



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

VALÉRIA FERREIRA DA SILVA COSTA SANTANA

DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ÍNDIGO CARMIM POR AGARICOMYCETES
COLETADOS NO NORTE E NORDESTE DO BRASIL

Recife

2022

VALÉRIA FERREIRA DA SILVA COSTA SANTANA

**DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ÍNDIGO CARMIM POR AGARICOMYCETES
COLETADOS NO NORTE E NORDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Biologia de Fungos.

Área de concentração: Micologia Aplicada

Orientadora: Norma Buarque de Gusmão

Coorientadoras: Leonor Alves de Oliveira da Silva e Tatiana Baptista Gibertoni

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Santana, Valéria Ferreira da Silva Costa.

Descoloração do corante índigo carmim por agaricomycetes coletados no norte e nordeste do Brasil. /
Valéria Ferreira da Silva Costa Santana. – 2022.

74 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Norma Buarque de Gusmão.

Coorientadora: Leonor Alves de Oliveira da Silva.

Coorientadora: Tatiana Baptista Gibertoni.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de fungos, 2022.

Inclui referências.

1. Basidiomycota. 2. Remediação. 3. Corante. 4. Indústria têxtil. I. Gusmão, Norma Buarque de. (Orient.). II. Silva, Leonor Alves de Oliveira da. (Coorient.). III. Gibertoni, Tatiana Baptista. (Coorient.). IV. Título.

VALÉRIA FERREIRA DA SILVA COSTA SANTANA

**DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ÍNDIGO CARMIM POR AGARICOMYCETES
COLETADOS NO NORTE E NORDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 01/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Norma Buarque de Gusmão (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª Cristina Maria de Souza Motta (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Keila Aparecida Moreira (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^º. Dr. Nelson Lima (Examinador Externo)
Universidade do Minho

Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Mendonça de Miranda (Examinadora Externa)
Universidade Ceuma

Dedico a Katarine, Kelvin e Chloe
que não me permitiram parar;
A Aurora Maria, sol de meus dias,
que me instiga a continuar...

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão vai primeiramente aos amigos da Espiritualidade Maior, por me dar forças e, por muitas vezes me carregarem, quando estas me faltavam. Às inspirações, os sussurros de encorajamento e persistência, quando pensava que não seria capaz, eterna gratidão!

À minha Mainha e minha irmã Sandra pelos momentos e os almoços; aos meus filhos, estimulante de todos os dias, nas inúmeras vezes que pensei em desistir, eles foram meu arrimo. À Aurora Maria que, chegou sorrateiramente, no momento certo para alegrar e colorir meus dias!

Aos colegas do Lab. I (Zygomycota): Catarina, Diogo, Rafael, Rejane, Thalline por inúmeras vezes me cederem espaço e equipamentos, além de compartilhar cafés e conversas que muito motivaram meus dias. À Laureana do Labiotec pelos inúmeros dias de compartilhamento do espaço do laboratório, conversas e sucos de laranja. Aos colegas do LAMAI que, direta ou indiretamente contribuíram à realização desse trabalho.

Aos amigos do Lab B (Basidiomycota) que, literalmente, me adotaram, cedendo espaço no Lab e emprestando os ouvidos às minhas infundáveis conversas. Angelina, João Ribamar, Renata, Renato, Vitor, Virton; pelas conversas frutíferas, pelos cafés e pelo companheirismo, meus mais sinceros agradecimentos.

À minha orientadora Prf^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão e a Co-orientação de Leonor Alves de Oliveira, ambas contribuíram significativamente para concretização de mais essa etapa de minha vida acadêmica.

A co-"orientadora" Prof^a. Dr^a. Tatiana Baptista Gibertoni que me concedeu a oportunidade de conhecer e participar de um mundo que eu desconhecia: o da pesquisa; meu carinho e minha gratidão, pela confiança e pelos "puxões de orelha!"

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Centro de Biociências e o Departamento de Micologia pelo espaço concedido e todo suporte acadêmico que possibilitou a conclusão do trabalho e minha formação.

Aos órgãos de fomento, sem o apoio financeiro não seria possível a concretização desse trabalho: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo À Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a PROPESQ pelo financiamento da pesquisa.

“É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir.”

Almir Sater e Renato Teixeira

“Não mudaria nada! pois todo o trajeto percorrido me trouxe até esse momento.”

A autora

RESUMO

A micorremediação surge como alternativa para minimizar a poluição causada por compostos recalcitrantes descartados no ambiente (solo e água). Considerando o potencial de representantes de Agaricomycetes na degradação e mineralização da lignina, este trabalho teve por objetivo identificar linhagens promissoras à utilização em processos de remoção do corante índigo carmim utilizado na coloração do denim e detectar a produção de enzimas ligninolíticas, lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase em espécies de Agaricomycetes coletadas no Norte e Nordeste do Brasil, tendo em vista a escassez de conhecimento sobre espécies tropicais do Brasil. Cento e quarenta e cinco espécimes foram utilizados para o cultivo. O teste de Bavendamm selecionou as linhagens produtoras das fenoloxidasas. Dez espécimes foram selecionados e utilizados em ensaios de descoloração do índigo carmim. Os testes ocorreram em caldo Kirk, sem esterilização a $\pm 28^{\circ}\text{C}$ sob condição estática, durante 5 dias. Testes de detecção para as enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase foram realizados de acordo com protocolo para cada enzima. Os percentuais de descoloração variaram entre 56% a 96%, sendo os mais significativos para as linhagens de *Trametes*: *T. lactinea* URM 8350 (81%), *T. lactinea* URM 8354 (85%) e *T. villosa* URM 8022 (96%). *Polyporus philippinensis* URM 87927 e *Polyporus* aff. *thailandensis* URM 8351 apresentaram percentuais de descoloração de 78% e 72% e, provavelmente, são os primeiros estudos dessas espécies em testes de descoloração. Atividade da lacase e manganês peroxidase foi detectada nas linhagens de *Pleurotus djamor* URM 8113, *Schizophyllum commune* URM 8549, *T. lactinea* URM 8350, *T. lactinea* URM 8354 e *T. villosa* URM 8022. A lignina peroxidase foi detectada apenas em *Perenniporia centrali-africana*. Os resultados obtidos evidenciam a importância de estudos de triagem para identificar linhagens promissoras, possibilitando a aplicação em processos de biorremediação e biotecnologia. Entretanto, a continuidade e o desenvolvimento de novas pesquisas permitirão compreender a fisiologia e os mecanismos enzimáticos de cada linhagem.

Palavras-chave: Basidiomycota; Remediação; Corante; Indústria têxtil.

ABSTRACT

Mycoremediation emerges as an alternative to minimize pollution caused by recalcitrant compounds discarded in the environment, mainly in water. Considering the potential of representatives of Agaricomycetes in the degradation and mineralization of lignin, this work aimed to identify promising strains for use in processes for removing the indigo carmine dye used in denim staining and to detect the production of ligninolytic enzymes laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase in Agaricomycetes species collected in Northeast Brazil, given the scarcity of knowledge about tropical species in Northeast Brazil. One hundred and forty-five specimens were used for cultivation. The Bavendamm test was used to detect the production of phenoloxidases. Ten specimens were selected and used in indigo carmine bleaching assays. The tests took place in non-sterile Kirk broth at $\pm 28^{\circ}\text{C}$ under static condition for 5 days. Detection tests for laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase enzymes were performed according to the protocol for each enzyme. The discoloration percentages ranged from 56% to 96%, being the most significant for the *Trametes* strains: *T. lactinea* URM 8350 (81%), *T. lactinea* URM 8354 (85%) and *T. villosa* URM 8022 (96%). *Polyporus philippinensis* URM 87927 and *Polyporus* aff. *thailandensis* URM 8351 showed discoloration percentages of 78% and 72% and are probably the first reports in discoloration tests. Laccase and manganese peroxidase activity was detected in *Pleurotus djamor* URM 8113, *Schizophyllum commune* URM 8549, *T. lactinea* URM 8350, *T. lactinea* URM 8354 and *T. villosa* URM 8022 strains. Lignin peroxidase was detected only in *Perenniporia centrali-africana*. The results obtained show the importance of screening studies to identify promising strains, enabling their application in bioremediation and biotechnology processes. However, the continuity and development of new research will allow understanding the physiology and enzymatic mechanisms of each promising strain.

Keywords: Basidiomycota; Remediation; Dye; Textile industry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura molecular do índigo carmim.....	22
Figura 2 – Processo de redução do corante a cuba com ditionito de sódio	23
Figura 3 – Esquema da fórmula estrutural da lignina	37
Figura 4 – Verso e reverso da formação do halo de detecção à produção fenoloxidasas: a URM 8020; b URM 8113 e c URM 8350	46
Figura 5 – <i>Pleurotus djamor</i> : a: detecção de fenoloxidasas em meio ácido tânico; b: crescimento em placa com índigo carmim; c: formação de halo em ácido gálico.....	49
Figura 6 – Descoloração em meio líquido por <i>Trametes villosa</i> URM 8022 em 5 dias de experimento em condição estática	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Espécies de Agaricomycetes depositadas na Micoteca URM e as sequências geradas de ITS e LSU depositadas no GenBank.....	43
Tabela 2 — Detecção de presença de fenoloxidasas; (IE) índice enzimático	45
Tabela 3 — Percentual de descoloração do índigo carmim em meio líquido por 5 dias.....	47
Tabela 4 — Detecção de lacase (Lac), lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase MnP).....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IE Índice enzimático

MEA Meio extrato de malte

Lac Lacase

LiP Lignina peroxidase

MnP Manganês peroxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 OBJETIVOS	16
1.1.1 Objetivo Geral.....	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 INDÚSTRIA TÊXTIL NO BRASIL	17
2.2 CORANTE ÍNDIGO CARMIN	20
2.3 AGARICOMYCETES: DESCOLORAÇÃO DE CORANTES EM EFLUENTES. 24	
2.3.1 Agaricomycetes e atuação na degradação de compostos vegetais	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 FUNGOS UTILIZADOS.	40
3.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS.	40
3.2.1 Testes qualitativos de detecção de fenoloxidasas.....	41
3.2.2 Ensaios de descoloração do índigo carmin em meio líquido	41
3.2.3 Ensaio quantitativo de detecção das enzimas Lac, LiP e MnP em caldo Kirk modificado	42
3.3 DETECÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE	42
3.3.1.Detecção da atividade enzimática de lignina-peroxidase	42
3.3.2 Detecção da atividade enzimática de manganês-peroxidase.....	43
4 RESULTADOS.....	43
4.1 FUNGOS UTILIZADOS	43
4.2 TESTES QUALITATIVO DE DETECÇÃO DE FENOLOXIDASAS.	44
4.3 ENSAIOS DE DESCOLORAÇÃO DO ÍNDIGO CARMIM EM MEIO SÓLIDO E LÍQUIDO.....	46
4.3.1 Gênero <i>Datronia</i>.....	47
4.3.2 Gênero <i>Polyporus</i>.....	48
4.3.3 Gênero <i>Pleurotus</i>.....	49

4.3.4 Gênero <i>Phlebia</i>.....	49
4.3.5 Gênero <i>Perenniporia</i>.....	50
4.3.6 Gênero <i>Schizophyllum</i>.....	50
4.3.7 Gênero <i>Trametes</i>.....	51
4.4 ENSAIO QUANTITATIVO DE DETECÇÃO DA LAC, LIP E MNP EM MEIO LÍQUIDO.....	52
5 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS.....	56
APÊNDICE A – ARTIGO	68

1 INTRODUÇÃO

As águas poluídas e/ou contaminadas provenientes de efluentes têxteis prejudicam o meio ambiente, compromete a fauna, a flora e a microbiota existentes nesses espaços. Estima-se que nessas águas estejam presentes mais de 2.000 diferentes componentes químicos abrasivos e recalcitrantes, além de corantes e outras substâncias auxiliares de tingimento (SPINA et al. 2014; SEN et al. 2016; SAMSAMI et al. 2020; DE OLIVEIRA et al. 2021; XIAO et al. 2022). A coloração das águas residuais decorrentes de atividades da indústria têxtil é considerada um dos fatores agravantes de poluição ambiental, pois dificulta a incidência dos raios solares, essenciais à fotossíntese da flora aquática, bem como a solubilidade dos gases em ecossistemas aquáticos (KUNZ et al. 2002; IRSHAD & ASGHER, 2011; SAMSAMI et al. 2020).

Os corantes são compostos que apresentam características recalcitrantes, altamente tóxicas, de difícil degradação além de propriedades mutagênicas e carcinogênicas, sendo considerados um dos maiores poluentes de corpos d'água, causando graves problemas ambientais (ULSON et al. 2010; OZDEMIR et al. 2013; SEN et al. 2016; BERRADI et al. 2019; CHOWDHURY et al. 2020). Dentre esses, o corante índigo carmim é uma substância de coloração azul amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, papel, celulose, na área médica, cosméticos, na fabricação de fibras funcionais, polímeros, semicondutores, sensores e na têxtil, no tingimento do denim (CHOI, 2021).

Em Pernambuco, a concentração do polo de confecção de roupas em conjunto com o setor de produção e customização, situado nas cidades de Caruaru, Toritama, Riacho das Almas e Santa Cruz do Capibaribe, é responsável pela produção de efluentes poluentes que são despejados nos principais rios da região, Capibaribe e Ipojuca. De acordo com o relatório de monitoramento de bacias hidrográficas do estado de Pernambuco (CPRH, 2020), a qualidade das águas desses rios está comprometida por vários fatores, sendo um deles, a poluição e contaminação, causada pelo despejo de efluentes altamente carregados de corantes sintéticos proveniente, principalmente, do tingimento do jeans. Os rios Ipojuca e Capibaribe estão entre os 10 rios mais poluídos do Brasil, ocupando o terceiro e sétimo lugar, respectivamente, devido, em grande parte, ao despejo de efluentes têxteis de lavanderias (IBGE, 2015; CPRH, 2020). O setor de acabamento da

indústria da moda é um dos que mais agrega valor econômico ao produto, atraindo o consumidor pelas cores provenientes dos processos de customização. Entretanto, também é responsável pelo grande volume de águas residuais geradas nas etapas de tingimento. Grande parte dos corantes (50%) utilizados para o tingimento não aderem à fibra e permanecem nas águas residuais como poluentes (PINNEDO-RIVILLA & COLLADO, 2009; BENKHAYA et al. 2020).

Os métodos de tratamento de descoloração das águas residuais, quando utilizados, além de elevar o custo às lavanderias podem deixar resíduos contaminantes mais tóxicos que o material inicial. Dessa maneira, se faz necessário encontrar formas alternativas que tornem o processo de tratamento barato e ecologicamente viável.

A micorremediação surge como uma das alternativas para o tratamento de descoloração de corantes e efluentes têxteis, sendo considerada uma alternativa biológica econômica, ecológica e eficaz para minimizar a poluição das águas como também do solo (SINGH, 2017; AKHTAR & MANNAN, 2020; XIAO et al. 2022).

Características peculiares aos fungos indicam esses microrganismos como prováveis ferramentas biológicas, a serem utilizados na restauração de áreas impactadas por materiais poluentes. Espécies fúngicas são abundantes na natureza e podem ser encontradas em diversos ecossistemas e nas mais inusitadas condições, tais como variações de faixas de pH e de temperatura, sendo adaptáveis e resistentes (PEREIRA & FREITAS, 2012; RODRÍGUEZ-COUTO, 2017). Devido à plasticidade do sistema enzimático, apresentam inespecificidade ao substrato, e, podem atuar na decomposição ou mineralização de compostos recalcitrantes (WESENBERG, 2003; ASGHER et al. 2008; RODRÍGUEZ-COUTO, 2017). Sendo assim, podem ser usados para a remediação *in situ* de vários poluentes, como corantes, herbicidas, fármacos e efluentes gerados pelo setor industrial (SINGH, 2017; AKHTAR & MANNAN, 2020).

A maioria dos fungos conhecidos como causadores de podridão branca pertence à classe Agaricomycetes do filo Basidiomycota. Dentre as principais características apresentadas pelo filo estão a formação de basídios e basidiosporos, esporos de origem sexuada que, nos Agaricomycetes, são produzidos em estrutura macroscópica denominada basidioma. Conhecidos popularmente como cogumelos, orelhas-de-pau, entre outros, várias espécies de Agaricomycetes atuam ativamente nos ecossistemas, podendo apresentar-se como sapróbias, ectomicorrizas ou

parasitas de plantas lenhosas (HIBBETT et al. 2014). Muitos trabalhos relatam o potencial dessas espécies para utilização em testes de degradação de compostos recalcitrantes através da atuação em mecanismos de produção de enzimas degradativas (WESENBERG et al. 2003; GIANFREDI & RAO, 2004; SEN et al. 2016; RODRIGUEZ-COUTO, 2017; SINGH, 2017; AKHTAR & MANNAN, 2020; XIAO et al. 2022; RATHI & KUMAR, 2022).

Conhecer linhagens promissoras e compreender sua fisiologia e os mecanismos que regulam a produção de enzimas nas espécies é de primordial importância à utilização em processos de biorremediação, principalmente nos de descoloração de corantes sintéticos (SOUZA & ROSADO, 2009; DASHTBAN et al. 2010; SRINIVASAN et al. 2010; BARRETO et al. 2011; PAVKO, 2011; CHANDER et al. 2014; SEN et al. 2016; LEGERSKÁ et al. 2016; SINGH, 2017; BERRADI et al. 2019; SAMSAMI et al. 2020).

Apesar dos diversos estudos sobre o tema serem recorrentes no mundo (XIAO et al. 2022), no Brasil e principalmente no Nordeste, estudos sobre potencial enzimático de espécies coletadas nessa região são escassos. Diante da diversidade de espécies fúngicas existentes em ambientes tropicais e ainda inexploradas, se faz urgente preencher uma lacuna importante sobre o potencial enzimático de linhagens a serem utilizadas em processos biotecnológicos. Portanto, testar a capacidade de descoloração do índigo carmim utilizado no segmento têxtil e detectar a produção enzimática em espécies de Agaricomycetes coletadas no Norte e Nordeste do Brasil é objetivo principal do atual estudo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Detectar a produção de enzimas ligninolíticas de espécies de Agaricomycetes coletadas no Norte e Nordeste do Brasil e seu potencial na descoloração do corante índigo carmim.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a. Selecionar espécies de Agaricomycetes coletadas no Norte e Nordeste do Brasil e depositadas no Banco de Fragmentos de Basidiomas (BDNA) do Departamento de Micologia;
- b. Avaliar os cultivos obtidos do BDNA da Micoteca URM quanto à capacidade em produzir lacase, lignina-peroxidase e manganês-peroxidase;
- c. Avaliar o tempo de produção enzimática nas espécies cultivadas;
- d. Avaliar o potencial de descoloração do corante índigo-carmim das espécies selecionadas;
- e. Incrementar o acervo da Micoteca URM com o depósito de culturas de Agaricomycetes obtidos do BDNA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 INDÚSTRIA TÊXTIL NO BRASIL

O desenvolvimento populacional proporcionou a aceleração na economia em seus mais diversos setores, principalmente os considerados essenciais, como os de alimentação e vestuário. Mundialmente, a busca por produtos industrializados fez com que o segmento industrial confeccionasse produtos cada vez mais atrativos ao consumo, diversificando textura, formatos e cores. Setores como o têxtil, eletrônico, alimentício, dentre outros, se superaram na atualização de seus materiais. Com isso, o consumo de produtos aumentou e o descarte de materiais no meio ambiente cresceu na mesma proporção (SILVA et al. 2012; DA SILVEIRA et al. 2016; DESHMUKH et al. 2016; DE OLIVEIRA et al. 2021).

Um dos segmentos industriais que mais se consolidou, e cujo crescimento é expressivo e sempre ascendente, foi a indústria da moda, que se empenha na produção e customização de peças coloridas, sendo as de cores intensas, as mais atrativas ao consumidor. A indústria têxtil é considerada uma das categorias industriais mais tradicionais mundialmente e de grande importância para manutenção de uma das necessidades básicas do ser humano, o vestir-se. Entretanto, o seguimento também ocupa lugar de destaque na emissão de gases poluentes, que vai desde a produção de matéria prima, o alto consumo de água até o descarte de grandes volumes de efluentes em corpos d'água, além da poluição do

solo e comprometimento da biota aquática dos rios e, conseqüentemente, do homem (COUTO, 2009; EL ENSHASY et al. 2017; KHAN e MALIK, 2018; LELLIS et al 2019; DE OLIVEIRA et al. 2021).

O setor têxtil teve a sua ascensão no início do século XVIII, há mais de 200 anos, em meados de 1780 e coincidiu com o início da Revolução Industrial que ocorreu na Inglaterra. Nessa época, o setor têxtil se concentrava na região britânica e dois principais pólos disputavam pelo mercado (EUA e Inglaterra). Entretanto, devido ao acesso a equipamentos de produção, outros países também passaram a disputar o mercado. A Grã-Bretanha foi um dos primeiros países a se empenhar para dominar o segmento têxtil da indústria (FCEM, 2019). No mundo, o ramo emprega cerca de 75 milhões de pessoas e é responsável por 8 a 10% das emissões globais de gases de efeito estufa; é responsável por cerca de 20% da poluição por águas residuais em todo o mundo e tem uma perda de US\$ 500 bilhões a cada ano devido às roupas subutilizadas e a falta de reciclagem (DE OLIVEIRA et al. 2021). No Brasil, o setor é responsável por gerar 1,36 milhões de empregos diretos, dos quais 60% se referem à mão de obra feminina, sendo considerado o segundo setor empregatício na indústria de transformação, perdendo apenas para os setores de alimentos e de bebidas. Em 2020, a produção e empregabilidade do setor representaram 19,8% do total de trabalhadores alocados na produção industrial e 5% do valor total da produção da indústria brasileira de transformação, acumulando um faturamento de R\$161 bilhões (IEMI, 2021). Apontado como a maior cadeia têxtil do ocidente e estão entre os cinco maiores consumidores e produtores de índigo no mundo, sendo o quarto produtor de malhas no mundo. No Brasil há, aproximadamente, 24,6 mil unidades produtivas formais em todo o país responsáveis por 1,91 milhões de toneladas de produtos. O Brasil detém aproximadamente 50 faculdades de moda espalhadas em 11 estados, responsável por apresentar uma das cinco maiores “Semanas de Moda” do mundo, evento importante da área (ABIT, 2020).

Embora o processo de industrialização de produtos tenha contribuído à formação dos centros urbanos e geração de empregos diretos e indiretos, também acelerou a transformação do meio ambiente, ocasionando danos, muitas vezes, irreversíveis. O segmento têxtil contribui significativamente à poluição do meio ambiente, desde a produção do algodão, com o uso de pesticidas, até a geração de retalhos que são descartados de forma inadequada (DE OLIVEIRA et al. 2021).

