

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ADRIANA PAOLA VELASQUEZ TORRICO

**APLICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM RESÍDUOS DA
CONSTRUÇÃO CIVIL PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS DE CÓRREGO
URBANO EM *WETLANDS* CONSTRUÍDOS DE FLUXO VERTICAL
SUBSUPERFICIAL**

CURITIBA

2026

ADRIANA PAOLA VELASQUEZ TORRICO

**APLICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM RESÍDUOS DA
CONSTRUÇÃO CIVIL PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS DE CÓRREGO
URBANO EM *WETLANDS* CONSTRUÍDOS DE FLUXO VERTICAL
SUBSUPERFICIAL**

**Application and Immobilization of Laccase on Construction Waste for the
Treatment of Urban Stream Water in Vertical Subsurface Flow Constructed
Wetlands**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Engenharia
Civil pelo Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Civil (PPGEC) da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Querne de
Carvalho Passig.

Coorientadora: Profa. Dra. Giselle Maria
Maciel.

CURITIBA

2026



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



ADRIANA PAOLA VELASQUEZ TORRICO

APLICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM RESÍDUOS DA CONSTRUÇÃO CIVIL PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS DE CÓRREGO URBANO EM WETLANDS CONSTRUÍDOS DE FLUXO VERTICAL SUBSUPERFICIAL

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Engenharia Civil da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Meio Ambiente.

Data de aprovação: 27 de Abril de 2026

Dra. Karina Querne De Carvalho Passig, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Fernando Hermes Passig, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Rosane Marina Peralta, Doutorado - Universidade Estadual de Maringá (Uem)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 27/04/2026.

Para a menina que sonha em ser engenheira e
fazer ciência. Para você, que fui eu, e para
todas as que virão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque antes deste sonho ser meu, já era seu, e por me dar a sabedoria, a força e a vontade para chegar até aqui, agindo em cada detalhe, em cada obstáculo e em cada conquista.

À minha mãe Sandra Torrico, por ser a primeira pessoa a acreditar em mim, antes mesmo de eu acreditar em mim mesma, para ela, tudo. Ao meu pai Victor Velasquez, por me deixar voar longe de casa para cumprir este sonho compartilhado. Aos meus irmãos Mariela e Victor, pelo carinho e apoio que me impediram de desistir. E à minha sobrinha Sofia, por me inspirar a buscar a excelência todos os dias, para ser o exemplo que ela merece.

Ao meu amor e companheiro de vida, Francisco Prieto, por estar presente em cada momento, nos bons e nos difíceis. Por me ouvir, me acompanhar e sempre me dar forças para seguir em frente. Por lutar junto comigo para que eu pudesse brilhar. Que este seja apenas um dos muitos sonhos que ainda vamos conquistar juntos.

Agradeço à minha orientadora e professora Dra. Karina Querne de Carvalho Passig, por aceitar me orientar no Mestrado e por estar presente em cada passo deste caminho, com paciência, dedicação e carinho. Nela descobri o que é a excelência acadêmica e pessoal, e sua orientação foi indispensável para que eu pudesse chegar até aqui. À minha coorientadora Dra. Giselle Maria Maciel, por transmitir entusiasmo e amor pela ciência, por me receber de braços abertos, por dedicar seu tempo para me ensinar desde o mais básico no laboratório e por cada conversa que iluminou meus dias de trabalho duro. Cheguei sem saber nada sobre pesquisa, em um país novo e em um idioma diferente, e as duas estiveram presentes em cada momento. Se eu puder levar um pouco de cada uma comigo, tenho certeza de que me tornarei o que sonho e admiro. Serei eternamente grata por tê-las conhecido e por tê-las em minha vida.

Agradeço ao professor Dr. Fernando Hermes Passig e à professora Dra. Rosane Marina Peralta por fazerem parte da minha banca examinadora, pelas valiosas contribuições ao meu trabalho e por acompanharem esta etapa final iluminando minha pesquisa com sua experiência e sabedoria. Suas observações e ensinamentos foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e para tornar este trabalho ainda melhor.

Agradeço a todos os colegas de laboratório que me ajudaram, ensinaram e compartilharam sua companhia ao longo destes dois anos de mestrado. Em especial, à Adelanira de Oliveira Souza, cujo apoio foi fundamental em cada etapa do meu trabalho, sempre presente e disposta a ajudar. À Maíre de Oliveira, por me ajudar a dar os primeiros passos na pesquisa. Ao Lucas de Carvalho Silva e ao Milton Manzoni Junior, por cada conselho e auxílio ao longo do caminho. E à Claudia Merlotti, por ir além de uma colega e se tornar minha família no Brasil.

Ao Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) da UTFPR, pela realização do procedimento de liofilização da lacase, contribuindo para uma melhor manipulação da enzima nos ensaios desta pesquisa.

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) por me escolher para realizar o Mestrado em sua instituição e por me oferecer a oportunidade de avançar na minha

carreira acadêmica. Por me proporcionar as ferramentas e o espaço necessários para crescer não apenas como profissional, mas também como pessoa. Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil (PPGEC) e a todos os professores que fizeram parte da minha formação.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio por meio do Programa GCUB-MOB, que tornou possível a realização deste Mestrado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 314540/2023-7) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Soluções baseadas na Natureza (INCT-SbN, Processo 58/2022), pelo financiamento desta pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, fizeram parte desta jornada. Cada palavra de incentivo, cada gesto de apoio e cada momento compartilhado deixaram sua marca neste trabalho e em mim. Obrigada.

“Tudo é possível se você
tiver coragem suficiente.”
(Rowling, 2003).

RESUMO

A aplicação de enzimas oxidativas em *wetlands* construídos tem sido investigada como estratégia para ampliar a remoção de compostos recalcitrantes que os mecanismos convencionais do leito filtrante não degradam com eficiência. Neste estudo foi avaliado o desempenho de *wetlands* construídos de fluxo vertical subsuperficial (WCFV), preenchidos com fragmentos de tijolo cerâmico e vegetados com *Eichhornia crassipes*, no tratamento de água do córrego Ribeirão dos Müller, com e sem adição de lacase produzida por *Trametes villosa*. A lacase foi obtida por fermentação em meio líquido com resíduos agroindustriais, atingindo atividade máxima de 9.106,44 U L⁻¹ no 12º dia de cultivo, e padronizada a 500 U L⁻¹. Dois sistemas em escala de bancada, com 2 L de volume útil e aeração contínua, foram operados em batelada com ciclos de 48 h ao longo de 162 dias: Sistema A, com adição de lacase livre a 500 U L⁻¹, e Sistema B, controle sem enzima. A operação foi dividida em Fase I, sem adição de corante, e Fase II, com azul de indigotina a 25 mg L⁻¹ como contaminante modelo. Na Fase I, ambos os sistemas apresentaram eficiências elevadas de remoção: DQO de 91,8% e 85,3%, NTK de 87,4% e 88,8%, N-Amon de 95,2% e 94,1% e PT de 50,0% e 95,1% nos Sistemas A e B, respectivamente. A menor eficiência de remoção do PT no Sistema A foi atribuída à presença residual de KH₂PO₄ proveniente do meio de cultivo no afluente. Na Fase II, a descoloração do azul de indigotina atingiu 86,32% no Sistema A e 72,81% no Sistema B (p-valor = 0,0009), confirmando a contribuição catalítica da lacase na descoloração do corante. A imobilização covalente da lacase em resíduos da construção civil foi avaliada em seis materiais suporte, dos quais o tijolo cerâmico apresentou viabilidade técnica, com atividade recuperada de 17,21% após otimização do protocolo. Em ensaios de bancada com três ciclos consecutivos de 48 h, a lacase imobilizada alcançou descoloração de 19,3 a 25,5% sem renovação enzimática, restando 75,7% da capacidade catalítica entre o primeiro e o terceiro ciclo. Normalizada pelo número de doses aplicadas, a lacase imobilizada atingiu 67,1% de descoloração por dose, valor 28% superior ao da lacase livre (52,5%), evidenciando melhor aproveitamento enzimático na forma imobilizada. Os resultados demonstram que a associação da lacase com *wetlands* construídos preenchidos com tijolo cerâmico constitui alternativa viável para a remoção de compostos recalcitrantes em águas de córrego urbano.

Palavras-chave: biocatálise; biorremediação; wetlands construídos; azul de indigotina; lacase.

ABSTRACT

The application of oxidative enzymes in constructed wetlands has been investigated as a strategy to enhance the removal of recalcitrant compounds that conventional filter bed mechanisms do not efficiently degrade. In this study, the performance of vertical subsurface flow constructed wetlands (VSFCW) filled with red ceramic brick fragments and vegetated with *Eichhornia crassipes* was evaluated in the treatment of urban stream water from Ribeirão dos Müller, with and without the addition of laccase produced by *Trametes villosa*. Laccase was obtained by liquid-state fermentation using agroindustrial waste, reaching a maximum activity of 9,106.44 U L⁻¹ on the 12th day of cultivation, and standardized to 500 U L⁻¹. Two bench-scale systems with 2 L working volume and continuous aeration were operated in batch mode with 48 h cycles over 162 days: System A, with the addition of free laccase at 500 U L⁻¹, and System B, an enzyme-free control. Operation was divided into Phase I, without dye addition, and Phase II, with indigo carmine at 25 mg L⁻¹ as a model contaminant. In Phase I, both systems achieved high removal efficiencies: COD of 91.8% and 85.3%, TKN of 87.4% and 88.8%, N-Ammon of 95.2% and 94.1%, and TP of 50.0% and 95.1% in Systems A and B, respectively. The lower TP removal efficiency in System A was attributed to residual KH₂PO₄ from the fungal growth medium in the influent. In Phase II, indigo carmine decolorization reached 86.32% in System A and 72.81% in System B (p-value = 0.0009), confirming the catalytic contribution of laccase to dye decolorization. Covalent immobilization of laccase on construction and demolition waste was evaluated on six support materials, of which red ceramic brick showed technical feasibility, with 17.21% recovered activity after protocol optimization. In bench-scale assays with three consecutive 48 h cycles, immobilized laccase achieved 19.3 to 25.5% decolorization of indigo carmine without enzyme renewal, retaining 75.7% of catalytic capacity between the first and the third cycle. When normalized by the number of enzymatic doses applied, immobilized laccase reached 67.1% decolorization per dose, a value 28% higher than that of free laccase (52.5%), indicating better enzymatic utilization in the immobilized form. The results demonstrate that the integration of laccase with constructed wetlands filled with red ceramic brick is a viable alternative for the removal of recalcitrant compounds from urban stream water.

Keywords: biocatalysis; bioremediation; constructed wetlands; indigo carmine; laccase.

DECLARAÇÃO DE USO DE FERRAMENTAS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

Declaro que, durante a elaboração desta dissertação, foram utilizadas ferramentas de inteligência artificial generativa (ChatGPT, da OpenAI, e Claude, da Anthropic) como apoio nas seguintes atividades: revisão ortográfica e gramatical do texto, tradução de termos técnicos entre português, inglês e espanhol e apoio na elaboração de figuras esquemáticas e ilustrativas. Os dados experimentais, análises estatísticas, interpretação dos resultados, discussão científica e conclusões apresentadas neste trabalho são de autoria exclusiva da autora, obtidos a partir dos experimentos conduzidos no Laboratório de Saneamento e no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, sob orientação da Profa. Dra. Karina Querne de Carvalho Passig e coorientação da Profa. Dra. Giselle Maria Maciel. A autora assume integral responsabilidade pelo conteúdo do trabalho.

Curitiba, abril de 2026.

Documento assinado digitalmente
 **ADRIANA PAOLA VELASQUEZ TORRICO**
Data: 21/04/2026 10:12:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Adriana Paola Velasquez Torrico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de wetland construído de fluxo vertical subsuperficial com alimentação intermitente.	21
Figura 2 – Esquema de um wetland construído com aeração forçada (WTAr).	24
Figura 3 – Morfologia de <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms.	26
Figura 4 – Coordenação dos centros de cobre no sítio catalítico da lacase.	31
Figura 5 – Mecanismo de interação da lacase com o poluente pelo fluxo de elétrons do substrato à molécula de H ₂ O.	32
Figura 6 – Macro morfologia de Basidioma - Superfície abhimenial e himenoforal de <i>Trametes villosa</i>	34
Figura 7 – Acondicionamento de resíduos na construção civil.	41
Figura 8 – Mecanismos propostos para adsorção e dessorção de fosfato em solução aquosa sobre adsorventes cerâmicos.	42
Figura 9 – Fluxograma das etapas experimentais realizadas no estudo	46
Figura 10 – Placas de Petri contendo: <i>Trametes villosa</i> (a) e desenvolvimento após 7 dias (b)	47
Figura 11 – Preparo do inóculo de <i>Trametes villosa</i> para produção enzimática: (a) crescimento em placa, (b) obtenção de plugs e (c) inoculação em meio líquido.	48
Figura 12 – Filtragem do meio enzimático na membrana de 0,45 µm: (a) processo de filtração e (b) comparação do meio antes e após a filtração.	50
Figura 13 – Montagem dos ensaios experimentais em frascos de Erlenmeyer contendo água do córrego sob diferentes condições.	51
Figura 14 – Montagem das provetas com aeração	52
Figura 15 – Preparação dos RCC utilizados como suporte: (a) materiais in natura e (b) materiais após trituração e peneiramento (60 mesh, 0,25 mm).	53
Figura 16 – Etapas da imobilização covalente da lacase em resíduos da construção civil. a) silanização do suporte e b) imobilização enzimática	54
Figura 17 – Peneiramento dos fragmentos de tijolo cerâmico entre as malhas de 3/4" e 1"	57
Figura 18 – Montagem das unidades de <i>wetlands</i> construídos com preenchimento de tijolo	58
Figura 19 – Local de coleta das mudas de <i>Eichhornia crassipes</i> no Parque Tingui, Curitiba - PR	59
Figura 20 – Ilustração esquemática da disposição das três mudas de <i>Eichhornia crassipes</i> em cada WCFV	59
Figura 21 – Ponto de coleta da água do córrego Ribeirão dos Müller, em frente ao LabSan - UTFPR	60
Figura 22 – Desenho esquemático dos sistemas <i>wetlands</i>	61
Figura 23 – Alíquota de 2 L de água do córrego do Ribeirão dos Müller e extrato enzimático utilizados na alimentação do sistema A	62
Figura 24 – Curvas de varredura dos corantes azul de indigotina (AI), amarelo tartrazina (AT) e ponceau 4R (P4R)	63
Figura 25 – Frascos de ensaio dos experimentos de seleção do corante: a) água destilada e b) água do córrego do Ribeirão dos Müller, contendo azul de indigotina (Azul), amarelo tartrazina (Amarelo) e ponceau 4R (Vermelho) na concentração de 25 mg L ⁻¹	64
Figura 26 – Curva analítica do Azul de Indigotina (AI) construída em água do córrego	65

Figura 27 – Variação da atividade da lacase (U L^{-1}) ao longo de 96 h de ensaio em água do córrego Ribeirão dos Müller com aeração contínua.	72
Figura 28 – Variação da concentração normalizada (C/C_0) de DQO (a), nitrato (b), fósforo total (c) e nitrogênio amoniacal (d) ao longo de 72 h de ensaio. Controle B (sem enzima) e tratamento A (lacase 500 U L^{-1}).	73
Figura 29 – Descoloração (%) do azul de indigotina (25 mg L^{-1}) em água do córrego Ribeirão dos Müller ao longo de três ciclos de reúso de 48 h para as condições Branco, Adsorção, Lacase livre (500 U L^{-1}) e Lacase imobilizada em tijolo cerâmico. Barras de erro representam desvio padrão ($n = 3$).	80
Figura 30 – Desempenho comparativo entre lacase livre e lacase imobilizada em função das doses enzimáticas aplicadas: (a) descoloração acumulada do azul de indigotina ao longo dos três ciclos consecutivos de 48 h e (b) descoloração total alcançada por dose enzimática após os três ciclos.	81
Figura 31 – Variação dos valores de pH nas amostras do afluente e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II	84
Figura 32 – Variação do POR nas amostras do afluente e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II	85
Figura 33 – Variação da CE nas amostras do afluente e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II	86
Figura 34 – Variação da Turbidez nas amostras do afluente e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II	88
Figura 35 – Variação da DQO nas amostras do afluente e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II	91
Figura 36 – Variação dos valores de Alcalinidade Total nas amostras do afluente e efluente dos Sistemas A e B nas Fases I e II	93
Figura 37 – Variação da concentração do NTK nas amostras dos afluentes e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II	94
Figura 38 – Variação da concentração do N-Amon nas amostras dos afluentes e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II	95
Figura 39 – Variação da concentração do Nitrito nas amostras dos afluentes e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II	97
Figura 40 – Variação da concentração do Nitrato nas amostras dos afluentes e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II	98
Figura 41 – Variação do Nitrogênio Total nas amostras do afluente e efluente dos Sistemas A e B nas Fases I e II	99
Figura 42 – Variação do Fósforo Total nas amostras do afluente e efluente dos Sistemas A e B nas Fases I e II	100
Figura 43 – Variação dos valores de concentração de cor nas amostras do afluente e efluente dos Sistemas A e B na Fase II	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade enzimática do extrato bruto de <i>Trametes villosa</i> ao longo do período de cultivo (n = 3).....	69
Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos das amostras após 6 h de contato com a lacase produzida por <i>Trametes villosa</i> , sob as condições experimentais descritas no Quadro 7 (n = 3).....	70
Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos das amostras após 6 h de contato com a lacase comercial de <i>Aspergillus</i> sp. (Sigma-Aldrich, SAE0050), sob as condições experimentais descritas no Quadro 7 (n = 3).	70
Tabela 4 – Atividade enzimática e parâmetros físico-químicos ao longo de 72 h de ensaio com lacase produzida (A) e controle sem enzima (B). Valores médios (n = 3).	72
Tabela 5 – Atividade enzimática retida no suporte e liberada na lavagem durante a triagem de materiais para imobilização de lacase a 1000 U L ⁻¹ (n = 3).	75
Tabela 6 – Rendimento de imobilização e atividade recuperada para diferentes suportes a 500 U L ⁻¹ . Valores médios (n = 3).	76
Tabela 7 – Efeito da sequência de adição na imobilização de lacase em tijolo autoclavado silanizado (TAS) a 500 U L ⁻¹ (n = 3).....	77
Tabela 8 – Concentração inicial (C ₀) e percentual de remoção do azul de indigotina (AI), amarelo tartrazina (AT) e ponceau 4R (P4R) pela lacase de <i>T. villosa</i> em água destilada e água do córrego do Ribeirão dos Müller nos tempos de 24 h e 48 h (n = 3).....	78
Tabela 9 – Concentração de azul de indigotina (mg L ⁻¹) e descoloração (%) nas quatro condições experimentais ao longo de três ciclos de reúso de 48 h em bancada (n = 3).....	79
Tabela 10 – Resultados em função da média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimos (Mín.) e máximos (Máx.) e eficiências de remoção (E%) para os parâmetros físicos monitorados no afluente e efluente dos Sistemas A e B ao longo das Fases I e II (n = 32)	83
Tabela 11 – Resultados em função da média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimos (Mín.) e máximos (Máx.) e eficiências de remoção (E%) para os parâmetros químicos monitorados no afluente e efluente dos Sistemas A e B ao longo das Fases I e II (n = 32)	90
Tabela 12 – Concentração de cor (mg L ⁻¹) no afluente e efluente dos Sistemas A e B e eficiências de remoção (%) ao longo da Fase II (n = 8)	103

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Importância relativa das funções das macrófitas em diferentes configurações de <i>wetlands</i> construídos.	25
Quadro 2 – Estudos sobre desempenho de <i>Eichhornia crassipes</i> na remoção de poluentes em sistemas de tratamento.....	27
Quadro 3 – Corantes alimentícios sintéticos permitidos no Brasil.	28
Quadro 4 – Estudos sobre remoção de corantes sintéticos em diferentes sistemas de tratamento.	29
Quadro 5 – Propriedades e características do corante azul de indigotina.	30
Quadro 6 – Técnicas de imobilização empregadas para lacases na degradação de poluentes.	37
Quadro 7 – Condições experimentais dos ensaios preliminares em bancada	51
Quadro 8 – Condições experimentais dos ensaios de descoloração do azul de indigotina em bancada (n = 3).	66
Quadro 9 – Parâmetros monitorados no afluente e efluente dos <i>wetlands</i> construídos	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AI	Azul de indigotina
APHA	<i>American Public Health Association</i>
AT	Alcalinidade total
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CE	Condutividade elétrica
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CV	Coeficiente de variação
DP	Desvio padrão
DQO	Demanda química de oxigênio
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raios X
GA	Gesso acartonado
GAM	Gesso acartonado modificado
INCT-SbN	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Soluções baseadas na Natureza
LabSan	Laboratório de Saneamento
LAMEAA	Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
N-Amon	Nitrogênio amoniacal
NT	Nitrogênio total
NTK	Nitrogênio total Kjeldahl
OD	Oxigênio dissolvido
P4R	Ponceau 4R
POR	Potencial de oxirredução
PPGEC	Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil
PT	Fósforo total
RCC	Resíduos da construção civil
TAS	Tijolo autoclavado silanizado
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
WCFV	<i>Wetland</i> construído de fluxo vertical
WTAr	<i>Wetland</i> com aeração forçada

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
C_0	Concentração inicial
C/C_0	Concentração normalizada
g	Gramas
h	Horas
L	Litros
$\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$	Miligramas de carbonato de cálcio por litro
mg L^{-1}	Miligramas por litro
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mV	Milivolts
nm	Nanômetros
NTU	Unidades nefelométricas de turbidez
pH	Potencial hidrogeniônico
U L^{-1}	Unidades de atividade enzimática por litro
μm	Micrômetros
$\mu\text{S cm}^{-1}$	Microsiemens por centímetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo principal	20
2.1.1	Objetivos específicos	20
2.2	Hipóteses da pesquisa	20
3	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1	Wetlands de fluxo vertical subsuperficial	21
3.2	Oxigenação em wetlands de fluxo vertical	23
3.3	Macrófitas em wetlands construídos	24
3.4	Corantes em efluentes	27
3.5	A enzima lacase	30
3.6	Produção de lacase em meio líquido com resíduos agroindustriais	33
3.7	Imobilização da lacase	35
3.8	Wetlands construídos no tratamento de corantes alimentícios	36
3.9	Resíduos da construção civil como suporte	40
3.10	Integração de lacase em <i>wetlands</i> construídos	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	Delineamento experimental	46
4.2	Produção da lacase	47
4.2.1	Cultivo do microrganismo	47
4.2.2	Produção, extração e determinação da atividade enzimática	48
4.2.3	Liofilização e padronização	49
4.3	Ensaios preliminares em bancada	50
4.3.1	Determinação da concentração enzimática	50
4.3.2	Ensaio de estabilidade da lacase em água do córrego urbano	52
4.4	Ensaios de imobilização da lacase em resíduos da construção civil	53
4.4.1	Protocolo de funcionalização e imobilização	54
4.4.2	Triagem dos materiais suporte	55
4.4.3	Avaliação quantitativa do rendimento de imobilização	56
4.4.4	Otimização da sequência de adição na imobilização	56
4.5	Configuração e operação dos <i>wetlands</i> construídos	57
4.5.1	Montagem dos sistemas	57
4.5.2	Macrófita	58
4.5.3	Efluente	60
4.5.4	Procedimento operacional	61
4.6	Seleção e quantificação do corante azul de indigotina	63
4.7	Ensaios de descoloração do azul de indigotina (AI) com lacase imobilizada em bancada	65
4.8	Parâmetros monitorados e métodos analíticos	67
4.9	Análise estatística	68
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1	Produção da lacase por <i>Trametes villosa</i>	69
5.2	Ensaios preliminares em bancada	69
5.2.1	Definição da concentração enzimática	69
5.2.2	Estabilidade da lacase em água do córrego	71

5.3	Imobilização da lacase em resíduos da construção civil	74
5.3.1	Triagem dos materiais suporte	74
5.3.2	Rendimento de imobilização e atividade recuperada.....	76
5.3.3	Otimização da sequência de adição.....	77
5.4	Seleção do corante modelo	78
5.5	Descoloração do azul de indigotina com lacase imobilizada em bancada .	79
5.6	Desempenho dos <i>wetlands</i>	82
5.6.1	Inspeção prévia dos sistemas	82
5.6.2	Parâmetros físicos-químicos	82
5.6.2.1	pH	84
5.6.2.2	Potencial de Oxirredução	85
5.6.2.3	Condutividade Elétrica	86
5.6.2.4	Turbidez	87
5.6.3	Parâmetros de caracterização dos afluentes	89
5.6.3.1	Demanda Química de Oxigênio	91
5.6.3.2	Alcalinidade Total	92
5.6.3.3	Série Nitrogenada	94
5.6.3.4	Fósforo Total.....	100
5.6.4	Comportamento do azul de indigotina nos sistemas avaliados	102
5.6.4.1	Sistemas de wetlands construídos	102
6	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	104
6.1	Conclusões	104
6.2	Recomendações para trabalhos futuros	105
	REFERÊNCIAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

Os *wetlands* construídos de fluxo vertical subsuperficial têm sido aplicados no tratamento descentralizado de águas residuárias em localidades onde os sistemas convencionais não se viabilizam, seja por custo de implantação, seja pela complexidade operacional exigida. A eficiência desses sistemas é elevada para matéria carbonácea e nutrientes, porém frente a compostos recalcitrantes, como corantes sintéticos e micropoluentes emergentes, a remoção cai consideravelmente (Hassan *et al.*, 2021).

A associação de processos catalíticos aos mecanismos já existentes no leito filtrante surge como alternativa a essa limitação. A lacase é uma enzima oxidativa produzida por fungos ligninolíticos, com capacidade comprovada de degradar compostos fenólicos, hormônios esteroides e corantes sintéticos, o que amplia o espectro de remoção dos *wetlands* convencionais (Arregui *et al.*, 2019; Auriol *et al.*, 2007).

Entre os fungos produtores, *Trametes villosa* tem sido estudado no Laboratório de Biotecnologia da UTFPR em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (Riedi, 2019; Torres, 2021; Silva *et al.*, 2024). A obtenção da enzima a partir de resíduos agroindustriais reduz o custo de produção e aproveita materiais que, de outra forma, seriam descartados.

A água do Ribeirão dos Müller, que atravessa a sede Ecoville do câmpus Curitiba da UTFPR, recebe contribuições clandestinas de áreas urbanizadas e apresenta características típicas de corpo hídrico degradado, com concentrações de DQO superiores a 355 mg L⁻¹, nitrogênio total acima de 54 mg L⁻¹ e fósforo total acima de 13 mg L⁻¹. O tratamento dessas águas por sistemas descentralizados de baixo custo configura demanda concreta para a recuperação ambiental de pequenas bacias urbanas da região.

Como corante modelo foi adotado o azul de indigotina, por ser contaminante representativo de efluentes alimentares e têxteis. O meio suporte escolhido foi o tijolo cerâmico, resíduo abundante da construção civil já avaliado em *wetlands* de escala similar pelo grupo de pesquisa, com eficiências de remoção de DQO de 74%, NTK de 47% e PT de 87% em trabalhos anteriores (Lima *et al.*, 2018; Cabral *et al.*, 2021; Silva, 2023). A cobertura vegetal foi composta por *Eichhornia crassipes*, espécie de ampla ocorrência na região de Curitiba e com desempenho documentado em *wetlands* do mesmo laboratório (Silva, 2023; Souza, 2023).

Nesta dissertação foi avaliada a aplicação da lacase produzida por *Trametes villosa* em *wetlands* construídos de fluxo vertical subsuperficial no tratamento da água do Ribeirão dos Müller. O desempenho dos sistemas foi comparado entre unidades operadas com e sem adição de lacase livre, com adição do corante azul de indigotina. Foram também conduzidos ensaios de imobilização da enzima em diferentes resíduos da construção civil, em escala de bancada para fins comparativos e de seleção do meio suporte mais adequado, sem aplicação contínua da enzima imobilizada nos sistemas durante a fase operacional principal.

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Saneamento e no Laboratório de Biotecnologia da UTFPR, câmpus Curitiba, sede Ecoville, em regime de batelada e escala de bancada. O período experimental em *wetlands* compreendeu 162 dias de operação, entre agosto de 2025

e fevereiro de 2026, e as análises restringiram-se aos parâmetros físico-químicos e à atividade enzimática, não abrangendo avaliações microbiológicas detalhadas ou ensaios ecotoxicológicos.

Ressalta-se ainda que o azul de indigotina foi adicionado artificialmente à água do córrego na Fase II dos ensaios, como forma de contornar a ausência de uma fonte local constante deste corante. Essa estratégia caracteriza um sistema semi-natural, que combina a matriz real de um córrego urbano com a introdução controlada de um contaminante modelo, e cujos resultados de descoloração refletem as condições desse cenário específico.

O trabalho está organizado em seis capítulos. O primeiro traz a introdução e a delimitação da pesquisa. No segundo estão os objetivos. O terceiro apresenta a revisão da literatura sobre *wetlands* construídos, aplicação da lacase no tratamento de efluentes, técnicas de imobilização enzimática e uso de resíduos da construção civil como meio suporte. Os materiais e métodos estão descritos no quarto capítulo, os resultados e a discussão no quinto, e as conclusões e as recomendações para trabalhos futuros no sexto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Avaliar a aplicação de lacase produzida por *Trametes villosa* em *wetlands* construídos de fluxo vertical subsuperficial e fundo saturado, preenchidos com resíduos da construção civil, no tratamento de água de córrego urbano e na degradação do corante azul de indigotina.

2.1.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Produzir lacase a partir de *Trametes villosa* cultivado em resíduos agroindustriais e determinar a atividade enzimática para aplicação nos sistemas de *wetlands* construídos;
- Comparar o desempenho dos *wetlands* construídos de fluxo vertical subsuperficial operados com e sem adição de lacase livre no tratamento de água de córrego urbano;
- Avaliar a capacidade de imobilização da lacase em diferentes resíduos da construção civil (tijolo cerâmico, gesso, gesso acartonado, concreto aerado, tijolo autoclavado e concreto aerado autoclavado), com vistas à seleção do meio suporte mais adequado para uso nos *wetlands* construídos;
- Comparar, em escala de bancada, a degradação do corante azul de indigotina entre a lacase livre e a lacase imobilizada.

2.2 Hipóteses da pesquisa

A presente pesquisa foi conduzida sob três hipóteses principais, fundamentadas na revisão da literatura apresentada no Capítulo 3 e avaliadas a partir dos testes estatísticos descritos no Capítulo 4. A primeira é que a adição de lacase produzida por *Trametes villosa* aos *wetlands* construídos amplia a eficiência de remoção do corante azul de indigotina em relação aos sistemas operados sem adição enzimática. A segunda é que os resíduos da construção civil permitem a imobilização eficiente da lacase com retenção da atividade catalítica, em razão da porosidade e da área superficial desses materiais. A terceira é que a integração entre *wetlands* construídos e lacase configura um sistema híbrido com desempenho superior ao dos *wetlands* convencionais na remoção de compostos recalcitrantes, por associar os mecanismos naturais do leito filtrante à ação catalítica específica da enzima.

3 REVISÃO DA LITERATURA

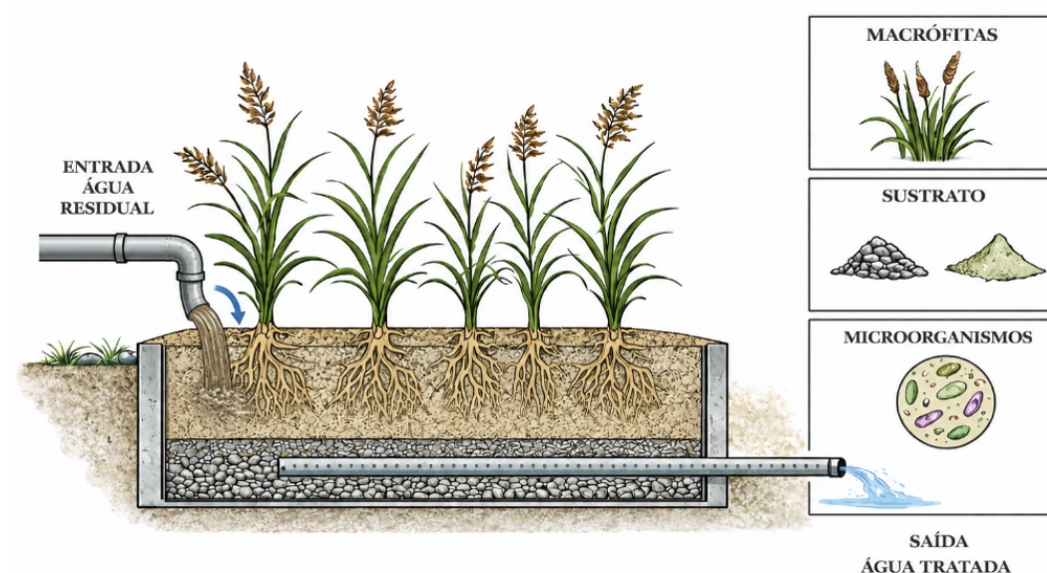
3.1 Wetlands de fluxo vertical subsuperficial

Os *wetlands* construídos são sistemas compostos por meio suporte, vegetação e microrganismos. A ação conjunta desses três elementos promove a remoção de poluentes das águas residuárias, e o meio suporte funciona também como base para o desenvolvimento do biofilme. A tecnologia foi desenvolvida na Europa e na América do Norte, com adaptações a diferentes condições climáticas ao longo das últimas décadas (Vymazal, 2010). Hassan *et al.* (2021) revisaram as configurações mais aplicadas desses sistemas, como as de fluxo horizontal, vertical e híbrido, com ênfase no uso dessa tecnologia em regiões de infraestrutura sanitária limitada.

