent in bovine meat loaf containing transglutaminase. **Meat Science**, v. 198, p. 109112, abr. 2023.

RODRIGUES, Antonio F. S. *et al.* A scientometric analysis of research progress and trends in the design of laccase biocatalysts for the decolourization of synthetic dyes. **Process Biochemistry**, v. 126, p. 272–291, mar. 2023.

SALEHIPOUR, Masoud *et al.* Recent advances in preparation of polymer hydrogel composites and their applications in enzyme immobilization. **Polymer Bulletin**, v. 80, n. 6, p. 5861–5896, jun. 2023.

SALES, Misael Bessa *et al.* Trends and Opportunities in Enzyme Biosensors Coupled to Metal-Organic Frameworks (MOFs): An Advanced Bibliometric Analysis. **Electrochem**, v. 4, n. 2, p. 181–211, abr. 2023.

SANTANA, Lidiani F. *et al.* Nutraceutical potential of carica papaya in metabolic syndrome. **Nutrients**, 1 jul. 2019.

SANTOS, Thais Menezes dos *et al.* Development and clinical application of hydrogel formulations containing papain and urea for wound healing. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59, 2023.

SELVARAJ, Chandrabose *et al.* Structural insights into the binding mode of d-sorbitol with sorbitol dehydrogenase using QM-polarized ligand docking and molecular dynamics simulations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 244–256, out. 2016.

SHELDON, Roger A.; BASSO, Alessandra; BRADY, Dean. New frontiers in enzyme immobilisation: robust biocatalysts for a circular bio-based economy. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 10, p. 5850–5862, 2021.

SHENG, Weiqin *et al.* Enhanced activity and stability of papain by covalent immobilization on porous magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 143–148, jul. 2018.

SHOUKET, H. A. *et al.* Study on industrial applications of papain: A succinct review. **IOP Publishing Ltd**, 18 dez. 2020.

SOGAWA, Hiromitsu; KATASHIMA, Takuya; NUMATA, Keiji. A covalently cross-linked silk fibroin hydrogel using enzymatic oxidation and chemoenzymatically synthesized copolypeptide crosslinkers consisting of a GPG tripeptide motif and tyrosine: control of gelation and resilience. **Polymer Chemistry**, v. 11, n. 18, p. 3152–3161, 2020.

STEPANKOVA, Veronika *et al.* Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents. **ACS Catalysis**, v. 3, n. 12, p. 2823–2836, dez. 2013.

TACIAS-PASCACIO, V. G. *et al.* Immobilization of papain: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 188, p. 94–113, 2021.

TACIAS-PASCACIO, Veymar G. *et al.* Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 2143–2196, dez. 2020.

THANGAVEL, Neelaveni; ALBRATTY, Mohammed. Benchmarked molecular docking integrated molecular dynamics stability analysis for prediction of SARS-CoV-2 papain-like protease inhibition by olive secoiridoids. **Journal of King Saud University - Science**, v. 35, n. 1, jan. 2023.

THIELE, Julian *et al.* 25th Anniversary Article: Designer Hydrogels for Cell Cultures: A Materials Selection Guide. **Advanced Materials**, v. 26, n. 1, p. 125–148, jan. 2014.

VASCONCELOS, Niédja Fittipaldi *et al.* Oxidized Bacterial Cellulose Membranes Immobilized with Papain for Dressing Applications: Physicochemical and In Vitro Biological Properties. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 8, ago. 2024.

VENETIKIDOU, Maria *et al.* Proteolytic Enzyme Activities of Bromelain, Ficin, and Papain from Fruit By-Products and Potential Applications in Sustainable and Functional Cosmetics for Skincare. **Applied Sciences**, 1 mar. 2025.

VICENTINE, Albeliggia Barroso. **A utilização do hidrogel com papaína no tratamento de feridas em pés diabéticos**. 2017. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear – Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

WAHAB, Roswanira Abdul *et al.* On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. **Reactive and Functional Polymers**, v. 152, jul. 2020.

WAHBA, M. I. Glutaraldehyde-copper gelled chitosan beads: characterization and utilization as covalent immobilizers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 50, p. 102668, 2023.

WOHLGEMUTH, Roland. Biocatalysis – Key enabling tools from biocatalytic one-step and multi-step reactions to biocatalytic total synthesis. **New Biotechnology**, v. 60, p. 113–123, jan. 2021.

YI, Dong *et al.* Recent trends in biocatalysis. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 14, p. 8003–8049, 2021.

YOON, Jaeho *et al.* Light-Harvesting Dye–Alginate Hydrogel for Solar-Driven, Sustainable Biocatalysis of Asymmetric Hydrogenation. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 6, p. 5632–5637, mar. 2019.

YU, Sebastian *et al.* The effect of papain hydrolysis on tropomyosin levels in shrimp. **Heliyon**, v. 9, n. 12, p. e22410, dez. 2023.

ZAHRA, Nureen *et al.* In-vivo and In-silico analysis of the anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic activities of methanolic fruit extracts of *Carica papaya*. **Italian Journal of Food Science**, v. 36, n. 4, p. 120–135, 2024.

ZHANG, Zhenzhen *et al.* Acid-resistant enzymes: the acquisition strategies and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 107, n. 20, p. 6163–6178, out. 2023.

CAPÍTULO 3

*Imobilização da papaína em hidrogel de tamarindo:
preparo e avaliação da atividade enzimática*

RESUMO

A imobilização enzimática tem sido amplamente utilizada como estratégia para aumentar a estabilidade estrutural e a reutilização de biocatalisadores, especialmente no caso de enzimas proteolíticas como a papaína, que apresenta elevada instabilidade em solução aquosa devido ao processo de autoproteólise. Nesse contexto, este capítulo teve como objetivo desenvolver e avaliar um sistema de papaína imobilizada em hidrogel de tamarindo, utilizando uma matriz polissacarídica obtida a partir da semente do tamarindo. O hidrogel foi previamente ativado com glutaraldeído e empregado como suporte para a imobilização da enzima, sendo a atividade enzimática avaliada por meio da metodologia de coagulação do leite. Os resultados demonstraram que a papaína livre apresentou rápida perda de atividade ao longo de 24 horas, enquanto o sistema imobilizado apresentou elevado rendimento de fixação (97,9%), indicando forte afinidade entre a enzima e a matriz polimérica. A análise por FTIR confirmou a incorporação da papaína ao hidrogel e a preservação das bandas características da proteína após a imobilização. Além disso, o uso do polissacarídeo de semente de tamarindo reforça o potencial de aproveitamento de biomassa regional como suporte biotecnológico sustentável.

Palavras-chave: Papaína; Imobilização Enzimática; Hidrogel de Tamarindo; FTIR; Atividade Enzimática.

3.1 INTRODUÇÃO

A imobilização de enzimas em suportes sólidos, como o hidrogel de tamarindo, é a estratégia central deste capítulo de modo a buscar alternativas que superem a instabilidade estrutural e a dificuldade de reutilização de biocatalisadores. Diferente do uso em forma livre, a fixação em matrizes poliméricas cria um microambiente protetor que preserva a integridade funcional da proteína frente a variações operacionais (Maghraby et al., 2023). Nesse sentido, busca-se aqui o desenvolvimento de um sistema que simulem condições biológicas ideais, garantindo a manutenção da funcionalidade catalítica em uma rede tridimensional estável (Yuan et al., 2025).

Nesse contexto, a papaína foi selecionada para este estudo devido à sua robustez e versatilidade em diferentes faixas de pH e temperatura (Bat-Ozmatara; Ünlü; Gevrek, 2023). Entretanto, a eficácia do seu preparo depende da superação da autoproteólise, desafio este que a imobilização visa mitigar ao isolar fisicamente as moléculas enzimáticas (Borella et al., 2018). Assim, o foco desta etapa experimental é converter a enzima livre em um derivado imobilizado capaz de manter sua estrutura e atividade catalítica por períodos prolongados (Borella et al., 2016).

Ainda, como suporte utilizado, o hidrogel de tamarindo, foi obtido a partir do xiloglucano para atuar como uma matriz de alta hidratação e estabilidade reológica (De

Castro Bizerra, 2024). A utilização desta biomassa agroindustrial não apenas provê um suporte mucoadesivo eficiente para a carga enzimática, mas também valida a aplicação biotecnológica de um recurso regional (Geethalaxmi et al., 2024; Zeleke et al., 2021). O preparo deste hidrogel é, portanto, o ponto de partida para a construção do sistema catalítico proposto.

Para confirmar a interação química entre a enzima e a matriz, utiliza-se a espectroscopia no infravermelho (FTIR). Esta técnica é fundamental neste capítulo para validar o sucesso do preparo, permitindo identificar as bandas vibracionais das amidas da proteína e as novas ligações formadas durante a reticulação química (Barth, 2007; Furlani et al., 2020). O FTIR atua, neste estágio, como a prova estrutural de que a papaína foi efetivamente incorporada ao hidrogel sem sofrer desnaturação.

Para a avaliação da atividade enzimática do sistema resultante, foi conduzida utilizando a metodologia de coagulação do leite descrita por Borella e colaboradores (2016). Este ensaio permite quantificar a eficiência do processo de imobilização através da hidrólise da caseína, fornecendo dados concretos sobre o rendimento e a estabilidade relativa do biocatalisador (Borella et al., 2016). Esta análise de bancada é determinante para verificar se o suporte de tamarindo foi capaz de preservar as propriedades catalíticas da papaína.

Dessa forma, o presente capítulo detalha os procedimentos de síntese e as técnicas de caracterização física utilizadas para validar o sistema "papaína-hidrogel". O objetivo é demonstrar a viabilidade técnica deste preparo, estabelecendo a base experimental necessária para a compreensão da eficiência catalítica que será discutida nos resultados a seguir.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

A papaína (PPN) foi adquirida pela Êxodo Científica (Sumaré-SP, Brasil). O hidrogel de tamarindo (*Tamarindus indica*) foi fornecido a partir colaboração técnica entre a UNILAB e o Instituto Federal do Ceará – IFCE, Unidade de Limoeiro do Norte. A solução de glutaraldeído (GLU) grau II 25% (m/v) foi obtida da Sigma-Aldrich (São Paulo – SP, Brasil). Os demais reagentes utilizados são de grau analítico e foram adquiridos da distribuidora Cequímica (Fortaleza - CE, Brasil).

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Preparação do suporte de hidrogel de tamarindo

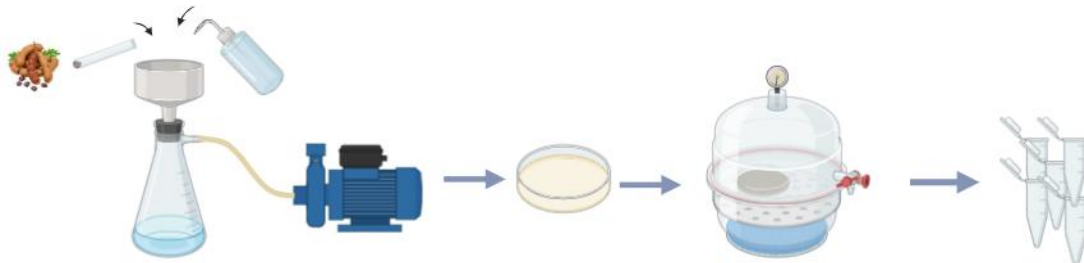
As amostras de hidrogel de tamarindo (TH) (Figura 14), tratavam-se de um polissacarídeo, onde após o aquecimento das sementes e extração dele foi produzido o hidrogel (De Castro Bizerra, 2024). Cerca de 3g de TH foram lavados com excesso de água destilada e, com auxílio de um sistema de filtragem (Figura 15), foi retirada o excesso de umidade e transferidos para o dessecador, contendo sílica gel, para a retirada total da umidade, assim, após secos, os hidrogéis foram pesados e armazenados no dessecador para finalizar a secagem.

Figura 14 - Hidrogel de Tamarindo



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Figura 15 - Esquema visual da lavagem do TH.



Fonte: Adaptado de De Castro Bizerra, 2024.

3.2.2.2 Ativação do suporte com Glutaraldeído (GLU).

Antes da imobilização enzimática foi ativado o suporte (TH) para possibilitar a formação de ligações covalentes com a enzima (PPN), conferindo maior estabilidade ao sistema (Sousa *et al.*, 2022). Nesse sentido, o glutaraldeído (GLU) foi empregado, pois promove alterações estruturais que impedem a dissolução em meio ácido além de potencializar a capacidade de adsorção do material (Oliveira; Fernandes; Carvalho, 2021). As ativações com GLU ocorreram, com adaptações, segundo a metodologia de Bizerra (2024) e Soares (2016).

Foram pesados 0,1g de suporte seco de TH e adicionados 1mL de tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ (pH 7), deixando hidratar em carrossel por 15min, e em seguida adicionados 5µL de GLU a 2,5% (v/v). As reações foram mantidas sob agitação contínua por 1 hora a 25°C. Os suportes ativados foram lavados com 2mL de tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ (pH 7), para a remoção do excesso do agente ativador.-O TH ativado foi colocado no dessecador pelo período de 7 dias até secagem completa.

3.2.2.3 Determinação da atividade enzimática da papaína livre

Para avaliar a atividade enzimática da papaína livre, utilizou-se um método baseado na coagulação do leite, adaptado de Borella *et al.* (2016, 2018). O princípio da técnica consiste em monitorar as modificações de um substrato proteico ao longo de um período. Preparou-se uma solução enzimática contendo 0,1g de papaína dissolvida em 10mL de tampão fosfato de sódio (100 mmol·L⁻¹, pH 7). Foi obtida uma solução de leite desnatado, preparada a partir da dissolução de 2,5g de leite em pó em 100g de água, sendo posteriormente aquecida em banho-maria até 50 °C. Em seguida, as duas soluções foram misturadas na proporção 1:1 (v/v) e agitadas até o aparecimento do primeiro indício de coagulação ou a mistura ficar visivelmente mais clara, aproximando-se da coloração da solução tampão, o que indica a hidrólise proteica. O intervalo de tempo entre a adição da enzima ao leite e a reação esperada foi utilizado para o cálculo da atividade enzimática, expressa em unidades de potência de coagulação do leite por grama de papaína (UPE), de acordo com a equação 1(Borella et al., 2016):

Eq. (1)

$$UPE = \frac{1000}{E * t}$$

Em que: E é massa (mg) de solução necessária para precipitar 10 mL do substrato (leite) no tempo t (min).

3.2.2.4 Imobilização enzimática

A imobilização da papaína foi realizada, segundo metodologia adaptada de Bizerra (2024) e Soares (2016), onde foi empregado 0,1 g de cada suporte previamente ativado (hidrogel de tamarindo + glutaraldeído). Em cada suporte adicionou-se 1 mL de solução de papaína preparada a partir da dissolução de 1 g da enzima em tampão fosfato de sódio $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 7). As misturas foram mantidas sob agitação contínua (60 rpm) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, com tempo de contato de 2 horas. Decorrido do intervalo, o suporte contendo a enzima imobilizada foram separados da fase líquida e submetidos a lavagens sucessivas com 1 mL do tampão fosfato de sódio $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 7), visando remover moléculas de papaína não fixadas. Os derivados obtidos foram então preparados para posterior determinação da atividade enzimática.

3.2.2.5 Determinação atividade enzimática após imobilização

A determinação da atividade enzimática da papaína imobilizada em hidrogel de tamarindo foi realizada utilizando o cálculo da atividade enzimática expressa em unidades de potência de coagulação do leite por grama de papaína, onde foi analisada a diferença entre o UPE_i e UPE_f , conforme equação 2 adaptada de Borella e colaboradores (2016) e De Castro Bizerra (2024). Além disso, esse cálculo permitiu definir o rendimento percentual de imobilização.

Eq. (2)

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{(UPE_i - UPE_f)}{UPE_i} \times 100$$

Onde: UPE_i é atividade enzimática inicial (antes da imobilização) e UPE_f é atividade enzimática no sobrenadante após a imobilização (enzima não imobilizada). Assim, o rendimento da imobilização, foi calculado considerando a atividade inicial da enzima (UPE_i) antes do processo e a atividade residual no sobrenadante (UPE_f) após a imobilização. Logo, o rendimento indica a fração da papaína que foi efetivamente fixada ao hidrogel, mostrando a eficiência do suporte em manter a atividade enzimática no derivado imobilizado.

