

# Degradación de índigo carmín por hongos de pudrición blanca

## Indigo carmine degradation by white rot fungi

Astrid Stefanía Duarte Trujillo<sup>1</sup>, Javier Alexander Jiménez Forero<sup>2</sup>, Julio Amilcar Pineda Insuasti<sup>3</sup>, Elsa Sulay Mora Muñoz<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Organización Micológica Internacional (OMI), Florencia, Colombia.

<sup>2</sup> Universidad de los Llanos (UNILLANOS), Villavicencio, Colombia.

<sup>3</sup> Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA), Ibarra, Ecuador.

<sup>4</sup> Universidad Técnica del Norte (UTN), Ibarra, Ecuador.

Autor para correspondencia: stefan-ing.agroind@hotmail.com

*Recibido: octubre 21 de 2018*

*Aceptado: diciembre 23 de 2018*

---

### RESUMEN

El Índigo Carmín (IC) es un colorante textil ampliamente usado, que causa contaminación ambiental por su estructura polifenólica de naturaleza persistente. Los Hongos de Pudrición Blanca (HPB) producen un complejo de enzimas no específicas capaces de degradar colorantes polifenólicos como el IC, por lo que su biomasa viva y/o sus enzimas presentan aplicaciones industriales potenciales en el tratamiento de efluentes industriales, en el blanqueo de pulpa para papel y en el envejecido de telas. El objetivo de éste artículo es describir los avances científicos en la degradación enzimática de Índigo Carmín (IC) por HPB e identificar las deficiencias de conocimiento que limitan su desarrollo tecnológico. Se identificó que la principal limitante tecnológica es el deficiente escalado del proceso.

**PALABRAS CLAVE:** biorremediación, enzimas, industria, lacasas, peroxidases.

### ABSTRACT

Indigo Carmine (IC) is a widely used textile dye, which causes environmental pollution due to its polyphenolic structure of persistent nature. White Rot Fungi (WRF) produce a complex of non-specific enzymes capable of degrading polyphenolic dyes such as IC, so that their living biomass and / or their enzymes present potential industrial applications in the treatment of industrial effluents, in the bleaching of pulp for paper and in the aging of fabrics. The objective of this article is to describe the scientific advances in the enzymatic degradation of IC by WRF and to identify the knowledge deficiencies that limit its technological development. It was identified that the main technological limitation is the poor scaling of the process.

**KEYWORDS:** bioremediation, enzymes, industry, laccases, peroxidases.

---

### INTRODUCCIÓN

Los colorantes sintéticos son compuestos aromáticos que en su estructura incluyen anillos aril con sustituyentes nitros, aminos,

hidroxilos, entre otros, los cuales presentan sistemas de electrones deslocalizados responsables de la absorción de la radiación electromagnética de diferentes longitudes de onda (Quintero y Cardona, 2010). Se pueden

clasificar por tecnología de teñido, estructura química o enlace cromóforo, índice de color y tipo de ionización (Quintero y Cardona, 2010; Wesenberg, 2003).

Los tintes tina (incluyendo el índigo) y los sulfurosos representan alrededor del 31% del mercado mundial de colorantes textiles, valor del cual el índigo constituye el 7%, representando cerca de 12.000 toneladas (Roessler, Crettenand, Dossenbach, Marte, y Rys, 2002). Su uso está muy difundido en la industria del denim, aunque gran parte del tinte empleado en la tinción de las telas, no se fija, sino que se pierde en las aguas residuales en proporción del 2 al 50%. Se calcula que la industria textil genera alrededor de 200 a 350 metros cúbicos de aguas residuales por tonelada de ropa teñida (Husain, 2010; Kuhad, Sood, Tripathi, Singh, y Ward, 2004; Schoeberl, Brik, Braun, y Fuchs, 2005).

Al salir en las aguas residuales, los tintes constituyen contaminantes persistentes debido a su origen sintético, su estructura compleja de alto peso molecular (Kuhad *et al.*, 2004), y su estabilidad a la luz, a la temperatura y al ataque microbiano (Gregory, 2000) generando fluctuaciones de las fuentes hídricas en parámetros como demanda química de oxígeno (DQO), demanda bioquímica de oxígeno (DBO), pH, color, salinidad, composición química (Talarposhti, Donnelly, y Anderson, 2001). El Índigo Carmín (IC), pese a contaminar el medio ambiente, causa dermatitis alérgica, conjuntivitis, hipertensión, hiperactividad, afecciones gastrointestinales y neurotoxicidad (Additifs, 2015; EFSA, 2015), además de ser un cancerígeno probable según la Association pour la Recherche Thérapeutique Anti-Cancéreuse (ARTAC, 2011).

Los métodos convencionales de tratamiento de efluentes de la industria textil se han caracterizado por ser eficientes, sin embargo, son inviables económicamente, generan lodos y en el caso de las membranas se colmatan; por el contrario, los métodos biológicos como

la biorremediación, trabajan con organismos vivos o muertos y/o enzimas, libres o inmovilizados con actividad biológica depurativa, son más económicos, son efectivos y no generan lodos (Kuhad *et al.*, 2004). En la biorremediación se han empleado hongos y/o bacterias en cultivos individuales o cocultivo para degradación de colorantes industriales, siendo los Hongos de Pudrición Blanca (HPB) de vital importancia gracias a su sistema enzimático inespecífico, que consta de ligninasas de tipo peroxidasa y fenoloxidasa, que en la naturaleza inician, más no dirigen la degradación de la lignina contenida en la madera, la cual tiene una estructura polifenólica similar a la de los colorantes sintéticos (Glenn y Gold, 1983; Wesenberg, 2003).