Os *wetlands* construídos de fluxo vertical podem operar com alimentação intermitente. O afluente é aplicado em pulsos sobre a superfície do leito e percola pelo meio granular até a drenagem de base. Entre os pulsos, o ar ocupa os espaços vazios do meio suporte e mantém condições aeróbias que favorecem a oxidação da matéria orgânica e a nitrificação (Vymazal, 2010).

Essa configuração ocupa menor área do que os *wetlands* de fluxo horizontal e permite ajustar o regime hidráulico à carga tratada (Hassan *et al.*, 2021), conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema de wetland construído de fluxo vertical subsuperficial com alimentação intermitente.



Fonte: Autoria própria (2026).

Na Figura 1 é possível observar a entrada do afluente pela parte superior do leito, que percola em sentido descendente pelo meio granular e é coletado pelo sistema de drenagem

instalado na base, de onde sai como efluente tratado. As macrófitas ocupam a superfície do sistema e contribuem com a oxigenação da rizosfera. No lado direito da ilustração estão destacados os três componentes principais do sistema: macrófitas, substrato e microrganismos.

A remoção de poluentes nesses sistemas combina processos físicos, químicos e biológicos. A filtração retém sólidos suspensos à medida que o efluente percola pelo meio granular, e a adsorção remove compostos orgânicos e micropoluentes, conforme a área superficial e a composição mineralógica do substrato. A precipitação química atua sobre o fósforo, que se liga a óxidos de cálcio, alumínio ou ferro presentes no material de enchimento (Cabral *et al.*, 2021).

A biodegradação é conduzida pelos microrganismos do biofilme aderido ao substrato e às raízes das plantas, que transformam os compostos nitrogenados e oxidam a matéria orgânica carbonácea (Dotro *et al.*, 2017).

O dimensionamento dos *wetlands* construídos de fluxo vertical requer a definição de parâmetros hidráulicos e biológicos. A frequência de alimentação, em geral em pulsos diários ou a cada 48 ou 72 horas, deve permitir a renovação do ar no leito e evitar condições anaeróbias prolongadas. O tempo de detenção hidráulica precisa equilibrar a eficiência de remoção com o risco de colmatação do meio suporte.

O meio suporte deve ter granulometria uniforme e resistência mecânica adequada. Areia e brita são materiais tradicionais, e mais recentemente têm sido aplicados resíduos da construção civil à base de cerâmica e concreto (Silva, 2023). As macrófitas contribuem para a oxigenação da rizosfera e para a ciclagem de nutrientes, com destaque para *Typha sp.*, *Phragmites australis* e *Eichhornia crassipes* (Hassan *et al.*, 2021).

Os *wetlands* de fluxo vertical apresentam boas eficiências na remoção de sólidos suspensos e de carbono, em termos de demanda bioquímica de oxigênio e demanda química de oxigênio. A aeração natural proporcionada pela alimentação intermitente favorece a nitrificação, com conversão da amônia em nitrito e, em seguida, em nitrato.

A remoção de fósforo depende do substrato. Quanto maior o teor de cálcio ou ferro no material filtrante, mais intensos são os processos de adsorção e precipitação do nutriente (Cabral *et al.*, 2021). Em *wetlands* verticais com placas de gesso, Souza (2023) verificaram que os mecanismos de remoção de nutrientes estavam ligados à composição química desse substrato.

Hormônios e outros micropoluentes resistem ao tratamento e chegam aos efluentes em concentrações baixas, ainda assim capazes de alterar o sistema endócrino de organismos aquáticos. A combinação entre adsorção no substrato e biodegradação microbiana retira entre 40 e 80% desses compostos nos sistemas verticais, a depender do modo de operação.

A presença de oxigênio no meio acelera a degradação dos hormônios (Auriol *et al.*, 2007). Bliss *et al.* (2022) testaram *wetlands* construídos na remoção de 17α -etinilestradiol e β -estradiol em escala de bancada. A adição de enzimas pode ampliar a eficiência de remoção desses compostos.

No Brasil, os *wetlands* construídos são estudados desde a década de 1980, inicialmente para o tratamento de esgoto doméstico de pequenas comunidades, e a partir dos anos 2000

o escopo foi estendido a efluentes agroindustriais e têxteis (Vymazal, 2010). Em tempos mais recentes, resíduos da construção civil vêm sendo aplicados como substrato, a exemplo do trabalho de Silva (2023) com cerâmica vermelha, concreto autoclavado e compósito de concreto no tratamento de matéria carbonácea, nutrientes e hormônios, pois o baixo custo e a disponibilidade local desses materiais viabilizam sua aplicação em sistemas descentralizados.

3.2 Oxigenação em wetlands de fluxo vertical

A eficiência dos *wetlands* de fluxo vertical depende diretamente da disponibilidade de oxigênio no leito filtrante, pois a alimentação intermitente, característica dessa configuração, permite a entrada de ar nos espaços vazios do substrato entre os pulsos de aplicação, e a alternância entre condições saturadas e não saturadas mantém o sistema predominantemente aeróbio, favorável à oxidação da matéria carbonácea e à nitrificação (Vymazal, 2010). A estrutura porosa do meio granular e a atividade das raízes das macrófitas também contribuem para a difusão de oxigênio ao longo do leito (Daltro *et al.*, 2017).

A oxigenação desses sistemas ocorre por três vias principais: a difusão atmosférica, que se dá pela superfície do leito e pelos poros do substrato nos intervalos entre alimentações; o transporte pelas raízes das macrófitas, que liberam oxigênio na rizosfera e criam microzonas aeróbias no entorno radicular, com capacidade variável entre espécies como *Phragmites australis*, *Typha sp.* e *Eichhornia crassipes* (Hassan *et al.*, 2021); e os pulsos hidráulicos intermitentes, que renovam o ar do meio suporte a cada ciclo de operação.

A presença de oxigênio define quais rotas metabólicas predominam no sistema, pois em condições aeróbias os microrganismos do biofilme oxidam a matéria carbonácea e conduzem a nitrificação, enquanto a desnitrificação do nitrato a nitrogênio gasoso ocorre em microzonas de menor aeração no próprio leito (Vymazal, 2010). A heterogeneidade do biofilme e do substrato permite que reações aeróbias e anóxicas aconteçam simultaneamente em diferentes pontos do sistema.

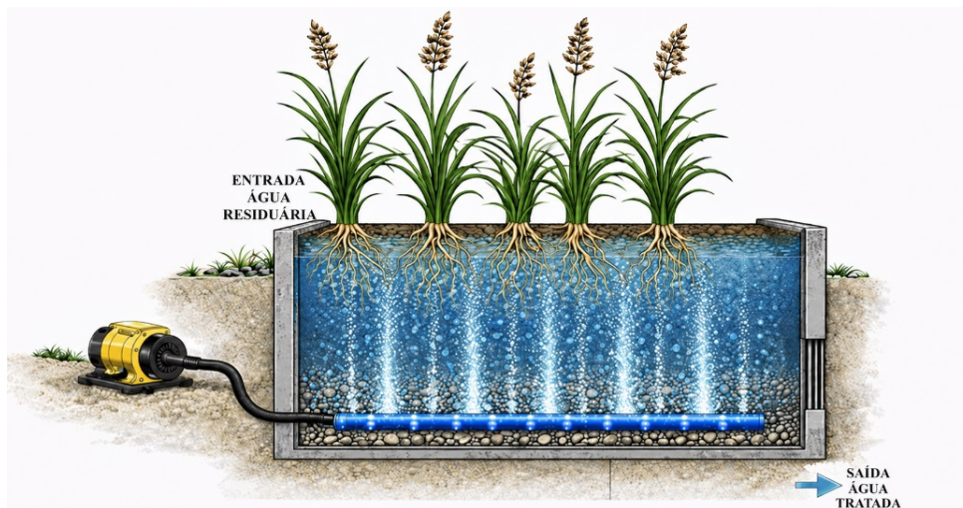
Algumas estratégias reforçam a oxigenação dos *wetlands* verticais, como a inclusão de camadas de materiais de maior condutividade hidráulica (brita grossa, por exemplo), que facilitam a circulação de ar no leito, e o uso de sistemas híbridos, nos quais unidades verticais e horizontais equilibram a disponibilidade de oxigênio e a remoção de nutrientes ao longo do tratamento (Hassan *et al.*, 2021).

A aeração forçada é uma das alternativas para ampliar a transferência de oxigênio ao leito filtrante, pois as bolhas de ar injetadas na coluna saturada do *wetland* transferem o oxigênio do estado gasoso para o dissolvido em taxas mais elevadas que as das configurações passivas, o que permite reduzir a área requerida para implantação do sistema, estimada em cerca de 1 m²/PE nos aerados, frente a 5 m²/PE nos de fluxo horizontal convencional e 4 m²/PE nos verticais não aerados.

Porém, o emprego de sopradores mecânicos eleva o consumo energético e torna a operação mais complexa, e a aeração intermitente, por sua vez, amplia a remoção do nitrogênio

total, pois a criação simultânea de zonas aeróbias e anaeróbias favorece os processos de nitrificação e desnitrificação (Nivala; Murphy; Freeman, 2020). Um esquema representativo dessa configuração é apresentado na Figura 2.

Figura 2 – Esquema de um wetland construído com aeração forçada (WTAr).



Fonte: Autoria própria (2026).

Na Figura 2 observa-se a entrada da água residuária pela parte superior do leito, a distribuição das bolhas de ar liberadas pelos difusores instalados próximos à base da unidade e a saída da água tratada pela lateral inferior. O soprador mecânico localizado no lado externo do sistema fornece o ar continuamente à tubulação de aeração, e as macrófitas enraizadas na superfície do leito complementam a oxigenação pela rizosfera.

A oxigenação do leito também ganha relevância na aplicação de enzimas oxidativas como a lacase, que utiliza o oxigênio molecular como aceptor final de elétrons na oxidação de compostos fenólicos e outros substratos (Auriol *et al.*, 2007). Os *wetlands* de fluxo vertical, por manterem condições aeróbias no leito, oferecem ambiente compatível com o uso da enzima na forma livre, adicionada à água do córrego, ou imobilizada no substrato, pois a atividade catalítica da lacase é reduzida em ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio.

3.3 Macrófitas em wetlands construídos

As macrófitas aquáticas integram os *wetlands* construídos desde os primeiros sistemas desenvolvidos na década de 1950, quando os experimentos pioneiros de Käthe Seidel, no Instituto Max Planck (Alemanha), demonstraram a capacidade dessas plantas em remover poluentes de águas residuárias (Vymazal, 2011). Nas décadas seguintes, a vegetação foi mantida como elemento funcional do tratamento em todas as configurações desenvolvidas, característica que diferencia os *wetlands* construídos dos filtros convencionais, e a importância relativa de suas funções físicas, químicas e biológicas varia conforme a configuração adotada, como mostra o Quadro 1.

Quadro 1 – Importância relativa das funções das macrófitas em diferentes configurações de *wetlands* construídos.

Função	Fluxo Superficial	Fluxo Subsuperficial	Fluxo Vertical	Sistemas Combinados
Área requerida	>20 m ² /PE	~10 m ² /PE	~5 m ² /PE	2–5 m ² /PE
Estabilização da superfície do leito	+++++	+++++	+++	+++
Prevenção de colmatção	-	-	+++++	+++++
Redução da velocidade do fluxo	+++	-	-	-
Atenuação da luz	+++++	++	+	+++
Isolamento térmico	+++	+++	+++	+++
Fixação de microrganismos	+++++	+++	+	+
Absorção de nutrientes	+++++	+	-	+
Transferência e liberação de O ₂	+	++	+	+
Habitat para fauna	+++++	+++	+	+
Estética	+++++	+++++	+++	+++++

Fonte: Brix (1994).

Nota: O número de sinais “+” indica maior importância do processo; “-” indica ausência de importância. PE = População Equivalente (Population Equivalent).

O Quadro 1 evidencia que as macrófitas exercem papel mais intenso nos *wetlands* de fluxo superficial, sobretudo na estabilização do leito, fixação de microrganismos e absorção de nutrientes, enquanto nos sistemas de fluxo vertical a contribuição principal está na prevenção da colmatção, o que reflete a maior circulação de ar e a menor saturação do leito.

A parte aérea das plantas atenua a radiação solar e reduz a velocidade do vento sobre a superfície, o que minimiza variações térmicas no leito, e as raízes e rizomas criam caminhos preferenciais para o fluxo da água do córrego, além de oferecerem superfície para fixação do biofilme microbiano. A liberação de oxigênio pela rizosfera cria microzonas aeróbias em meio predominantemente anóxico e favorece a nitrificação localizada (Brix, 1994), e as plantas absorvem também nitrogênio e fósforo, que são incorporados à biomassa vegetal.

A taxa de liberação radicular de oxigênio varia conforme a espécie vegetal e o estágio de desenvolvimento da planta, e Zhang *et al.* (2014) quantificaram valores entre 108 e 404 mg O₂ m⁻² dia⁻¹ em *wetlands* plantados com *Phragmites australis*, oxigenação que permite a coexistência de processos aeróbios e anaeróbios no mesmo sistema e amplia as rotas metabólicas para transformação de compostos nitrogenados e degradação da matéria orgânica.

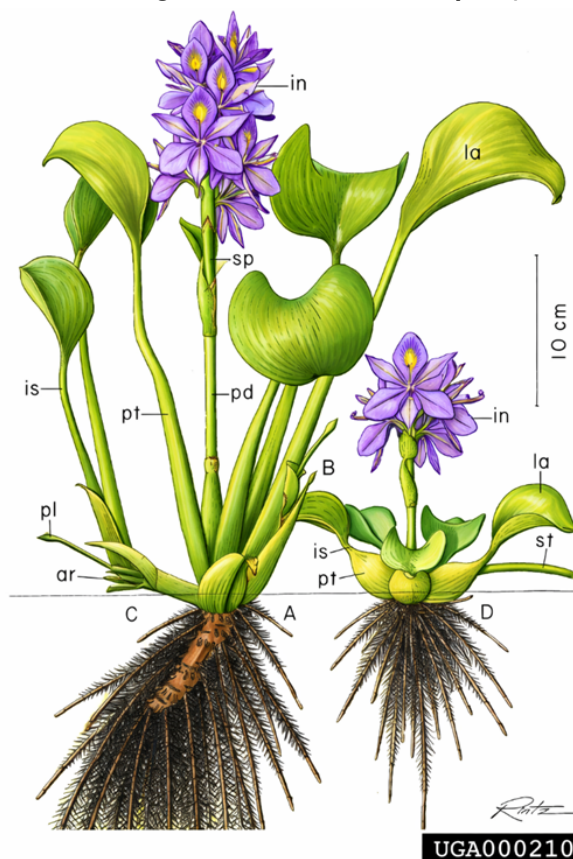
Os levantamentos sobre espécies aplicadas em *wetlands* construídos apontam para a predominância de macrófitas emergentes em sistemas de fluxo subsuperficial, com *Phragmites australis* como a mais frequente em publicações internacionais, seguida por *Typha spp.* e *Scirpus spp.* (Vymazal, 2011). Em regiões tropicais, dá-se preferência a espécies nativas adaptadas ao clima, como *Heliconia spp.*, *Cyperus spp.* e *Eichhornia crassipes*, cuja seleção considera também as características da água tratada e a facilidade de manejo.

No Brasil, as pesquisas com *wetlands* construídos aplicam majoritariamente espécies do gênero *Typha*, conhecidas popularmente como taboa, e a análise de 42 publicações nacionais por Sezerino *et al.* (2015) identificou *T. domingensis* e *T. latifolia* como as mais empregadas em sistemas de fluxo horizontal, seguidas por *Eleocharis spp.*, *Cyperus papyrus* e *Heliconia psittac-*

corum. Sperling e Sezerino (2018) compilaram parâmetros de projeto para condições tropicais brasileiras, com recomendações sobre densidade de plantio e manejo da vegetação.

A *Eichhornia crassipes*, conhecida como aguapé ou jacinto-d'água, é uma macrófita flutuante nativa da bacia amazônica, de crescimento rápido e elevada capacidade de absorção de nutrientes (Rezania *et al.*, 2015). O sistema radicular extenso da espécie fornece área superficial para adsorção de compostos e fixação de microrganismos, e a planta tolera ampla faixa de pH e temperatura, o que favorece sua adaptação às condições climáticas do sul do Brasil. Na Figura 3 é apresentada a morfologia da espécie.

Figura 3 – Morfologia de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms.



Fonte: Adaptado de USDA Agricultural Research Service Archive, Bugwood.org (UGA0002102).

Nota: A - roseta com pecíolo atenuado (condições de adensamento); B - gema axilar em expansão; C - ramete em desenvolvimento; D - roseta com pecíolo bulboso (condições abertas). ar = raiz adventícia; in = inflorescência; is = istmo foliar; la = lâmina foliar; pd = pedúnculo floral; pl = folha primária; pt = pecíolo; sp = espata; st = estolão.

A Figura 3 mostra a planta adulta com folhas arredondadas, pecíolos bulbosos responsáveis pela flutuação, inflorescência violeta-clara no ápice e sistema radicular extenso e fibroso, que atua na absorção de nutrientes e na fixação do biofilme microbiano, e ilustra ainda quatro estágios morfológicos: roseta com pecíolo atenuado em condições de adensamento (A), gema axilar em expansão (B), ramete em desenvolvimento (C) e roseta com pecíolo bulboso em ambientes abertos (D).

A literatura registra a eficiência de *E. crassipes* na remoção de diferentes classes de poluentes em sistemas de tratamento, desde biomassa e nutrientes até corantes, hidrocarbonetos e metais pesados, com resultados que são sintetizados no Quadro 2.

Quadro 2 – Estudos sobre desempenho de *Eichhornia crassipes* na remoção de poluentes em sistemas de tratamento.

Referência	Poluente / matriz	Principal resultado
Henry-Silva e Camargo (2002)	Biomassa em reservatório eutrófico (MG)	Produtividade entre 20 e 226 ton peso seco ha ⁻¹ ano ⁻¹
Mustapha, Bruggen e Lens (2018)	Efluente de refinaria de petróleo	Remoção satisfatória de hidrocarbonetos e nutrientes em <i>wetland</i> vertical
Mustapha, Bruggen e Lens (2019)	Nitrogênio e fósforo em WC vertical	85% de N-amoniaco e 62% de fósforo total
Rigueto <i>et al.</i> (2020)	Corante reativo vermelho	95% de remoção por bioadsorção nas raízes
Ekanayake <i>et al.</i> (2021)	Mecanismos de remoção de corantes	Até 46% por enzimas intracelulares, restante por bioadsorção
Monroy-Licht <i>et al.</i> (2024)	Metais pesados (Pb, Cu, Cd)	Remoções superiores a 80% em fitorremediação

Fonte: Autoria própria (2026).

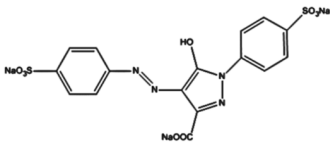
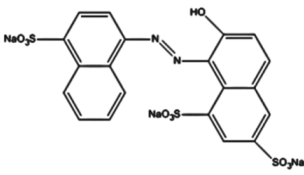
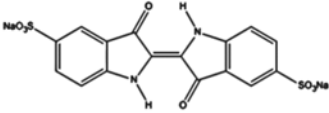
Os estudos compilados no Quadro 2 mostram o desempenho da *E. crassipes* sobre poluentes orgânicos, inorgânicos e emergentes, atuação viabilizada pelo rápido crescimento, pela adaptabilidade a diferentes condições ambientais e pela ocorrência natural em corpos hídricos eutrofizados do sul do Brasil, fatores que facilitam a obtenção da planta para aplicação em sistemas de tratamento (Rezania *et al.*, 2015). A degradação de corantes por enzimas intracelulares (Ekanayake *et al.*, 2021) indica ainda que a adição de lacase exógena pode ampliar a remoção de compostos recalcitrantes, hipótese que fundamenta a escolha da macrófita na presente pesquisa.

3.4 Corantes em efluentes

Os corantes sintéticos são amplamente utilizados em diversos setores industriais, como têxtil, alimentício, farmacêutico, cosmético e de papel, e dentre os estudos sobre remoção desses compostos em sistemas de tratamento, os efluentes têxteis concentram a maior atenção da literatura por representarem a principal fonte de descarte em corpos hídricos. Paralelamente, a indústria alimentícia também emprega corantes sintéticos em larga escala em doces, bebidas, iogurtes, gomas de mascar e produtos de confeitaria (Cabral, 2022).

No Brasil, a ANVISA autoriza o uso de 11 corantes sintéticos em alimentos, distribuídos nas classes azo, trifenilmetano, indigoide e xanteno (Ristea; Zărnescu, 2023), e entre os mais aplicados na indústria estão o azul de indigotina, o amarelo tartrazina e o ponceau 4R, cujas estruturas químicas e principais empregos estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3 – Corantes alimentícios sintéticos permitidos no Brasil.

Corante	Classe	Estrutura	Principais usos
Amarelo Tartrazina	Azo		Laticínios, fermentados, licores e doces
Ponceau 4R	Azo		Frutas em caldas, balas e doces
Azul de Indigotina	Indigoide		Balas, gomas, iogurtes e sucos

Fonte: Adaptado de Cabral (2022).

O Quadro 3 evidencia que o amarelo tartrazina e o ponceau 4R pertencem à classe azo, caracterizada pela presença da ligação N=N em sua estrutura cromófora, enquanto o azul de indigotina pertence à classe dos indigoides, com dois núcleos benzeno ligados a grupos sulfônicos. Os três corantes são aplicados em produtos de consumo direto, como laticínios, balas, gomas, iogurtes, frutas em caldas e sucos, o que reforça a necessidade de acompanhamento de sua presença em efluentes da indústria alimentícia.

O azul de indigotina, também chamado índigo carmim, é empregado em balas, gomas de mascar, iogurtes e refrescos em pó, com ingestão diária aceitável de 5,0 mg kg⁻¹ segundo a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA); o amarelo tartrazina confere cor amarelo-limão a sucos, sopas, geleias e sorvetes, com ingestão diária aceitável de 7,5 mg kg⁻¹, e o ponceau 4R dá tonalidade vermelha a alimentos e cosméticos (Cabral, 2022).

Embora autorizados para uso alimentício, esses corantes apresentam toxicidade: o azul de indigotina causa irritações na pele e nos olhos, o amarelo tartrazina está associado a reações alérgicas como urticária e asma em indivíduos sensíveis (Cabral, 2022), e o ponceau 4R é proibido em alguns países por suspeitas de carcinogenicidade. A presença desses compostos em efluentes industriais representa risco ambiental, pois suas estruturas cromóforas resistem

à biodegradação em sistemas convencionais de tratamento e reduzem a penetração de luz em corpos hídricos (Castillo-suárez *et al.*, 2023b).

Diferentes tecnologias têm sido investigadas para a remoção de corantes sintéticos em efluentes, com ênfase em *wetlands* construídos, processos adsorptivos e degradação enzimática pela lacase, cujas condições operacionais e resultados principais estão reunidos no Quadro 4.

Quadro 4 – Estudos sobre remoção de corantes sintéticos em diferentes sistemas de tratamento.

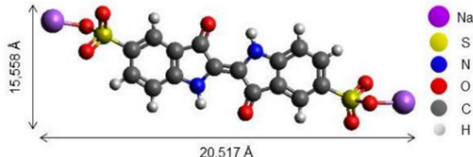
Referência	Corante / matriz	Sistema e condições	Principal resultado
Dogdu e Yalcuk (2016)	Efluente de tingimento com índigo	<i>Wetland</i> construído, influência do substrato	Remoção dependente da composição do meio suporte
Hussein e Scholz (2017)	Corantes têxteis	<i>Wetland</i> de fluxo vertical	Remoção superior a 80%
Cabral (2022)	Azul de indigotina, amarelo tartrazina e ponceau 4R	Carvão ativado de casca de maracujá	Eficiências de 99,87%, 52,51% e 67,90%, respectivamente
Leontieş <i>et al.</i> (2022)	Azul de indigotina e verde naftol B	Lacase de <i>Trametes versicolor</i> imobilizada em microesferas de quitosana-ácido poliacrílico	Descoloração ~90% em 10 min, 2,4 vezes mais rápida que a enzima livre, com retenção de 72% da atividade
Benny e Chakraborty (2023)	Corantes têxteis	<i>Wetlands</i> horizontais e verticais com resíduos orgânicos como meio suporte	Bons resultados na remoção de cor
Jayalakshmi, Soundaranayaki e Kannan (2023)	Azul de metileno	<i>Wetland</i> vertical	Remoção satisfatória
Jeyabalan <i>et al.</i> (2023)	Corantes azo (revisão)	Lacase livre e imobilizada	Comparação de formas de aplicação enzimática
Hordieieva <i>et al.</i> (2023)	Azul de indigotina	Lacase de <i>Trametes versicolor</i> + mediador redox TEMPO, temperatura ambiente, pH neutro	Descoloração completa

Fonte: Autoria própria (2026).

Os estudos reunidos no Quadro 4 mostram que a remoção de corantes varia conforme o sistema adotado e as condições operacionais. Os *wetlands* construídos apresentam desempenho influenciado pelo tipo de substrato e pela configuração do fluxo (Dogdu; Yalcuk, 2016; Hussein; Scholz, 2017; Benny; Chakraborty, 2023; Jayalakshmi; Soundaranayaki; Kannan, 2023), enquanto a adsorção em carvão ativado alcança eficiências elevadas, porém variáveis conforme o corante tratado (Cabral, 2022), e a degradação enzimática pela lacase se destaca pela rapidez e pela adaptabilidade a diferentes condições de pH e temperatura (Leontieş *et al.*, 2022; Hordieieva *et al.*, 2023; Jeyabalan *et al.*, 2023).

A combinação dessas evidências fundamenta o uso do azul de indigotina como corante modelo no presente trabalho, pois suas propriedades físico-químicas, apresentadas no Quadro 5, são compatíveis com o acompanhamento espectrofotométrico da atividade enzimática da lacase.

Quadro 5 – Propriedades e características do corante azul de indigotina.

Corante Azul de Indigotina	
Fórmula Química	$C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$
Massa Molar ($g\ mol^{-1}$)	466,35
Color Index	73015
Nº CAS de identificação	860-22-0
λ máx. de absorbância (nm)	610
Estrutura química tridimensional	

Fonte: Adaptado de Cabral (2022).

O Quadro 5 apresenta a fórmula química $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$, a massa molar de 466,35 $g\ mol^{-1}$, o Color Index 73015, o número CAS 860-22-0, o comprimento de onda de absorbância máxima em 610 nm e a estrutura tridimensional da molécula, com dimensões de 15,558 Å por 20,517 Å, dados úteis para a quantificação do corante por espectrofotometria na região visível.

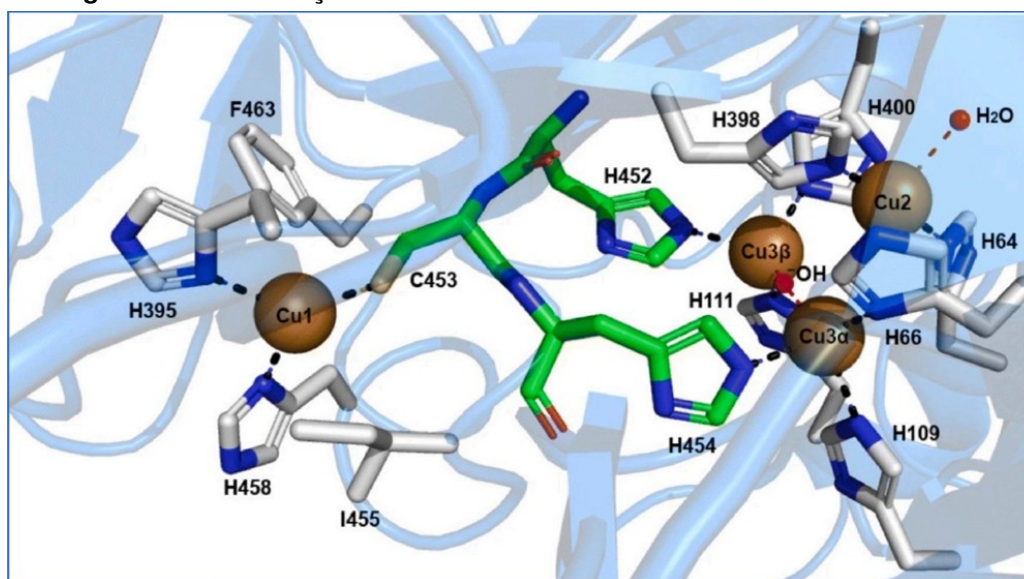
A estrutura química do azul de indigotina permite sua oxidação pela lacase, que resulta em perda de cor quantificável por espectrofotometria na região visível, e entre os corantes alimentícios permitidos no Brasil é o único que também é aplicado na indústria têxtil, fato que explica a maior disponibilidade de estudos sobre sua degradação (Cabral, 2022). O emprego de um corante alimentício como modelo permite ainda avaliar a ação enzimática sobre compostos cromóforos sem a complexidade analítica associada a micropoluentes como hormônios ou fármacos.

3.5 A enzima lacase

A lacase (EC 1.10.3.2) é uma oxidase multicobre que catalisa reações de oxidação em substratos fenólicos e aromáticos, pois o oxigênio molecular atua como aceptor final de elétrons durante o ciclo catalítico e é reduzido a água, e entre os principais produtores dessa enzima estão os fungos ligninolíticos dos gêneros *Trametes* e *Pleurotus*, embora também sejam observados registros em plantas e bactérias (Arregui *et al.*, 2019).

A estrutura da enzima é composta por quatro átomos de cobre distribuídos em três centros, sendo o T1 o responsável pela cor azul característica e pelo maior potencial redox, com absorbância máxima em 610 nm, enquanto os centros T2 e T3 formam um *cluster* trinuclear no qual ocorre a redução do oxigênio. O cobre T1 é coordenado por dois resíduos de histidina e um de cisteína, ao passo que os centros T2 e T3 estão ligados a cadeias laterais de histidina, conforme mostra a Figura 4.

Figura 4 – Coordenação dos centros de cobre no sítio catalítico da lacase.

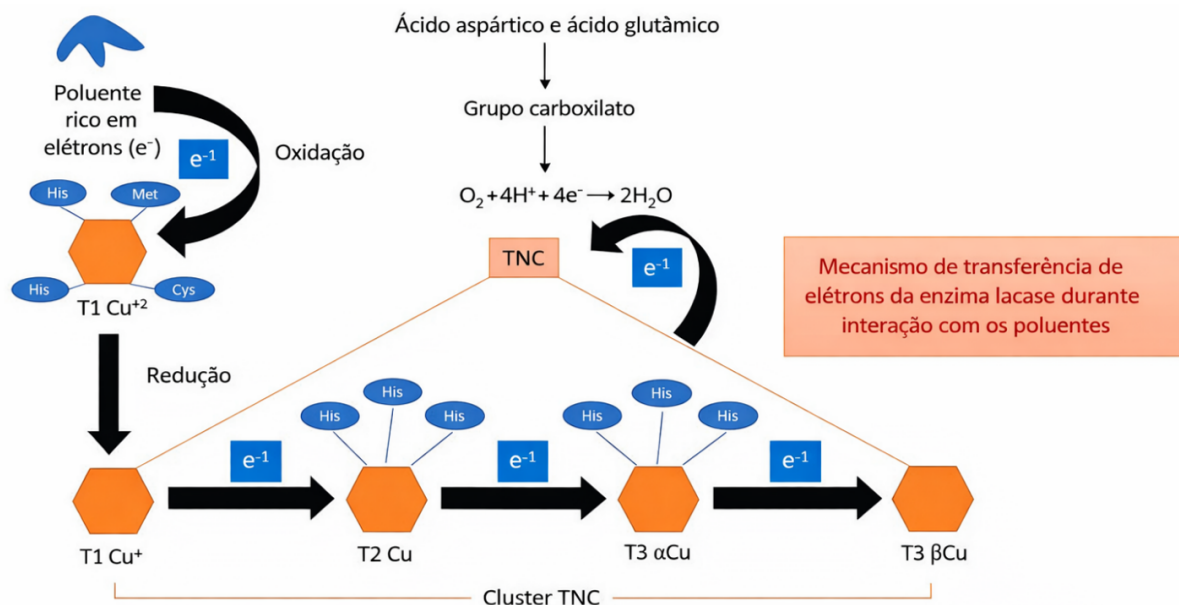


Fonte: Arregui (2019).

A Figura 4 ilustra a coordenação dos centros de cobre no sítio catalítico da lacase: o centro T1, coordenado pelos resíduos H395, C453 e H458, ocupa a região de entrada dos elétrons, enquanto o *cluster* trinuclear, formado pelos centros Cu2, Cu3 α e Cu3 β , se localiza na extremidade oposta, coordenado pelos resíduos H64, H66, H109, H111, H398 e H400, próximo à molécula de H₂O liberada ao final da reação.