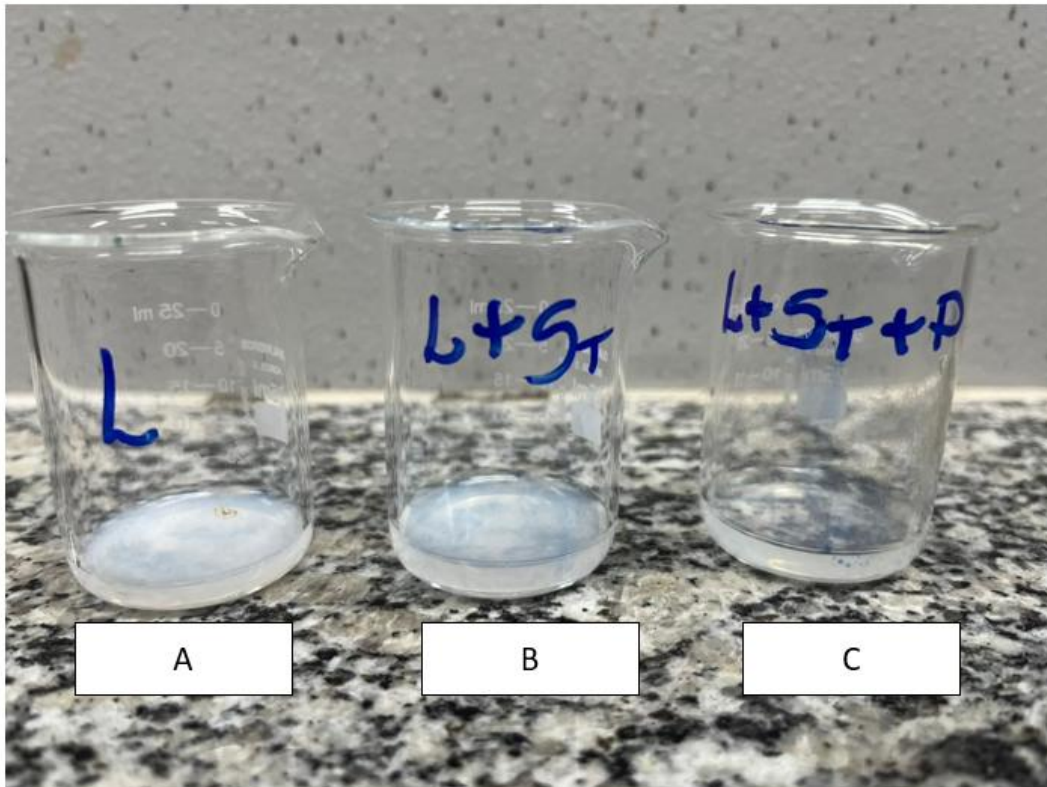
Além das etapas experimentais voltadas à imobilização, avaliação da atividade catalítica e caracterização estrutural da papaína no hidrogel de tamarindo, este estudo incorporou ferramentas computacionais como abordagens complementares. O emprego de técnicas *in silico* teve como finalidade ampliar a interpretação funcional do sistema desenvolvido, permitindo investigar, em nível molecular, possíveis interações relevantes envolvendo a enzima e avaliar cenários teóricos associados a aplicações futuras. Dessa forma, as análises computacionais foram utilizadas como suporte adicional aos resultados experimentais, contribuindo para expandir a compreensão do comportamento da papaína imobilizada e indicar perspectivas para investigações posteriores, especialmente em contextos biomédicos e de liberação controlada. Ressalta-se que tais abordagens não substituem validações experimentais adicionais, mas agregam subsídios preditivos e estruturais ao biocatalisador obtido.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Estabilidade da papaína livre

A análise da atividade enzimática da papaína livre apresentou um perfil de degradação acelerado, com redução de 86,99% de sua capacidade catalítica em 24 horas, evidenciando sua elevada instabilidade em meio aquoso. A atividade inicial de 22,22 UPE reduziu-se para 5,98 UPE após apenas 6 horas, resultado compatível com o comportamento descrito por Borella et al. (2016). Segundo os autores, essa perda acentuada de atividade está diretamente relacionada ao processo de autoproteólise, no qual as próprias moléculas da protease promovem a degradação umas das outras, comprometendo rapidamente a eficiência catalítica. Esse fenômeno pode ser visualizado qualitativamente no ensaio apresentado na Figura 16.

Figura 16 – Ensaio de coagulação do leite: (A) solução de leite desnatado; (B) leite acrescido de solução tampão; (C) leite acrescido de solução tampão e solução de papaína.



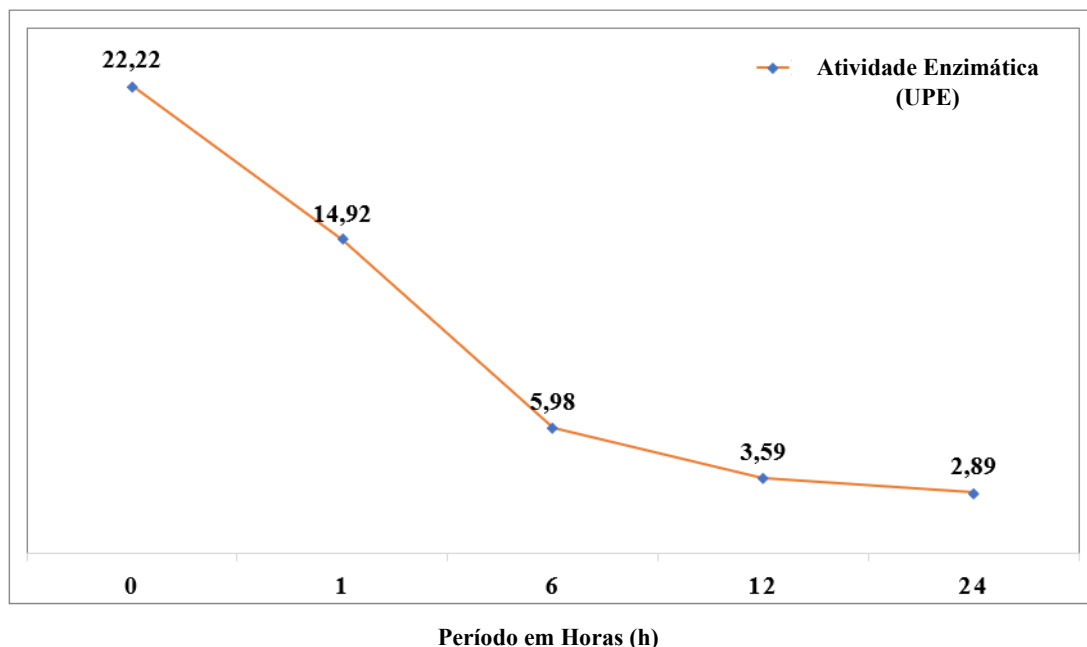
Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Esse comportamento é característico das cisteína-proteases em solução aquosa, conforme amplamente documentado na literatura. Sheng et al. (2018) demonstraram que a papaína livre perde rapidamente sua atividade em condições não protegidas, o que limita severamente sua aplicabilidade industrial. De modo semelhante, Homaei (2015) observou que a papaína livre apresenta meia-vida reduzida em comparação com formas imobilizadas, atribuindo essa instabilidade à autoproteólise e à sensibilidade conformacional da enzima.

A queda de 32,85% na atividade logo na primeira hora (14,92 UPE), como demonstrado na Figura 17, reforça as observações de Borella et al. (2018) sobre a fragilidade da enzima em meios semissólidos ou aquosos. Segundo os autores, a manutenção da eficácia terapêutica e catalítica da papaína depende de condições que preservem sua estrutura terciária. A utilização do leite como substrato, adaptada de Borella et al. (2016, 2018), evidenciou que a hidrólise da caseína é comprometida quando

não há estratégia de proteção, o que limita o uso da forma livre em processos de longa duração.

Figura 17 – Atividade enzimática da papaína pura em 24 h.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Estudos recentes corroboram esses achados. Baidamshina et al. (2021) relataram que a papaína livre sofre degradação significativa em poucas horas, enquanto formas imobilizadas em quitosana mantiveram atividade por períodos prolongados. Ademais, Tacias-Pascacio et al. (2021) destacaram, em sua revisão, que a instabilidade da papaína livre é uma das principais motivações para o desenvolvimento de estratégias de imobilização, uma vez que a enzima imobilizada pode reter até 85% de sua atividade inicial após armazenamento prolongado.

3.3.2 Rendimento de imobilização no hidrogel de tamarindo

A eficiência da fixação da enzima na matriz de tamarindo foi quantificada por meio do cálculo do rendimento de imobilização, correlacionando a atividade enzimática inicial (UPE_i) com a atividade residual detectada no sobrenadante (UPE_f) após o período de contato. Ao aplicar a Equação (2), obteve-se um rendimento expressivo de aproximadamente 97,9%. Esse resultado revela que a redução da atividade no meio líquido não decorreu da instabilidade natural da enzima, mas de sua efetiva migração e

fixação quase total nos poros do hidrogel. A Tabela 4 apresenta os parâmetros utilizados para o cálculo do rendimento e as condições experimentais adotadas durante o processo de imobilização.

Tabela 4 – Parâmetros experimentais e resultado do rendimento de imobilização da papaína.

Categoria	Parâmetro	Símbolo	Valor	Unidade
Dados para cálculo	Atividade enzimática inicial	UPE _i	22,22	U/mL
	Atividade residual no sobrenadante	UPE _f	0,46	U/mL
	Rendimento de imobilização	RI	97,9	%
Condições experimentais	Massa do suporte	—	0,1	g
	Volume de solução enzimática	—	1	mL
	Tampão	—	Fosfato 100 mmol·L ⁻¹ (pH 7)	—
	Temperatura	—	25	°C
	Agitação	—	60	rpm

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Esse índice de rendimento demonstra uma performance superior quando comparado aos achados de De Castro Bizerra et al. (2026), que empregaram o hidrogel de tamarindo como suporte para a imobilização da lipase Eversa Transform 2.0 (ET2). Embora os referidos autores destaquem a excelente capacidade de carga e a biocompatibilidade da matriz de xiloglucano, os valores de eficiência catalítica obtidos para a papaína neste estudo superam os patamares observados para a referida lipase (De Castro Bizerra et al., 2026). Essa disparidade sugere que a papaína apresenta uma afinidade química ainda mais acentuada pelos grupos funcionais da matriz de tamarindo, resultando em um aprisionamento quase integral da carga proteica inicial (Borella et al., 2016).

Essa forte ancoragem pode ser explicada pela elevada densidade de grupos hidroxila (–OH) e unidades de galactose e xilose que compõem o esqueleto do xiloglucano, as quais favorecem a formação de uma rede extensa de ligações de

hidrogênio com os resíduos polares expostos na superfície da papaína (De Castro Bizerra et al., 2026). Adicionalmente, a natureza anfófila da papaína permite que interações hidrofóbicas ocorram com as porções menos polares do polissacarídeo, promovendo um ajuste conformacional que estabiliza a enzima de forma mais eficaz do que em sistemas enzimáticos com menor complementaridade estrutural (Azarkan et al., 2003). O papel do glutaraldeído como agente reticulante é determinante nesse cenário, pois estabelece pontes covalentes entre os grupos amino terminais da enzima e a estrutura do hidrogel, consolidando a retenção que a afinidade natural já havia iniciado (Maghraby et al., 2023). Portanto, a superioridade dos resultados frente aos sistemas de lipases imobilizadas não é apenas numérica, mas reflexo de uma sinergia química específica entre a estrutura da papaína e a arquitetura porosa do hidrogel de tamarindo (Ma et al., 2021).

O polissacarídeo de semente de tamarindo (TSP) possui características que favorecem a imobilização enzimática, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade (Joseph et al., 2012). Conforme demonstrado por Kaur et al. (2012), soluções de TSP exibem excelente resistência a variações de pH (estabilidade em pH 1–10) e boa termoestabilidade, propriedades benéficas para a manutenção da atividade enzimática sob diferentes condições ambientais. Além disso, a alta viscosidade e a capacidade de retenção de substâncias ativas do TSP (Manchanda et al., 2014) são análogas ao seu potencial para retenção de enzimas dentro da matriz do hidrogel.

Ainda, de acordo com De Castro Bizerra (2024), suportes baseados em polissacarídeos naturais são particularmente eficientes para a imobilização enzimática, pois as propriedades reológicas do gel permitem elevada carga de proteína sem comprometer a acessibilidade do substrato ao sítio ativo. No caso da papaína, esse rendimento de 97,9% é fundamental para a viabilidade econômica do biocatalisador, pois garante que a maior parte do insumo enzimático seja preservada no suporte, evitando desperdícios. Resultados semelhantes foram obtidos por Wahba (2023), que reportou rendimentos de imobilização superiores a 90% para papaína em esferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído.

Além da retenção física, a proteção conferida pelo hidrogel atua mantendo as moléculas de enzima fisicamente separadas. Esse isolamento é a estratégia mais eficaz para reduzir drasticamente a taxa de autoproteólise descrita por Borella et al. (2016), preservando a estrutura terciária da proteína por períodos muito superiores às 24 horas em que a enzima livre perde quase a totalidade de sua função. Meyer et al. (2022) destacaram que hidrogéis proporcionam um ambiente aquoso que mimetiza condições

fisiológicas, preservando a conformação nativa da enzima e oferecendo proteção mecânica contra tensões de cisalhamento.

Portanto, a análise conjunta do rendimento e da estabilidade confirma que o hidrogel de tamarindo não apenas sequestra a enzima com eficiência máxima, mas a transforma em um sistema catalítico robusto e passível de reutilização. Esses resultados estão em concordância com estudos anteriores que demonstraram que enzimas imobilizadas em matrizes polissacarídicas naturais podem reter até 82,9% de sua atividade específica após cinco ciclos de reutilização (Zhang et al., 2015). Entretanto, embora ensaios adicionais de reuso e estabilidade operacional prolongada sejam necessários para validação em escala industrial, os resultados obtidos nesta etapa demonstram que o hidrogel de tamarindo constitui uma matriz promissora para imobilização da papaína, reunindo eficiência de fixação, condições operacionais moderadas e potencial de aplicabilidade biotecnológica.

3.3.3 Caracterização por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise por FTIR permitiu comparar os padrões obtidos com aqueles descritos na literatura para papaína livre e papaína imobilizada em matrizes poliméricas. No espectro da papaína pura na Figura 18(a), observaram-se bandas características da estrutura proteica, incluindo o estiramento N–H na região de 3300–3400 cm^{-1} e as bandas de Amida I ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$) e Amida II ($\sim 1540 \text{ cm}^{-1}$).

Segundo Ma et al. (2021), essas bandas representam a assinatura espectral típica da papaína, refletindo a integridade de sua estrutura secundária antes de processos de imobilização. A banda de Amida I, originada majoritariamente por vibrações de estiramento da ligação C=O (contribuindo com 70–85% da energia vibracional) e, em menor extensão, de grupos C–N (10–20%), é altamente sensível à conformação da cadeia principal (*backbone*) proteica e aos padrões de ligação de hidrogênio (Barth, 2007). Já a banda de Amida II, situada entre 1510 e 1580 cm^{-1} , decorre principalmente de deformações N–H no plano (40–60% da energia vibracional) e vibrações de estiramento C–N (18–40%) (Kong; Yu, 2007). Assim, os resultados mostram conformidade com o perfil espectral amplamente estabelecido para a enzima.

Após a incorporação da papaína ao hidrogel, Figura 18(b), observou-se leve redução da intensidade das bandas amida e alargamento da região entre 3300 e 3400 cm^{-1} . De acordo com Da Silva Melo et al. (2023), essa diminuição é indicativa de interações

entre a enzima e grupos hidroxila do polímero, resultando em encapsulamento parcial e formação de ligações de hidrogênio. Os autores destacam que a preservação, ainda que atenuada, das bandas Amida I e II indica que a estrutura da papaína permanece estável após a imobilização. Desse modo, o comportamento observado sugere que a enzima foi incorporada ao hidrogel de tamarindo sem sofrer desnaturação significativa.

Resultados similares foram reportados por Holyavka et al. (2025), que observaram que a imobilização de papaína em diferentes suportes preserva as bandas de amida características, indicando manutenção da estrutura secundária. Adicionalmente, Li et al. (2021) demonstraram que a papaína imobilizada em nanolâminas de MXene (Ti_3C_2) manteve suas bandas de amida características, confirmando a preservação estrutural durante o processo de imobilização.