Entretanto, as etapas de lavagem e tingimento são as que diretamente causam danos visíveis ao meio ambiente devido a geração de grandes quantidades de efluentes contendo alta carga de compostos poluentes coloridos (SILVA et al. 2012; BERRADI et al. 2019).

No Brasil, a região Nordeste abriga o segundo maior pólo de confecções do país, compreendido entre os estados da Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. No estado de Pernambuco, os municípios de Caruaru, Santa Cruz do Capibaribe, Toritama e Riacho das Almas, localizados na mesorregião do agreste pernambucano produzem e customizam denim (jeans), sendo a principal atividade econômica da região responsável pelo desenvolvimento local (SANTOS et al. 2013; ABIT, 2020).

O denim é uma das peças mais utilizadas no mundo. O tecido de algodão sarjado de coloração azul índigo, conhecido popularmente como “jeans”, foi muito utilizado pelos marinheiros genoveses no século XVII e como roupa de trabalho na Nova Inglaterra no século XIX. Entretanto, foi em meados do século XX que o jeans se tornou um artigo melhorado e requisitado pela moda vigente (GORINI, 1999; GONDIM et al. 2008).

Antes disso, o jeans era comercializado sem lavagem e engomado. A goma utilizada deixava o produto rijo, sem maleabilidade, causando desconforto ao usuário. Somente após sucessivas lavagens, o tecido amolecia. Nesse momento, surgem as lavanderias industriais que passaram a tratar o tecido, tornando-o uma vestimenta confortável ao vestir (GONDIM et al. 2008). Esse tratamento envolve várias etapas, dentre as quais estão as de tingimento e lavagem, consideradas as principais responsáveis pela produção de efluentes com elevada concentração de corantes e outras substâncias utilizadas no processo (CARNEIRO & ZANONI, 2016; AKHTAR & MANNAN, 2020). As substâncias resultantes desse processo são responsáveis não só pela poluição da água, como também acarretam danos ao solo e à vegetação ao longo das margens de rios nos quais são despejados os efluentes, como por exemplo, o rio Capibaribe Pernambuco-Br (GONDIM et al. 2008).

Grande parte da poluição gerada por efluentes têxteis se deve ao uso de corantes utilizados no tingimento da fibra do tecido (GONDIM et al. 2008). Estima-se que para cada quilo de produto produzido sejam necessários 200 a 400 litros de água (DE OLIVEIRA et al. 2021), sendo 88% dessa água descartada contendo alta carga de resíduos e mais de 10.000 subprodutos, tais como compostos clorados, sais,

substâncias químicas auxiliares, surfactantes e, principalmente, corantes (SEN et al. 2016; DE ALMEIDA et al. 2016; SINGH, 2017; LELLIS et al. 2019; CHOI, 2020).

A presença de corantes dissolvidos nos efluentes, ainda que em pequenas quantidades, interfere diretamente na atividade fotossintética comprometendo a biota aquática, pois impedem a penetração dos raios solares na coluna d'água (KUNZ et al. 2002; SPINA et al. 2014; SINGH, 2017; LELLIS et al. 2019).

2.2.CORANTE ÍNDIGO CARMIN

Desde os primórdios da civilização, a humanidade utiliza fontes naturais para obtenção de substâncias coloridas para tingir o corpo, tecidos e objetos. O primeiro corante foi sintetizado em 1856, após a descoberta de Mauveine por William Henry Perkin ao tentar sintetizar quinino, um medicamento usado para curar a malária, que assolava regiões tropicais. Dessa maneira, Perkin produziu uma nova geração de corantes e, desde então, os corantes naturais foram sendo substituídos por compostos sintéticos (CARNEIRO & ZANONI, 2016; BENKHAYA et al. 2020).

Corantes são complexos orgânicos insaturados que têm a propriedade de absorver luz e dão cor à região visível, denominada cromóforo. A cor é dada pela fração de luz não absorvida pelo corante e sim refletida. As ligações duplas conjugadas constituem uma estrutura química favorável à absorção da luz. Assim, os corantes geralmente contêm aminas aromáticas e apresentam composição complexa e estável, sendo, por isso, considerados recalcitrantes e, geralmente, não podem ser facilmente tratados através dos métodos convencionais sendo necessário implementar duas ou mais formas de tratamento tornando o tratamento caro (LELLIS et al. 2019; BENKHAYA et al. 2020).

A produção de corantes chega a 700.000 toneladas por ano, sendo o Brasil responsável por 2,6% dessa produção (GUARATINI & ZANONI, 2000; CARNEIRO & ZANONI, 2016). Dos corantes utilizados nas indústrias, 10 a 20% são transformados em efluentes descartados no meio ambiente (EL ENSHASY et al. 2017; BERRADI et al. 2019).

De acordo com o índice de cores, publicado pela Society of Dyers and Colorists (Reino Unido) em cooperação com a Associação Americana de Químicos e Coloristas Têxteis (AATC), os corantes têxteis são classificados com base na estrutura química do cromóforo, cor e método de aplicação. Dessa forma, cada

corante é representado por dois números referentes a base da classificação em cores e química. Um nome genérico para o índice de cores (IC) para corantes inclui ácido, básico, direto, disperso, reativo, corante de enxofre, pigmento, cuba e azo insolúvel. Quando a classificação ocorre usando a base química (cromóforo), o número do I.C é apresentado como nitro, azo, carotenóide, difenilmetano, xanteno, acridina, quinolina, indamina, enxofre, amino e hidroxiketona, antraquinona, indigoide, ftalocianina e pigmento inorgânico. Portanto, corantes sintéticos apresentam dois componentes principais: o grupo responsável pela coloração, denominado cromóforo, e o grupo funcional, responsável pela fixação à fibra (GUARATINI & ZANONI, 2000; EL ENSHASY et al. 2017; IHSANULLAH et al. 2020; BENKHAYA et al. 2020).

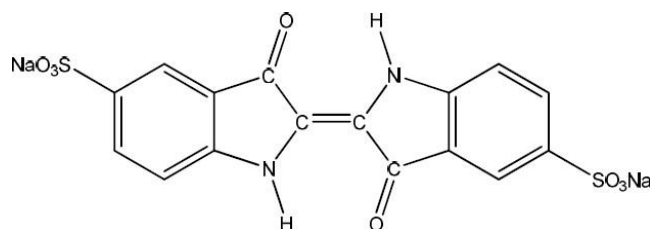
Corantes sintéticos têm sido frequentemente utilizados nas indústrias de alimentos, de cosméticos, em curtumes, papel, farmacêutica e têxtil no tingimento da fibra. Devido à sua praticidade, custo-benefício e características peculiares, as indústrias têxteis preferem os corantes sintéticos aos corantes naturais. Dentre as características, pode-se citar a alta estabilidade à luz, resistência a diversos fatores, tais como, temperatura, transpiração, utilização de detergentes, ataque microbiano dentre outros (GUARATINI, 1999; FORGACS et al. 2004; MUGDHA & USHA, 2012; EL ENSHASY et al. 2017). Amplamente utilizados na indústria têxtil, contribuem para a carga orgânica e a toxicidade das águas residuais. Produzidos para resistir ao desbotamento e a outros produtos químicos, os corantes apresentam composição química estável e geralmente são de difícil degradação (GUARATINI & ZANONI, 2000; SEN et al. 2016; SINGH, 2017; BERRADI et al. 2019). Dentre os diversos corantes utilizados pelas indústrias, o índigo carmin se sobressai pela utilização tradicional no tingimento do denim (jeans). O jeans é uma das roupas mais consumidas no mundo, com um número estimado de dois bilhões de peças vendidas a cada ano, e consome cerca de 20.000 toneladas/ano de índigo sintético. O tingimento de uma peça consome em média 3-12 g de corante índigo (MOREIRA, 2019; CHOWDHURY et al. 2020).

Índigo é um dos corantes mais antigos usados na história da humanidade, com registros de aproximadamente 5 milênios. Considerado um corante nobre pela qualidade no tingimento, o índigo natural teve sua origem na Índia antiga e era obtido das espécies vegetais *Indigofera tinctoria*, *Polygonum tinctorum* e *Isatis tinctoria*. A extração era realizada com água e o extrato resultante consistia numa

solução aquosa do glucósido de indoxilo, que era hidrolisado por via fermentativa para dar origem ao indoxilo, sendo oxidado em seguida ao índigo. O corante sintético surgiu com o processo de industrialização, em 1856, e ainda é o principal composto usado para tingir denim devido à sua excelente coloração, embora apresente baixa solubilidade em água devido à sua estrutura química (CARNEIRO & ZANONI, 2016; CHOI, 2021).

O índigo carmim é uma substância de coloração azul amplamente utilizada nas indústrias de alimentos, cosméticos, celulose, têxtil, além de aplicações médicas (Choi, 2020). Pertencente ao grupo indigóides, o corante é um sal sódico do ácido 5,5-indigosulfônico e apresenta um grupo cetônico (C=O) em sua composição química, sendo insolúvel em água (Fig 1). Entretanto, quando se encontra na forma reduzida (C-OH), torna-se solúvel e passa a ter afinidade química pela fibra celulósica. Devido à estrutura molecular complexa, os indigóides são estáveis quimicamente e, portanto, difíceis de serem removidos quando descartados no meio do ambiente (GUARATINI & ZANONI, 2000; PAVANELLI, 2010; CHOWDHURY et al. 2020).

Figura 1 – Estrutura molecular do índigo carmim



Fonte: Pavanelli (2010).

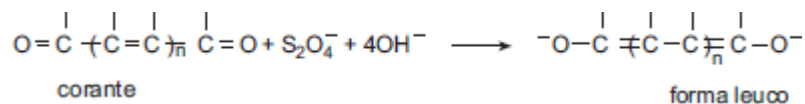
De acordo com a fixação à fibra, o índigo carmim é classificado como sendo um dos mais importantes corantes pertencentes à família do tipo vat, também conhecidos como corantes à tina ou à cuba e, na classificação com base no cromóforo, o índigo entra como pertencente aos indigoide (VETEC, 2008; DE ANDRADE & LOPES, 2015; ZANONI & CARNEIRO, 2016; BERRADI et al. 2019).

Geralmente, os corantes classificados à cuba são utilizados para tingir algodão devido às propriedades de fixação. Devido à produção química de hidrossulfito de sódio, essa classe de corantes pode causar sérios danos ecológicos

(GUARATINI & ZANONI, 2000; CHOI, 2020; BERRADI et al. 2019; CHOWDHURY et al. 2020).

As etapas de tingimento utilizando o índigo carmin, insolúvel em água, incluem a redução de índigo a um leucoíndigo que passa a ser altamente solúvel (Fig 2). Quando fixado à fibra, o corante apresenta capacidade de reoxidação através do ar retomando a forma inicial (insolúvel). Entretanto, para que o processo de redução ocorra, é utilizado um forte redutor em solução alcalina, o ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), que gera subprodutos tóxicos e perigosos que causam poluição ambiental (BERRADI et al. 2019; CHOI, 2020; CHOWDHURY et al. 2020). Além disso, o índigo carmin sintético é altamente tóxico e apresenta propriedades cancerígenas como também interfere no desenvolvimento neural. O contato com o corante pode causar irritações na pele, risco de danificar permanentemente os olhos quando entra em contato direto na córnea e causar problemas ao trato respiratório dos seres humanos (SAGGIORO et al. 2012; CHOWDHURY et al. 2020).

Figura 2 – Processo de redução do corante a cuba com ditionito de sódio



Fonte: Guaratini & Zanoni (2000).

Diante do exposto, estudos se intensificaram em busca de alternativa ecologicamente viável à remediação de águas residuais poluídas por corantes, sendo apontado o uso de fungos causadores de podridão branca, como potenciais candidatos a serem utilizados não só para descoloração de efluentes como também de diversos compostos recalcitrantes. Nesse contexto, a micorremediação se sobressai como alternativa favorável a ser utilizada como ferramenta biológica mais indicada para minimizar os danos ambientais causados pela utilização de compostos poluentes, como os corantes (NOVOTNÝ et al. 1997; EL ENSHASY et al. 2017; CHOWDHURY et al. 2018; PANDEY et al. 2017; PRZYSTAS et al. 2018; AKHTAR & MANNAN 2020; XIAO et al. 2022). Dentre os fungos mais estudados, os que mais se destacam são aqueles capazes de produzir enzimas ligninolíticas, tais como lacases, lignina e manganês dependente de peroxidases e peroxidases versáteis (RUIZ-DUEÑAS et al. 2009; PINEDO-RIVILLA & COLLADO, 2009; DASHTBAN et al.

2010; SINGH et al. 2015; LEGERSKÁ et al. 2016, 2018; XIAO et al. 2022). Estas enzimas têm sido apontadas com as principais ferramentas biológicas usadas para descolorir corantes em águas residuais, sendo as lacases mais evidenciadas em estudos de degradação de resíduos (SILVA et al. 2012; SEN et al. 2016; XIAO et al. 2022). Portanto, identificar e selecionar cepas capazes de serem utilizadas nesses processos é primordial à saúde do meio ambiente bem como dos seres vivos que o compõem.

2.3 AGARICOMYCETES: DESCOLORAÇÃO DE CORANTES EM EFLUENTES

Nas últimas décadas, pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de selecionar e testar linhagens de fungos, principalmente os causadores de podridão branca, para degradar poluentes recalcitrantes. O interesse geral da comunidade científica é encontrar uma alternativa economicamente viável e ecologicamente correta para remoção/diminuição de poluentes em comparação aos métodos de remoção físico-químicos existentes (PINEDO-RIVILLA & COLLADO, 2009; RODRÍGUEZ-COUTO, 2017; SAMSAMI et al. 2020; XIAO et al. 2022). Políticas governamentais rigorosas relacionadas aos níveis de poluentes permitidos em águas, não são suficientes para coibir o despejo de efluentes não tratados nos rios. Além disso, os custos elevados dos tratamentos químicos para remoção de poluentes e a possibilidade de alguns desses tratamentos gerarem subprodutos e sólidos, na maioria das vezes, mais tóxico do que o produto inicial, têm acelerado a busca por alternativas biológicas para remediar os impactos ambientais causados por poluentes oriundos das atividades industriais (PINEDO-RIVILLA & COLLADO, 2009; MUGDHA & USHA, 2012; CPRH, 2020).

Os processos desenvolvidos para o tratamento da remoção da cor em águas residuais podem ser físico-químicos ou biológicos, sendo os primeiros, geralmente, de custo elevado, se tornando inviáveis, principalmente, às pequenas lavanderias. Dentre os processos físicos, pode-se citar adsorção e filtração por membrana, e, dentre os processos químicos, os de coagulação-floculação e ozonização. Há ainda os processos de oxidação avançados, como reação de Fenton e fotocatalise, além dos processos eletroquímicos que incluem eletrocoagulação, eletro-oxidação e redução eletroquímica. Todos os processos listados têm por objetivo a remoção de cor de águas residuais, mas sua aplicação é limitada devido aos altos custos

operacionais, à utilização de produtos químicos/reagentes caros, à baixa eficiência, à mineralização incompleta e à produção de lodo residual contendo produtos mais tóxicos do que os iniciais (POPLI & PATEL, 2015; SEN et al. 2016; CHOWDHURY et al. 2020).

O tratamento biológico é uma solução ecologicamente correta que usa métodos sem grandes investimentos e custos operacionais, sendo o mais favorável em termos econômicos e ecológicos. Geralmente, ocorre por adsorção na biomassa microbiana ou por biocatálise enzimática e pode ocorrer de forma aeróbica e anaeróbica. O tratamento biológico anaeróbio-aeróbio sequencial é considerado um dos métodos mais econômicos para a mineralização completa de corantes. O estágio anaeróbico produz descoloração através da clivagem redutiva das ligações azo do corante, resultando na formação de aminas aromáticas incolores, mas potencialmente perigosas. O estágio aeróbio envolve a degradação das aminas aromáticas e os produtos de tratamento aeróbio contêm dióxido de carbono e biomassa (AHMAD et al. 2015; KIRAN et al. 2017; SINGH, 2017; SAMSAMI et al. 2020).

Os fungos causadores de podridão branca, principalmente espécies de Agaricomycetes, apresentam capacidade de degradar lignina e celulose, por isso são denominados lignocelulolíticos. Para que ocorra a degradação dos componentes da madeira é necessária a atuação de um processo multienzimático que envolve, principalmente, enzimas oxidativas, tais como a lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase (LEONOWICZ et al. 1999; ZHANG et al. 2016). Uma das primeiras publicações sobre produção de enzimas foi relatada por Bourquelot & Herissey (1897) em espécimes de *Polyporus sulphureus*, obtendo resultados positivos. Logo em seguida, Czapek (1899) descobriu a enzima de degradação da lignina em *Merulius lacrymans*. Posteriormente, Buller (1906) publicou uma lista de enzimas presentes em *Polyporus squamosus* (NGUYEN et al. 2018). Entretanto, a constatação do potencial de linhagens de *Phanerochaete chrysosporium* em degradar compostos recalcitrantes chamou a atenção para o desenvolvimento de diversos estudos (BORCHERT & LIBRA, 2001; MECHICHI et al. 2006; CHANDER & ARORA, 2007; PINEDO-RIVILLA & COLLADO, 2009; DASHTBAN et al. 2010; GHEBRESLASIE et al. 2016; SINGH et al. 2017).

Estudos utilizando espécies de Agaricomycetes para degradar compostos poluentes têm sido cada vez mais recorrentes e comprovam a potencialidade da

classe. Em estudo de revisão, Pinedo-Rivilla e Rivilla (2009) relatam a utilização de espécies de *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* e *Daldinia concentrica* testadas para degradação de estireno monomérico. *Pleurotus tuber-regium* apresentou diminuição dos compostos aromáticos quando testado em solução aquosa contendo óleo diesel. Espécies pertencentes aos gêneros *Coriolus*, *Pycnoporus*, *Pleurotus*, *Fomitopsis* e *Daedalea* apresentaram potencial de degradação quando testadas frente a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, enquanto que espécies de *Phanerochaete*, *Irpex*, *Polyporus*, *Stereum*, *Lentinus*, *Bjerkandera*, *Pleurotus* e *Phlebia* foram testadas para remediação de solos contaminados. Espécies de *Panus tigrinus* CBS 577 e 579 foram testadas para reduzir poluentes de águas residuais de moinho de azeitonas contendo fenóis. *Trametes versicolor* foi testada para degradação e descoloração de efluentes de uma fábrica de papel. Isolados de *Trametes versicolor* HR131 e *Trametes sp.* HR577 foram estudados na degradação do pentaclorofenol. Espécies de *Boletus edulis*, *Suillus luteus*, *Cortinarius russus*, *Suillus grevillei*, *Gomphidius viscidus*, *Laccaria bicolor*, *Leccinum scabrum*, *Xerocomus chrysenteron* foram cultivadas em meios em diferentes concentrações de substrato contendo pentaclorofenol com o objetivo de determinar o efeito do composto sobre o crescimento micelial. Os resultados obtidos comprovaram que não houve impacto no crescimento do micélio, entretanto houve a diminuição dos níveis de pentaclorofenol no substrato. Em estudo semelhante, espécies de *Peniophora cinerea*, *Psilocybe castanella*, duas cepas de *Trametes villosa*, *Agrocybe perfecta*, *Trichaptum bisogenum* e *Lentinus villosus* foram capazes de colonizar solo contendo até 4600 mg de pentaclorofenol/kg de solo. Foi observada a produção de íons cloreto durante a degradação, indicando a desalogenação da molécula. Outros artigos comprovam a capacidade de produção de enzimas de espécies de Agaricomycetes (SRINIVASAN et al. 2010; PAVKO, 2011; CHANDER & ARORA, 2014; SEN et al. 2016; LEGERSKÁ et al. 2016; SINGH, 2017). Todavia, é importante ressaltar que, grande parte dos estudos foram desenvolvidos e publicados, majoritariamente por pesquisadores da China e dos Estados Unidos. Esses países são os que mais contribuem para o desenvolvimento de pesquisas sobre fungos de podridão branca e produção de enzimas, principalmente lacase, como também a utilização em processos de biorremediação e degradação de compostos xenobióticos (XIAO et al. 2022).

No Brasil, os estudos ainda sobre o tema são tímidos, se levarmos em consideração a megadiversidade fúngica existente e, do quanto ainda precisa ser explorado. Deve-se levar em consideração que o Brasil detém biomas exclusivos, bem como temperaturas e climas que só existem no país, tornando, talvez as espécies endêmicas, potenciais ferramentas biológicas de um futuro próximo.

Diante da comprovação dos estudos já realizados com diversos compostos recalcitrantes, a possibilidade de aplicar o potencial de espécies coletadas no Nordeste para o tratamento de águas residuais e efluentes contendo corantes, se faz urgente. A água é um bem comum que precisa ser cuidado para a manutenção da vida no planeta. Diversos efluentes despejados nos mananciais e rios têm desencadeado a poluição e contaminação das águas. O interesse no desenvolvimento de estratégias para minimizar os impactos no meio ambiente tem se tornado de interesse coletivo. Sendo assim, estudos de identificação de cepas capazes de degradar corantes vêm sendo realizados. Espécies de Agaricomycetes podem ser usadas para clivagem de cromóforos de corantes sintéticos e, consequentemente, remoção de cor (ALI et al. 2010). O sistema enzimático inespecífico do grupo apresenta capacidade de mineralizar complexos vegetais poliméricos, tais como a lignina (KUNZ, 2002; WESENBERG et al. 2003), bem como para oxidar compostos poluentes orgânicos, inclusive corantes sintéticos. Portanto, uma promissora ferramenta biológica a ser utilizada em processos de descoloração de corantes e remoção de compostos recalcitrantes em ambientes impactados (PINEDO-RIVILLA & COLLADO, 2009; RODRÍGUEZ-COUTO, 2017). Pesquisas desenvolvidas utilizando fungos de podridão branca para descoloração de corantes sintéticos têm sido bastante recorrentes em diversos países. Todavia, a maioria dos estudos de descoloração foi realizada fora do Brasil (XIAO et al. 2022).

Novotný et al. (2001) testaram 103 cepas de fungos para descoloração de diferentes grupos de corantes: azo, diazo, antraquinona, heterocíclico, trifenilmetano, ftalocianina. Na triagem, foram avaliadas a taxa e eficiência de descoloração em meio ágar sólido contendo 200 µg/g-1 de poli R-478 ou Remazol Brilliant Blue R (RBBR). *Irpex lacteus* 617/93 e *Pleurotus ostreatus* 670/93 foram capazes de remover completamente o corante RBBR no 10º dia a 28 °C. Em meio líquido, *I. lacteus* 617/93 foi testada para remoção de RBBR, azul de bromofenol, ftalocianina, vermelho de metila e vermelho congo em meio líquido. Ao fim do 14º dia, foi verificada a redução de 93% de RBBR, 100% de azul de bromofenol, 98% de

ftalocianina, 56% de vermelho de metila e 58% de vermelho congo. *Irpex lacteus* 617/93 também foi testada para degradação de RBBR adicionado a solo esterilizado e, em seis semanas, 77% do corante foi removido.