Durante a oxidação do poluente, o centro T1 extrai um elétron do substrato e reduz Cu²⁺ a Cu⁺, e os elétrons migram em seguida para o *cluster* trinuclear, onde a acumulação de quatro elétrons permite a redução do O₂ a duas moléculas de água, reação na qual os grupos carboxilato dos ácidos aspártico e glutâmico fornecem os átomos de hidrogênio necessários (Dong *et al.*, 2023), como ilustrado na Figura 5.

Figura 5 – Mecanismo de interação da lacase com o poluente pelo fluxo de elétrons do substrato à molécula de H₂O.



Fonte: Adaptado de Dong (2023).

A Figura 5 detalha o fluxo de elétrons da molécula de substrato à molécula de água, com a oxidação do poluente rico em elétrons no centro T1 Cu^{2+} , a transferência sequencial pelos centros T1 Cu^+ , T2 Cu, T3 αCu e T3 βCu do *cluster* trinuclear (TNC) e a redução final do O_2 a $2H_2O$ pela combinação de quatro elétrons e quatro prótons, mediada pelos grupos carboxilato dos ácidos aspártico e glutâmico.

As condições do meio reacional afetam diretamente a atividade catalítica da lacase: o pH ótimo das lacases fúngicas situa-se entre 3,0 e 6,0, conforme a origem da enzima e o substrato avaliado, e valores muito ácidos aumentam a oxidação de fenóis, porém reduzem a estabilidade da proteína ao longo do tempo (Auriol *et al.*, 2007). As temperaturas entre 25 e 60 °C favorecem a atividade enzimática, com queda em valores superiores; salinidade elevada e presença de metais pesados podem provocar inibição parcial ou desnaturação, enquanto mediadores redox como o ABTS permitem a oxidação de compostos recalcitrantes que não reagem diretamente com o sítio ativo (Rodríguez-couto, 2024).

A ação da lacase se estende a várias classes de compostos encontrados em efluentes. Nos fenóis, a oxidação é direta e origina produtos polimerizados que precipitam e são removidos por sedimentação. Os hormônios esteroides, a exemplo do 17β -estradiol e do 17α -etinilestradiol, sofrem degradação pela enzima, o que diminui a atividade estrogênica do efluente tratado (Auriol *et al.*, 2007; Bliss *et al.*, 2022). Para corantes têxteis e alimentícios das classes azo e indigoide, a literatura relata descoloração pela via enzimática com eficiências acima de 80% (Jayalakshmi; Soundaranayaki; Kannan, 2023; Rajendran; Kalairaj; Senthilvelan, 2024).

Arregui *et al.* (2019) revisaram a estrutura e as aplicações da enzima no tratamento de águas e ressaltaram sua capacidade de oxidar compostos fenólicos com uso exclusivo de oxigênio como aceptor de elétrons e liberação de água como único subproduto, enquanto Jeya-

balan *et al.* (2023) compararam o desempenho da lacase livre e imobilizada na descoloração de corantes e apontaram que a imobilização confere maior estabilidade operacional e permite a reutilização em múltiplos ciclos, embora com possível perda parcial de atividade.

Rodríguez-Couto (2024) discutiu a aplicação de lacase imobilizada em biorreatores de leito fixo e leito fluidizado, com estabilidade operacional mantida por períodos prolongados, em alguns casos superiores a 75 horas de operação contínua, o que viabiliza a aplicação da enzima em escala ampliada.

O custo de obtenção da lacase pode ser reduzido pelo uso de resíduos agroindustriais como substrato para cultivo fúngico, pois o bagaço de cana, o bagaço de uva e a casca de arroz fornecem nutrientes e indutores para a síntese enzimática, e *Trametes villosa* cultivado nesses substratos produz lacase com atividade comparável à de preparações comerciais (Riedi, 2019; Torres, 2021).

Em algumas matrizes, porém, a lacase na forma livre apresenta limitações, pois a concentração elevada de matéria orgânica compete pelos sítios ativos e reduz a eficiência da degradação dos compostos-alvo, enquanto o fluxo hidráulico arrasta a enzima e diminui o tempo de contato com os poluentes. A imobilização em suportes sólidos confere maior estabilidade térmica e operacional, além de permitir o reuso do biocatalisador em múltiplos ciclos (Fernández-fernández; Sanromán; Moldes, 2013; Kujawa *et al.*, 2021a), e entre as opções disponíveis destacam-se os materiais cerâmicos porosos, que oferecem área superficial para ancoragem enzimática e podem ser incorporados ao leito filtrante de *wetlands* construídos (Silva, 2023).

3.6 Produção de lacase em meio líquido com resíduos agroindustriais

Os fungos do gênero *Trametes* estão entre os principais produtores de lacase estudados para aplicações biotecnológicas, pois espécies como *T. versicolor*, *T. hirsuta*, *T. pubescens* e *T. villosa* secretam múltiplas isoformas da enzima em meios de cultivo com compostos fenólicos e lignina, sendo *T. versicolor* a mais estudada e comercializada, com preparações enzimáticas disponíveis em catálogos de fornecedores de reagentes. A espécie *T. villosa*, por sua vez, destaca-se por características vantajosas para produção em larga escala, conforme apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Macro morfologia de Basidioma - Superfície abhimenial e himenoforal de *Trametes villosa*.



Fonte: Fernandes (2024).

Na Figura 6 é possível observar a morfologia macroscópica do basidioma de *T. villosa*, composta por duas superfícies distintas: à esquerda, a superfície abhimenial exibe zoneamento concêntrico de coloração castanho-amarelada e textura aveludada característica da espécie; à direita, a superfície himenoforal apresenta poros bem definidos dispostos de forma regular, estrutura responsável pela liberação dos esporos. Essa espécie apresenta rápido crescimento micelial e boa tolerância a variações de pH e temperatura durante o cultivo, atributos que favorecem sua aplicação em escala ampliada (Arregui *et al.*, 2019).

Estudos realizados na UTFPR têm avaliado a produção de lacase por *T. villosa* em diferentes substratos agroindustriais, com Riedi (2019) caracterizando as isoformas enzimáticas produzidas e avaliando técnicas de imobilização, Torres (2021) otimizando condições de cultivo para maximizar a atividade no extrato bruto, e Silva *et al.* (2024) comparando o desempenho da enzima produzida com a lacase comercial de *T. versicolor* em ensaios de degradação de compostos recalcitrantes, com resultados comparáveis em condições controladas; o conjunto desses trabalhos consolida uma base de conhecimento sobre a produção e aplicação da enzima no contexto de tratamento de efluentes.

Os resíduos agroindustriais fornecem carbono, nitrogênio e compostos fenólicos que induzem a síntese da lacase, com destaque para o bagaço de cana-de-açúcar, abundante no Brasil em razão da produção de etanol e açúcar, o bagaço de uva, resíduo da indústria vinícola rico em polifenóis que atuam como indutores naturais, e a casca de arroz, subproduto do beneficiamento de grãos que fornece lignina e celulose para o crescimento fúngico.

Combinações desses resíduos alcançam atividades superiores a 4000 U L⁻¹ em cultivos otimizados de *T. villosa* (Riedi, 2019; Torres, 2021), e o aproveitamento desses materiais reduz os custos de produção e valoriza resíduos que, de outro modo, seriam descartados ou subutilizados.

A produção da lacase por fungos da podridão branca pode ser conduzida por fermentação submersa (FS) ou fermentação em estado sólido (FES): na FS, o cultivo ocorre em meio líquido sob agitação orbital, o que facilita o controle de pH e temperatura, e na FES, o fungo cresce sobre substratos semissólidos úmidos em condições que simulam seu habitat natural, o que tende a aumentar a produtividade enzimática e a reduzir os custos operacionais no caso do

gênero *Trametes*, pois a lignina presente no substrato atua como indutor natural (Wang *et al.*, 2022; Osmá; Toca-herrera; Rodríguez-couto, 2011).

A temperatura de cultivo é mantida entre 25 e 30 °C, faixa adequada para fungos mesofílicos, e o tempo de fermentação varia entre 7 e 14 dias. Indutores metálicos e não metálicos ampliam a produção da lacase, com destaque para os íons Cu^{2+} , componente estrutural do sítio ativo da enzima, cujas concentrações entre 0,5 e 2,0 mM de sulfato de cobre elevam a atividade enzimática no extrato final.

Compostos fenólicos como ácido ferúlico, ácido vanílico e siringaldazina também atuam como indutores, pois estimulam a transcrição dos genes da lacase, e o etanol em baixas concentrações (1 a 3% v/v) pode ser adicionado como indutor complementar, sendo a combinação de indutor metálico com indutor fenólico geralmente responsável por efeito sinérgico, com atividades superiores às obtidas pela indução isolada (Rodríguez-couto, 2024).

Após o período de cultivo, o meio fermentado é separado do micélio por filtração em papel ou centrifugação, e o líquido sobrenadante constitui o extrato enzimático bruto, que contém lacase e outras proteínas secretadas pelo fungo. O armazenamento sob refrigeração a 4 °C preserva a atividade por algumas semanas, enquanto o congelamento a -18 °C estende a conservação por meses.

A quantificação da atividade enzimática é realizada pelo método colorimétrico com ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato]) como substrato, pois o ABTS oxidado apresenta coloração verde-azulada com absorbância máxima em 420 nm, o que permite o acompanhamento espectrofotométrico da reação, com os resultados expressos em Unidades de Atividade (U mL^{-1}), definidas como a quantidade de enzima que oxida 1 μmol de ABTS por minuto nas condições do ensaio (Bourbonnais; Paice, 1990).

A produção de lacase a partir de resíduos agroindustriais apresenta vantagens econômicas e ambientais, pois o custo dos substratos é baixo em comparação a meios de cultivo formulados com reagentes analíticos, e os resíduos lignocelulósicos estão disponíveis em grandes quantidades no Brasil, o que facilita o escalonamento da produção. A enzima obtida no extrato bruto pode ser aplicada diretamente em sistemas de tratamento, sem necessidade de purificação extensiva que elevaria os custos, condição que viabiliza o uso da lacase em *wetlands* construídos e outros sistemas descentralizados, nos quais grandes volumes de biocatalisador são necessários e preparações comerciais seriam economicamente inviáveis.

3.7 Imobilização da lacase

A lacase livre perde atividade catalítica ao longo do tempo quando aplicada no tratamento de alguns efluentes, pois variações de pH e temperatura, presença de compostos inibidores e arraste pelo fluxo hidráulico comprometem seu desempenho, e a imobilização em suportes sólidos atenua essas limitações ao manter a enzima ancorada no sistema, preservar a atividade por períodos mais longos e viabilizar o reuso em ciclos sucessivos (Fernández-fernández; Sanromán; Moldes, 2013). O suporte pode ainda ser incorporado ao leito filtrante

de *wetlands* construídos, o que associa a remoção física à degradação enzimática no mesmo sistema.

Cerâmicas, sílicas, aluminas e polímeros estão entre os materiais empregados como suporte para imobilização enzimática (Kujawa *et al.*, 2021a), e a porosidade e a área superficial desses materiais condicionam tanto a quantidade de enzima fixada quanto o acesso dos substratos ao sítio ativo, pois poros de dimensões reduzidas dificultam a difusão de moléculas volumosas, enquanto poros amplos demais comprometem a área disponível para ancoragem.

A presença de grupos funcionais na superfície do suporte viabiliza a ligação enzima-suporte por mecanismos distintos, ao passo que a resistência mecânica do material previne sua fragmentação ao longo da operação, fatores que, somados à granulometria e à estabilidade química, determinam a durabilidade do biocatalisador imobilizado.

Entre os métodos de fixação da lacase em suportes sólidos, a adsorção física atua por meio de interações eletrostáticas e forças de Van der Waals, sendo simples e de baixo custo, porém com risco de liberação da enzima durante a operação, ao passo que a ligação covalente forma pontes químicas entre o suporte e a enzima e aumenta a retenção e a estabilidade, com o glutaraldeído como agente mais empregado para esse fim.

O encapsulamento aprisiona a enzima em redes poliméricas e a protege de condições adversas, enquanto o método sol-gel forma matrizes inorgânicas ao redor da molécula enzimática, com preservação da atividade catalítica em ambientes agressivos (Fernández-fernández; Sanromán; Moldes, 2013; Rodríguez-couto, 2024).

3.8 Wetlands construídos no tratamento de corantes alimentícios

No Quadro 6 são apresentadas técnicas de imobilização usadas para lacases de diferentes fontes, com dados de eficácia, vantagens operacionais e remoção de poluentes.

Quadro 6 – Técnicas de imobilização empregadas para lacases na degradação de poluentes.

Fonte da lacase	Método de imobilização	Carga de lacase	Eficácia de imobilização	Benefícios da imobilização	Aplicação	Eficiência de biodegradação	Referência
<i>Aspergillus</i> sp.	Covalente em PET amino-funcionalizado com estrutura metal-orgânica UiO-66(Zr)-NH ₂ e adsorção física do mediador ABTS	28,49 mg g ⁻¹ (lacase bruta); 40,97 mg g ⁻¹ (lacase pura)	n.m.	Estabilidade de pH aumentada em pH ácido, maior afinidade pelo substrato e grande reciclabilidade	Degradação de cristal violeta, verde malaquita, verde alizarina e laranja de metila	58,80% para cristal violeta, 64,82% para verde malaquita, 61,61% para verde alizarina, 21,12% para laranja de metila em 24 h	Lou et al. (2023)
Folhas de <i>Carica papaya</i>	Aprisionamento físico em esferas de quitosana	2,3 µg	98%	Alta termoestabilidade, tolerância a metais, solventes, melhor remoção de corantes	Descoloração do corante sintético índigo carmim	100% em 8 h	Jaiswal et al. (2016)
Lacase comercial (NOVOZYME)	Co-imobilização de lacase com CTF modificado com PEG em esferas de gel de alginato de cálcio dopado com Cu	10 LAMU g ⁻¹	n.m.	Estabilidade contra irradiação de luz azul, estabilidade de pH melhorada, fotocatalise e oxidação enzimática de poluentes fenólicos	Oxidação fotocatalítica e enzimática de poluentes fenólicos	87,47% (fenol), 100% (indol), 100% (NP), 69,59% (4-CP), 80,38% (2,4-DCP) e 100% (BPA)	Zhou et al. (2023)
Lacase comercial (SIGMA, EUA)	Partículas magnéticas de Fe ₃ O ₄ revestidas com quitosana	1 mg mL ⁻¹	79,1%	Alta estabilidade operacional, reusabilidade e fácil recuperação magnética da enzima	Degradação de HPAs, ANT e BAP	81,9% (ANT) e 69,2% (BaP) em 48 h	Deng et al. (2022)

Quadro 6 – Técnicas de imobilização empregadas para lacases na degradação de poluentes. Continuação

Fonte da lacase	Método de imobilização	Carga da lacase	Eficácia de imobilização	Benefícios da imobilização	Aplicação	Eficiência de biodegradação	Referência
<i>Corioloopsis polyzona</i>	Agregados enzimáticos reticulados usando PEG como precipitante, GA como agente reticulante, BSA como estabilizador	148 U g ⁻¹	60,2%	Resistente a protease, NaN ₃ , EDTA, metanol e acetona, alta termorresistência	Remoção de NP, bisfenol A e triclosan em FBB em modo contínuo	>95%, 150 min de tempo de residência	Cabana et al. (2007)
<i>Trametes versicolor</i>	Imobilização covalente de lacase com glutaraldeído em nanopartículas magnéticas modificadas com ácido tânico/polietilenoimina	39,9 mg g ⁻¹	53,1%	Atividade em pH ácido e ampla faixa de temperatura, excelente estabilidade de armazenamento e reusabilidade satisfatória	Remoção de inibidores fenólicos em hidrolisado lignocelulósico (vanilina, siringaldeído, ácido ferúlico e ácido p-cumárico)	9,8% para vanilina, 67,3% para siringaldeído, 100% para ácido ferúlico e 38,5% para ácido p-cumárico	Li et al. (2022)
<i>Trametes versicolor</i>	Adsorção iônica de lacase em celulose funcionalizada com lisina zwitteriônica	27,91 mg g ⁻¹	129%	Aprimoramento biocatalítico, natureza renovável e biodegradável do material imobilizante	Degradação dos corantes verde malaquita e índigo carmim em soluções aquosas	88,58% após 96 h para verde malaquita, 99% para índigo carmim após 72 h	Mares et al. (2022)
<i>Trametes versicolor</i>	Encapsulação de lacase em nanopartículas vault	n.m.	n.m.	Melhor estabilidade de pH e térmica (60% a 35 °C; 40% a 45 °C após 6 dias), redução da toxicidade da solução de corante e menor inibição de diversas funções celulares em vários organismos	Descoloração e destoxificação do corante antraquinona Reactive Blue 19 e corantes azo Acid Orange 7	72% para Reactive Blue 19, 80% para Acid Orange 7	Gao et al. (2022)

Quadro 6 – Técnicas de imobilização empregadas para lacases na degradação de poluentes. Continuação

Fonte da lacase	Método de imobilização	Carga da lacase	Eficácia de imobilização	Benefícios da imobilização	Aplicação	Eficiência de biodegradação	Referência
<i>Trametes versicolor</i>	Adsorção/adsorção-reticulação/ligação covalente em biocarvão modificado com álcali	1,71 mg mL ⁻¹ (A/lac@A-MB), 1,77 mg mL ⁻¹ (A-C/lac@A-MB), 0,77 mg mL ⁻¹ (CB/lac@A-MB)	n.m.	Excelente reusabilidade e estabilidade	Degradação de verde malaquita	97,70% (A/lac@A-MB), 98,77% (A-C/lac@A-MB) e 97,86% (CB/lac@A-MB)	Wang et al. (2022)
<i>Trametes versicolor</i>	Esferas de Amberlite IR-120 H	2–6 mg mL ⁻¹	78,7%	Matriz barata, melhor estabilidade operacional, térmica e de armazenamento	Uso projetado em biorremediação	n.m.	Spinelli et al. (2013)
<i>Trametes versicolor</i>	CLEAs reticulados com genipina como agente reticulante e BSA como alimentador de aminoácidos	2 mg mL ⁻¹	>15%	Alta afinidade pelo substrato, estabilidade térmica, estabilidade de pH, baixa toxicidade, alta biocompatibilidade	Uso projetado na indústria	n.m.	Hong et al. (2021)
<i>Trametes versicolor</i>	Co-imobilização com acetossiringona via BC funcionalizada e regenerada enxertada com grupos epóxi e catecol de metacrilato de glicidila e dopamina	10 mg (20 mg) ⁻¹	n.m.	Alta degradação de poluentes e redução de fitotoxicidade	Degradação de 2,4,5-triclorofenol	98,3%	Jia et al. (2022a, 2022b)

Fonte: Dong et al. (2023).

Nota: BC: celulose bacteriana; BSA: albumina sérica bovina; FBB: biorreator de leito fluidizado; PEG: polietilenoglicol; GA: glutaraldeído; NP: nonilfenol; HPAs: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; ANT: antraceno; BAP: benzo[a]pireno; PET: polietileno tereftalato; CP: 4-cloro-fenol; DCP: 4-diclorofenol; BPA: bisfenol A; n.m.: não mencionado.

Os materiais cerâmicos figuram entre os principais candidatos para imobilização enzimática, pois resistem a esforços mecânicos, suportam variações de temperatura e apresentam porosidade natural, e os resíduos da construção civil, como tijolos, placas de gesso e concreto aerado, reúnem essas propriedades a baixo custo e ampla disponibilidade. Kujawa *et al.* (2021a) testaram cerâmicas porosas funcionalizadas com aminosilanos e obtiveram boa retenção de lacase, enquanto Silva (2023) avaliou cerâmica vermelha, concreto autoclavado e compósito de concreto como meio suporte em *wetlands* construídos, materiais que podem atuar simultaneamente como meio suporte e suporte enzimático.

A funcionalização do suporte melhora sua capacidade de reter a enzima, processo iniciado pela lavagem prévia para remoção de impurezas, seguida do tratamento com APTES (3-aminopropiltietoxissilano), que introduz grupos amino na superfície, e da reação com glutaraldeído, que forma ligações covalentes entre esses grupos e as aminas da enzima. O suporte funcionalizado é então incubado com solução enzimática por 2 a 24 horas, após o que se procede à lavagem para remoção da enzima não ligada.

As pesquisas realizadas na UTFPR têm avaliado a imobilização da lacase de *Trametes villosa* em diferentes suportes, com Riedi (2019) caracterizando as isoformas enzimáticas produzidas pelo fungo e testando técnicas de imobilização por adsorção e ligação covalente, com rendimentos entre 40 e 60%, enquanto Torres (2021) otimizou as condições de cultivo para produção da enzima em resíduos agroindustriais e Silva *et al.* (2024) compararam o desempenho da lacase produzida com a enzima comercial de *T. versicolor* em ensaios de degradação de compostos recalcitrantes.

Braga *et al.* (2024) ampliaram essa linha de investigação ao avaliar a imobilização da lacase produzida por monocultura e por cocultura de *T. villosa* e *Pycnoporus sanguineus* para degradação de ciprofloxacino, o que demonstrou a aplicabilidade da enzima imobilizada no tratamento de fármacos, e o conjunto desses estudos consolida uma base de conhecimento sobre produção, caracterização e imobilização da lacase de *T. villosa* para sistemas de tratamento de efluentes.

A avaliação do desempenho de um suporte e de um método de imobilização apoia-se em quatro parâmetros principais: a carga proteica, que indica a massa de enzima fixada por grama de suporte; o rendimento de imobilização, dado pela razão entre a atividade da enzima imobilizada e a atividade inicialmente oferecida; os ensaios de reuso, que verificam a manutenção da atividade catalítica em bateladas sucessivas; e os testes de lixiviação, que monitoram a perda de proteína para o meio líquido (Jeyabalan *et al.*, 2023).

3.9 Resíduos da construção civil como suporte

O setor da construção civil gera grandes volumes de resíduos sólidos no Brasil, com produção superior a 80 milhões de toneladas por ano de resíduos da construção e demolição (RCD), dos quais apenas uma fração é reciclada ou reaproveitada (Associação Brasileira de Resíduos e Meio Ambiente (ABREMA), 2025). A maior parte desses resíduos é composta por

tijolos cerâmicos, concreto, argamassa, gesso e materiais de acabamento, cujo descarte inadequado ocupa espaço em aterros e pode contaminar solo e água, conforme se observa na Figura 7.

Figura 7 – Acondicionamento de resíduos na construção civil.



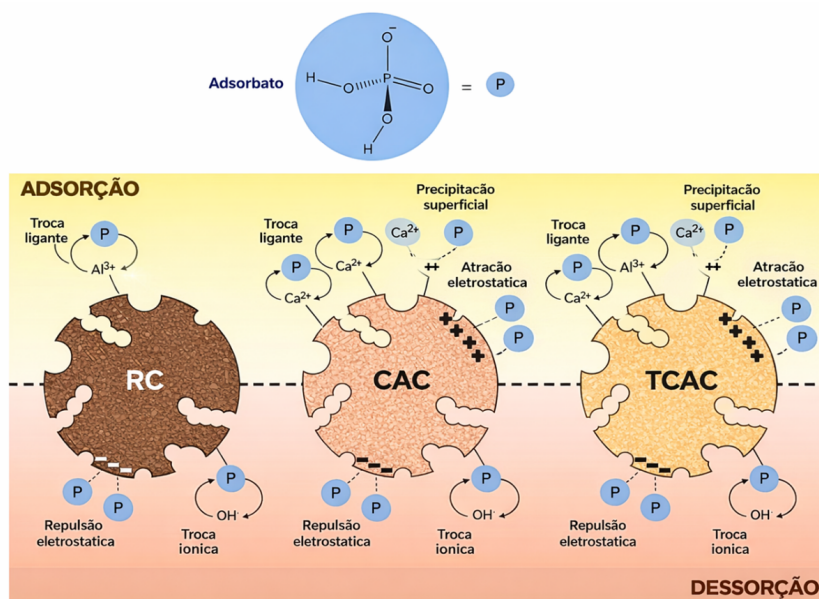
Fonte: Votorantim Cimentos (2024).

Na Figura 7 é apresentado o acondicionamento típico de resíduos da construção civil em obras urbanas, com fragmentos de concreto, tijolos cerâmicos e argamassa dispostos em caçamba metálica de coleta. O aproveitamento desses materiais em sistemas de tratamento de efluentes é uma alternativa para reduzir o volume descartado e agregar valor a materiais que seriam desperdiçados.

A cerâmica vermelha, o concreto e o gesso têm sido estudados como meio filtrante em *wetlands* construídos, pois apresentam origens e características distintas: a cerâmica vermelha provém de tijolos, telhas e revestimentos descartados; o concreto inclui resíduos de estruturas, pisos e elementos pré-moldados; e o gesso é gerado em obras de acabamento e divisórias internas, e cada um desses materiais apresenta propriedades físicas e químicas que influenciam seu desempenho no tratamento de efluentes (Silva, 2023).

A cerâmica vermelha possui estrutura porosa formada durante a queima da argila, com área superficial elevada que favorece a adsorção de compostos e o desenvolvimento do biofilme, e sua composição mineralógica inclui óxidos de ferro e alumínio, que participam de reações de adsorção e precipitação de fósforo. Os mecanismos envolvidos na interação entre a cerâmica vermelha e o fosfato em solução aquosa estão apresentados na Figura 8.

Figura 8 – Mecanismos propostos para adsorção e dessorção de fosfato em solução aquosa sobre adsorventes cerâmicos.



Fonte: Adaptado de Cabral (2021).

Na Figura 8 são ilustrados os mecanismos propostos para a adsorção e dessorção de fosfato em três cerâmicas adsorventes: a cerâmica vermelha bruta (RC), na qual predominam a troca de ligantes com Al^{3+} , a troca iônica com OH^- e a repulsão eletrostática devido à carga negativa da superfície em pH superior ao ponto de carga zero; e as cerâmicas pré-ativadas com cal dolomítica (CAC e TCAC), nas quais a presença de Ca^{2+} introduz mecanismos adicionais de atração eletrostática e precipitação superficial de fosfatos de cálcio, com aumento da capacidade adsorptiva de $2,27 \text{ mg g}^{-1}$ na cerâmica bruta para $22,28 \text{ mg g}^{-1}$ na cerâmica tratada termoquimicamente (Cabral *et al.*, 2021).

Cabral *et al.* (2021) observaram ainda que os tratamentos térmicos e químicos da cerâmica vermelha ampliam a eficiência de remoção do fósforo, e que a resistência mecânica do material permite seu uso prolongado em leitos filtrantes sem fragmentação excessiva.

O concreto apresenta estrutura densa com porosidade variável conforme a formulação original, e quando autoclavado exibe maior porosidade em razão das bolhas de ar incorporadas durante a fabricação, característica acompanhada de composição alcalina rica em hidróxidos de cálcio que favorece a precipitação de fósforo e pode elevar o pH da água do córrego em contato com o material. Silva (2023) avaliou concreto autoclavado como substrato em *wetlands* e observou remoção de nutrientes associada tanto à adsorção quanto à precipitação química, e a disponibilidade desse resíduo em obras urbanas facilita a obtenção de grandes volumes para aplicação em sistemas descentralizados.

O gesso é composto principalmente por sulfato de cálcio di-hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Barbosa; Ferraz; Santos, 2014), com solubilidade moderada em água ($\sim 2,0\text{--}2,5 \text{ g L}^{-1}$ a 25°C) que libera íons cálcio (Ca^{2+}) e sulfato (SO_4^{2-}) para a matriz aquosa em contato com o material (Bock, 1961), característica vantajosa para a precipitação de fósforo, porém que exige monitoramento para evitar dissolução excessiva ao longo do tempo.

As placas de gesso acartonado são geradas em grande quantidade em obras de acabamento, com consumo no Brasil em crescimento de cerca de 25% em 2020 e aproximadamente 73 milhões de m² de chapas em 2019 (Souza, 2023), e a principal fonte de perda ocorre nas atividades de corte para instalação do sistema drywall, com variações entre 10 e 12% nos Estados Unidos (Neto, 2005; Cavalcanti; Póvoas, 2016).

No conjunto das etapas de produção, construção e demolição, cerca de 15 milhões de toneladas de resíduos de placas de gesso são descartadas em aterros anualmente em nível mundial, o que torna esse material o segundo maior contribuinte no fluxo de resíduos da construção civil, atrás apenas dos materiais argilosos (Godinho-castro *et al.*, 2012), e Souza (2023) avaliou placas de gesso como substrato em *wetlands* de fluxo vertical e caracterizou os mecanismos de remoção de nutrientes.

O preparo dos RCD para uso em sistemas de tratamento envolve as etapas de seleção, britagem, lavagem e classificação granulométrica, com descarte prévio dos materiais contaminados com tintas, solventes ou outros produtos químicos. A britagem reduz o tamanho das peças para faixas entre 10 e 50 mm, a lavagem remove finos e impurezas solúveis que poderiam colmatar o sistema, e o peneiramento separa as frações por tamanho, o que permite compor camadas com granulometrias distintas no leito e garantir uniformidade do material e previsibilidade do desempenho hidráulico (Silva, 2023).

Os estudos com RCD em *wetlands* de fluxo vertical relatam bons resultados de remoção, com Silva (2023) observando eficiência de remoção de DQO superior a 70% e redução das concentrações de nitrogênio amoniacal e fósforo total nos três substratos testados (cerâmica vermelha, concreto autoclavado e compósito de concreto) no tratamento de matéria orgânica, nutrientes e hormônios, enquanto Souza (2023) obteve remoção satisfatória de nutrientes com o uso de placas de gesso como meio suporte, resultados que apontam para a viabilidade de substituir agregados convencionais como brita e areia em sistemas descentralizados.

O uso dos RCD em sistemas de tratamento atende aos princípios da economia circular, pois resíduos que seriam descartados em aterros passam a exercer função útil, o que reduz a demanda por extração de agregados minerais virgens, e o custo de obtenção é baixo ou nulo quando os materiais são retirados diretamente de obras ou centrais de reciclagem. A logística de transporte também é simplificada em contextos urbanos, nos quais a geração dos RCD ocorre próxima aos locais de aplicação, o que contribui para a sustentabilidade do setor de saneamento, sobretudo em sistemas descentralizados que atendem comunidades com recursos limitados (Associação Brasileira de Resíduos e Meio Ambiente (ABREMA), 2025).

Além da função como meio suporte, os RCC apresentam potencial como suporte para imobilização de enzimas, conforme discutido na Seção 3.7, pois a porosidade e a área superficial dos materiais cerâmicos favorecem a ancoragem de proteínas após funcionalização adequada, e essa dupla função permite integrar a remoção física dos poluentes à degradação catalítica no mesmo sistema, o que amplia as possibilidades de aplicação dos RCD no tratamento de efluentes.

3.10 Integração de lacase em *wetlands* construídos

Os *wetlands* construídos removem de forma eficiente a matéria orgânica biodegradável e os nutrientes, porém apresentam limitações frente a compostos recalcitrantes como corantes sintéticos, fármacos e hormônios esteroides, cujas estruturas moleculares estáveis resistem à degradação microbiana convencional e permanecem no efluente tratado em concentrações baixas, ainda assim capazes de causar efeitos adversos em organismos aquáticos. A incorporação de processos catalíticos a esses sistemas configura-se como alternativa para ampliar a capacidade de remoção sem aumento expressivo da complexidade operacional.

A lacase apresenta capacidade comprovada de degradação de micropoluentes em matrizes aquosas, conforme demonstrado por Auriol *et al.* (2007), que obtiveram remoção completa de estrona, estradiol, estriol e etinilestradiol em esgotos sanitários com atividade enzimática de 20 U mL⁻¹, e por revisões recentes que indicam eficiências de descoloração de até 90% em sistemas lacase-mediador aplicados a corantes têxteis (Jeyabalan *et al.*, 2023).

No tratamento de fármacos, Al-sareji *et al.* (2023) obtiveram remoção quase completa de diclofenaco, amoxicilina, carbamazepina e ciprofloxacino em duas horas com lacase imobilizada em carvão ativado derivado de cascas de romã, resultados que reforçam a versatilidade da enzima para diferentes classes de compostos recalcitrantes.

Os primeiros estudos sobre a adição de enzimas exógenas em *wetlands* construídos datam do início dos anos 2000, com Shackle, Freeman e Reynolds (2000) observando aumento de 173 a 530% na atividade enzimática do sistema após a suplementação, efeito que se manteve por mais de seis semanas, e com Giraud *et al.* (2001) identificando fungos produtores de lacase em *wetlands* destinados ao tratamento de efluentes industriais, o que indica que a enzima pode ser produzida naturalmente pelo microbioma do sistema sob condições adequadas.

Apesar dos avanços individuais no tratamento enzimático e nos *wetlands* construídos, a integração direta dessas tecnologias permanece pouco explorada, pois o levantamento bibliográfico nas principais bases de dados científicas revela escassez de publicações que combinem lacase, livre ou imobilizada, com *wetlands* para tratamento de efluentes. A maioria dos estudos com lacase utiliza reatores de bancada em condições controladas, enquanto as pesquisas com *wetlands* concentram-se nos processos naturais do sistema, lacuna que representa oportunidade para a investigação de configurações híbridas capazes de aproveitar as vantagens de ambas as tecnologias.

A combinação da lacase com *wetlands* construídos apresenta potencial sinérgico, pois o ambiente do leito oferece condições favoráveis à atividade enzimática pela presença de oxigênio dissolvido, temperatura moderada e tempo de detenção hidráulica compatível com a cinética da reação, enquanto o meio suporte poroso pode atuar simultaneamente como suporte para imobilização enzimática e como meio para desenvolvimento do biofilme microbiano, com a aeração natural ou artificial do sistema assegurando o oxigênio necessário à reação catalítica, uma vez que a enzima utiliza o oxigênio molecular como acceptor final de elétrons (Arregui *et al.*, 2019).