Debido a que la actividad enzimática de los HPB es inespecífica, los colorantes pueden ser también objeto de degradación. Su eficiencia depende de variables exógenas como la temperatura de incubación, presencia o ausencia de inductores, concentración de sustrato (índigo, en este caso), composición del medio, pH, entre otros (Harvey y Thurston, 2001). El papel depurador de los hongos de pudrición blanca puede ir desde la decoloración de las aguas residuales coloradas con tintes industriales, hasta su detoxificación, como reporta Abadulla *et al.* (2000) en colorantes antraquinónicos, azo e indigoide tratados con *Trametes Hirsuta*.

El objetivo de este artículo es describir los avances científicos en la degradación enzimática de Índigo Carmín (IC) por HPB e identificar las deficiencias de conocimiento que limitan su desarrollo tecnológico.

## ÍNDIGO CARMÍN

El índigo carmín es un polvo azul oscuro y cristalino que también está disponible como laca. Es insoluble en agua, alcohol y éter debido a las fuerzas intermoleculares fuertes de los puentes de hidrógeno, pero soluble en

cloroformo, nitrobenzono y ácido sulfúrico concentrado (Zollinger, 2003). Genéricamente es denominado indigotina, carmín de índigo o índigo carmín. En los Estados Unidos de Norte América le identifican como §74.102 FD&C Blue No. 2 mientras que en la Unión Europea le reconocen como E132. También suele conocerse como CI 73015, CI 75781 (cosméticos), CI Vat blue I, FD & C Azul Nº 2 / Azul 2 (EE.UU.), Azul Acido CI 74 (Additifs, 2015). En la figura 1 se puede ver el grupo cromóforo causante del color, que consta de un doble enlace entre dos carbonos sustituidos por dos donadores N-H y dos aceptores C=O (U. S. Government Publishing Office, 2016).

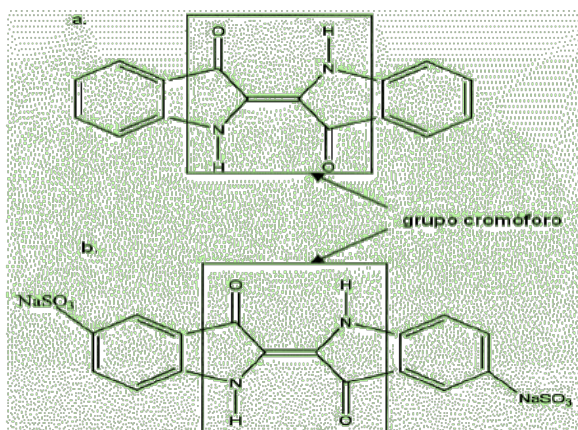


Fig. 1. Molécula de índigo (a) y molécula de índigo carmín (b) (Quintero y Cardona, 2010).

El índigo carmín se obtiene por calentamiento del índigo (añil o pasta de índigo), en presencia de ácido sulfúrico. El aditivo es aislado y sometido a procedimientos de purificación (U. S. Government Publishing Office, 2016). Es ampliamente empleado como aditivo en la industria farmacéutica, alimentaria (animal, humana...) y cosmética desde 1931 (FDA, 2015). Su aplicación más importante es el teñido de Blue Jeans y otros productos del denim (Gemeay, Mansour, El-Sharkawy, y Zaki, 2003).

El índigo se fija a los textiles durante la etapa de tinción mediante óxido-reducción compleja debido a su insolubilidad en agua y a la no afinidad con las fibras celulósicas (Božič y Kokol, 2008). El colorante es reducido con agentes

reductores o mediante métodos electroquímicos, de modo que empieza a decolorarse, solubilizarse en agua, aumentar su afinidad por la celulosa e incorporarse a las fibras textiles a través de sus hendiduras. En la medida en que seca la tela, el índigo va volviendo a su forma insoluble, estableciendo enlaces mecánicos con las fibras (Quintero y Cardona, 2010). Finalmente, se adiciona peróxido de hidrógeno u oxígeno atmosférico a pH alto para remover el exceso de colorante (Božič y Kokol, 2008).

## EFLUENTES TEXTILES

En la tabla 1 se observan las características fisicoquímicas de un efluente teñido con índigo:

**Tabla 1.** Caracterización de un efluente de la industria textil teñido de índigo

Parámetro	Valor de rango	Valor promedio
pH	11.2 - 11.3	11.3 +/- 0.1
DQO (mg/L)	1300 - 1554	1427 +/- 180
Conductividad	12.2 - 12.3	12.3 +/- 0.1
Color (Pt-Co)	3132 - 4190	3661 +/- 748

Fuente: (Maga y Tu, 1995)

## MECANISMOS DE DEGRADACIÓN

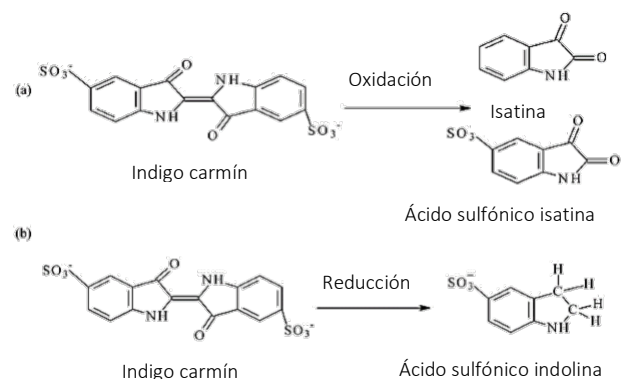


Fig. 2. Mecanismos de degradación del índigo carmín (H.-X. Li *et al.*, 2015).