Eichlerová et al. (2007), em estudos de descoloração, verificaram que *Dichomitus squalens* apresentou taxa de descoloração de 99% frente ao corante Laranja G e 98% do RBBR em concentração de 0.5 g/L de ambos os corantes em 14 dias de experimento, em meio líquido e em condição estática.

Sathiya et al. (2007) avaliaram *Trametes hirsuta* (MTCC-136) e *Pleurotus florida* quanto à capacidade de descolorir o azul CA, o preto B133 e o violeta SR usados nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/L em meio líquido. Na concentração de 25 mg/L, para o azul CA, a taxa de remoção ocorreu nas primeiras 24 h para ambas as espécies. A descoloração máxima foi observada no 10º dia de incubação: *P. florida* descoloriu 93,54% e *T. hirsuta* (MTCC-136) 92,17%. A 50 mg/L, *P. florida* removeu 61,27% e *T. hirsuta* (MTCC-136) 56,64% no 10º dia, enquanto na concentração de 75 mg/L de corante *P. florida* removeu 52,42% e *T. hirsuta* 39,45%. Para o preto B133, os resultados obtidos na concentração de 25 mg/L foram de 64,67% para *P. florida* e 57,21%, para *T. hirsuta* (MTCC-136), de 50 mg/L foram de 33,94% e 29,97% para *P. florida* e *T. hirsuta* (MTCC-136) respectivamente, enquanto em 75 mg/L *P. florida* removeu 28,57% e *T. hirsuta* (MTCC-136) 24,04%. A descoloração do violeta SR na concentração de 25 mg/mL foi de 83,70% por *P. florida* e 62,02% por *T. hirsuta* (MTCC-136). Em 50 mg/L, a descoloração máxima observada foi de 64,67% por *P. florida* e 57,21% por *T. hirsuta* e, em 75 mg/L, *P. florida* e *T. hirsuta* (MTCC-136) removeram 58,04% e 43,48%, respectivamente.

Grassi et al. (2011) verificaram a capacidade de descoloração de *Trametes trogii* BAFC 463 frente a corantes azóicos, indigóides, trifenilmetanos, antraquinônicos e heterocíclicos, bem como quantificaram a produção de lacase e manganês peroxidase (MnP). Além disso, testaram a lacase purificada na descoloração dos corantes RBBR, índigo carmim, xilidina, verde malaquita, violeta genciana, azul de bromofenol. O experimento foi realizado em meio de cultura líquida e as condições utilizadas foram semelhantes às encontradas em efluentes contendo corantes, tais como desnaturação, altos teor de sais, presença de metais, altas temperaturas e pHs alcalinos. Os resultados obtidos confirmaram o potencial de *T. trogii* em produzir lacase (110 U mL⁻¹) e MnP (0.94 U mL⁻¹), e remover mais de 85% dos seis corantes após 1º dia de incubação.

Yuan et al. (2012) testaram 60 cepas de fungos quanto à descoloração do vermelho congo, alaranjado G, alizarina, cristal violeta, vermelho neutro e azul de metileno em placas de Petri utilizando meio malte-agar (MEA) composto por (g/L⁻¹) extrato de malte 20 g, ágar 18 g e 0,05 de corante. *Antrodiella albocinnamomea* W2784, *Bjerkandera adusta* C3760, *Trametes ochracea* D5900-1, *Trametes versicolor* C3706, C3752 e C3759 removeram completamente os corantes entre 10-14 dias a 30 °C. *Antrodiella albocinnamomea* W2784 apresentou melhor resultado e foi usada em testes de descoloração do vermelho de alizarina em meio líquido, apresentando ótimos resultados de descoloração atribuída à alta produção de lacase. No 6º dia foram produzidas 318 U/L⁻¹ de lacase, diminuindo logo depois, enquanto a atividade de MnP manteve-se em um nível baixo, sendo observado um aumento na produção no 8º dia de 37 U/ L⁻¹.

Ghebreslasie et al. (2016) realizaram estudos de descoloração de azul de metileno, RBBR e vermelho de fenol. Os melhores resultados foram observados do 2º e 5º dia após a inoculação, atingindo o diâmetro máximo no 7º dia em vermelho de fenol e RBBR e no 11º dia para Azure B. *Stereum complicatum* começou a crescer na placa no 2º dia de inoculação e a descoloração de vermelho de fenol ocorreu totalmente (9 cm) de diâmetro do 3º ao 7º dia de incubação. *Ganoderma australe* (TM2) apresentou taxa média de descoloração de 1,14cm diâmetro por dia em relação à linhagem de controle de *Phanerochaete chrysosporium* (NBRC 31249), que foi de 0,54 cm de diâmetro por dia. De acordo com os autores, 49 isolados apresentaram melhores taxas de descoloração quando comparados às linhagens de *Phanerochaete chrysosporium* (NBRC 31249) e *Trametes versicolor* (NBRC6422) utilizadas como controle. *Megacollybia platyphylla*, *Laccaria laccata* e *Lenzites* sp. foram apontadas como potenciais espécies degradadoras por apresentarem taxa de descoloração melhor que os isolados utilizados como controle.

Kunjadia et al. (2016) realizaram estudo comparativo utilizando *Pleurotus ostreatus*, *P. sapidus* e *P. florida* quanto à produção de enzimas e potencial de descoloração dos corantes azóicos: amarelo dourado (Coralene Golden Yellow), vermelho escuro (Coralene Dark Red) e azul marinho (Coralene Navy Blue) em várias concentrações (50 ppm, 100 ppm e 200 ppm) em meio líquido. Os resultados apresentaram variações percentuais de acordo com as espécies estudadas: *P. ostreatus* (88%), *P. sapidus* (92%) e *P. florida* (98%). Todas as três espécies de *Pleurotus* foram capazes de remover todos os três corantes. Porém, *P. florida*

mostrou mais de 95% de eficiência na remoção de todos os três corantes. Os autores também avaliaram o padrão de produção da lacase, MnP e lignina peroxidase durante o crescimento das espécies durante 10 dias. A lacase foi a principal enzima ligninolítica extracelular produzida pelas linhagens estudadas, enquanto os resultados para lignina peroxidase e MnP não apresentaram valores expressivos.

Akpinar e Urek (2017) cultivaram *Pleurotus eryngii* (MCC58) utilizando resíduo de pêssgo como substrato indutor para a produção de lacase. O isolado foi testado quanto à capacidade em degradar os corantes laranja de metila, tartrazina, vermelho reativo 2 e corante negro reativo. Os resultados demonstraram a descoloração de 2,8% do corante laranja de metila após 5 min de tratamento. O trabalho é o primeiro sobre produção de lacase por *Pleurotus eryngii* usando resíduos de pêssgo como substrato indutor.

Estudos com linhagens de Agaricomycetes coletadas no Brasil são escassos ou quase inexistentes, embora haja evidências da necessidade de rastrear espécies coletadas em regiões tropicais tendo em vista a biodiversidade fúngica existente.

Machado et al. (2005) utilizaram o RBBR como substrato para avaliar a atividade ligninolítica de 125 Basidiomycota macroscópicos coletados em diferentes ecossistemas de Mata Atlântica. Também foi avaliada a atividade extracelular de descoloração da RBBR produzida quando os fungos selecionados foram cultivados em meio sólido e em solo contaminado com organoclorados. Um total de 106 fungos foi capaz de remover o RBBR durante o crescimento em MEA (2%), dos quais 96 mostraram uma atividade de crescimento e descoloração do micélio mais forte que *Phanerochaete chrysosporium* usada como referência. Também foram testados quanto à descoloração do RBBR e atividade da peroxidase extratos fúngicos obtidos de 35 linhagens cultivadas em meio sólido suplementado com bagaço de cana-de-açúcar. Os isolados testados apresentaram resultados mais promissores que *P. chrysosporium* usada como controle. Todos os isolados apresentaram atividades de peroxidase, entretanto cinco isolados não removeram o RBBR. *Trogia buccinalis* e três linhagens de *Lentinus* apresentaram descoloração de RBBR, no entanto não foi observada a produção de MnP.

Moreira-Neto et al. (2009) realizaram estudos para determinar a influência do pH no crescimento de *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella* e na descoloração in vitro do corante RBBR e na atividade de lacase. Os resultados obtidos

demonstraram que o pH do meio de cultivo influenciou o crescimento de *Lentinus crinitus* e *P. castanella*, que apresentaram menor crescimento a pH 5,9 e pH 2,7, respectivamente, como também foram capazes de modificar o pH do meio de cultura, ajustando-o ao pH ótimo para crescimento próximo a 4,5. A descoloração do RBBR foi máxima a um pH entre 2,5 a 3,5 e maior atividade de lacase foi observada em pH 3,5 para *L. crinitus* e pH 4,5 *P. castanella*.

Lyra et al. (2009) realizaram estudo de descoloração utilizando culturas obtidas de *Caripia montagnei*, *Datronia caperata*, *Earliela scabrosa*, *Fomitopsis feei*, *Ganoderma stipitatum*, *Hexagonia hydroides*, *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes membranacea* coletadas na Mata Atlântica de Pernambuco, frente aos corantes azul de bromofenol, azul de metileno, vermelho de fenol, vermelho do congo, laranja de metila e verde de metila. *Trametes membranacea* e *H. hydroides* foram os únicos isolados capazes de degradar todos os corantes testados.

Santana et al. (2016) avaliaram, em meio sólido, três isolados de *Geastrum* quanto à produção de fenoloxidasas e descoloração do RBBR. Os espécimes foram coletados no Campus do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Para detecção de fenoloxidase, foi utilizado o meio BDA contendo ácido tânico (0,5%), enquanto para os testes de descoloração foi utilizado meio BDA acrescido de RBBR (0,02%). O resultado mais promissor foi observado para a linhagem de *G. subiculosum*, capaz de oxidar o substrato e degradar RBBR.

Ribeiro et al. (2018) realizam testes de descoloração utilizando RBBR, Acid Blue 129, Reactive Blue 4, Reactive Black 5 e Acid Red frente a isolados obtidos de basidiomas causadores de podridão branca encontrados em toras de árvores mortas no campus da Universidade Federal do Amazonas em Manaus. Os isolados obtidos foram cultivados em MEA contendo ácido tânico ou guaiacol, a fim de verificar a produção de enzimas ligninolíticas. Os isolados também foram cultivados em meio MEA contendo um dos corantes. Foram obtidos 13 isolados e todos foram capazes de oxidar o ácido tânico, todavia apenas em seis foi observada a oxidação do guaiacol. Os isolados LMA008, LMA009 e LMA012 foram os únicos que promoveram a descoloração de todos os corantes utilizados. Quatro isolados não foram capazes de descolorir nenhum corante. De uma maneira geral, os isolados que produziram um halo marrom-escuro quando cultivados em meio com ácido tânico se mostraram capazes de descolorir um maior número de corantes. Neste

estudo, o guaiacol mostrou-se um melhor indicador da capacidade de descoloração dos fungos de podridão branca.

Almeida et al. (2018) testaram isolados de *Lentinus crinitus* para produção de lacase utilizando subprodutos agroindustriais como substrato para descoloração de corantes. Os subprodutos utilizados foram casca de café ou pellet de polpa cítrica acrescentados ao meio de cultura em diferentes fontes de nitrogênio (uréia, extrato de levedura, sulfato de amônia e nitrato de sódio). O extrato enzimático foi usado na descoloração do RBBR. A descoloração máxima de 74% no meio contendo polpa cítrica e 76% no meio contendo casca de café foi observada em 24 horas.

Desse modo, espécies de Agaricomycetes são ferramentas biológicas promissoras a serem utilizadas na remoção de corantes.

2.3.1 Agaricomycetes e atuação na degradação de compostos vegetais

A classe Agaricomycetes compreende aproximadamente 21.000 spp e tem como característica principal a formação de estruturas macroscópicas de reprodução sexuada denominada basidioma onde são produzidos os basídios e basidiósporos, que são esporos de origem sexuada (KIRK et al. 2008; HIBBETT et al. 2014). Muitas espécies são decompositores em ambientes florestais e participam ativamente da ciclagem de materiais orgânicos na natureza contribuindo com o ciclo do carbono. A atuação de espécies do grupo não se limita apenas à decomposição de matéria orgânica, mas também em formar associações simbióticas liquenicas e micorrízicas, além de atuarem como patógenos causando doenças em espécies vegetais. Há ainda a produção de policetídeos proveniente do metabolismo secundário, linha de pesquisa de interesse na produção de produtos naturais (GRESSLER et al. 2021), além dos estudos que buscam produtos de interesse medicinal, farmacológico e nutricional (WASSER et al. 2014).

Tantas atribuições tornam os representantes da classe Agaricomycetes ferramentas biológicas interessantes pesquisadas a nível mundial e, portanto a ser explorada pelas mais diversas áreas do conhecimento. Todavia, a produção de enzimas é uma das áreas de maior relevância e, conseqüentemente, a mais estudada (TELES et al. 2020). Tanto interesse se deve à produção de diversas enzimas lignocelulolíticas extracelulares secretadas no substrato por esses organismos. Essas enzimas apresentam potencial em degradar os principais

polímeros estruturais da madeira, tais como celulose, hemicelulose e lignina, bem como macromoléculas como quitina, lipídios e proteínas (WESENBERG et al. 2003; MUGDHA & USHA, 2012; SERGENTANI et al. 2016).

Devido à presença de um sistema enzimático versátil e inespecífico, capaz de degradar material complexo e recalcitrante como a lignina e a celulose, representantes de Agaricomycetes podem causar dois tipos de podridões em madeira: a podridão parda ou marrom e a podridão branca (BLANCHETTE, 1995).

Nos dois tipos de podridão, há a descompactação dos componentes vegetais pela atuação de diferentes enzimas. A podridão parda ou marrom é assim denominada por resultar em pedaços de madeira de coloração marrom quando a celulose e a hemicelulose são hidrolisadas. No processo de hidrólise, a lignina não é degradada, mas modificada por desmetilação, dificultando o processo de degradação da molécula que persiste no solo (SINGH ARORA & KUMAR SHARMA, 2010; CRAGG et al. 2015; PERALTA et al. 2017). Na podridão parda, a lignina é atacada pela química de Fenton e quimicamente modificada em uma forma marrom oxidada que permite o acesso de enzimas à celulose para despolimerização oxidativa (KÜES, 2015).

O termo podridão branca faz referência a formação de resíduo branco fibroso após a descompactação da celulose, hemicelulose e da lignina, que ocorre pela atuação de enzimas lignolíticas. Na podridão branca, pode ocorrer dois tipos de decomposição: uma em que a celulose, a hemicelulose e a lignina são degradadas simultaneamente e a deslignificação, na qual a lignina e as hemiceluloses são removidas antes da celulose. A ocorrência desses tipos de decomposição vai depender das espécies ou de linhagens entre as espécies. Pode ocorrer de uma única espécie decompor material vegetal das duas formas (KIRK & CULLEN, 1998). As espécies causadoras de podridões-brancas têm habilidades enzimáticas únicas em degradar seletivamente ou simultaneamente a lignina para liberar os polícarboidratos fermentáveis à decomposição enzimática (KÜES, 2015).

Os fungos da podridão branca são aeróbios obrigatórios e sua nutrição ocorre através da combustão biológica da madeira e materiais associados e se utilizam do oxigênio molecular comoceptor terminal de elétrons (DURAN & ESPÓSITO, 2000; KIRK & CULLEN 1998; AGUIAR & FERRAZ, 2011). Por apresentarem inespecificidade quanto ao substrato, esses organismos são passíveis de adaptar-se aos mais diversos substratos. Por isso, podem ser utilizados como ferramenta

biológica ideal para o tratamento de ambientes contaminados e/ou poluídos por resíduos ou subprodutos industriais, utilizando-os como substrato.

Devido à presença de um potente sistema enzimático, os fungos de podridão branca atuam na despolimerização da estrutura da lignina (KIRK & FARREL 1987). A composição molecular de uma planta varia entre os tipos de células, tecidos e espécies. As paredes das células vegetais são compostas de lignina que confere resistência mecânica à estrutura da planta. Celulose e hemicelulose compõem toda a biomassa e estão firmemente unidas às moléculas de lignina através de ligações covalentes e hidrogenadas que tornam a estrutura extremamente forte e recalcitrante. A biomassa lignocelulósica é composta principalmente de celulose (38–50%), hemicelulose (23–32%) e lignina (12–25%). A parede primária da planta é composta por fibrilas de celulose, hemicelulose e proteína com grande quantidade de pectina formando uma matriz viscosa que serve de cimento à parede. Essa composição confere à planta proteção contra patógenos e umidade, além da rigidez e sustentação que auxiliam no desenvolvimento da planta (EVANS & HEDGER, 2001; CHRISTOPHER et al. 2014; PONNUSAMY et al. 2019).

A lignocelulose é um complexo compacto e cristalino composto de polissacarídeos que formam microfibras densamente embaladas em camadas de lignina, que os protege contra a atividade de enzimas hidrolíticas, umidade, substâncias externas, degradação microbiana além de atuarem como estabilizadores do complexo estrutural (LEONOWICZ et al. 1999; FARINAS, 2011).

A celulose é o principal e mais abundante composto vegetal na natureza. É um homopolissacarídeo não-ramificado constituído unicamente por moléculas de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. As moléculas individuais de celulose estão dispostas em feixes conhecidos como microfibrilas que parecem estar emaranhados em uma matriz de hemiceluloses e lignina. As hemiceluloses, em associação com a celulose, influenciam na organização da lignina (KIRK & CULLEN, 1998). Devido à configuração espacial alternada das ligações glicosídicas, a unidade de repetição da celulose é um dissacarídeo, a celobiose. Duas unidades de glicose adjacentes formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água (KIRK & CULLEN, 1998; FARINAS, 2011). As pontes de hidrogênio intra e intermoleculares formadas entre as longas cadeias de celulose originam as microfibrilas de celulose, que formam um conjunto de agregados insolúveis em água (FARINAS, 2011). A celulose é hidrolisada devido

a ação sinérgica de pelo menos três classes de enzimas: as endoglucanases, as exoglucanases e as β -glucosidases ou celobiasas. As endoglucanases têm ação randômica, causando mudança rápida no grau de polimerização através da hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4 intramoleculares da cadeia de celulose. A exoglucanase é ativa sobre celulose cristalina, liberando celobiose a partir dos terminais da cadeia. Já a celobiose hidrolisa ligações glicosídicas β -1,4 da molécula de celobiose e de pequenos oligossacarídeos, com liberação de glicose (ZHANG et al. 2016).

A lignina representa o maior recurso orgânico renovável na Terra, mas também um dos mais recalcitrantes à degradação (KÜES, 2015). Sendo o segundo componente mais abundante de todos os materiais orgânicos reciclados no planeta, representa a biomassa lignocelulósica de aproximadamente 15-25% do material vegetal (NGUYEN, 2018; PONNUSAMY et al. 2019). O termo "lignina" é derivado da palavra latina "Lignum", que significa madeira e representa substâncias incrustantes de celulose nas paredes celulares das plantas. O primeiro modelo foi proposto por Adler em 1957 e o esquema compreende 16 unidades de fenilpropano que juntou-se com ligações C-O-C ou C-C (KIRK & FARREL, 1987; LEONOWICZ et al. 1999).

Geralmente, há material vegetal que contém mais lignina que outros. Como por exemplo, a madeira macia que é composta de aproximadamente 25% a 35% de lignina, enquanto que as folhosas contêm 20% a 25%. Por ser um polímero hidrofóbico, a lignina impede a entrada de água na planta evitando o acúmulo excessivo de água (CHRISTOPHER et al. 2014).

A lignina está concentrada em tecidos relacionados com condução de solutos e suporte mecânico e representa um conjunto de polímeros amorfos, de alto peso molecular e muitas ligações cruzadas. Apresenta natureza química diferente dos carboidratos, sendo caracterizada por uma estrutura aromática composta de unidades fenilpropanóides denominadas por monolignóis que estão conectadas através de ligações C-C e C-O com grau variável de metoxilação. As unidades monoméricas precursoras da lignina são hidroxilas fenólicas dos alcoóis trans-p-cumarílico, trans-coniferílico e álcool trans-sinapílico unidos entre si, com os polissacarídeos da parede celular, por ligações covalentes do tipo éter ou éster que são extremamente difíceis de degradar. Todas as características atribuídas à lignina a tornam um dos únicos biopolímeros mais recalcitrantes de ocorrência natural

(KIRK, 1971; KIRK & CULLEN, 1998; WONG, 2009; FARINAS, 2011; CHRISTOPHER et al 2014; KAMIMURA et al. 2018; XU et al. 2021).

Geralmente, a lignina é degradada por combustão enzimática na presença de O₂ (KIRK, 1971; BOUACEM et al. 2018) e a quebra do polímero é iniciada pela ação de um único elétron que produz radicais catiônicos aromáticos na sua estrutura. Estes, então, funcionam em reações não enzimáticas promovidas por radicais que rompem a molécula de lignina. Esse processo leva à oxidação inespecífica da lignina em produtos aleatórios de baixo peso molecular, que ficam então disponíveis para mineralização por fungos ou bactérias (KIRK & CULLEN, 1998; WONG, 2009; BOUACEM et al. 2018).

Na natureza, a lignina pode ser descompactada por meio de dois estágios: despolimerização e/ou mineralização dos compostos aromáticos. Os dois processos podem ocorrer pela atuação de enzimas oxidativas, como peroxidases e lacases, secretadas por fungos da podridão branca e produzidas por certas bactérias que atuam como degradadores primários (KIRK, 1971). Os fungos de podridão branca são os precursores majoritários da mineralização da lignina convertendo-a em água e gás carbônico, o que os torna os organismos mais eficientes na degradação da lignina (KIRK & FARREL 1987).

A lignina não atua como substrato de crescimento para os fungos, entretanto a degradação ocorre por meio de um mecanismo oxidativo aleatório. Dessa forma, os fungos utilizam uma fonte alternativa de carbono, denominada co-substrato que precisa estar disponível no ambiente. Alguns componentes da madeira podem servir como co-substrato, como por exemplo, o xilano, a celulose e os carboidratos. A transformação de celulose ou hemicelulose isolada em monossacarídeos é um processo relativamente simples. Geralmente, fungos lignocelulíticos usam um complexo de hidrolases capazes de produzir monossacarídeos em grandes quantidades. No entanto, quando esses componentes ocorrem em um complexo com lignina (Fig 3), são resistentes à decomposição hidrolítica, pois a lignina parece inibir a atividade hidrolítica e mecanismos oxidativos podem atuar na decomposição (LEONOWICZ et al. 1999).

