



## TRANSFORMAÇÃO DO CORANTE AZUL DE METILENO POR EXTRATO ENZIMÁTICO DE *Ganoderma lucidum* PRODUZIDO EM CASCA DE CAFÉ

Adriana B. Pimentel<sup>2</sup>; Marise S. Carvalho<sup>2</sup>; Alisson S. S. Quinto<sup>1,2</sup>; Gabriel L. S. Jesus<sup>1,2</sup>; Geovanna S. L. Reis<sup>1</sup>; Rafael R. Teixeira<sup>1</sup>; Izis R. A. S. Vieira<sup>1</sup>; Marcelo Franco<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Pesquisa em Biotransformação e Biocatálise Orgânica, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, Brasil.

<sup>2</sup> Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 40110-100, Brasil  
[gslreis.bqi@uesc.br](mailto:gslreis.bqi@uesc.br)

**Palavras-Chave:** Resíduo agroindustrial; Lacase; Biorremediação.

### Introdução

A crescente geração de efluentes industriais contendo corantes sintéticos tem intensificado as preocupações com a qualidade dos recursos hídricos, uma vez que esses compostos apresentam elevada estabilidade química, persistência ambiental e potencial toxicidade para organismos aquáticos. Entre os setores industriais, a indústria têxtil destaca-se como uma das principais fontes desses contaminantes, liberando grandes volumes de efluentes capazes de reduzir a penetração de luz nos corpos d'água, comprometer a atividade fotossintética e alterar o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos (HOLKAR et al., 2016; PEREIRA et al., 2024; SELLAPPA, 2025; YASEEN e SCHOLZ, 2019).

O Azul de Metileno (MB), pertencente à classe dos corantes tiazínicos, é frequentemente utilizado como molécula modelo em estudos de biorremediação devido à sua elevada estabilidade e resistência à degradação. Sua permanência no ambiente está associada à formação de subprodutos potencialmente tóxicos e à dificuldade de remoção por métodos convencionais, como coagulação-floculação, adsorção, filtração e fotocatalise, que apresentam limitações relacionadas ao elevado custo operacional, à geração de resíduos secundários e à necessidade de infraestrutura especializada (KHAN et al., 2022; PANHWAR et al., 2024; AHMAD et al., 2022).

Nesse contexto, processos biotecnológicos baseados em fungos ligninolíticos têm despertado interesse como alternativas mais sustentáveis para o tratamento de efluentes, devido à capacidade desses microrganismos de produzir enzimas oxidativas, especialmente lacases, capazes de degradar uma ampla variedade de compostos aromáticos presentes em corantes sintéticos (COSTA et al., 2025; FANG et al., 2025). Entretanto, a aplicação de enzimas purificadas ainda enfrenta limitações relacionadas aos custos de produção, à



estabilidade operacional e à obtenção em larga escala (BRUGNARI et al., 2021; YANG et al., 2017).

Uma estratégia para contornar essas limitações consiste na produção de biomassa fermentada por fermentação em estado sólido (FES), utilizando resíduos agroindustriais lignocelulósicos como substratos. Além de agregar valor a esses resíduos, a FES favorece a obtenção de sistemas multienzimáticos contendo lacases e outras enzimas ligninolíticas com potencial para a degradação de compostos recalcitrantes (GUTIERREZ-RANGEL, MAYOLO-DELOISA e TORRES-ACOSTA, 2024; QUINTO et al., 2025). Essa abordagem tem sido amplamente explorada devido à capacidade dos fungos ligninolíticos, especialmente espécies do gênero *Pleurotus*, de produzir enzimas oxidativas durante o crescimento em substratos lignocelulósicos, promovendo a bioconversão de resíduos agroindustriais (HAN et al., 2020; BRUGNARI et al., 2021). Entre os resíduos disponíveis, a casca de café destaca-se por sua elevada disponibilidade e composição rica em lignina, celulose, hemicelulose e compostos fenólicos, características que favorecem o crescimento de fungos ligninolíticos e a produção de enzimas oxidativas (MURTHY e MADHAVA NAIDU, 2012).