Desafios técnicos, porém, precisam ser superados para viabilizar essa integração, pois a estabilidade da lacase em matrizes de efluentes é inferior à observada em soluções sintéticas, em razão da presença de inibidores e da variabilidade de pH e temperatura. A imobilização em suportes adequados pode contornar parte dessas limitações, embora poucos estudos tenham avaliado materiais compatíveis com meios suporte de *wetlands*, como cerâmicas e agregados reciclados, e restam ainda por investigar a frequência de reposição enzimática, a interação com o microbioma do sistema e a relação custo-benefício da suplementação.

Foram identificadas lacunas específicas de conhecimento na literatura, pois não há estudos publicados que avaliem a incorporação de lacase imobilizada diretamente no meio suporte de *wetlands* construídos, e a interação entre a enzima exógena e a comunidade microbiana nativa do sistema permanece desconhecida, assim como a comparação da eficiência de remoção de corantes ou hormônios entre *wetlands* convencionais e sistemas suplementados com a enzima, além do comportamento da atividade enzimática ao longo de ciclos operacionais típicos dos sistemas de fluxo vertical.

Essas lacunas configuram oportunidade para pesquisa original, pois a avaliação de *wetlands* operados com adição de lacase pode evidenciar se a suplementação enzimática amplia a remoção de compostos recalcitrantes em condições reais de tratamento, e o uso de corantes como indicadores visuais da atividade enzimática permite verificar a contribuição da enzima de forma direta, enquanto os ensaios de imobilização em materiais alternativos, como resíduos da construção civil, podem identificar suportes adequados para aplicação futura no próprio leito filtrante.

O presente estudo se insere nesse contexto de integração tecnológica pouco explorada, pois a proposta de avaliar *wetlands* construídos operados com e sem adição de lacase livre representa contribuição original para a pesquisa na área, e o uso do corante azul de indigotina como indicador permite verificar a degradação promovida pela enzima no próprio ambiente do leito, enquanto os ensaios complementares de imobilização em resíduos da construção civil estabelecem base para o desenvolvimento futuro de sistemas com a enzima ancorada ao meio suporte, abordagem que combina tratamento baseado na natureza com biotecnologia enzimática, com o objetivo de ampliar a remoção de compostos recalcitrantes em sistemas descentralizados de baixo custo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

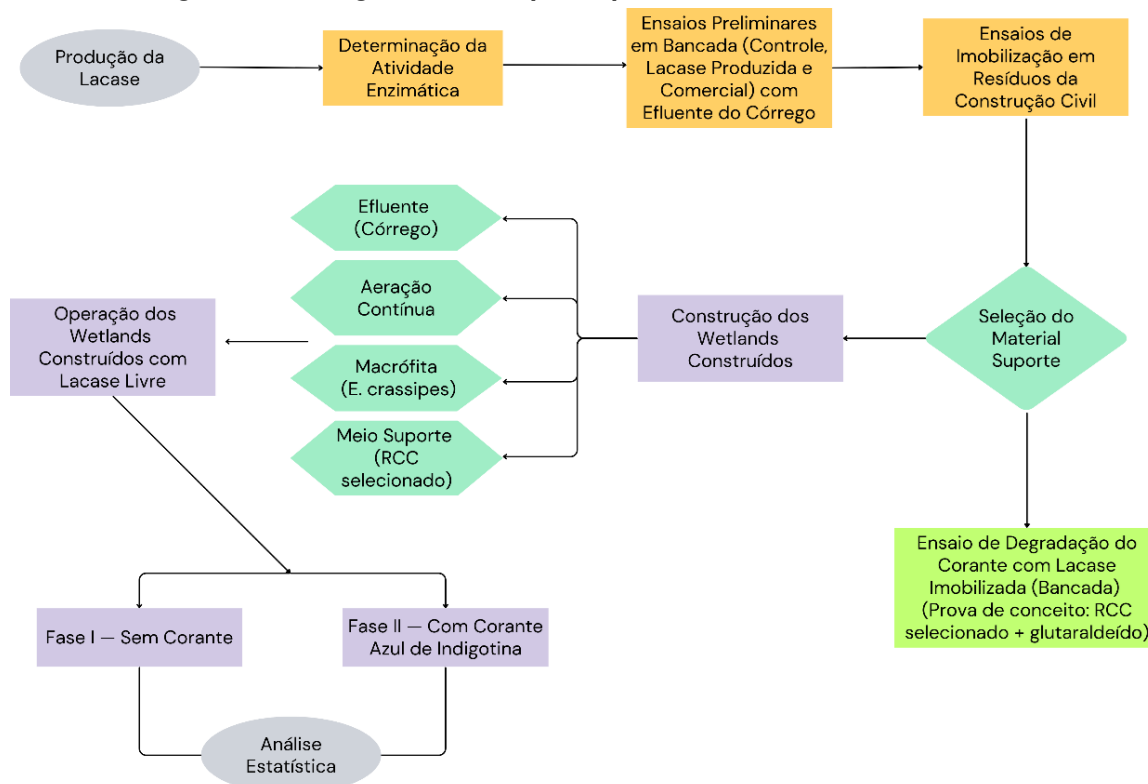
4.1 Delineamento experimental

A pesquisa foi desenvolvida no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, área de concentração em Saneamento e Recursos Hídricos, integrando conceitos de biotecnologia enzimática, tratamento de efluentes por soluções baseadas na natureza e valorização de resíduos, buscando contribuir para o desenvolvimento de tecnologias acessíveis e ambientalmente sustentáveis para o saneamento descentralizado.

Esta pesquisa possui natureza aplicada e abordagem quantitativa, com delineamento experimental precedido por ensaios exploratórios em escala de bancada para definição das condições operacionais.

Neste capítulo são descritos os procedimentos de produção da lacase, determinação da atividade enzimática, ensaios de imobilização em resíduos da construção civil e em bancada com lacase livre, bem como a configuração, operação e monitoramento dos *wetlands* construídos, ensaios com corante e os métodos analíticos adotados. Na Figura 9 é apresentado o fluxograma das etapas da pesquisa.

Figura 9 – Fluxograma das etapas experimentais realizadas no estudo



Fonte: Autoria própria (2025).

O fluxograma apresenta a sequência metodológica adotada, desde a produção e caracterização da lacase por *Trametes villosa*, passando pelos ensaios preliminares em bancada e

de imobilização em resíduos da construção civil, até a configuração e operação dos *wetlands* construídos com monitoramento dos parâmetros físico-químicos e de remoção de cor.

A pesquisa foi conduzida entre agosto de 2024 e fevereiro de 2026 na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Curitiba, Sede Ecoville. A lacase foi produzida no Laboratório de Biotecnologia e a liofilização do extrato enzimático foi conduzida no Laboratório Multiusuários de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA). A montagem, a operação e o monitoramento do comportamento dos *wetlands* construídos foram realizados no Laboratório de Saneamento (LabSan).

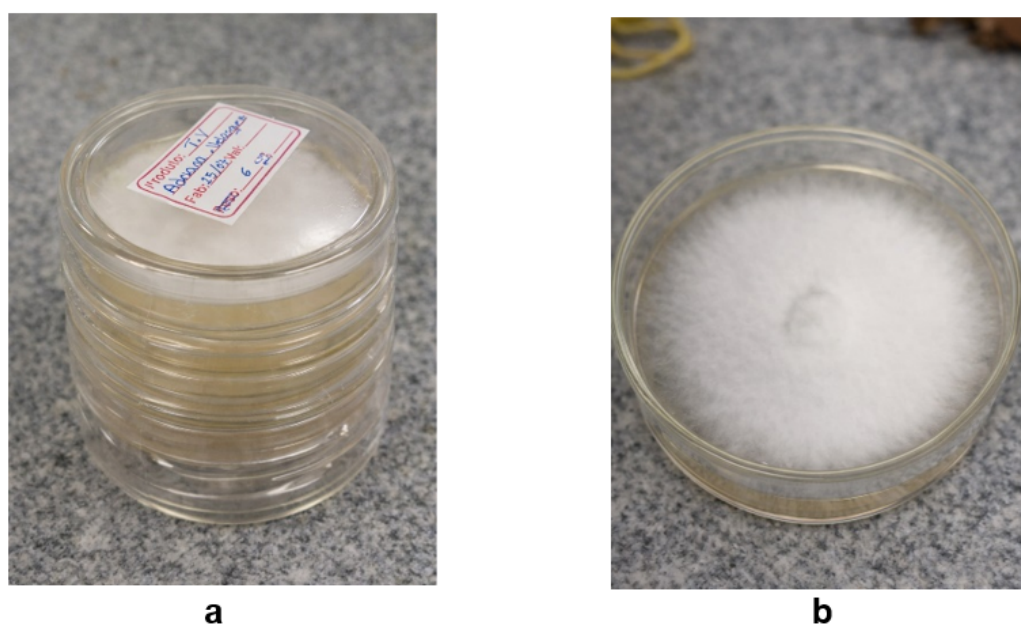
4.2 Produção da lacase

A enzima lacase empregada neste estudo foi obtida a partir do fungo *Trametes villosa*, mantido no banco de cepas do Laboratório de Biotecnologia. A produção foi realizada de acordo com adaptação dos protocolos desenvolvidos por Riedi (2019), Modkovski (2021) e Silva *et al.* (2024). Para efeito de comparação nos ensaios de bancada, também foi utilizada lacase comercial de *Aspergillus* sp. adquirida da Sigma-Aldrich (referência SAE0050, número CAS 80498-15-3).

4.2.1 Cultivo do microrganismo

A cepa de *Trametes villosa* foi mantida sob refrigeração a 4 °C em Ágar Batata Dextrose (BDA). Para o crescimento micelial, a cepa foi repicada em placas contendo meio BDA e incubada em estufa bacteriológica DeLeo, a 28 °C durante sete dias, conforme apresentado na Figura 10.

Figura 10 – Placas de Petri contendo: *Trametes villosa* (a) e desenvolvimento após 7 dias (b)



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 10 observa-se o crescimento micelial radial homogêneo da cepa de *Trametes villosa* sobre o meio BDA, com colonização completa da superfície do ágar ao final dos sete dias de incubação.

Após esse período, as colônias desenvolvidas foram recortadas com auxílio de tubos de ensaio estéreis, gerando fragmentos (*plugs*) de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro. Os *plugs* obtidos foram utilizados imediatamente para inoculação no meio de cultura de produção enzimática.

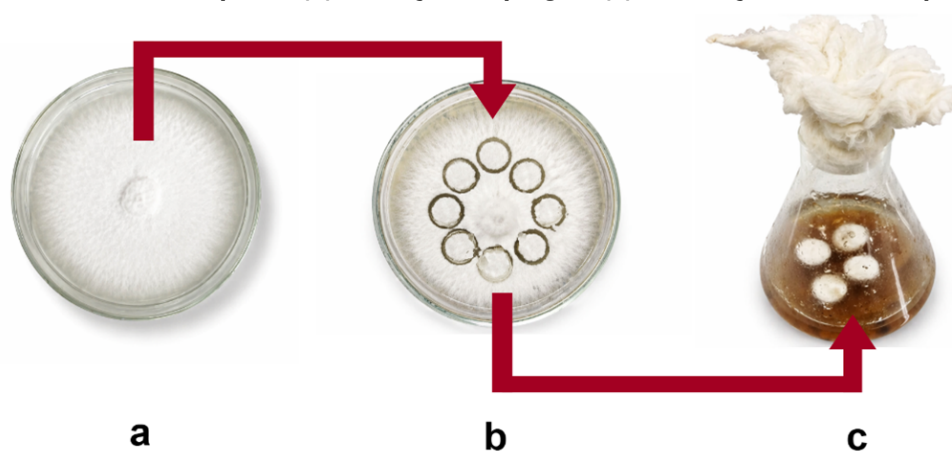
4.2.2 Produção, extração e determinação da atividade enzimática

Foram preparados 50 mL de meio de cultura em um frasco Erlenmeyer de 250 mL composto de casca de arroz (10 g L^{-1}), bagaço de uva bordô (5 g L^{-1}), bagaço de cana-de-açúcar (20 g L^{-1}), glicose (10 g L^{-1}), fosfato de potássio (KH_2PO_4 , 3 g L^{-1}), peptona (5 g L^{-1}), sulfato de manganês (MnSO_4), sulfato de cobre (CuSO_4), sulfato de ferro (FeSO_4), sulfato de zinco (ZnSO_4) e sulfato de magnésio (MgSO_4) na concentração de 1 mM, conforme metodologias de Modkovski (2021) e Souza (2024).

Os resíduos agroindustriais utilizados como componentes do meio de cultura (casca de arroz, bagaço de uva e bagaço de cana-de-açúcar) foram obtidos por doação de agroindústrias da região de Curitiba, por se tratarem de subprodutos sem valor comercial agregado.

O meio foi tampado e autoclavado a 121°C durante 20 min na autoclave vertical Phoenix Luterco, modelo AV-75, e após resfriamento à temperatura ambiente, os micélios fúngicos preparados conforme item 4.2.1 foram inoculados no meio, sendo adicionados 4 *plugs* de colônia por frasco. O preparo do inóculo é ilustrado na Figura 11.

Figura 11 – Preparo do inóculo de *Trametes villosa* para produção enzimática: (a) crescimento em placa, (b) obtenção de *plugs* e (c) inoculação em meio líquido.



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 11 são apresentadas as etapas sequenciais do preparo do inóculo. Em (a), observa-se o crescimento micelial homogêneo de *Trametes villosa* sobre o meio BDA. Em (b), os cortes circulares no ágar evidenciam a retirada dos *plugs* com perfurador estéril. Em (c), os

plugs já transferidos para o meio de cultura líquido no frasco Erlenmeyer, tampado com gaze estéril para permitir trocas gasosas durante a incubação.

Para o acompanhamento da produção enzimática ao longo do cultivo, foram preparados múltiplos frascos em paralelo, retirando-se um frasco integralmente nos dias 7, 12 e 15, momento em que a atividade enzimática foi determinada em triplicata analítica a partir do extrato obtido. Os frascos remanescentes permaneceram incubados até o 15º dia, quando o extrato acumulado foi coletado para uso nos ensaios subsequentes. Os valores de atividade obtidos ao longo do cultivo e a definição do dia de coleta são apresentados na Seção 5.1.

Após cada período de incubação, o extrato obtido era filtrado em bomba a vácuo AirMed Brasil, modelo 400 AMPPro, e a atividade enzimática determinada no espectrofotômetro UV-Vis UV-M51 da BEL Engineering. O método utilizado consistiu na oxidação do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) a 10 mM, em solução tampão de acetato de sódio a 50 mM (pH 5,0) a 40 °C durante 5 min, com leitura da absorbância a 420 nm, conforme Hou *et al.* (2004). A atividade enzimática foi calculada conforme a Equação (1).

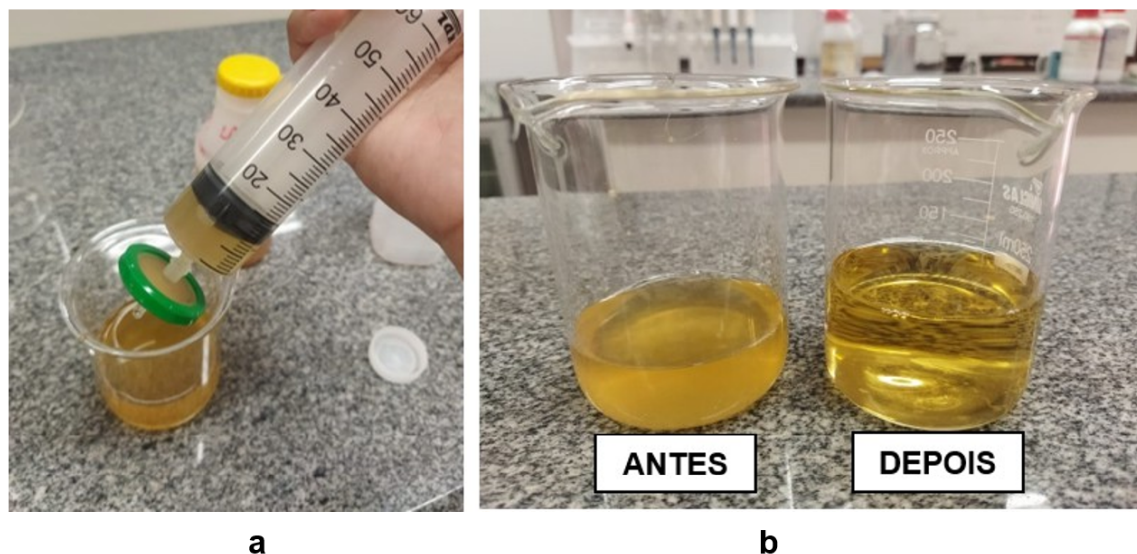
$$\text{Atividade (U mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Volume final (mL)} \times \text{Absorbância} \times \text{Fator de diluição}}{\varepsilon \text{ (mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)} \times \text{Caminho óptico (cm)} \times \text{Volume de amostra (mL)} \times \text{Tempo de reação (min)}} \quad (1)$$

O coeficiente de extinção molar (ε) do ABTS a 420 nm foi de $3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde à quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto nas condições descritas.

4.2.3 Liofilização e padronização

O extrato bruto coletado no 15º dia do cultivo foi novamente filtrado em membrana de fibra de vidro de 0,45 μm para remoção de biomassa fúngica residual e partículas em suspensão, conforme apresentado na Figura 12.

Figura 12 – Filtragem do meio enzimático na membrana de 0,45 μm : (a) processo de filtração e (b) comparação do meio antes e após a filtração.



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 12 em (a) observa-se o sistema de filtração utilizado para clarificação do extrato. Em (b), a diferença de coloração entre o meio bruto e o filtrado evidencia a remoção da biomassa fúngica retida na membrana.

O filtrado foi submetido à liofilização e o material resultante foi armazenado sob refrigeração a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso nos ensaios. Para o preparo das soluções, o liofilizado foi reconstituído em solução tampão de acetato 50 mM (pH 5,0) e sua atividade enzimática foi novamente determinada pelo método descrito na seção 4.2.2. A lacase produzida e a lacase comercial foram padronizadas para a concentração de 500 U L^{-1} , valor empregado nos ensaios subsequentes.

4.3 Ensaios preliminares em bancada

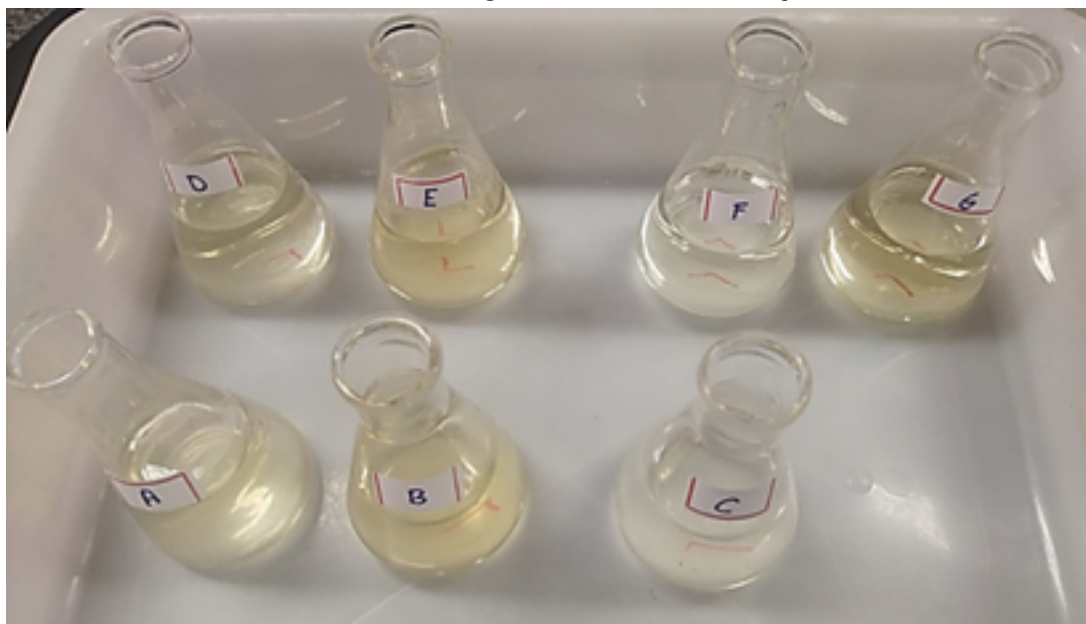
4.3.1 Determinação da concentração enzimática

A proposta inicial desta pesquisa foi utilizar a lacase produzida por *Trametes villosa* a partir de resíduos agroindustriais, por se tratar de uma alternativa de menor custo e alinhada aos princípios da economia circular. A lacase comercial de *Aspergillus sp.* (Sigma-Aldrich, SAE0050, CAS: 80498-15-3) foi incluída nos ensaios apenas como referência analítica, permitindo comparar seus comportamentos catalíticos sob as mesmas condições.

Esses ensaios preliminares tiveram como finalidade prática definir a concentração enzimática mais adequada para aplicação em *wetlands* construídos. Foram testadas as dosagens de 500 e 1000 U L^{-1} para avaliar seu efeito sobre parâmetros de qualidade da água do córrego Ribeirão dos Müller, que atravessa a Sede Ecoville do campus Curitiba da UTFPR.

Os ensaios foram montados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 100 mL de água do córrego, conforme apresentado na Figura 13.

Figura 13 – Montagem dos ensaios experimentais em frascos de Erlenmeyer contendo água do córrego sob diferentes condições



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 13 observam-se os frascos de Erlenmeyer contendo água do córrego, identificados conforme as condições experimentais descritas no Quadro 7, com as respectivas dosagens de lacase produzida e comercial.

A lacase produzida (LP) e a lacase comercial (LC) foram adicionadas conforme as condições experimentais descritas no Quadro 7. Após a adição da enzima, as amostras foram mantidas a 37 °C por 3 h e, em seguida, sob agitação a 100 rpm por mais 3 h no agitador orbital Solab SL 222. Cada condição foi ensaiada em triplicata.

Quadro 7 – Condições experimentais dos ensaios preliminares em bancada

GRUPO	DESCRIÇÃO
A	Efluente do córrego + enzima 500 U L ⁻¹
B	Efluente do córrego + enzima 1000 U L ⁻¹
C	Efluente do córrego sem enzima (controle)
D	Efluente do córrego + enzima inativada 500 U L ⁻¹
E	Efluente do córrego + enzima inativada 1000 U L ⁻¹
F	Água destilada + enzima 500 U L ⁻¹
G	Água destilada + enzima 1000 U L ⁻¹

Fonte: Autoria própria (2025).

Ao término do período de contato, foram analisados os parâmetros pH, alcalinidade total, demanda química de oxigênio (DQO), fósforo total (PT), nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), conforme os métodos analíticos descritos na Seção 4.8 (Quadro 9). Os resultados obtidos para ambas as enzimas e a definição da concentração de trabalho são apresentados na Seção 5.2.1.

4.3.2 Ensaio de estabilidade da lacase em água do córrego urbano

Um segundo ensaio foi realizado para avaliar a estabilidade temporal da lacase produzida em contato direto com a água do córrego, sob aeração contínua. O objetivo foi verificar por quanto tempo a enzima permaneceria ativa nessas condições e, a partir disso, definir o tempo de ciclo operacional dos *wetlands* construídos.

O experimento foi conduzido em duas provetas graduadas de 1 L cada, mantidas à temperatura ambiente ($\sim 22^\circ\text{C}$). Uma proveta recebeu 1 L de água do córrego com lacase a 500 U L^{-1} (tratamento A), e a outra, apenas água do córrego, sem adição enzimática (controle B). Ambas foram seladas com filme de PVC para minimizar a contaminação externa e as perdas por evaporação, conforme apresentado na Figura 14.

Figura 14 – Montagem das provetas com aeração



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 14 observam-se as duas provetas graduadas seladas com filme de PVC, conectadas ao sistema de aeração por compressor.

As provetas foram submetidas à aeração constante por compressor Maxxi Air C-440 (4 saídas $\times 4\text{ L min}^{-1}$, 127 V), operado na menor intensidade do equipamento para evitar agitação excessiva do meio. A aeração garantiu a disponibilidade de oxigênio molecular, necessária à atividade catalítica da lacase (Auriol *et al.*, 2007).

As coletas foram realizadas a cada 24 h, durante 96 h, retirando-se aproximadamente 100 mL de cada proveta nos intervalos de 0, 24, 48, 72 e 96 h. A atividade enzimática foi monitorada em cada ponto pelo método descrito na Seção 4.2.2, e os parâmetros físico-químicos

foram determinados conforme os métodos descritos na Seção 4.8 (Quadro 9). Os ensaios foram realizados em duplicata. Os resultados obtidos e a definição do tempo de ciclo operacional são apresentados na Seção 5.2.2.

4.4 Ensaios de imobilização da lacase em resíduos da construção civil

Os ensaios de imobilização tiveram como objetivo fixar a lacase produzida por *T. villosa* em resíduos da construção civil (RCC) para avaliar a viabilidade do aproveitamento desses materiais como suporte enzimático nos *wetlands* construídos. Foram investigados cerâmica vermelha (tijolo) e concreto aerado autoclavado, triturados e peneirados em peneira com malha de 60 mesh (0,25 mm), conforme apresentado na Figura 15.

Figura 15 – Preparação dos RCC utilizados como suporte: (a) materiais in natura e (b) materiais após trituração e peneiramento (60 mesh, 0,25 mm).



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 15 em (a) são apresentados o tijolo cerâmico e o concreto aerado autoclavado em seu estado original. Em (b), os mesmos materiais após trituração e peneiramento, com granulometria padronizada para utilização nos ensaios de imobilização.

A escolha partiu de trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, que já haviam empregado cerâmica vermelha e placas de gesso em *wetlands* construídos (Cabral *et al.*, 2021; Souza, 2023; Silva, 2023), e da disponibilidade desses resíduos na região de Curitiba.

A estratégia adotada foi a ligação covalente por funcionalização com 3-aminopropiltriethoxissilano (APTES), seguida de reticulação com glutaraldeído a 2% em tampão de acetato de sódio pH 5,0. Os grupos aldeído do glutaraldeído reagem com os grupos amino disponíveis, no silano e na superfície da enzima, formando ligações covalentes estáveis (Kujawa *et al.*, 2021b; Fernández-fernández; Sanromán; Moldes, 2013). Os ensaios de imobilização foram conduzidos em etapas progressivas, conforme descrito nas subseções a seguir.

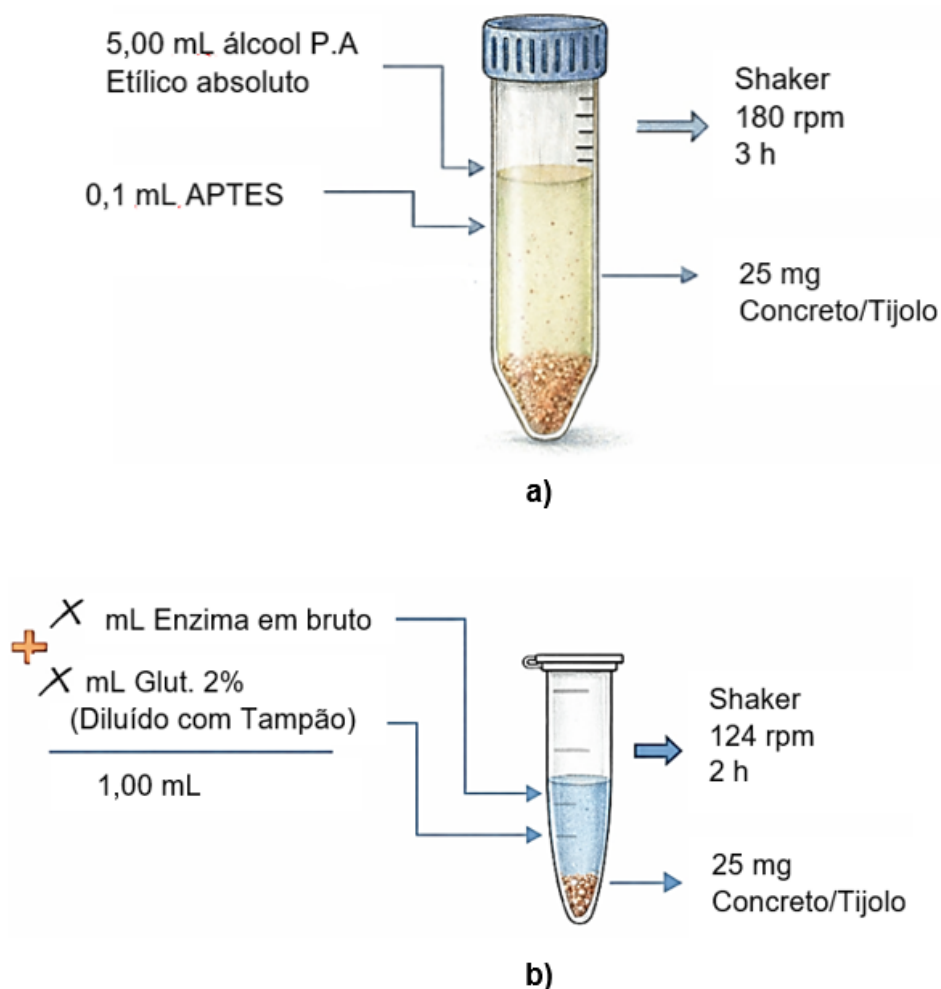
4.4.1 Protocolo de funcionalização e imobilização

O procedimento foi realizado em duas etapas sequenciais: silanização do suporte e imobilização enzimática com glutaraldeído como agente reticulante.

Na silanização, 25 mg do material suporte previamente triturado foram adicionados a tubos Falcon contendo 5,0 mL de álcool etílico P.A. absoluto, 0,1 mL de APTES e 0,5 mL de água destilada. Os tubos permaneceram em agitação orbital a 180 rpm por 3 h, à temperatura ambiente. Após essa etapa, o material foi separado por decantação e utilizado diretamente na imobilização.

O APTES funciona como agente de acoplamento em que o grupo etoxissilano se liga covalentemente aos grupos hidroxila da superfície do material cerâmico ou cimentício, enquanto o grupo aminopropil permanece exposto para reagir com o glutaraldeído na etapa seguinte (Kujawa *et al.*, 2021b). As etapas de silanização e imobilização são esquematizadas na Figura 16.

Figura 16 – Etapas da imobilização covalente da lacase em resíduos da construção civil. a) silanização do suporte e b) imobilização enzimática



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 16 em (a) é representada a funcionalização da superfície do suporte com APTES, em que o grupo silano se ancora aos grupos hidroxila do material. Em (b), a enzima é

reticulada à superfície funcionalizada por meio do glutaraldeído, que forma pontes covalentes entre os grupos amino do APTES e os da proteína.

Para imobilização, o volume de extrato enzimático bruto foi calculado pela equação de diluição ($C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$), para atingir a concentração-alvo de 500 U L⁻¹ em 1,0 mL de volume final. O volume restante foi completado com solução de glutaraldeído 2% diluído em tampão acetato de sódio pH 5,0 em um microtubo Eppendorf. A mistura do extrato enzimático, glutaraldeído e suporte silanizado (25 mg) foi mantida em agitação orbital a 124 rpm por duas horas à temperatura ambiente. Ao final, o sobrenadante foi coletado e o suporte lavado com solução tampão acetato para remoção da enzima não ligada.

Os parâmetros rendimento de imobilização, que indica a fração da enzima adicionada retida no suporte (Equação 2), e a atividade recuperada, que expressa a fração da enzima retida que manteve capacidade catalítica (Equação 3), foram utilizados para avaliar o desempenho da imobilização.

$$\text{Rendimento de imobilização (\%)} = \frac{U_{\text{adi}} - U_{\text{sobr}}}{U_{\text{adi}}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Atividade recuperada (\%)} = \frac{U_{I_{\text{mob}}}}{U_{\text{adi}} - U_{\text{sobr}}} \times 100 \quad (3)$$

Em que: U_{adi} = unidades enzimáticas adicionadas na imobilização; U_{sobr} = unidades remanescentes no sobrenadante e lavagens; $U_{I_{\text{mob}}}$ = unidades de atividade medidas diretamente no suporte imobilizado, por incubação com ABTS 0,5 mM a 420 nm.

4.4.2 Triagem dos materiais suporte

A primeira etapa consistiu na triagem exploratória para comparar o comportamento do tijolo cerâmico e do concreto aerado autoclavado como suporte para imobilização. Cada material foi avaliado em quatro condições de pré-tratamento: *in natura*, autoclavado (121 °C, 20 min), silanizado com APTES e autoclavado seguido de silanização, totalizando oito combinações.

Nesta triagem, a concentração enzimática utilizada foi de 1000 U L⁻¹, uma vez que os ensaios de determinação da concentração de trabalho (Seção 4.3.1) ainda estavam em andamento naquele momento. A imobilização foi realizada de acordo com o protocolo descrito na Seção 4.4.1.

A atividade enzimática retida no suporte foi determinada pelo método ABTS descrito na Seção 4.2.2, com a diferença de que a solução de ABTS (1,0 mL, 0,5 mM) foi adicionada diretamente ao tubo contendo o suporte lavado, e a absorbância do sobrenadante foi lida após o período de incubação. A atividade liberada na primeira lavagem com tampão acetato de sódio pH 5,0 também foi quantificada pelo mesmo método. Os ensaios foram conduzidos em triplicata. Os resultados da triagem e a seleção do material suporte são apresentados na Seção 5.3.1.