El mecanismo de degradación del índigo carmín más común es la oxidación, donde se producen principalmente isatina y ácido sulfónico isatina como metabolitos tras la

escisión del doble enlace C=C y la formación del grupo carbonilo C=O. Existen también algunas bacterias como *Bacillus* spp. que no oxida, sino que reducen el IC hasta ácido sulfónico indolina según figura 2 (H.-X. Li, Xu, Tang, Zhang, y Mao, 2015).

## TRATAMIENTO DE EFLUENTES

### Métodos fisicoquímicos

Adsorción por hidróxido de calcio (Ramesh, Kirana, Ashwini, y Manasa, 2015), por nanofibras de alcohol de polivinilo mesoporoso (Teng, Li, Zhang, y Taha, 2011), por quitina o quitosán (Prado, Torres, Faria, y Dias, 2004); coagulación con sulfato de aluminio y cloruro férrico (Unlu, Yukseler, y Yetis, 2009); filtración por membranas (Buscio, Crespi, y Gutiérrez-Bouzán, 2015; Unlu *et al.*, 2009); oxidación química con peróxido de hidrógeno sobre gel de sílica (Gemeay *et al.*, 2003), con película de birnesita (Zaied *et al.*, 2011), con ozono (Qu, Xu, Meng, Wang, y Wang, 2015); oxidación electroquímica con un electrodo de tipo DSA y un cátodo de circonio (Palma-Goyes, Silva-Agredo, González, y Torres-Palma, 2014); fotodegradación química con peróxido de hidrógeno y radiación UV (Galindo, Jacques, y Kalt, 2001); fotocatalisis en fibras de dióxido de titanio (Barka, Assabane, Nounah, y Ichou, 2008; Othman, Mohamed, y Ibrahim, 2007; Palma-Goyes *et al.*, 2014; Vautier, Guillard, y Herrmann, 2001); electrofenton y foto-electrofenton (Flox *et al.*, 2006); ultrasonido (Palma-Goyes *et al.*, 2014); y disolución en un agente tensoactivo como bromuro de cetiltrimetilamonio (Lu *et al.*, 2005).

### Métodos biológicos

Actividad microbiana con células libres o inmovilizadas, principalmente de *Bacillus* spp (H.-X. Li *et al.*, 2015),  $\gamma$ -*Proteobacterium* (Singh, Capalash, Goel, y Sharma, 2007) y *Paenibacillus larvae* (Ramya, Anusha, y Kalavathy, 2008). Actividad enzimática, principalmente con enzimas lacasas de *Bacillus amyloliquefaciens* (L. Lu *et al.*, 2012), de *Scytalidium thermophilum* (L. Lu *et al.*, 2012),

de *Bacillus subtilis* (Cho, Seo, Lee, y Pan, 2011) y de hongos de pudrición blanca (Balan y Monteiro, 2001; Wesenberg, 2003).

## HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA

Los hongos de pudrición blanca (HPB) abarcan grupos diversos ecofisiológicamente como los basidiomicetes, que en la naturaleza son capaces de despolimerizar y mineralizar la lignina presente en la madera por acción de una o más enzimas extracelulares, con procesos de absorción mínima en los micelios (Wesenberg, 2003). La lignina es un polímero que forma parte de la pared celular de las plantas y se conforma de unidades no repetitivas de fenilpropanoide ligadas por varios enlaces C-C, con una estructura muy semejante a la de los Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs); su alta complejidad, estabilidad e irregularidad implica que las enzimas que le degradan, posean la habilidad de oxidar inespecíficamente sustratos de alto potencial de oxido-reducción.

Por tanto, las Enzimas Modificadoras de Lignina (EML) pueden degradar varios compuestos de estructura polifenólica semejante a la lignina como los colorantes sintéticos y otros compuestos persistentes (Pointing, 2001; Swamy y Ramsay, 1999; Van Aken y Agathos, 2002), lo cual le otorga diversas aplicaciones biotecnológicas como la biorremediación (Bumpus y Aust, 1987) y el blanqueo tanto de la pulpa para papel (Camarero *et al.*, 2007) como de prendas textiles en la etapa del acabado (Doshi y Shelke, 2001).

## ENZIMAS MODIFICADORAS DE LIGNINA (EML)

Las Enzimas Modificadoras De Lignina (EML) de los HPB son principalmente tres oxidoreductasas: una fenoloxidasas y dos peroxidadasas; Lacasa (LAC), Manganese Peroxidasa (MnP) y Lignin-peroxidadasas (LiP), respectivamente. LiP y MnP requieren de un suministro constante de peróxido de hidrógeno, por lo que enzimas auxiliares como

Glioxal Oxidasa y Superóxido Dismutasa son necesarias. Algunos hongos producen las tres enzimas ligninolíticas mientras que otros sólo pueden sintetizar una (Glenn y Gold, 1983; Wesenberg, 2003).