Espécies do gênero *Ganoderma*, pertencentes ao grupo dos fungos da podridão branca, são reconhecidas pela elevada capacidade de secretar enzimas ligninolíticas durante o crescimento em substratos lignocelulósicos, demonstrando potencial para aplicações em processos de biorremediação (HUANG, WANG e LIU, 2023). Além disso, estudos recentes relatam que extratos multienzimáticos obtidos por fermentação em estado sólido (FES), utilizando resíduos agroindustriais como substratos, apresentam resultados promissores na degradação de diferentes corantes sintéticos, reforçando a viabilidade dessa abordagem para o tratamento de efluentes contaminados (QUINTO et al., 2025; RUEDA-VILLABONA et al., 2021).

Diante desse cenário, este trabalho teve como objetivo avaliar a degradação do corante Azul de Metileno utilizando extrato enzimático contendo lacase, obtido a partir da fermentação em estado sólido de casca de café por *Ganoderma lucidum*, monitorando o processo por espectrofotometria UV-Vis e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

## Material e Métodos

A casca de café utilizada como substrato foi obtida de produtores rurais do sudoeste da Bahia, lavada, seca em estufa com circulação de ar a 65 °C até massa constante, moída até granulometria aproximada de 2 mm e armazenada à temperatura ambiente. A linhagem de *Ganoderma lucidum* foi mantida em meio ágar batata-dextrose (PDA) a 28 °C por 8 dias. Discos miceliais de 6 mm, retirados da região de crescimento ativo da colônia, foram utilizados como inóculo.



A fermentação em estado sólido foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 5 g de casca de café, com umidade inicial ajustada para 70%. Após a esterilização e o resfriamento do substrato, os frascos foram inoculados e incubados a 28 °C por 144 h. Ao término da fermentação, foram adicionados 50 mL de água destilada estéril a cada frasco, seguidos de agitação orbital a 200 rpm por 30 min, prensagem mecânica e centrifugação a 4.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático bruto.

A atividade de lacase foi determinada por espectrofotometria, utilizando guaiacol como substrato. A mistura reacional foi composta por 0,75 mL de tampão acetato de sódio 100 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,0, 0,50 mL do extrato enzimático e 0,75 mL de guaiacol 100 mmol L<sup>-1</sup>. A reação foi mantida a 28 °C por 30 min e a absorbância medida a 470 nm, conforme Umar e Ahmed (2022). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de guaiacol por minuto, sendo os resultados expressos em U/mL.

Os ensaios de tratamento foram realizados com solução de azul de metileno inicialmente preparada a 20 mg L<sup>-1</sup>, combinada ao extrato enzimático na proporção volumétrica de 1:1. Os sistemas, juntamente com os controles sem adição do extrato enzimático, foram incubados em agitador orbital a 30 °C e 150 rpm, em triplicata. Alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 30, 60, 120, 180, 240, 360 e 520 min, centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min e analisadas por espectrofotometria UV-Vis e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

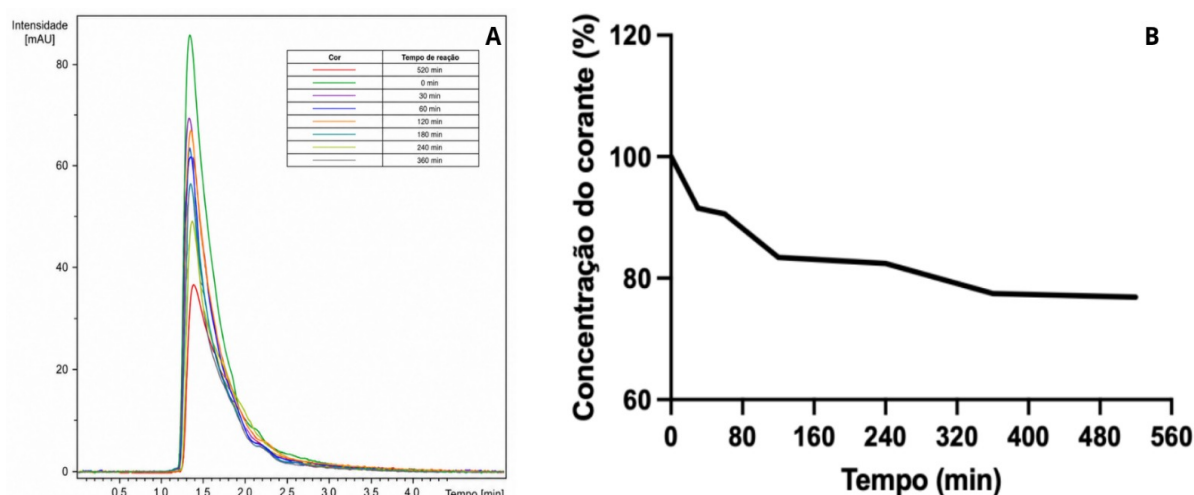
A varredura espectral foi realizada entre 190 e 1.100 nm, e o monitoramento espectrofotométrico ocorreu a 662 nm. Para a CLAE, utilizou-se sistema LC-20A equipado com coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 e detector UV-Vis. A fase móvel foi constituída por metanol:água (90:10, v/v), acidificada com 0,1% de ácido fórmico, com fluxo de 0,4 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20 µL. O azul de metileno foi monitorado a 665 nm, e a redução percentual foi calculada em relação ao sinal cromatográfico obtido no tempo inicial.