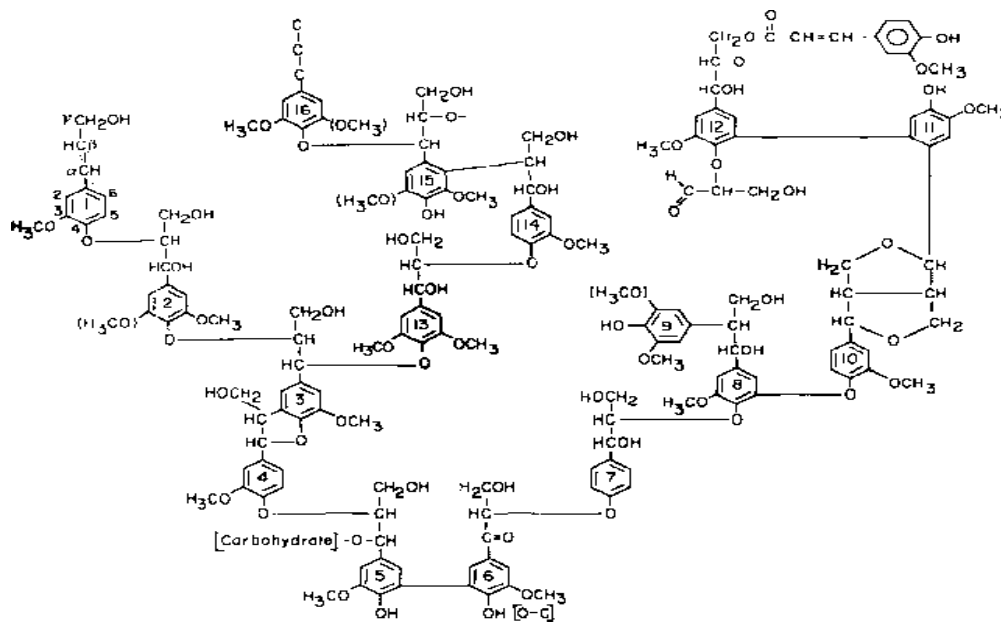


Figura 3 – Esquema da fórmula estrutural da lignina Fonte: Kirk & Farrel (1987).

A degradação da lignina ocorre devido à atuação de um sistema enzimático oxidativo, extracelular e inespecífico. Estudos indicam que a degradação da lignina está associada à produção de fenoloxidase. Esse fato foi observado por Glenn e Gold (1985) quando investigavam a degradação da lignina por *Phanerochaete chrysosporium* e descobriram a atuação da manganês peroxidase. Portanto, enzimas ligninolíticas envolvidas na degradação de lignina, geralmente, são pertencentes à classe das oxidoredutases que removem átomos de hidrogênio adicionando átomos de oxigênio à reação. Essas enzimas comumente são inespecíficas, capazes de oxidar inúmeros tipos de substratos e podem ser amplamente utilizadas nos mais diversos setores industriais, tais como os têxteis, o de alimentos e bebidas, papel e celulose, farmacêutico, cosméticos, nanobiotecnologia e biorremediação (DASHTBAN et al. 2010; LEGERSKÁ et al. 2016; RODRÍGUEZ-COUTO, 2017; AKHTAR & MANNAN, 2020).

As principais enzimas envolvidas, direta ou indiretamente, no processo de oxidação da lignina, em sua maioria, pertencem ao complexo fenoloxidases que inclui as lacases, tirosinases, lignina peroxidase e manganês peroxidase, tendo como principais produtores os fungos causadores de podridão branca (KIRK, 1971; MARTÍNKOVA et al. 2016). Algumas dependem de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para serem ativadas, como a manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13), a lignina

peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) e a peroxidase versátil (EC 1.11.1.16). Enquanto a lacase (Lac, EC 1.10.3.2) utiliza oxigênio como aceptor (SAITO et al. 2018). Há evidências de que todas essas enzimas podem atuar com mediadores de baixo peso molecular para oxidar a lignina (KIRK & CULLEN, 1998).

As fenoloxidasas pertencem às metaloproteínas e estão descritas em dois subgrupos, um que contém as enzimas dependentes de peróxido (LiP e MnP) para atividade catalítica e o subgrupo das lacases, que são cuproproteínas independentes de peróxido (KIRK & CULLEN, 1998; AGUIAR & FERRAZ, 2011). A produção de polifenoloxidasas por fungos de podridão branca foi constatada por Bavendamm (1928) quando foi observado o aparecimento de zonas de difusão marrons em placas de ágar quando suplementado com 0,5% (p/v) de ácido gálico ou ácido tânico. Bavendamm concluiu que as zonas de difusão formadas eram resultante da oxidação do ácido fenólico por oxidasas extracelular ou intracelular. Desde então, o resultado do experimento tem sido utilizado como teste de detecção de produção de fenoloxidasas (DAVIDSON et al. 1938).

Embora estas enzimas sejam comumente produzidas por fungos causadores de podridão branca, há espécies que produzem somente uma, duas ou as três enzimas simultaneamente. Entretanto, os fungos causadores de podridão parda são conhecidos como não produtores de fenoloxidasas (AGUIAR & FERRAZ, 2011).

A lacase foi descoberta pela primeira vez no século XIX em *Rhus vernicifera*. Atualmente, se sabe que a presença da enzima faz parte da composição de espécies de plantas superiores, bem como de bactérias, fungos e insetos. Entretanto, as lacases podem oxidar uma variedade de substratos, contendo compostos aromáticos e não aromáticos, degradando-os em componentes menores que ajudam a reduzir o oxigênio molecular em água, as de origem fúngica estão entre as mais estudadas, principalmente as produzidas por fungos de podridão branca (CHRISTOPHER et al. 2014; YANG et al. 2015; ZERVA et al. 2019; AN et al. 2021).

A lacase (E.C. 1.10.3.2) é uma oxiredutase que atua em difenóis e utiliza o oxigênio como aceptor. Caracterizada como uma glicoproteína polifenoloxidase que contém cobre no seu sítio ativo e catalisa a redução de quatro elétrons de oxigênio molecular (O_2) à água (H_2O) com oxidação de substratos fenólicos e não fenólicos (ADAM et al. 1999; BALDRIAN, 2006; MUGDHA & USHA, 2012). A catálise de substratos fenólicos e compostos de lignina por lacase ocorre via transferência de

um elétron, conduzindo à geração de radicais fenoxila, que podem ser convertidos a quinonas (LEONOWICZ et al. 2001; DE MENEZES et al. 2009). Estudos indicam a lacase como o mais simples membro de um grupo de proteínas contendo quatro átomos de cobre na molécula, o que sugere que a enzima tem uma estrutura com três sítios ativos (PINKOSKI, 1997).

A enzima apresenta diversas funções, tais como a biodegradação da lignina, formação de pigmentos em esporos de fungos e patogênese em plantas. Além disso, podem atuar como fator de virulência em fungos, no metabolismo do ferro e no escurecimento do grão em plantas. Industrialmente, as lacases, geralmente, são utilizadas em processos de polpação e branqueamento de pasta celulósica. A utilização da enzima reduz a quantidade de componentes utilizados no processo, bem como os resíduos tóxicos resultantes (AGUIAR & FERRAZ, 2011; LEGERSKÁ et al. 2016).

A manganês peroxidase (MnP) (E.C. 1.11.1.13) é uma enzima extracelular comum nos fungos causadores de podridão branca. É uma glicoproteína que tem como grupo prostético o ferro protoporfirínico IX que depende de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para ser ativado. Seu ciclo catalítico é semelhante ao da lignina peroxidase, porém o Mn^{2+} atua como doador de elétrons para gerar o composto II (SUNDARAMOORTHY et al. 1997; BARRETO & DE MENEZES, 2015). O ciclo catalítico do MnP prossegue através de uma oxidação inicial pelo H_2O_2 a um composto intermediário que, por sua vez, promove a oxidação do Mn^{2+} a Mn^{3+} . O Mn^{3+} é estabilizado pelo ácido orgânico, e o complexo de ácido orgânico Mn^{3+} formado atua como oxidante ativo (CHENG et al. 2007).

A enzima lignina peroxidase (E.C. 1.11.1.14) é uma glicoproteína composta por 20-30% de açúcar, possui ferro como grupo prostético e é dependente de H_2O_2 para iniciar a catálise. A enzima é produzida extracelularmente durante o metabolismo secundário do fungo, pela escassez de substrato (BARRETO & DE MENEZES, 2015). Descoberta em 1984, em culturas de *Phanerochaete chrysosporium* (TIEN & KIRK, 1984), a lignina peroxidase apresenta faixa de pH 3,0 considerado ótimo para atividade enzimática.

As enzimas lignolíticas produzidas por fungos são de interesse econômico, ecológico e industrial, devido à eficiência em degradar compostos complexos. A lignina é um dos biopolímeros mais recalcitrantes na natureza. Assim, se os fungos de podridão branca podem descompactar um aglomerado complexo como a lignina

(Fig 3), também podem atuar em poluentes recalcitrantes específicos e mineralizar moléculas complexas a CO_2 e H_2O , possibilitando então um melhor resultado no tratamento, sem deixar resíduos tóxicos (DURAN & ESPÓSITO, 2000; GIANFREDI & RAO, 2004).

Espécies fúngicas coletadas em florestas tropicais apresentam capacidade de biorremediação ainda melhores comparados a organismos de origem temperada atualmente estudados, exibindo mais tolerância à temperatura e ambientes especializados (EVANS & HEDGER, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho de pesquisa foi realizado no Laboratório de Basidiomycota (LabB), Laboratório I do PPG Biologia de Fungos, Laboratório de Biotecnologia (Biotec) localizados no Departamento de Micologia e no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial (LAMAI) localizado no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

3.1 FUNGOS UTILIZADOS

Foram utilizados 145 espécimes provenientes de coletas realizadas entre os anos de 2010 a 2014 em ambientes arbóreo-arbustivos do Norte e Nordeste do Brasil. Fragmentos dos espécimes foram mantidos em tubos de 1,5 mL a 4°C e depositados no Banco de Fragmentos do Departamento de Micologia da UFPE (BDNA) do Laboratório de Basidiomycota do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

O material foi previamente identificado morfológicamente por taxonomistas do Laboratório de Basidiomycota do Departamento de Micologia e posteriormente confirmado por sequenciamento das regiões ITS e LSU, seguindo o usual para este grupo (GOMES-SILVA et al. 2010; VERMA et al. 2018; XAVIER et al. 2020).

3.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS

Fragmentos do basidioma foram assepticamente tratados utilizando uma solução de hipoclorito de sódio a 3%, por um minuto e enxaguado com água

destilada autoclavada e transferidos para tubos contendo ágar Saboraud acrescido de cloranfenicol (100 mg/mL). Os tubos foram incubados em temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) por um período de 7 a 12 dias ou até o desenvolvimento do micélio (CAVALCANTI, 1972, STALPERS, 1978). Após o crescimento micelial, os cultivos foram repicados em meio seletivo para detecção de enzimas fenoloxidasas. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

3.2.1 Testes qualitativos de detecção de fenoloxidasas

A seleção qualitativa foi determinada pelo teste de Bavendamm que possibilitou reconhecer espécimes produtores de fenoloxidasas (DAVIDSON et al. 1938). Blocos de gelose do micélio com 5 mm de diâmetro foram retirados das bordas de colônias com 5 dias de crescimento e transferidos para placas de Petri contendo 10 mL de meio extrato de malte (15 g/L), ágar (20 g/L) e ácido tânico (5 g/L). O material foi incubado e verificado a formação de halo marrom, considerado como reação positiva para produção de fenoloxidasas (NOBLES, 1965). Todo o procedimento foi realizado em triplicata. A detecção de enzima foi mensurada mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, denominado índice enzimático. O halo foi aferido com paquímetro digital em milímetros (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975; DA SILVA et al. 2019). O Índice Enzimático (IE) foi calculado pela fórmula: $\text{IE} = \text{Diâmetro do halo} / \text{Diâmetro da colônia}$. O valor do Índice Enzimático (IE) corresponde à média de 3 repetições.

3.2.2 Ensaios de descoloração do índigo carmin em meio líquido

O corante índigo carmin foi obtido comercialmente da empresa Sigma (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA Aldrich) e utilizado na concentração de 50 mg/L. O experimento foi realizado em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio Kirk sem esterilização (KIRK & FARRELL, 1987) acrescido de 5 discos de micélio fúngico (0,5 mm de diâmetro). Os frascos foram mantidos por 5 dias a $\pm 28^{\circ}\text{C}$ sob condição estática. Alíquotas de 2 mL foram retiradas do caldo e centrifugadas a 1500 rpm por 15 min a 4°C . A porcentagem de descoloração foi mensurada em espectrofotômetro (HITACHI U.5100) no comprimento de onda de 640 nm. Como controle, foi utilizado meio Kirk acrescido do corante sem inóculo

fúngico. Todo o experimento foi realizado em triplicata. O percentual de descoloração foi calculado de acordo com a fórmula (1), na qual $D\%$ = porcentagem de descoloração, $AbsT0$ = absorbância inicial e $AbsTx$ = absorbância considerando o tempo. O caldo descolorido foi utilizado para quantificar a produção das enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase.

3.2.3 Ensaio quantitativo de detecção das enzimas Lac, LiP e MnP em meio líquido

A quantificação enzimática foi realizada em meio líquido. Cinco blocos de gelose com 3 mm de diâmetro do cultivo com 5 dias de crescimento foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio Kirk modificado, obtido a partir 0,1 g de extrato de levedura; 0,2 g de KH_2PO_4 ; 0,05 g de $MgSO_4$; 0,016 g de $MnSO_4$ e 0,049 g $CuSO_4$ p/L (YAMANAKA et al. 2008). Os frascos foram incubados a 28°C por 5 dias sob condição estática. Alíquotas de 2 mL foram retiradas do caldo e centrifugadas a 1000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado nos testes quantitativos de atividade para as enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase.

3.3 DETECÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE

A atividade da lacase foi determinada pelo monitoramento da oxidação de uma solução de ABTS [(2,2'-azino-bis-3-etilbentiazolina-6-sulfônico)] a 1 mM. Foram utilizados 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM (pH 5,0), 0,1 mL de água e 0,5 mL de extrato. A reação foi monitorada em intervalo de 10 s e 5 min através da leitura de absorbância em comprimento de onda de 420 nm em espectrofotômetro (HITACHI U.5100). A atividade foi calculada com base na absortividade molar do ABTS ($\epsilon_{420nm} = 36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μmol do produto formado por minuto (BOURBONNAIS et al. 1997).

3.3.1 Detecção da atividade enzimática de lignina-peroxidase

A atividade de lignina peroxidase foi determinada através da oxidação da mistura composta por 0,22 mL de ácido tartárico 50 mM em pH 2,5; 0,2 mL de álcool veratrílico 10 mM, 0,8 mL de peróxido de hidrogênio 5 mM e 0,5 mL de extrato

enzimático. A reação foi monitorada em espectrofotômetro (HITACHI U.5100) em comprimento de onda de 310 nm ($\epsilon_{310\text{nm}} = 9.300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 μmol do produto por minuto (TIEN & KIRK, 1984).

3.3.2 Detecção da atividade enzimática de manganês-peroxidase

A atividade de manganês-peroxidase foi determinada pela oxidação de 0,5 mL de vermelho de fenol a 0,1% (a dissolução do vermelho de fenol em água foi feita pelo ajuste continuado do pH em 7,4) em 1,5 mL de tampão succinato de sódio 20 mM (pH 4,5), 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0,25 mL de albumina 1%, 0,5 mL de MnSO_4 1 mM, 0,5 mL de extrato e 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM. Em intervalos de 1 a 5 minutos, foi retirado 1 mL da mistura contida no tubo de ensaio e adicionado 65 μL de hidróxido de sódio 6,5 M para interromper a reação e medir a absorbância em 610 nm no espectrofotômetro. A atividade enzimática foi calculada com base na absortividade molar do vermelho de fenol oxidado ($\epsilon_{610\text{nm}} = 22.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μmol do produto formado por minuto (KUWAHARA et al. 1984). Todo procedimento foi realizado em triplicata e o resultado foi a média entre as repetições.

4 RESULTADOS

4.1 FUNGOS UTILIZADOS

Dos 145 espécimes, 18 espécimes foram purificados e 12 foram depositados na Coleção de Cultura do Departamento de Micologia (Micoteca URM) (Tab.1). Dos 18 espécimes, 10 apresentaram os melhores resultados no teste qualitativo de detecção de fenoloxidasas (Tab. 2, Fig. 4, Apêndice A) e, destes, foram realizadas análises moleculares. As sequências geradas foram depositadas no GenBank (Tab. 1).

Tabela 1 – Espécies de Agaricomycetes depositadas na Micoteca URM e as sequências geradas de ITS e LSU depositadas no GenBank.

Espécimes	Micoteca (M)/Herbário (H)	ITS	LSU
<i>Amauroderma praetervisum</i> (Pat.) Torrend	URM (M) 8353	-	-
<i>Datronia caperata</i> (Berk.) Murrill	URM (H) 90338	-	-
<i>Fuscoporia</i> cf. <i>scruposa</i> (Mont.) Gibertoni & Oliveira-Filho	URM (H) 87880	-	-
<i>Fuscoporia semiarida</i> Lima-Júnior, CRS de Lira & Gibertoni	URM (H) 87879	-	-
<i>Hexagonia papyracea</i> Berk.	URM (M) 8114	-	-
<i>Perenniporia centrali-africana</i> Decock & Mossebo	URM (M) 8115	MW578792	MW553716
<i>Perenniporia centrali-africana</i> Decock & Mossebo	URM (M) 8352	MW578793	MW553717
<i>Phlebia ludoviciana</i> (Burt) Nakasone & Burds.	URM (M) 8112	MW578799	MW553722
<i>Pleurotus djamor</i> (Rumph. Ex Fr.) Boedijn	URM (M) 8113	MW578801	MW553723
<i>Polyporus</i> aff. <i>thailandensis</i> Sotome	URM (M) 8351	MW578794	-
<i>Polyporus arcularius</i> (Batsch) Fr.	URM (H) 89702	-	-
<i>Polyporus philippinensis</i> Berk.	URM (H) 87927	-	-
<i>Schizophyllum commune</i> Fr.	URM (M) 8116	-	-
<i>Schizophyllum commune</i> Fr.	URM (M) 8349	MW578796	MW553719
<i>Schizophyllum commune</i> Fr.	URM (M) 8020	MW578800	-
<i>Trametes lactinea</i> (Berk.) Sacc.	URM (M) 8350	MW578797	MW553720
<i>Trametes lactinea</i> (Berk.) Sacc.	URM (M) 8354	MW578798	MW553721
<i>Trametes villosa</i> (Sw.) Kreisel	URM (M) 8022	MW578795	MW553718

Fonte: A autora (2022).

4.2 TESTES QUALITATIVO DE DETECÇÃO DE FENOLOXIDASES

Dezoito espécimes foram purificados e apresentaram halo âmbar, indicativo de produção de enzimas pertencentes ao complexo fenoloxidasas. Os melhores resultados do teste de fenoloxidase (Tab.1), 10 linhagens, foram utilizados nos testes de descoloração e detecção de enzimas (Tab. 2, Apêndice A). O valor do Índice Enzimático (IE) corresponde a média de 3 repetições.

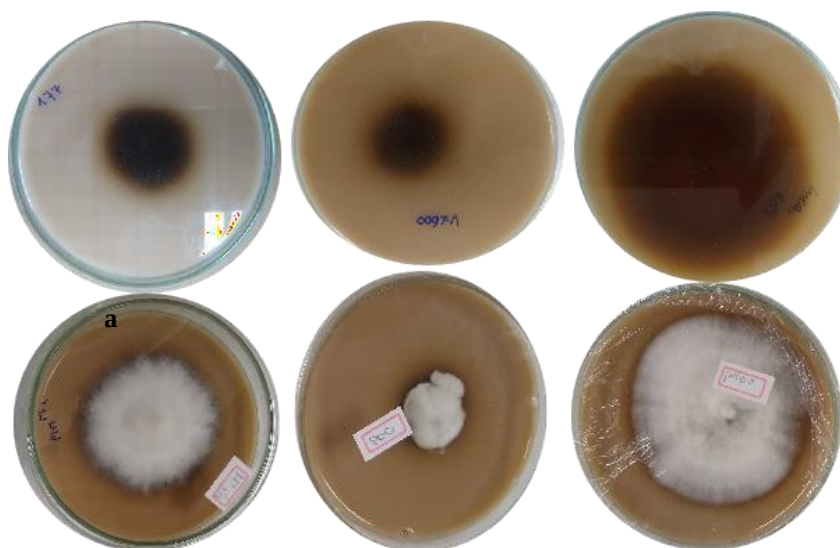
Tabela 2.Detecção de presença de fenoloxidasas nas espécies de Agaricomycetes e Índice enzimático (IE) dos espécimes utilizados

Espécies	Diâmetro (mm)		IE
	Colônia	Halo	
<i>Amauroderma praetervisum</i> URM 8353	20	30	1,5
<i>Datronia caperata</i> URM 90338	15	20	1,1
<i>Fuscoporia</i> cf. <i>scruposa</i> URM 87880	28	30	1,0
<i>Fuscoporia semiarida</i> URM 87879	17	22	1,3
<i>Hexagonia papyracea</i> URM 8114	14	15	1,0
<i>Perenniporia centrali-africana</i> URM 8115	8	10	1,2
<i>Perenniporia centrali-africana</i> URM 8352	12	14	1,1
<i>Phlebia ludoviciana</i> URM 8112	18	30	1,6
<i>Pleurotus djamor</i> URM 8113	20	20	1,0
<i>Polyporus aff. thailandensis</i> URM 8351	28	30	1,0
<i>Polyporus leprieuri</i> URM 86339	28	30	1,0
<i>Polyporus philippinensis</i> URM 87927	54	60	1,1
<i>Porogramme albocincta</i> URM 89783	42	42	1,0
<i>Schizophyllum commune</i> URM 8020	13	15	1,1
<i>Schizophyllum commune</i> URM 8116	15	18	1,2
<i>Schizophyllum commune</i> URM 8349	17	20	1,1
<i>Trametes lactinea</i> URM 8350	40	70	1,7
<i>Trametes lactinea</i> URM 8354	40	60	1,5
<i>Trametes villosa</i> URM 8022	40	66	1,6

Fonte: A autora (2022).