Los HPB producen las EML durante su metabolismo secundario (idiofase), que según la teoría, es la fase de stress celular inducida por el nivel limitado de la fuente de Carbono o Nitrógeno, el cual puede ser simulado a escala laboratorio (Wesenberg, 2003). Las EML son capaces de iniciar, más no de dirigir el proceso denominado "Combustión enzimática" que activa al compuesto polifenólico para que supere la barrera energética e inicie una fragmentación termodinámicamente favorecida (Kirk y Farrell, 1987).

Las EML catalizan la oxidación del IC mediante abstracción de cuatro electrones para reducir del oxígeno molecular a agua y producir isatina. A partir de allí sigue una secuencia de reacciones de hidrólisis sin mediación de la enzima. La isatina se oxida y forma el ácido isático, que es inestable y se descarboxila espontáneamente produciendo ácido antranílico como producto final de degradación. Varios factores pueden influir en la velocidad global de la degradación enzimática de índigo tales como los fenómenos de adsorción, las limitaciones de transporte, la accesibilidad y el potencial redox de la enzima y el sustrato (Balan y Monteiro, 2001; Campos, Kandelbauer, Robra, Cavaco-Paulo, y Gübitz, 2001). A continuación, se describen las principales enzimas ligninolíticas implicadas en la degradación del IC.

### Peroxidasas

Son enzimas que utilizan peróxido de hidrógeno para catalizar la oxidación de una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos. La gran mayoría tiene un grupo protoporfirina IX (hemo b) como grupo prostético, el cual consta de un  $\text{Fe}^{2+}$  pentacoordinado a 4 Nitrógenos pirrólicos y al nitrógeno de la histidina proximal (Conesa, Punt, y van den Hondel, 2002). En la figura 4 se ilustra su ciclo catalítico.

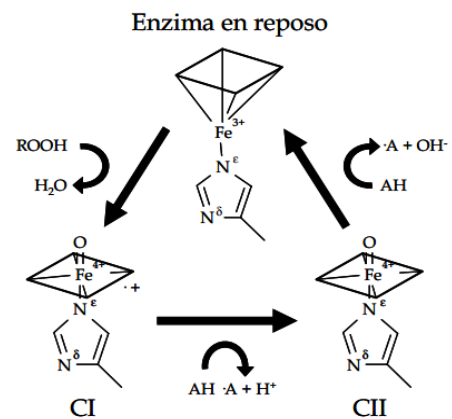


Fig. 3. Ciclo catalítico de las peroxididasas (Rodríguez Sánchez, 2006).

Las diferentes peroxididasas difieren en la naturaleza del sustrato de reducción, como se describe a continuación:

**Manganeso-Peroxidasas:** son las más producidas por los hongos de pudrición blanca. Son glicoproteínas N-Glicosiladas con una protoporfirina de hierro IX (hemo) como grupo prostético, peso molecular entre 32 a 62.5 kDa, y múltiples isoformas, alrededor de 11. Las MnP oxidan  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{3+}$ , catión que sólo degrada compuestos fenólicos porque su potencial redox no es suficientemente elevado para mediar la ruptura de enlaces C $\alpha$ -C $\beta$ .  $\text{Mn}^{3+}$  es inestable en medio acuoso, por ende, es estabilizado con quelantes sintetizados por el mismo hongo como el ácido oxálico o el malónico, y promovido tanto por mediadores nativos  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{3+}$ , como por cooxidantes o mediadores secundarios como los ácidos grasos insaturados (Tween 80...) o los tioles (Glutatión reducido, cisteína...); éstos últimos son secretados por la célula en forma de péptidos durante la lisis celular parcial (Conesa *et al.*, 2002; Paszczyński, Andrzej Crawford y Huynh, 1988; Wesenberg, 2003).

**Lignin-peroxididasas:** su masa molecular está entre 38 y 47 kDa, presenta hasta 19 isoformas y su estructura N-Glicosilada contiene un grupo hemo en el sitio activo. Esta enzima cataliza las escisiones laterales, la ruptura de anillos de compuestos fenólicos, las demetoxilaciones, las cloraciones oxidativas, y la oxidación de compuestos tipo lignina

aromática no fenólica como los dímeros mediante la extracción de un electrón para formar radicales reactivos. Sin embargo, la LiP no es imprescindible para iniciar la oxidación de la lignina; inclusive existen varios HPB que no le excretan. Al igual que las MnP, la actividad de las LiP es promovida por mediadores redox sintetizados por el mismo hongo como 2-cloro-1,4-dimetoxibenceno y alcohol veratrílico (3,4-Dimethoxybenzyl) que acercan sustratos al centro redox de la enzima y le salvaguardan de inactivación por agua oxigenada (Conesa *et al.*, 2002; Van Aken y Agathos, 2002; Wesenberg, 2003).