## Resultados e Discussão

O extrato enzimático bruto contendo lacase, obtido por fermentação em estado sólido da casca de café com *Ganoderma lucidum*, apresentou capacidade de atuar sobre o azul de metileno durante o período experimental. A concentração calculada do corante diminuiu de 5,5268 mg L<sup>-1</sup> no tempo inicial para 4,0838 mg L<sup>-1</sup> após 520 min de tratamento, correspondendo a uma redução acumulada de 26,1%. Esse resultado demonstra que o sistema enzimático produzido a partir da biomassa residual permaneceu ativo durante o monitoramento e promoveu redução mensurável do composto presente no meio reacional (LOZANO PÉREZ; LOZADA CASTRO; GUERRERO FAJARDO, 2024; LIU et al., 2013).



**Figura 1** – Monitoramento do azul de metileno durante o tratamento com extrato enzimático bruto obtido de *Ganoderma lucidum*: (A) cromatogramas obtidos por CLAE a 665 nm; e (B) concentração remanescente do corante ao longo de 520 min. O ensaio foi realizado na proporção volumétrica extrato:corante de 1:1, a 30 °C e 150 rpm. Os valores correspondem às médias dos ensaios realizados em triplicata.



A análise do perfil cinético demonstrou que a atuação do extrato ocorreu desde os primeiros períodos do tratamento. Após 30 min, a concentração do azul de metileno diminuiu para 5,0579 mg L<sup>-1</sup>, correspondendo a uma redução de aproximadamente 8,5% em relação ao valor inicial. Aos 60 min, foi determinada concentração de 5,0074 mg L<sup>-1</sup>, mantendo a progressão da resposta observada no início do processo.

A redução tornou-se mais evidente com o aumento do tempo de contato. Aos 120 min, a concentração atingiu 4,6105 mg L<sup>-1</sup>, equivalente a uma redução acumulada de aproximadamente 16,6%. Após 180 min, o valor diminuiu para 4,5552 mg L<sup>-1</sup> e, aos 240 min, alcançou 4,2498 mg L<sup>-1</sup>. Assim, nas primeiras quatro horas de tratamento, o sistema já havia promovido redução de aproximadamente 23,1% da concentração inicialmente determinada.

Entre 240 e 360 min, os valores permaneceram em uma faixa próxima, com concentrações de 4,2498 e 4,2810 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Posteriormente, foi observada nova diminuição, alcançando 4,0838 mg L<sup>-1</sup> aos 520 min, menor concentração registrada durante todo o monitoramento. O perfil obtido demonstra uma atuação mais expressiva nas primeiras horas, seguida pela manutenção da resposta e pela continuidade da redução até o período final analisado. Os cromatogramas obtidos por CLAE complementam a análise da concentração do azul de metileno. A área do pico correspondente ao azul de metileno foi reduzida de 1.746 no tempo inicial para 1.146 após 520 min, representando uma diminuição de aproximadamente 34,4% da resposta cromatográfica. A atenuação do pico ao longo do



tratamento acompanha a diminuição da concentração calculada, indicando a redução da concentração do azul de metileno detectado ao longo do tratamento com o extrato enzimático.

