

ESTUDOS DE ADSORÇÃO NA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS: PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS, MODELAGEM CINÉTICA, ISOTERMAS DE EQUILÍBRIO E ANÁLISE TERMODINÂMICA

ADSORPTION STUDIES IN ENZYME IMMOBILIZATION: EXPERIMENTAL PROCEDURES, KINETIC MODELING, EQUILIBRIUM ISOTHERMS, AND THERMODYNAMIC ANALYSIS

EMERSON BARRIOS **MOGOLLÓN**¹, ANA CAROLINE RAIMUNDINI **ARANHA**^{2*}, DEISE **MOLINARI**³, EYME GABRIELE DE **MATTOS**⁴, PEDRO AUGUSTO **ARROYO**⁵

1. Doutorando, Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Paraná, Brasil; 2. Professora, Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Paraná, Brasil; 3. Pós-Doutoranda, Departamento de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Paraná, Brasil; 4. Mestra, Departamento de Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana – Paraná, Brasil; 5. Professor, Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Paraná, Brasil.

* Avenida Colombo, 5790, Maringá, Paraná, Brasil. CEP: 87020-900. acaranha@uem.br

RESUMO

Esta revisão sintetiza avanços recentes em estudos de adsorção aplicados à imobilização de enzimas em suportes sólidos, com ênfase em procedimentos experimentais, modelagem cinética e de equilíbrio, e análise termodinâmica. São discutidos métodos batelados para quantificação de proteína adsorvida, influência de parâmetros como pH, temperatura e concentração inicial, e caracterização de interações enzima-suporte. Modelos cinéticos (pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem, Elovich e Avrami) e de isotermas (Henry, Langmuir, Freundlich, Sips e Toth) são avaliados quanto à capacidade preditiva, complementados por análises de difusão intrapartícula. Parâmetros termodinâmicos (ΔG° , ΔH° e ΔS°) elucidam a espontaneidade, natureza energética e controle entrópico/entalpico do processo. Exemplos de imobilização de lipases, celulasas e outras enzimas em suportes porosos destacam a integração de experimentação com modelagem para otimização de biocatalisadores robustos e reutilizáveis, contribuindo para processos enzimáticos sustentáveis e escaláveis.

PALAVRAS-CHAVE: Imobilização Enzimática; Adsorção; Cinética; Isotermas; Termodinâmica; Biocatalisadores.

ABSTRACT

This review synthesizes recent advances in adsorption studies applied to enzyme immobilization on solid supports, emphasizing experimental procedures, kinetic and equilibrium modeling, and thermodynamic analysis. Batch methods for quantifying adsorbed protein, the influence of parameters such as pH, temperature, and initial concentration, and characterization of enzyme-support interactions are discussed. Kinetic models (pseudo-first-order, pseudo-second-order, Elovich, and Avrami) and isotherm models (Henry, Langmuir, Freundlich, Sips, and Toth) are evaluated for predictive capacity, supplemented by intraparticle diffusion analyses. Thermodynamic parameters (ΔG° , ΔH° , and ΔS°) elucidate process spontaneity, energy nature, and

entropic/enthalpic control. Examples of lipase, cellulase, and other enzyme immobilizations on porous supports highlight the integration of experimentation with modeling to optimize robust and reusable biocatalysts, contributing to sustainable and scalable enzymatic processes.

KEYWORDS: Enzyme Immobilization; Adsorption; Kinetics; Isotherms; Thermodynamics; Biocatalysts.

1. INTRODUÇÃO

Enzimas são biocatalisadores que podem ser utilizados com o objetivo de atender à crescente demanda por produtos sustentáveis, particularmente medicamentos, aromas e vitaminas^{1,2}. Tais macromoléculas proteicas catalisam reações sob condições amenas (próximas à temperatura ambiente, pressão atmosférica e pH fisiológico), de maneira relativamente rápida e com elevada seletividade^{3,4}.

Entretanto, a aplicação de enzimas em escala industrial é restrita pela falta de estabilidade operacional, bem como pela difícil recuperação e reutilização das biomoléculas^{5,6}. Esses problemas são geralmente minimizados por meio da imobilização das proteínas em um suporte poroso (por exemplo, zeólitas, resinas, sílicas e polímeros), estratégia capaz de tornar os bioprocessos economicamente viáveis^{7,8}.

A fixação de enzimas em um suporte pode ocorrer por ligações físicas (interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio ou ligações coordenadas), iônicas ou covalentes^{9,10}. Ligações iônicas e covalentes costumam ser melhores do que as físicas para impedir a lixiviação das biomoléculas e mantê-las no suporte mesmo sob condições rigorosas, como no caso de meios com elevada força iônica ou com a presença de solventes^{11,12}.

Os tipos de ligações presentes nas biomoléculas suportadas podem ser avaliados não só pela abordagem

da cinética, do mecanismo e da isoterma de adsorção, mas também dos parâmetros termodinâmicos. A partir dessas análises também pode-se evitar dispendir tempo maior que o necessário para a imobilização das macromoléculas e avaliar se existe possibilidade de elevar a quantidade de proteína retida a fim de obter um biocatalisador com elevado poder catalítico^{4,13-15}.

Estudos de adsorção são ferramentas essenciais nesse contexto, pois permitem quantificar a afinidade entre enzima e suporte, prever o comportamento em diferentes condições operacionais e otimizar parâmetros como carga proteica, pH, temperatura e força iônica^{16,17}. Modelos clássicos de isotermas, como Langmuir, Freundlich e Temkin, têm sido amplamente aplicados para descrever o equilíbrio de adsorção, enquanto análises cinéticas (modelos pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem) elucidam a velocidade do processo¹⁸⁻²⁰. Além disso, a termodinâmica fornece informações sobre a espontaneidade (ΔG), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) da interação, distinguindo processos físico-químicos e revelando se a adsorção é exotérmica ou endotérmica, favorecida por entropia ou por interações específicas^{21,22}.