De acordo com a literatura, o índice enzimático satisfatório é de $IE \geq 2,00$ (OLIVEIRA et al. 2006). Entretanto, Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) concluíram, em seus estudos, que o valor do índice enzimático não foi um parâmetro adequado de avaliação na tentativa de comparar atividades entre diferentes linhagens, mas que seria uma medida útil para selecionar linhagens de uma mesma espécie ou como um parâmetro simples e rápido para selecionar mutantes produtores de enzimas pertencentes ao complexo (AUER et al. 2014). Os resultados do presente estudo corroboram com a afirmação de Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004), pois, apesar dos valores do índice enzimático estar abaixo de 2,0, houve a formação do halo, comprovando a produção de enzimas pertencentes ao complexo fenoloxidasas. O verso e o reverso dos espécimes a: URM 8020, b: URM 8113 e c: URM 8350 apresentaram formação de halo indicativo à produção de fenoloxidasas (Fig.4).

Fig. 4 Verso e reverso da formação do halo de detecção à produção fenoloxidasas: a URM 8020; b URM 8113 e c URM 8350



Fonte: Autora (2022).

4.3 ENSAIOS DE DESCOLORAÇÃO DO ÍNDIGO CARMIM EM MEIO SÓLIDO E LÍQUIDO

Onze isolados demonstraram capacidade de descoloração do índigo carmim, com percentuais entre 56% a 96% (Tab. 3, Apêndice A), nas condições do experimento. Os percentuais observados são similares aos encontrados em estudos

de seleção de linhagens promissoras para degradação de corantes sintéticos (NOVOTNÝ et al. 2001; SATHIYA et al. 2007; LYRA et al. 2009; YUAN et al. 2012; CHOI 2021).

Tabela 3 - Percentual de descoloração do índigo carmin em meio líquido por 5 dias.

Linhagens	URM	%D
<i>Datronia caperata</i>	90338	60,00%
<i>Perenniporia centrali-africana</i>	8115	79,00%
<i>Phlebia ludoviciana</i>	8112	56,00%
<i>Pleurotus djamor</i>	8113	76,00%
<i>Polyporus aff. thailandensis</i>	8351	72,00%
<i>Polyporus philippinensis</i>	87927	78,00%
<i>Schizophyllum commune</i>	8349	78,00%
<i>Schizophyllum commune</i>	8116	82,00%
<i>Trametes lactinea</i>	8350	81,40%
<i>Trametes lactinea</i>	8354	85,09%
<i>Trametes villosa</i>	8022	96,11%

Fonte: A autora (2022).

4.3.1 Gênero *Datronia*

O isolado de *D. caperata* apresentou percentual de descoloração de 60% (Tab. 2), entretanto, abaixo dos outros Agaricomycetes e próximo aos resultados observados em outros trabalhos relacionados ao gênero. Tekere et al. (2001) obtiveram resultados de descoloração utilizando *D. concentrica* frente aos corantes azul dextrano (AD), violeta cristal (VC), azul de bromofenol (AB) e vermelho cresol (VCr3). Os autores utilizaram uma escala de magnitude de 0-5 para determinar a intensidade de descoloração das linhagens testadas, os resultados obtidos foram AD-3; VC-2; AB-5 e VCr-3. Lyra et al. (2009) observaram resultados similares quando testaram uma linhagem de *D. caperata* para descoloração do azul de bromofenol (61,7%). Outros corantes também foram testados utilizando a mesma linhagem e os percentuais observados foram de 74,3% azul de metileno, 20,3% vermelho do congo, 14,1% laranja de metila, 19,7% verde de metila. Abrahão et al. (2008) testaram o caldo enzimático de *D. caperata* SP381992 para descoloração do laranja II e obtiveram os percentuais de 1,5% na 1ª hora de experimento, 8,2% em 7h, 14,5% em 24h e 27,1% em 48h. Os autores atribuíram a descoloração à atividade e produção das ligninases LiP (6,2 Uml⁻¹) e MnP (6,2 Uml⁻¹) observadas no

experimento em estado sólido tendo o farelo de trigo como substrato. *Datronia* sp. foi utilizada para descoloração dos corantes reativos (RBBR) e Reactive Black 5 (RB5) e o percentual observado foi de 86% para RBBR e 88,01% para RB5 no sétimo dia de experimento (VAITHANOMSAT et al. 2010). Apesar dos poucos relatos de estudos para descoloração de corantes utilizando espécies do gênero *Datronia*, os resultados até então observados, evidenciam a capacidade das linhagens utilizadas, enquanto trabalhos constataam a produção de Lac e MnP por espécies de *Datronia* (TEKERE et al. 2001; VAITHANOMSAT et al. 2010).

4.3.2 Gênero *Polyporus*

As espécies *Polyporus* também são pouco estudadas para a remoção de corantes. Os resultados obtidos para *P. philippinensis* e *P. aff. thailandensis*, provavelmente, são os primeiros relatos para o Brasil e para o mundo, até o momento, em testes de descoloração de corante utilizando essas espécies.

Chander e Arora (2005) testaram *P. sanguineus* para descoloração Poly R-478. Dayaram e Dasgupta (2008) verificaram que o caldo enzimático de *P. rubidus* descoloriu 70 a 100% dos corantes Remazol azul reativo, laranja reativo e preto em oito dias. Lucas et al. (2008), testaram a capacidade de descoloração de *P. brumalis* e obtiveram um percentual de descoloração de 52,2% frente a cinco corantes azo e dois corantes de antraquinona, enquanto Hadibarata e Nor (2014) observaram que *Polyporus* sp. S133 descoloriu o corante de amarantho em 72 h. Przystas et al. (2018) utilizaram uma linhagem de *P. picipes*, que foi capaz de descolorir quase completamente os corantes verdes e azuis Evans entre 24 e 48 h. Wehaidy et al. (2018) descobriram que o extrato enzimático bruto de *P. durus* descoloriu 100% do azul reativo 19, azul ácido 225 e violeta reativo 5 após 90 min de incubação. No entanto, *P. sanguineus*, *P. rubidus* e *P. durus* pertencem atualmente ao gênero *Polyporus*, enquanto a identidade de *Polyporus* sp. não pode ser confirmada, demonstrando a necessidade de atualização taxonômica desses isolados. O caldo enzimático de *P. tenuiculus* SP381977 foi testado para descoloração do laranja II em sistema sólido de fermentação. O percentual de descoloração observado em 1h foi de 1,7%, em 7 h 5,3%, em 24h 6,4% e em 48h 7%. A descoloração foi atribuída à produção de lacase, que foi de 235,3 U ml⁻¹. Sobre a produção de enzimas diversos trabalhos relatam a produção de enzimas por espécies de *Polyporus* (VARES et al.

1994; KIM et al. 2012; NAKADE et al. 2013; RYU et al. 2013; SERGENTANI et al. 2016).

4.3.3 Gênero *Pleurotus*

Trabalhos anteriores demonstram a capacidade representantes do gênero para descoloração de corantes (NOVOTNÝ et al. 2001; SATHIYA et al. 2007; KUMJADIA et al. 2016; AKPINAR & UREK 2017). Os resultados encontrados (Tab. 3, Fig. 5), corroboram com os da literatura citada. A linhagem testada no presente trabalho apresentou crescimento considerável em meio de cultivo contendo corante (Fig. 5), o que evidencia a adaptabilidade da linhagem ao substrato.

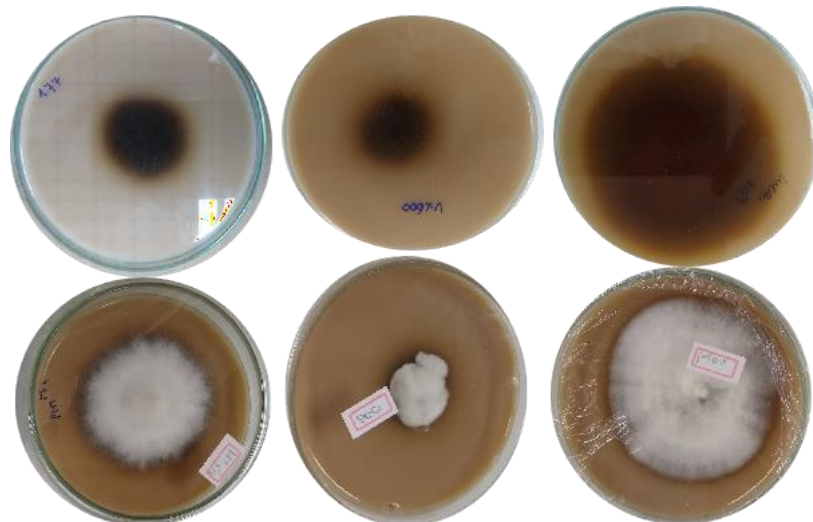


Fig. 5 *Pleurotus djamor*: **a**: detecção de fenoloxidasas em meio ácido tânico; **b**: crescimento em placa com índigo carmim; **c**: formação de halo em ácido gálico

Fonte: Autora (2022).

4.3.4 Gênero *Phlebia*

O resultado para descoloração para linhagem de *P. ludoviciana* (Tab. 3) foi considerado satisfatório diante das condições do experimento e comparado a outros trabalhos que utilizaram linhagens do gênero. Kirby et al. (2000) relataram que a lacase de *P. tremellosa* descoloriu oito corantes têxteis apresentando percentual de 96% em 14 dias sob condição estática. *P. radiata* descoloriu o corante

antraquinônico Basic Blue 22 (CI 61512) em cinco dias de experimento (JAROSZ-WILKOLAZKA et al. 2002).

Lucas et al. (2008) testaram várias espécies do gênero quanto à capacidade de descoloração de cinco corantes azo, dois corantes de antraquinona e uma mistura de corantes durante três dias de incubação em microplacas. A capacidade de descoloração observada foi de: *P. livida* 24,99%; *P. ludoviciana* 38,22%; *P. radiata* 24,93%; *P. subcalcea* 21,64%; *P. subochracea* 48,22%; *P. subserialis* 65,15%. Chander e Arora (2014) observaram um percentual de descoloração de 57% para *P. brevispora* e 60% para *P. floridensis* em testes utilizando o corante Poly R-478 no oitavo dia de experimento. Kumar et al (2018) testaram *P. acerina* para descoloração de vermelho congo e preto de eriocromo. O isolado apresentou um percentual de descoloração de até 92,4% para o vermelho congo e um máximo de 50% de descoloração do preto de eriocromo. Das espécies testadas nestes estudos, várias não mais pertencem ao gênero *Phlebia*, sendo necessária revisão taxonômica para melhor identificação desses isolados.

O percentual de descoloração observado no presente trabalho (Tab. 3) foi similar aos percentuais observados por outros autores. A produção de Lac é apontada como principal fator de descoloração de corantes por espécies de *Phlebia* (KIRBY et al. 2000; ARORA & GIL, 2001; ROBINSON et al. 2001; HERMANN et al. 2020).

4.3.5 Gênero *Perenniporia*

Os resultados aqui obtidos (Tab. 3) pela linhagem de *P. centrali-africana* superaram o resultado observado por Lucas et al. (2008) em experimento de descoloração de cinco corantes azo e dois corantes de antraquinona utilizando espécies do gênero. Os resultados observados apresentaram percentuais de 61,9% para *P. tephropora*, 59,5% para *P. ochroleuca* e 58,5 % para *P. medulla-panis*. Os resultados foram observados após três dias de experimento. *Perenniporia subacida* descoloriu o corante antraquinônico Basic Blue 22 (CI 61512) após oito dias de experimento (JAROSZ-WILKOLAZKA et al. 2002).

4.3.6 Gênero *Schizophyllum*

Tang et al. (2011) observaram que *Schizophyllum* sp. F17 descoloriu 92,4% de Vermelho Congo, 93,4% de Vermelho de Alizarina, 83,6% de Vermelho Neutro e

70,5% de Violeta após 120h. *Schizophyllum commune* IBL-06 foi usado para descolorir o corante vermelho brilhante solar 80. No estudo de triagem inicial, a descoloração máxima foi de 84,8% em sete dias de experimento, sob agitação. Ao otimizar a cultura, houve descoloração de 100% em três dias de experimento. Os autores atribuem à descoloração com a formação máxima de LiP (944 U/mL) seguido pelas atividades de MnP e Lac (ASGHER et al. 2013).

4.3.7 Gênero *Trametes*

No presente estudo, foi observado que a linhagem de *T. villosa* testada apresentou percentual de descoloração de 96%, enquanto *T. lactinea* apresentou 85% ao 5º dia de experimento em condição estática (Tab. 2, Apêndice A). Resultados semelhantes foram observados por Machado et al. (2006) quando testaram linhagem de *T. villosa* frente a 28 corantes reativos. Entretanto, diferente dos resultados obtidos no presente estudo que ocorreu ao 5º dia, os autores observaram que a linhagem de *T. villosa* descoloriu todos os corantes entre o 7º e o 21º dia, sob agitação a 28 °C.

Couto et al. (2004) estudaram a descoloração do corante índigo carmin por *T. hirsuta* em biorreator de leito fixo e constataram a degradação quase total do corante em apenas três dias. Estes atribuíram à descoloração do corante índigo carmin e à produção da enzima lacase associada a outros mecanismos.

Sathiya et al. (2007) relataram que *T. hirsuta* removeu 56,6% do azul CA a 50 mg/L no 10º dia de incubação, enquanto Lucas et al. (2008) observaram percentual de descoloração de 64.6% para *T. versicolor*, 53.4% para *T. villosa* e 62,5% para *Coriolopsis polyzona* (= *T. polyzona*) quando as linhagens foram testadas com cinco corantes azo e dois corantes de antraquinona.

Lyra et al. (2009) que *T. membranacea* foi capaz de remover 99,2% do azul de bromofenol e 71,8% do azul de metileno no 10º dia de experimento sob agitação e Grassi et al. (2011) que *T. trogii* BAFC 463 removeu 8% do índigo carmin na primeira meia hora.

Figura 6 – Descoloração do índigo carmim por *Trametes villosa* em 5 dias de experimento em condição estática.



Fonte: A autora (2022)

A capacidade de duas linhagens de *T. versicolor* em descolorir o corante azo xilidina e o trifenilmetano verde malaquita foi avaliada por Diorio et al. (2021). Os testes foram realizados em biorreator e, após a primeira fase (100 min) foi atingido o percentual de 73,5% de verde malaquita e 40% de xilidina, enquanto no final da segunda fase (240 min) foi observada uma descoloração de 97% de verde malaquita e 52% de xilidina.

Uribe-Arizmendi et al. (2020) obtiveram resultados em estudos utilizando *T. polyzona* que descoloriu os corantes amaranço, azul denim e laranja G. Os resultados obtidos indicam que *T. polyzona* possui alta eficiência de descoloração de corantes têxteis, uma vez que a taxa de descoloração observada em todos os testes foi maior que 90%.

Os resultados do presente trabalho (Tab. 3) foram melhores que alguns referenciados, o que denota a eficácia das linhagens testadas.

Espécies de *Trametes* são bastante utilizadas em estudos de biorremediação, talvez pelo fato das linhagens apresentarem um bom desenvolvimento em condições controladas de cultivo, devido à plasticidade e adaptabilidade desses organismos ao substrato. Isso sugere que as linhagens desse gênero são uma provável ferramenta biológica a ser utilizada em larga escala.

4.4 ENSAIO QUANTITATIVO DE DETECÇÃO DA LAC, LIP E MNP EM MEIO LÍQUIDO

Para os testes de detecção de enzimas, 10 espécimes foram selecionados, todavia, devido às condições sanitárias impostas pela pandemia da COVID-19, o teste de detecção enzimática foi realizado em seis espécimes (Tab. 4, Apêndice A).

Em todos os espécimes testados, foi observada a produção de Lac e MnP, exceto em *Perenniporia centrali-africana* (URM 8115) em que foi detectada LiP, sendo esta a única espécie em que foi observada a atuação da enzima. Um estudo

de Ben Younes et al. (2007) demonstrou que a lacase purificada de *Perenniporia tephropora* apresentou resultado positivo para descoloração de corantes utilizados nas indústrias têxteis, incluindo rosa neolane, azul neolane e remazol azul brilhante R (RBBR).

Tabela 4 – Detecção de lacase (Lac), lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP). expressa em unidade de enzima por Litro(U/L); NR= teste de detecção enzimática não realizado; (-) Não observado.

Linhagens	URM	Lac	LiP	MnP
<i>Perenniporia centrali-africana</i>	8115	NR	17,219	-
<i>Pleurotus djamor</i>	8113	2,10	-	14,349
<i>Schizophyllum commune</i>	8349	0,52	-	5,114
<i>Trametes lactinea</i>	8350	0,25	-	3,280
<i>Trametes lactinea</i>	8354	0,75	-	3,677
<i>Trametes villosa</i>	8022	27,80	-	3,408

Fonte: A autora (2022).

A produção de enzima parece ter relação direta com a cepa utilizada, as condições de cultivo e o tipo de substrato (WESEMBERG et al. 2003; LEVIN et al. 2012; An et al. 2021). Mecanismos enzimáticos apresentam complexidade que precisam ser elucidadas. Há relatos de estudos em que não foi observado e/ou detectado atividade da Lip (LEVIN et al. 2004; RIGAS, 2006). Em testes de descoloração para os corantes azo vermelho congo, Laranja G e Laranja IV, foi possível observar a atuação da MnP purificada de *Schizophyllum sp.* F17, entretanto a atividade enzimática para LiP foi pouco detectável (CHENG et al. 2007). Asgher et al. (2013) detectaram as enzimas LiP, MnP e Lac secretadas por *S. commune* IBL-06 e relatam que a LiP apresentou valores de 507 U/mL, sendo a principal enzima registrada, seguida por MnP e Lac. Irshad e Asgher (2011) observaram em *S. commune* BL-06 a produção de Lac, MnP e LiP em testes de otimização. Cheng et al. (2007) detectaram MnP em *S. commune* F17. Os resultados aqui apresentados (Tab. 4) foram similares aos dos trabalhos referenciados, comprovando a eficácia das enzimas no processo de descoloração.

Estudos relatam a produção de enzimas lignolíticas por espécies do gênero *Pleurotus*. De Menezes et al. (2009) detectaram Lac e MnP em *Pleurotus* spp. Os melhores resultados para Lac foram observados na linhagem *Pleurotus* sp BCCB068, com 6,23 U/L no 15º dia, e na linhagem *P.sajor-caju*, com 3,52 U/L no 10º dia de incubação, enquanto manganês peroxidase foi detectada em *Pleurotus* sp. BCCB068 (31.56 U/L) no 5º dia e 23,58 U/L e *Pleurotus 'tailandia'* no 15º dia de incubação. Zancan et al. (2015) detectaram Lac em linhagens de *Pleurotus* spp: a linhagem P068 apresentou o maior valor de atividade obtida no dia 75, com 1,80 U/L e a linhagem P001 a maior atividade detectada foi no 90º dia, com o valor de 1,90 U/L. Vale salientar que *P. 'tailandia'* não existenas bases de dados (mycobank.org;

indexfungorum.org), sendo necessária revisão taxonômica para melhor identificação deste isolado. Mallak et al. (2020) testaram a capacidade degradativa de *P. ostreatus* e *Trametes versicolor*. *Pleurotus ostreatus* apresentou maior potencial e atividade lignolítica que *T. versicolor*. An et al. (2021) observaram produção de lacase em *P. pulmonarius*, mas atividade de MnP não foi detectada para a linhagem testada nas condições do experimento. Souza et al. (2011) detectaram em *P. pulmonarius* produção de lacase quando testado para degradação de pentaclofenol. Os resultados obtidos em *P. djamor* para Lac e MnP (Tab. 4) são considerados expressivos, tanto na quantidade de unidade de enzima produzida como no tempo de produção, quando comparados aos resultados da literatura. Em relação ao gênero *Perenniporia*, Si et al. (2013) purificaram uma peroxidase de *P. subacida* que apresentou capacidade em descolorir corantes. No presente estudo, o resultado para LiP (Tab. 4) foi considerado muito bom e, até o momento, representa o primeiro relato da produção desta enzima para a espécie no mundo.

Espécies do gênero *Trametes* são modelo de produção de enzima em diversos estudos (MACHADO et al. 2005; MECHICHI et al. 2006; COUTO 2009; TAVARES et al. 2017; ORTIZ-MONSALVE et al. 2019; URIBE-ARIZMENDI et al. 2020; HAPUARACHCHI et al. 2021). Sergeantani et al. (2016) observaram a capacidade de produção de enzimas celulolíticas, xenolíticas e lignolíticas em espécies de *Trametes*. Os níveis mais altos de celulasas foram observados em *T. versicolor* ATHUM 6541, *T. gibbosa* ATHUM 6816 e *T. trogii* ATHUM 6579, enquanto a atividade de xilanase foi detectada em *T. pubescens* ATHUM 6529 (4,7 U/mL¹) e *T. versicolor* (4,4 U U/mL¹). *Trametes gibbosa* e *T. trogii* apresentaram o maior nível de lacase (8 U/mL¹). Não foram detectadas atividades LiP nem MnP nas linhagens estudadas. Damasceno et al. (2019) constataram a produção de lacase na degradação de HPAs (hidrocarboneto policíclico aromáticos) em *T. cubensis*. Os resultados do presente estudo (TAB 4) são considerados bons em relação aos estudos realizados até o momento, tendo em vista termos conseguido um percentual de descoloração em pouco tempo de experimento nas condições apresentadas (APÊNDICE A).

Em todos os trabalhos, a eficiência na descoloração nem sempre está associada a altos níveis enzimáticos. Apesar dos diferentes níveis de enzimas terem sido detectados, o percentual de descoloração observado é aproximado ao dos valores de referência. Estudos realizados indicam que os níveis de enzimas lignolíticas não parecem ser um fator limitante para descoloração de corantes (MOREIRA-NETO et al. 2011). Como observado em estudos anteriores, MnP de diferentes fungos podem apresentar propriedades diferentes e percentuais de

descoloração aproximados ou não, pois os mecanismos enzimáticos de cada cepa diferem. Além disso, os fatores que contribuem ou não à produção e/ou detecção de enzimas ainda são bem pouco estudados (CHENG et al. 2007), sendo necessário estudos aprofundados e complementares.

5 CONCLUSÕES

A partir de testes com 11 espécimes de nove espécies, é possível concluir que:

- A taxa de isolamento e purificação entre Agaricomycetes foi considerada baixa e que cada espécime apresenta particularidades para o cultivo.
- A produção de enzimas pertencentes ao complexo fenoloxidase está diretamente relacionada à capacidade de descolorir o índigo carmim.
- A produção enzimática depende da composição do substrato, sendo variável de acordo com cada linhagem. Por isso, nem todos isolados apresentaram produção enzimática nas condições do atual experimento.
- Os resultados obtidos com as linhagens do presente trabalho foram considerados bons e, em alguns casos, bem acima dos obtidos em outros trabalhos.
- A bioprospecção de fungos tropicais é necessária para conhecer linhagens promissoras à aplicação em biorremediação e biotecnologia.