A apresentação conjunta dos cromatogramas e do gráfico de concentração fortalece a interpretação dos resultados. Enquanto os cromatogramas demonstram visualmente a redução da intensidade e da área do pico analítico, o gráfico evidencia a evolução quantitativa do processo ao longo do tempo. Dessa forma, as duas representações são complementares e permitem visualizar tanto a alteração do sinal cromatográfico quanto o comportamento cinético do tratamento.

A redução observada está associada ao potencial oxidativo da lacase produzida por *G. lucidum* durante a fermentação. As lacases são enzimas multicobre capazes de catalisar a oxidação de diferentes compostos aromáticos, utilizando o oxigênio molecular como aceptor final de elétrons. Esse mecanismo permite sua atuação sobre estruturas químicas presentes em corantes sintéticos, incluindo grupos cromóforos responsáveis pela absorção de luz e pela coloração intensa dessas moléculas (JANUSZ et al., 2020; JEYABALAN et al., 2023).

O azul de metileno apresenta uma estrutura aromática heterocíclica pertencente à classe dos corantes tiazínicos e elevada estabilidade em solução aquosa. Essas características contribuem para sua persistência e justificam sua utilização como composto modelo em estudos de tratamento. A resposta obtida demonstra que o extrato produzido foi capaz de promover a redução da concentração do azul de metileno nas condições avaliadas, evidenciando sua atuação sobre um corante reconhecido por sua elevada estabilidade química (KHAN et al., 2022). A determinação prévia da atividade de lacase com guaiacol evidenciou a produção da enzima durante o cultivo de *G. lucidum* na casca de café. A utilização do guaiacol como substrato permite monitorar sua oxidação pela enzima e verificar a presença de atividade catalítica no extrato obtido após a fermentação. Dessa forma, a atividade enzimática determinada é consistente com a resposta observada durante o tratamento do azul de metileno (UMAR; AHMED, 2022).

A casca de café possui composição lignocelulósica constituída principalmente por celulose, hemicelulose, lignina e compostos fenólicos. Essas características tornam o resíduo adequado ao crescimento de fungos ligninolíticos e à obtenção de enzimas oxidativas por fermentação em estado sólido. A utilização desse material como substrato amplia sua possibilidade de aproveitamento biotecnológico e reduz a dependência de meios de cultivo formulados com matérias-primas de maior custo (MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012).

A fermentação em estado sólido também apresenta vantagens para a produção enzimática por utilizar matrizes com baixa disponibilidade de água livre e condições semelhantes ao ambiente natural de crescimento de fungos filamentosos. Nesse processo, o resíduo atua simultaneamente como suporte físico e fonte de nutrientes para o microrganismo,



favorecendo a obtenção de biocatalisadores a partir de matérias-primas agroindustriais (GUTIERREZ-RANGEL; MAYOLO-DELOISA; TORRES-ACOSTA, 2024).

Outro aspecto relevante foi a aplicação direta do extrato enzimático bruto. A ausência de etapas de purificação simplifica sua obtenção, reduz o número de operações e mantém no sobrenadante os componentes solúveis produzidos durante a fermentação. Essa abordagem é especialmente importante para aplicações ambientais, nas quais a viabilidade do processo depende não apenas da atividade catalítica, mas também da simplicidade de produção e aplicação do biocatalisador (BRUGNARI et al., 2021; QUINTO et al., 2025).

A redução de 26,1% alcançada após 520 min evidencia o potencial do sistema desenvolvido, principalmente por ter sido obtido a partir da fermentação da casca de café e aplicado diretamente na forma de extrato bruto. O resultado integra a valorização da casca de café, a produção de uma enzima oxidativa por fermentação em estado sólido e sua aplicação no tratamento de um corante sintético de elevada estabilidade.

Em conjunto, os resultados demonstram que o cultivo de *G. lucidum* em casca de café permitiu a obtenção de um extrato enzimático ativo, capaz de promover redução progressiva do azul de metileno. A diminuição simultânea da concentração calculada e do sinal cromatográfico confirma o desempenho do sistema durante o período avaliado e reforça a utilização de resíduos lignocelulósicos como matérias-primas para a produção de biocatalisadores destinados a processos de biorremediação.