4.4.3 Avaliação quantitativa do rendimento de imobilização

Uma vez definida a concentração de 500 U L^{-1} como padrão de trabalho (Seção 4.3.1), um segundo conjunto de ensaios foi conduzido para quantificar formalmente o rendimento de imobilização e a atividade recuperada conforme as Equações 2 e 3. Nesta etapa foram testadas quatro condições: concreto aerado autoclavado silanizado (CAS), tijolo autoclavado silanizado (TAS), concreto aerado sem tratamento (C) e tijolo sem tratamento (T). O concreto foi mantido nesta rodada para confirmar a interferência observada na triagem por meio de medições do sobrenadante. Os ensaios foram conduzidos em triplicata, com medição da atividade no suporte, no sobrenadante e na lavagem pelo método descrito nas Seções 4.2.2 e 4.4.2. Os resultados são apresentados na Seção 5.3.2.

4.4.4 Otimização da sequência de adição na imobilização

Nos ensaios anteriores, o extrato enzimático e a solução de glutaraldeído foram adicionados simultaneamente ao suporte silanizado. Essa abordagem, embora operacionalmente simples, expõe a enzima ao agente reticulante antes que ela tenha tempo de se ligar à superfície, o que pode promover reticulação intermolecular entre moléculas da lacase na solução em vez da ligação ao suporte (Rodríguez-couto, 2024). Para investigar essa hipótese, três sequências de adição foram comparadas utilizando tijolo autoclavado silanizado (TAS) e concentração de 500 U L^{-1} .

Na primeira condição (TAS E), o extrato enzimático foi adicionado ao suporte silanizado 30 minutos antes do glutaraldeído, permitindo que a enzima interagisse com os grupos amino do APTES por adsorção antes da reticulação. Na segunda (TAS G), o glutaraldeído foi adicionado primeiro ao suporte silanizado por 30 minutos, seguido da enzima, promovendo a ativação prévia da superfície com grupos aldeídicos reativos. Na terceira (TAS), a adição foi simultânea, conforme o protocolo original da Seção 4.4.1.

As demais condições foram mantidas constantes: 25 mg de suporte, 1,0 mL de volume final, agitação a 124 rpm por 2 h, tampão de acetato de sódio pH 5,0. Dois controles adicionais foram preparados em paralelo: C1 (glutaraldeído + tampão + enzima, sem suporte) para avaliar o efeito isolado do reticulante sobre a atividade enzimática, e C2 (tampão + enzima, sem glutaraldeído nem suporte) para confirmar a estabilidade da enzima nas condições do ensaio. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e a atividade foi determinada conforme descrito nas Seções 4.2.2 e 4.4.2. Os resultados e a definição do protocolo adotado nos *wetlands* construídos são apresentados na Seção 5.3.3.

4.5 Configuração e operação dos *wetlands* construídos

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Saneamento (LabSan) da UTFPR, Campus Curitiba, Sede Ecoville, localizado no bairro Cidade Industrial de Curitiba (CIC), com coordenadas geográficas de 25°26'39"S e 49°21'16"O, a altitude de 934,36 m, entre agosto de 2025 e fevereiro de 2026. Duas unidades de *wetlands* construídos de fluxo vertical subsuperficial e fundo saturado (WCFV) foram montadas em paralelo, sendo uma operada como controle, sem adição de enzima (Sistema B), e a outra unidade que recebeu lacase livre a cada ciclo de alimentação (Sistema A).

4.5.1 Montagem dos sistemas

Cada unidade do WCFV foi montada em uma caixa de polipropileno com dimensões internas de $38 \times 18 \times 17$ cm, totalizando volume de aproximadamente 11,5 L. A camada com tijolo cerâmico ocupou altura de 11,3 cm, resultando no volume útil de 5,6 L. O tijolo utilizado era proveniente de resíduos da construção civil doados pelo Departamento Acadêmico de Construção Civil (DACOC) da UTFPR, tendo sido selecionado como meio suporte com base nos ensaios de imobilização descritos na Seção 3.4.

Após trituração manual, os fragmentos do tijolo foram peneirados e retidos entre as malhas de 3/4" (19,0 mm) e 1" (25,4 mm) para evitar compactação e entupimento do meio. Antes do preenchimento, o material foi lavado com água corrente para remoção de impurezas (Figura 17).

Figura 17 – Peneiramento dos fragmentos de tijolo cerâmico entre as malhas de 3/4" e 1"



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 17 observam-se as peneiras utilizadas para seleção granulométrica dos fragmentos de tijolo cerâmico, com retenção do material entre as malhas de 3/4" e 1".

Na parte inferior de cada WCFV foi instalado um registro de 25 mm de PVC para drenagem do efluente tratado. Sobre o fundo, antes de receber o tijolo, posicionou-se um difusor de ar flexível de 20 cm, no centro da unidade. Cada difusor estava conectado por mangueira de silicone a um compressor Maxxi Air C-440 (4 saídas, 4 L min⁻¹ por saída, 127 V), com fluxo de ar regulado para minimizar a agitação do meio líquido. A aeração foi realizada de forma contínua ao longo da operação, pois a lacase requer oxigênio molecular como aceptor final de elétrons para catalisar a oxidação do substrato (Lloret *et al.*, 2011) (Figura 18).

Figura 18 – Montagem das unidades de *wetlands* construídos com preenchimento de tijolo



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 18 são apresentadas as duas unidades de WCFV durante a montagem, com o leito de tijolo cerâmico, o difusor de ar posicionado no fundo e as mangueiras de silicone conectadas ao compressor de aeração.

Em cada ciclo de alimentação foram adicionados 2 L de água do córrego para preencher os espaços intersticiais entre os fragmentos do tijolo sem ultrapassar a superfície do leito.

4.5.2 Macrófita

A espécie *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms foi adotada como cobertura vegetal dos sistemas. Trata-se de uma macrófita aquática flutuante abundante na região de Curitiba e utilizada em pesquisas anteriores do grupo de estudos do LabSan (Silva, 2023). A escolha dessa

espécie se deu, entre outros motivos, pelo seu sistema radicular extenso e permanentemente submerso, que amplia a superfície de contato com a água e favorece a transferência de oxigênio na zona radicular (Brix, 1994). Essa característica é particularmente relevante neste trabalho, em que a atividade da lacase depende da disponibilidade de oxigênio dissolvido.

As mudas foram coletadas no Parque Tingui, em Curitiba – PR, e transportadas ao laboratório no mesmo dia. Na triagem, descartaram-se exemplares com sinais de necrose, com pragas ou com diferenças evidentes de tamanho em relação às demais (Figura 19).

Figura 19 – Local de coleta das mudas de *Eichhornia crassipes* no Parque Tingui, Curitiba - PR



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 19 observa-se o local de coleta das mudas no Parque Tingui, onde exemplares de *E. crassipes* foram selecionados visualmente e transportados ao laboratório no mesmo dia.

Após a coleta, as plantas foram lavadas com água potável e acondicionadas em recipientes contendo água do córrego. A troca de água foi realizada a cada 48 h ao longo de 60 d, período adotado para a aclimação ao efluente antes do transplante para os sistemas (Figura 20).

Figura 20 – Ilustração esquemática da disposição das três mudas de *Eichhornia crassipes* em cada WCFV



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 20 é representada a disposição das três mudas de *E. crassipes* sobre o leito de tijolo cerâmico em cada unidade, distribuídas de forma a cobrir a superfície disponível.

Cada caixa apresenta área superficial de 0,064 m². Com base na densidade de plantio de 25 plantas m⁻² adotada por Silva (2023), seriam necessárias aproximadamente duas mudas por caixa. Optou-se por transplantar três mudas em cada uma, como margem para eventual mortalidade durante a aclimação.

4.5.3 Efluente

A água utilizada nos sistemas foi coletada no córrego do Ribeirão dos Müller que atravessa a Sede Ecoville do campus Curitiba da UTFPR. O Ribeirão dos Müller é um córrego típico de áreas urbanizadas de Curitiba, que recebe contribuições de drenagem pluvial e lançamentos clandestinos de esgotos sanitários ao longo do seu percurso. A escolha desse manancial como fonte de efluente se deu pela proximidade com o LabSan, que viabilizava coletas frequentes da água bruta em estudos com wetlands construídos sem necessidade de transporte motorizado, pela representatividade como cenário de contaminação urbana difusa e pelo fato de pesquisas anteriores do grupo já o terem utilizado como efluente em estudos com *wetlands* construídos.

Figura 21 – Ponto de coleta da água do córrego Ribeirão dos Müller, em frente ao LabSan - UTFPR



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 21 observa-se o trecho do córrego Ribeirão dos Müller em frente ao LabSan, de onde a água era coletada manualmente a cada ciclo de alimentação.

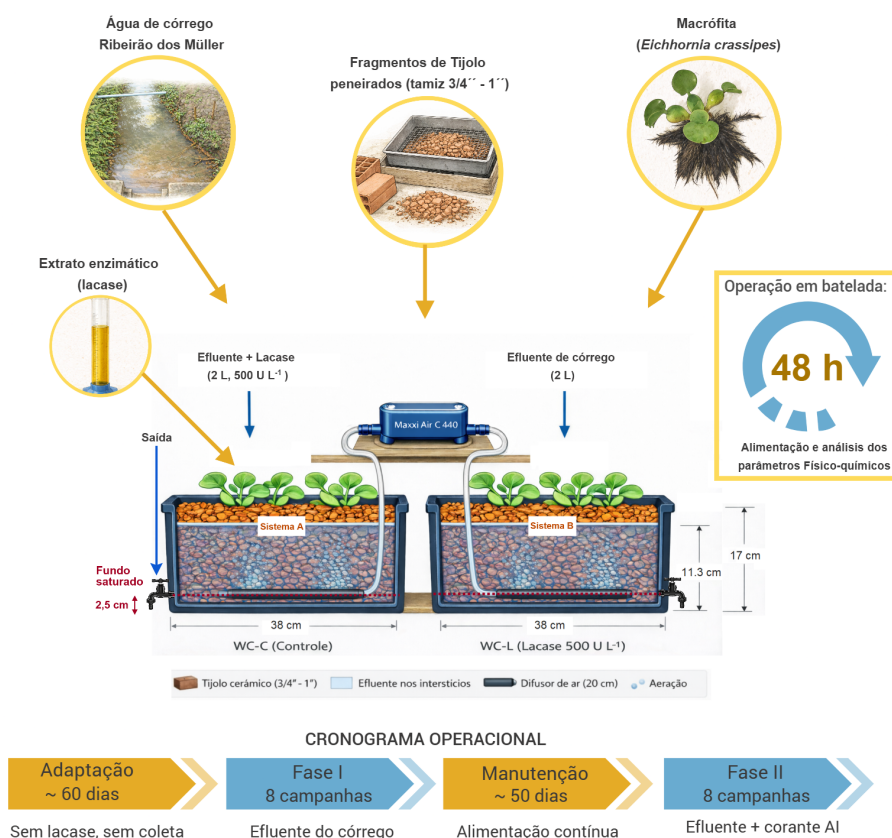
A coleta da água do córrego era realizada manualmente com balde plástico de 20 L no período da tarde e no mesmo dia em que os sistemas eram alimentados. Não havia armazenamento prévio do efluente para evitar alterações nas características físico-químicas entre a coleta e a aplicação nos WCFV. De cada balde, 2 L eram destinados a cada unidade, totalizando 4 L por ciclo de alimentação, sendo o volume restante descartado.

Por se tratar de um corpo hídrico, as características físico-químicas da água variavam entre as coletas em função de condições pluviométricas e do aporte de cargas difusas e concentradas.

4.5.4 Procedimento operacional

A alimentação dos *wetlands* foi realizada em regime de batelada com ciclos de 48 horas, frequência definida com base nos ensaios de bancada (Seção 3.3), que indicaram estabilidade da atividade enzimática por até 96 horas. Na Figura 22 é apresentado um desenho esquemático da montagem, operação e funcionamento dos sistemas.

Figura 22 – Desenho esquemático dos sistemas *wetlands*



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 22 é apresentado o esquema de operação dos dois sistemas, com identificação dos componentes, fluxo de entrada e saída, e o cronograma das fases experimentais.

Cada ciclo era composto de registros da concentração de oxigênio dissolvido (OD) e do potencial de oxirredução (ORP) *in situ* antes da drenagem para coleta de dados referentes ao ciclo anterior. Em seguida, as amostras do efluente tratado eram coletadas no registro após descarte do volume dos 10 primeiros segundos. Após drenagem de toda a unidade, o registro era fechado.

A água bruta do córrego era fracionada em alíquotas de 2 L medidas em um balão volumétrico de 1 L. Na unidade com lacase, a atividade enzimática do extrato refrigerado era medida antes de cada alimentação e o volume de extrato era calculado para atingir 500 U L^{-1} nos 2 L de água do córrego; no controle, os mesmos 2 L eram aplicados sem enzima (Figura 23).

Figura 23 – Alíquota de 2 L de água do córrego do Ribeirão dos Müller e extrato enzimático utilizados na alimentação do sistema A



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 23 observam-se a alíquota de 2 L de água do córrego medida em balão volumétrico e a proveta com o extrato enzimático liofilizado reconstituído, utilizados na alimentação do Sistema A.

As amostras de entrada eram coletadas a partir do efluente já preparado antes de vertê-lo na superfície dos WCFV manualmente a uma faixa de altura entre 5 e 10 cm, evitando assim deslocar os fragmentos de tijolo e as mudas. Depois da alimentação, os valores de OD e ORP eram registrados novamente.

Os sistemas foram operados em três períodos. O primeiro período, de adaptação, começou em agosto de 2025 e durou cerca de 60 dias com alimentação dos *wetlands* com água do córrego a cada 48 h sem coleta de amostras. No segundo período, correspondente à Fase

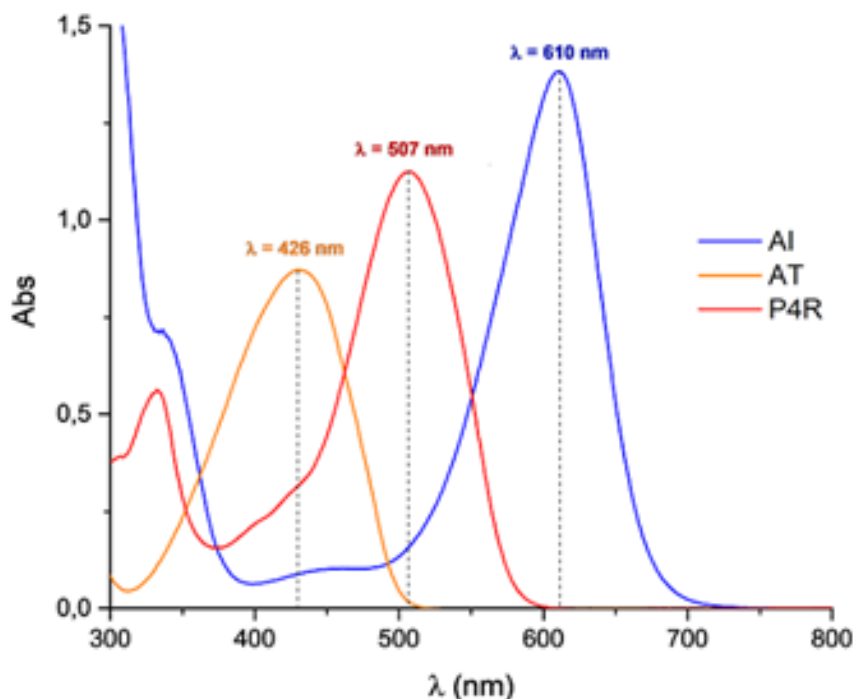
I, foram realizadas oito campanhas de monitoramento no período de 20 de outubro a 17 de novembro de 2025. Nesta fase, a unidade controle (Sistema B) recebeu apenas água do córrego e o Sistema A recebeu afluente com lacase livre a 500 U L^{-1} . No terceiro período, correspondente à Fase II, foram realizadas oito campanhas de monitoramento no período de 6 de janeiro a 5 de fevereiro de 2026, acrescentando azul de indigotina a 25 mg L^{-1} .

4.6 Seleção e quantificação do corante azul de indigotina

Os corantes alimentícios azul de indigotina (AI), amarelo tartrazina (AT) e ponceau 4R (P4R) foram avaliados como modelos de contaminantes para os ensaios nos *wetlands*, por terem sido utilizados previamente por Cabral (2022) e por apresentarem características estruturais que permitem comparar a susceptibilidade de diferentes classes de corantes à ação da lacase. O AI é um corante índigo de natureza sulfonada, o AT pertence ao grupo azo e o P4R é um corante azo sulfonado de cadeia mais complexa.

Os comprimentos de onda de máxima absorbância para cada corante foram adotados a partir de Cabral (2022), que os determinou por curvas de varredura espectrofotométrica, sendo 610 nm para AI, 426 nm para AT e 507 nm para P4R (Figura 24).

Figura 24 – Curvas de varredura dos corantes azul de indigotina (AI), amarelo tartrazina (AT) e ponceau 4R (P4R)

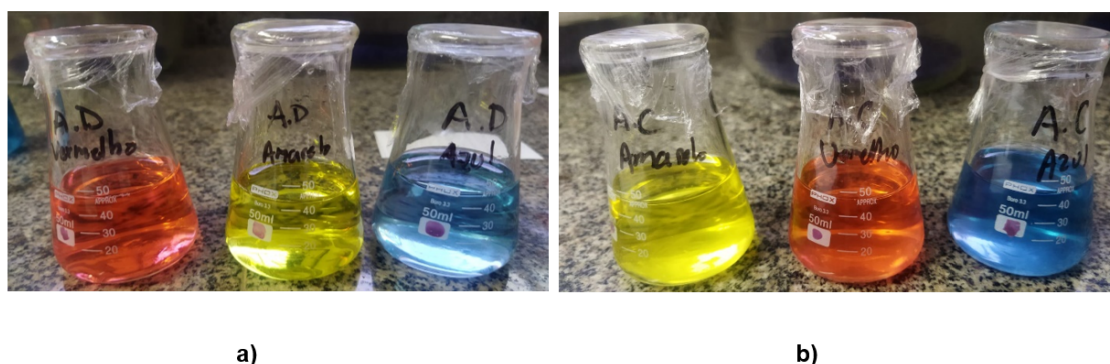


Fonte: Cabral (2022).

Na Figura 24 são identificados os picos de absorbância máxima de cada corante na região visível do espectro, utilizados como comprimentos de onda analíticos nos ensaios de degradação.

Para selecionar qual corante seria aplicado nos *wetlands*, foram realizados ensaios de degradação em bancada e em triplicata, em frascos de Erlenmeyer de vidro com volume de 50 mL, contendo cada corante individualmente na concentração de 25 mg L⁻¹. As matrizes de água destilada e água do córrego Ribeirão dos Müller foram testadas em paralelo, conforme apresentado na Figura 25.

Figura 25 – Frascos de ensaio dos experimentos de seleção do corante: a) água destilada e b) água do córrego do Ribeirão dos Müller, contendo azul de indigotina (Azul), amarelo tartrazina (Amarelo) e ponceau 4R (Vermelho) na concentração de 25 mg L⁻¹



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 25 observam-se os frascos com os três corantes nas duas matrizes testadas. A inclusão da água do córrego permitiu verificar se as interferências da matriz real afetariam o desempenho da enzima na remoção dos corantes.

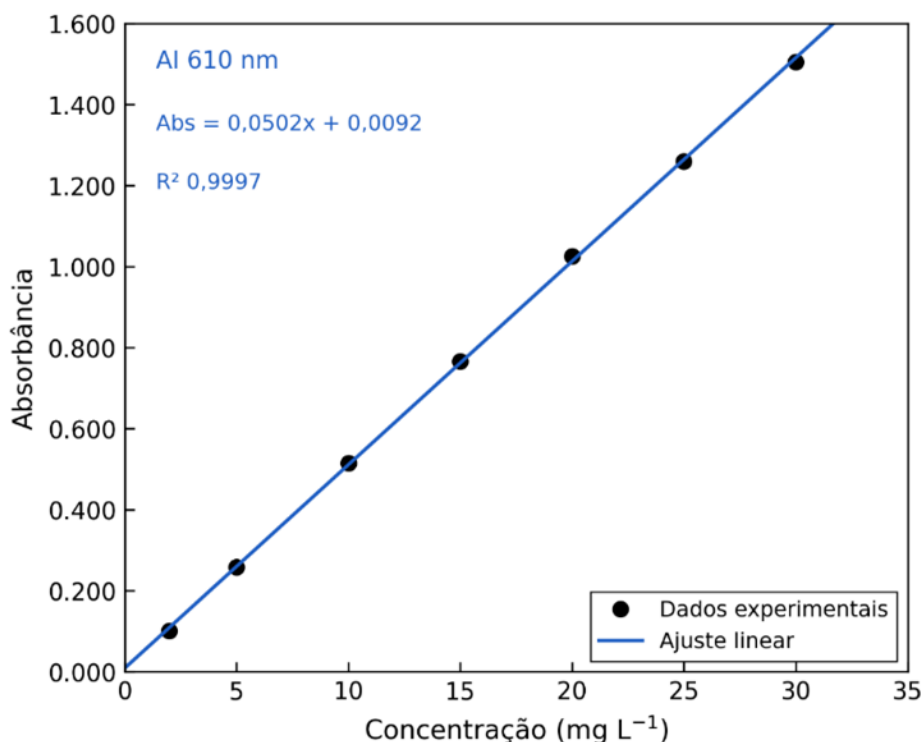
A atividade enzimática foi ajustada para 500 U L⁻¹ nos frascos, conforme definido nos ensaios descritos na Seção 4.3.1. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente e as leituras de absorbância realizadas na entrada ($t = 0$), 24 h e 48 h. A remoção foi calculada pela Equação 4.

$$\text{Remoção (\%)} = \left[\frac{C_0 - C_t}{C_0} \right] \times 100 \quad (4)$$

Em que C_0 é a concentração inicial e C_t a concentração no tempo t , ambas obtidas pela curva analítica de cada corante. Os resultados da triagem e a justificativa da seleção do AI são apresentados na Seção 5.4.

A remoção do AI na água do córrego foi menor do que na água destilada, sugerindo interferências da matriz nas leituras de absorbância a 610 nm. Essa constatação justificou a construção de uma curva analítica própria em água do córrego, pois a matriz das amostras difere da água destilada utilizada por Cabral (2022). A curva analítica foi construída com sete soluções padrão de AI nas concentrações de 2, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg L⁻¹, preparadas com água do córrego, e as leituras foram realizadas no espectrofotômetro UV-Vis HACH modelo DR 5000 no comprimento de onda de 610 nm (Figura 26).

Figura 26 – Curva analítica do Azul de Indigotina (AI) construída em água do córrego



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 26 observa-se a relação linear entre a concentração de AI e a absorbância a 610 nm na faixa de 2 a 30 mg L⁻¹, com coeficiente de determinação compatível com a quantificação do corante nas amostras dos *wetlands*.

Na Fase II de operação dos *wetlands*, o AI foi adicionado à água do córrego na concentração de 25 mg L⁻¹, dissolvido no volume de 2 L preparado para cada ciclo de 48 h. Para a leitura das amostras, o procedimento de zeragem do espectrofotômetro utilizou a mesma matriz do efluente real. A cada ciclo, antes da alimentação dos sistemas, uma alíquota de água do córrego sem corante foi armazenada nas mesmas condições ambientais do laboratório pelo período de 48 h. Essa alíquota serviu como branco para zerar o equipamento tanto na leitura do afluente quanto na leitura dos efluentes ao final do ciclo, descontando qualquer variação na coloração natural da água do córrego.

4.7 Ensaios de descoloração do azul de indigotina (AI) com lacase imobilizada em bancada

Com o tijolo cerâmico confirmado como suporte e o protocolo TAS E definido como procedimento padrão de imobilização (Seção 4.4), a etapa seguinte foi verificar se a lacase imobilizada nesse material mantinha capacidade de descolorir o azul de indigotina. Para isso, foram realizados ensaios em bancada usando água do córrego Ribeirão dos Müller como matriz, reproduzindo as condições de operação dos WCFV.

O extrato enzimático liofilizado foi descongelado, reconstituído em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e sua atividade determinada pelo método descrito na Seção 4.2.2. A partir da atividade medida, o volume de extrato foi calculado pela equação de diluição para atingir a concentração-alvo de imobilização. O procedimento de imobilização seguiu o protocolo TAS E descrito na Seção 4.4.4, com silanização prévia do suporte (Seção 4.4.1) e adição da enzima 30 minutos antes do glutaraldeído.

Foram preparados 12 frascos de Erlenmeyer, distribuídos em quatro condições experimentais em triplicata, conforme o Quadro 8. A ordem das condições segue a lógica de comparação, partindo do controle sem intervenção até o ensaio com lacase imobilizada, de modo que cada condição adiciona um fator ao sistema.

Quadro 8 – Condições experimentais dos ensaios de descoloração do azul de indigotina em bancada (n = 3).

CONDIÇÃO	DESCRIÇÃO
Branco	2 mL de AI 25 mg L ⁻¹ em água do córrego, sem tijolo nem lacase
Adsorção	25 mg de tijolo autoclavado sem lacase + 2 mL de AI 25 mg L ⁻¹ em água do córrego
Lacase livre	Lacase livre 500 U L ⁻¹ + 2 mL de AI 25 mg L ⁻¹ em água do córrego
Lacase imobilizada	25 mg de tijolo com lacase imobilizada (protocolo TAS E) + 2 mL de AI 25 mg L ⁻¹ em água do córrego

Fonte: Autoria própria (2026).

A condição Branco verifica a estabilidade do corante na ausência de enzima e suporte. A condição Adsorção quantifica a contribuição da retenção física do corante no tijolo cerâmico. A condição Lacase livre serve como referência do desempenho catalítico da enzima em solução, e a condição Lacase imobilizada avalia se a enzima ancorada no suporte mantém capacidade de descoloração.

Em cada frasco foram adicionados 2 mL de água do córrego contendo azul de indigotina na concentração de 25 mg L⁻¹, a mesma utilizada na Fase II de operação dos *wetlands*. A água do córrego foi coletada no dia do ensaio e o corante dissolvido diretamente na matriz. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente em condições estáticas, sem agitação, para simular o regime hidráulico do leito saturado dos WCFV.

A absorbância foi lida no espectrofotômetro UV-Vis HACH DR 5000 no comprimento de onda de 610 nm, no tempo inicial (t = 0 h) e ao final de cada ciclo de 48 h. A remoção de cor foi calculada pela Equação 4 (Seção 4.6).

Ao término de cada ciclo de 48 h, o sobrenadante era drenado dos frascos e uma nova alíquota de 2 mL de água do córrego com AI a 25 mg L⁻¹ era adicionada diretamente, sem lavagem intermediária do suporte, reproduzindo a dinâmica de alimentação em batelada dos *wetlands*. Na condição Lacase livre, o extrato enzimático também era renovado a cada ciclo para manter a atividade a 500 U L⁻¹. Foram realizados três ciclos consecutivos de reúso (0–48 h, 48–96 h, 96–144 h), permitindo avaliar a retenção da capacidade de descoloração da lacase imobilizada ao longo de operações sucessivas.

Os resultados obtidos são apresentados na Seção 5.5.

4.8 Parâmetros monitorados e métodos analíticos

O monitoramento foi realizado em amostras do afluente e efluente dos WCFV durante as duas fases de operação, seguindo os procedimentos do APHA (2017). Os parâmetros analisados e os respectivos métodos estão apresentados no Quadro 9.

Quadro 9 – Parâmetros monitorados no afluente e efluente dos *wetlands* construídos

Parâmetros	Unidade	Método	Número do método	Referência
pH	–	Potenciômetro	4500 – H	APHA (2017)
Turbidez	UNT	Nefelométrico	2130 – B	APHA (2017)
Potencial de oxirredução	mV	Potenciométrico	2580 ORP	APHA (2017)
Condutividade elétrica	$\mu\text{S cm}^{-1}$	Condutimétrico	2510 – B	APHA (2017)
Oxigênio dissolvido	$\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$	Polarográfico	4500-O G	APHA (2017)
Alcalinidade total	$\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$	Titulométrico	–	Ripley et al. (1986)
Demanda Química de Oxigênio	$\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$	Espectrofotométrico	5220 – D	APHA (2017)
Nitrogênio Total Kjeldahl	mg L^{-1}	Titulométrico	4500 – N – C	APHA (2017)
Nitrogênio amoniacal	mg L^{-1}	Titulométrico	4500 – Norg	APHA (2017)
Nitrito	mg L^{-1}	Colorimétrico	4500 – NO_2^-	APHA (2017)
Nitrato	mg L^{-1}	Espectrofotométrico	4500 – NO_3^-	APHA (2017)
Fósforo total	$\text{mgPO}_4^{-3} \text{ L}^{-1}$	Espectrofotométrico	4500 – P	APHA (2017)
Cor/Absorbância (AI)	UA	Espectrofotométrico	2120 – C	APHA (2017)

Fonte: Autoria própria (2025).

O pH foi determinado em pHmetro de bancada Quimis Q400AS e a condutividade elétrica no medidor multiparâmetro AKSO 86505. A turbidez foi lida no turbidímetro PoliControl AquaColor Micro pelo método nefelométrico (SM 2130 B). O oxigênio dissolvido foi medido com oxímetro YSI 550A e o potencial de oxirredução com sonda YSI PRO 10, ambos nos pontos de coleta (*in situ*) nos sistemas.

As análises de DQO, nitrito, nitrato e fósforo total foram realizadas no espectrofotômetro HACH DR 3900. A DQO seguiu o método de refluxo fechado colorimétrico (SM 5220 D), nitrito e nitrato foram quantificados com os kits HACH PermaChem NitriVer 3 e NitraVer 5, equivalentes aos métodos SM 4500- NO_2^- B e SM 4500- NO_3^- E, e o fósforo total pelo método espectrofotométrico SM 4500-P. A absorbância do azul de indigotina foi lida a 610 nm no espectrofotômetro UV-Vis HACH DR 5000 e convertida em concentração pela curva analítica descrita na Seção 3.6.

O nitrogênio total Kjeldahl e o nitrogênio amoniacal foram determinados por digestão e destilação em sistema Kjeldahl pelos métodos SM 4500-N C e SM 4500-N_{org}, respectivamente. A alcalinidade total foi obtida por titulometria ácida conforme Ripley, Boyle e Converse (1986).

4.9 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente no BioEstat 5.0 (gratuito). O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para verificação da distribuição dos dados. Confirmada a normalidade na distribuição dos dados, as médias foram comparadas pelo ANOVA de um critério seguido do pós-teste de Tukey. O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para os dados que não apresentaram distribuição normal.

A comparação entre a unidade controle e a unidade com lacase livre foi realizada com base nas eficiências de remoção (%) obtidas em cada campanha. Essa escolha se justifica pelo fato de o extrato enzimático adicionado ao Sistema A contribuir com carga orgânica e nutrientes adicionais ao afluente, tornando os afluentes dos dois sistemas distintos. O uso das eficiências de remoção permite isolar o efeito catalítico da lacase sobre o desempenho dos *wetlands*, independentemente da carga aplicada em cada ciclo. As seguintes hipóteses foram testadas para cada parâmetro monitorado:

H_0 : A adição da lacase livre não interfere na remoção do parâmetro avaliado;

H_1 : A adição da lacase livre interfere na remoção do parâmetro avaliado.

O efeito da introdução do corante sobre os sistemas foi avaliado comparando as eficiências de remoção obtidas nas Fases I e II pelo Teste t pareado, com as campanhas correspondentes de cada fase como pares de observação:

H_0 : A presença do azul de indigotina não interfere na remoção do parâmetro avaliado;

H_1 : A presença do azul de indigotina interfere na remoção do parâmetro avaliado.

O nível de significância adotado foi de 95% ($p\text{-valor} \leq 0,05$) para todas as comparações.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção da lacase por *Trametes villosa*

A atividade enzimática do extrato bruto foi monitorada ao longo do cultivo nos dias 7, 12 e 15, conforme descrito na Seção 4.2.2. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Atividade enzimática do extrato bruto de *Trametes villosa* ao longo do período de cultivo (n = 3).

Dia do cultivo	Atividade enzimática (U L ⁻¹)
7	4.113,66
12	9.106,44
15	8.491,00

Fonte: Autoria própria (2025).

O pico de produção foi registrado no 12º dia do cultivo, com atividade de 9.106,44 U L⁻¹. No 15º dia houve redução para 8.491 U L⁻¹, provavelmente associada à depleção de nutrientes no meio de cultura. Esse perfil é coerente segundo (Modkovski, 2021; Silva *et al.*, 2024) o comportamento reportado para lacases de basidiomicetos cultivados em meio líquido com resíduos lignocelulósicos, em que a produção atinge o máximo entre o 10º e o 14º dia, seguida de queda gradual à medida que as fontes de carbono e nitrogênio se esgotam.

O extrato utilizado nos ensaios subsequentes foi coletado no 15º dia do cultivo, quando a atividade já apresentava declínio, porém havia maior volume acumulado disponível. Essa decisão evitou o desperdício do material produzido e a necessidade de preparar um novo cultivo. Após liofilização e reconstituição em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0), o extrato foi padronizado para a concentração de trabalho de 500 U L⁻¹, conforme descrito na Seção 4.2.3.