**Versatil-peroxidadas:** se describió por primera vez en *Pleurotus* y *Bjerkandera*. Esta enzima puede oxidar tanto compuestos aromáticos fenólicos como no fenólicos, por lo que se considera un híbrido entre MnP y LiP; además, es curioso que su pH óptimo difiera de acuerdo al sustrato oxidado, siendo de 5 para Mn<sup>2+</sup> y de 3 para compuestos aromáticos, valores similares a óptimos para MnP y el LiP, respectivamente. Por otro lado, oxida directamente hidroquinonas y fenoles sustituidos que no se oxidan de manera eficiente por MnP y LiP (Martínez, 2002; Wesenberg, 2003).

## FENOLOXIDASAS

### Lacasas

Son enzimas N-Glucosiladas del tipo fenoloxidasas producidas por casi todos los basidiomicetes de pudrición blanca. Su peso molecular está entre 60 a 390 kDa, presentan cuatro átomos de Cu (2+ en estado de reposo) distribuidos en diferentes sitios de unión del sitio activo y se clasifican en tres tipos de acuerdo a sus características específicas. Como se observa en la figura 3, catalizan la oxidación de donantes de hidrógeno aromático, con una consecuente reducción del oxígeno a agua. Algunas se expresan constitutivamente, otras lo hacen por inducción con compuestos aromáticos como ABTS (ácido 2,2-azino-bis- (3-

etilbenzotiazolin-6-sulfónico), HBT (N, N' bis- (1 H -tetrazol-5-il) – hidrazina) y siringaldazina (Wesenberg, 2003; Xiao *et al.*, 2004).

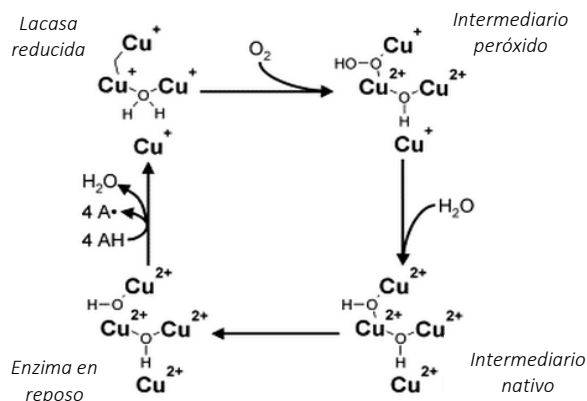


Fig. 4. Ciclo catalítico de las lacasas (Wesenberg, 2003).

## DEGRADACIÓN DE IC POR HPB

Los colorantes se emplearon inicialmente como medidores de actividades fúngica ligninolítica en varios ensayos enzimáticos. Los primeros en reportarlo fueron Glenn y Gold (1983), quienes evaluaron la decoloración de colorantes poliméricos sulfonados utilizando *Phanerochaete chrysosporium*. A partir de allí se empezaron a publicar estudios que evaluaban la capacidad decolorante de varias cepas más. Los primeros en reportar la decoloración de un efluente de la industria química que contenía cromóforos azo fueron Knapp y Newby (1999); luego Wesenberg, Buchon y Agathos Wesenberg, Buchon y Agathos (2002) utilizaron las enzimas ligninolíticas de hongos para tratar efluentes de la industria textil.

En la tabla 2 se enuncian y describen brevemente las principales investigaciones de hongos que se han empleado para degradar el índigo carmín:

**Tabla 2.** Hongos de pudrición blanca que degradan índigo carmín.

Variedad	Descripción	Fuente
<i>Coprinopsis cinérea</i> , <i>Gongronella sp.</i>	Como cocultivo es 900 veces más efectivo que emplearlas por separado. El pH óptimo es de 6,5 a una temperatura de 60°C. Conversión 75-80%	(Pan <i>et al.</i> , 2014)
<i>Corilopsis rigida</i>	Fermentación en estado sólido ex situ con cáscara de cebada y castañas como soporte y sulfato de cobre como inductor. Hubo producción de lacasa y degradación total del IC en 4h.	(Gómez, Pazos, Rodríguez Couto, y Sanromán, 2005)
<i>Trametes hirsuta</i>	Decoloró hasta un 82% el IC inmovilizado en esponja de acero inoxidable, en un bioreactor suplementado con sulfato de cobre.  Inmovilizado del hongo sobre perladura de naranja en bioreactores de cama fija tanto en modo batch como en continuo. En batch decoloró el 100% del IC 100% en 3h y en continuo el 94% en 3 días.  Fermentación en reactores de platos cónicos y de inmersión, empleando las semillas de uva como soporte. El IC se degradó 98% en 20h.	(Rodríguez Couto, Sanromán, Hofer, y Gübitz, 2004)  (Rodríguez Couto, Rosales, y Sanromán, 2006)  (Rodríguez Couto <i>et al.</i> , 2006)
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Lacasa de <i>T. hirsuta</i> fue inmovilizada en perlas de alginato en un bioreactor de transporte aéreo, alcanzando una degradación del IC en un 96%  La cepa creció en estado semisólido sobre cáscaras de melón con xilidina como inductor para producción de lacasa y decoloración del IC hasta más del 95%	(Domínguez, Alberto Rodríguez Couto, Susana Sanromán, 2005)  (Yavuz, Kaya, y Aytekin, 2014)
<i>Phellinus gilvus</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i> , <i>Trametes hirsuta</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Decoloró el índigo un 100% en medio líquido Decoloró el índigo un 94% en medio líquido Decoloró el índigo un 91% en medio líquido Se empleó lacasa aislada del hongos para degradar el IC hasta Ácido antanílico, decolorando hasta un 98% Los residuos de yuca se bioconvirtieron fúngicamente para la producción de MnP en estado sólido. Dicha enzima se empleó para degradación de índigo hasta un 90,18% El hongo en medio líquido decoloró el índigo en un 75%.	(Balan y Monteiro, 2001)   (Campos <i>et al.</i> , 2001))  (H. Li, Zhang, Tang, Zhang, y Mao, 2015)  (Balan y Monteiro, 2001)
<i>Piptoporus betulinus</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Trametes (Coriolus) versicolor</i>	Mayor decoloración, hasta el 100% con dos días más de actividad. El hongo en medio líquido logra decoloración del IC del 100%. El hongo en medio líquido logra decoloración del IC del 99%. El hongo en medio líquido logra decoloración del IC del 100%.	(Knapp, Newby, y Reece, 1995)  (Knapp <i>et al.</i> , 1995)