Nos últimos anos, avanços em suportes nanoestruturados, como óxidos metálicos funcionalizados, materiais híbridos orgânico-inorgânicos e polímeros condutores, têm impulsionado a eficiência da imobilização, com relatos de retenção de até 90% da atividade enzimática após múltiplos ciclos. Tais inovações destacam a relevância de abordagens integradas que combinem experimentação com modelagem matemática para o design racional de biocatalisadores robustos²³⁻²⁶.

Dessa forma, esta revisão tem como objetivo apresentar uma síntese dos resultados relatados em trabalhos recentes cujo foco tenha sido a aplicação de estudos de adsorção voltados para processos de imobilização de enzimas em um material sólido. A metodologia experimental normalmente utilizada e a aplicação de modelos matemáticos preditivos também são brevemente elucidadas, com ênfase em como esses estudos contribuem para o desenvolvimento de processos enzimáticos sustentáveis e escaláveis.

2. PROCEDIMENTO DE ADSORÇÃO

A imobilização de enzimas por meio da ligação das biomoléculas a um suporte é geralmente realizada em sistema batelada continuamente agitado. O procedimento consiste em incubar o sólido com um volume específico de solução tampão contendo o biocatalisador a uma dada temperatura. Depois disso, as enzimas suportadas são removidas do meio (por centrifugação ou filtração), lavadas com tampão ou água Milli-Q e armazenadas sob condições apropriadas (geralmente a 4 °C ou congeladas)^{27,28}.

As quantidades de enzimas carregadas no suporte são determinadas com base na variação da absorbância da solução de imobilização, cujas medidas são realizadas em espectrofotômetro UV/Vis a 280 nm.²⁹⁻³¹ Técnicas colorimétricas como os métodos de Smith,

Bradford ou Lowry também são frequentemente utilizadas^{28,32-36}.

As absorbâncias obtidas são então convertidas em unidades de concentração e o cálculo da proteína retida é realizado de acordo com a Equação 1:

$$q = \frac{(C_o - C) \times V}{m} \quad (1)$$

em que q é a quantidade de proteína adsorvida por unidade de massa suporte (mg/g), C_o e C são, respectivamente, a concentração inicial e final da proteína no meio de imobilização (mg. mL⁻¹), V é o volume da fase líquida (mL) e m é a massa de suporte (g).

Os efeitos de alguns parâmetros experimentais (temperatura, pH e concentração inicial de enzima) na capacidade de adsorção do suporte são corriqueiramente avaliados. Dependendo do tipo de enzima, a faixa de estudo pode variar (Tabela 1), mas a metodologia é basicamente a mesma – ensaios são realizados em duplicata ou triplicata, alterando apenas o parâmetro sob investigação^{37,38}.

A influência do pH no processo de adsorção costuma ser investigada em virtude desse parâmetro afetar o grau de ionização das enzimas, além de ser capaz de alterar as cargas da superfície do suporte. Os ensaios experimentais são conduzidos por um período pré-determinado (geralmente até o equilíbrio, verificado por monitoramento cinético), sob temperatura e agitação constantes, com solução cuja concentração inicial de proteína não ocasione resistências difusionais significativas^{32,42}.

A análise dos resultados envolve conhecimento prévio do ponto de carga zero (PCZ) do suporte (valor de pH de uma solução, sob o qual as cargas presentes na superfície do material são neutras) e do ponto isoelétrico (pI) da enzima. Determinações do potencial zeta também podem ser utilizadas para investigar as cargas superficiais presentes na enzima livre, no suporte e no biocatalisador suportado^{39,43-47}.

Bolina *et al.* (2018)⁴² avaliaram o efeito do pH de incubação (3,0–7,0) na imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em suportes de troca iônica preparados à base de sílica. Os autores reportaram diminuição da quantidade de proteína retida com o aumento do pH devido ao aumento de cargas negativas na superfície da enzima, resultando em repulsões eletrostáticas entre as biomoléculas e a superfície do suporte.

Coutinho *et al.* (2018)⁴³ mostraram que nem a variação de pH (4–8), nem o aumento da força iônica da solução de imobilização (concentrações de cloreto de sódio de 20–1.600 mM) alteraram o percentual de β -glicosidase retida em hidroxiapatita ($\approx 87\%$). Todavia, sob pH acima de 4, os autores relataram diminuição do poder catalítico devido ao aumento das interações enzima-suporte à medida que as cargas das biomoléculas se tornaram mais negativas, causando distorções conformacionais.

Tabela 1. Parâmetros experimentais utilizados para estudos de adsorção aplicados a processos de imobilização de proteínas/enzimas.

Enzima*	Suporte** (g)	Temperatura (K)	pH	Concentração de enzima (mg/mL)	Solução (mL)	Tempo (min)	Referência
α -Amilase Lipase Protease	0,2 ZnFe ₂ O ₄	298–323	7,0 6,7 5,0	0,001–0,004 0,001–0,020 0,005–0,015	5	120	27
α -Amilase	0,05 Composto de bentonita/quitosana	288,15–323,15	5,0–8,0	0,4–1,4	15	–	29
BSA Celulase	0,025 Zr-SBA-15 (porosexpandidos)	293,15	4,8 4,0	1,0–15,0 1,0–7,0	5	480	39
Celulase	0,025 Carvãoativadocomercial	293,15–333,15	4,8	2–16	10	60	30
Lipase	0,112 Suporte magnético revestido com ácido poliacrílico	288–308	3,5–7,8	6–16	5	1	40
Lipase	Resina de poliestirenodivinilbenzeno**	283,15–298,15	4,0–9,0	—***	**	900	32
Lisozima	1 NaY	277–310	8,0	0,25–2,00	50	180	37
Lisozima BSA Celulase	0,015 SBA-15 SBA-16	295	6,5–12,0 3,6–5,6 3,0–5,4	1–15 1–15 1–7	3	420 480 400	38
Lisozima BSA Celulase	0,025 SBA-15 (comprimento dos poros modificados)	298,15	6,5–12,0 3,6–5,6 3,0–5,4	1–10 1–15 1–7	5	480	41
Papaína	0,05 FDU-12 com poros expandidos (funcionalizada com ácido carboxílico)	288,15–308,15	7,0/8,2	20	10	5580	31

*BSA= Albumina de soro bovino; ** Dado fornecido em proporção suporte/solução de 1/19 (m/v) *** Variação do carregamento de 10 - 200 mg_{proteína}/g_{suporte}

Fonte: Autoria própria (2025).