No espectro da Figura 18(d), a presença do agente de reticulação glutaraldeído promoveu alterações espectrais bem definidas. O hidrogel de tamarindo reticulado apresentou redução acentuada da banda larga de $3300\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$, compatível com o consumo de grupos hidroxila e amina durante a formação da rede polimérica. Mostaraddi et al. (2023) demonstraram, em sistemas de papaína imobilizada em nanopartículas funcionalizadas, que o glutaraldeído provoca diminuição dessa banda e aumento de absorções na região de $1620\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$, atribuídas à formação de ligações do tipo imina ($C=N$). Esse mesmo comportamento foi observado neste espectro, sugerindo reticulação eficiente entre o polímero e o agente reticulante.

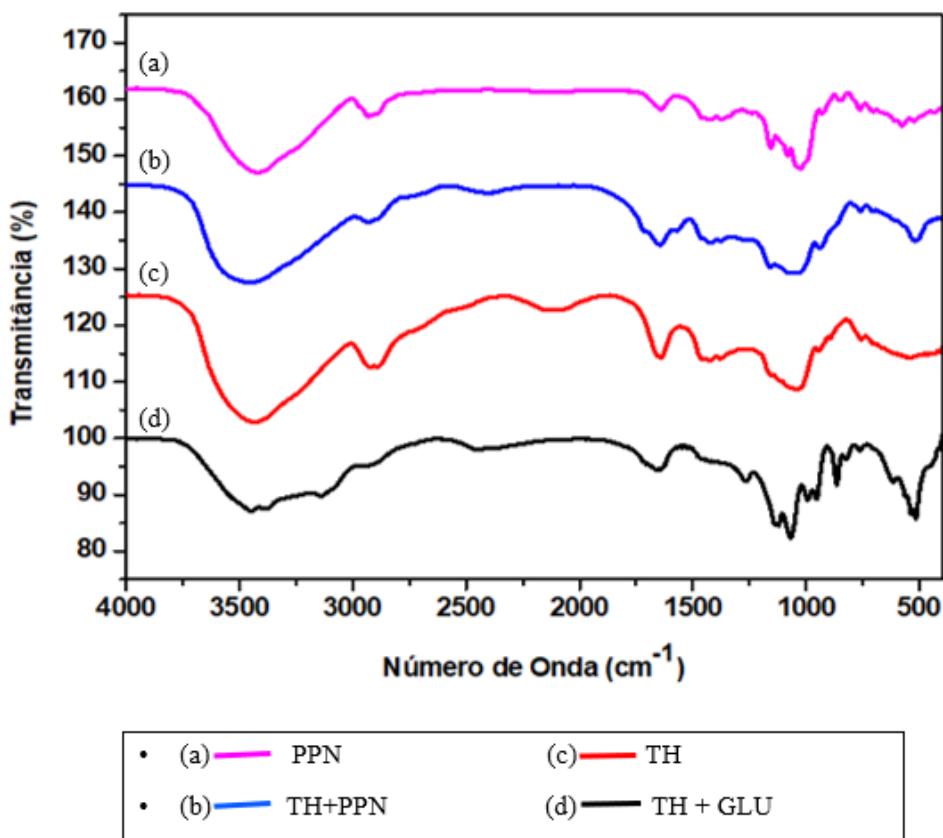
A formação de ligações imina (bases de Schiff) entre grupos aldeído do glutaraldeído e grupos amino da enzima e do polímero é um mecanismo bem estabelecido na literatura de imobilização enzimática (Barbosa et al., 2015; Sheldon et al., 2021). Gür et al. (2018) demonstraram que a otimização da coimobilização de enzimas com alginato de sódio e quitosana ativada com glutaraldeído resulta em formação eficiente de ligações cruzadas, evidenciada por alterações espectrais semelhantes às observadas neste estudo.

Além disso, observou-se intensificação das bandas entre $1100\text{ e }1000\text{ cm}^{-1}$ nos hidrogéis reticulados, sugerindo maior organização do esqueleto polissacarídico. Dai et al. (2017), ao estudarem a imobilização de papaína em hidrogéis de carboximetilcelulose (CMC), álcool polivinílico (PVA) e sílica mesoporosa (SBA-15), relataram que a reticulação promove reorganização estrutural detectada por intensificação dessas mesmas bandas. Assim, os efeitos observados nos hidrogéis de tamarindo são coerentes quando comparados ao estudo de Dai et al. (2017).

O espectro do hidrogel lavado na Figura 18(c) desempenhou função essencial como controle negativo. A ausência total das bandas amida confirmou que os sinais proteicos observados nas formulações contendo papaína derivam exclusivamente da enzima, e não da matriz polissacarídica. Esse procedimento segue recomendações metodológicas presentes em estudos como o de Ma et al. (2021), que reforçam a importância da comparação entre matriz pura e matriz funcionalizada para evitar interpretações equivocadas de absorções espectrais.

Dessa forma, os resultados obtidos por FTIR demonstram que a papaína foi incorporada à matriz de hidrogel de forma eficaz e estável, preservando suas características estruturais essenciais. Além disso, as alterações observadas após a reticulação com glutaraldeído confirmam que o processo modifica a arquitetura do hidrogel, tornando-o mais rígido e organizado, conforme também relatado na literatura (Furlani et al., 2020).

Figura 18 – Espectros de FTIR das amostras: (a) PPN – papaína pura; (b) TH+PPN – papaína + hidrogel de tamarindo; (c) TH – hidrogel de tamarindo lavado; (d) TH+GLU – hidrogel de tamarindo funcionalizado com glutaraldeído.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

3.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que a imobilização da papaína em hidrogel de tamarindo foi eficiente para reduzir a instabilidade estrutural característica da enzima em solução aquosa. A papaína livre apresentou perda acentuada de atividade ao longo de 24 horas, evidenciando o impacto da autoproteólise, enquanto o sistema imobilizado apresentou elevado rendimento de fixação (97,9%) e preservação estrutural confirmada por FTIR. Esses resultados indicam que o hidrogel atuou como um microambiente protetor, mantendo a integridade da proteína e sua atividade catalítica.

Além da eficiência técnica, o sistema desenvolvido reforça o potencial do hidrogel de tamarindo como suporte biotecnológico obtido a partir de biomassa regional. O polissacarídeo extraído da semente de tamarindo, frequentemente tratado como resíduo agroindustrial, foi convertido em uma matriz funcional capaz de estabilizar a enzima e ampliar sua vida útil. Dessa forma, o trabalho não apenas apresenta uma estratégia experimental viável, mas também demonstra a valorização de um recurso natural disponível no semiárido nordestino.

Sob a perspectiva da economia circular regional, o biocatalisador proposto pode ser entendido como parte de um ciclo produtivo simplificado, no qual um resíduo agrícola é transformado em material funcional, utilizado como suporte para uma enzima com potencial aplicação biotecnológica e posteriormente biodegradado sem gerar resíduos persistentes. Esse processo evidencia uma alternativa sustentável baseada no aproveitamento de biomassa e na agregação de valor a recursos locais.

Assim, o sistema papaína–hidrogel de tamarindo demonstrou viabilidade técnica, relevância ambiental e potencial de aplicação em diferentes áreas biotecnológicas. Os resultados obtidos neste capítulo estabelecem uma base experimental consistente para estudos posteriores envolvendo estabilidade catalítica, aplicações biomédicas e sistemas de liberação controlada.

REFERÊNCIAS

- AZARKAN, M. et al. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. **Journal of Chromatography B**, v. 790, p. 229–238, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00084-9](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00084-9).
- BAIDAMSHINA, D. R. et al. Biochemical properties and anti-biofilm activity of chitosan-immobilized papain. **Marine Drugs**, v. 19, n. 4, p. 197, 2021.
- BARBOSA, O. et al. Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 435-456, 2015.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, 2007.
- BAT-OZMATARA, Merve; ÜNLÜ, Aişe; GEVREK, Tugce Nihal. Preparation of isocyanate-containing hydrogel films as antibacterial enzyme immobilization matrices. **Reactive and Functional Polymers**, v. 192, p. 105695, 1 nov. 2023.
- BIZERRA, Viviane de Castro. **Imobilização da Lipase Eversa® Transform 2.0 em Hidrogel de Tamarindo e sua aplicação na síntese de ésteres: butirato de metila e butirato de etila**. 2024. 97 f. Dissertação (Mestrado em Energia e Ambiente) - Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB, Redenção, 2024.
- BIZERRA, V. de Castro et al. Sustainable Ester Synthesis Using Eversa Transform 2.0 Immobilized on Tamarind-Derived Hydrogel Support. **ACS Food Science & Technology**, v. 6, n. 6, p. 711-724, 2026. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsfoodscitech.5c00123>. Acesso em: 21 mar. 2026.
- BORELLA, Júlio César et al. Avaliação da estabilidade e da atividade enzimática de soluções de papaína utilizadas no desbridamento e cicatrização de feridas. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 28, n. 3, p. 179–184, 2016. Disponível em: <https://revistas.cff.org.br/infarma/article/view/1735>. Acesso em: 2 out. 2025.
- BORELLA, J. C. et al. Stability and enzymatic activity of papain in semisolid formulations. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 12-18, 2018.
- BORELLA, Júlio César et al. Formas farmacêuticas semissólidas à base de papaína – avaliação preliminar da estabilidade, contaminação microbiológica e atividade enzimática. **Visão Acadêmica**, v. 19, n. 2, 2018. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/academica/article/view/58223>. Acesso em: 2 out. 2025.
- DAI, Hongjie et al. Pineapple peel carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol/mesoporous silica SBA-15 hydrogel composites for papain immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 169, p. 504–514, 2017.

DAI, Y. et al. In situ encapsulation of laccase in microfibers by emulsion electrospinning: preparation, characterization, and application. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 267-275, 2017.

FURLANI, I. L. et al. Enzyme immobilization: concepts and effects on proteolysis. **Química Nova**, v. 43, n. 4, p. 463-473, 2020.

GEETHALAXMI, M. et al. Physicochemical and bioactive characterization of Tamarindus indica seeds: a potential source for polysaccharide extraction and hydrogel formation. **Food & Function**, 2024.

GÜR, Sinem Diken; İDİL, Neslihan; AKSÖZ, Nilüfer. Optimization of Enzyme Co-Immobilization with Sodium Alginate and Glutaraldehyde-Activated Chitosan Beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 2, p. 538–552, 2018.

HOLYAVKA, Marina G.; GONCHAROVA, Svetlana S.; ARTYUKHOV, Valeriy G. Various Options for Covalent Immobilization of Cysteine Proteases—Ficin, Papain, Bromelain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 2, p. 547, 10 jan. 2025.

HOMAEI, Ahmad Abolpour. Enhanced activity and stability of papain immobilized on CNBr-activated sepharose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 373–377, abr. 2015.

JOSEPH, M. M. et al. Galactoxyloglucan-modified nanocarriers of doxorubicin for improved tumor-targeted drug delivery with minimal toxicity. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 382-391, 2012.

KAUR, H. et al. Carboxymethyl tamarind kernel polysaccharide nanoparticles for ophthalmic drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 833-839, 2012.

KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549-559, 2007.

LI, Chunzhi et al. Non-covalent and covalent immobilization of papain onto Ti3C2 MXene nanosheets. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 148, p. 109817, 1 ago. 2021.

MA, X. et al. Functional characterization of papain-like cysteine protease gene family from Carica papaya. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 1067-1078, 2021.

MA, Y. et al. Synthesis of papain–polyacrylamide hydrogel microspheres and their catalytic application. **New Journal of Chemistry**, v. 45, p. 15551–15559, 2021.

MAGHRABY, Y. R. et al. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. **ACS Omega**, v. 8, n. 6, p. 5184–5196, 31 jan. 2023.

- MANCHANDA, R. et al. Tamarind seed polysaccharide and its modifications—versatile pharmaceutical excipients: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 19, n. 1, p. 100-106, 2014.
- MELO, A. E. C. da Silva et al. Immobilization of papain in chitosan membranes as a potential alternative for skin wounds. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 12, p. 2649, 2023.
- MEYER, J.; MEYER, L.-E.; KARA, S. Enzyme immobilization in hydrogels: a perfect liaison for efficient and sustainable biocatalysis. **Engineering in Life Sciences**, v. 22, n. 3-4, p. 165-177, 2022.
- MOSTARADDI, S. et al. The Relationship Between the Cross-Linker on Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles and the Properties of Immobilized Papain. **Molecular Biotechnology**, v. 65, n. 11, p. 1809–1823, 2023.
- OLIVEIRA, Maria Zillene Franklin da Silva; FERNANDES, Tatiana Sainara Maia; CARVALHO, Tecia Vieira. Síntese e caracterização de beads de quitosana comercial reticulados com glutaraldeído. **Revista Matéria**, v. 26, n. 1, p. 1–14, 2021.
- SHELDON, Roger A.; BASSO, Alessandra; BRADY, Dean. New frontiers in enzyme immobilisation: robust biocatalysts for a circular bio-based economy. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 10, p. 5850–5862, 2021.
- SHENG, Weiqin et al. Enhanced activity and stability of papain by covalent immobilization on porous magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 143–148, 15 jul. 2018.
- SOARES, Aurileide Maria Bispo Frazão. **Imobilização da papaína em suportes híbridos contendo óxidos metálicos nanoparticulados e quitosana: síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica**. 2016. 146 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.
- SOUSA, Isamayra Germano de et al. A novel hybrid biocatalyst from immobilized Eversa® Transform 2.0 lipase and its application in biolubricant synthesis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 42, n. 2, p. 151–172, 2022.
- TACIAS-PASCACIO, V. G. et al. Immobilization of papain: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 188, p. 94-113, 2021.
- WAHBA, M. I. Glutaraldehyde-copper gelled chitosan beads: characterization and utilization as covalent immobilizers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 50, p. 102668, 2023.
- YUAN, Zhong-Zhu et al. A bibliometric analysis of hydrogel research in various fields: the trends and evolution of hydrogel application. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 23, n. 1, p. 70, 2025.
- ZELEKE, Gizachew et al. Land-use impact on stand structure and fruit yield of *Tamarindus indica* L. in the drylands of southeastern Ethiopia. **Life**, v. 11, n. 5, p. 408, 2021.

ZHANG, Y.; GE, J.; LIU, Z. Enhanced activity of immobilized or chemically modified enzymes. **ACS Catalysis**, v. 5, n. 8, p. 4503-4513, 2015.

CAPÍTULO 4

*Estudo in sílico da interação da papaína e análise
computacional da liberação controlada*

RESUMO

Este capítulo apresenta a aplicação de abordagens computacionais para investigar o comportamento estrutural, as interações moleculares e o perfil de liberação controlada da papaína em um sistema polimérico. A análise por *docking* molecular indicou que a interação entre a papaína e a ciclooxigenase-2 é energeticamente favorável e estruturalmente viável, sendo sustentada por diferentes tipos de interações intermoleculares. As simulações de dinâmica molecular foram utilizadas para avaliar a estabilidade estrutural do complexo proteína-proteína ao longo do tempo de simulação, mostrando que o sistema permaneceu estável, sem variações conformacionais significativas. Além disso, a modelagem matemática da liberação controlada permitiu avaliar, de forma preditiva, o comportamento cinético do sistema em diferentes intervalos de tempo. Os resultados indicaram melhor ajuste do modelo de Higuchi para tempos mais longos de liberação, enquanto o modelo de Korsmeyer-Peppas apresentou melhor desempenho nos estágios iniciais. No entanto, como os ensaios de liberação foram realizados exclusivamente por meio de simulação computacional e com base em uma matriz polimérica descrita na literatura, torna-se necessária a validação experimental desses resultados por meio de ensaios de liberação utilizando o hidrogel de tamarindo desenvolvido neste trabalho.

Palavras-chaves: Papaína; *Docking* Molecular; Dinâmica Molecular; Liberação Controlada; Modelagem Matemática.