5.2 Ensaios preliminares em bancada

Os ensaios preliminares tiveram como finalidade definir as condições operacionais dos *wetlands* construídos, em particular a concentração enzimática de trabalho e o tempo de ciclo de alimentação.

5.2.1 Definição da concentração enzimática

Os parâmetros físico-químicos obtidos após 6 h de contato com a lacase produzida por *Trametes villosa* e com a lacase comercial de *Aspergillus* sp. são apresentados nas Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente, conforme as condições experimentais descritas no Quadro 7 (Seção 4.3.1). As tabelas foram organizadas com o controle na primeira linha, seguido das condições com enzima ativa, enzima inativada e água destilada, para facilitar a comparação entre os tratamentos.

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos das amostras após 6 h de contato com a lacase produzida por *Trametes villosa*, sob as condições experimentais descritas no Quadro 7 (n = 3).

Grupo	Condição	pH	Alcal. (mgCaCO ₃ L ⁻¹)	DQO (mg L ⁻¹)	PT (mg L ⁻¹)	NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)
C	Água do córrego sem enzima (controle)	8,65	50,0	108	6,22	0,144	0,5
A	Água do córrego + enzima 500 U L ⁻¹	7,55	41,8	115	17,86	0,065	10,5
B	Água do córrego + enzima 1000 U L ⁻¹	7,14	44,0	178	20,19	0,078	11,3
D	Água do córrego + enzima inativada 500 U L ⁻¹	8,41	44,4	97	15,94	0,066	4,5
E	Água do córrego + enzima inativada 1000 U L ⁻¹	8,39	46,0	128	16,65	0,075	4,8
F	Água destilada + enzima 500 U L ⁻¹	7,19	5,3	136	17,86	0,042	5,6
G	Água destilada + enzima 1000 U L ⁻¹	7,13	4,0	149	17,45	0,059	6,0

Fonte: Autoria própria (2025).

Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos das amostras após 6 h de contato com a lacase comercial de *Aspergillus* sp. (Sigma-Aldrich, SAE0050), sob as condições experimentais descritas no Quadro 7 (n = 3).

Grupo	Condição	pH	Alcal. (mgCaCO ₃ L ⁻¹)	DQO (mg L ⁻¹)	PT (mg L ⁻¹)	NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)
C	Água do córrego sem enzima (controle)	8,38	52,0	277,82	5,94	0,169	0,8
A	Água do córrego + enzima 500 U L ⁻¹	8,11	33,0	> 900*	6,97	0,013	0,9
B	Água do córrego + enzima 1000 U L ⁻¹	7,94	30,0	> 900*	6,30	0,016	0,9
D	Água do córrego + enzima inativada 500 U L ⁻¹	8,29	57,0	> 900*	9,32	0,128	1,4
E	Água do córrego + enzima inativada 1000 U L ⁻¹	8,35	55,0	> 900*	8,10	0,130	1,5
F	Água destilada + enzima 500 U L ⁻¹	7,06	1,1	> 900*	-1,13	0,010	0,5
G	Água destilada + enzima 1000 U L ⁻¹	7,25	0,6	> 900*	-1,06	0,020	0,7

Fonte: Autoria própria (2025).

Nota: *Valores de DQO que excederam a faixa superior da curva de calibração (900 mg L⁻¹) mesmo após sucessivas diluições, reportados como indicação qualitativa da elevada carga orgânica da formulação comercial.

Nos grupos A e B da Tabela 2, onde a lacase produzida atuou sobre a água do córrego, o pH variou de 7,14 a 7,55, valores inferiores ao do controle sem enzima (grupo C, pH 8,65). A alcalinidade nesses grupos permaneceu próxima àquela das amostras com enzima desnaturada (grupos D e E), o que sugere que a redução do pH decorre da composição do próprio extrato enzimático, e não da atividade oxidativa da lacase.

A DQO foi de 108 mg L⁻¹ no controle para 115 mg L⁻¹ no grupo A (500 U L⁻¹) e 178 mg L⁻¹ no grupo B (1000 U L⁻¹). O incremento com 500 U L⁻¹ foi consideravelmente menor do

que com 1000 U L^{-1} , indicando que parte dessa DQO adicional provém da matéria orgânica do extrato e que a dose mais baixa interfere menos na qualidade do efluente. Os grupos F e G (água destilada + enzima) reforçam essa observação, com DQO de 136 e 149 mg L^{-1} atribuída exclusivamente aos componentes do extrato.

O fósforo total nos grupos com enzima ativa e inativada (A, B, D, E, F, G) variou de $15,94$ a $20,19 \text{ mg L}^{-1}$, valores muito superiores ao do controle C ($6,22 \text{ mg L}^{-1}$). Essa elevação é atribuída ao KH_2PO_4 presente na formulação do meio de cultura utilizado para produção da lacase (Seção 4.2.2), cujo fósforo residual é carregado pelo extrato mesmo após filtração e liofilização.

Quanto à lacase comercial (Tabela 3), os valores de DQO nos grupos A e B foram superiores a 900 mg L^{-1} mesmo após sucessivas diluições. O mesmo padrão foi observado nos controles com enzima inativada (D, E) e nos ensaios com água destilada (F, G), o que evidencia interferência intrínseca da formulação comercial sobre o método colorimétrico e não efeito catalítico. Os valores negativos de fósforo total nos grupos F e G corroboram essa interferência da matriz.

A partir desses ensaios, definiu-se a concentração de 500 U L^{-1} para os experimentos nos *wetlands* construídos, pois a dose de 1000 U L^{-1} acarretou aumento expressivo da DQO sem ganho proporcional na ação enzimática. Os dados confirmaram a viabilidade de trabalhar com a lacase produzida por *Trametes villosa*, que demonstrou comportamento catalítico compatível com a aplicação pretendida sem comprometer a qualidade do efluente. A lacase comercial, embora incluída como referência, mostrou-se incompatível com a quantificação dos parâmetros físico-químicos pela elevada carga orgânica da sua formulação.

5.2.2 Estabilidade da lacase em água do córrego

A atividade enzimática e os parâmetros físico-químicos monitorados ao longo de 72 h são apresentados na Tabela 4, com o controle sem enzima (B) disposto antes do tratamento com lacase (A) para facilitar a comparação. O ensaio foi descontinuado em 96 h por inativação enzimática completa.

Tabela 4 – Atividade enzimática e parâmetros físico-químicos ao longo de 72 h de ensaio com lacase produzida (A) e controle sem enzima (B). Valores médios (n = 3).

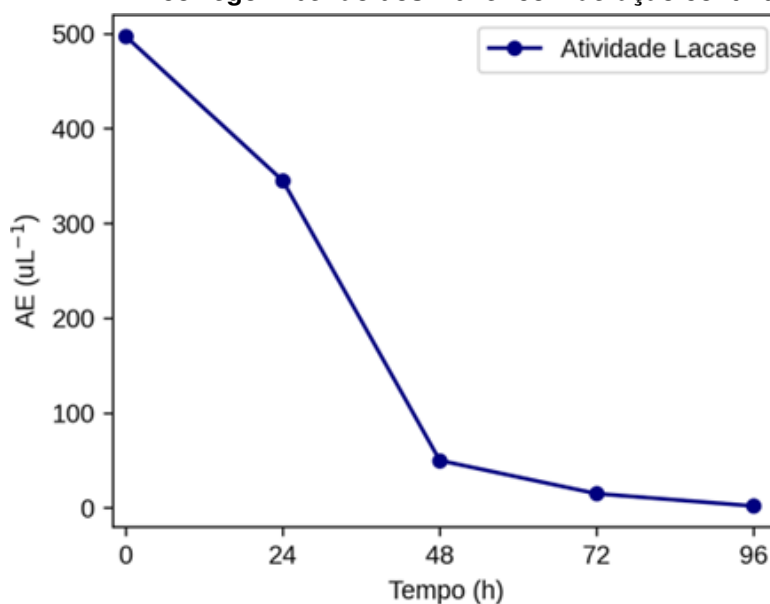
Parâmetro	Unidade	Afluente	24 h	48 h	72 h
<i>Controle sem enzima (B)</i>					
pH	—	7,4	8,5	8,7	8,6
DQO	mg L ⁻¹	115,9	62,9	45,8	34,6
Remoção de DQO	%	—	45,7	60,5	70,1
N-amoniacal	mg L ⁻¹	35,7	35,3	35,0	31,4
Nitrito	mg L ⁻¹	0	0	0	0
Nitrato	mg L ⁻¹	0,4	0,5	0,5	0,5
Fósforo total	mg L ⁻¹	7,0	5,7	5,4	5,2
Remoção de PT	%	—	18,6	22,9	25,7
<i>Tratamento com lacase (A)</i>					
Atividade da lacase	U L ⁻¹	500	345,8	55,7	20,5
pH	—	6,9	7,9	8,5	8,5
DQO	mg L ⁻¹	572,4	484,6	216,2	206,7
Remoção de DQO	%	—	15,3	62,2	63,9
N-amoniacal	mg L ⁻¹	31,0	30,6	30,3	30,0
Nitrito	mg L ⁻¹	0,1	0,1	0,1	0,1
Nitrato	mg L ⁻¹	17,4	8,8	3,0	1,7
Remoção de Nitrato	%	—	49,4	82,8	90,2
Fósforo total	mg L ⁻¹	15,6	12,8	11,1	10,6
Remoção de PT	%	—	17,9	28,8	32,1

Fonte: Autoria própria (2025).

Nota: Ensaio descontinuado em 96 h por inativação enzimática completa (0,1 U L⁻¹). Traços (—) indicam que o cálculo de remoção não se aplica ao tempo inicial.

O perfil de decaimento da atividade enzimática ao longo do ensaio é apresentado na Figura 27.

Figura 27 – Variação da atividade da lacase (U L⁻¹) ao longo de 96 h de ensaio em água do córrego Ribeirão dos Müller com aeração contínua.

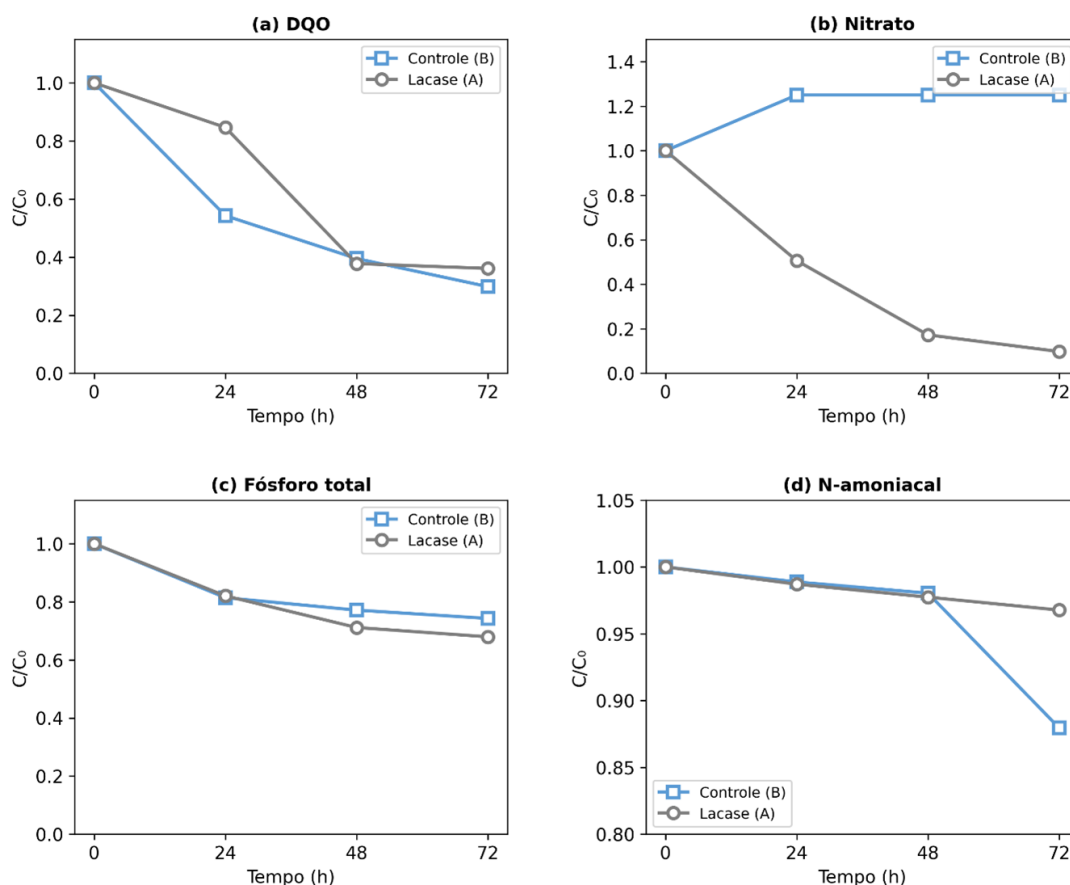


Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 27 observa-se que a atividade decaiu de 500 U L^{-1} para $345,8 \text{ U L}^{-1}$ nas primeiras 24 h, reduzindo para $55,7 \text{ U L}^{-1}$ em 48 h, $20,5 \text{ U L}^{-1}$ em 72 h e tornando-se indetectável em 96 h. Esse perfil de inativação era esperado, dado que o meio não era estéril, microrganismos presentes na água do córrego podem ter degradado a enzima por proteólise, somado aos efeitos de temperatura e adsorção ao material particulado, condições que reduzem a estabilidade da lacase em matrizes reais quando comparada a soluções sintéticas (Lloret *et al.*, 2011; Kujawa *et al.*, 2021b). Em 48 h a enzima ainda conservava cerca de 11% da atividade inicial, o que sustentou a definição de ciclos operacionais de 48 h para os *wetlands* construídos.

As concentrações normalizadas (C/C_0) dos parâmetros físico-químicos monitorados são apresentadas na Figura 28.

Figura 28 – Variação da concentração normalizada (C/C_0) de DQO (a), nitrato (b), fósforo total (c) e nitrogênio amoniacal (d) ao longo de 72 h de ensaio. Controle B (sem enzima) e tratamento A (lacase 500 U L^{-1}).



Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 28 em (a), os perfis de C/C_0 da DQO mostram que o controle B apresentou queda mais acentuada nas primeiras 24 h ($C/C_0 = 0,54$) em comparação ao tratamento A ($C/C_0 = 0,85$), porém ambos convergiram para valores próximos a partir de 48 h. A DQO no afluente do tratamento A ($572,4 \text{ mg L}^{-1}$) foi cerca de cinco vezes superior à do controle B ($115,9 \text{ mg L}^{-1}$), diferença atribuída à carga orgânica do próprio extrato enzimático, composto de proteínas, carboidratos residuais e metabólitos da fermentação. Em 72 h, o tratamento atingiu $206,7 \text{ mg L}^{-1}$ (remoção de 63,9%) e o controle $34,6 \text{ mg L}^{-1}$ (70,1%). A remoção observada no controle

B, onde não havia lacase, poderia ser atribuída à atividade microbiana aeróbia estimulada pela aeração contínua. No tratamento A, o mesmo mecanismo microbiano atuou sobre uma carga orgânica maior, o que explica a eficiência percentual semelhante a partir de 48 h, momento em que a lacase já havia perdido a maior parte da sua atividade.

O nitrogênio amoniacal variou pouco em ambos os sistemas, permanecendo entre 30 e 35 mg L⁻¹ ao longo do ensaio (Figura 28d). Esse resultado é coerente com o fato de a lacase não atuar sobre formas reduzidas de nitrogênio (Baldrian, 2006).

O nitrato no tratamento A apresentou redução expressiva, de 17,4 mg L⁻¹ no afluente para 3,0 mg L⁻¹ em 48 h (82,8%) e 1,7 mg L⁻¹ em 72 h (90,2%), conforme visualizado na Figura 28b. No controle B, as concentrações permaneceram entre 0,4 e 0,5 mg L⁻¹, sem variação. A concentração inicial elevada no tratamento A é atribuída ao nitrato residual do meio de cultura, e a redução ao longo do tempo pode estar associada ao consumo de oxigênio pela atividade microbiana estimulada pela matéria orgânica do extrato, gerando microzonas anóxicas que favorecem a desnitrificação (Vymazal, 2010; Dotro *et al.*, 2017).

O fósforo total partiu de 15,6 mg L⁻¹ no tratamento A e 7,0 mg L⁻¹ no controle B. A concentração mais elevada no tratamento é novamente atribuída ao KH₂PO₄ do meio de cultura. As remoções em 72 h foram de 32,1% e 25,7%, respectivamente, possivelmente associadas à precipitação de fosfatos em condições de pH alcalino. Os perfis de C/C₀ (Figura 28c) mostram comportamento semelhante entre os dois sistemas.

Com base nos resultados, definiu-se o ciclo operacional de 48 h para os *wetlands* construídos, período em que a lacase ainda apresentava atividade mensurável e os parâmetros físico-químicos já indicavam estabilização.

5.3 Imobilização da lacase em resíduos da construção civil

Os ensaios de imobilização foram conduzidos em etapas progressivas, partindo da triagem exploratória dos materiais suporte, passando pela quantificação do rendimento de imobilização e finalizando com a otimização da sequência de adição dos reagentes, conforme os protocolos descritos na Seção 4.4.

5.3.1 Triagem dos materiais suporte

Os resultados da triagem exploratória entre tijolo cerâmico e concreto aerado autoclavado são apresentados na Tabela 5. Cada material foi avaliado em quatro condições de pré-tratamento, totalizando oito combinações, com concentração enzimática de 1000 U L⁻¹.

Tabela 5 – Atividade enzimática retida no suporte e liberada na lavagem durante a triagem de materiais para imobilização de lacase a 1000 U L⁻¹ (n = 3).

Condição do suporte	Atividade no suporte (U L ⁻¹)	DP	Atividade na lavagem (U L ⁻¹)	DP	CV suporte (%)
Tijolo cerâmico					
<i>in natura</i> (T)	43,09	3,54	51,56	14,19	8,2
Autoclavado (TA)	54,42	4,52	44,04	5,89	8,3
Silanizado (TS)	55,94	2,21	33,14	6,69	3,9
Autoclav. + silan. (TAS)	33,43	1,49	41,73	4,53	4,5
Concreto aerado autoclavado					
<i>in natura</i> (C)	34,82	4,93	69,48	2,56	14,2
Autoclavado (CA)	50,88	8,15	58,15	16,42	16,0
Silanizado (CS)	64,80	1,33	6,52	3,73	2,1
Autoclav. + silan. (CAS)	67,75	2,69	23,68	3,09	4,0

Fonte: Autoria própria (2025).

Nota: DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação. Atividades medidas pelo método ABTS a 420 nm

A triagem evidenciou diferenças marcantes entre os materiais que iam além dos valores numéricos de atividade. No tijolo cerâmico, a solução resultante da incubação com ABTS apresentou coloração verde característica da oxidação do substrato, proporcional à atividade da lacase. O meio permaneceu límpido ao longo do ensaio, sem interferência na leitura espectrofotométrica.

O concreto aerado, ao entrar em contato com a solução aquosa, liberou partículas finas que conferiram aspecto leitoso e persistente ao meio, mesmo após centrifugação. A coloração verde produzida pela oxidação do ABTS era menos intensa nos tubos com concreto do que nos tubos com tijolo, apesar de os valores numéricos de absorbância serem superiores. A dispersão da luz pelas partículas suspensas eleva a linha de base espectrofotométrica e superestima a atividade enzimática. Essas interferências foram relatadas previamente para suportes à base de silicato de cálcio por Kujawa *et al.* (2021b). Os valores aparentemente elevados de atividade para CS (64,80 U L⁻¹) e CAS (67,75 U L⁻¹) não podem, portanto, ser comparados diretamente aos obtidos para o tijolo. O controle de turbidez do concreto, realizado em ensaio paralelo com suporte sem enzima, gerou leituras de absorbância equivalentes ou superiores às do suporte com enzima, confirmando a interferência.

Quanto ao tijolo cerâmico, a silanização reduziu a perda enzimática na lavagem. A condição TS (silanizado) apresentou a menor atividade na lavagem entre os tratamentos do tijolo (33,14 U L⁻¹), indicando maior retenção da enzima na superfície funcionalizada. O tijolo *in natura* (T) apresentou atividade na lavagem superior à do próprio suporte (51,56 *versus* 43,09 U L⁻¹), o que indica baixa afinidade entre a enzima e a superfície não funcionalizada. A autoclavagem isolada (TA) melhorou a retenção, e a combinação autoclavagem + silanização produziu os menores coeficientes de variação (4,5% no suporte), sugerindo maior reprodutibilidade na ligação.

Diante desses resultados, o concreto aerado autoclavado foi descartado como suporte por apresentar interferência analítica incompatível com a determinação espectrofotométrica da

atividade enzimática. O tijolo cerâmico foi selecionado para a continuidade do trabalho em suas condições silanizadas, por permitir leituras confiáveis e retenção enzimática consistente.

5.3.2 Rendimento de imobilização e atividade recuperada

Uma vez definida a concentração de 500 U L^{-1} como padrão de trabalho (Seção 5.2.1), os resultados da quantificação formal do rendimento de imobilização e da atividade recuperada são apresentados na Tabela 6. Foram testadas quatro condições: concreto aerado autoclavado silanizado (CAS), tijolo autoclavado silanizado (TAS), concreto aerado sem tratamento (C) e tijolo sem tratamento (T). O concreto foi mantido nesta rodada para confirmar a interferência observada na triagem.

Tabela 6 – Rendimento de imobilização e atividade recuperada para diferentes suportes a 500 U L^{-1} . Valores médios ($n = 3$).

Suporte	Atividade suporte (U L^{-1})	DP	Sobrenadante (U L^{-1})	DP	Ativ. recup. (%)	Rend. imob. (%)	Lavagem (U L^{-1})
CAS	48,50	0,54	462,35	16,23	2,13	83,13	9,97
TAS	39,56	0,55	470,34	3,14	1,74	82,84	20,58
C	42,38	0,40	600,51	6,54	1,98	78,09	25,26
T	25,62	0,49	507,27	3,15	1,15	81,50	18,54

Fonte: Autoria própria (2025).

Nota: CAS = concreto aerado autoclavado silanizado; TAS = tijolo autoclavado silanizado; C = concreto aerado sem tratamento; T = tijolo sem tratamento; DP = desvio padrão; Sobrenad. = atividade no sobrenadante diluído 1/20; Ativ. recup. = atividade recuperada; Rend. imob. = rendimento de imobilização.

O rendimento de imobilização variou entre 78% e 83% em todos os suportes, indicando que a maior parte da enzima adicionada foi removida da solução e retida nos materiais. Não houve diferença expressiva entre suportes silanizados e não silanizados nesse parâmetro. A atividade recuperada, contudo, foi inferior a 2,2% em todos os casos, sugerindo que, embora a enzima tenha sido adsorvida ou ligada ao suporte, grande parte perdeu a conformação catalítica durante o processo de reticulação com glutaraldeído.

O CAS apresentou a maior atividade recuperada (2,13%) e a menor atividade na lavagem (9,97 U L^{-1}), valores que poderiam indicar boa retenção. A turbidez do concreto, porém, persistiu neste ensaio. O sobrenadante do concreto sem tratamento (C) atingiu 600,51 U L^{-1} , valor superior aos 500 U L^{-1} adicionados, resultado fisicamente impossível que só se explica pela interferência da turbidez na leitura. Esse dado confirmou, de forma quantitativa, a limitação analítica já observada na triagem (Seção 5.3.1).

Para o TAS, o rendimento de 82,84% e a atividade recuperada de 1,74% foram ligeiramente inferiores ao CAS, mas as leituras foram limpas e reprodutíveis (CV de 1,39% no suporte e 0,67% no sobrenadante). A lavagem do TAS (20,58 U L^{-1}) foi maior do que a do CAS (9,97 U L^{-1}), sugerindo que parte da enzima estava fracamente adsorvida e não covalentemente ligada.

A atividade recuperada baixa em todos os suportes ($\sim 2\%$) apontou para a necessidade de revisar o protocolo de imobilização. Essa perda catalítica pode estar associada a alterações conformacionais da enzima durante a reticulação com glutaraldeído, efeito já descrito quando a concentração do reticulante ou o tempo de contato são excessivos (Fernández-fernández; Sanromán; Moldes, 2013). Tal constatação motivou os ensaios de otimização da sequência de adição, descritos na seção seguinte.

5.3.3 Otimização da sequência de adição

Os resultados das três sequências de adição testadas em tijolo autoclavado silanizado (TAS) são apresentados na Tabela 7, organizados em ordem decrescente de atividade recuperada.

Tabela 7 – Efeito da sequência de adição na imobilização de lacase em tijolo autoclavado silanizado (TAS) a 500 U L^{-1} ($n = 3$).

Condição	Ativ. suporte (U L^{-1})	DP	CV (%)	Ativ. recup. (%)	Rend. imob. (%)	Lavagem (U L^{-1})
TAS E (enzima primeiro)	50,53	5,57	11,0	17,21	58,72	7,22
TAS G (glutaraldeído primeiro)	36,07	2,79	7,7	13,82	52,20	5,45
TAS (adição simultânea)	40,28	4,55	11,3	11,74	68,60	3,61

Fonte: Autoria própria (2025).

Nota: TAS E = enzima adicionada antes do glutaraldeído; TAS G = glutaraldeído adicionado antes da enzima; TAS = adição simultânea.

A sequência de adição teve efeito direto sobre a atividade recuperada. A condição TAS E, com enzima adicionada 30 minutos antes do glutaraldeído, atingiu 17,21% de atividade recuperada, aumento de quase dez vezes em relação ao protocolo de adição simultânea utilizado nas etapas anteriores ($\sim 2\%$, Seção 5.3.2). A atividade no suporte também foi a mais alta do ensaio ($50,53 \text{ U L}^{-1}$).

A condição TAS G (glutaraldeído primeiro) alcançou 13,82% e a adição simultânea ficou em 11,74%. O rendimento de imobilização, por outro lado, foi maior na adição simultânea (68,60%) e menor na TAS E (58,72%). Esse comportamento é compatível com a cinética de reticulação do glutaraldeído: quando presente desde o início, o reticulante remove grande parte da enzima da solução por reticulação intermolecular entre moléculas de lacase, o que aumenta o rendimento aparente mas aprisiona parte da enzima em agregados sem atividade catalítica.

Na condição TAS E, o contato prévio de 30 minutos com o suporte permite que a enzima adsorva aos grupos aminopropil do APTES em uma orientação que preserva melhor o sítio ativo. O glutaraldeído, adicionado posteriormente, estabiliza a ligação já formada sem promover reticulação cruzada. O rendimento acaba menor porque nem toda a enzima se liga ao suporte nesse intervalo, mas a fração que se liga mantém mais atividade, e é a atividade catalítica que interessa para a aplicação nos *wetlands*.

Os controles realizados em paralelo reforçaram a coerência dos resultados. O controle C1 (glutaraldeído + tampão + enzima, sem suporte) apresentou atividade de $351,43 \text{ U L}^{-1}$, evi-

denciando que o glutaraldeído por si só reduz a atividade enzimática em cerca de 30%. Cabe ressaltar que, neste ensaio, foi utilizada uma solução de glutaraldeído recém-comprada, o que pode ter contribuído para a maior eficiência de reticulação em comparação com os ensaios anteriores (Seção 5.3.2), nos quais a solução apresentava maior tempo de armazenamento. O controle C2 (tampão + enzima, sem glutaraldeído nem suporte) manteve atividade de 474,19 U L⁻¹, próxima da atividade inicial, confirmando que a enzima permanece estável nas condições do ensaio na ausência do reticulante.

Diante desses resultados, o protocolo com adição prévia da enzima (TAS E) foi adotado como procedimento padrão para imobilização nos *wetlands* construídos. O tijolo cerâmico autoclavado e silanizado com APTES, combinado à sequência enzima-glutaraldeído, reuniu as melhores condições para a aplicação proposta: leituras analíticas confiáveis, atividade recuperada de 17,21% e boa reprodutibilidade entre réplicas.

5.4 Seleção do corante modelo

Os resultados dos ensaios de descoloração dos três corantes alimentícios pela lacase de *T. villosa* são apresentados na Tabela 8, nas matrizes água destilada e água do córrego Ribeirão dos Müller, conforme protocolo descrito na Seção 4.6.

Tabela 8 – Concentração inicial (C₀) e percentual de remoção do azul de indigotina (AI), amarelo tartrazina (AT) e ponceau 4R (P4R) pela lacase de *T. villosa* em água destilada e água do córrego do Ribeirão dos Müller nos tempos de 24 h e 48 h (n = 3)

Corante	Matriz	C ₀ média (mg L ⁻¹)	Remoção (%)	
			t = 24 h	t = 48 h
AI (610 nm)	Água destilada	23,71 ± 0,09	81,6 ± 0,2	99,9 ± 0,1
	Água do córrego	23,79 ± 0,05	54,1 ± 0,2	61,2 ± 0,2
AT (426 nm)	Água destilada	19,02 ± 0,07	0	0
	Água do córrego	26,21 ± 0,03	0,3 ± 0,1	0
P4R (507 nm)	Água destilada	25,35 ± 0,04	30,3 ± 0,1	38,9 ± 0,2
	Água do córrego	19,07 ± 0,03	0,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1

Fonte: Autoria própria (2025).

O amarelo tartrazina não apresentou descoloração detectável em nenhuma das matrizes, resultado coerente com a estrutura azo monossubstituída desse corante, que oferece maior resistência à oxidação pela lacase. O ponceau 4R alcançou 38,9 ± 0,2% de remoção em água destilada após 48 h, porém em água do córrego os valores foram de apenas 1,6%, indicando forte influência da matriz sobre a ação enzimática nesse substrato.

O azul de indigotina foi o corante com maior descoloração nas duas matrizes. Em água destilada, a descoloração atingiu 81,6 ± 0,2% em 24 h e 99,9 ± 0,1% em 48 h. Em água do córrego, os valores foram de 54,1 ± 0,2% e 61,2 ± 0,2%, respectivamente. A descoloração menor na água do córrego sugere que compostos orgânicos e inorgânicos presentes no efluente competiram com o corante pelos sítios ativos da enzima ou interferiram na sua atividade catalítica.

Com base nesses resultados, o azul de indigotina foi selecionado como corante modelo para as etapas subsequentes, por apresentar a maior susceptibilidade à ação da lacase e permitir quantificação espectrofotométrica a 610 nm com boa resolução analítica em ambas as matrizes.

5.5 Descoloração do azul de indigotina com lacase imobilizada em bancada

A atividade enzimática medida diretamente no suporte após a imobilização e lavagem foi de $27,06 \pm 4,94 \text{ U L}^{-1}$, confirmando a presença de lacase ativa no tijolo cerâmico. Os resultados dos três ciclos consecutivos de 48 h são apresentados na Tabela 9, com as concentrações de azul de indigotina (AI) calculadas a partir da curva analítica construída em água do córrego (Seção 4.6).

Tabela 9 – Concentração de azul de indigotina (mg L^{-1}) e descoloração (%) nas quatro condições experimentais ao longo de três ciclos de reúso de 48 h em bancada ($n = 3$).

Condição	Ciclo 1 (0–48 h)		Ciclo 2 (48–96 h)		Ciclo 3 (96–144 h)	
	C (mg L^{-1})	Desc. (%)	C (mg L^{-1})	Desc. (%)	C (mg L^{-1})	Desc. (%)
Entrada	$24,76 \pm 0,07$	—	$22,44 \pm 0,19$	—	$20,07 \pm 0,10$	—
Branco	$26,38 \pm 0,56$	0	$22,38 \pm 0,28$	0	$20,92 \pm 1,04$	0
Adsorção	$26,83 \pm 1,05$	0	$23,01 \pm 0,25$	0	$21,44 \pm 1,43$	0
Lacase livre	$10,38 \pm 1,39$	58,1	$11,15 \pm 2,58$	50,3	$10,24 \pm 1,18$	49,0
Lacase imobilizada	$18,46 \pm 1,59$	25,5	$17,44 \pm 3,07$	22,3	$16,20 \pm 0,39$	19,3

Fonte: Autoria própria (2026).

Nota: C = concentração de azul de indigotina obtida pela curva analítica descrita na Seção 4.6. Valores de 0% indicam ausência de descoloração ($C \geq C_0$).

A concentração inicial do AI variou de 20,07 a 24,76 mg L^{-1} entre os ciclos, em função de coletas independentes da água do córrego, cuja matriz apresenta carga orgânica e iônica variável que interfere na quantificação espectrofotométrica. Nas condições Branco e Adsorção, a concentração de saída foi igual ou ligeiramente superior à de entrada nos três ciclos. Esse pequeno aumento pode ser atribuído à concentração do corante por evaporação parcial durante as 48 h em frasco aberto à temperatura ambiente, e não à degradação ou adsorção. Esse resultado confirma que o azul de indigotina é estável na matriz e que o tijolo cerâmico sem enzima não retém o corante, atribuindo a descoloração observada nas demais condições exclusivamente à ação catalítica da lacase.

