



APLICAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO CONTENDO MANGANÊS PEROXIDASE NO TRATAMENTO DE CORANTES SINTÉTICOS

Marise S. Carvalho²; Adriana B. Pimentel²; Alisson S. S. Quinto^{1,2}; Gabriel L. S. Jesus^{1,2}; Guilherme M. Madureira⁴; Júlia L. Nascimento⁵; Izis R. A. S. Vieira¹; Marcelo Franco¹

¹ Grupo de Pesquisa em Biotransformação e Biocatálise Orgânica, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, CEP 45654-370, Brasil.

² Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, CEP 40110-100, Brasil.

³ Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, CEP 81531-980, Brasil.

⁴ Departamento de Engenharias e Computação, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, CEP 45654-370, Brasil.

⁵ Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, CEP 45654-370, Brasil. marisecarvalho.tec@gmail.com

Palavras-Chave: biorremediação, azul de metileno, vermelho de fenol.

Introdução

As indústrias utilizam amplamente corantes sintéticos devido à sua elevada estabilidade, intensa coloração e baixo custo de produção. No entanto, durante as etapas de processamento, parte desses compostos pode ser incorporada aos efluentes e alcançar corpos hídricos quando o tratamento é inadequado. Mesmo em baixas concentrações, esses corantes alteram a aparência da água, reduzem a penetração da luz e comprometem a atividade fotossintética, afetando o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos. Além disso, a elevada estabilidade de suas estruturas aromáticas e grupos cromóforos dificulta sua degradação, aumentando a preocupação com os potenciais efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos de determinados corantes e dos subprodutos gerados durante tratamentos incompletos (AL-TOHAMY et al., 2022).

Entre os compostos empregados como modelos em estudos de tratamento de soluções coloridas, destaca-se o azul de metileno, um corante catiônico pertencente à classe das tiazinas, amplamente utilizado em investigações de remoção devido à intensa coloração e à facilidade de monitoramento por técnicas espectrofotométricas e cromatográficas. O vermelho de fenol, por sua vez, é um indicador ácido-base pertencente à classe das sulfoneftaleínas. Por apresentarem características químicas distintas, esses compostos permitem avaliar o comportamento do sistema enzimático diante de diferentes estruturas. Entretanto, os resultados devem ser interpretados considerando as condições específicas empregadas em cada ensaio (KHAN et al., 2022; EASLEY; PLACE, 2017).

Diversas tecnologias têm sido empregadas para o tratamento de efluentes contendo corantes, incluindo coagulação-floculação, adsorção, filtração e processos oxidativos. Embora esses métodos possam apresentar elevada eficiência, sua aplicação frequentemente envolve limitações, como a geração de resíduos secundários, a necessidade de regeneração de materiais adsorventes e o controle rigoroso das condições operacionais. Nesse contexto, a biorremediação tem se destacado como uma alternativa sustentável baseada na utilização de microrganismos



ou de seus metabólitos. Entre essas abordagens, o emprego direto de extratos enzimáticos apresenta vantagens importantes, como a dispensa da introdução de biomassa microbiana no sistema de tratamento e o maior controle das condições reacionais, reduzindo limitações associadas ao crescimento e à adaptação dos microrganismos ao efluente (CHAUHAN; CHOUDHURY, 2021; QUINTO et al., 2025).

Entre os microrganismos de interesse biotecnológico, os fungos de podridão branca destacam-se pela produção de enzimas ligninolíticas extracelulares capazes de oxidar uma ampla variedade de compostos aromáticos. Dentre essas enzimas, a manganês peroxidase (MnP) integra o sistema oxidativo responsável pela modificação da lignina e apresenta elevado potencial para a descoloração de corantes. O fungo *Ganoderma lucidum* pode produzir essas enzimas quando cultivado em resíduos vegetais por fermentação em estado sólido, estratégia que alia a obtenção de biocatalisadores ao aproveitamento de biomassas lignocelulósicas (CHEVREUIL et al., 2022). Além disso, a utilização do extrato bruto pode preservar a ação sinérgica entre as enzimas e outros metabólitos presentes no meio fermentado, eliminando etapas de purificação e simplificando o processo de obtenção do biocatalisador.