4.1 INTRODUÇÃO

O avanço das biotecnologias aplicadas ao semiárido exige que o desenvolvimento de novos biomateriais, como o hidrogel de tamarindo, seja validado por métodos que alcancem a resolução atômica (Maghraby et al., 2023). Por mais que os dados de bancada comprovem a eficiência da imobilização, o entendimento real de como a papaína se comporta dentro da matriz e como ela interage com potenciais alvos terapêuticos só é possível através da simulação computacional (Hollingsworth; Dror, 2018). Este capítulo dedica-se ao estudo *in silico* dessas interações, utilizando ferramentas de *docking* e dinâmica molecular para prever a estabilidade e a funcionalidade da enzima (Yan et al., 2020). A ideia central é transformar observações experimentais em modelos preditivos que expliquem a viabilidade biológica do sistema desenvolvido (Yuan et al., 2025).

Um dos pilares deste estudo é a análise da interação entre a papaína e a ciclooxigenase-2 (COX-2), enzima que desempenha papel fundamental na cascata inflamatória (Rouzer; Marnett, 2009). A escolha deste alvo específico justifica-se pelo interesse em investigar o potencial anti-inflamatório da protease vegetal, avaliando se o complexo for-

mado é energeticamente favorável (Amri; Mamboya, 2012). Através de modelos computacionais, busca-se entender se a papaína mantém sua capacidade de reconhecimento molecular mesmo após os processos de síntese e reticulação (Babalola, 2024). Assim, o *docking* proteína-proteína atua como uma prova de conceito para futuras aplicações biomédicas do biocatalisador (Keskin et al., 2008).

Para garantir o rigor científico desta etapa, as estruturas moleculares foram rigorosamente preparadas a partir dos códigos PDB 1CX2 e 9PAP (Kurumbail; Stallings, 1997; Kamphuis; Drenth, 1986). O processo envolveu a limpeza minuciosa de ligantes e águas cristalográficas que poderiam gerar falsos positivos nos resultados de afinidade (Rinaldo; Field, 2003). Além disso, o ajuste dos estados de protonação em pH fisiológico permitiu que as interações eletrostáticas fossem simuladas de forma realista (Field et al., 2000). Todo este cuidado na etapa de preparação é o que confere credibilidade à busca global por conformações estáveis (Yan et al., 2017).

O acoplamento molecular foi executado no servidor HDOCK, utilizando o algoritmo de Transformada Rápida de Fourier (FFT) para varrer as possibilidades de encaixe entre as macromoléculas (Yan et al., 2020). A utilização da FFT é essencial por permitir uma amostragem exaustiva e rápida das orientações espaciais, localizando os vales de menor energia potencial (Yan et al., 2017). O sistema utiliza funções de pontuação que equilibram parâmetros físicos e estatísticos para classificar os melhores modelos de interação (Ormeño; General, 2024). Ao final, o complexo com a melhor pontuação foi selecionado por demonstrar a maior complementaridade geométrica e relevância biológica (Yan et al., 2020).

Complementando o estudo de interação, a análise computacional da liberação controlada foi fundamentada em modelos matemáticos que descrevem o transporte da enzima através do gel (Peppas; Sahlin, 1989). Como a liberação é um processo dinâmico, o uso de equações cinéticas permite prever o comportamento do sistema ao longo de dias ou semanas (Genier et al., 2025). O mapeamento das interações identificado pelo PLIP ajuda a explicar, em nível químico, por que certas taxas de liberação são observadas (Schake et al., 2025). Identificar se a difusão ou a relaxação da matriz governa o processo é vital para o design de novos hidrogéis (Korsmeyer et al., 1983).

Por fim, a estabilidade temporal do sistema foi validada por simulações de dinâmica molecular de 100 ns (Abraham et al., 2015). Parâmetros como o desvio quadrático médio (RMSD) e as flutuações residuais foram monitorados para assegurar que a interação não fosse apenas um evento momentâneo (Maruyama et al., 2023). Essa integração

entre o *docking*, a dinâmica e a modelagem matemática de liberação oferecem uma visão 360 graus do biocatalisador (Bolz et al., 2025). Com isso, fecha-se o ciclo teórico necessário para validar o hidrogel de tamarindo como uma plataforma eficiente para a entrega controlada de enzimas (Genier et al., 2025).

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 *Docking* molecular e análise de interações.

Como etapa complementar às análises experimentais de imobilização da papaína no hidrogel de tamarindo, foram empregadas abordagens computacionais com o objetivo de ampliar a compreensão estrutural e funcional da enzima. A incorporação do *docking* molecular buscou investigar a plausibilidade de interações proteína–proteína envolvendo a papaína e alvos biológicos de interesse, permitindo explorar potenciais aplicações do biocatalisador desenvolvido além do contexto catalítico experimental. Nesse sentido, foi conduzido o *docking* molecular entre a papaína e a ciclooxigenase-2 (COX-2), proteína associada a processos inflamatórios, com o intuito de avaliar parâmetros de afinidade, estabilidade e possíveis regiões de interação. Essa abordagem fornece subsídios teóricos sobre o comportamento molecular da enzima, complementando os resultados experimentais obtidos e contribuindo para uma interpretação mais ampla do sistema estudado.

4.2.2 Preparação das proteínas

As estruturas tridimensionais das proteínas empregadas neste estudo foram obtidas a partir do *Protein Data Bank* (PDB) e submetidas a procedimentos padronizados de preparação estrutural previamente ao *docking* molecular. A enzima ciclooxigenase-2 (COX-2; prostaglandina sintase-2) foi considerada como receptor, enquanto a enzima papaína foi utilizada como ligante enzimático. As estruturas cristalográficas correspondentes foram recuperadas sob os códigos PDB 1CX2 para a COX-2 (Kurumbail e Stallings 1997) e 9PAP para a papaína (Kamphuis e Drenth 1986), ambas determinadas por difração de raios X.

A preparação das estruturas envolveu a remoção de moléculas de água cristalográfica, íons e ligantes não essenciais, incluindo o inibidor sintético co-cristalizado na estrutura da COX-2, a fim de evitar interferências no processo de acoplamento molecular. Adicionalmente, foi realizada a inspeção de resíduos ausentes e a definição de estados de protonação compatíveis com condições fisiológicas de pH.

Hidrogênios polares foram adicionados tanto ao receptor quanto ao ligante, garantindo uma descrição adequada das interações eletrostáticas e das ligações de hidrogênio (Rinaldo, Field; 2003). Essas etapas são fundamentais para assegurar a qualidade estrutural e a confiabilidade dos resultados obtidos por métodos computacionais.

4.2.2.1 Docking molecular

O *docking* molecular proteína–proteína foi realizado utilizando o servidor HDOCK, um método híbrido que combina busca global baseada em FFT (*Fast Fourier Transform*) com funções de pontuação derivadas de potenciais estatísticos e físicos (Yan et al. 2017, 2020). O algoritmo FFT permite uma amostragem eficiente do espaço conformacional, identificando rapidamente as melhores orientações geométricas entre as moléculas antes do refinamento energético. O HDOCK é particularmente adequado para sistemas proteína–proteína, pois permite tanto *docking* guiado por *template* quanto *docking ab initio*, apresentando desempenho comparável ou superior a métodos consagrados na literatura. O complexo com melhor pontuação energética foi selecionado para análises subsequentes, considerando critérios de complementaridade geométrica e plausibilidade biológica.

4.2.2.1.1 Análise das interações proteína-enzima

Após a obtenção do complexo COX-2/papaína, a caracterização detalhada das interações intermoleculares foi realizada por meio do *Protein–Ligand Interaction Profiler* (PLIP) (Schake et al. 2025). Embora originalmente desenvolvido para análises proteína–ligante, o PLIP tem sido amplamente empregado para a identificação automática e padronizada de interações não covalentes em interfaces proteína–proteína (Bolz et al. 2025). O servidor permite a detecção precisa de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, contatos de *van der Waals* e interações aromáticas, fornecendo distâncias geométricas e resíduos envolvidos.

As interações identificadas foram analisadas considerando critérios geométricos amplamente aceitos, nos quais distâncias inferiores a 3.5 Å indicam interações fortes e direcionais, enquanto distâncias entre 3.5 e 5.0 Å são associadas a contatos hidrofóbicos e interações de *van der Waals*. A identificação de resíduos recorrentes na interface foi utilizada para inferir possíveis *hotspots* de interação, frequentemente associados à estabilidade do complexo e à relevância funcional da associação proteína–proteína.

Os dados de simulação com as principais interações receptor-ligante foram visualizados no Pymol (DeLano 2014) e ChimeraX (Pettersen et al. 2021).

4.2.2.1.2 Dinâmica molecular

As simulações computacionais foram realizadas por meio do método de dinâmica molecular (DM) utilizando o programa Gromacs versão 2021.4 e consistiram em 3 etapas. Na primeira etapa os sistemas foram minimizados usando o algoritmo *steepest descent* de modo a evitar átomos sobrepostos ou muito próximos (Wardi 1988; Petrova and Solov'ev 1997; Cai et al. 2016). Em seguida, a segunda etapa concentrou-se em equilibrar os sistemas para a temperatura (NVT) e pressão (NPT) de interesses, 25 °C e 1 atm, respectivamente (Ormeño and General 2024). O termostato *Berendsen* e o barostato *Parrinello-Rahman* foram usados nas etapas NVT e NPT, respectivamente (Lemak and Balabaev 1994; Ulz 2013). As etapas de equilíbrio tiveram um tempo de 5 nanossegundos (ns) cada. Por fim, foi realizada a última etapa, chamada produção, com um tempo de simulação de 100 ns. A partir dessa última etapa foi obtida a trajetória do comportamento do sistema da qual foi feita toda a análise de interações interatômicas. O tamanho do passo para todas as etapas de equilíbrio e produção foram de 2 femtossegundos (ft) (Field et al. 2000).

A estabilidade de cada sistema foi averiguada por meio do *Root Mean Square Deviation* (RMSD), que apresenta as mudanças de posições em relação a um conjunto de posições de referência (Maruyama et al. 2023). As interações foram analisadas usando a função de distribuição radial e função de distribuição espacial (Kulińska et al. 2000). Além disso, as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas foram apresentadas quando formadas durante a trajetória gerada na simulação. A visualização das estruturas e suas posições resultantes da simulação foram realizadas no programa VMD (Humphrey et al. 1996). Os gráficos foram gerados usando o programa Qtrace (Turner 2005).

4.2.2.2 Ensaio *in silico* de liberação controlada.

Para o ensaio de liberação controlada, optou-se por empregar a abordagem computacional (*in silico*), baseado em modelagem matemática e simulação numérica do comportamento de liberação controlada da papaína a partir de matrizes poliméricas do tipo hidrogel. As análises foram realizadas exclusivamente a partir de parâmetros cinéticos reportados na literatura, sem a execução de experimentação própria (Helton; Davis, 2003; Saltelli *et al.*, 2008).

Quanto ao sistema de estudo e fonte dos dados, devido à inexistência de parâmetros cinéticos quantitativos na literatura reportados para o sistema hidrogel de tamarindo–papaína, adotou-se como referência para essa análise, o sistema de hidrogel de quitosana reticulado com glutaraldeído contendo papaína (Vasconcellos; Goulart; Beppu, 2011). Os parâmetros cinéticos utilizados foram extraídos do estudo de Genier *et al.* (2025), conduzido em PBS pH 7,4, a 35 °C, com acompanhamento da liberação por até 30 dias.

Assim, essa abordagem possibilitou a aplicação rigorosa de modelos matemáticos consolidados e a análise sistemática da influência dos parâmetros cinéticos sobre o comportamento de liberação, constituindo base metodológica para o desenvolvimento desse estudo, usando o hidrogel de tamarindo.

4.2.2.2.1 Modelos matemáticos de liberação controlada

A liberação da papaína foi descrita por meio de três modelos semiempíricos utilizados na literatura para sistemas poliméricos de liberação controlada Genier *et al.* (2025).

- **Modelo de Higuchi:** Este modelo descreve a liberação do composto governada predominantemente por difusão Fickiana (processo no qual o composto se desloca da região de maior para a de menor concentração, em função do gradiente de concentração) em matrizes sólidas, sendo aplicável principalmente às frações iniciais do processo de liberação. A equação é dada por:

Eq. (3)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \cdot \sqrt{t}$$

em que M_t/M_∞ representa a fração liberada no tempo t , k_H é a constante cinética de Higuchi ($\text{h}^{-1/2}$) e t é o tempo (Higuchi, 1961; Higuchi, 1963).

- **Modelo de Korsmeyer–Peppas:** O modelo baseia-se em uma lei de potência, sendo adequado para descrever a liberação do composto em siste-

mas poliméricos nos quais atuam simultaneamente os mecanismos de difusão e relaxação da matriz, considerando estruturas com geometria definida. A equação utilizada foi:

Eq. (4)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n$$

onde k é a constante cinética e n é o expoente de liberação, indicador do mecanismo dominante. Assim, para sistemas com geometria cilíndrica, valores de $n < 0,45$ indicam predominância de difusão *Fickiana* (Korsmeyer *et al.*, 1983; Ritger; Peppas, 1987). Para melhores resultado, neste estudo, o expoente n foi mantido fixo conforme descrito na literatura.

- **Modelo Parabólico de Peppas–Sahlin:** Este modelo permite analisar separadamente os dois principais mecanismos responsáveis pela liberação do composto a partir da matriz polimérica: a difusão, relacionada ao transporte do ativo através da rede do polímero, e a relaxação, associada às mudanças estruturais da matriz durante o processo de liberação. Considerando as simplificações normalmente adotadas para sistemas poliméricos, assume-se que esses mecanismos sejam predominantes, o que facilita a interpretação dos resultados experimentais. A equação empregada foi:

Eq. (5)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_p \cdot \sqrt{t} + b \cdot t$$

em que K_p representa a contribuição difusional e b representa a contribuição associada à relaxação ou reorganização estrutural da matriz polimérica. Ainda, quando apresentados, os valores negativos de b podem indicar fenômenos como reorganização da rede ou readsorção do soluto (Peppas; Sahlin, 1989).

4.2.2.2.2 Simulação Computacional, Análise de Sensibilidade e Critérios de Validação.

As equações dos modelos foram implementadas em ambiente Python (versão 3.10+), utilizando bibliotecas científicas para cálculo numérico, análise estatística e visualização gráfica. O intervalo de simulação compreendeu até 30 dias, com segmentação temporal uniforme. A influência dos parâmetros cinéticos sobre os perfis de liberação foi avaliada por meio de análise de sensibilidade global, com amostragem sistemática do espaço paramétrico, conforme recomendações para propagação de incertezas em sistemas complexos (Helton; Davis, 2003; Saltelli *et al.*, 2008).

Os perfis simulados foram submetidos a critérios de viabilidade, sendo considerados adequados aqueles cuja fração de liberação acumulada situou-se entre 80% e 95%, intervalo adotado com base em práticas usuais de avaliação de sistemas de liberação controlada (FDA, 1999). A análise abrangeu dois cenários temporais: 24 horas, para aplicações de curto prazo, e 30 dias, para sistemas de liberação prolongada. Complementarmente, foram calculadas estatísticas descritivas e tempos característicos de liberação, permitindo a comparação entre os modelos matemáticos e a identificação de regiões do espaço paramétrico associadas a comportamentos otimizados.

Para assegurar a consistência física e a reprodutibilidade dos resultados, aplicaram-se procedimentos de validação numérica, incluindo a restrição da fração liberada ao intervalo físico admissível $0 \leq M_t/M_\infty \leq 1$ e a verificação estrita da monotonicidade da liberação acumulada ao longo do tempo.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Análise das interações entre os resíduos do receptor e do ligante

A interação molecular entre a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), um alvo central na biossíntese de prostaglandinas pró-inflamatórias, e a enzima papaína, uma cisteíno-protease vegetal com propriedades anti-inflamatórias descritas na literatura, foi investigada por meio de *docking* molecular proteína-proteína (Keskin *et al.*, 2008; Sim *et al.*, 2025). A análise revelou uma interface de contato bem definida, sustentada por um conjunto balanceado de interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos, sugerindo um complexo estruturalmente estável e potencialmente relevante do ponto de vista funcional (conforme ilustrado na Tabela 5 e na Figura 19).

A papaína é tradicionalmente utilizada para aliviar dor, inchaço e inflamação, com estudos confirmando sua eficácia na redução de inflamação associada a condições como cirurgia dental e problemas articulares (Rakhimov, 2000; Amri; Mamboya, 2012). Sua

ação anti-inflamatória é parcialmente atribuída à sua capacidade de degradar proteínas, o que pode prevenir o desenvolvimento ou propagação da inflamação pela quebra de substâncias mensageiras, receptores celulares e anticorpos de natureza proteica (Babalola, 2024).