A hipótese foi sustentada no fato de a enzima livre não ter apresentado queda de atividade sob as mesmas condições. A diminuição do poder catalítico da β -glicosidase imobilizada também foi verificada sob concentrações salinas acima de 50 mM. Os resultados foram atribuídos à presença de interações hidrofóbicas que tornaram os sítios ativos das enzimas indisponíveis. Por meio de análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), medidas de potencial zeta e testes de dessorção com diferentes sais, foi reportada a formação de ligações de coordenação entre os sítios de Ca^{2+} do suporte e os resíduos de aminoácidos COO^- das macromoléculas proteicas.

Em geral, testes de dessorção são ensaios que consistem em manter sob agitação uma mistura contendo a enzima imobilizada e a solução aquosa com concentração salina sob pH de interesse. Após um período pré-estabelecido (geralmente 1–2 h), uma amostra é removida e centrifugada. A quantidade de enzima no sobrenadante é, então, calculada a partir de medidas de absorvância, sendo o percentual de dessorção o valor que corresponde à quantidade de enzima dessorvida dividida pela quantidade de enzima que estava imobilizada no suporte^{37,43}.

Outra variável bastante investigada em estudos de adsorção voltados à imobilização de enzimas é a temperatura. Além de exercer influência sobre o poder catalítico das biomoléculas, a avaliação do seu efeito pode fornecer informações acerca dos tipos de ligações presentes no biocatalisador suportado. De acordo com Uygun *et al.* (2010)⁴⁸, o aumento da capacidade de nanoesferas produzidas com 2-hidroxietil metacrilato e N-metacrilóil-(L)-triptofano em imobilizar a lipase de pâncreas suíno (de 163 a 698 mg proteína/g suporte) sob temperaturas mais altas (277,15 a 328,15 K) indica interações hidrofóbicas entre as proteínas e o grupo triptofano do suporte.

Daoud *et al.* (2010)³⁰ reportaram que, por conta do aumento da temperatura de 293,15 para 333,15 K ter resultado em aumento da adsorção da enzima celulase em carvão ativado (de 1400 a 2165 mg proteína/g suporte), o processo pode ser considerado endotérmico. Segundo os autores, a elevação da temperatura do sistema pode favorecer a conformação alterada da celulase já adsorvida nos sítios ativos do suporte devido à energia vibracional adquirida, possibilitando a imobilização de novas biomoléculas.

Quando se trata de estudos de adsorção aplicados à imobilização de enzimas, a influência que a concentração inicial de biomoléculas exerce na quantidade de proteína retida também é frequentemente avaliada. Isso ocorre não só porque quanto maior for a concentração da solução, maior será a força motriz responsável pela migração das enzimas da fase fluida para a fase sólida, mas também porque soluções muito diluídas podem resultar em sítios ativos desocupados e soluções muito concentradas podem acarretar desperdício de enzimas⁴⁹.

Chang *et al.* (2006)³⁷ reportaram que a quantidade

de lisozima retida em zeólitas NaY aumentou (de 7,67 a 16,39 mg proteína/g suporte) com o aumento da concentração inicial de enzima de 0,25 a 1,5 mg proteína/mL. Foi relatado que de 1,5 mg proteína/mL a 2,0 mg proteína/mL não houve variação na quantidade de proteína fixada em virtude da saturação dos locais de ligação do suporte. Para os autores, os locais disponíveis na superfície do material se mostraram um fator limitante para a imobilização das biomoléculas e o aumento da força motriz do processo superou todas as resistências à transferência de massa, resultando em maior probabilidade de colisão entre as enzimas e as partículas sólidas, aumentando as chances de ligação em soluções com elevadas concentrações iniciais.

Recentemente, tem-se observado a integração de técnicas avançadas de caracterização (como microscopia eletrônica de varredura – MEV, microscopia de força atômica – AFM, e espectroscopia de impedância eletroquímica) para correlacionar a morfologia do suporte com a eficiência de adsorção, além do uso de planejamento experimental (DOE), como delineamentos fatoriais e superfície de resposta, para otimizar múltiplos parâmetros simultaneamente e reduzir o número de experimentos^{31,39}. Tais abordagens têm permitido identificar condições ótimas com maior precisão, acelerando o desenvolvimento de biocatalisadores industriais.

3. CINÉTICA E MECANISMO DE ADSORÇÃO

Ensaio experimentais para determinação da quantidade de proteína adsorvida em um suporte em função do tempo de contato são empregados para investigar a cinética e o mecanismo de adsorção de enzimas. A análise cinética permite estimar constantes de velocidade e o tempo necessário para atingir o equilíbrio; o mecanismo elucidada as etapas envolvidas na adsorção de macromoléculas proteicas^{27,30}.

Os experimentos podem ser conduzidos por dois protocolos: (i) remoção de alíquotas de um único reator, sem alteração significativa do volume total; ou (ii) bateladas independentes para cada intervalo temporal, replicando condições idênticas de temperatura, pH, agitação, volume de solução aquosa, concentração inicial de enzima e massa de adsorvente^{27,37}. Deve-se empregar massa adsorvente suficiente para evitar adsorção excessivamente rápida, que poderia induzir conclusões equivocadas sobre o equilíbrio.

O tempo de equilíbrio é identificado graficamente pela plotagem da capacidade de adsorção (q_t , mg de enzima por g de suporte) em função do tempo de contato. Tipicamente, observa-se aumento progressivo de q_t até um platô, cujo início corresponde ao tempo requerido para a adsorção máxima nas condições experimentais^{27,50,51}.