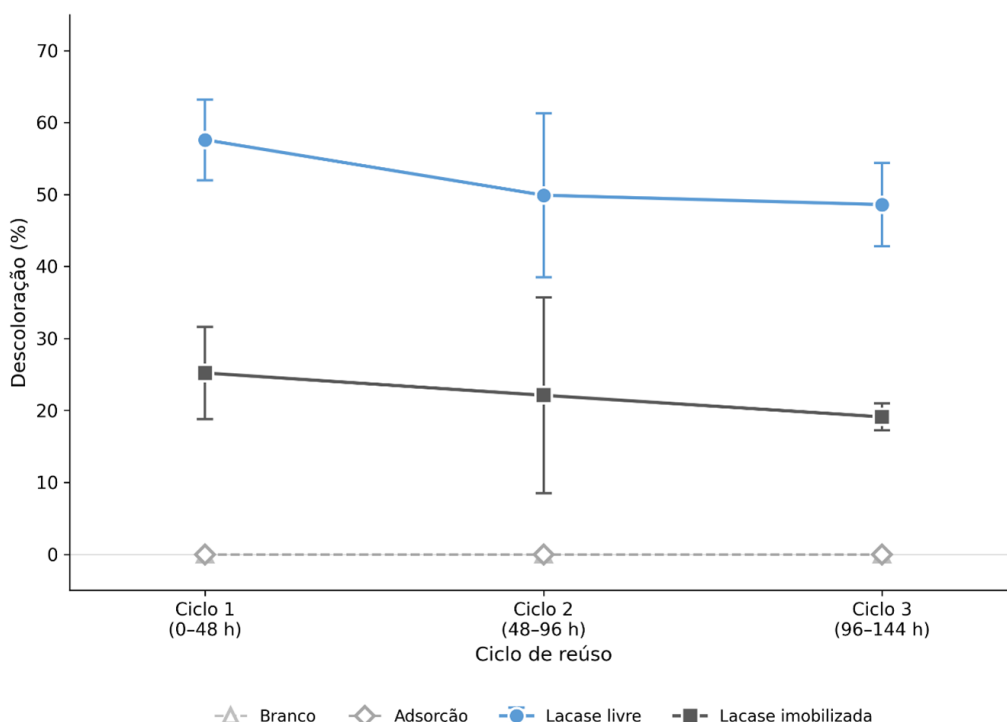
Na lacase livre, a concentração residual variou de 10,24 a 11,15 mg L^{-1} , com descoloração entre 49,0 e 58,1% ao longo dos três ciclos, com enzima renovada a cada batelada. A descoloração ligeiramente maior no primeiro ciclo (58,1%) pode estar relacionada a variações na composição da água do córrego entre coletas, uma vez que compostos presentes no efluente competem com o corante pelos sítios ativos da enzima.

Na lacase imobilizada, a concentração residual variou de 16,20 a 18,46 mg L^{-1} , com descoloração entre 19,3 e 25,5% sem renovação da enzima. A retenção da capacidade catalítica entre o primeiro e o terceiro ciclo foi de 75,7% (19,3/25,5), o que indica boa estabilidade ope-

racional do biocatalizador ancorado no tijolo. Porém, observou-se queda gradual ao longo dos ciclos, possivelmente associada à lixiviação de moléculas de lacase fracamente ligadas ao suporte ou à inativação progressiva pela exposição contínua à matriz real (Fernández-fernández; Sanromán; Moldes, 2013).

Os percentuais de descoloração ao longo dos ciclos são apresentados na Figura 29.

Figura 29 – Descoloração (%) do azul de indigotina (25 mg L^{-1}) em água do córrego Ribeirão dos Müller ao longo de três ciclos de reúso de 48 h para as condições Branco, Adsorção, Lacase livre (500 U L^{-1}) e Lacase imobilizada em tijolo cerâmico. Barras de erro representam desvio padrão ($n = 3$).

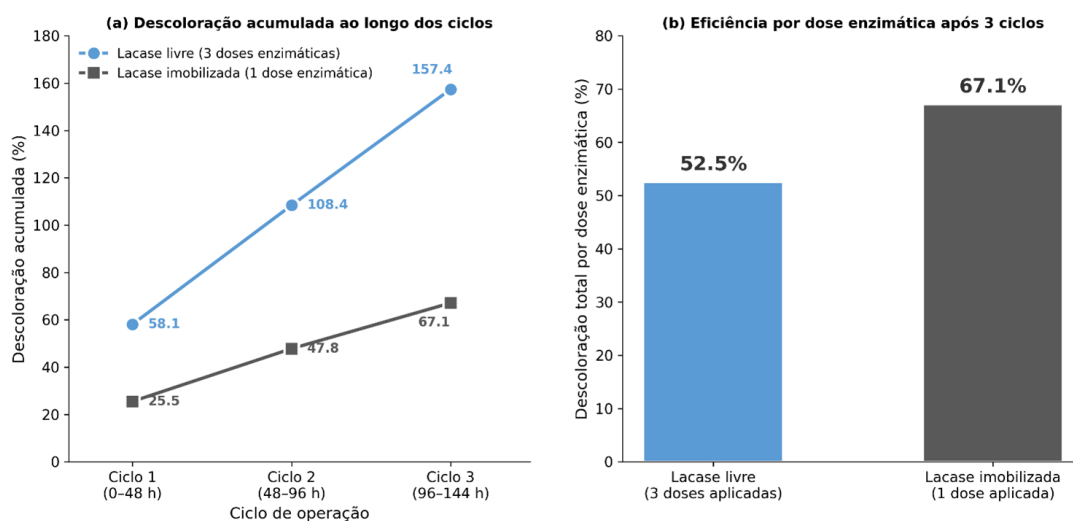


Fonte: Autoria própria (2026).

Na Figura 29 observa-se que a lacase imobilizada manteve descoloração em todos os ciclos, embora em valores inferiores aos da lacase livre. A diferença entre as duas formas é coerente com o comportamento descrito na literatura para enzimas imobilizadas por ligação covalente, em que a reticulação com glutaraldeído pode restringir a mobilidade conformacional da enzima e dificultar o acesso do substrato ao sítio ativo (Kujawa *et al.*, 2021b; Rodríguez-couto, 2024).

Os resultados apresentados até aqui mostram a descoloração obtida em cada ciclo individual, porém a comparação entre as formas livre e imobilizada exige considerar o consumo enzimático associado. Enquanto a lacase livre foi renovada a cada batelada, totalizando três doses aplicadas ao longo dos 144 h de operação, a lacase imobilizada atuou sobre as três bateladas a partir de uma única dose inicial. O desempenho comparativo entre as duas formas em função das doses enzimáticas aplicadas é apresentado na Figura 30.

Figura 30 – Desempenho comparativo entre lacase livre e lacase imobilizada em função das doses enzimáticas aplicadas: (a) descoloração acumulada do azul de indigotina ao longo dos três ciclos consecutivos de 48 h e (b) descoloração total alcançada por dose enzimática após os três ciclos.



Fonte: Autoria própria (2026).

Na Figura 30 em (a), observa-se que a descoloração acumulada após os três ciclos foi de 157,4% para a lacase livre e 67,1% para a lacase imobilizada, ou seja, a forma livre removeu o dobro de corante em termos absolutos ao longo do período de operação. Porém, quando a descoloração acumulada é normalizada pelo número de doses enzimáticas aplicadas (Figura 30b), a lacase imobilizada alcançou 67,1% de descoloração por dose, valor 28% superior ao da lacase livre (52,5%). Esse resultado indica que, em termos de aproveitamento enzimático, cada unidade de atividade aplicada na forma imobilizada gera maior descoloração total ao longo do tempo do que na forma livre.

Adicionalmente, a lacase imobilizada manteve 75,7% da capacidade catalítica entre o primeiro e o terceiro ciclo (19,3/25,5), o que sugere que o biocatalisador permaneceu ativo ao final do experimento e poderia sustentar ciclos adicionais até a perda completa da atividade. Esse comportamento reforça a vantagem operacional da imobilização em sistemas com alimentação cíclica, como os *wetlands* construídos, em que a substituição contínua do extrato enzimático seria inviável na prática.

A adição controlada do azul de indigotina à água do córrego, em concentração de 25 mg L⁻¹ a cada ciclo, permitiu avaliar a atuação da lacase sobre um contaminante de interesse em matriz real, porém configura um cenário semi-natural. Em efluentes industriais reais, a carga do corante é variável, pode estar associada a outros compostos recalcitrantes da mesma linha produtiva, e a matriz pode conter agentes químicos provenientes dos processos de tingimento. Assim, as eficiências de descoloração obtidas neste estudo refletem o comportamento dos sistemas nas condições ensaiadas e não devem ser extrapoladas diretamente para efluentes industriais sem estudos complementares com matrizes reais de origem têxtil ou alimentícia.

Com base nos resultados apresentados, a lacase de *Trametes villosa* imobilizada em tijolo cerâmico pelo protocolo TAS E (Seção 4.4.4) manteve capacidade de descoloração do

azul de indigotina ao longo de ciclos sucessivos em condições que simulam a operação dos WCFV. A possibilidade de reutilização do biocatalisador sem reposição enzimática a cada ciclo representa uma vantagem operacional frente à aplicação da lacase na forma livre, em que a renovação do extrato a cada ciclo eleva o consumo enzimático.

5.6 Desempenho dos *wetlands*

5.6.1 Inspeção prévia dos sistemas

O objetivo dessa etapa foi permitir a estabilização do meio suporte de tijolo cerâmico e o enraizamento das mudas de *Eichhornia crassipes* antes do início do monitoramento.

As três mudas introduzidas em cada unidade experimental sobreviveram ao período, embora o crescimento vegetativo tenha sido visivelmente limitado pelas condições climáticas de Curitiba neste período, que segundo (AccuWeather, 2026), a temperaturas registradas de 7 a 31 °C, com média de 17,1 °C valores inferiores à faixa recomendada por (Brix, 1994; Rezania *et al.*, 2015) de 25 a 35 °C indicada como ótima para o desenvolvimento de *E. crassipes*, refletindo a transição do inverno para a primavera característica da região sul do Brasil. O monitoramento teve início em 20 de outubro de 2025, com a Fase I de operação.

5.6.2 Parâmetros físicos-químicos

A água utilizada na alimentação de ambos os sistemas foi coletada diretamente no córrego Ribeirão dos Müller, corpo hídrico urbano que atravessa o campus da UTFPR Sede Eco-ville. Por se tratar de um manancial urbano sujeito a variações pluviométricas, drenagem difusa e contribuições difusas ao longo do seu percurso, a composição da água variou entre as campanhas de monitoramento, o que se reflete nos coeficientes de variação elevados observados nos afluentes de ambos os sistemas, especialmente para turbidez e condutividade elétrica. Essa variabilidade é inerente ao uso de água de córrego e não representa instabilidade experimental, ao contrário, confere maior representatividade aos resultados. Vale destacar que os afluentes dos dois sistemas diferem sistematicamente entre si, enquanto o afluente do Sistema B corresponde à água do córrego sem qualquer adição, o afluente do Sistema A recebe, a cada ciclo, o extrato bruto de lacase calculado para atingir 500 U L⁻¹ nos 2 L de alimentação. Esse extrato, obtido por fermentação com resíduos agroindustriais, introduz carga orgânica e iônica adicional no afluente de A, o que explica as diferenças sistemáticas observadas entre os afluentes dos dois sistemas ao longo de todo o experimento. Os resultados dos parâmetros físicos monitorados nas Fases I e II estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Resultados em função da média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimos (Mín.) e máximos (Máx.) e eficiências de remoção (E%) para os parâmetros físicos monitorados no afluente e efluente dos Sistemas A e B ao longo das Fases I e II (n = 32)

Amostra	n	Estatística	Fase I - Ciclo 48 h					Fase II - Ciclo 48 h				
			pH	OD	ORP	CE	Turbidez	pH	OD	ORP	CE	Turbidez
Afluente Sistema A	8	Média	7,3	3,7	139	675	35	7,0	2,2	150	526	4,8
		Mín.	7,1	2,7	123	420	10	6,8	1,6	141	398	3,0
		Máx.	7,6	5,2	162	1069	72	7,3	3,2	159	590	7,9
		DP	0,2	0,9	16	197	18	0,2	0,7	6	61	1,6
		CV	0,02	0,2	0,1	0,29	0,52	0,03	0,30	0,04	0,12	0,32
Efluente Sistema A	8	Média	6,3	5,1	125	545	0,6	6,8	4,7	142	349	0,0
		Mín.	5,3	4,4	94	400	0,0	6,6	4,3	132	284	0,0
		Máx.	7,2	5,9	151	670	2,6	7,0	5,3	155	423	0,0
		DP	0,7	0,6	18	75	1,0	0,1	0,4	9	57	0,0
		CV	0,10	0,10	0,10	0,14	1,56	0,02	0,08	0,06	0,16	0,00
		E%	—	—	—	19,20%	98,30%	—	—	—	33,70%	99,60%
Afluente Sistema B	8	Média	7,5	4,4	124	543	19,8	7,8	4,4	126	292	0,3
		Mín.	7,4	3,5	86	321	7,5	7,4	3,7	111	169	0,1
		Máx.	7,8	5,8	169	941	57,3	8,3	4,9	180	359	0,9
		DP	0,2	0,9	32	195	17	0,3	0,4	23	60	0,3
		CV	0,02	0,20	0,26	0,36	0,86	0,04	0,10	0,18	0,21	1,00
Efluente Sistema B	8	Média	6,3	6,2	109	474	0,1	7,1	5,1	118	89	0,0
		Mín.	5,9	5,8	89	303	0,0	6,8	4,5	92	76	0,0
		Máx.	6,6	6,7	136	703	0,3	7,3	5,3	184	108	0,0
		DP	0,3	0,3	18	136	0,1	0,2	0,3	29	10	0,0
		CV	0,05	0,06	0,17	0,29	1,37	0,02	0,06	0,24	0,11	0,00
		E%	—	—	—	12,70%	99,60%	—	—	—	69,60%	92,60%

Fonte: Autoria própria (2026).

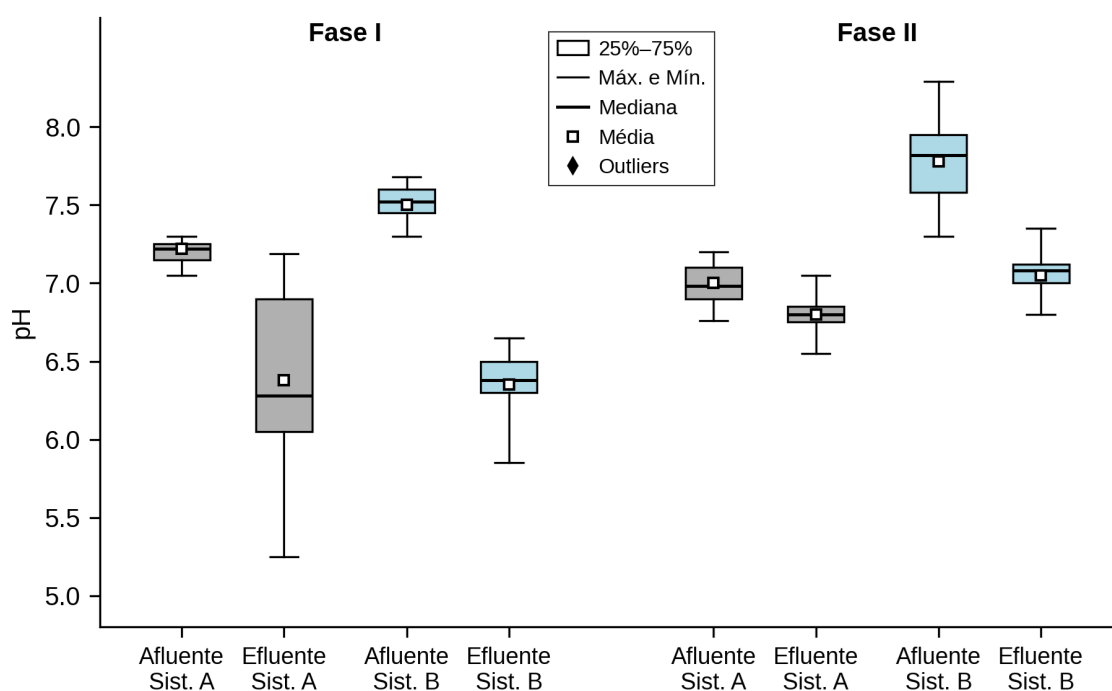
Nota: Sistema A = *wetland* com lacase imobilizada; Sistema B = *wetland* controle (sem lacase). Fase I = operação sem corante; Fase II = operação com azul de indigotina a 25 mg L⁻¹.

5.6.2.1 pH

Na Figura 31 é apresentada a variação dos valores de pH nas amostras do afluente e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II, com e sem o corante azul de indigotina ($n = 32$).

O pH das amostras do afluente variou de 7,05 a 7,82 durante a operação, faixa que segundo Cooper *et al.* (1996), IWA (2000) e Kadlec e Wallace (2009) é favorável para amonificação (6,5–8,5), nitrificação (7,5–8,6) e desnitrificação (6,5–7,5). Após o ciclo de 48 h, o pH das amostras dos efluentes reduziu para 5,25 a 7,19 no Sistema A e de 5,85 a 6,65 no Sistema B na Fase I. Este comportamento pode ser atribuído à produção de íons H^+ pela nitrificação e à liberação de CO_2 durante a mineralização da matéria orgânica (Dotro *et al.*, 2017; Vymazal, 2007). Vale destacar que os valores do pH se mantiveram na faixa de 5,0 a 9,0 estabelecida na Resolução CONAMA nº 430/2011 para lançamento de efluentes (Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), 2002).

Figura 31 – Variação dos valores de pH nas amostras do afluente e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II



Fonte: Autoria própria (2025).

Nota: Sistemas - A = *wetland* com lacase livre (500 U L⁻¹); B = *wetland* controle (sem lacase). Fase I = sem adição de corante; Fase II = com adição de azul de indigotina (25 mg L⁻¹)

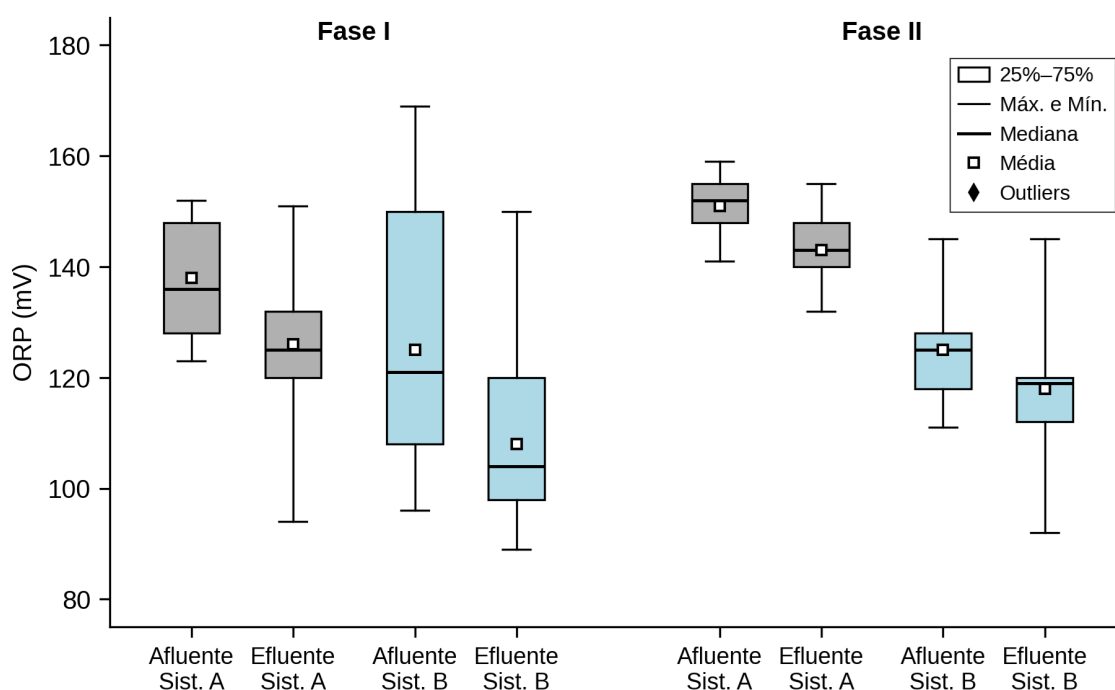
Na Fase I, a presença da lacase não alterou o pH das amostras dos efluentes dos sistemas, que não diferiram entre si (p -valor = 0,7128). Na Fase II, com a adição do corante, o pH do afluente variou de 6,76 a 8,29 considerando os dois sistemas. Nas amostras dos efluentes, foi observada diferença significativa entre os sistemas (p -valor = 0,0018), rejeitando-se H_0 ; a lacase interferiu no pH do efluente na presença do corante, provavelmente pela geração de ácidos intermediários durante a degradação enzimática no Sistema A.

No Sistema A com lacase, o pH das amostras do efluente manteve-se estável nas Fases I e II e sem diferença significativa (p -valor = 0,0697). No Sistema B sem lacase, foi verificado aumento do pH nas amostras do efluente na Fase II e diferença significativa (p -valor = 0,0010), sugerindo que a variação no pH das amostras do Sistema B está ligada à composição da água do córrego nessa fase e não ao efeito do corante no pH.

5.6.2.2 Potencial de Oxirredução

Na Figura 32 é apresentada a variação dos valores do potencial de óxido-redução (POR) nas amostras do afluente e dos efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II ($n = 32$).

Figura 32 – Variação do POR nas amostras do afluente e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II



Fonte: Autoria própria (2025).

Nota: Sistema A = *wetland* com lacase livre (500 U L⁻¹); Sistema B = *wetland* controle (sem lacase). Fase I = sem adição do azul de indigotina; Fase II = adição de azul de indigotina a 25 mg L⁻¹

Nas amostras do afluente na Fase I, os valores do POR variaram de +123 a +162 mV no Sistema A e de +86 a +169 mV no Sistema B. Após o tempo de contato de 48 h, os valores do POR nas amostras dos efluentes variaram de +94 a +151 mV no Sistema A e de +89 a +136 mV no Sistema B. Nesta fase, a adição da lacase livre não interferiu no POR, pois não foram observadas diferenças significativas entre as amostras dos efluentes dos sistemas (p -valor = 0,0952). Estes valores, associados às concentrações do OD observadas, sugerem ambientes predominantemente aeróbios nos sistemas segundo Matos *et al.* (2010) e Dotro *et al.* (2017), condição favorável à atividade catalítica da lacase.

Com a adição do corante na Fase II, os valores do POR nas amostras do afluente variaram de +141 a +159 mV no Sistema A e de +111 a +180 mV no Sistema B. Nas amostras dos efluentes, os valores do POR variaram de +132 a +155 mV no Sistema A e de +92 a +184 mV no Sistema B. Nesta fase, foi observada diferença significativa entre as amostras dos efluentes dos sistemas (p -valor = 0,0115), ou seja, a lacase interferiu no POR na presença do corante, com o Sistema A em condições mais oxidantes durante a degradação enzimática do azul de indigotina.

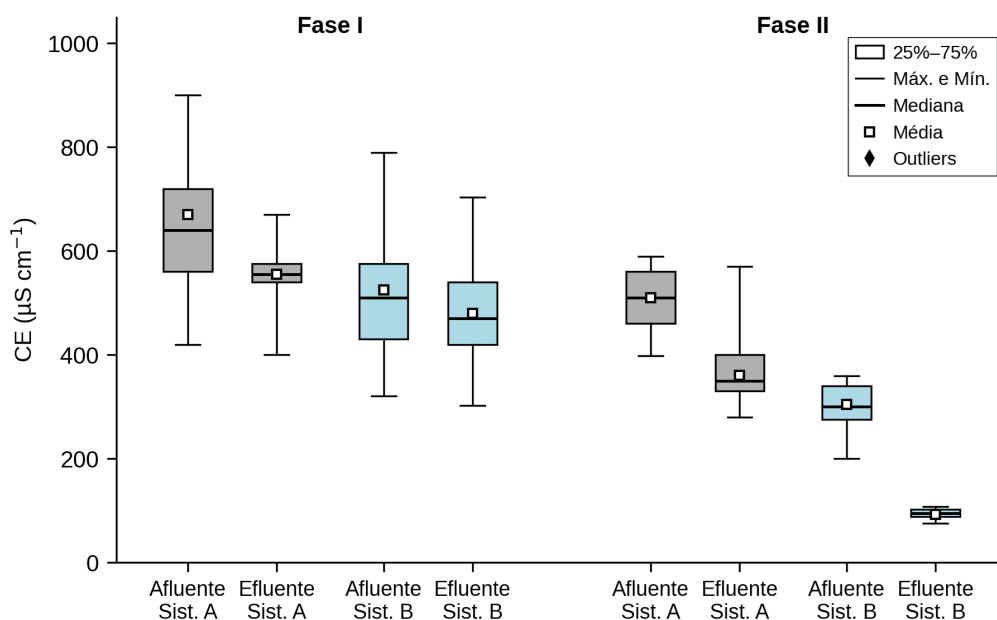
Porém na comparação entre as Fases I e II, a adição do corante não alterou as condições oxidantes do Sistema A (p -valor = 0,0605) e nem do Sistema B (p -valor = 0,4313).

Com base nos resultados apresentados, é possível considerar que os sistemas se mantiveram predominantemente sob condições aeróbias mesmo com a atividade enzimática e com a adição do azul de indigotina, pois valores superiores a +100 mV indicam ambientes aeróbios e entre -100 mV e +100 mV indicam ambientes anóxicos de acordo com Matos *et al.* (2010).

5.6.2.3 Condutividade Elétrica

Na Figura 33 é apresentada a variação dos valores da CE nas amostras do afluente e dos efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II ($n = 32$).

Figura 33 – Variação da CE nas amostras do afluente e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II



Fonte: Autoria própria (2025).

Nota: Sistema A = *wetland* com lacase livre (500 U L⁻¹); Sistema B = *wetland* controle (sem lacase). Fase I = sem adição de corante; Fase II = com azul de indigotina a 25 mg L⁻¹.

Nas amostras do afluente na Fase I, a CE variou de 420 e 1069 $\mu\text{S cm}^{-1}$ no Sistema A e de 321 a 941 $\mu\text{S cm}^{-1}$ no Sistema B. Os picos nos valores da CE registrados provavelmente refletem período de estiagem no córrego, com menor volume de água e maior concentração de

sólidos. Os valores mais elevados da CE nas amostras do afluente no Sistema A em relação ao Sistema B são atribuídos à carga iônica do extrato enzimático incorporado ao afluente.

Nas amostras dos efluentes, a CE variou de 400 a 670 $\mu\text{S cm}^{-1}$ no Sistema A e de 302 a 703 $\mu\text{S cm}^{-1}$ no Sistema B, sem diferença significativa entre as amostras, ou seja, a lacase livre não interferiu na CE na Fase I. A redução da CE nas amostras dos efluentes em relação às amostras do afluente pode ser atribuída à absorção pelas macrófitas e à adsorção no material filtrante à base de cerâmica (Sandoval *et al.*, 2019).

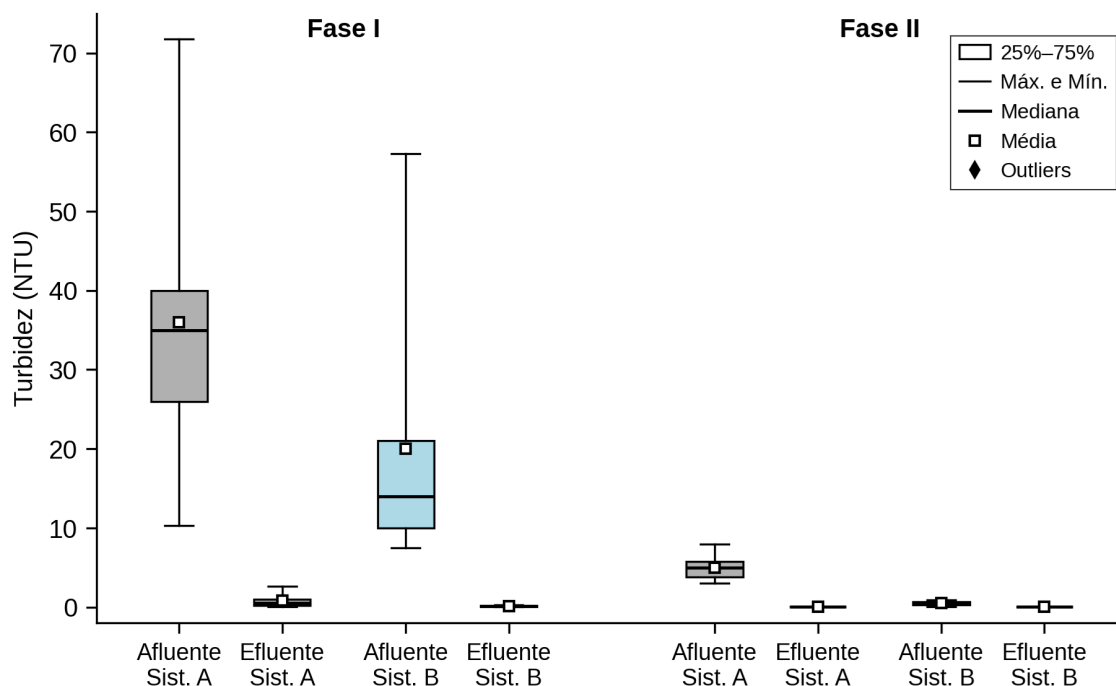
Na Fase II, a CE das amostras dos afluentes apresentou variação de 398 a 590 $\mu\text{S cm}^{-1}$ no Sistema A e de 168 a 359 $\mu\text{S cm}^{-1}$ no Sistema B. Nas amostras dos efluentes do Sistema B, os valores da CE variaram na faixa de 75 a 108 $\mu\text{S cm}^{-1}$ durante a operação independentemente da CE no afluente, sugerindo retenção iônica e adsorção do grupo sulfonato do corante no material filtrante e nas raízes da *Eichhornia crassipes* (Cabral *et al.*, 2021). A CE nas amostras dos efluentes diferiu significativamente entre os sistemas A e B (p -valor = 0,0008), indicando que a lacase interferiu neste parâmetro nestas amostras. Porém, é importante destacar que parte dessa diferença pode estar relacionada ao afluente mais diluído do Sistema B e não somente ao desempenho superior deste sistema controle.

A comparação entre as fases revelou redução significativa da CE nos sistemas, indicando que a adição do corante alterou a CE das amostras do efluente em ambos os sistemas (Sistema A, $p = 0,0248$ e Sistema B, p -valor < 0,0001), combinando a menor CE do afluente e a adaptação do sistema nesta fase com maior tempo de operação comparada à Fase I.

5.6.2.4 Turbidez

Na Figura 34 é apresentada a variação da turbidez nas amostras do afluente e dos efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II ($n = 32$).

Figura 34 – Variação da Turbidez nas amostras do afluente e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II



Fonte: Autoria própria (2025).

Nota: Sistema A = *wetland* com lacase livre (500 U L⁻¹); Sistema B = *wetland* controle (sem lacase). Fase I = sem adição de corante; Fase II = com azul de indigotina a 25 mg L⁻¹.

Na Fase I, a turbidez das amostras do afluente do Sistema A variou de 10,30 a 71,80 UNT e de 7,46 a 57,30 UNT no Sistema B. Nas amostras dos efluentes, a turbidez diminuiu para 0,02 a 2,63 UNT no Sistema A e de 0,02 a 0,27 UNT no Sistema B, correspondendo às eficiências de remoção de 96,1% e 99,3%, respectivamente. A remoção pode ser atribuída à capacidade filtrante do material cerâmico e à ação das raízes da *Eichhornia crassipes* (Kadlec; Wallace, 2009; Dotro *et al.*, 2017). Não foi verificada diferença significativa entre as amostras dos efluentes dos sistemas (p -valor = 0,7926), sugerindo que a lacase livre não interferiu neste parâmetro nesta fase.

Na Fase II, a turbidez das amostras do afluente foi menor do que na Fase I com variação de 3,00 a 7,92 UNT no Sistema A e de 0,08 a 0,90 UNT no Sistema B e de 0,02 UNT nas amostras dos efluentes, atingindo o limite mínimo de detecção de leitura do turbidímetro. A diferença significativa da turbidez entre as amostras dos efluentes dos sistemas (p -valor = 0,0008) e a menor eficiência de remoção alcançada pelo Sistema B (87,0%) em relação ao Sistema A (99,6%) podem estar relacionadas aos baixos valores da turbidez nas amostras do afluente nesta fase.

Na comparação entre as fases foi observada maior estabilidade do Sistema A (p -valor = 0,2976) em relação ao Sistema B, ou seja, a adição do corante não alterou a eficiência de remoção da turbidez nesse sistema. Na comparação do comportamento do Sistema B foi verificada diferença significativa entre as fases (p -valor = 0,0033).