## CONCLUSIÓN

Los hongos de pudrición blanca son microorganismos que cuentan con un sistema enzimático inespecífico capaz de degradar compuestos de estructura polifenólica como los colorantes sintéticos, lo que constituye una alternativa potencial para el tratamiento de efluentes textiles contaminados con índigo carmín y para el proceso de decoloración del

denim, evitando así el uso de químicos persistentes. Las investigaciones realizadas corroboran la actividad enzimática de los hongos de pudrición blanca, pero no solucionan el problema de contaminación de cuerpos de agua por índigo carmín porque se limitan a la escala laboratorio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.-H., Cavaco-Paulo, A., & Gubitz, G. M. (2000). Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3357–3362. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3357-3362.2000>
- Additifs. (2015). Indigotine, Carmin(e) d'indigo. Toxicite. Recuperado a partir de [http://www.additifs-alimentaires.net/E132.php?src\\_reg&nostat#a\\_src](http://www.additifs-alimentaires.net/E132.php?src_reg&nostat#a_src)
- Association pour la Recherche Thérapeutique Anti-Cancéreuse (ARTAC). (2011). *Classification de l'ARTAC des additifs alimentaires selon leur risque potentiellement ou certainement cancérigène*. Recuperado a partir de [http://www.artac.info/fic\\_bdd/pdf\\_fr\\_fichier/Classification\\_des\\_additifs\\_13299194710.pdf](http://www.artac.info/fic_bdd/pdf_fr_fichier/Classification_des_additifs_13299194710.pdf)
- Balan, D. S. L., & Monteiro, R. T. R. (2001). Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. *Journal of Biotechnology*, 89(2), 141–145. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00304-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00304-2)
- Barka, N., Assabane, A., Nounah, A., & Ichou, Y. A. (2008). Photocatalytic degradation of indigo carmine in aqueous solution by TiO<sub>2</sub>-coated non-woven fibres. *Journal of Hazardous Materials*, 152(3), 1054–1059. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.080>
- Božič, M., & Kokol, V. (2008). Ecological alternatives to the reduction and oxidation processes in dyeing with vat and sulphur dyes. *Dyes and Pigments*, 76(2), 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2006.05.041>
- Bumpus, J. A., & Aust, S. D. (1987). Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of the lignin degrading system. *BioEssays*, 6(4), 166–170. <https://doi.org/10.1002/bies.950060405>
- Buscio, V., Crespi, M., & Gutiérrez-Bouzán, C. (2015). Sustainable dyeing of denim using indigo dye recovered with polyvinylidene difluoride ultrafiltration membranes. *Journal of Cleaner Production*, 91, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.12.016>
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, Á. T., Romero, J., Gutiérrez, A., & del Río, J. C. (2007). Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1264–1271. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.09.016>
- Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K. ., Cavaco-Paulo, A., & Gübitz, G. . (2001). Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Biotechnology*, 89(2), 131–139. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00303-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00303-0)
- Cho, E.-A., Seo, J., Lee, D.-W., & Pan, J.-G. (2011). Decolorization of indigo carmine by laccase displayed on *Bacillus subtilis* spores. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(1), 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.03.005>
- Conesa, A., Punt, P. J., & van den Hondel, C. A. M. J. J. (2002). Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology*, 93(2), 143–158. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00394-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00394-7)
- Domínguez, Alberto Rodríguez Couto, Susana Sanromán, M. Á. (2005). Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(4), 405–409. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-1763-x>
- Doshi, R., & Shelke, V. (2001). Enzymes in textile industry- An environment-friendly approach. *Indian Journal of Fibre & Textile Research (IJFTR)*, 26(1–2), 202–205. Recuperado a partir de [http://14.139.47.15/bitstream/123456789/24929/1/IJFTR 26%281-2%29 202-205.pdf](http://14.139.47.15/bitstream/123456789/24929/1/IJFTR%2026%281-2%29%202-205.pdf)
- European Food Safety Authority (EFSA). (2015). Scientific Opinion on the safety and efficacy of indigo carmine (E 132) for cats and dogs and ornamental fish. *EFSA Journal*, 13(5), 4108–4123. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4108>
- Flox, C., Ammar, S., Arias, C., Brillas, E., Vargas-Zavala, A. V., & Abdelhedi, R. (2006). Electro-Fenton