Conforme relatado por Anirudhan e Rauf⁵⁰, a taxa inicial de adsorção de enzimas é elevada devido à abundância de sítios ativos. Os autores investigaram a cinética de adsorção de lisozima em adsorvente à base de silano funcionalizado com grupos sulfonila.

Concentrações iniciais de enzima entre 0,01 e 0,05 mg mL⁻¹ resultaram em capacidades de adsorção de 9,47 a 43,72 mg g⁻¹, com equilíbrio atingido em 180 min para todas as concentrações.

Tanto a taxa quanto o mecanismo de adsorção são influenciados pelas propriedades do adsorvente e pelas condições de imobilização. A dinâmica de sorção é geralmente descrita por quatro etapas consecutivas (Figura 1), uma das quais limita a velocidade global^{34,37,51,52}:

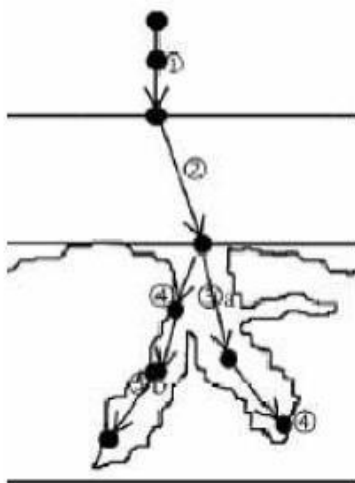


Figura 1. Representação das etapas sucessivas de adsorção. Fonte: Weber & Smith⁵².

- Transporte das enzimas do seio da solução para a camada limite líquida adjacente à superfície do adsorvente;
- Difusão através da camada limite até a superfície externa;
- Transporte interno nos poros por difusão molecular no líquido poroso e difusão superficial (difusão intrapartícula);
- Adsorção nas paredes dos poros e espaços capilares.

Os dados de q_t em função do tempo são ajustados a modelos cinéticos (Tabela 2). Os principais incluem pseudo-primeira ordem (Equação 2), pseudo-segunda ordem (Equação 3), Elovich (Equação 4) e Avrami (Equação 5):^{27,32,50}

$$q_t = q_e \times (1 - e^{-k_1 t}) \quad (2)$$

$$q_t = k_2 q_e^2 t / (1 + k_2 q_e t) \quad (3)$$

$$q_t = \frac{\ln \alpha \beta}{\beta} + \frac{\ln t}{\beta} \quad (4)$$

$$q_t = q_e \times (1 - e^{(-k_{AV} t)^{n_{AV}}}) \quad (5)$$

onde q_t e q_e (mg g⁻¹) são as capacidades de adsorção no tempo t (min) e no equilíbrio, respectivamente; k_1 (min⁻¹) e k_2 (g mg⁻¹ min⁻¹) são

constantes de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem; α (mg g⁻¹ min⁻¹) é a taxa inicial de adsorção e β (g mg⁻¹) a constante de dessorção; k_{AV} (min⁻¹) é a constante de Avrami e n relaciona-se ao mecanismo.

A validade dos modelos cinéticos e de isotermas é avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2) e métricas de erro, como o erro relativo médio (ARE, Equação 6) ou a soma dos quadrados dos erros (SSE, Equação 7):

$$ARE = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{q_t^{exp} - q_t^{calc}}{q_t^{exp}} \right|, \quad (6)$$

$$SSE = \sum_{i=1}^N (q_t^{exp} - q_t^{calc})^2 \quad (7)$$

onde $q_{i,exp}$ e $q_{i,calc}$ (mg g⁻¹) são os valores experimentais e preditos no tempo t_i , e N é o número de pontos. Valores elevados de R^2 e baixos de ARE/SSE indicam melhor ajuste^{27,32,42,53,60}.

Adeogun *et al.* (2017)²⁷ investigaram a adsorção de α -amilase, protease e lipase em ZnFe₂O₄ sob diferentes concentrações iniciais. Embora R^2 médio fosse similar para pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem, o modelo pseudo-primeira ordem foi selecionado pela proximidade entre q_e calculado e experimental, além de menores SSE. Ajuste ao modelo Elovich ($R^2 > 0,9$) também foi observado; α aumentou com a concentração (maior probabilidade de colisão), enquanto β diminuiu (distribuição de energias de ativação limitante em altas concentrações).

Os modelos pseudo-primeira ordem (Equação 2), pseudo-segunda ordem (Equação 3), Elovich (Equação 4) e Avrami (Equação 5) podem ser insuficientes para identificar a etapa limitante. O modelo de difusão intrapartícula (Equação 8) permite análise mais detalhada^{27,31,32,54,61}:

$$q_t = k_{DI} \times \frac{1}{t^2} + C_i \quad (8)$$

onde k_{id} (mg g⁻¹ min^{-1/2}) é a constante de difusão intrapartícula, t o tempo (min) e C a espessura da camada limite.

Santos Leite *et al.* (2016)⁵¹ demonstraram que pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem predizem a imobilização de peroxidase em esferas de goma guar-alginato. A plotagem de q_t vs. $t^{1/2}$ exibiu região linear inicial (difusão em filme) seguida de curva suave e segunda região linear (difusão porosa).

Yang *et al.* (2017)³¹ ajustaram a cinética de papaína em sílica FDU-12 funcionalizada com -COOH ao modelo pseudo-segunda ordem. A plotagem de q_t vs. $t^{1/2}$ revelou três regiões lineares: (i) difusão externa, (ii) difusão intrapartícula em mesoporos e (iii) equilíbrio (decaimento por depleção de enzima e sítios).

Passos *et al.* (2016)⁵⁴ ajustaram pseudo-segunda ordem à imobilização de colina oxidase em esferas de vidro aminoalquiladas e sílica aminopropil. Pelo modelo de difusão intrapartícula, a reta q_t vs. $t^{1/2}$ não interceptou a origem, indicando que a difusão porosa não foi limitante.