Estudos utilizando extratos oxidativos produzidos por fermentação em estado sólido demonstram a viabilidade dessa abordagem na descoloração de diferentes corantes sintéticos. Extratos obtidos a partir de resíduos agroindustriais já apresentaram atividade sobre azul de metileno e outros compostos aromáticos, reforçando o potencial da valorização de resíduos lignocelulósicos como estratégia integrada ao tratamento ambiental (CHAUHAN; CHOUDHURY, 2021; QUINTO et al., 2025). Entretanto, a redução da coloração não deve ser interpretada, isoladamente, como evidência de mineralização completa, pois pode refletir apenas a transformação parcial da molécula, a alteração do grupo cromóforo ou a diminuição da concentração do composto original. Dessa forma, técnicas cromatográficas tornam-se recursos importantes para acompanhar a transformação dos compostos, permitindo monitorar a redução do sinal correspondente ao analito ao longo do tratamento.

Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a aplicação de um extrato enzimático contendo manganês peroxidase (MnP), produzido por *G. lucidum* em condições fermentativas previamente selecionadas, na remoção dos corantes azul de metileno e vermelho de fenol. A eficiência do tratamento foi monitorada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ao longo do tempo, considerando as proporções específicas entre o extrato enzimático e cada composto avaliadas em cada sistema experimental.

Material e Métodos

O extrato enzimático contendo manganês peroxidase (MnP) foi produzido por *Ganoderma lucidum* em fermentação em estado sólido, utilizando mistura igualitária de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*), casca de coco-verde (*Cocos nucifera*) e palha de milho (*Zea mays*). A linhagem, cedida pela Universidade Federal da Bahia, foi previamente cultivada em ágar sabouraud a 28 °C por 7 dias. Quatro discos miceliais de 7 mm foram inoculados em



frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 5 g da matriz, ajustada para 65% de umidade, e incubados a 28 °C durante 4 dias.

Ao término da fermentação, foram adicionados 50 mL de água destilada estéril ao material, seguidos de agitação a 200 rpm por 30 min, extração mecânica e centrifugação a 4.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi utilizado como extrato bruto enzimático para os ensaios posteriores. A atividade de MnP foi determinada segundo Lundell et al. (1990), com adaptações, pela oxidação do vermelho de fenol a 610 nm, nos tempos 0 e 5 min, utilizando coeficiente de absorção molar de 44.600 L.mol⁻¹.cm⁻¹, e expressa em U/mL.

As soluções de azul de metileno e vermelho de fenol foram preparadas a 10 mg/L. O extrato foi combinado aos compostos nas proporções volumétricas extrato:corante de 1:1 para o azul de metileno e 3:7 para o vermelho de fenol. Os sistemas foram incubados a 30 °C e 150 rpm, juntamente com controles sem adição do extrato. Os ensaios foram realizados em triplicata.

O azul de metileno foi monitorado em 0, 30, 60, 120, 240, 360 e 520 min, enquanto o vermelho de fenol foi avaliado em 0, 30, 150 e 390 min. Em cada intervalo, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min e os sobrenadantes analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em sistema LC-20A, com coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 e detector UV-Vis. Utilizou-se fase móvel metanol:água (90:10, v/v), acidificada com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de 20 µL. O azul de metileno foi monitorado a 665 nm e o vermelho de fenol a 430 nm. A redução percentual foi calculada em relação ao sinal cromatográfico do tempo inicial.