Os resíduos da COX-2 localizados nas cadeias A e D participam ativamente da interface de interação, com destaque para Arg 428A, Gln 583A, Lys 175D, Glu 179D, Arg 185D, Glu 186D, Tyr 262D e His 278D, os quais apresentam características químicas favoráveis à formação de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas (Rouzer; Marnett, 2009). Esses resíduos são frequentemente associados à estabilização de complexos proteína–proteína e à modulação da afinidade molecular em sistemas biológicos. Conforme demonstrado por Orlando et al. (2015), resíduos polares e carregados são fundamentais para a estabilização de interfaces proteína–proteína, contribuindo significativamente para a energia livre de ligação.

Adicionalmente, resíduos hidrofóbicos como Phe 187D, Met 196D, Leu 294D, Val 295D e Ile 279D contribuem para a complementaridade estrutural da interface, favorecendo o empacotamento molecular e a redução da exposição ao solvente. Estudos de Janin et al. (2008) demonstraram que interfaces proteína–proteína tipicamente apresentam uma combinação de regiões hidrofóbicas cercadas por resíduos polares, padrão observado no complexo COX-2/papaína.

No ligante, a papaína, os resíduos Ser 21A, Arg 58A, Asn 64A, Tyr 67A, Trp 69A, Gln 114A e Arg 111A desempenham papel central na interação com a COX-2, atuando como doadores e aceitadores de ligações de hidrogênio, além de participarem de interações eletrostáticas (Azarkan et al., 2003). Paralelamente, resíduos hidrofóbicos como Val 91A, Ala 137A e Phe 207A reforçam a estabilidade do complexo por meio de interações de van der Waals, um mecanismo recorrente em interfaces proteína–proteína biologicamente relevantes.

Estudos recentes demonstraram a capacidade da papaína em inibir a expressão de COX-2. Jiang et al. (2018) evidenciaram que a papaína pode atenuar a ativação de monócitos por inibição da expressão de COX-2, operando por meio da regulação das vias de sinalização MAPKs e PI3K/Akt. Adicionalmente, extratos de casca de mamão demonstraram reduzir a atividade de COX-2, sugerindo este como um mecanismo para seus efeitos anti-inflamatórios (Nguyen et al., 2013).

As interações intermoleculares mais significativas incluem ligações de hidrogênio e contatos eletrostáticos entre Arg 428A–Gln 114A (3,06 Å), Gln 583A–Gln 114A (2,997

Å), Lys 175D–Arg 58A (2,760 Å) e Glu 179D–Gln 92A (4,710 Å). Distâncias inferiores a 3,5 Å indicam interações fortes e direcionais, enquanto contatos entre 3,5 e 5,0 Å, como observado para algumas interações envolvendo Glu 179D, sugerem contribuições adicionais de natureza eletrostática e de van der Waals (Jeffrey, 1997). Interações hidrofóbicas relevantes, como Phe 187D–Ser 21A (3,158 Å), Met 196D–Ala 137A (4,294 Å) e Leu 294D–Tyr 67A (2,935 Å), reforçam a organização estrutural da interface e contribuem para a estabilidade conformacional do complexo.

Do ponto de vista funcional, a recorrência de Gln 114A da papaína como resíduo central de ancoragem, interagindo com múltiplos resíduos da COX-2, sugere seu papel como *hotspot* de interação (Vane et al., 1998). De modo semelhante, Arg 428A da COX-2 destaca-se como um resíduo-chave na estabilização do complexo por meio de pontes de hidrogênio. Clackson e Wells (1995) demonstraram que *hotspots* de interação frequentemente envolvem resíduos de tirosina, triptofano e arginina, os quais contribuem desproporcionalmente para a energia de ligação.

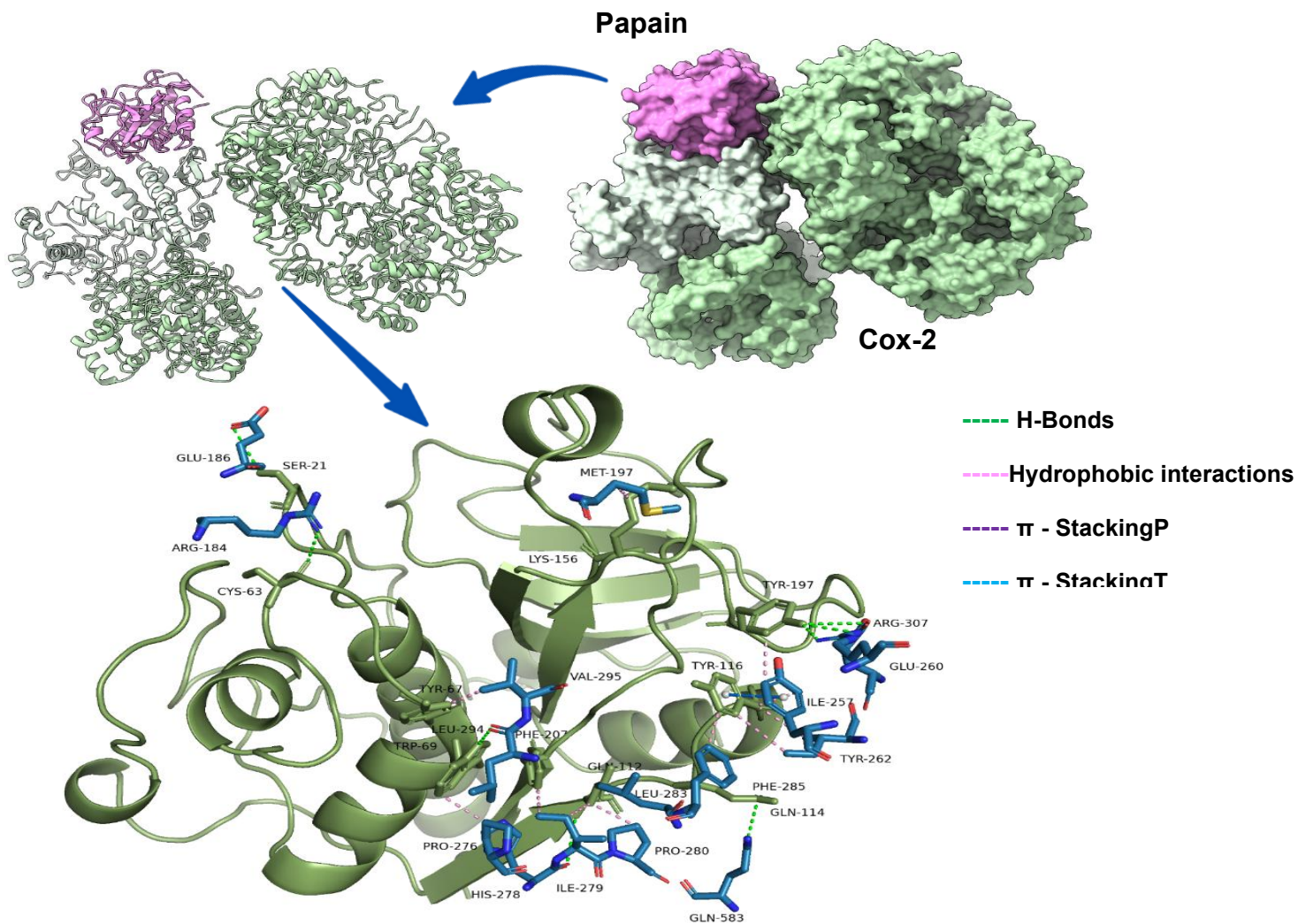
Em conjunto, os resultados sugerem que a interação entre COX-2 e papaína é estruturalmente favorável e pode estar associada à modulação da atividade inflamatória, possivelmente por interferência direta ou indireta na função catalítica da COX-2. Embora esses achados forneçam base molecular robusta, estudos adicionais, como simulações de dinâmica molecular e validações experimentais, são necessários para confirmar a estabilidade do complexo e esclarecer suas implicações biológicas (Keskin et al., 2008).

Tabela 5 - Principais interações intermoleculares identificadas no *docking* molecular entre a enzima COX-2 (receptor) e a papaína (ligante), indicando os resíduos envolvidos e as respectivas distâncias interatômicas (Å). Distâncias inferiores a 3,5 Å sugerem interações fortes, enquanto valores entre 3,5 e 5,0 Å indicam contatos de van der Waals ou interações eletrostáticas de menor intensidade.

Resíduo do receptor (Cox-2)	Resíduo do ligante (Papaina)	Distância (Å)
Arg 428A	Gln 114A	3.060
Gln 583A	Gln 114A	2.997
Lys 175D	Arg 58A	2.760
Glu 179D	Gln 92A	4.710
Glu 179D	Gln 93A	4.806
Glu 179D	Tyr 94A	4.792
Phe 187D	Ser 21A	3.158
Met 196D	Ala 137A	4.294
Leu 294D	Tyr 67A	2.935
Tyr 262D	Phe 207A	3.196
Arg 185D	Ser 21A	2.145
Ile 279D	Gln 112A	2.400
Arg 307D	Tyr 197A	2.268

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Figura 19 – Complexo COX-2/papaina obtido por *docking* molecular. No topo, estruturas antes e após o acoplamento (papaina em magenta e COX-2 em verde). Abaixo, ampliação da interface destacando resíduos e interações principais: ligações de hidrogênio, hidrofóbicas e π - π , responsáveis pela estabilidade do complexo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

4.3.2 Dinâmica molecular

Um complexo proteína–proteína pode ser descrito como um sistema termodinâmico dinâmico, onde a estabilidade é governada por trocas energéticas e interações intermoleculares contínuas com o solvente (Arcon et al., 2017). No contexto deste estudo, é fundamental considerar que a imobilização em matrizes poliméricas não anula essas propriedades, mas cria um microambiente onde as forças não covalentes e os processos de transferência de calor entre moléculas e íons continuam a ditar a conformação proteica (Beretta, 2020). De acordo com os princípios da termodinâmica, a estabilidade observada nas simulações sugere que a enzima mantém sua integridade estrutural mesmo sob as condições impostas pelo sistema de suporte (Abraham et al., 2015). Assim, a análise da trajetória molecular permite compreender como a energia livre do sistema se comporta diante das restrições impostas pela vizinhança química do hidrogel (Hess et al., 2008).

Com o objetivo de investigar esse comportamento, simulações de dinâmica molecular foram empregadas utilizando o pacote GROMACS, permitindo avaliar se a matriz de xiloglucano imporia restrições estéricas capazes de comprometer a interação com a COX-2 (Abraham et al., 2015). Embora a imobilização limite a difusão rotacional da papaína, a porosidade característica do hidrogel de tamarindo e a flexibilidade das cadeias de xiloglucano permitem que a enzima preserve sua capacidade de reconhecimento molecular (De Castro Bizerra et al., 2026). Essa abordagem elucidada que, longe de ser um impedimento estérico intransponível, o suporte atua como um estabilizador conformacional que mantém os sítios de interação expostos e acessíveis ao alvo terapêutico (Hollingsworth; Dror, 2018). Dessa forma, a simulação demonstra que o biocatalisador imobilizado mantém um potencial de interação comparável ao da enzima livre, garantindo a manutenção da relação entre estrutura e função biológica (Du et al., 2016).

Além das questões de posicionamento espacial, é preciso considerar que a eficácia terapêutica da papaína depende da manutenção da tríade catalítica em uma conformação funcional, mesmo quando restrita pela matriz (Azarkan et al., 2003). A análise da Área de Superfície Acessível ao Solvente (SASA) sugere que, embora a enzima esteja ancorada ao xiloglucano, suas regiões de interface críticas permanecem expostas, permitindo que o reconhecimento molecular da COX-2 ocorra sem impedimentos estéricos significativos (Maruyama et al., 2023). Essa preservação da acessibilidade é favorecida pela organização das cadeias do polissacarídeo de tamarindo, que formam canais porosos amplos o suficiente para a difusão de macromoléculas de interesse biológico (De Castro Bizerra et al., 2026). Portanto, a imobilização não atua como uma barreira ao potencial terapêutico,

mas como um suporte que orienta a enzima, minimizando o autodesdobramento e potencializando a estabilidade do complexo proteína-proteína (Hollingsworth; Dror, 2018).

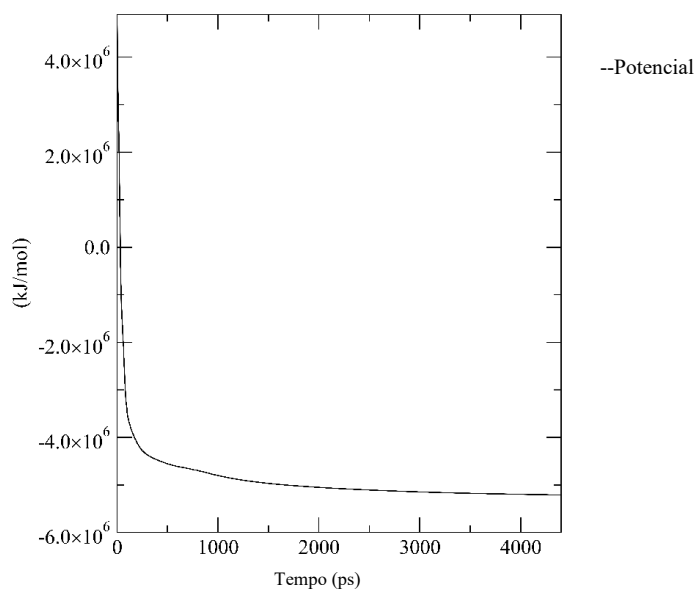
4.3.2.1 *Minimização de energia inicial*

A etapa de minimização promoveu redução rápida e consistente da energia potencial em todos os complexos proteína-proteína (Figura 20). A minimização de energia é etapa essencial na preparação de sistemas proteína-proteína, pois visa eliminar contatos estéricos desfavoráveis e tensões estruturais introduzidas durante o *docking* (Lemkul, 2018). No presente estudo, a minimização inicial do complexo COX-2/papaína resultou em redução acentuada da energia potencial do sistema, conforme observado no perfil energético obtido no GROMACS, indicando rápida reorganização estrutural dos átomos nas regiões mais flexíveis e, principalmente, na interface de interação entre as proteínas.

A queda pronunciada da energia nos estágios iniciais está associada à remoção de sobreposições atômicas e interações repulsivas de curto alcance, enquanto a estabilização gradual da energia em valores mais negativos reflete a convergência do sistema para um mínimo energético local. Esse comportamento é típico de sistemas biomoleculares adequadamente relaxados e sugere que interações não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e forças de van der Waals, passaram a governar a estabilidade do complexo (Valverde, 2001; Karplus; McCammon, 2002).

A ausência de flutuações abruptas após a fase inicial de relaxamento indica que o complexo se encontra estruturalmente estável e livre de artefatos geométricos, condição necessária para a execução confiável das etapas subsequentes de equilíbrio e produção em dinâmica molecular. Dessa forma, a minimização de energia assegura descrição fisicamente realista do sistema, fornecendo base robusta para a análise da estabilidade conformacional e das interações proteína-proteína ao longo do tempo (Hess et al., 2008; Lemkul, 2018).