Tabela 2. Modelos de cinética e de isoterma de adsorção para imobilização de enzimas.

Enzima*	Suporte**	Cinética	Isoterma	Referência
α -Amilase Lipase Protease	ZnFe ₂ O ₄	Pseudo primeira ordem Elovich	Freundlich	27
α -Amilase	Composto de bentonita/quitosana	-	Langmuir	29
BSA Celulase	Zr-SBA-15 (poros expandidos)	-	Toth Henry	39
Celulase	Carvãoativadocomercial	Pseudossegunda ordem	Freundlich	30
Choline oxidase	Esferas de vidro aminoalquiladas Sílica modificada por aminopropil	Pseudossegunda ordem	Freundlich	54
Laccase	Poly(VP)-M Cu(II)-M	-	Langmuir	55
Lipase	Resina de Polivinilestireno	Pseudoprimeiraordem	Sips	32
Lipase	SílicaStöber	Pseudossegunda ordem		53
Lipase	Sílicas mesoporosas	Avrami	-	56
Lipase	LewatitMonoPlus MP 64	Pseudossegunda ordem	Langmuir	57
Lipase	Partículas de polimetacrilato	-	Langmuir	58
Lipase	Partículas magnéticas de Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	-	Langmuir	59
Lysozyme	NaY	Pseudossegunda ordem	Langmuir	37
Lysozyme BSA Cellulase	SBA-15 SBA-16	-	Langmuir Sips Langmuir	38
Lysozyme BSA Cellulase	SBA-15 (comprimento dos poros modificados)	-	Langmuir Langmuir Henry	41
Papain	FDU-12 com poros expandidos (funcionalizada com ácido carboxílico)	Pseudossegunda ordem	Langmuir	31
Peroxidase	matrizes esféricas de goma guar-alginato	Pseudoprimeira ordem Pseudossegundaordem	Langmuir	51

*BSA= Albumina de soro bovino

Fonte: Autoria própria (2025).

4. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO E PARÂMETROS TERMODINÂMICOS

As isotermas de adsorção descrevem a relação entre a concentração de enzimas na fase líquida e a concentração de enzimas adsorvidas na fase sólida, em temperatura constante. A quantidade de proteína adsorvida no equilíbrio — definido por estudos cinéticos prévios — é determinada a partir de diferentes concentrações iniciais e plotada graficamente em função da concentração residual de biomoléculas na solução (α)^{30,49,54,62}.

Os dados experimentais são ajustados a modelos matemáticos, permitindo estimar a capacidade máxima de imobilização do suporte e elucidar a natureza das interações enzima-suporte nos biocatalisadores imobilizados. Dentre os modelos de equilíbrio mais empregados em processos de imobilização enzimática destacam-se Henry (Equação 9), Langmuir (Equação 10), Freundlich (Equação 11), Sips (Langmuir-Freundlich, Equação 12) e Toth (Equação 13) (Tabela 2)^{30,54,63}:

$$q_e = K_H \times C_e \quad (9)$$

$$q_e = q_{\max} \times C_e / (K_L + C_e) \quad (10)$$

$$q_e = K_F + C_e^{\frac{1}{n_F}} \quad (11)$$

$$q_e = K_S \times C_e^{\beta_S} / (1 + a_S \times C_e^{\beta_S}) \quad (12)$$

$$q_e = K_T \times C_e / ((a_T + C_e)^{\frac{1}{n_T}}) \quad (13)$$

Em que q_e representa a capacidade de adsorção no equilíbrio (mg/g), C_e a concentração residual de proteína na solução (mg/mL), q_{\max} a capacidade máxima de adsorção (mg/g), K_H a constante de Henry (mL/g), K_L a constante de Langmuir (mL/mg), K_F (mL/mg) e n_F (adimensional) os parâmetros de Freundlich, K_S (mL/mg) e n_S (adimensional) os parâmetros de Sips, e q_{\max} , K_T (mL/mg) e n_T (adimensional) os parâmetros do modelo de Toth.

O modelo de Henry é aplicável quando há interações enzima-suporte fracas ou baixa saturação da fase sólida. A isoterma de Langmuir pressupõe adsorção monolayer em sítios homogêneos, com interações laterais desprezíveis entre moléculas adsorvidas. O modelo de Freundlich descreve adsorção multicamadas em superfícies energeticamente heterogêneas^{39,60}.

O modelo de Sips combina características dos modelos de Langmuir e Freundlich, sendo adequado para sistemas que exibem comportamento monolayer em altas concentrações de adsorvato e multilayer em baixas concentrações^{29,32,50}. O modelo de Toth é particularmente útil para superfícies nas quais a

maioria dos sítios apresenta energia de adsorção inferior a um valor máximo^{39,62}.

Alves *et al.* (2017)³² investigaram a imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em resina de poliestireno divinilbenzeno, variando a carga inicial de proteína de 10 a 200 mg/g de suporte. Os autores reportaram atividade máxima de 145.130,1 \pm 2973,1 UI/g de suporte e capacidade de adsorção de 134 mg de proteína/g de suporte. Os dados experimentais ajustaram-se adequadamente ao modelo de Sips, que previu retenção de 128,9 mg de proteína/g de suporte no equilíbrio.

Apesar da alta atividade catalítica dos biocatalisadores imobilizados, observou-se redução na atividade específica (atividade por unidade de massa de proteína) com o aumento da carga enzimática adsorvida. Tal comportamento foi atribuído ao bloqueio de poros do suporte, restringindo a difusão de substrato ao microambiente interno do biocatalisador.

Outra abordagem relevante em estudos de adsorção enzimática é a determinação das variações de energia livre de Gibbs (ΔG°), entalpia (ΔH°) e entropia (ΔS°), que indicam a espontaneidade e viabilidade termodinâmica do processo. Esses parâmetros são estimados a partir de constantes de equilíbrio dependentes da temperatura^{27,29,31,54}.