REFERÊNCIAS

- ABIT, **Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de confecção**. Disponível em: <<https://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor>>. Acesso em: 27 de março 2020.
- ADAM, W.; LAZARUS, M.; SAHA-MOLLER, C.R.; WEICHOLD, O.; HOCH, U.; HARING, D.; SCHREIER, P. Biotransformation with Peroxidase In: Faber, k. (eds) Biotransformation. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, 63, 73-107, 1999.
- AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE. Relatório de monitoramento de bacias hidrográficas do Estado de Pernambuco - 2019. Recife: **CPRH**. 200p. 2020.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, 1729-1738, 2011.
- AHMAD, Akil et al. Recent advances in new generation dye removal technologies: novel search for approaches to reprocess wastewater. **RSC advances**, v. 5, n. 39, p. 30801-30818, 2015.
- AKPINAR, M.; OZTURK, U.R. Induction of fungal laccase production under solid state bioprocessing of new agroindustrial waste and its application on dye decolorization. **Biotechnology**, v. 7, p. 1-10, 2017.
- AKHTAR, N.; MANNAN, M.A. Mycoremediation: Expunging environmental pollutants **Biotechnology Reports** v.26, p. e00452, 2020.
- ALI, H. Biodegradation of synthetic Dyes, a Review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 213, p. 251-273, 2010.
- ALMEIDA, P.H. et al. Decolorization of remazol brilliant blue R with laccase from *Lentinus crinitus* grown in agro-industrial by-products. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 3463-3473, 2018.
- AN, Q. et al. Evaluation of the Capacity of Laccase Secretion of Four Novel Isolated White-rot Fungal Strains in Submerged Fermentation with Lignocellulosic Biomass: **BioResources**, v. 16, n. 4, p. 6706-6722, 2021.
- ASGHER, M. et al. Recent developments in bioremediation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, v. 19, p. 771-783, 2008.
- ASGHER, M. YASMEEN, Q.; IQBAL, H.M.N. Enhanced decolorization of Solar brilliant red 80 textile dye by an indigenous white-rot fungus *Schizophyllum commune* IBL-06. **Saudi Journal Biology Science**, v. 20, n. 4, p. 347-352, 2013.
- ARORA, D.S.; GILL, P.K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. **Enzyme and microbial technology**, v. 28, n. 7-8. p. 602 605, 2001.
- AUER, C.G. et al. Atividades degradativas de celulose e de fenóis por fungos isolados de acículas de *Pinus taeda*. **Floresta, Curitiba, PR**, v. 44, n. 2, p. 179-184, 2014.
- BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Fungal laccases: occurrence and properties. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 2, p. 215-242, 2006.

BARRETO, W.J.B. et al. Biodegradação de uma mistura de corantes têxteis usando o fungo *Ganoderma* sp: um estudo cinético, **Química Nova**, v, 34, p. 568-572, 2011.

BARRETO, Andressa Ribas; DE MENEZES, Cristiano Ragagnin. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimáticofúngico. Revista **Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, p. 1365-1391, 2015.

BAVENDAMM, W. Über das vorkommen und den nachweis von oxydasen bei olzzerstorenden Pilzen. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v, 38, n.9/10, p. 257-276, 1928.

BENKHAYA, S.; M'RABET, S.; EL HARFI, A. A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes **Inorganic Chemistry Communications**, v. 115, p. 107891, 2020.

BEN YOUNES, S.; MECHICHI, T.; SAYADI, S. Purification and characterization of the laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolourization of synthetic dyes. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 4, p. 1033-1042, 2007.

BERRADI, M. et al. Textile finishing dyes and their impact on aquatic environs. **Heliyon**, v. 5, n. 11, p. e02711, 2019.

BLANCHETTE, R.A. Degradation of the lignocellulose complex in wood **Canadian Journal of Botanic**, v. 73, n. S1, p. 999-S1010, 1995.

BORCHERT, M.; LIBRA, J.A. Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. **Biotechnology and bioengineering**, v. 75, n. 3, p. 313-321, 2001.

BOUACEM, K. et al. Purification and characterization of two novel peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta* strain CX-9. *International journal of biological macromolecules*, v. 106, p. 636-646, 2018.

BOURBONNAIS, R. et al. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. **Applied and environmental microbiology**, v, 63, n. 12, p. 4627-4632, 1997.

CARNEIRO, P.A.; ZANONI, M.V.B. Corantes Têxteis. In: Zanoni, VB, Yamanaka H, Corantes: Caracterização Química. Toxicológica, Métodos de Detecção e tratamento, 1ª Edição, São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016.

CAVALCANTI, M.A.Q. Caracteres culturais de alguns Basidiomycetes isolados em Recife. **Publicações do Instituto de Micologia da Universidade de Recife**, v. 694, p. 1-15, 1972.

CHANDER, M.; ARORA, D.S. Evaluation of some white-rot fungi for their potential to decolourise industrial dyes. **Dyes and Pigments**, v. 72, n. 2, p. 192-198, 2007.

CHANDER, M.; ARORA, D.S. Biodegradation of a Dye by Different White rot Fungi on a Novel Agro Residue Based Medium. **Lignocellulose**, v. 3, n. 1, p. 37-50, 2014.

CHENG, X.; JIA, R. et al. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Schizophyllum commune* sp. F17, and decolorization of azo dyes by the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 258-264, 2007.

CHOI, K.Y. A review of recent progress in the synthesis of bio-indigoids and their

biologically assisted end-use applications. **Dyes and Pigments**, v. 181, p. 108570, 2020.

CHOI, Kwon-Young. Discoloration of indigo dyes by eco-friendly biocatalysts. **Dyes and Pigments**, v. 184, p. 108749, 2021.

CHOWDHARY, P.; RAJ, Abhay; BHARAGAVA, Ram Naresh. Environmental pollution and health hazards from distillery wastewater and treatment approaches to combat the environmental threats: A review. **Chemosphere**, v. 194, p. 229-246, 2018.

CHOWDHURY, M.F. et al. Current treatment technologies and mechanisms for removal of indigo carmine dyes from wastewater: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 318, p. 114061, 2020.

CHRISTOPHER, L.P. YAO, B.; JI, Yun. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. **Frontier in Energy Research**, v. 2, p. 12, 2014.

COUTO, S.R. et al. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 1, p. 67-72, 2004.

COUTO, Susana Rodríguez. Dye removal by immobilised fungi. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 3, p. 227-235, 2009.

CRAGG, S.M. et al. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. **Current opinion in chemical biology**, v. 29, p. 108-119, 2015.

DAMASCENO, A.A. et al. Biodegradação de Derivados de Petróleo (HPAs) por fungo *Trametes Cubensis*. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, v. 8, n. 2, 2019.

DASHTBAN et al. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International journal of biochemistry and molecular biology**, v. 1, n. 1, p. 36-50, 2010.

DA SILVA, C.P. et al. Revista Agrária Acadêmica. Revista Agrária Acadêmica, p. 39.

DA SILVEIRA, L.R. et al. Biorremediação: considerações gerais e características do processo. **Engenharia Ambiental Pesquisa e Tecnologia**, v. 13, n. 2, 2016.

DAVIDSON, R.W. et al. Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. **Journal Agriculture Research**, v. 57, p. 683-695, 1938.

DAYARAM, P.; DASGUPTA, D. Decolorisation of synthetic dyes and textile wastewater using *Polyporus rubidus*. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, n. 6, p. 831-836, 2008.

DE ALMEIDA, É.J.R.; DILARRI, G.; CORSO, C.R. A Indústria têxtil no Brasil: uma revisão dos seus impactos ambientais e possíveis tratamentos para os seus efluentes. **BOLETIM DAS ÁGUAS**, Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), p. 1-18, 2016.

DE ANDRADE, F.V.; LOPES, E.N. Estudo de estabilidade do corante índigo carmim em condições de degradação forçada. **Revista Brasileira de Ciências da Vida**, v. 3, n. 2, 2015.

DEMENEZES, C.R.; SILVA, I.S.; DURRANT, L.R. Bagaço de cana: Fonte para

produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 5, p. 68-78, 2009.

DE OLIVEIRA, C.R.S. et al. Textile Re-Engineering: Eco-responsible solutions for a more sustainable industry, **Sustainable Production and Consumption**, 2021.

DESHMUKH, R. et al. Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. **Indian Journal of Microbiology**, 56(3):247-264, 2016.

DIORIO, L.A.; FRÉCHOU, D.M.S.; LEVIN, L. N. Removal of dyes by immobilization of *Trametes versicolor* in a solid-state micro-fermentation. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 53, n. 1, p. 3-10, 2021.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied catalysis B: environmental**, v. 28, n. 2, p. 83-99, 2000.

EICHLEROVÁ, I. et al. Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*; toxicological evaluation and morphological study. **Chemosphere**, v. 69, n. 5, p. 795-802, 2007.

EL ENSHASY, H.A. et al. Mycoremediation: Decolourization potential of fungal ligninolytic enzymes. In **Mycoremediation and Environmental Sustainability**, v.1, p. 69-104, 2017.

EVANS, CS.; HEDGER, J.N. Degradation of plant cell wall polymers. Degradation of plant cell wall polymers. In: British mycological society symposium series, p. 1-26 2001.

FARINAS, C.S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. Embrapa Instrumentação, ISSN: 1518-7179; p. 54, 2011.

FCEM, Febratex Group <https://fcem.com.br/noticias/historia-da-industria-textil-quais-os-avancos-ate-os-dias-atuais/> acesso em 16/01/2021 às 20:00

FORGACS, E.; CSERHÁTI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Environmental international**, v. 30, n. 7, p. 953-971, 2004.

GHEBRESLASIE Z. et al. Screening of Fungi Producing Ligninolytic Enzymes. **KKU Research Journal**, v. 2, p. 200-209, 2016.

GIANFREDA, L.; RAO, M.A. Potential of extracellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. **Enzyme and microbial technology**, v. 35, n. 4, p. 339-354, 2004.

GLENN, J.K.; GOLD, M.H. Purification and characterization of an extracellular Mn(II) - dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 242, n. 2, p. 329-341, 1985.

GOMES-SILVA, A.C. RYVARDEN, L.; GIBERTONI, T.B. Notes on *Trametes* from the Brazilian Amazonia. **Mycotaxon**, v. 113, n. 1, p. 61-71, 2010.

GONDIM, R.O. Caracterização das águas e efluentes em lavanderias de jeans no Agreste pernambucano. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

GORINI, A.P.F. O segmento de índigo. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, v. 10, p.

313-334, 1999.

GRASSI, E. et al. Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n.4, p. 635-643, 2011.

GRESSLER, M.; NIKOLAI, A.L. et al. Mind the mushroom: natural product biosynthetic genes and enzymes of Basidiomycota. **Natural Product Reports**, v. 38, n. 4, p. 702-722, 2021.

GUARATINI, C.C.; ZANONI, M.V.B. Corantes têxteis. **Química nova**, v. 23, p. 71-78, 2000.

HADIBARATA, T.; NOR, N.M. Decolorization and degradation mechanism of Amaranth by *Polyporus* sp. S133. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, p. 1879-1885, 2014.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HAPUARACHCHI, K.K. et al. A Review on Bioactive Compounds, Beneficial Properties and Biotechnological Approaches of *Trametes* (Polyporaceae, Polyporales) and a New Record from Laos. **Chiang Mai Journal Science**, v. 4, n. 3, p. 674-698, 2021.

HERMANN, K.L. et al. Discoloration of rhodamine b dye by white-rot fungi in solid bleached sulfate paperboard coated with polyethylene terephthalate: scale-up into non-sterile packed-bed bioreactor, **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 3, p. 103685, 2020.

HIBBETT, D. et al. Agaricomycetes. In: McLaughlin DJ, Spatafora JW(eds), *The Mycota. Part A. Systematics and Evolution*, **Springer Verlag**, v. 3, n. 2, p. 373-429, 2014.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores de desenvolvimento sustentável: Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais Coordenação de Geografia. **IBGE, Estudos e Pesquisas. Informação geográfica**, 10: ISSN 1517-1450, 2015.

IEMI 2021- Inteligência de mercado. Disponível em <https://www.iemi.com.br/iemi/> acesso em 14/03/2022.

IHSANULLAH, I. et al. Bioremediation of dyes: Current status and prospects. **Journal of Water Process Engineering**, v. 38, p. 101680, 2020.

IRSHAD, M.; ASGHER, M. Production and optimization of ligninolytic enzymes by white rot fungus *Schizophyllum commune* IBL-06 insolid state medium banana stalks, **African Journal of biotechnology**, v. 10, n. 79, p. 18234-18242, 2011.

JAROSZ-WILKOŁAZKA, Anna et al. Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 566-572, 2002.

KHAN, S.; MALIK, A. Toxicity evaluation of textile effluents and role of native soil bacterium in biodegradation of a textile dye. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 25, n. 5, p. 4446-4458, 2018.

- KIM, H. et al. Decolorization of remazol brilliant blue R by purified laccase of *Polyporus brumalis*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, p. 159-164, 2012.
- KIRAN, S. et al. Recent trends in textile effluent treatments: A review. **Advanced Materials for Wastewater Treatment**, v. 29, n. 29-49, 2017.
- KIRBY, N. et al. Decolorization of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. **FEMS Microbiology Letters**, n. 188, p. 93-96, 2000.
- KIRK, T.K. Effects Of Microorganisms On Lignin. **Annual Review of Phytopathology**, v. 9, n. 1, p. 185-210, 1971.
- KIRK, T. Kent; FARRELL, Roberta L. Enzymatic" combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 465-501, 1987.
- KIRK, T. et al. Enzimologia e genética molecular da degradação da madeira por fungos da podridão branca. **Tecnologias ecologicamente corretas para a indústria de celulose e papel**. Wiley, Nova York, p. 273-307, 1998.
- KIRK, P.M; CANNON, P.F; MINTER, D.W. & STALPERS, J.A. Dictionary of the Fungi. 10 ed. CABI Publishing, Surrey, 2008.
- KÜES, U. Fungal enzymes for environmental management. **Current opinion in biotechnology**, v. 33, p. 268-278, 2015.
- KUMAR, R. et al. Wastewater cleanup using *Phlebia acerina* fungi: an insight into mycoremediation, **Journal of environmental management**, v. 228, p. 130-139, 2018.
- KUNJADIA, P.D. et al. Role of ligninolytic enzymes of white rot fungi (*Pleurotus* spp.) grown with azo dyes. **SpringerPlus**, v. 5, p. 1-9, 2016.
- KUNZ, A. et al. N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.
- KUWAHARA, M. et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, n. 2, p. 247-250, 1984
- LEGERSKÁ, B.; CHMELOVÁ, D.; ONDREJOVIČ, M. Degradation of synthetic dyes by lacases - A mini-review. **Nova Biotechnologica Chimica**, v. 15, n. 1, p. 90-106, 2016.
- LEGERSKÁ, B.; CHMELOVÁ, D.; ONDREJOVIČ, M. Decolourization and detoxification of monoazo dyes by laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p. 84-90, 2018.
- LELLIS, B. et al. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 2, p. 275-290, 2019.
- LEONOWICZ, A. et al. Biodegradation of lignin by white rot fungi. **Fungal genetic biology**, v. 27, n. 2-3, p. 175-185, 1999.
- LEONOWICZ, A. et al. Fungal laccase: Properties and activity on lignin, **Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms**, v. 41, n. 3-4, p. 185-227,

2001.

LEVIN, L.; PAPINUTTI, L.; FORCHIASSIN, F. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. **Bioresource Technology**, v. 94, n. 2, p. 169-176, 2004.

LUCAS, M. et al. Synthetic dyes decolourisation by white-rot fungi: development of original microtitre plate method and screening. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 2, p. 97-106, 2008.

LYRA, E.S. et al Decolorization of synthetic dyes by basidiomycetes isolated from woods of the Atlantic Forest (PE), Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1499-1504, 2009.

MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R. Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue R decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 246-252, 2005.

MACHADO, K.M.G. et al. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from Brazilian ecosystems. **Brazilian journal of microbiology**, v. 37, p. 481-487, 2006.

MALLAK, A.M. et al. Effect of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on triclosan biodegradation and activity of laccase and manganese peroxidase enzymes. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104473, 2020.

MARTÍNKOVA, L. et al. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. **Chemosphere**, v. 149, p. 373-382, 2016.

MECHICHI, T.; MHIRI, N.; SAYADI, Sami. Remazol brilliant blue R decolourization by the laccase from *Trametes troglitii*. **Chemosphere**, v. 64, n. 6, p. 998-1005, 2006.

MOREIRA NETO, Sérgio L. et al. Novel salt and alkali tolerant neotropical basidiomycetes for dye decolorisation in simulated textile effluent. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2665-2673, 2011.

MOREIRA, S.C. Efeitos ecotoxicológicos dos corantes índigo sintético e natural sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata* e sobre o peixe *Danio rerio*. Dissertação (mestrado) Universidade Estadual Paulista, **Instituto de Ciência e Tecnologia**, 99, 2019.

MUGDHA, A.; USHA, M. Enzymatic treatment of waste containing dyestuffs using different delivery systems. **Scientific Reviews and Chemical Communications**, v. 2, n. 1, p. 31-40, 2012.

NAKADE, Keiko et al. Effective induction of pblac1 laccase by copper ion in *Polyporus brumalis* ibrc05015. **Fungal biology**, v. 117, n. 1, p. 52-61, 2013.

NGUYEN, K. A.; WIKKE, S.; LUMYONG, S. Brief review: lignocellulolytic enzymes from polypores for efficient utilization of biomass. **Mycosphere**, v. 9, n. 6, p. 1073-1088, 2018.

NOBLES, Mildred K. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. **Canadian journal of botany**, v. 43, n. 9, p. 1097-1139, 1965.

NOVOTNÝ, Č. et al. Removal of PCBs by various white rot fungi in liquid cultures. **Folia Microbiologica**, v. 42, p. 136-140, 1997.

NOVOTNÝ, Čeněk et al. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. **Journal of Biotechnology**, v. 89, n. 2-3, p. 113-122, 2001.

OLIVEIRA, A.N. et al. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. *Food Science and Technology*, v. 26, p. 853-860, 2006.

ORTIZ-MONSALVE, S. et al. Biodecolourization and biodetoxification of dye-containing wastewaters from leather dyeing by the native fungal strain *Trametes villosa* SCS-10. **Biochemical Engineering Journal**, v. 141, p. 19-28, 2019.

OZDEMIR, S. et al. Treatment of azo dye-containing synthetic textile dye effluent using sulfidogenic anaerobic baffled reactor. **Bioresource technology**, v. 146, p. 135-143, 2013.

PANDEY, Kritika et al. Application of microbial enzymes in industrial waste water treatment. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 8, p. 1243-1254, 2017.

PAVANELLI, Sergio Pinton. Degradação de corantes da indústria alimentícia por processos oxidativos e redutivos: monitoramento por espectrometria de massas com ionização electrospray (ESI-MS). 2010.

PAVRO, A. Fungal Decolourization and Degradation of Synthetic Dyes Some Chemical Engineering Aspects. **Waste Water-Treatment and Reutilization**, v. 4, p. 65-89, 2011.

PEREIRA, A.R.B.; DE FREITAS, D.A.F. Uso de micro-organismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, n.6, p. 995-1006, 2012.

PERALTA, R.M. et al. Enzimas de Basidiomicetes-Ferramentas peculiares e eficientes para Biotecnologia. **Biotechnology of Microbial Enzymes**, p. 119-149, 2017.

PINEDO-RIVILLA, Cristina; ALEU, J.; COLLADO, I. G. Pollutants biodegradation by fungi. **Current organic chemistry**, v. 13, n. 12, p. 1194-1214, 2009.

PINKOSKI, P. I. Produção de lacase e descoramento do vermelho congo e verde malaquita pelo *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes versicolor*. 1997. 190 p. 1977. Tese de Doutorado. Tese (doutorado)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Porto Alegre, RS.

PONNUSAMY, V.K. et al. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential, **Bioresource Technology**, v. 271, p. 462-472, 2019.

POPLI, S.; PATEL, U.D. Destruction of azo dyes by anaerobic-aerobic sequential biological treatment: a review. **International Journal of Environment Science Technology**, v. 12, p. 405-420, 2015.

PRZYSTAŚ, W.; ZABŁOCKA-GODLEWSKA, E.; GRABIŃSKA-SOTA, E. Efficiency of decolorization of different dyes using fungal biomass immobilized on different solid supports. **Brazilian journal of microbiology**, v. 49, p. 285-295, 2018.

RATHI, B. Senthil; KUMAR, P. Senthil. Sustainable approach on the biodegradation of azo dyes: A short review. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 33, p. 100578, 2022.

RIBEIRO, N.H.S. et al. Descoloração de corantes industriais por fungos degradadores de madeira isolados no campus da UFAM. **Scientia Amazonia**, v. 7, n. 1, p. 141-149, 2018.

RIGAS, Fotis. Enhanced ligninolytic activity of selected fungi potentially useful in bioremediation applications. 2006.

ROBINSON, T. et al. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource technology**, v. 77, p. 247-255, 2001.

RODRÍGUEZ-COUTO, S. Industrial and environmental applications of white-rot fungi. **Mycosphere**, v. 8, n. 3, p. 456-466, 2017.

RUIZ-DUEÑAS, F. et al. Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. **Journal of experimental botanic**, n. 60, n.2, p. 441-452, 2009.

RUEGGER, Marcelo JS; TAU-K-TORNISIELO, Sâmia M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 27, p. 205-211, 2004.

RYU, Sun-Hwa et al. Enhanced lignin biodegradation by a laccase-overexpressed white-rot fungus *Polyporus brumalis* in the pretreatment of wood chips. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 171, p. 1525-1534, 2013.

SAGGIORO, E.M. et al. Photo-decolorization and ecotoxicological effects of solar compound parabolic collector pilot plant and artificial light photocatalysis of indigo carmine dye. **Dyes and Pigments**, v. 113, p. 571-580, 2015.

SAITO, Y. et al. Screening of fungi for decomposition of lignin-derived products from Japanese cedar. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 126, n. 5, p. 573-579, 2018.

SAMSAMI, S. et al. Recent advances in the treatment of dye-containing wastewater from textile industries: Overview and perspectives. **Process safety and environmental protection**, v. 143, p. 138-163, 2020.

SANTANA, M.D.F. et al. Fenoloxidasas e biodegradação do corantetêxtil azul Brilhante remazol r (RBBR) para três espécies de macrofungos coletadas na Amazônia. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 11, n. 2, p. 53-60, 2016.

SANTOS, V. L. Avaliação do processo fenton solar no tratamento de efluente gerado por lavanderia de jeans de Pernambuco. Embrapa Semiárido - **Anais. Búzios: Associação Brasileira de Engenharia Química**, 2013.