Resultados e Discussão

A análise por CLAE evidenciou diminuição dos sinais associados ao azul de metileno e ao vermelho de fenol durante o contato com o extrato enzimático bruto contendo manganês peroxidase (MnP). Para o azul de metileno, a interpretação foi baseada na concentração calculada; para o vermelho de fenol, utilizou-se a área do pico cromatográfico. As condições experimentais e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

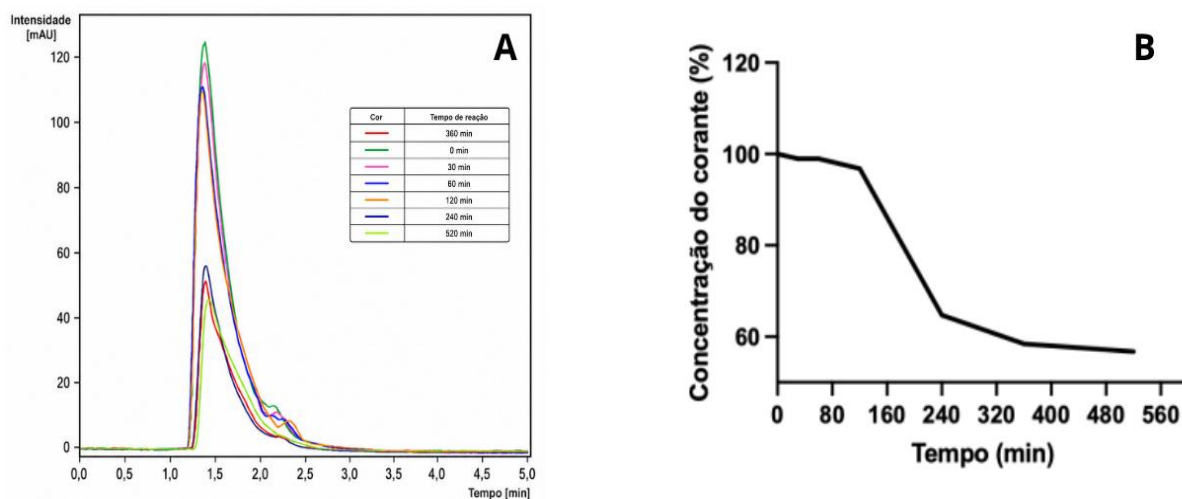
Tabela 1. Condições experimentais e resultados do tratamento dos corantes sintéticos com extrato enzimático contendo MnP.

Corante	Extrato: corante	Parâmetro monitorado	Valor inicial	Valor final	Tempo (min)	Redução (%)
Azul de metileno	1:1	Concentração (mg/L)	5,916450	3,355123	520	43,29

Corante	Extrato: corante	Parâmetro monitorado	Valor inicial	Valor final	Tempo (min)	Redução (%)
Vermelho de fenol	3:7	Área do pico	753,4	581,0	390	22,88

No sistema contendo azul de metileno, a concentração permaneceu próxima ao valor inicial durante os primeiros 120 min. Partindo de 5,916450 mg/L, foram obtidos 5,856325 mg/L após 30 min, 5,726455 mg/L após 60 min e 5,856325 mg/L após 120 min, correspondendo a 98,98%, 96,79% e 98,98% da concentração inicial. A oscilação indica uma fase inicial de baixa variação.

Figura 1 - Comportamento do azul de metileno durante o tratamento com extrato enzimático contendo MnP, na proporção extrato:corante de 1:1: (A) cromatogramas obtidos a 665 nm; e (B) concentração remanescente do corante ao longo de 520 min. Os valores correspondem às médias dos ensaios realizados em triplicata.



A alteração mais expressiva ocorreu entre 120 e 240 min, quando a concentração diminuiu de 5,856325 para 3,828908 mg/L. Nesse intervalo, a fração remanescente passou de 98,98% para 64,71%, representando redução adicional de 34,27 pontos percentuais. Aos 360 min, foram determinados 3,456133 mg/L e, ao final de 520 min, 3,355123 mg/L, correspondentes a 58,42% e 56,71% do valor inicial. A redução acumulada foi, portanto, de 43,29%.