Para uma concentração mássica de suporte de 1,0 g/L, ΔS° e ΔH° são obtidos pelo ajuste linear de $\log K_d$ versus $1/T$ (Equação 14):

$$\log \left(\frac{q_e}{C_e} \right) = \left(\frac{\Delta S^\circ}{R} - \frac{\Delta H^\circ}{RT} \right) \quad (14)$$

Em que $K_d = q_e / C_e$ (mL/g), q_e é a quantidade de enzima imobilizada por unidade de massa de suporte (mg/g), C_e a concentração de equilíbrio (mg/L), R a constante dos gases (8,314 J/mol·K) e T a temperatura absoluta (K).

A análise dos parâmetros termodinâmicos fornece as seguintes informações^{27,29,60}:

- Natureza energética: $\Delta H^\circ > 0$ indica processo endotérmico; $\Delta H^\circ < 0$, exotérmico. A magnitude de ΔH° reflete o tipo de interação: < 20 kJ/mol (interações de van der Waals), 20–80 kJ/mol (eletrostáticas) e 80–450 kJ/mol (ligações químicas).
- Variação entrópica: $\Delta S^\circ < 0$ sugere redução na aleatoriedade na interface sólido-solução; $\Delta S^\circ > 0$ pode indicar reorganização estrutural no complexo adsorvato-adsorvente.

A variação de energia livre de Gibbs (ΔG°) é calculada por:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (15)$$

Valores negativos de ΔG° confirmam espontaneidade termodinâmica da adsorção. Quanto maior a magnitude negativa de ΔG° , mais favorável o processo. Se $|\Delta H^\circ| > |T\Delta S^\circ|$, o processo é controlado

por entalpia; caso contrário, é controlado por entropia^{29,31,60}.

5. CONCLUSÃO

Os estudos de adsorção representam uma ferramenta essencial para o desenvolvimento racional de biocatalisadores imobilizados, permitindo quantificar afinidades enzima-suporte, prever desempenhos operacionais e otimizar condições de imobilização. A combinação de procedimentos experimentais padronizados com modelagem cinética e de equilíbrio — incluindo pseudo-ordens, Elovich, Avrami, Langmuir, Freundlich, Sips e Toth — fornece insights detalhados sobre taxas, mecanismos e capacidades máximas de retenção. A análise termodinâmica complementa essas abordagens ao revelar a espontaneidade, natureza energética e controle do processo, distinguindo interações físicas, eletrostáticas ou químicas. Exemplos recentes demonstram que suportes nanoestruturados e estratégias integradas (DOE, caracterização avançada) elevam a eficiência de imobilização, com retenções de atividade superiores a 90% após ciclos repetidos. Assim, a sinergia entre experimentação e modelagem matemática não apenas acelera o design de biocatalisadores industriais, mas também promove processos enzimáticos economicamente viáveis, reutilizáveis e alinhados aos princípios da química verde e da bioeconomia circular.

6. FINANCIAMENTO

Os autores gostariam de agradecer pelo apoio financeiro da CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

7. REFERÊNCIAS

- [1] Siddiquey F, Jahan I, Hasan T, Nishi NJ, Hasan SMK, Rahman N, Faik A, Hossain MA. Enzyme Technology in the Food Industry: Molecular Mechanisms, Applications, and Sustainable Innovations. *Food Sci. Nutr.* 2025; 13: e70927.
- [2] Wohlgemuth R. Enzyme Catalysis for Sustainable Value Creation Using Renewable Biobased Resources. *Molecules* 2024; 29: 5772.
- [3] Long R, Huang Y, Dabbour M, Mintah BK, Pan J, Wu M, Zhang S, Qin Z, He R, Ma H. Physical Processing-Assisted pH Shifting for Food Protein Modification: A Comprehensive Review. *Foods* 2025; 14: 2360.
- [4] Mishra S, Ghosh A, Hansda B, Mondal TK, Biswas T, Das B, Roy D, Kumari P, Mondal S, Mandal B. Activation of Inert Supports for Enzyme(s) Immobilization Harnessing Biocatalytic Sustainability for Perennial Utilization. *Langmuir* 2024; 40: 18377-18406.
- [5] Farhan M, Hasani IW, Khafaga DSR, Ragab WM, Kazi RNA, Aatif M, Muteeb G, Fahim YA. Enzymes as Catalysts in Industrial Biocatalysis: Advances in Engineering, Applications, and Sustainable Integration. *Catalysts* 2025; 15: 891.
- [6] Abdelaziz AA, Abo-Kamar AM, Elkotb ES, Al-Madboly LA. Microbial lipases: advances in production, purification, biochemical characterization, and multifaceted applications in industry and medicine. *Microb. Cell. Fact.* 2025; 24: 40.
- [7] Najim AA, Radeef AY, Al-Doori I, Jabbar ZH. Immobilization: the promising technique to protect and increase the efficiency of microorganisms to remove contaminants. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2024; 99: 1707-1733.
- [8] Patti S, Alunno IM, Pedroni S, Riva S, Ferrandi EE, Monti D. Advances and Challenges in the Development of Immobilized Enzymes for Batch and Flow Biocatalyzed Processes. *ChemSusChem* 2024; 18: e202402007.
- [9] Zhao P. Coordination Polymer Surface Chemistry and Enzyme Interaction Mechanisms: Molecular Recognition and Binding. *Journal of Technology, Culture & Sustainability.* 2025; 1.
- [10] Mirsalami SM, Mirsalami M, Ghodousian A. Techniques for immobilizing enzymes to create durable and effective biocatalysts. *Results Chem.* 2024; 7: 101486.
- [11] Hayes MHB, Roulia M. Relevance of Organic Matter Compositions, Structures and Associations to Soil Aggregates and to Sustainable Productivity. *Agronomy* 2025; 15: 2182.
- [12] Králik M, Koós P, Markovic M, Lopatka P. Organic and Metal–Organic Polymer-Based Catalysts—Enfant Terrible Companions or Good Assistants? *Molecules* 2024; 29: 4623.
- [13] Hassan ME, Zhu X, Souza Jr EF, Elnashar MM, Lu F. Enzyme immobilization advances: a key to unlocking renewable bioenergy potential. *Green Chem.* 2025; 27: 11289-11311.
- [14] McCann B, Tipper B, Shahbeigi S, Soleimani M, Jabbari M, Esfahani MN, A Review on Perception of Binding Kinetics in Affinity Biosensors: Challenges and Opportunities. *ACS Omega* 2025; 10: 4197-4216.
- [15] Hastings J, Lassitter T, Zheng Z, Chheda S, Siepmann JI, Gagliardi L, Yaghi OM, Glover TG. High-Temperature Water Adsorption Isotherms and Ambient Temperature Water Diffusion Rates on Water Harvesting Metal–Organic Frameworks. *J. Phys. Chem. C.* 2024; 128: 11328-11339.
- [16] Almeida CS, Neto FS, Sousa OS, Aires FIS, Matos Filho JR, Cavalcante ALG, Sousa Junior PG, Melo RLF, Santos JCS. Enhancing Lipase Immobilization via Physical Adsorption: Advancements in Stability, Reusability, and Industrial Applications for Sustainable Biotechnological Processes *ACS Omega* 2024; 9: 46698-46732.
- [17] Mao S, Jiang J, Xiong K, Chen Y, Yao Y, Liu L, Liu H, Li X. Enzyme Engineering: Performance Optimization, Novel Sources, and Applications in the Food Industry. *Foods* 2024; 13: 3846.
- [18] Ezzati R, Azizi M, Ezzati S. A theoretical approach for evaluating the contributions of pseudo-first-order and pseudo-second-order kinetics models in the Langmuir rate equation. *Vacuum* 2024; 222: 113018.
- [19] Kanagalakshmi M, Devi SG, Ananthi P, Pius A. Adsorption Isotherms and Kinetic Models. *Carbon Nanomaterials and Their Composites as Adsorbents* 2024; 135-154.
- [20] Tawfik AM, Eltabey RM. Fractional Kinetic Strategy toward the Adsorption of Organic Dyes: Finding a Way Out of the Dilemma Relating to Pseudo-First- and Pseudo-Second-Order Rate Laws. *J. Phys. Chem. A.* 2024; 128: 1063-1073.