Figura 20 – Variação da energia potencial durante a minimização do complexo receptor COX-2 e a enzima papaína. Observa-se queda rápida inicial e estabilização em ~1000–1200 ps, com diferenças finais pequenas entre os ligantes. As curvas são sobrepostas, indicando ausência de tensões locais relevantes após o preparo dos sistemas.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

4.3.2.2 Equilíbrio 1 – Temperatura (NVT)

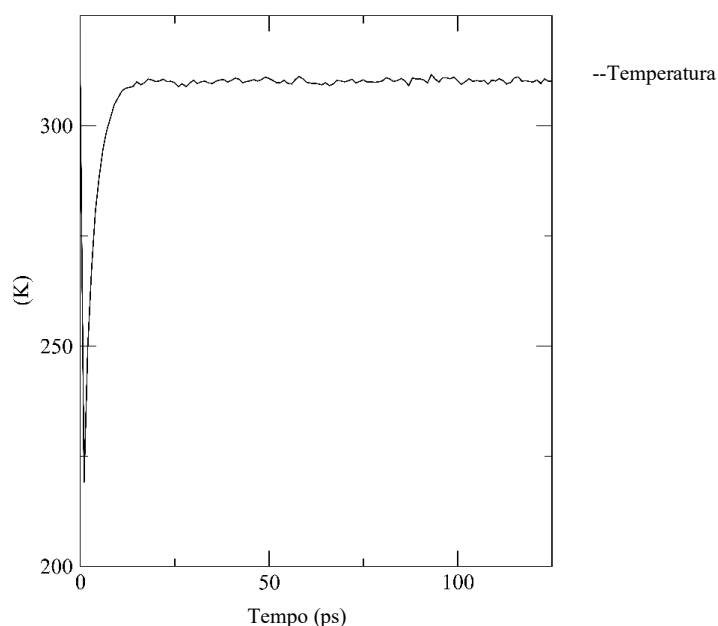
Após a minimização de energia, o complexo proteína–proteína foi submetido à etapa de equilíbrio em ensemble NVT com o objetivo de estabilizar a temperatura do sistema antes da fase de produção. O perfil térmico obtido indica curto regime transiente nos primeiros instantes da simulação, correspondente ao ajuste das velocidades atômicas e à redistribuição da energia cinética imposta pelo termostato. Em seguida, a temperatura oscilou de maneira estável em torno do valor-alvo de 300 K, sem apresentar deriva sistemática ao longo do tempo.

Na Figura 21, as flutuações térmicas observadas permanecem dentro de intervalo estreito, característico de sistemas biomoleculares bem controlados termicamente, indicando a eficiência do método de acoplamento empregado. Esse comportamento sugere que a energia térmica foi distribuída de forma homogênea, minimizando a ocorrência de aquecimento localizado ou instabilidades que poderiam comprometer a integridade estrutural do complexo (Bussi et al., 2007; Ibrahim et al., 2024).

A estabilização da temperatura durante a etapa NVT é pré-requisito fundamental para as fases subsequentes de equilíbrio em NPT e para a simulação de produção, pois assegura que eventuais mudanças conformacionais observadas posteriormente estejam

associadas à dinâmica intrínseca do complexo, e não a artefatos decorrentes de controle térmico inadequado. Assim, os resultados da equalibração em NVT confirmam que o sistema atingiu equilíbrio térmico apropriado, validando a continuidade das simulações de dinâmica molecular (Adelusi et al., 2022; Al-Asadi et al., 2025).

Figura 21 – Perfil de temperatura do complexo proteína–proteína durante a etapa de equalibração em ensemble NVT. Observa-se breve regime transiente inicial, seguido por oscilações estáveis em torno de 300 K, indicando controle térmico eficiente e equilíbrio adequado do sistema antes das etapas de NPT e produção.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

4.3.2.3 Equalibração 2 – Pressão (NPT)

Após a estabilização térmica em ensemble NVT, o sistema foi submetido à equalibração em ensemble NPT com o objetivo de ajustar o volume do sistema e estabilizar a pressão em torno de 1 atm, condição essencial para reproduzir um ambiente termodinâmico próximo ao fisiológico. O perfil de pressão evidencia flutuações pronunciadas nos instantes iniciais da simulação, comportamento esperado para sistemas biomoleculares solvatados, especialmente durante o acoplamento inicial do barostato e a acomodação do volume da caixa de simulação (Parrinello; Rahman, 1981; Berendsen et al., 1984).

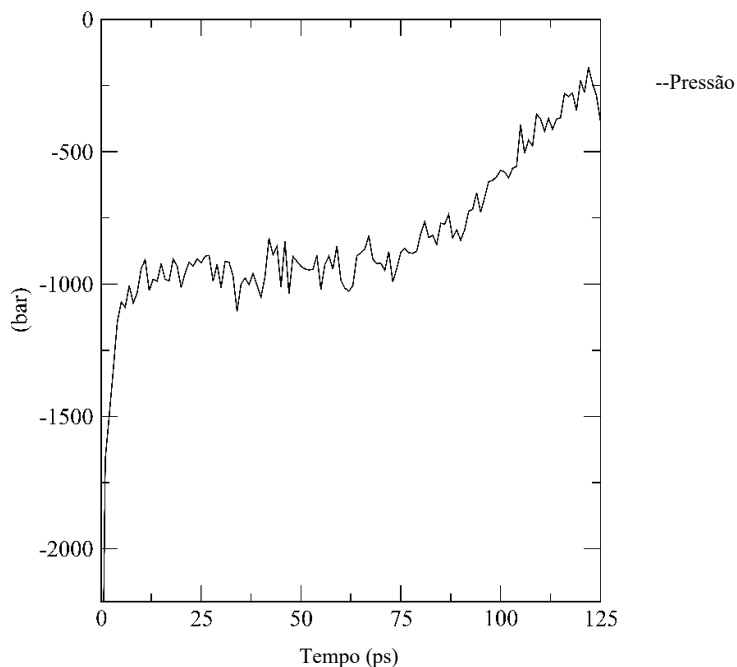
Com o avanço da simulação, observa-se na Figura 22 a ausência de deriva sistemática da pressão, indicando que o sistema atingiu regime estacionário. As

oscilações em torno do valor-alvo refletem a natureza estatística do ensemble NPT, no qual a pressão é variável intensiva sujeita a flutuações maiores do que a temperatura, particularmente em sistemas de tamanho finito como complexos proteína–proteína (Martyna et al., 1992; Tuckerman, 2006).

A estabilização do regime pressórico sugere que o solvente e os íons foram adequadamente redistribuídos ao redor do complexo, permitindo o relaxamento estrutural global sem induzir distorções artificiais na interface proteína–proteína. Esse comportamento é fundamental para garantir que as análises subsequentes, como RMSD, RMSF, área de superfície acessível ao solvente (SASA) e cálculos energéticos, reflitam a dinâmica intrínseca do complexo e não artefatos decorrentes de controle inadequado de pressão (Sinha et al., 2022).

Portanto, os resultados da equilibração em NPT confirmam que o sistema alcançou estado termodinâmico consistente, validando a continuidade para a etapa de produção em dinâmica molecular.

Figura 22 – Perfil de pressão do complexo proteína–proteína durante a etapa de equilibração em ensemble NPT. Observam-se flutuações iniciais associadas ao ajuste do volume do sistema, seguidas por oscilações estáveis em torno de 1 atm, indicando controle pressórico eficiente e adequado relaxamento do



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

4.3.2.4 *Análise de Root Mean Square Deviation (RMSD)*

A estabilidade conformacional do complexo proteína–proteína ao longo da simulação de produção de 100 ns foi avaliada por meio do RMSD, expresso em nanômetros (Figura 23). O RMSD quantifica a distância média entre os átomos de uma estrutura simulada e uma estrutura de referência, servindo como indicador primário de desvio estrutural e estabilidade geral do sistema durante uma simulação de dinâmica molecular (Kufareva; Abagyan, 2012).

O perfil de RMSD revela aumento pronunciado nos primeiros estágios da simulação, atingindo valores máximos da ordem de 1,3–1,4 nm (~13–14 Å). Esse comportamento indica evento significativo de rearranjo estrutural global, que vai além das flutuações térmicas tipicamente observadas em complexos proteicos rigidamente estáveis (Karplus; McCammon, 2002; Hollingsworth; Dror, 2018).

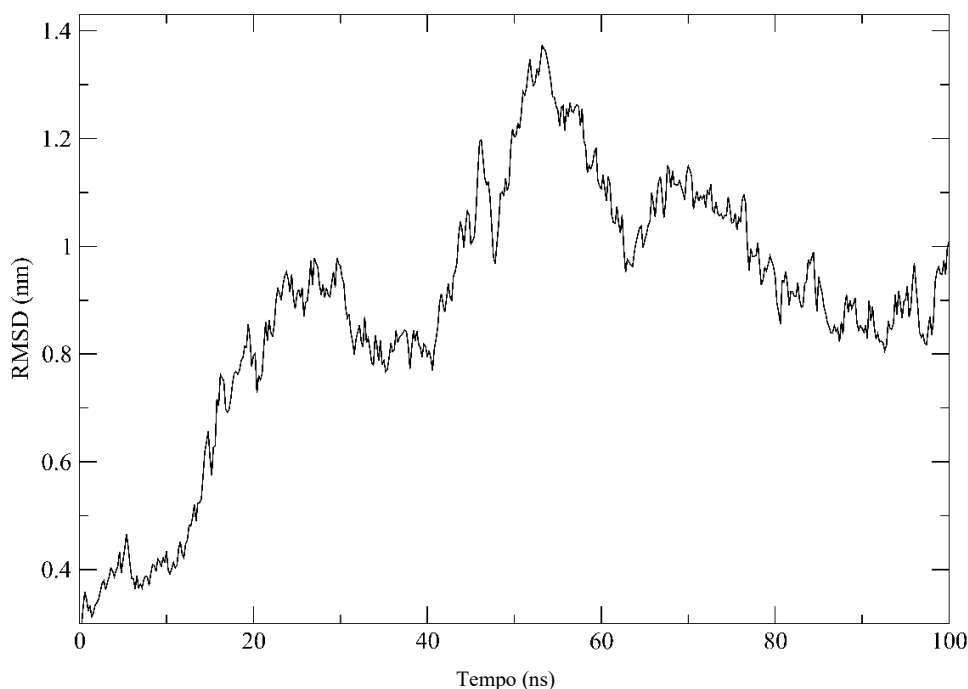
Valores de RMSD acima de ~0,6–0,8 nm em simulações de proteínas geralmente refletem movimentos coletivos de domínios, reorientações relativas entre subunidades ou adaptações conformacionais extensas, especialmente em sistemas proteína–proteína, nos quais a interface pode sofrer reorganização após a remoção de restrições impostas durante o *docking* e a equilibração inicial (Dror et al., 2012; Filipe; Loura, 2022). Assim, o pico observado próximo a 1,4 nm sugere processo de acomodação estrutural tardia, possivelmente associado ao ajuste fino da interface de interação entre as proteínas em ambiente aquoso explícito.

Após esse evento de rearranjo, o RMSD passou a oscilar em torno de um novo patamar médio, sem apresentar tendência contínua de aumento ao longo do restante da trajetória. Esse comportamento indica que, apesar da magnitude elevada do deslocamento inicial, o sistema atinge regime dinâmico estacionário, caracterizado por flutuações limitadas em torno de valor constante. Tal padrão é consistente com sistemas que passam por transição conformacional inicial antes de alcançar estabilidade relativa, fenômeno frequentemente observado em simulações longas de complexos biomoleculares flexíveis (Shaw et al., 2010; Hollingsworth; Dror, 2018).

É importante destacar que RMSD elevados não implicam, necessariamente, instabilidade ou dissociação, desde que não apresentem deriva progressiva ao longo do tempo (Liu et al., 2018). No presente caso, a ausência de aumentos contínuos após o pico máximo sugere que o complexo não sofreu desassociação completa, mas reorganização estrutural significativa seguida de estabilização. Esse comportamento reforça a necessidade de análises complementares, como RMSF, número de contatos

intermoleculares, área de superfície acessível ao solvente (SASA) e energias de interação, para distinguir entre flexibilidade funcional e perda de integridade do complexo (Gohlke; Klebe, 2002).

Figura 23 – Evolução temporal do RMSD (nm) do complexo proteína–proteína ao longo de 100 ns de simulação de dinâmica molecular de produção. Após período inicial de acomodação estrutural, o RMSD permanece estável, com flutuações dentro de intervalo típico de sistemas proteicos estáveis, indicando manutenção da integridade conformacional do complexo.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

4.3.2.5 Análise de Root Mean Square Fluctuation (RMSF)

A mobilidade residual do complexo proteína–proteína ao longo da simulação foi avaliada por meio do RMSF (Root Mean Square Fluctuation), expresso em nanômetros. O RMSF mede a flutuação média de átomos ou resíduos individuais em torno de suas posições médias durante uma simulação, fornecendo informações sobre a flexibilidade e mobilidade de diferentes partes de uma proteína ou complexo (Bagewadi et al., 2023).

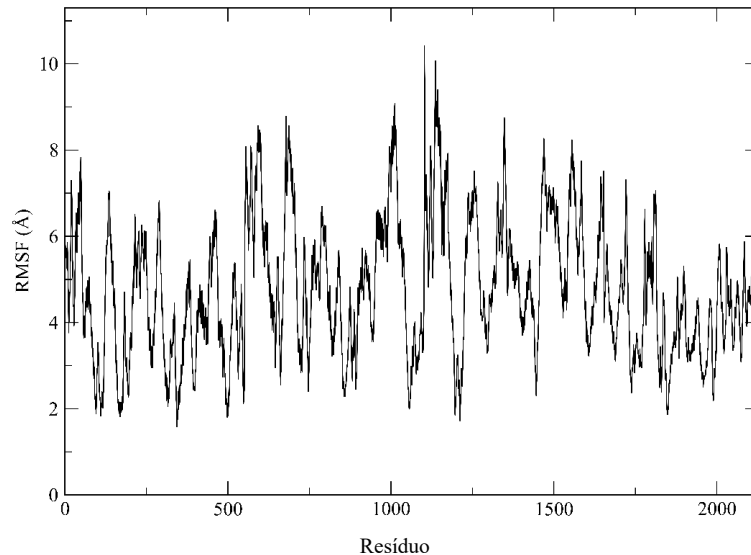
De modo geral, o perfil de RMSF indica que a maior parte dos resíduos apresenta flutuações inferiores a 0,25–0,30 nm ($\sim 2,5$ – $3,0$ Å), valores amplamente aceitos na literatura como indicativos de boa estabilidade local ao longo da trajetória (Bagewadi et al., 2023).

As flutuações mais pronunciadas concentram-se em regiões específicas da sequência, particularmente nas extremidades N- e C-terminais e em segmentos de loop expostos ao solvente, onde valores de RMSF atingem aproximadamente 0,45–0,60 nm ($\sim 4,5\text{--}6,0$ Å). Esse comportamento é esperado, uma vez que tais regiões apresentam menor restrição estrutural e não participam diretamente do núcleo estável da proteína ou da interface de interação, sendo naturalmente mais flexíveis em simulações em solvente explícito (Li et al., 2022).

É relevante destacar que resíduos localizados na região de interface proteína–proteína exibem flutuações significativamente menores quando comparados às regiões periféricas. A ausência de picos elevados de RMSF na interface sugere que os contatos intermoleculares estabelecidos durante o *docking* foram mantidos ao longo da simulação, indicando estabilidade local da interação e ausência de eventos de dissociação parcial. Em sistemas proteína–proteína, esse padrão — baixa flutuação na interface e maior mobilidade em regiões externas — é característico de complexos estruturalmente estáveis e funcionalmente plausíveis (Zen et al., 2010).

Embora alguns resíduos apresentem valores de RMSF moderadamente elevados, esses picos não são acompanhados por instabilidades globais, como deriva contínua do RMSD ou aumento progressivo da SASA. Assim, tais flutuações devem ser interpretadas como flexibilidade conformacional local, possivelmente necessária para ajustes estruturais finos e acomodação dinâmica do complexo no ambiente aquoso, e não como indicativo de perda de integridade estrutural (Whitten et al., 2005). Esses dados são mostrados na Figura 24.

Figura 24 - Perfil de RMSF (nm) dos resíduos do complexo proteína–proteína ao longo da simulação de dinâmica molecular de 100 ns. Observa-se baixa flutuação na maior parte da estrutura, especialmente na região de interface, enquanto picos mais elevados concentram-se em regiões de loop e nas extremidades N- e C-terminais, refletindo flexibilidade conformacional local típica de regiões expostas ao solvente.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

4.3.3 Área de superfície acessível ao solvente (SASA)

A área de superfície acessível ao solvente (SASA) é parâmetro amplamente utilizado para monitorar alterações conformacionais e avaliar a estabilidade estrutural de complexos biomoleculares ao longo de simulações de dinâmica molecular, refletindo o grau de exposição da superfície proteica ao solvente (Shrake; Rupley, 1973; Marsh; Teichmann, 2014). SASA representa a área total da superfície de uma molécula acessível a moléculas de solvente, tipicamente calculada pelo método da sonda esférica rolante (Richmond, 1984). Variações significativas nesse parâmetro podem indicar processos de compactação, expansão estrutural ou rearranjos conformacionais relevantes.