O perfil cinético apresentou uma etapa inicial com baixa variação, seguida de redução acentuada entre 120 e 240 min e de uma etapa posterior com menor alteração. Esse comportamento demonstra a importância do tempo de contato. Caso o acompanhamento tivesse

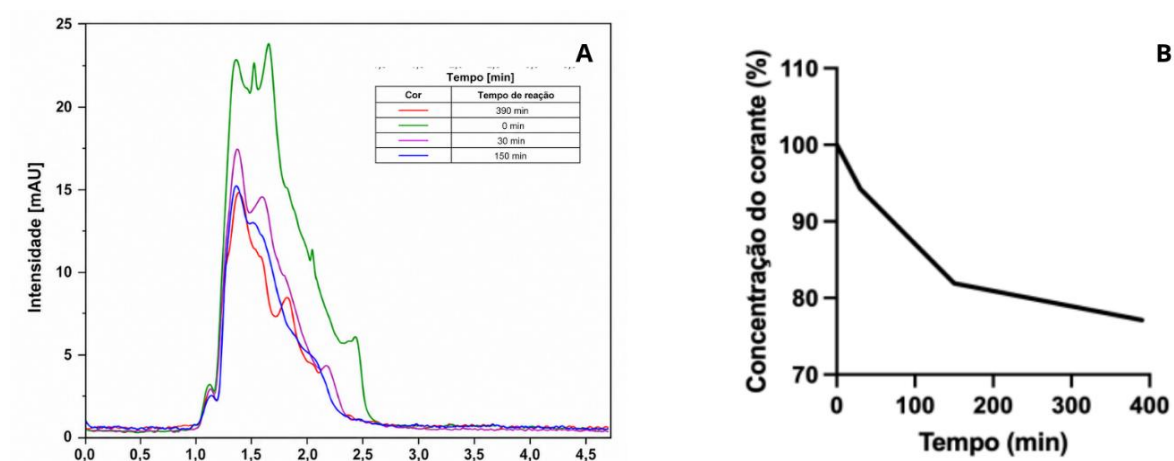
sido encerrado aos 120 min, a resposta do sistema seria subestimada, pois a maior redução ocorreu no intervalo seguinte.

A redução observada é compatível com o potencial oxidativo da MnP presente no extrato. Na presença de peróxido de hidrogênio, essa enzima catalisa a oxidação de Mn^{2+} a Mn^{3+} , formando espécies oxidantes capazes de atuar sobre estruturas aromáticas. O manganês oxidado pode funcionar como mediador entre a enzima e moléculas que não acessam diretamente o sítio catalítico (LUNDELL et al., 1990). Assim, a atividade de MnP previamente determinada fornece suporte para sua aplicação no tratamento do azul de metileno.

A eficiência de sistemas ligninolíticos pode variar com a concentração do composto, a proporção de extrato, a disponibilidade dos componentes da reação e o período de incubação. Preparações à base de peroxidases e sistemas contendo enzimas ligninolíticas já demonstraram capacidade de transformar o azul de metileno, reforçando a aplicabilidade desses biocatalisadores no tratamento de moléculas aromáticas coloridas (WU et al., 2022; ALMAZ; AGIRCELIK, 2023). O uso do extrato bruto também representa vantagem operacional, pois dispensa purificação e associa o aproveitamento de biomassas lignocelulósicas à obtenção de biocatalisadores de interesse ambiental (CHAUHAN; CHOUDHURY, 2021; QUINTO et al., 2025).

Para o vermelho de fenol, a área média do pico diminuiu progressivamente. O valor inicial de 753,4 foi reduzido para 710,0 após 30 min, correspondendo à permanência de 94,24% do sinal e à redução de 5,76%. Aos 150 min, a área atingiu 617,0, equivalente a 81,90% do valor inicial e a uma redução acumulada de 18,10%.