SATHIYA, M. et al. Decolourization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 4, 2007.

SEN, S.K. et al. Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 112-133, 2016.

SERGENTANI, A.G. et al. Lignocellulose degradation potential of Basidiomycota from Thrace (NE Greece). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 114, p. 268-277, 2016.

SI, J.; CUI, B.K. A new fungal peroxidase with alkaline-tolerant, chloride-enhancing activity and dye decolorization capacity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 6-14, 2013.

SILVA, M.V.A. A Questão Ambiental no polo de confecções de Caruaru: um primeiro ensaio à luz dos instrumentos econômicos de proteção ambiental. **Revista Estudos do CEPE**, v. 35, p. 108-132, 2012.

SINGH ARORA, D.; KUMAR SHARMA, R. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, p. 1760-1788, 2010.

SINGH, Ram Lakhan; SINGH, Pradeep Kumar; SINGH, Rajat Pratap. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes-A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, p. 21-31, 2015.

SINGH, L. Biodegradation of synthetic dyes: a micoremediation approach for degradation/decolourization of textile dyes and effluents. **Journal of Applied Biotechnonology & Bioengineering**, v. 3, n. 5, p. 430-435, 2017.

SOUZA, A.F.; ROSADO, F.R. Utilização de fungos basidiomycetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, 2:1, 121-139, 2009.

SOUZA, D.F. et al. Pentachlorophenol Removal by *Pleurotus pulmonarius* in submerged cultures. **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 54, n.2, p. 357-362, 2011.

SPINA, F. et al. A scaling-up issue: the optimal bioreactor configuration for effective fungal treatment of textile wastewaters. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 37-42, 2014.

SRINIVASAN, A.; VIRARAGHAVAN, T. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. **Journal of environmental management**, v. 91, n. 10, p. 1915-1929, 2010.

STALPERS, J.A. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. **Studies in Mycology**, n. 16, 1978.

SUNDARAMOORTHY, M. et al. Crystal structures of substrate binding site mutants of manganese peroxidase. **Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 28, p. 17574-17580, 1997.

TANG, W.; JIA, R.; ZHANG, D. Decolorization and degradation of synthetic dyes by *Schizophyllum* sp. F17 in a novel system. **Desalination**, v. 265, n. 1-3, p. 22-27, 2011.

TAVARES, A.P.M. et al. Aplicações biotecnológicas de *Trametes versicolor* e suas enzimas. **Current biotechnology**, v. 6, n. 2, 2017.

TELES, M.N.O. et al. A Bibliometric Description of Lignin Applicability for the Removal of Chemical Pollutants in Effluents, **Water Air & Soil Pollution**, v. 231, p. 1-14, 2020.

TEKERE, M. et al. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 4-5, p. 420-426, 2001.

TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 8, p. 2280-2284, 1984.

ULSON, Selene Maria de Arruda Guelli et al. Removal of COD and color from hydrolyzed textile azo dye by combined ozonation and biological treatment. **Journal of hazardous materials**, v. 179, n. 1-3, p. 35-42, 2010.

URIBE-ARIZMENDI, I. Biological Decolorization of Amaranth, Denim Blue and Orange G with *Trametes polyzona*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, p. 1-14, 2020.

VAITHANOMSAT, P. et al. Production of ligninolytic enzymes by white-rot fungus *Datronia* sp. KAPI0039 and their application for reactive dye removal. **International Journal of chemical engineering**, v. 2010, p. 1-6, 2010.

VARES, T.; NIEMENMAA, O.; HATAKKA, A. Secretion of ligninolytic enzymes and mineralization of ¹⁴C-ring-labelled synthetic lignin by three *Phlebia tremellosa* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 569-575, 1994.

VERMA, R.K. et al. Diversity of Macro-fungi in central India-XI: *Trametes lactinea* on *Terminalia arjuna*, a new host record **Van Sangyan**, v. 5, n. 2, 2018.

VETEC QUÍMICA FINA. Ficha de informação de segurança de produtos químicos-índigo carmim, n. 0000873. 2008.

WASSER, S.P. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, and challenges. **Biomedicine journal**, v. 37, n. 6, 2014.

WEHAIDY, H.R. et al. Comparative study on crude and partially purified laccase from *Polyporus durus* ATCC 26726 in the decolorization of textile dyes and wastewater treatment. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 17, n. 2, p. 94, 2018.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 1-2, p. 161-187, 2003.

WONG, D.W.S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 157, p. 174-209, 2009.

XAVIER, V.L. et al. Additions to neotropical stereoid fungi (Polyporales, Basidiomycota): one new species of *Lopharia* and one new combination in *Phlebiopsis*. **Mycological Progress**, v. 19, n. 1, p. 31-40, 2020.

XIAO, P.; WU, D.; WANG, J. Bibliometric analysis of global research on white rot fungi biotechnology for environmental application. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p. 1491-1507, 2022.

XU, Lingxia et al. Dye decoloring peroxidase structure, catalytic properties and applications: current advancement and futurity. **Catalysts**, v. 11, n. 8, p. 955, 2021.

YAMANAKA, R. et al. Lignolytic Enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under diferente culture conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 78-84, 2008.

YANG, J. et al. A novel laccase from basidiomycete *Cerrena* sp.: cloning, heterologous expression, and characterization, **International journal biological macromolecules**, v. 77, p. 344-349, 2015.

YUAN, H.S. et al. Screening and evaluation of white rot fungi to decolourise synthetic dyes, with particular reference to *Antrodia albocinnamomea*. **Mycology**, v. 3, n. 2, p. 100-108, 2012.

ZANCAN, L.R. BARRETO, A.R.; DE MENEZES, C.R. Estudo da produção enzimática fúngica por basidiomicetos cultivados em resíduos lignocelulósicos **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 3, p. 850-860, 2015.

ZERVA, A. et al. Applications of microbial laccases: Patent review of the past decade (2009-2019), **Catalysts**, v. 9, n. 12, p. 1023, 2019.

ZHANG, H. et al. Characterization of a manganese peroxidase from white-rot fungus *Trametes* sp.48424 with strong ability of degrading different types of dyes and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Hazardous Materials**, v. 320, p. 265-277, 2016.



Acta Botanica Brasílica, 2022, 36: e2021abb0356
doi: 10.1590/0102-33062021abb0356

Original article

Trametes lactinea and *T. villosa* collected in Brazil are able to discolor indigo carmine

Valéria Ferreira-Silva^{1*}, Norma Buarque de Gusmão², Tatiana Baptista Gibertoni¹ and Leonor Alves de Oliveira da Silva²

Received: December 5, 2021
Accepted: May 11, 2022

ABSTRACT

Dyes used in the textile industry contribute significantly to the increase of water pollution as they are disposed of, most of the time, without proper treatment. Indigo carmine is a synthetic dye widely used in the coloring of jeans and is considered difficult to remove, causing irreversible damage to the food chain in ecosystems. Mycoremediation appears as an economical and sustainable way to treat textile effluents, and this work tested three strains of *Trametes* collected in Brazil against the ability to discolor the indigo carmine and also the activity of laccase, lignin and manganese peroxidases. The experiment was carried out in Kirk medium under static, non-sterile condition, at $\pm 28^\circ\text{C}$ for 120 h. *Trametes lactinea* (URM8350) discolored 81.40 % of the indigo carmine, *T. lactinea* (URM8350) 85.09 % and *T. villosa* (URM8022) 96.11 %. Laccase was detected in all specimens. Manganese peroxidase was detected in *T. villosa* and *T. lactinea* (URM8354), while lignin peroxidase was not detected in any of the isolates. The ability of *T. lactinea* to discolor dyes is reported for the first time. The discoloration rates demonstrate the ability of the strains to discolor carmine indigo and their promising use in the discoloration processes in wastewater from the textile segment.

Keywords: *Trametes*, Basidiomycota, indigo carmine, mycoremediation, pollutants, textile industry

Introduction

Population growth allied to industrial development has caused serious environmental problems, such as pollution of soil and water by chemicals (Zhang *et al.* 2011; Rodríguez-Couto 2017; Choi 2021). Among the pollutants, the effluents from paper, cellulose, textile and petrochemical industries and from alcohol distilleries contain aromatic, recalcitrant

and xenobiotic compounds, responsible for the intense color and toxicity of wastewater (Sharma *et al.* 2011; Almeida *et al.* 2016; Chowdhury *et al.* 2020).

The textile sector is considered to be one of the largest sectors in the manufacturing industry in the world. In Brazil alone, the segment is responsible for generating 1.5 million direct jobs, being considered the largest textile chain in the West (Abit 2020) and employs 75 million people worldwide (De Oliveira *et al.* 2021). However, its expansion

¹ Departamento de Micologia Professor Chaves Batista, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil
² Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, PE, Brazil

* Corresponding author: valeria.costasantana@ufpe.br



and maintenance cause damage to the environment, since the dyeing and washing processes of the fabric generate a large volume of effluents containing xenobiotic compounds, including dyes (Rodríguez-Couto 2009; Singh 2017).

Synthetic dyes are designed to resist discoloration, high temperatures and antioxidant chemicals. Therefore, they have a stable chemical structure, usually recalcitrant, highly toxic, mutagenic and carcinogenic (Baughman & Weber 1994; Vacchi *et al.* 2017; Berradi *et al.* 2019; Benkhaya *et al.* 2020). The presence of dyes in water bodies, even in small concentrations, interferes with the trophic chain in aquatic ecosystems, as it prevents the penetration of the light necessary for photosynthesis, thus causing serious environmental problems (Kunz *et al.* 2002; Berradi *et al.* 2019; Benkhaya *et al.* 2020; Chowdhury *et al.* 2020). The production of dyes reaches 7×10^7 tons per year in the world, of which Brazil accounts for 2.6 %. Of this production, 10–20% is transformed into wastewater (Carneiro & Zanoni 2016; Sen *et al.* 2016; Benkhaya *et al.* 2020). Indigo carmine synthetic dye belongs to the group of indigoids and has a ketone group ($C=O$) in its chemical structure. It is widely used in the food, paper, cellulose and textile industries, being indispensable in dyeing denim (Choi 2020 & 2021; Chowdhury *et al.* 2020). Considered chemically stable and difficult to remove when discarded in the environment (Guaratini & Zanoni 2000; Choi 2020), it is one of the main causes of wastewater coloring originated from textile effluents. The yarn dyeing process requires large amounts of water: it is estimated that for each kilogram of manufactured product, 200 to 400 liters of water are required, 88 % of which will be discarded with more than 10,000 by-products, as chlorinated compounds, salts, auxiliary chemicals, surfactants and especially dyes (Sen *et al.* 2016; Almeida *et al.* 2016; Singh 2017; Choi 2020; De Oliveira *et al.* 2021).

There are numerous chemical and physical dye removal strategies implemented over the years. These include adsorption, flocculation, photodegradation, membrane filtration and coagulation (Adenan *et al.* 2020). The treatment of wastewater from the textile industry, especially discoloration, is expensive and not always effective as it can generate a large volume of sludge and generally requires the addition of other chemical additives dangerous to the environment (Singh 2017). Therefore, the search for low-cost biological alternatives is urgent. Biological removal of dyes can occur through three mechanisms: biosorption, bioaccumulation and/or biodegradation (Sen *et al.* 2016; Singh 2017; Chowdhury *et al.* 2020). Biosorption involves trapping the dye by binding the dye molecules to the functional groups present on the cell wall. Subsequently, the dyes are accumulated intracellularly in the living cells through a process known as bioaccumulation. The biodegradation process involves the breakdown of dye molecules by enzymes produced by microbial cells, where complete eradication of dyes is possible (Jasińska *et al.* 2015; Adenan *et al.* 2020). Mycoremediation emerges as

an economically viable and ecologically effective biological alternative, as fungi are able to adapt to various pH and temperature ranges, in addition to producing extracellular lignolytic enzymes such as laccase (EC 1.10.3.2), lignin peroxidase (EC 1.11.1.14) and manganese peroxidase (EC 1.11.1.13), which can mineralize xenobiotic and recalcitrant compounds (Tien & Kirk 1984; Ellouze & Sayadi 2016; Sen *et al.* 2016; Singh 2017; Akhtar & Mannan 2020). White rot fungi, mainly Agaricomycetes, have been identified as a potentially efficient biological tool in the removal of synthetic dyes from textile effluents (Wesenberg *et al.* 2003; Ali 2010). Some studies have demonstrated the efficacy of *Trametes* species in the degradation of phenolic compounds in effluents from the paper industry, degradation of pentachlorophenol and synthetic dyes in textile effluents (Rodríguez-Couto 2009; Pinedo-Rivilla *et al.* 2009; Pandey *et al.* 2017). However, in Brazil, which has a high mycodiversity (Forzza *et al.* 2010; Maia *et al.* 2015), little is known about the potential for degradation and discoloration of the species collected in the country (Balan & Monteiro 2001; Lyra *et al.* 2009; Motato-Vasquez *et al.* 2016; Araújo *et al.* 2020).

Thus, the aim of the present study was to test three strains of two species of *Trametes* collected in Northeast Brazil for the ability to remove the indigo carmine used in the customization of denim and to quantify lignolytic enzymes laccase (EC 1.10.3.2), lignin peroxidase (EC 1.11.1.14) and manganese peroxidase (EC 1.11.1.13) produced after the experiment.

Materials and methods

Microorganism: collection and cultivation conditions

Specimens of *Trametes lactinea* (Berk.) Sacc. were collected on the campus of the Universidade Federal de Pernambuco (08°03'07"S 34°56'59"W, Atlantic Forest domain) in November 2019, while *T. villosa* (Sw.) Kreisel was collected in the Chapada Diamantina National Park (13°14'31"S, 41°40'7" W, Caatinga domain) in March 2015.

For culture, three fragments with a diameter of 5 mm were removed from the basidiomata and transferred to Petri dishes containing 2 % malt extract supplemented with chloramphenicol (20 mg L⁻¹). The plates were kept at 28 °C for 7 days or until mycelial development (Cavalcanti 1972; Stalpers 1978; Motato-Vásquez *et al.* 2016).

The cultures obtained were deposited in the Collection of Cultures Micoteca URM of the Department of Mycology of the Center Biosciences of the Federal University of Pernambuco under registration numbers URM8350 (*T. lactinea*), URM8354 (*T. lactinea*) and URM8022 (*T. villosa*).

Microorganism: identification

The morphological identification of the basidioma and DNA analyses followed the usual for this group (Gomes-



Trametes lactinea and *T. villosa* collected in Brazil are able to discolor indigo carmine

Silva *et al.* 2010; Verma *et al.* 2018; Xavier *et al.* 2020). The resulting ITS and LSU sequences were subjected to BLASTn search in NCBI to verify the closest identification match.

Qualitative tests for phenoloxidase

The qualitative analysis of phenoloxidase activity was verified using the Bavendamm method, which allows observing the production of cellular oxidase such as laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase, in addition to tyrosine and catechol oxidase (Nobles 1965; Melo & Azevedo 2008). In our assay, an agar block with diameter of 5 mm was removed from colonies with 7 days of cultivation and transferred to the center of the Petri dishes with diameter of 90 mm containing solid malt agar medium plus tannic acid (0.5 %). The control was prepared under the same conditions without tannic acid. All procedures were performed under aseptic conditions. After 3 days of incubation, the formation of a brown halo was observed in the colony reverse, indicating a positive reaction to produce phenoloxidases. These halos were measured with the aid of a digital caliper. The enzyme index was measured through the relationship between the average diameter of the degradation zone and the average diameter of the colony, expressed in millimeters (Hankin & Anagnostakis 1975; Silva *et al.* 2019).

Discoloration tests

The indigo carmine dye was of analytical grade purchased from Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA and used at a concentration of 50 mg L⁻¹. The experiment was carried out in Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 50 mL of Kirk medium without sterilization (Kirk & Farrell 1987) plus 5 disks of the fungal mycelium with diameter of 5 mm grown in 2 % malt extract after 7 days. The vials were kept for 120 h at ± 28 °C under static condition; 2 mL aliquots were removed from the broth and centrifuged at 1500 rpm for 15 min at 4 °C. The percentage of discoloration (D %) was calculated according to equation: $D \% = [(Abscontrol - Abstest) / Abstest] \times 100$, by which abscontrol (absorbance of the control) and abstest (absorbance with fungal treatment) denote the percentage of discoloration the at 610 nm. As a control, Kirk medium was used with the dye without fungal inoculum. The experiments were carried out in triplicate.

The discolored broth was used to quantify the production of the enzymes laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase.

Enzymatic assays

The enzymatic activity of the laccase was verified by measuring the oxidation of ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) 0.5 mM in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5) plus the enzyme broth. The final volume of the reaction was 1 mL (800 µL of ABTS +

100 µL of sodium acetate buffer + 100 µL of crude extract). Activity was calculated based on ABTS molar absorptivity ($\epsilon_{420nm} = 36,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Bourbonnais *et al.* 1997; Boran 2019). The activity of lignin peroxidase was verified through the oxidation of the mixture composed of 375 µL of 0.25 M sodium tartrate buffer at pH 3.0; 125 µL of 10 mM veratryl alcohol; 50 µL of 2 mM hydrogen peroxide and 500 µL of enzymatic extract. The reaction was monitored on a spectrophotometer at a length of 310 nm ($\epsilon_{310nm} = 9,300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Tien & Kirk 1984). The reaction mixture for manganese peroxidase (1mL) was composed of 100 µL of phenol red (0.01 %), 100 µL of sodium lactate (25 mM), 50 µL of MnSO₄ (100 mM), 200 µL of egg albumin (0.5 %), 50 µL of H₂O₂ (100 µM) in 20 mM sodium succinate buffer (pH 4.5) and 500 µL of enzymatic extract. The reactions were carried out at 30 °C for 5 minutes and stopped with the addition of 40 µL of 2N NaOH. The absorbance was monitored at 610 nm (Kuwahara *et al.* 1984). A unit of enzymatic activity was defined as 1 µmol of the product formed per minute. All tests were performed in triplicate.

Statistical analysis

The decolorization test was carried out in triplicate. The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) with the software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 24.0. The Tukey-Kramer multiple comparison test (honestly significant difference, HSD, $P < 0.05$) or paired t test ($P < 0.05$) was also performed to evaluate statistical significance between the mean values.

Results and Discussion

Morphological and molecular identification

The specimens were morphologically identified as *Trametes lactinea* (URM8350, URM8354) and *T. villosa* (URM8022). DNA analyses resulted in one ITS sequence for each specimen *T. lactinea* URM8350 (MW578797), *T. lactinea* URM8354 (MW578798) and *T. villosa* URM8022 (MW578795) and LSU sequences for both *T. lactinea* URM8350 (MW553720), *T. lactinea* URM8354 (MW553721) and *T. villosa* URM8022 (MW553718). BLASTn search confirmed the original identifications.

Detection of phenoloxidases

All strains tested showed a dark amber halo in three days of the experiment, evidenced by the degradation of tannic acid and the production of phenoloxidases: diameter of 80 mm for *T. villosa* (URM8022), of 90 mm for *T. lactinea* (URM8350) and of 80 mm for *T. lactinea* (URM8354). According to Bavendamm (1928), these amber-colored diffusion zones around the fungal colony are the result of the oxidation of phenolic acid produced by extracellular



phenoloxidas. The detection of phenoloxidas in microorganisms is used as a way to select promising strains with the potential for degradation of complex compounds to be used in studies of degradation of recalcitrant compounds. The production of phenoloxidas complex enzymes is associated with the discoloration of synthetic dyes due to the similarity in the chemical structure of the dyes and the components of lignin (Melo & Azevedo 2008; Arora & Sharma 2010; Sen *et al.* 2016; Singh 2017).

Discoloration of indigo carmine

Trametes villosa (URM8022), *T. lactinea* (URM8350) and *T. lactinea* were all able to degrade indigo carmine (Fig. 1) at high rates (Tab. 1). The results referring to the percentage of discoloration were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the effects were considered significant for $p < 0.05$. All groups showed values of F (26.60) greater than the values, indicating that there is a significant difference in all experiments performed in the present work.

Species of *Trametes* are well studied for discoloration of various synthetic dyes: *T. trogii* discolored 97 % of the remazol brilliant blue (Zouari-Mechichi *et al.* 2006); *T. hirsuta*, 94 % indigo carmine, 85 % of Bromophenol Blue, 41 % of Methyl Orange and 47 % Poly R-478 (Rodríguez-Couto *et al.* 2006); *T. membranacea*, 99.2 % of bromophenol blue and 71.8 % of methylene blue (Lyra *et al.* 2009);

T. trogii, 8 % of indigo carmine in the first hour of experiment (Grassi *et al.* 2011), 69 % of Janus Green and 6 % of Poly R-478 (Levin *et al.* 2010); *T. pubescens*, 59 % of Bemaplex Navy M-T and 50 % of Bezaktiv Blue BA (Rodríguez-Couto 2014); *T. versicolor*, 44.74 % of blue indigo 24 hours after the maximum recorded activity of laccase (Lopes *et al.* 2014) and 93.5 % of Remazol Brilliant Yellow 3-GL (Asghar *et al.* 2016); *T. lyubarskyi*, 97.7 % of reactive violet 5 (Goh *et al.* 2017); *T. villosa*, 93.8 % of acid orange 142 (Ortiz-Monsalve *et al.* 2019); and *T. polyzona*, 90 % at 100 mg L⁻¹, 91 % at 150 mg L⁻¹ and 93 % at 200 mg L⁻¹ of indigo carmine (Uribe-Arizmendi *et al.* 2020). However, *T. lactinea* has not been tested before for discoloration of indigo carmine. Also, studies of discoloration of indigo carmine using species, not only of *Trametes*, collected in Brazil are scarce.

Lyra *et al.* (2009) found that *T. membranacea* collected in the Atlantic Forest was able to discolor 99.2 % of the bromophenol blue and 71.8 % of the methylene blue in 10 days, while Lopes *et al.* (2014) obtained efficient results in 44.78 % in 5 days. More recently, Ortiz-Monsalve *et al.* (2019) tested *T. villosa*, also collected in the Atlantic Forest, for discoloration of acid orange 142 and observed discoloration of 93.8 % in 264 h of incubation. To date, our study is the first report of discoloration of indigo carmine and quantification of lignolytic enzymes using species of *Trametes* collected in Brazil.