Conforme observado na Figura 25, o perfil de SASA do complexo proteína–proteína ao longo de 100 ns apresenta comportamento globalmente estável, sem tendências de aumento ou diminuição progressiva. Após período inicial de acomodação estrutural, observado nos primeiros ~10–20 ns, os valores de SASA passam a oscilar em torno de média aproximadamente constante, indicando que o sistema atingiu equilíbrio conformacional dentro da escala temporal da simulação.

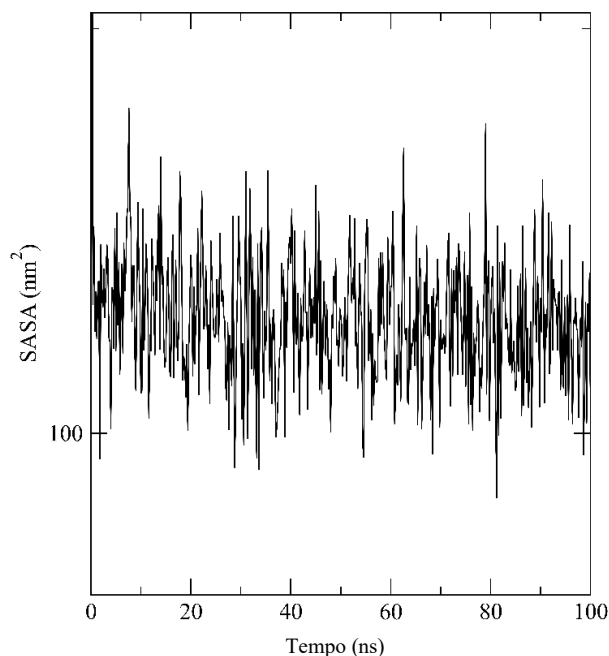
Os valores médios de SASA mantêm-se dentro de faixa estreita, com flutuações moderadas e sem picos abruptos, sugerindo ausência de eventos de desnaturação parcial ou abertura significativa da estrutura. Um complexo proteína–proteína estável e compacto

geralmente mantém SASA relativamente constante e mais baixa (Lins et al., 2003). Aumentos significativos de SASA podem indicar desenovelamento ou estrutura menos compacta, sugerindo redução de estabilidade (Chen; Brooks, 2010).

As pequenas oscilações observadas ao longo da trajetória podem ser atribuídas a rearranjos locais e movimentos respiratórios naturais da proteína em solvente explícito, especialmente em regiões flexíveis como loops e extremidades, não configurando instabilidade estrutural global. Em estudos de dinâmica molecular, esse comportamento é típico de sistemas bem equilibrados (Komeiji et al., 1993).

Em conjunto, a estabilidade do perfil de SASA reforça os resultados obtidos nas análises de RMSD e RMSF, corroborando que o complexo proteína–proteína mantém conformação compacta e estruturalmente consistente ao longo da simulação. A convergência desses parâmetros indica que a interação modelada é energeticamente e estruturalmente plausível sob condições fisiológicas simuladas.

Figura 25 – Evolução temporal da área de superfície acessível ao solvente (SASA) do complexo proteína–proteína ao longo de 100 ns de simulação de dinâmica molecular. Após período inicial de acomodação estrutural, o sistema apresenta valores estáveis de SASA, indicando equilíbrio conformacional e manutenção da compactação estrutural ao longo da trajetória.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

4.3.4 Ensaio *in silico* de liberação controlada

4.3.4.1 Viabilidade paramétrica dos modelos matemáticos

A análise da viabilidade paramétrica evidenciou comportamentos substancialmente distintos entre os três modelos matemáticos avaliados, demonstrando que a adequação de um modelo está fortemente condicionada à escala temporal considerada. Os modelos de Higuchi e Korsmeyer–Peppas são amplamente utilizados para descrever e analisar a liberação de fármacos a partir de sistemas de hidrogel, fornecendo informações sobre os mecanismos de liberação subjacentes (Siepmann; Siepmann, 2012; Peppas; Narasimhan, 2014).

O modelo de Higuchi descreve a cinética de liberação de fármacos a partir de sistema de matriz sólida, baseado principalmente em princípios de difusão. Analisa a porcentagem cumulativa de fármaco liberado em função da raiz quadrada do tempo (Higuchi, 1963). Esse modelo é particularmente aplicável quando a liberação do fármaco é controlada apenas por difusão, a partir de matrizes planares homogêneas que não se dissolvem (Siepmann; Peppas, 2011).

O modelo de Korsmeyer–Peppas, também conhecido como Lei de Potência, é modelo empírico utilizado para descrever a liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos, especialmente quando o mecanismo de liberação não é bem compreendido ou envolve combinação de mecanismos cinéticos (Korsmeyer et al., 1983; Ritger; Peppas, 1987). Esse modelo utiliza um expoente de liberação (n) para caracterizar diferentes mecanismos:

- Difusão Fickiana ($n < 0,45$): liberação controlada por difusão através da matriz polimérica;
- Transporte não Fickiano ou anômalo ($0,45 < n < 0,89$): liberação governada por combinação de difusão e relaxamento/inchaço do polímero;
- Transporte Caso II ($n = 0,89$): liberação controlada pelo relaxamento do polímero;
- Transporte Super Caso II ($n > 0,89$): mecanismo de liberação mais rápido que o transporte Caso II.

Os percentuais de combinações paramétricas viáveis nos cenários de 24 horas e 30 dias são apresentados na Tabela 6. Observa-se que o modelo parabólico apresentou viabilidade de 3,00% em 24 horas, valor que se reduziu drasticamente para 0,07% em 30 dias, resultando em deslocamento negativo de $-2,93\%$. Esse comportamento evidencia que ajustes adequados para curto prazo se tornam inviáveis quando extrapolados para

escalas temporais mais longas, em função do fenômeno de reversão induzido pelo parâmetro negativo.

Em contraste, o modelo de Higuchi apresentou viabilidade nula em 24 horas, mas atingiu 5,71% em 30 dias, evidenciando deslocamento positivo (+5,71%). Esse comportamento confirma que o modelo não é apropriado para liberação rápida, porém apresenta potencial quando o objetivo é liberação prolongada, reforçando a importância da coerência entre o modelo matemático e a aplicação pretendida. Dash et al. (2010) demonstraram que o modelo de Higuchi é derivado da primeira lei de difusão de Fick e é mais apropriado para sistemas de liberação prolongada controlada por difusão.

O modelo de Korsmeyer–Peppas apresentou o maior percentual de viabilidade em 24 horas (14,57%), mas perdeu completamente sua viabilidade em 30 dias. Essa característica indica cinética intermediária, adequada para aplicações de médio prazo, e evidencia que mesmo modelos amplamente utilizados possuem domínios temporais bem definidos. Bruschi (2015) enfatiza que o modelo de Korsmeyer–Peppas é frequentemente aplicado para analisar os primeiros 60% da liberação de fármacos, o que explica sua maior adequação para períodos mais curtos.

Tabela 6 – Viabilidade paramétrica nos cenários de 24 horas e 30 dias.

Modelo	Viável 24h (%)	Viável 30d (%)	Shift (%)
Parabólico	3,00	0,07	-2,93
Higuchi	0,00	5,71	+5,71
Korsmeyer-Peppas	14,57	0,00	-14,57

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

4.3.4.2 *Distribuições de liberação em 24 horas*

As estatísticas descritivas das distribuições de liberação em 24 horas são apresentadas na Tabela 7, permitindo avaliação crítica da previsibilidade de cada modelo.

O modelo parabólico apresentou distribuição altamente assimétrica, com discrepância acentuada entre média (34,99%) e mediana (0,00%), além de coeficiente de variação extremamente elevado (124,4%). Esse comportamento indica baixa robustez e elevada sensibilidade paramétrica, tornando o modelo pouco confiável para aplicações que demandam controle preciso da liberação.

O modelo de Higuchi exibiu distribuição aproximadamente simétrica, com média e mediana coincidentes (31,39%) e coeficiente de variação moderado (42,0%). Contudo,

todos os valores permaneceram abaixo do limite inferior de viabilidade estabelecido (80%), reforçando sua inadequação para sistemas de liberação em curto prazo. Esse resultado está em consonância com Costa e Lobo (2001), que demonstraram que o modelo de Higuchi é mais apropriado para sistemas de matriz que liberam fármaco de forma lenta e sustentada.

O modelo de Korsmeyer–Peppas apresentou assimetria negativa leve, com mediana superior à média e coeficiente de variação de 27,7%, sendo o único a apresentar parcela significativa da distribuição dentro da janela terapêutica. Korsmeyer et al. (1983) corroboram que sistemas que seguem a cinética de Korsmeyer–Peppas frequentemente exibem liberação inicial mais rápida seguida de sustentação, padrão observado neste estudo.

Tabela 7 – Estatísticas descritivas de liberação em 24 horas.

Modelo	Média (%)	Mediana (%)	DP (%)	P5 (%)	P95 (%)	CV (%)
Parabólico	34,99	0,00	43,53	0,00	100,0	124,4
Higuchi	31,39	31,39	13,19	10,83	51,95	42,0
Korsmeyer-Peppas	79,05	85,80	21,88	39,47	100,00	27,7

Nota: Modelo: modelo matemático avaliado; Média (%): média dos valores de liberação; Mediana (%): valor central da distribuição; DP (%): desvio padrão; P5 (%): percentil 5; P95 (%): percentil 95; CV (%): coeficiente de variação.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

4.3.4.3 *Tempos característicos e janela terapêutica*

Os tempos característicos medianos necessários para atingir diferentes níveis de liberação (50%, 80% e 95%), bem como a largura da janela terapêutica, são apresentados na Tabela 8, permitindo avaliar a aplicabilidade prática de cada modelo.

O modelo parabólico apresentou cinética ultrarrápida ($t_{50\%} = 3,7$ h) e janela terapêutica extremamente estreita (1,1 h), comprometendo sua aplicabilidade prática devido à reduzida margem operacional. O modelo de Higuchi demonstrou cinética lenta ($t_{50\%} = 55,1$ h) e ampla janela terapêutica (37 h), característica desejável para sistemas de liberação prolongada. Jain et al. (2012) demonstraram que sistemas de liberação prolongada baseados em matrizes de hidrogel frequentemente seguem cinética de Higuchi, com tempos de meia-vida superiores a 24 horas.

O modelo de Korsmeyer–Peppas apresentou comportamento intermediário, com $t_{50\%}$ de 6,6 h e janela terapêutica de 9,7 h, configurando-se como alternativa viável para aplicações de médio prazo. Esse resultado está em concordância com Fu e Kao (2010), que identificaram o modelo de Korsmeyer–Peppas como particularmente útil para sistemas que combinam mecanismos de difusão e erosão.

Tabela 8 – Tempos característicos medianos e janela terapêutica.

Modelo	$t_{50\%}$ (h)	$t_{80\%}$ (h)	$t_{95\%}$ (h)	Janela (h)
Parabólico	3,7	5,8	6,9	1,1
Higuchi	55,1	120,3	157,3	37,0
Korsmeyer-Peppas	6,6	18,5	28,2	9,7

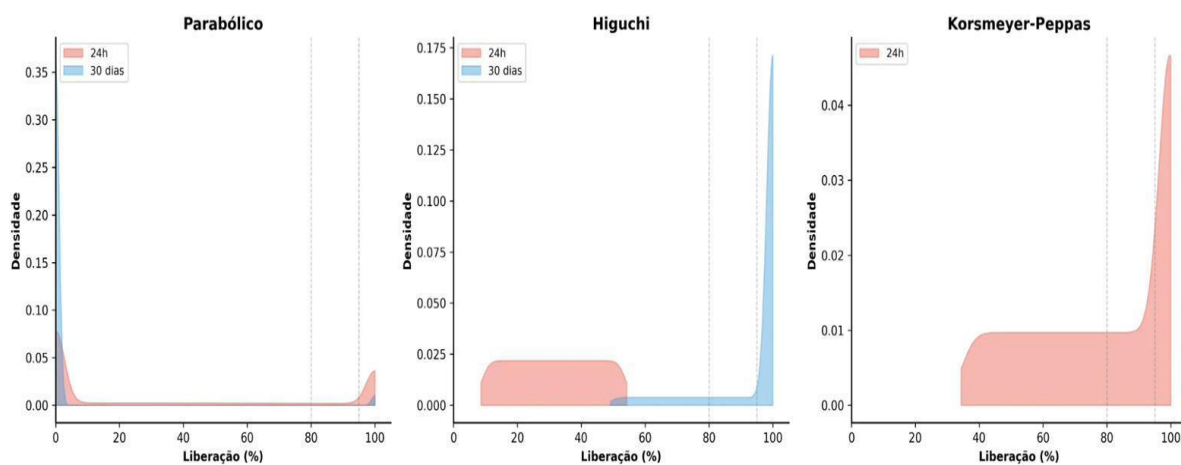
Nota: Modelo: modelo matemático avaliado; $t_{50\%}$ (h): tempo necessário para atingir 50% de liberação; $t_{80\%}$ (h): tempo necessário para atingir 80% de liberação; $t_{95\%}$ (h): tempo necessário para atingir 95% de liberação; Janela (h): intervalo de tempo entre $t_{50\%}$ e $t_{95\%}$ de liberação.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

4.3.4.4 Comparação entre cenários temporais

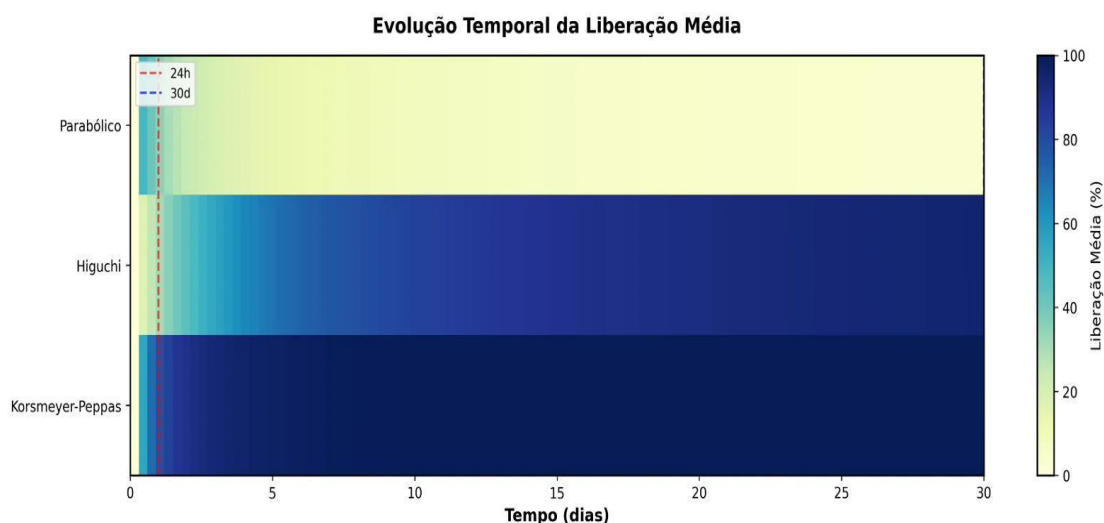
A transformação das distribuições de liberação entre os cenários de 24 horas e 30 dias é apresentada na Figura 26, evidenciando padrões cinéticos contrastantes entre os modelos avaliados. A evolução temporal da liberação média ao longo de 30 dias é apresentada na Figura 27, por meio de mapas de calor que ilustram, de forma integrada, os fenômenos de reversão, acúmulo progressivo e saturação.

Figura 26 – Deslocamento das distribuições de liberação entre 24 horas e 30 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Figura 27 – Evolução temporal da liberação média para os três modelos.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

4.3.4.5 Síntese crítica dos resultados e implicações para a aplicação

De forma integrada, os resultados demonstram que não existe modelo matemático universalmente aplicável a todas as escalas temporais. Cada modelo apresenta domínio específico de validade, e a extrapolação sem análise crítica pode mascarar limitações importantes, como reversão ou saturação. Siepmann e Göpferich (2008) enfatizaram que a seleção do modelo cinético apropriado deve considerar não apenas o ajuste estatístico aos dados experimentais, mas também a plausibilidade física do mecanismo proposto.

Esses achados reforçam que a escolha do modelo deve ser orientada pela janela temporal da aplicação clínica ou tecnológica pretendida, constituindo a principal contribuição deste trabalho para o desenvolvimento racional de sistemas de liberação controlada. Conforme destacado por Langer e Tirrell (2004), o design de sistemas de liberação controlada deve integrar considerações físico-químicas, biológicas e de engenharia para otimizar o perfil de liberação desejado.