- [21] Zhou X, Yu X, Maimaitiniyazi R, Zhang X, Qu Q. Discussion on the thermodynamic calculation and adsorption spontaneity re Ofudje et al. (2023). *Heliyon* 2024; 10: e28188.
- [22] Alahmad J, BiBi A, Al-Ghouti MA. Application of TiO₂-loaded fly ash-based geopolymer in adsorption of methylene blue from water: Waste-to-value approach. *Groundw. Sustain. Dev.* 2024; 25: 101138.
- [23] Hao X, Liu P, Chu X. Recent Advances in the Strategies of Simultaneous Enzyme Immobilization Accompanied by Nanocarrier Synthesis. *Appl. Sci.* 2024; 14: 3702.
- [24] Wang Z, Wang R, Geng Z, Luo X, Jia J, Pang S, Fan X, Bilal M, Cui J. Enzyme hybrid nanoflowers and enzyme@metal-organic frameworks composites: fascinating hybrid nanobiocatalysts. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2024; 44: 674-697.
- [25] Akhtar M, Shahzadi S, Arshad M, Akhtar T, Janjua MRSA. Metal oxide-polymer hybrid composites: a comprehensive review on synthesis and multifunctional applications. *RSC Adv.* 2025; 15: 18173-18208.
- [26] Tadesse M, Liu Y. Recent Advances in Enzyme Immobilization: The Role of Artificial Intelligence, Novel Nanomaterials, and Dynamic Carrier Systems. *Catalysts* 2025; 15: 571.
- [27] Adegun AI, Kareem SO, Adebayo OS, Balogun SA. Comparative adsorption of amylase, protease and lipase on ZnFe₂O₄: kinetics, isothermal and thermodynamics studies. *3 Biotech* 2017; 7: 198.
- [28] Osman B, Kara A, Beşirli N. Immobilization of glucoamylase onto Lewis metal ion chelated magnetic affinity sorbent: kinetic, isotherm and thermodynamic studies. *J. Macromol. Sci. Part A* 2011; 48: 387-399.
- [29] Baysal Z, Bulut Y, Yavuz M, Aytekin Ç. Immobilization of α -amylase via adsorption onto bentonite/chitosan composite: Determination of equilibrium, kinetics, and thermodynamic parameters. *Starch-Stärke*, 2014; 66: 484-490.
- [30] Daoud FBO, Kaddour S, Sadoun T. Adsorption of cellulase *Aspergillus niger* on a commercial activated carbon: kinetics and equilibrium studies. *Colloids Surf. B.* 2010; 75: 93-99.
- [31] Yang YC, Deka JR, Wu CE, Tsai CH, Saikia D, Kao HM. Cage like ordered carboxylic acid functionalized mesoporous silica with enlarged pores for enzyme adsorption. *J. Mater. Sci.* 2017; 52: 6322-6340.
- [32] Alves MD, Aracri FM, Cren ÉC, Mendes AA. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. *Chem. Eng. J.* 2017; 311: 1-12.
- [33] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 7: 248-254.
- [34] Liese A, Hilterhaus L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chem. Soc. Rev.* 2013; 42: 6236-6249.
- [35] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
- [36] Smith PE, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano M, ... Klenk DC. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985; 150: 76-85.
- [37] Chang YK, Chu L, Tsai JC, Chiu SJ. Kinetic study of immobilized lysozyme on the extrudate-shaped NaY zeolite. *Process Biochem.* 2006; 41: 1864-1874.
- [38] dos Santos SML, Nogueira KAB, de Souza Gama M, Lima JDF, da Silva Júnior IJ, de Azevedo DCS. Synthesis and characterization of ordered mesoporous silica (SBA-15 and SBA-16) for adsorption of biomolecules. *Microporous Mesoporous Mater.* 2013; 180: 284-292.
- [39] Santos SM, Cecilia JA, Vilarrasa-García E, García-Sancho C, Junior IJS, Rodríguez-Castellón E, Azevedo DC. Adsorption of biomolecules in porous silicas modified with zirconium. Effect of the textural properties and acidity. *Microporous Mesoporous Mater.* 2018; 260: 146-154.
- [40] Huang SH, Liao MH, Chen DH. Fast and efficient recovery of lipase by polyacrylic acid-coated magnetic nano-adsorbent with high activity retention. *Sep. Purif. Technol.* 2006; 51: 113-117.
- [41] Santos SM, Cecilia JA, Vilarrasa-García E, Junior IJS, Rodríguez-Castellón E, Azevedo DC. The effect of structure modifying agents in the SBA-15 for its application in the biomolecules adsorption. *Microporous Mesoporous Mater.* 2016; 232: 53-64.
- [42] Bolina IC, Salviano AB, Tardioli PW, Cren ÉC, Mendes AA. Preparation of ion-exchange supports via activation of epoxy-SiO₂ with glycine to immobilize microbial lipase—Use of biocatalysts in hydrolysis and esterification reactions. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018; 120: 2354-2365.
- [43] Coutinho TC, Rojas MJ, Tardioli PW, Paris EC, Farinas CS. Nanoimmobilization of β -glucosidase onto hydroxyapatite. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018; 119: 1042-1051.
- [44] Min K, Kim J, Park K, Yoo YJ. Enzyme immobilization on carbon nanomaterials: loading density investigation and zeta potential analysis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2012; 83: 87-93.
- [45] Park M, Park SS, Selvaraj M, Zhao D, Ha CS. Hydrophobic mesoporous materials for immobilization of enzymes. *Microporous Mesoporous Mater.* 2009; 124: 76-83.
- [46] Regalbuto JR, Robles J. The engineering of Pt/carbon catalyst preparation. University of Illinois, Chicago. 2004.
- [47] Schultz N, Metreveli G, Franzreb M, Frimmel FH, Syltsat C. Zeta potential measurement as a diagnostic tool in enzyme immobilisation. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 2008; 66: 39-44.
- [48] Uygun DA, Çorman ME, Öztürk N, Akgöl S, Denizli A. Poly (hydroxyethyl methacrylate-co-methacryloylamidotryptophane) nanospheres and their utilization as affinity adsorbents for porcine pancreas lipase adsorption. *Mater. Sci. Eng. C* 2010; 30: 1285-1290.
- [49] McCabe WL, Smith JC, Harriott P. Unit Operations of Chemical Engineering 6th Edition, Boston, Burr Ridge, IL, Dubuque, IA, Madison, WI, New York, San Francisco, St. Louis. 2001.
- [50] Anirudhan TS, Rauf TA. Lysozyme immobilization via adsorption process using sulphonic acid functionalized silane grafted copolymer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013; 107: 1-10.
- [51] Santos Leite AC, Valetti NW, Brassesco ME, Teixeira JA, Picó G. Adsorption of peroxidase from *Raphanus sativus* L onto alginate-guar gum matrix: Kinetic,