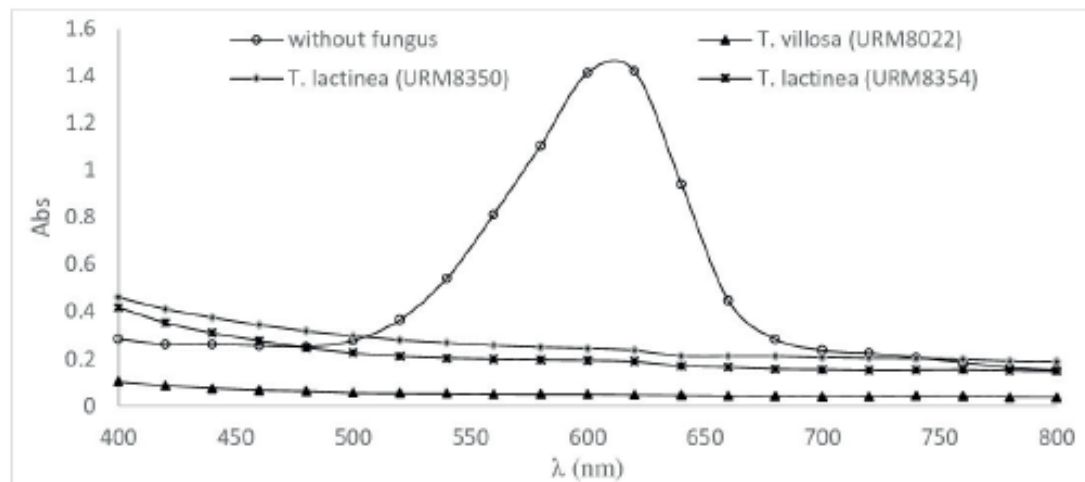


Figure 1. Discoloration of the indigo carmine dye (50 mg L⁻¹) by three strains of *Trametes* during 120 h at 28 °C under static condition.

Table 1. Percentage of discoloration and production of laccase (Lac) and manganese peroxidase (MnP) enzymes in units per liter (U/L) by *Trametes* strains after decolorization of indigo carmine dye for 120 h.

Fungi	Lac (U/L)	MnP (U/L)	% Discoloration
<i>T. villosa</i> (URM8022)	27.833 ± 0.031	3.408.065 ± 31.70	96.11 ± 0.86
<i>T. lactinea</i> (URM8350)	0.250 ± 0.002	-	81.40 ± 3.40
<i>T. lactinea</i> (URM8354)	0.750 ± 0.003	3.677.125 ± 25.36	85.09 ± 2.73

(-) Not detected

Quantification of detected enzymes

In the present study, the production of enzymes was detected (Tab. 1). The low enzyme indices observed for laccase may be related to the presence of the dye, as found by Novotný *et al.* (2001), who observed that the presence of dye decreased the detection rates of laccase and manganese peroxidase in a lineage of *Irpex lacteus*, as well as the mycelial development of the fungus. Trombini & Obara-Doi (2012) obtained 99.97 % of discoloration using *Ganoderma* sp. and low laccase indices, showing the action of another enzyme or other mechanisms involved in the discoloration process. Dye discoloration process may involve the participation of enzymes as well as the association of other mechanisms such as adsorption involved in the discoloration process (Novotný *et al.* 2001; Rodríguez-Couto *et al.* 2004; Srinivasan & Viraraghavan 2010). Several studies indicate that laccase acts as the enzyme responsible for discoloration (Levin *et al.* 2004; Rodríguez-Couto *et al.* 2004; Rodríguez-Couto *et al.* 2006; Zeng *et al.* 2011; Yuan *et al.* 2012; Younes *et al.* 2015; Orzechowski *et al.* 2018; Uribe-Arizmendi *et al.* 2020). However, the participation of manganese peroxidase has also been observed in some discoloration studies (Eichlerová *et al.* 2007; Grassi *et al.* 2011; Li *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2016).

In the present study, the indices of discoloration of indigo carmine were well above the rate observed by Lopes *et al.* (2014), Rodríguez-Couto (2014) and Levin *et al.* (2010). The discoloration time observed in the present study was relatively better if compared to other studies. Uribe-Arizmendi *et al.* (2020) carried out their experiments in 21 days (*T. polyzona*, 90 % at 100 mg L⁻¹, 91 % at 150 mg L⁻¹ and 93 % at 200 mg L⁻¹ of indigo carmine), Ortiz-Monsalve *et al.* (2019) in 264 h (*T. villosa*, 93.8 % of acid orange 142), Lyra *et al.* (2009) in 10 days (*T. membranacea*, 99.2 % of bromophenol blue and 71.8 % of methylene blue), and Zouari-Mechichi *et al.* (2006) after three weeks (*T. troglia*, 97 % of the remazol brilliant blue). Generally, studies that report good results of dye discoloration in a shorter time are those that use optimization of the enzymes of interest with addition of the dye after enzymatic production, commonly laccase and/or manganese peroxidase (Campos *et al.* 2001; Rodríguez-Couto *et al.* 2006; Li *et al.* 2015; Wang *et al.* 2019; Xu *et al.* 2020).

The chemical treatment processes of indigo carmine generate potentially dangerous by-products and sludge, causing serious environmental pollution. The treatment with indigoids using the enzymatic arsenal of fungal species has been considered a promising strategy at an environmental and economic level (Nyanhongo *et al.* 2007; Mugdha & Usha 2012; Li *et al.* 2015). Species belonging to the genus *Trametes* can produce multiple isoforms of Lac and MnP expressed under different cultivation conditions. However, LiP, when observed, is produced in low quantities (Choi 2021). Laccase contains copper polyphenoloxidases, produces four free electrons that react with phenolic and non-

phenolic molecules and is one of the few enzymes capable of catalyzing the reduction of four electrons of molecular oxygen to water and even produced in small quantities can act in the degradation of recalcitrant compounds. The catalytic efficacy of Lac and MnP in the removal of recalcitrant compounds is due to the high redox potential, activity and stability of these enzymes, whether in a raw or purified state. However, other enzymes may be involved in the discoloration process (Nyanhongo *et al.* 2007; Campos *et al.* 2016; Zheng *et al.* 2017; Xu *et al.* 2020; Choi 2021).

Species of Agaricomycetes that cause white rot have an arsenal of degradable lignolytic enzymes that can be used in bioremediation processes. These enzymes are expressed according to the composition of the substrate and the lineage used. The interest in identifying promising strains has been increasing as an effort to minimize and/or treat environments polluted or degraded by anthropic action. Knowing the enzymatic potential of neotropical species is essential in view of the fungal megadiversity in these still unexplored but threatened environments. The results obtained here proved that the *T. lactinea* strains (URM8350), *T. lactinea* (URM8354) e *T. villosa* (URM8022), collected in the Northeast of Brazil, showed a significant percentage of indigo carmine discoloration in a short period of time and at a low cost. In this work, it was possible to detect the production of Lac and MnP after dye removal, but LiP was not detected under the conditions of this experiment. The present work allowed, therefore, to identify promising strains of the genus *Trametes* that can be used to remove synthetic dye from textile effluents. Future studies of enzyme optimization and growing conditions need to be better studied for use on an industrial scale. The understanding of the enzymatic mechanisms acting in the discoloration process presented in the present study, needs to be elucidated. This study presented the first report of use for removing a synthetic dye from the *T. lactinea* strain. The results presented in this work, even if preliminary, show the potential of the studied strains. The strains *T. lactinea* (URM8350), *T. lactinea* (URM8354) and *T. villosa* (URM8022), collected in Northeastern Brazil, showed significant percentage of discoloration of indigo carmine in a short time and at a low cost and their Lac and MnP were efficient in discoloration of the dye. The present work allowed, thus, the identification of promising strains of the genus *Trametes* that can be used in the treatment of textile effluents. Further studies will be necessary to verify the toxicity level of the discoloration product.

Acknowledgements

We would like to thank Vitor Xavier de Lima for the morphological identification of the specimens and review of the statistical analysis, Renato Lúcio de Alvarenga for the DNA analysis, and Virton Rodrigo Targino de Oliveira for



submitting the sequences to GenBank. This work was funded by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE (APQ 0375-2.03/15), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (PQ 307601/2015-3, PQ 302941/2019-3) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (PhD scholarship of V. Ferreira-Silva).

References

- Abit. 2020. Perfil do Setor. Abit. <https://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor>. 10 Apr. 2022.
- Adenan NH, Lim YY, Su Yen Ting A. 2020. Discovering Decolorization Potential of Triphenylmethane Dyes by Actinobacteria from Soil. *Water, Air, & Soil Pollution*: 231-560.
- Akhtar N, Mannan MA. 2020. Mycoremediation: Expunging environmental pollutants. *Biotechnology Reports* 26: 00452. doi: 10.1016/j.btre.2020.00452.
- Ali, H. 2010. Biodegradation of synthetic Dyes, a Review. *Water, Air, & Soil Pollution* 213: 251-273.
- Almeida ÉJR, Dilari G, Corso CR. 2016. A indústria têxtil no Brasil: uma revisão dos seus impactos ambientais e possíveis tratamentos para os seus efluentes. *Conexão Água: Boletim das águas*. <https://conexaogua.mpf.mp.br/boletim-das-aguas/edicao-2016>. 20 Mar. 2021.
- Araújo CAV, Contato AG, Aranha GM, et al. 2020. Biodiscoloration, Detoxification and Biosorption of Reactive Blue 268 by *Trametes* sp. M3: a Strategy for the Treatment of Textile Effluents. *Water, Air, & Soil Pollution*: 231-349.
- Arora DS, Sharma RK. 2010. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry Biotechnology* 160: 1760-1788.
- Asgher M, Shah SAH, Iqbal HMN. 2016. Statistical Correlation between Ligninolytic Enzymes Secretion and Remazol Brilliant Yellow-3GL Dye Degradation Potential of *Trametes versicolor* IBL-04. *Water Environment Research* 88: 338-345.
- Balan DSL, Monteiro RTR. 2001. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. *Journal of Biotechnology* 89: 141-145.
- Baughman GL, Weber EJ. 1994. Transformation of dyes and related compounds in anoxic sediment: kinetics and products. *Environment Science Technology* 28: 267-276.
- Bavendamm W. 1928. Über das vorkommen und den nachweis von oxydasen bei holzerstörenden pilzen. *Z Pflanzenkr Pflanzenschutz* 38: 257-276.
- Benkhaya S, Mrabet A, El Harfi. 2020. Classification, properties, recent synthesis of azo dyes. *Heliyon* 6: e03271. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.03271.
- Berradi M, Hsissou R, Khudhair M, et al. 2019. Textile finishing dyes and their impact on aquatic environments. *Heliyon* 5: e02711. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.03271.
- Boran F, Birhanli E, Yösilada Ö, Özbey E. 2019. Comparison of indigo carmine decolorization by *Pseudomonas aeruginosa* and crude laccase enzyme from *Fusarium troglia*. *Turkish Journal Biology* 7: 37-46.
- Bourbonnais R, Paice MG, Freiermuth B, Bodie E, Borneman S. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with Kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4627-4632.
- Campos PA, Levin LN, Wirth SA. 2016. Heterologous production, characterization and dye decolorization ability of a novel thermostable laccase isoenzyme from *Trametes troglia* BAPC 463. *Process Biochemistry* 51: 895-903.
- Campos R, Kandelbauer A, Robra KH, Paulo AC, Gubitz GM. 2001. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *sclerotinia rolfsii*. *Journal of Biotechnology* 8: 131-139.
- Carneiro PA, Zanoni VBM. 2016. Corantes Têxteis. In: Zanoni VB, Yamanaka H. *Corantes Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento*. São Paulo, Editora UNESP. p. 13-38.
- Cavalcanti MAQ. 1972. Caracteres culturais de alguns Basidiomycetes isolados em Recife. *Instituto de Micologia Universidade do Recife* 694: 1-15.
- Choi KY. 2020. A review of recent progress in the synthesis of bio-indigoids and their biologically assisted end-use applications. *Dyes and Pigments* 181: 108570. doi: 10.1016/j.dyepig.2020.108570.
- Choi KY. 2021. Discoloration of indigo dyes by eco-friendly biocatalysts. *Dyes and Pigments* 184: 108749. doi: 10.1016/j.dyepig.2020.108749.
- Chowdhury ME, Khandaker S, Sarker F, Islam A, Rahman MT, Asual MDR. 2020. Current treatment technologies and mechanisms for removal of indigo carmine dyes from wastewater: A review. *Journal of Molecular Liquids* 318: 114061. doi: 10.1016/j.molliq.2020.114061.
- De Oliveira CRS, Silva Júnior AH, Mulinari J, Imrich APS. 2021. Textile Re-Engineering: Eco-responsible solutions for a more sustainable industry. *Sustainable Production and Consumption* 28: 1232-1248.
- Eichlerová I, Hornolka L, Benada O, Kofronová O, Hubálek T, Neruda F. 2007. Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*: Toxicological evaluation and morphological study. *Chemosphere* 69: 795-802.
- Ellouze M, Sayadi S. 2016. White-Rot Fungi and their Enzymes as a Biotechnological Tool for Xenobiotic Bioremediation. *IntechOpen*. doi: 10.5772/64145.
- Forzza RC, Baumgratz JFA, Bicudo CEM, et al. 2010. Catálogo de plantas e fungos. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, SciELO Books.
- Goh SM, Chan MY, Ong LGA. 2017. Degradation potential of basidiomycetes *Trametes hirsuta* on Reactive Violet 5 (RV5) using urea as optimum nitrogen source. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 31: 743-748.
- Gomes-Silva AC, Gibertoni TB, Ryvarden L. 2010. Notes on *Trametes* from the Amazonia. *Mycotaxon* 113: 61-71.
- Grassi E, Scodeller P, Filie N, Carballo R, Levin L. 2011. Potential of *Trametes troglia* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. *International Biodeterioration Biodegradation* 65: 635-643.
- Guaratini CCI, Zanoni VBM. 2000. Corantes têxteis. *Química Nova* 23: 71-78.
- Hankin L, Anagnostakis SL. 1975. The use of media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia* 67: 597-607.
- Jasińska A, Paraszewicz K, Staba M, Długosiński J. 2015. Microbial decolorization of triphenylmethane dyes. In: Singh S. (Ed.). *Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters*. Environmental Science and Engineering. Cham, Springer.
- Kirk TK, Farrell RL. 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41: 465-505.
- Kunz A, Zamora PP, Moraes SG, Durán N. 2002. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova* 25: 78-82.
- Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, Gold MH. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 169: 247-250.
- Levin L, Melignani E, Ramos M. 2010. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Journal of Biorenewable Technology* 10: 4554-4563.
- Levin L, Papinutti L, Forchassin F. 2004. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Journal Biorenewable Technology* 94: 169-176.
- 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: 227-233.
- Lopes MMG, Sales PTF, Campos LC, Schmidt F, Santiago ME. 2014. Study of decolorization of FD&C blue # 2 indigotine by fungus *Trametes versicolor* combined with slow sand filtration. *Engenharia Sanitária Ambiental* 19: 113-120.



Trametes lactinea and *T. villosa* collected in Brazil are able to discolor indigo carmine

- Lyra FS, Moreira KA, Porto TS, et al. 2009. Decolorization of synthetic dyes by basidiomycetes isolated from woods of the Atlantic Forest (PE), Brazil. *World Journal Microbiology Biotechnology* 25: 1499-1504.
- Maia LC, Carvalho Junior AA, Cavalcanti LH, et al. 2015. Diversity of Brazilian Fungi. *Rodriguezia* 64: 1-13.
- Melo IS, Azevedo JL. 2008. *Microbiologia Ambiental*. 2nd. edn. Jaguarina. Embrapa Meio Ambiente.
- Motato-Vásquez V, Pires RM, Vitali VMV, Gugliotta AM. 2016. Cultural and ligninolytic activity studies of some polypores (Basidiomycota) from Brazilian Atlantic Forest, São Paulo State, Brazil. *Hoeheia* 43: 289-300.
- Mugdha A, Usha M. 2012. Enzymatic treatment of waste containing dyestuffs using different delivery systems. *Scientific Reviews and Chemical Communications* 2: 31-40.
- Nobles MK. 1965. Identification of cultures of wood-inhabiting hymenomycetes. *Canadian Journal of Botany* 43: 1097-1139.
- Novotný C, Raval R, Bhatt M, Patel M, Sasek V, Molitoris P. 2001. Capacity of *Irpiclactes* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal Biotechnology* 89: 113-122.
- Nyanhongo GS, Gubitz G, Sulay P, Leitner C, Haltrich D, Ludwig R. 2007. Oxidoreductases from *Trametes* spp., *Food Technology and Biotechnology*. 45:3 250-268.
- Ortiz-Monsalve S, Valente P, Polla E, Jaramillo-García V. 2019. Biodecolorization and biodegradation of dye-containing wastewaters from leather dyeing by the native fungal strain *Trametes villosa* SCS-10. *Biochemical Engineering Journal* 141: 19-28.
- Orzechowski J, Rampinelli JR, Silveira MLL, Bonatti-Chaves M, Furlan AS. 2018. Avaliação do Potencial de Descoloração e de Detoxificação de Corantes Têxteis por *Laccase* de *Pleurotus sajor-caju*. *Evidência* 18: 59-80.
- Pandey K, Singh B, Pandey AK, et al. 2017. Application of Microbial Enzymes in Industrial Waste Water Treatment. *International Journal Current Microbiology Applied Sciences* 6:8 1243-1254.
- Pinedo-Rivilla C, Aleu J, Collado IG. 2009. Pollutants Biodegradation by Fungi. *Current Organic Chemistry*. doi: 1310.2174/138527209788921774.
- Rodríguez-Couto S, Hofer D, Sanromán MA, Gubitz GM. 2004. Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor. Application to decolorisation of dyes from a leather factory. *Engineering in Life Sciences* 4: 233-238.
- Rodríguez-Couto S, Rosales E, Sanromán MA. 2006. Decolorization of synthetic dyes by *Trametes hirsuta* in expanded-bed reactors. *Chemosphere* 62: 1558-1563.
- Rodríguez-Couto S. 2009. Dye removal by immobilized fungi. *Biotechnology Advances* 27: 227-235.
- Rodríguez-Couto S. 2014. Decoloration of industrial metal-complex dyes in successive batches by active cultures of *Trametes pubescens*. *Biotechnology Reports* 4: 156-160.
- Rodríguez-Couto S. 2017. Industrial and environmental applications of white rot fungi. *Mycosphere* 8(3): 456-466.
- Sen SK, Raut S, Bandyopadhyay P, Raut S. 2016. Fungal decoloration and degradation of azo dyes: A review. *Fungal Biology Reviews* 30: 112-133.
- Sharma P, Kaur H, Sharma M, Sahore V. 2011. A review on applicability of naturally available adsorbents for the removal of hazardous dyes from aqueous waste. *Environmental Monitoring and Assessment* 183: 151-195.
- Silva BNS, Ferreira MA, Santos NJR. 2019. Biodegradação da madeira de eucalipto por fungos de podridão. *Biodegradação de eucalipto. Revista Agrária Acadêmica* 2: 5. doi: 10.32406/v2n52019/41-54/agrariacad.
- Singh L. 2017. Biodegradation of synthetic dyes: a microremediation approach for degradation/decolorization of textile dyes and effluents. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering* 3: doi: 0081.10.15406/jabb.2017.03.00081.
- Srinivasan A, Viraraghavan T. 2010. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. *Journal Environmental Management* 91: 1915-1929. doi: 10.1016/j.jenvman.2010.05.003.
- Stalpers JA. 1978. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. *Studies in Mycology* 16.
- Tien M, Kirk TK. 1984. Lignin degrading from *Phanerochaete chrysosporium* purification, characterization and catalytic properties of unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81: 2280-2284.
- Trombini RB, Obara-Doi SM. 2012. Remoção de cor e análises físico-químicas de efluentes de indústrias têxteis tratados com *Ganoderma* spp. *Revista Fapciência* 9: 101-122.
- Uribe-Arismendi I, Anducho-Reyes MA, Ramírez-Vargas MR, Cadena-Ramírez A, Muro-Urista CR, Téllez-Jurado A. 2020. Biological Decolorization of Amaranth, Denim Blue, and Orange G with *Trametes polyzona*. *Water Air Soil Pollution* 231: 307. doi: 10.1007/s11270-020-04705-9.
- Vacchi FI, Vendemiatti JAS, Silva BF, Zanoni MVB, Umbuzeiro GA. 2017. Quantifying the contribution of dyes to the mutagenicity of waters under the influence of textile activities. *Science of the Total Environment* 601: 230-236.
- Verna RK, Asaiya AJK, Kumar S. 2018. Diversity of Macro-fungi in central India-XI: *Trametes lactinea* on *Terminalia arjuna*, a new host record. *Tropical Forest Research Institute* 5(2): 40-43.
- Wang F, Xu L, Zhao LT, Ding ZY, Ma HL, Terry N. 2019. Fungal laccase production from lignocellulosic agricultural wastes by solid-state fermentation: a review. *Microorganisms* 7: 665. doi: 10.3390/microorganisms7120665.
- Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22: 161-187.
- Xavier LV, Lira CRS, Chikowski RS, Lima NMVS, Santos CIA, Gibertoni TB. 2020. Additions to neotropical stereoid fungi (Polyporales, Basidiomycota): one new species of *Lopharia* and one new combination in *Phlebotopis*. *Mycological Progress* 19: 31-40.
- Xu L, Sun K, Wang F, Zhao L, Hu J, Ma H. 2020. Laccase production by *Trametes versicolor* in solid-state fermentation using tea residues as substrate and its application in dye decolorization. *Journal of Environmental Management* 270: 110904. doi: 10.1016/j.jenvman.2020.110904.
- Younes SB, Cherif I, Dhoub A, Sayadi S. 2015. *Trametes troglit* A Biologic Powerful Tool for Dyes Decolorization and Detoxification. *Catalysis Letters*. doi: 10.1007/s10562-015-1629-x.
- Yuan HS, Dai YC, Steffen K. 2012. Screening and evaluation of white rot fungi to decolorise synthetic dyes, with particular reference to *Antrodia albocinnamomea*. *Mycology* 3: 100-108.
- Zeng X, Cai Y, Liao X, Zeng X, Li W, Zhang D. 2011. Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes troglit* strain cultivated on solid agro-industrial residue. *Journal of Hazardous Materials* 187: 517-525.
- Zhang H, Zhang S, He F, Qin X, Zhang X, Yang Y. 2016. Characterization of a manganese peroxidase from white-rot fungus *Trametes* sp. 48424 with strong ability of degrading different types of dyes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials* 320: 265-277.
- Zhang W, Han Y, Haijiang L, et al. 2011. Removal of dyes from aqueous solutions by straw based adsorbents: batch and column studies. *Chemical Engineering Journal* 168: 1120-1127.
- Zheng F, An Q, Meng G, et al. 2017. A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis*: purification, characterization, and application. *International Journal Biological Macromolecules* 102: 758-70.
- Zouari-Mechichi H, Mechichi T, Dhoub A, Sayadi S, Martinez AT, Martinez MJ. 2006. Laccase purification and characterization from *Trametes troglit* isolated in Tunisia: Decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme Microbiology Technology* 39: 141-148.