4.4 CONCLUSÃO

No tocante aos resultados apresentados neste capítulo pode-se observar que as abordagens computacionais utilizadas permitiram compreender o comportamento estrutural e funcional do sistema proposto (COX2-papaína). Ainda, o *docking* molecular indicou que a interação entre a papaína e a ciclooxigenase-2 é energeticamente favorável e estruturalmente viável, sendo sustentada por diferentes tipos de interações intermoleculares. Além disso, as simulações de dinâmica molecular mostraram que o

complexo proteína–proteína permaneceu estruturalmente estável ao longo do tempo de simulação, sem variações estruturais significativas.

Ademais, a modelagem matemática da liberação controlada permitiu avaliar, de forma preditiva, o comportamento cinético do sistema em diferentes intervalos de tempo. Os resultados indicaram melhor ajuste do modelo de Higuchi para tempos mais longos de liberação, enquanto o modelo de Korsmeyer–Peppas apresentou melhor desempenho nos estágios iniciais. No entanto, como os ensaios de liberação foram realizados exclusivamente por meio de simulação computacional e com base em uma matriz polimérica descrita na literatura, a quitosana, esses resultados ainda precisam ser confirmados experimentalmente utilizando o hidrogel de tamarindo.

Dessa forma, o próximo passo necessário é a realização de ensaios de liberação utilizando o hidrogel de tamarindo, com obtenção do perfil real de liberação da papaína e ajuste dos dados experimentais aos modelos cinéticos utilizados. Assim, os resultados obtidos poderão indicar que o sistema proposto apresenta potencial para aplicação em imobilização e liberação controlada de enzimas.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. J. et al. Gromacs: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1-2, p. 19-25, 2015.
- ADELUSI, T. I. et al. Molecular modeling in drug discovery. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 29, p. 100880, 2022.
- AL-ASADI, M. et al. Impact of Initial Pressure and Heat Flux on Hydrogen and Carbon Monoxide Production in Supercritical Water Gasification of Biomass: A Molecular Dynamics Study. **Applications in Energy and Combustion Science**, v. 24, p. 100395, 2025.
- AMRI, Ezekiel; MAMBOYA, Florence. Papain, a plant enzyme of biological importance: A review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, 2012.
- ARCON, J. P. et al. Molecular Dynamics in Mixed Solvents Reveals Protein-Ligand Interactions, Improves Docking, and Allows Accurate Binding Free Energy Predictions. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, p. 846–863, 2017.
- AZARKAN, M. et al. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of Carica papaya. **Journal of Chromatography B**, v. 790, p. 229–238, 2003.
- BABALOLA, Benjamin Ayodipupo. Carica papaya: a tropical source of bioactive compounds with nutraceutical and pharmaceutical potentials. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 17, n. 1, 2024.
- BAGEWADI, Z. K. et al. Molecular dynamics and simulation analysis against superoxide dismutase (SOD) target of *Micrococcus luteus* with secondary metabolites from *Bacillus licheniformis* recognized by genome mining approach. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 30, p. 103753, 2023.
- BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, p. 3684–3690, 1984.
- BERETTA, G. P. The fourth law of thermodynamics: Steepest entropy ascent. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 378, p. 1–17, 2020.
- BOLZ, S. N. et al. The structural basis of drugs targeting protein–protein interactions uncovered with the protein–ligand interaction profiler PLIP. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 20, p. 1447–1462, 2025.
- BRUSCHI, M. L. **Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems**. [S.l.]: Woodhead Publishing, 2015.
- BUSSI, G. et al. Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of Chemical Physics**, v. 126, 2007.

- CAI, X. et al. Single channel steepest descent algorithm for the correction of cycle frequency error. **IET Communications**, v. 10, p. 1829–1838, 2016.
- CHEN, J.; BROOKS, C. L. Can molecular dynamics simulations provide high-resolution refinement of protein structure? **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 67, n. 4, p. 922-930, 2010.
- CLACKSON, T.; WELLS, J. A. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. **Science**, v. 267, n. 5196, p. 383-386, 1995.
- COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.
- DASH, S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 217-223, 2010.
- DE CASTRO BIZERRA, V. et al. Sustainable Ester Synthesis Using Eversa Transform 2.0 Immobilized on Tamarind-Derived Hydrogel Support. **ACS Food Science & Technology**, v. 6, n. 6, p. 711-724, 2026.
- DELANO, W. L. References. **Hypertension Research**, v. 37, p. 362–387, 2014.
- DROR, R. O. et al. Biomolecular Simulation: A Computational Microscope for Molecular Biology. **Annual Review of Biophysics**, v. 41, p. 429–452, 2012.
- FDA (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). **Guidance for Industry: Population Pharmacokinetics**. Rockville, MD, 1999.
- FIELD, M. J. et al. The Dynamo Library for Molecular Simulations Using Hybrid Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Potentials. **Journal of Computational Chemistry**, v. 21, p. 1088–1100, 2000.
- FILIPE, H. A. L.; LOURA, L. M. S. Molecular Dynamics Simulations: Advances and Applications. **Molecules**, v. 27, p. 2105, 2022.
- FU, Y.; KAO, W. J. Drug release kinetics and transport mechanisms of nondegradable and degradable polymeric delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 429-444, 2010.
- GENIER, F. S. et al. Controlled release of papain from chitosan-glutaraldehyde hydrogels for enzymatic wound debridement. **Journal of Controlled Release**, v. [em impressão], 2025.
- GOHLKE, H.; KLEBE, G. Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-Molecule Ligands to Macromolecular Receptors. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, p. 2644–2676, 2002.
- HELTON, J. C.; DAVIS, F. J. Latin hypercube sampling and the propagation of uncertainty in analyses of complex systems. **Reliability Engineering and System Safety**, v. 81, n. 1, p. 23-69, 2003.

- HESS, B. et al. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, p. 435–447, 2008.
- HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication: theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, 1963.
- HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 10, p. 874-875, 1961.
- HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. **Neuron**, v. 99, p. 1129–1143, 2018.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, p. 33–38, 1996.
- IBRAHIM, M. A. et al. Molecular dynamics simulations of protein-ligand complexes: benchmarking and applications. **Journal of Molecular Modeling**, v. 30, p. 45, 2024.
- JAIN, A. et al. Perspectives of biodegradable natural polysaccharides for site-specific drug delivery to the colon. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 86-128, 2012.
- JANIN, J. et al. Protein–protein interaction and quaternary structure. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 41, n. 2, p. 133-180, 2008.
- JEFFREY, G. A. **An introduction to hydrogen bonding**. Oxford: Oxford University Press, 1997.
- JIANG, L. et al. Papain ameliorates the MPAS formation-mediated activation of monocytes by inhibiting COX-2 expression via regulating the MAPKs and PI3K/Akt signal pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1208, 2018.
- KAMPHUIS, I. G.; DRENTH, J. Structure of papain refined at 1.65 angstroms resolution. **Worldwide Protein Data Bank**, 1986.
- KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural Biology**, v. 9, p. 646–652, 2002.
- KESKIN, O. et al. Principles of Protein–Protein Interactions: What are the Preferred Ways For Proteins To Interact? **Chemical Reviews**, v. 108, p. 1225–1244, 2008.
- KOMEIJI, Y. et al. A molecular dynamics study of solvent behavior around a protein. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 16, p. 268–277, 1993.
- KORSMEYER, R. W. et al. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.

- KUFAREVA, I.; ABAGYAN, R. Methods of protein structure comparison. **Methods in Molecular Biology**, v. 857, p. 231-257, 2012.
- KULIŃSKA, K. et al. Spatial distribution functions as a tool in the analysis of ribonucleic acids hydration. **Computers and Chemistry**, v. 24, p. 451–457, 2000.
- KURUMBAIL, R.; STALLINGS, W. Cyclooxygenase-2 (prostaglandin synthase-2) complexed with a selective inhibitor, SC-558. **Worldwide Protein Data Bank**, 1997.
- LANGER, R.; TIRRELL, D. A. Designing materials for biology and medicine. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 487-492, 2004.
- LEMAK, A. S.; BALABAEV, N. K. On the berendsen thermostat. **Molecular Simulation**, v. 13, p. 177–187, 1994.
- LEMKUL, J. A. From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package. **Living Journal of Computational Molecular Science**, v. 1, p. 5068, 2018.
- LI, L. et al. Modeling the Structure and Interactions of Intrinsically Disordered Peptides with Multiple Replica, Metadynamics-Based Sampling Methods and Force-Field Combinations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 18, p. 1915–1928, 2022.
- LINS, L. et al. Analysis of accessible surface of residues in proteins. **Protein Science**, v. 12, p. 1406–1417, 2003.
- LIU, X. et al. Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 13, n. 1, p. 23-37, 2018.
- MAGHRABY, Y. R. et al. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. **ACS Omega**, v. 8, n. 6, p. 5184–5196, 2023.
- MARSH, J. A.; TEICHMANN, S. A. Protein Flexibility Facilitates Quaternary Structure Assembly and Evolution. **PLoS Biology**, v. 12, p. e1001870, 2014.
- MARTYNA, G. J. et al. Nosé–Hoover chains: The canonical ensemble via continuous dynamics. **The Journal of Chemical Physics**, v. 97, p. 2635–2643, 1992.
- MARUYAMA, Y. et al. Analysis of Protein Folding Simulation with Moving Root Mean Square Deviation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 63, p. 1529–1541, 2023.
- NGUYEN, T. T. H. et al. Papaya (*Carica papaya* L.) seed extract inhibits COX-2 activity. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 8, p. 767-770, 2013.
- ORLANDO, G. et al. The importance of electrostatic interactions in protein-protein interactions. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0139080, 2015.
- ORMEÑO, F.; GENERAL, I. J. Convergence and equilibrium in molecular dynamics simulations. **Communications Chemistry**, v. 7, p. 1–11, 2024.

- PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, v. 52, p. 7182–7190, 1981.
- PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: how modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 75-81, 2014.
- PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 169-172, 1989.
- PETROVA, S. S.; SOLOV'EV, A. D. The Origin of the Method of Steepest Descent. **Historia Mathematica**, v. 24, p. 361–375, 1997.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, v. 30, p. 70–82, 2021.
- RAKHIMOV, M. R. Anti-inflammatory activity of domestic papain. **Ekspierimental'naia i Klinicheskaia Farmakologija**, v. 63, n. 3, p. 55-56, 2000.
- RICHMOND, T. J. Solvent accessible surface area and excluded volume in proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 178, n. 1, p. 63-89, 1984.
- RINALDO, D.; FIELD, M. J. A Computational Study of the Open and Closed Forms of the N-Lobe Human Serum Transferrin Apoprotein. **Biophysical Journal**, v. 85, p. 3485–3501, 2003.
- RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 23-36, 1987.
- ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. S29–S34, 2009.
- SALTELLI, A. et al. **Global Sensitivity Analysis: The Primer**. Chichester: John Wiley & Sons, 2008.
- SCHAKE, P. et al. PLIP 2025: introducing protein–protein interactions to the protein–ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Research**, v. 53, p. W463–W465, 2025.
- SHAW, D. E. et al. Atomic-Level Characterization of the Structural Dynamics of Proteins. **Science**, v. 330, p. 341–346, 2010.
- SHRAKE, A.; RUPLEY, J. E. Environment and exposure to solvent of protein atoms. **Journal of Molecular Biology**, v. 79, p. 351–371, 1973.
- SIEPMANN, J.; GÖPFERICH, A. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 2-3, p. 229-247, 2008.

- SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 6-12, 2011.
- SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Modeling of diffusion controlled drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 351-362, 2012.
- SIM, J. et al. Recent advances in AI-driven protein-ligand interaction predictions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 92, 2025.
- SINHA, S. et al. Molecular dynamics simulation for understanding protein conformational changes. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 20, p. 5112-5125, 2022.
- TUCKERMAN, M. E. **Statistical mechanics: theory and molecular simulation**. Oxford: Oxford University Press, 2006.
- TURNER, P. **XMGRACE**, Version 5.1.19. Beaverton: Oregon Graduate Institute of Science and Technology, 2005.
- ULZ, M. H. Comments on a Continuum-Related Parrinello-Rahman Molecular Dynamics Formulation. **Journal of Elasticity**, v. 113, p. 93–112, 2013.
- VANE, J. R. et al. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 97–120, 1998.
- VASCONCELLOS, F. C. et al. Produção e caracterização de micropartículas de quitosana contendo papaína para aplicações de liberação controlada. **Powder Technology**, v. 205, n. 1–3, p. 65–70, 2011.
- WARDI, Y. A stochastic steepest-descent algorithm. **Journal of Optimization Theory and Applications**, v. 59, p. 307–323, 1988.
- WHITTEN, S. T. et al. Local conformational fluctuations can modulate the coupling between proton binding and global structural transitions in proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 4282–4287, 2005.
- YAN, Y. et al. HDock: a web server for protein–protein and protein–DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. W365–W373, 2017.
- YAN, Y. et al. The HDock server for integrated protein–protein docking. **Nature Protocols**, v. 15, p. 1829–1852, 2020.
- YUAN, Z.-Z. et al. A bibliometric analysis of hydrogel research in various fields: the trends and evolution of hydrogel application. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 23, n. 1, p. 70, 2025.
- ZEN, A. et al. Comparing interfacial dynamics in protein-protein complexes: an elastic network approach. **BMC Structural Biology**, v. 10, p. 26, 2010.

CAPÍTULO 5

Considerações Finais

5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente dissertação cumpriu com êxito o objetivo de desenvolver e avaliar um sistema biocatalítico inovador baseado na imobilização covalente da papaína em hidrogel de tamarindo, integrando de forma holística abordagens bibliométricas, experimentais e de modelagem molecular.

Na análise bibliométrica e patentária realizada para o período de 2015 a 2025 demonstrou que a imobilização enzimática em hidrogéis é uma área de pesquisa em franca expansão e de alto valor estratégico, na qual o Brasil desempenha um papel crescente em redes internacionais de colaboração. No âmbito experimental, a utilização do polissacarídeo da semente de tamarindo (xiloglucano) como matriz de imobilização mostrou-se altamente eficiente, alcançando um rendimento de fixação de 97,9%, valor que superou resultados de sistemas consolidados na literatura, como os baseados em quitosana. A caracterização por espectroscopia no infravermelho (FTIR) confirmou que a imobilização ocorreu por meio de ligações covalentes estáveis (bases de Schiff), preservando a estrutura secundária da enzima e protegendo-a contra a autoproteólise, fenômeno que rapidamente inativou a enzima em sua forma livre nos ensaios de controle.

Os estudos *in silico* expandiram a interpretação funcional do sistema, revelando que a papaína mantém sua capacidade de reconhecimento molecular e estabilidade ao interagir com a ciclooxigenase-2 (COX-2), conforme validado por simulações de dinâmica molecular de 100 ns que demonstraram equilíbrio termodinâmico e manutenção da integridade conformacional do complexo. Entretanto, é fundamental ressaltar que os ensaios de liberação controlada apresentados foram puramente preditivos e fundamentados em parâmetros cinéticos da quitosana extraídos da literatura. Dessa forma, o próximo passo experimental obrigatório para a continuidade desta pesquisa é a realização de ensaios de liberação *in vitro* utilizando especificamente o hidrogel de tamarindo produzido em bancada, visando validar se o perfil real de transporte da enzima segue as tendências dos modelos de Higuchi ou Korsmeyer-Peppas observadas nas simulações.

Sob a perspectiva da sustentabilidade e da Economia Circular regional, este trabalho demonstrou que o aproveitamento de resíduos agroindustriais do semiárido nordestino permite a criação de biomateriais de alto valor agregado, fortalecendo as cadeias produtivas locais. O biocatalisador proposto integra-se a um ciclo de vida simplificado que compreende a recuperação das sementes de tamarindo descartadas pela indústria de polpa, sua transformação tecnológica em uma matriz de hidrogel mucoadesiva e biodegradável, a aplicação em processos que permitem a reutilização da carga enzimática e,

por fim, a biodegradação segura do material sem a geração de resíduos persistentes. Em conclusão, o sistema papaína-hidrogel de tamarindo apresenta-se como uma plataforma robusta e sustentável para aplicações biotecnológicas, estabelecendo as bases necessárias para futuros estudos de escalabilidade e ensaios *in vivo* em contextos farmacêuticos.