## Conclusões

O presente estudo demonstrou o potencial da utilização da casca de café como substrato agroindustrial para a produção de enzimas oxidativas por fermentação em estado sólido utilizando *Ganoderma lucidum*. O extrato enzimático bruto obtido apresentou atividade catalítica capaz de promover a redução do azul de metileno em solução aquosa, evidenciando a produção de enzimas ativas com potencial para aplicação em processos de biorremediação.

A concentração do corante foi reduzida de 5,5268 para 4,0838 mg L<sup>-1</sup> após 520 min de tratamento, correspondendo a uma remoção de 26,1%. Os resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência confirmaram a diminuição do sinal cromatográfico do azul de metileno, corroborando os dados obtidos por espectrofotometria.

A atividade observada está relacionada à produção de lacases por *G. lucidum*, previamente confirmada pelo ensaio com guaiacol, indicando que o sistema enzimático produzido apresentou capacidade oxidativa suficiente para atuar sobre um corante de elevada estabilidade química.



Além da eficiência na degradação do corante, a utilização da casca de café como substrato representa uma alternativa sustentável para a valorização de resíduos agroindustriais e para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. O emprego do extrato bruto, sem etapas de purificação, torna o processo mais simples e economicamente atrativo.

Assim, conclui-se que o cultivo de *Ganoderma lucidum* em casca de café permitiu a obtenção de um extrato enzimático com potencial para aplicação no tratamento de efluentes contendo corantes sintéticos. Os resultados reforçam a viabilidade dessa estratégia e indicam que futuras otimizações das condições de cultivo e reação poderão aumentar a eficiência do processo, ampliando suas perspectivas de aplicação ambiental e industrial.



## Agradecimentos

Agradecemos à UESC e ao LaBioCat pelo apoio, infraestrutura e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

## Referências

- ALI, M.; BHARDWAJ, P.; ISHQI, H. M.; et al. Laccase engineering: redox potential is not the only determinant of activity in metalloproteins. *Molecules*, v. 28, p. 6209, 2023.
- BRUGNARI, T.; et al. Laccases as green and versatile biocatalysts: from lab to enzyme market—an overview. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 8, p. 131, 2021.
- COSTA, F. C. R.; BRITO, F. S. L.; DE GRANDI, M. J. R.; DANIEL, J. F. S. White Rot Fungi for Biodegradation of Dyes: Potential for Industrial Uses – A Review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 36, n. 6, p. 1–27, 2025.
- CHAUHAN, A. K.; CHOUDHURY, B. Synthetic dyes degradation using lignolytic enzymes produced from *Halopiger aswanensis* strain ABC\_IITR by solid-state fermentation. *Chemosphere*, v. 273, p. 129671, 2021.
- FANG, X.; et al. Enhanced laccase production by *Aspergillus oryzae* from lignocellulosic wastes through solid-state fermentation: Cytotoxicity, anticancer activity against breast cancer cells, and 4-chlorophenol degradation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 316, p. 144450, 2025.
- GUTIERREZ-RANGEL, P. C.; MAYOLO-DELOISA, K.; TORRES-ACOSTA, M. A. Decisional tool development and application for techno-economic analysis of fungal laccase production. *Bioresource Technology*, v. 402, 130781, 2024.
- HAN, M.-L.; AN, Q.; HE, S.-F.; et al. Solid-state fermentation of poplar sawdust and corn cob residues for lignocellulolytic enzyme production by different *Pleurotus ostreatus* strains. *BioResources*, v. 15, 2020.
- HIMANSHU, C. S.; SINGH, A.; et al. Purification and characterization of laccase from *Ganoderma lucidum* and its application in malachite green dye decolorization. *Bioresource Technology Reports*, v. 21, p. 101368, 2023.
- HOLKAR, C. R.; et al. A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches. *Journal of Environmental Management*, v. 182, p. 351–366, 2016.
- HUANG, J.; WANG, X.; LIU, Y. *Ganoderma* species as cell factories for lignocellulose bioconversion: advances in ligninolytic enzyme production and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, v. 42, n. 2, p. 197–211, 2023.
- ISLAM, T.; REPON, M. R.; ISLAM, T.; et al. Impact of textile dyes on health and ecosystem: A review of structure, causes and potential solutions. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 30, p. 9207–9242, 2022.
- JANUSZ, G.; et al. Laccase properties, physiological functions, and evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, p. 966, 2020.
- JEYABALAN, J.; VELUCHAMY, A.; V. P., V.; et al. A review on laccase-assisted dye decolorization: Recent trends and research progress. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 151, p. 105081, 2023.