- and photoelectro-Fenton degradation of indigo carmine in acidic aqueous medium. *Applied Catalysis B: Environmental*, 67(1), 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2006.04.020>
- Galindo, C., Jacques, P., & Kalt, A. (2001). Photochemical and photocatalytic degradation of an indigoid dye: a case study of acid blue 74 (AB74). *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 141(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(01\)00435-X](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(01)00435-X)
- Gemeay, A. H., Mansour, I. A., El-Sharkawy, R. G., & Zaki, A. B. (2003). Kinetics and mechanism of the heterogeneous catalyzed oxidative degradation of indigo carmine. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 193(1), 109–120. [https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(02\)00477-6](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(02)00477-6)
- Glenn, J. K., & Gold, M. H. (1983). Decolorization of Several Polymeric Dyes by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 45(6), 1741–1747. Recuperado a partir de <http://aem.asm.org/cgi/content/long/45/6/1741>
- Gómez, J., Pazos, M., Rodríguez Couto, S., & Sanromán, M. Á. (2005). Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions. *Journal of Food Engineering*, 68(3), 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.06.005>
- Gregory, P. (2000). Dyes and Dye Intermediates. En *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (pp. 1–66). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471238961.0425051907180507.a01.pub2>
- Harvey, P. J., & Thurston, C. F. (2001). The biochemistry of ligninolytic fungi. En G. M. Gadd (Ed.), *Fungi in Bioremediation* (pp. 27–52). Cambridge: British Mycological Society.
- Husain, Q. (2010). Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 9(2), 117–140. <https://doi.org/10.1007/s11157-009-9184-9>
- Jeffords, D. L., Lance, P. H., & Dewolf, W. C. (1977). Severe hypertensive reaction to indigo carmine. *Urology*, 9(2), 180–181. [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(77\)90192-3](https://doi.org/10.1016/0090-4295(77)90192-3)
- Kirk, K., & Farrell, R. (1987). Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41, 465–505. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002341>
- Knapp, J. ., & Newby, P. . (1999). The decolourisation of a chemical industry effluent by white rot fungi. *Water Research*, 33(2), 575–577. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00243-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00243-7)
- Knapp, J. S., Newby, P. S., & Reece, L. P. (1995). Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(7), 664–668. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00112-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00112-5)
- Kuhad, R. C., Sood, N., Tripathi, K. K., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents. *Advances in Applied Microbiology*, 56, 185–213. Recuperado a partir de <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=16287114>
- Li, H.-X., Xu, B., Tang, L., Zhang, J.-H., & Mao, Z.-G. (2015). Reductive decolorization of indigo carmine dye with *Bacillus* sp. MZS10. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.007>
- Li, H., Zhang, R., Tang, L., Zhang, J., & Mao, Z. (2015). Manganese peroxidase production from cassava residue by *Phanerochaete chrysosporium* in solid state fermentation and its decolorization of indigo carmine. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 23(1), 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2014.11.001>
- Lu, L., Zhao, M., Li, G.-F., Li, J., Wang, T.-N., Li, D.-B., & Xu, T.-F. (2012). Decolorization of synthetic dyes by immobilized spore from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Catalysis Communications*, 26, 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2012.04.024>
- Lu, Y., Li, J., Zhang, X., Tang, J., Wei, B., & Liu, J. (2005). Studies on the mechanism of Indigo Carmine removal by solvent sublation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 292(1), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.05.046>
- Maga, J., & Tu, A. (1995). *Food additive toxicology*. New York: Marcel Dekker, Inc.