- equilibrium and thermodynamic analysis. *Adsorpt. Sci. Technol.* 2016; 34: 388–402.
- [52] Weber WJ, Smith EH. Simulation and design models for adsorption processes. *Environ. Sci. Technol.* 1987; 21: 1040-1050.
- [53] Zdarta J, Sałek K, Kołodziejczak-Radzimska A, Siwińska-Stefańska K, Szwarc-Rzepka K, Norman M, ... Jesionowski T. Immobilization of Amano Lipase A onto Stöber silica surface: Process characterization and kinetic studies. *Open Chem.* 2015; 13: 138-148.
- [54] Passos ML, Ribeiro DS, Santos JL, Saraiva MLM. Physical and chemical immobilization of choline oxidase onto different porous solid supports: Adsorption studies. *Enzyme Microb. Technol.* 2016; 90: 76-82.
- [55] Bayramoğlu G, Yilmaz M, Arica MY. Reversible immobilization of laccase to poly (4-vinylpyridine) grafted and Cu (II) chelated magnetic beads: biodegradation of reactive dyes. *Bioresour. Technol.* 2010; 101: 6615-6621.
- [56] George R, Sugunan S. Kinetics of adsorption of lipase onto different mesoporous materials: Evaluation of Avrami model and leaching studies. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2014; 105: 26-32.
- [57] Ortega S, Máximo MF, Montiel MC, Murcia MD, Arnold G, Bastida J. Esterification of polyglycerol with polycondensedricinoleic acid catalysed by immobilised *Rhizopus oryzae* lipase. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2013; 36: 1291-1302.
- [58] Lage FA, Bassi JJ, Corradini MC, Todero LM, Luiz JH, Mendes AA. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyzebiolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. *Enzyme Microb. Technol.* 2016; 84: 56-67.
- [59] Tran DT, Chen CL, Chang JS. Immobilization of *Burkholderia* sp. lipase on a ferric silica nanocomposite for biodiesel production. *J. Biotechnol.* 2012; 158: 112-119.
- [60] Piccin JS, Cadaval TRSA, Pinto LAA, Dotto GL. Adsorption isotherms in liquid phase: experimental, modeling, and interpretations. In: *Adsorption Processes for Water Treatment and Purification* 2017; pp. 19-51.
- [61] Kopac T, Bozgeyik K. Equilibrium, Kinetics, and Thermodynamics of Bovine Serum Albumin Adsorption on Single-Walled Carbon Nanotubes, *Chem. Eng. Commun.* 2016; 203: 1198-1206.
- [62] Foo KY, Hameed BH. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chem. Eng. J.* 2010; 156: 2-10.
- [63] Miranda JS, Silva NC, Bassi JJ, Corradini MC, Lage FA, Hirata DB, Mendes AA. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous polyhydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. *Chem. Eng. J.* 2014; 251: 392-403.