KHAN, I.; SAEED, K.; ZEKKER, I.; et al. Review on Methylene Blue: Its Properties, Uses, Toxicity and Photodegradation. **Water**, v. 14, n. 2, artigo 242, 2022.

KISHOR, R.; SARATALE, G. D.; SARATALE, R. G.; et al. Efficient degradation and detoxification of methylene blue dye by a newly isolated ligninolytic enzyme-producing bacterium, *Bacillus albus* MW407057. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 206, p. 111947, 2021.

LIU, S.-T.; HUANG, J.; YE, Y.; ZHANG, A.-B.; PAN, L.; CHEN, X.-G. Microwave enhanced Fenton process for the removal of methylene blue from aqueous solution. **Chemical Engineering Journal**, v. 215–216, p. 586–590, 2013.

LOZANO PÉREZ, A. S.; LOZADA CASTRO, J. J.; GUERRERO FAJARDO, C. A. Application of microwave energy to biomass: a comprehensive review of microwave-assisted technologies, optimization parameters, and their strengths and weaknesses. **Journal of Manufacturing and Materials Processing**, v. 8, n. 3, p. 121, 2024.

MEJÍA-OTÁLVARO, F.; MERINO-RESTREPO, A.; HORMAZA-ANAGUANO, A. Production of ligninolytic enzymes by solid-state fermentation and application in dye degradation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2021.

MURTHY, P. S.; MADHAVA NAIDU, M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition: a review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 66, p. 45–58, 2012.

PEREIRA, A. R.; et al. Exploring acylated anthocyanin-based extracts as a natural alternative to synthetic food dyes: Stability and application insights. **Food Chemistry**, v. 461, p. 140945, 2024.

QUINTO, A. S. S.; et al. 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**, v. 102, n. 6, p. 101717, 2025.

RUEDA-VILLABONA, J. D.; RUEDA, A. M.; SAAVEDRA, O. L.; HERNÁNDEZ, I.; RINCÓN, G.; MARTÍNEZ-VEGA, R. A.; SÁNCHEZ, C. I. Crude enzymatic extract from *Dictyopanus pusillus* LMB4 as a biotechnological tool for crystal violet biodegradation. **Bioresource Technology Reports**, v. 15, artigo 100723, 2021.

SAMPAIO, I. C. F.; QUINTO, A. S. S.; MOURA, I. V. L.; et al. Laccase: a catalyst for change in environmentally friendly industrial processes. In: TAFT, C. A.; DE LAZARO, S. R. (Eds.). **Advances in Hydrogen Energy, Fuel Cells, Nanobiotechnology and Advanced Bioactive Compounds**. Cham: Springer Nature, p. 371–388, 2024.

SELLAPPA, K. Sustainable transition to circular textile practices in Indian textile industries: a review. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 27, n. 10, p. 4963–4983, 2025.

UMAR, A.; AHMED, S. Optimization, purification and characterization of laccase from *Ganoderma leucocontextum* along with its phylogenetic relationship. **Scientific Reports**, v. 12, n. 2416, 2022.

WU, X.; et al. Efficient catalytic removal of phenolic pollutants by laccase from *Coriolopsis gallica*: Binding interaction and polymerization mechanism. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 279, p. 135272, 2024.

YANG, J.; LI, W.; NG, T. B.; et al. Laccases: production, expression regulation and pharmaceutical biodegradation applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 832, 2017.

YASEEN, D. A.; SCHOLZ, M. Textile dye wastewater characteristics and constituents of synthetic effluents: A critical review. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 2019.