Figura 2 - Comportamento do vermelho de fenol durante o tratamento com extrato enzimático contendo MnP, na proporção extrato:corante de 3:7: (A) cromatogramas obtidos a 430 nm; e (B) sinal cromatográfico remanescente ao longo de 390 min. Os valores correspondem às médias dos ensaios realizados em triplicata.





Ao final de 390 min, a área do pico atingiu 581,0, permanecendo 77,12% do sinal inicial e resultando em redução total de 22,88%. A maior parcela da alteração ocorreu nos primeiros 150 min, período em que foram alcançados 18,10 dos 22,88 pontos percentuais observados ao final. Entre 150 e 390 min, a redução adicional foi de 4,78 pontos percentuais, indicando desaceleração da resposta.

O vermelho de fenol é empregado como substrato cromogênico em ensaios de MnP, porque sua oxidação produz alteração mensurável da resposta analítica (LUNDELL et al., 1990). Neste trabalho, sua permanência foi monitorada por CLAE em solução de 10 mg/L, permitindo acompanhar a diminuição do pico correspondente ao composto original. A redução progressiva reforça a capacidade oxidativa do extrato diante de uma molécula estruturalmente distinta do azul de metileno.

A resposta de 18,10% nos primeiros 150 min mostra que a atuação ocorreu desde a fase inicial. Posteriormente, a menor variação até 390 min indica redução da velocidade, possivelmente relacionada a mudanças na disponibilidade do composto ou dos componentes da reação, aspectos que devem ser investigados em estudos posteriores. Ainda assim, a redução final de 22,88% demonstra que o sistema permaneceu ativo durante o período avaliado e promoveu alteração mensurável no sinal do vermelho de fenol.

Os perfis cinéticos foram distintos: para o azul de metileno, a principal redução ocorreu entre 120 e 240 min; para o vermelho de fenol, a maior parcela foi registrada nos primeiros 150 min. Entretanto, os percentuais finais não devem ser interpretados como comparação direta da suscetibilidade, pois foram utilizadas proporções e tempos diferentes. O azul de metileno foi avaliado na proporção 1:1 durante 520 min, enquanto o vermelho de fenol foi tratado na proporção 3:7 durante 390 min.

A participação relativa do extrato foi de 50% no sistema com azul de metileno e de 30% no sistema com vermelho de fenol. A influência da proporção entre extrato e composto é relatada em preparações oxidativas, nas quais o desempenho varia conforme a configuração do sistema e a disponibilidade do biocatalisador (QUINTO et al., 2025). Dessa forma, a proporção volumétrica deve ser considerada na interpretação e na futura otimização do processo.

A diminuição da concentração do azul de metileno e da área cromatográfica do vermelho de fenol confirma a redução dos sinais correspondentes aos compostos originais. Como não foram identificados os produtos formados, os resultados demonstram remoção ou transformação parcial nas condições avaliadas, sem permitir afirmar mineralização completa. A associação da CLAE a técnicas de identificação de metabólitos poderá esclarecer as rotas de transformação em estudos futuros.



Em conjunto, o extrato bruto contendo MnP promoveu redução de 43,29% da concentração do azul de metileno após 520 min e de 22,88% da área do vermelho de fenol após 390 min. A atuação sobre compostos de classes químicas diferentes evidencia a versatilidade do sistema enzimático e sustenta seu potencial para o tratamento de soluções coloridas. Os resultados também indicam que o tempo de contato e a proporção entre extrato e composto são fatores relevantes para a eficiência do processo.

Conclusões

O extrato enzimático contendo manganês peroxidase, produzido por *Ganoderma lucidum* em condições fermentativas previamente selecionadas, apresentou capacidade de reduzir os sinais correspondentes ao azul de metileno e ao vermelho de fenol nas condições avaliadas.