- Martínez, A. T. (2002). Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4), 425–444. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00521-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00521-X)
- Othman, I., Mohamed, R. M., & Ibrahim, F. M. (2007). Study of photocatalytic oxidation of indigo carmine dye on Mn-supported TiO<sub>2</sub>. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 189(1), 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.01.010>
- Palma-Goyes, R. E., Silva-Agredo, J., González, I., & Torres-Palma, R. A. (2014). Comparative degradation of indigo carmine by electrochemical oxidation and advanced oxidation processes. *Electrochimica Acta*, 140, 427–433. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.06.096>
- Pan, K., Zhao, N., Yin, Q., Zhang, T., Xu, X., Fang, W., ... Xiao, Y. (2014). Induction of a laccase Lcc9 from *Coprinopsis cinerea* by fungal coculture and its application on indigo dye decolorization. *Bioresource Technology*, 162, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.116>
- Paszczyński, Andrzej Crawford, R. L., & Huynh, V.-B. (1988). Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Methods in enzymology*, 161, 264–270.
- Pointing, S. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1), 20–33. <https://doi.org/10.1007/s002530100745>
- Prado, A. G. ., Torres, J. D., Faria, E. A., & Dias, S. C. . (2004). Comparative adsorption studies of indigo carmine dye on chitin and chitosan. *Journal of Colloid and Interface Science*, 277(1), 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.04.056>
- Qu, R., Xu, B., Meng, L., Wang, L., & Wang, Z. (2015). Ozonation of indigo enhanced by carboxylated carbon nanotubes: Performance optimization, degradation products, reaction mechanism and toxicity evaluation. *Water Research*, 68, 316–327. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.017>
- Quintero, L., & Cardona, S. (2010). Índigo Carmín technologies for the decolorization of dyes : indigo and indigo carmine. *Dyna*, 77, 371–386.
- Ramesh, T. N., Kirana, D. V., Ashwini, A., & Manasa, T. R. (2015). Calcium hydroxide as low cost adsorbent for the effective removal of indigo carmine dye in water. *Journal of Saudi Chemical Society, In press*. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2015.03.001>
- Ramya, M., Anusha, B., & Kalavathy, S. (2008). Decolorization and biodegradation of Indigo carmine by a textile soil isolate *Paenibacillus larvae*. *Biodegradation*, 19(2), 283–291. Recuperado a partir de <http://link.springer.com/article/10.1007/s10532-007-9134-6>
- Rodríguez Sánchez, E. (2006). *Caracterización molecular de lacasas de Pleurotus eryngii: expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromáticos*. Universidad Complutense de Madrid.
- Rodríguez Couto, S., Rosales, E., & Sanromán, M. Á. (2006). Decolourization of synthetic dyes by *Trametes hirsuta* in expanded-bed reactors. *Chemosphere*, 62(9), 1558–1563. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.06.042>
- Rodríguez Couto, S., Sanromán, M. Á., Hofer, D., & Gübitz, G. . (2004). Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. *Bioresource Technology*, 95(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.05.002>
- Roessler, A., Crettenand, D., Dossenbach, O., Marte, W., & Rys, P. (2002). Direct electrochemical reduction of indigo. *Electrochimica Acta*, 47(12), 1989–1995. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(02\)00028-2](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(02)00028-2)
- Schoeberl, P., Brik, M., Braun, R., & Fuchs, W. (2005). Treatment and recycling of textile wastewater —case study and development of a recycling concept. *Desalination*, 171(2), 173–183. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2004.02.105>
- Singh, G., Capalash, N., Goel, R., & Sharma, P. (2007). A pH-stable laccase from alkali-tolerant  $\gamma$ -

- proteobacterium JB: Purification, characterization and indigo carmine degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6), 794–799. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.07.001>
- Swamy, J., & Ramsay, J. . (1999). The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3), 130–137. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00105-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00105-7)
- Talarposhti, A. M., Donnelly, T., & Anderson, G. K. (2001). Colour removal from a simulated dye wastewater using a two-phase Anaerobic packed bed reactor. *Water Research*, 35(2), 425–432. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00280-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00280-3)
- Teng, M., Li, F., Zhang, B., & Taha, A. A. (2011). Electrospun cyclodextrin-functionalized mesoporous polyvinyl alcohol/SiO<sub>2</sub> nanofiber membranes as a highly efficient adsorbent for indigo carmine dye. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 385(1), 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.06.020>
- U. S. Government Publishing Office. (2016). Tittle 21. Chapter I. Subchapter A. Part 74: Listing of color additives subject to certificación. En *Electronic code of federal regulations (ECFR)*.
- U.S. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION (FDA). (2015). Summary of Color Additives for Use in the United States in Foods, Drugs, Cosmetics, and Medical Devices. Recuperado a partir de <http://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/ColorAdditiveInventories/ucm115641.htm>
- Unlu, M., Yukseler, H., & Yetis, U. (2009). Indigo dyeing wastewater reclamation by membrane-based filtration and coagulation processes. *Desalination*, 240(1–3), 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.02.026>
- Van Aken, B., & Agathos, S. N. (2002). Implication of manganese (III), oxalate, and oxygen in the degradation of nitroaromatic compounds by manganese peroxidase (MnP). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(3), 345–351. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0888-1>
- Vautier, M., Guillard, C., & Herrmann, J.-M. (2001). Photocatalytic Degradation of Dyes in Water: Case Study of Indigo and of Indigo Carmine. *Journal of Catalysis*, 201(1), 46–59. <https://doi.org/10.1006/jcat.2001.3232>
- Wesenberg, D. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22(1–2), 161–187. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.08.011>
- Wesenberg, D., Buchon, F., & Agathos, S. N. (2002). Degradation of dye-containing textile effluent by the agaric white-rot fungus *Clitocybula dusenii*. *Biotechnology Letters*, 24(12), 989–993. <https://doi.org/10.1023/A:1015660927710>
- Xiao, Y. Z., Chen, Q., J., H., Shi, Y. Y., Wu, J., Hong, Y. Z., & Wang, Y. P. (2004). Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. *Mycologia*, 96(1), 26–35. Recuperado a partir de <http://www.mycologia.org/content/96/1/26.short>
- Yavuz, M., Kaya, G., & Aytakin, Ç. (2014). Using *Ceriporiopsis subvermispora* CZ-3 laccase for indigo carmine decolorization and denim bleaching. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.014>
- Yoshida, O., Harada, T., Miyagawa, M., & Kato, T. (1971). Bladder cancer in workers of the dyeing industry. *Igaku No Ayumi*, 79, 421–422.
- Zaied, M., Chutet, E., Peulon, S., Bellakhal, N., Desmazières, B., Dachraoui, M., & Chaussé, A. (2011). Spontaneous oxidative degradation of indigo carmine by thin films of birnessite electrodeposited onto SnO<sub>2</sub>. *Applied Catalysis B: Environmental*, 107(1), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2011.06.035>
- Zollinger, H. (2003). *Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments* (3<sup>a</sup> ed.). Zürich: Wiley-VCH.