Para o azul de metileno, na proporção extrato:corante de 1:1, foi observada redução de 43,29% após 520 min de tratamento. No ensaio com vermelho de fenol, realizado na proporção de 3:7, a área cromatográfica apresentou redução de 22,88% após 390 min. As diferenças entre os percentuais não permitem uma comparação direta entre os compostos, pois foram utilizadas proporções e tempos de acompanhamento distintos.

Dessa forma, os resultados demonstram o potencial do extrato enzimático na remoção parcial de compostos coloridos. Entretanto, como não foram identificados os produtos formados durante o tratamento, os dados confirmam a redução dos compostos monitorados, mas não permitem afirmar sua mineralização completa. O estudo fornece base para ensaios posteriores com condições padronizadas, maior tempo de reação e identificação dos produtos de transformação.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e ao Grupo de Pesquisa em Biotransformação e Biocatálise Orgânica (LABIOCAT), pelo apoio e infraestrutura disponibilizados.

Referências

- AL-TOHAMY, R.; ALI, S. S.; LI, F.; OKASHA, K. M.; MAHMOUD, Y. A.-G.; ELSAMAHY, T.; JIAO, H.; FU, Y.; SUN, J. A critical review on the treatment of dye-containing wastewater: Ecotoxicological and health concerns of textile dyes and possible remediation approaches for environmental safety. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 231, 113160, 2022.
- ALMAZ, Z.; AGIRCELIK, F. N. Enzymatic degradation of azo dyes methylene blue and Congo red with peroxidase purified from cauliflower using affinity chromatography technique: kinetic study, optimization and metal binding activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 136(2), 102–108, 2023.
- CHAUHAN, A. K.; CHOUDHURY, B. Synthetic dyes degradation using lignolytic enzymes produced from *Halopiger aswanensis* strain ABC_IITR by solid-state fermentation. **Chemosphere**, 273, 129671, 2021.
- CHEVREUIL, L. R.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; VASCONCELOS, A. S.; BINDÁ, V. S.; PESSOA, V. A.; NASCIMENTO, L. B. B.; GOUVÊA, P. R. S.; SALES-CAMPOS, C. Screening of ligninolytic enzymes produced



by *Ganoderma lucidum* in solid residues from the Amazon. **Research, Society and Development**, 11(14), e243111436257, 2022.

EASLEY, R. A.; PLACE, B. J. Mass spectra of sulfonephthalein pH indicator dyes and their impurities. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**, 122, 21, 2017.

KHAN, I.; SAEED, K.; ZEKKER, I.; ZHANG, B.; HENDI, A. H.; AHMAD, A.; AHMAD, S.; ZADA, N.; AHMAD, H.; SHAH, L. A.; SHAH, T.; KHAN, I. Review on Methylene Blue: Its Properties, Uses, Toxicity and Photodegradation. **Water**, 14(2), 242, 2022.

LUNDELL, T.; LEONOWICZ, A.; ROGALSKI, J.; HATAKKA, A. Formation and action of lignin-modifying enzymes in cultures of *Phlebia radiata* supplemented with veratric acid. **Applied and Environmental Microbiology**, 56(9), 2623–2629, 1990.

QUINTO, A. S. S.; SAMPAIO, I. C. F.; CARVALHO, M. S.; CÉZAR, K. S.; SILVA, F. N.; COSTA, F. S.; SOUZA, M. S.; PIMENTEL, A. B.; TAVARES, I. M. C.; NASCIMENTO, N. A.; SANTANA, E. C.; LIMA, M. D.; IRFAN, M.; FRANCO, M. Valorization of agri-food by-products for laccase oxidative multienzyme extract production and dye degradation: a sustainable biodegradation approach. **Journal of the Indian Chemical Society**, 102(6), 101717, 2025.

WU, K.; SHI, M.; PAN, X.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; SHEN, T.; TIAN, Y. Decolourization and biodegradation of methylene blue dye by a ligninolytic enzyme-producing *Bacillus thuringiensis*: degradation products and pathway. **Enzyme and Microbial Technology**, 156, 109999, 2022.