5.6.3 Parâmetros de caracterização dos afluentes

Os parâmetros químicos refletem diretamente a composição dos afluentes de cada sistema. O afluente do Sistema A, além da água do córrego, recebeu a cada ciclo o extrato bruto de lacase contendo matéria orgânica residual do meio, ácidos do tampão acetato e fósforo proveniente dos resíduos agroindustriais utilizados como substrato de cultivo, o que explica as diferenças sistemáticas observadas nas concentrações afluentes de Alcalinidade Total, DQO, NTK, N-Amóniacal e Fósforo Total entre os dois sistemas. O afluente do Sistema B correspondia exclusivamente à água do Ribeirão dos Müller, sem nenhuma adição, esse desequilíbrio entre afluentes impede a comparação direta dos valores absolutos dos efluentes, razão pela qual a análise se baseia nas eficiências de remoção calculadas em relação ao afluente do próprio sistema. Os resultados dos parâmetros químicos monitorados nas Fases I e II estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Resultados em função da média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimos (Mín.) e máximos (Máx.) e eficiências de remoção (E%) para os parâmetros químicos monitorados no afluente e efluente dos Sistemas A e B ao longo das Fases I e II (n = 32)

Amostra	n	Estatística	Fase I — Ciclo 48 h (sem azul de indigotina)								Fase II — Ciclo 48 h (com azul de indigotina)							
			DQO	AT	NTK	N-Amon	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NT	PT	DQO	AT	NTK	N-Amon	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NT	PT
Afluente Sistema A	8	Média	356	102,3	45,3	32,6	0,1	9,3	54,5	13,2	354	37,7	33,3	14,1	0,1	8,9	42,3	15,7
		Mín.	258	49,0	33,1	16,0	0,1	8,7	43,0	11,8	325	31,2	31,9	12,4	0,1	7,6	40,7	15,1
		Máx.	446	155,6	64,5	68,9	0,1	9,8	73,4	14,9	417	43,2	37,3	16,4	0,1	9,7	46,6	16,5
		DP	61	38,3	10,2	17,3	0,0	0,5	9,2	1,0	31	4,6	1,9	1,6	0,0	0,7	1,8	0,5
		CV	0,17	0,37	0,23	0,53	0,30	0,05	0,17	0,08	0,09	0,12	0,06	0,11	0,28	0,08	0,04	0,03
Efluente Sistema A	8	Média	28	4,6	5,8	1,3	0,0	5,5	11,3	6,6	17	5,0	6,4	2,2	0,0	2,5	9,0	10,0
		Mín.	12	2,7	3,8	0,2	0,0	4,1	9,3	4,4	2	3,6	5,9	2,0	0,0	1,4	8,4	7,7
		Máx.	50	8,9	9,5	1,8	0,0	7,6	13,9	8,4	45	6,2	7,0	2,4	0,0	4,0	10,1	11,1
		DP	11	2,7	1,7	0,6	0,0	1,1	1,3	1,3	17	0,9	0,5	0,2	0,0	1,1	0,7	1,1
		CV	0,40	0,59	0,30	0,43	0,79	0,21	0,12	0,22	1,01	0,17	0,07	0,08	0,22	0,42	0,07	0,11
		E%	91,8%	—	87,4%	95,2%	93,8%	40,4%	79,0%	50,0%	95,4%	—	80,9%	84,5%	97,6%	70,8%	78,6%	36,4%
Afluente Sistema B	8	Média	94	101,6	40,3	29,1	0,1	0,4	40,8	7,0	36	36,1	15,6	11,2	0,1	0,4	16,1	1,8
		Mín.	38	44,6	22,9	12,8	0,1	0,2	23,4	6,0	26	27,6	13,9	9,7	0,1	0,3	14,7	0,6
		Máx.	219	176,5	69,0	53,1	0,1	0,7	69,4	9,5	55	41,9	17,0	13,0	0,1	0,7	17,4	2,9
		DP	60	44,1	15,1	12,6	0,0	0,2	14,1	1,3	11	4,5	1,1	1,4	0,0	0,1	0,9	0,9
		CV	0,64	0,43	0,38	0,43	0,51	0,51	0,34	0,18	0,29	0,12	0,07	0,13	0,36	0,33	0,06	0,5
Efluente Sistema B	8	Média	12	2,6	4,1	1,5	0,0	6,4	10,5	0,3	8	6,1	6,4	2,2	0,0	0,2	6,6	0,4
		Mín.	5	2,2	0,0	1,1	0,0	4,4	8,4	0,1	2	4,9	6,0	2,0	0,0	0,2	6,2	0,2
		Máx.	30	2,7	5,0	1,7	0,0	8,7	13,7	0,6	14	7,1	7,1	2,4	0,0	0,2	7,3	0,6
		DP	8	0,2	1,7	0,2	0,0	1,9	1,7	0,2	4	0,8	0,46	0,2	0,0	0,0	0,4	0,1
		CV	0,68	0,08	0,41	0,16	0,84	0,29	0,16	0,61	0,53	0,13	0,07	0,08	0,55	0	0,06	0,36
		E%	85,3%	—	88,8%	94,1%	96,5%	Nit.	71,7%	95,1%	77,2%	—	59,2%	80,6%	98,5%	48,9%	59,0%	67,2%

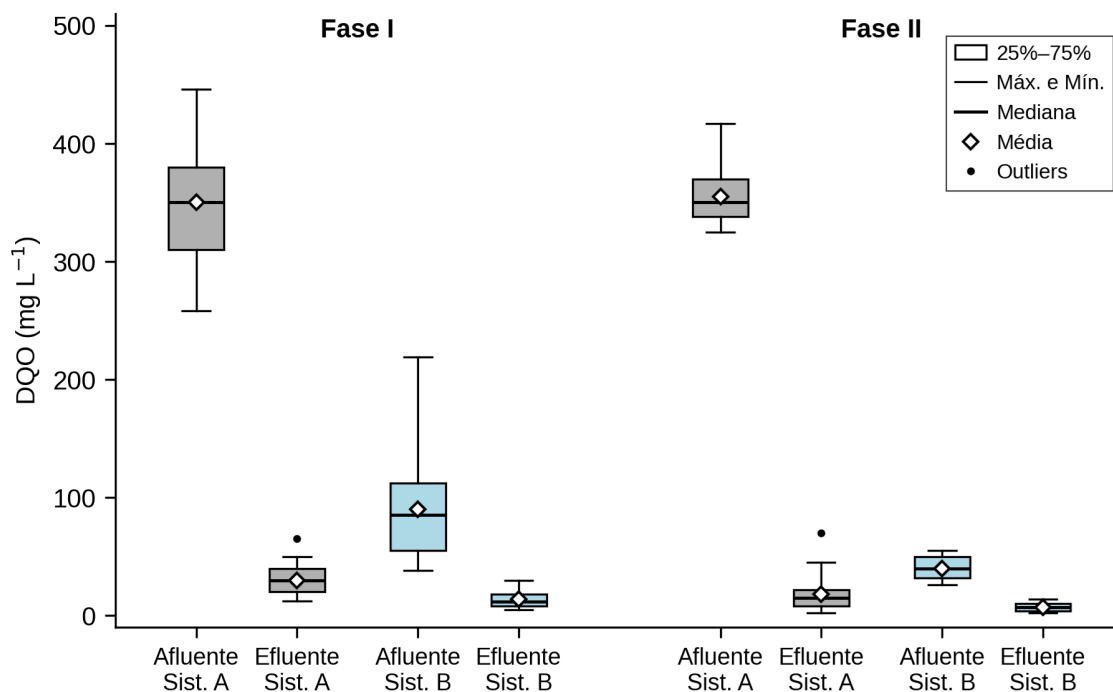
Fonte: Autoria própria (2026).

Nota: n - número de campanhas; DP - desvio padrão; CV - coeficiente de variação (adimensional); Mín. - valor mínimo; Máx. - valor máximo; E% - eficiência de remoção calculada em relação ao afluente do respectivo sistema; (—) - parâmetro sem eficiência esperada de remoção ou comparação não realizada; **Nit.** - nitrificação (produção de nitrato no efluente); AT - alcalinidade total (mg CaCO₃ L⁻¹); DQO - demanda química de oxigênio (mg L⁻¹); NTK - nitrogênio total Kjeldahl (mg L⁻¹); N-Amon - nitrogênio amoniacal (mg L⁻¹); NO₂⁻ - nitrito (mg L⁻¹); NO₃⁻ - nitrato (mg L⁻¹); NT - nitrogênio total (mg L⁻¹); PT - fósforo total (mg L⁻¹). Sistema A = *wetland* com lacase livre (500 U L⁻¹); Sistema B = *wetland* controle (sem lacase). Fase I = operação sem corante; Fase II = operação com azul de indigotina a 25 mg L⁻¹.

5.6.3.1 Demanda Química de Oxigênio

Na Figura 35 é apresentada a variação das concentrações de matéria orgânica em termos de DQO e as respectivas eficiências de remoção nos Sistemas A e B nas Fases I e II (n = 32).

Figura 35 – Variação da DQO nas amostras dos afluentes e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II



Fonte: Autoria própria (2025).

Nas amostras do afluente na Fase I, a DQO variou de 257,87 a 445,78 mg L⁻¹ no Sistema A e de 37,66 a 218,84 mg L⁻¹ no Sistema B (Tabela 11). Os valores mais elevados da DQO nas amostras do afluente no Sistema A são atribuídos à presença de compostos orgânicos solúveis residuais da fermentação da lacase, incorporados ao sistema. Nas amostras dos efluentes, a DQO variou de 12,48 a 50,23 mg L⁻¹ no Sistema A e de 4,83 a 29,86 mg L⁻¹ no Sistema B, correspondendo às eficiências de remoção de 91,8% e 85,3%. Nesta fase, foi observada diferença significativa da DQO entre as amostras dos efluentes dos sistemas (p-valor = 0,0116), ou seja, a lacase interferiu neste parâmetro. Porém, parte dessa diferença pode estar relacionada à maior concentração de carbono pela adição da lacase no afluente do Sistema A e não à menor capacidade de tratamento deste sistema.

Com a adição do corante na Fase II, a DQO nas amostras dos afluentes variou de 325,11 a 417,12 mg L⁻¹ no Sistema A e de 25,51 a 54,62 mg L⁻¹ no Sistema B. Nas amostras dos efluentes, a DQO variou de 2,27 a 44,83 mg L⁻¹ no Sistema A e de 2,28 a 13,84 mg L⁻¹ no Sistema B, correspondendo às eficiências de remoção de 95,4% e 77,2%, respectivamente. A menor eficiência alcançada pelo Sistema B pode estar relacionada às menores concentrações de DQO no afluente (25,51 a 54,62 mg L⁻¹). Nesta fase, a lacase livre não interferiu na DQO, pois

não foi verificada diferença significativa entre as amostras dos efluentes dos sistemas (p-valor = 0,9487).

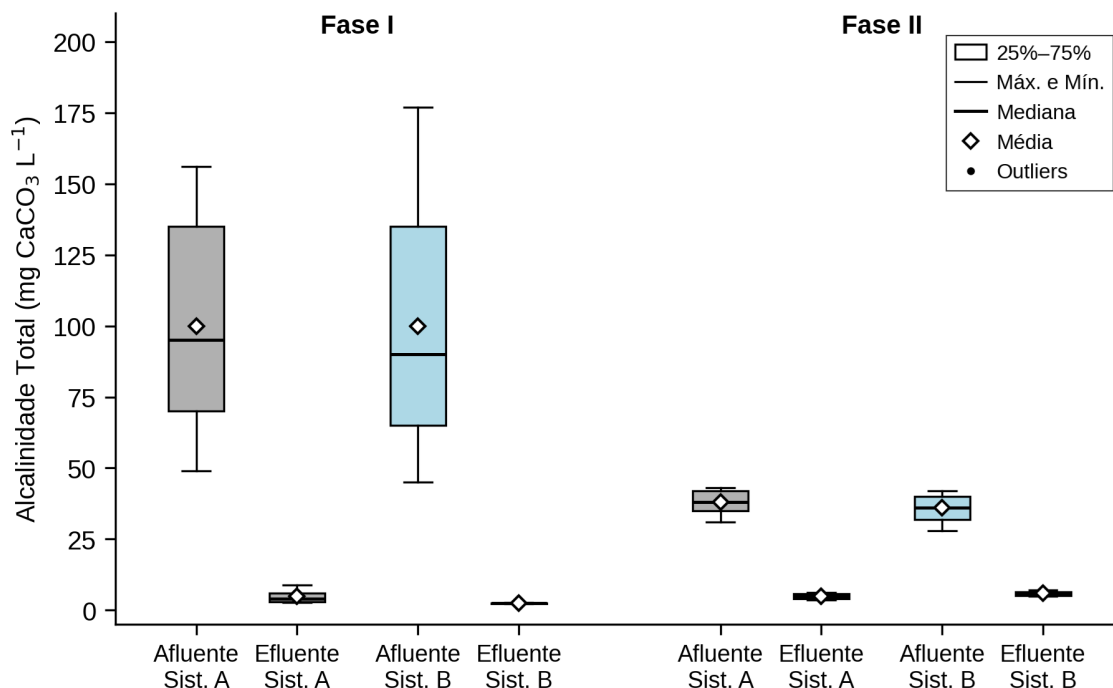
Na comparação entre as Fases I e II, a adição do corante azul de indigotina não alterou a remoção da DQO no Sistema A (p-valor = 0,2162) nem no Sistema B (p-valor = 0,1120). Com base nos resultados apresentados, é possível considerar que a remoção da DQO nos sistemas pode ser atribuída predominantemente à degradação aeróbia promovida pela atividade microbiana no biofilme aderido ao material filtrante à base de cerâmica, favorecida pela aeração contínua durante os ciclos de 48 h (Vymazal, 2010; Dotro *et al.*, 2017).

Silva (2023) obteve eficiências de remoção de DQO de 71% e 65% em WCFV (12 L) vegetado com *E. crassipes* em fragmentos de cerâmica vermelha, sem aeração, em ciclos de 24 e 48 h, tratando efluente sintético com DQO inicial de 155 e 149 mg L⁻¹ nas respectivas etapas. Lima et al. (2018) verificaram eficiência de remoção de 73% da DQO em WCFV (12 L) vegetado com *E. crassipes* em fragmentos de cerâmica vermelha, sem aeração, em ciclos de 48 h, tratando DQO inicial de 203 mg L⁻¹. Donato et al. (2025) verificaram eficiências de remoção de 91% e 82% em WCFV (56 L) vegetados com *E. crassipes* em concreto aerado autoclavado, operados com aeração intermitente de 2,4 e 1,4 L O₂ min⁻¹ em ciclos de 48 h, tratando efluente sintético com DQO inicial de 194 mg L⁻¹. Com base nos resultados deste estudo e na comparação com os referidos autores, é possível atribuir as maiores eficiências de remoção da DQO ao efeito da aeração contínua.

5.6.3.2 Alcalinidade Total

Na Figura 36 é apresentada a variação da alcalinidade total nas amostras dos afluentes e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II (n = 32).

Figura 36 – Variação dos valores de Alcalinidade Total nas amostras do afluente e efluente dos Sistemas A e B nas Fases I e II



Fonte: Autoria própria (2025).

Nota: Sistema A = *wetland* com lacase livre (500 U L⁻¹); Sistema B = *wetland* controle (sem lacase). Fase I = sem adição de corante; Fase II = com azul de indigotina a 25 mg L⁻¹.

Nas amostras do afluente na Fase I, a alcalinidade total variou de 49,03 a 155,56 mg CaCO₃ L⁻¹ no Sistema A e de 44,57 a 176,51 mg CaCO₃ L⁻¹ no Sistema B (Tabela 11). Nas amostras dos efluentes, a alcalinidade total variou de 2,67 a 8,91 mg CaCO₃ L⁻¹ no Sistema A e de 2,23 a 2,67 mg CaCO₃ L⁻¹ no Sistema B.

O consumo da alcalinidade total das amostras do afluente pode ser atribuído à ocorrência da nitrificação, no qual são consumidos 7,14 g de CaCO₃ por grama de N-NH₄⁺ oxidado (Kadlec; Wallace, 2009). Além deste processo, pode ter ocorrido mineralização aeróbia da matéria orgânica (Dotro *et al.*, 2017). Foi observada diferença significativa da alcalinidade total entre as amostras dos efluentes dos sistemas (*p*-valor = 0,0298), indicando que a lacase interferiu neste parâmetro nesta fase.

Com a adição do corante na Fase II, a alcalinidade total nas amostras do afluente variou de 31,20 a 43,24 mg CaCO₃ L⁻¹ no Sistema A e de 27,64 a 41,90 mg CaCO₃ L⁻¹ no Sistema B, ou seja, valores inferiores aos obtidos na Fase I. Foi verificado consumo da alcalinidade total nesta fase, com valores nas amostras dos efluentes de 3,57 a 6,24 mg CaCO₃ L⁻¹ no Sistema A e de 4,90 a 7,13 mg CaCO₃ L⁻¹ no Sistema B. A lacase interferiu na alcalinidade total nesta fase, pois foi verificada diferença significativa entre as amostras dos efluentes dos sistemas (*p*-valor = 0,0199).

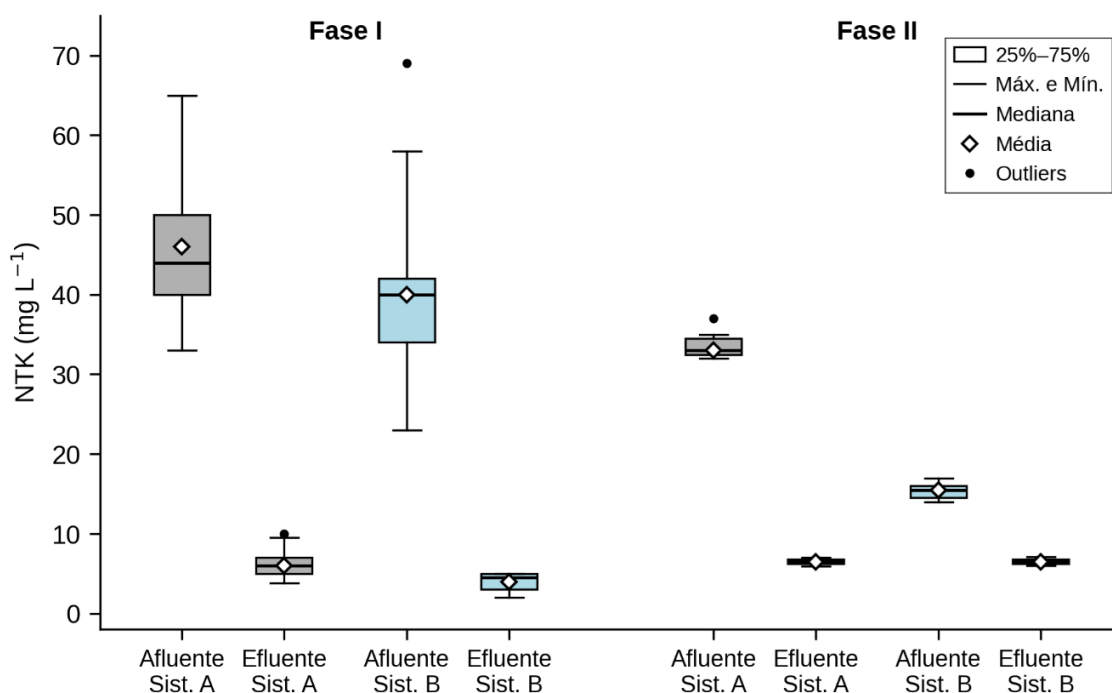
Na comparação entre as Fases I e II, a adição do corante não alterou o consumo da alcalinidade total no Sistema A (*p*-valor = 0,7240). Porém, no Sistema B foi verificada diferença significativa entre as fases (*p*-valor = 0,0117), com AT levemente mais elevada nas amostras

dos efluentes nesta fase, o que pode estar relacionado à menor disponibilidade de alcalinidade no afluente nesta etapa.

5.6.3.3 Série Nitrogenada

Na Figura 37 é apresentada a variação da concentração do NTK nas amostras dos afluentes e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II ($n = 32$).

Figura 37 – Variação da concentração do NTK nas amostras dos afluentes e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II



Fonte: Autoria própria (2025).

Nota: Sistema A = *wetland* com lacase livre (500 U L^{-1}); Sistema B = *wetland* controle (sem lacase). Fase I = sem adição de corante; Fase II = com azul de indigotina a 25 mg L^{-1} .

Nas amostras dos afluentes na Fase I, a concentração do NTK variou de $33,08$ a $64,54 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema A e de $22,92$ a $69,02 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema B (Tabela 11). Nas amostras dos efluentes, a concentração do NTK variou de $3,80$ a $9,50 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema A e de $0,02$ a $5,04 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema B, correspondendo às eficiências de remoção de $87,4\%$ e $88,8\%$, respectivamente. A remoção do NTK pode ser atribuída à atuação integrada da amonificação, nitrificação e absorção pelas macrófitas no tempo de contato de 48 h (Vymazal, 2007; Dotro *et al.*, 2017). Nesta fase, a lacase livre não interferiu na remoção do NTK, pois não foi verificada diferença significativa entre as amostras dos efluentes dos sistemas ($p\text{-valor} = 0,8335$).

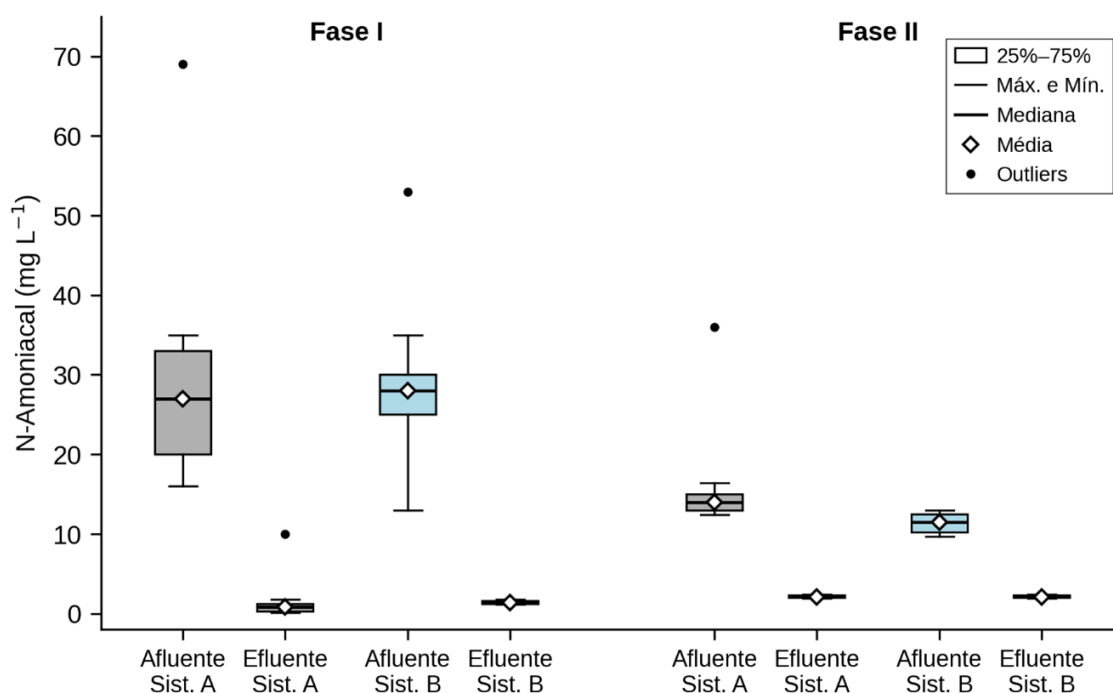
Lima *et al.* (2018) verificaram 47% de eficiência de remoção do NTK em WCFV (12 L) vegetado com *E. crassipes* em fragmentos de cerâmica vermelha, sem aeração, em ciclos de 48 h , tratando NTK inicial de 69 mg L^{-1} . Silva (2023) obteve 33% de eficiência de remoção do NTK em WCFV (12 L) vegetado com *E. crassipes* em fragmentos de cerâmica vermelha, sem

aeração, em ciclos de 48 h, tratando NTK inicial de $29,3 \text{ mg L}^{-1}$. As eficiências de remoção do NTK obtidas neste estudo foram superiores aos valores reportados pelos referidos autores, o que pode estar relacionado ao efeito da aeração contínua no desempenho dos sistemas.

Com a adição do corante na Fase II, a concentração do NTK nas amostras do afluente variou de $31,88$ a $37,34 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema A e de $13,88$ a $17,04 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema B. Nas amostras dos efluentes, a concentração do NTK variou de $5,86$ a $7,02 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema A e de $5,96$ a $7,12 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema B, correspondendo às eficiências de remoção de $80,9\%$ e $59,2\%$, respectivamente. Nesta fase, foi verificada diferença significativa entre as amostras dos efluentes dos sistemas ($p\text{-valor} = 0,0017$), ou seja, a lacase interferiu neste parâmetro. Porém, as concentrações nas amostras dos efluentes foram similares nos sistemas, de modo que a diferença nas eficiências pode estar relacionada às baixas concentrações do NTK no afluente do Sistema B nesta etapa e não ao desempenho distinto entre os sistemas. Na comparação entre as Fases I e II, a adição do corante azul de indigotina influenciou na remoção do NTK no Sistema A ($p\text{-valor} < 0,0001$) e no Sistema B ($p\text{-valor} < 0,0001$).

Na Figura 38 é apresentada a variação da concentração do N-Amon nas amostras dos afluentes e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II ($n = 32$).

Figura 38 – Variação da concentração do N-Amon nas amostras dos afluentes e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II



Fonte: Autoria própria (2025).

Nota: Sistema A = *wetland* com lacase livre (500 U L^{-1}); Sistema B = *wetland* controle (sem lacase). Fase I = sem adição de corante; Fase II = com azul de indigotina a 25 mg L^{-1} .

Nas amostras do afluente na Fase I, a concentração do N-Amon variou de $15,96$ a $68,94 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema A e de $12,84$ a $53,08 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema B (Tabela 11). Nas amostras dos efluentes, a concentração do N-Amon variou de $0,15$ a $1,80 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema A e de $1,14$ a $1,74$

mg L⁻¹ no Sistema B, correspondendo às eficiências de remoção de 95,2% e 94,1%, respectivamente. Nesta fase, a lacase livre não interferiu na remoção do N-Amon, pois não foi verificada diferença significativa entre as amostras dos efluentes dos sistemas (p -valor = 0,5553). A aeração contínua manteve concentrações de OD suficientes para promover a nitrificação durante o tempo de contato de 48 h, mesmo com aplicação de maiores concentrações (Nivala; Murphy; Freeman, 2020; Murphy *et al.*, 2016).

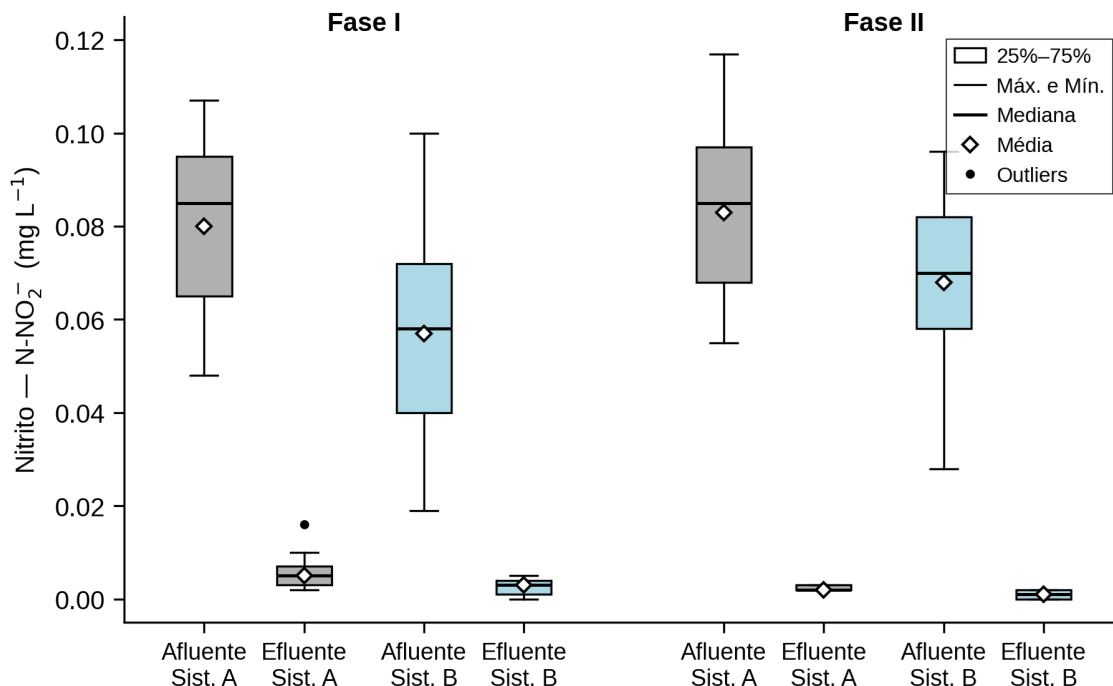
Lima *et al.* (2018) verificaram 13% de eficiência de remoção do N-Amon em WCFV (12 L) vegetado com *E. crassipes* em fragmentos de cerâmica vermelha, sem aeração, em ciclos de 48 h, tratando N-Amon inicial de 40 mg L⁻¹. Donato *et al.* (2025) verificaram eficiências de remoção de 74% e 66% do N-Amon em WCFV (56 L) vegetados com *E. crassipes* em concreto aerado autoclavado, operados com aeração intermitente de 2,4 e 1,4 L O₂ min⁻¹ em ciclos de 48 h, tratando N-Amon inicial de 14 mg L⁻¹.

Com a adição do corante na Fase II, a concentração do N-Amon nas amostras do afluente variou de 12,36 a 16,38 mg L⁻¹ no Sistema A e de 9,66 a 13,00 mg L⁻¹ no Sistema B. Nas amostras dos efluentes, a concentração do N-Amon variou de 1,96 a 2,38 mg L⁻¹ no Sistema A e de 1,96 a 2,38 mg L⁻¹ no Sistema B, correspondendo às eficiências de remoção de 84,5% e 80,6%, respectivamente. Nesta fase, foi verificada diferença significativa entre as amostras dos efluentes dos sistemas (p -valor < 0,0001), ou seja, a lacase interferiu neste parâmetro. Porém, conforme observado no NTK, as concentrações nas amostras dos efluentes foram similares nos sistemas. A redução nas eficiências em relação à Fase I pode estar associada à competição por OD entre microrganismos heterotróficos degradadores do corante e bactérias nitrificantes (Fan *et al.*, 2021). Ong *et al.* (2010) observaram redução na nitrificação em *wetland* vertical tratando efluente com corante azo. O fato da redução ter ocorrido nos dois sistemas sugere que o mecanismo está ligado à presença do corante e não à presença da lacase.

Na comparação entre as Fases I e II, a adição do corante azul de indigotina influenciou na remoção do N-Amon no Sistema A (p -valor < 0,0001) e no Sistema B (p -valor < 0,0001).

Na Figura 39 é apresentada a variação da concentração do nitrito nas amostras dos afluentes e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II (n = 32).

Figura 39 – Variação da concentração do Nitrito nas amostras dos afluentes e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II



Fonte: Autoria própria (2025).

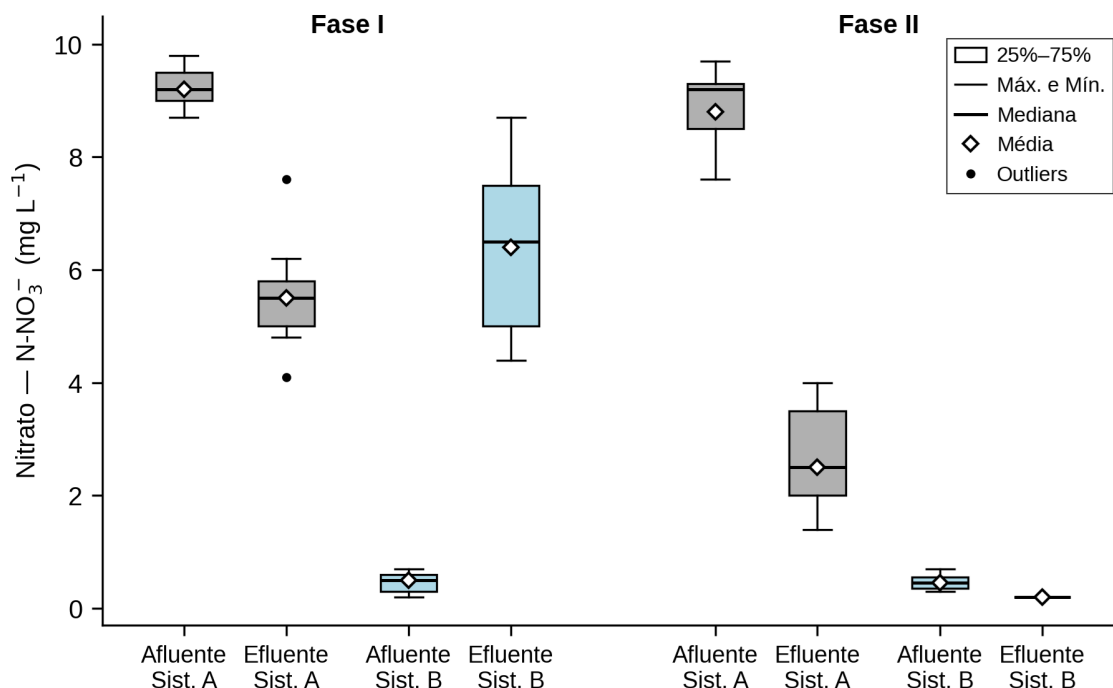
Nota: Sistema A = *wetland* com lacase livre (500 U L⁻¹); Sistema B = *wetland* controle (sem lacase). Fase I = sem adição de corante; Fase II = com azul de indigotina a 25 mg L⁻¹.

Nas amostras do afluente na Fase I, a concentração do nitrito variou de 0,048 a 0,107 mg L⁻¹ no Sistema A e de 0,019 a 0,100 mg L⁻¹ no Sistema B (Tabela 11). Nas amostras dos efluentes, a concentração do nitrito variou de 0,002 a 0,014 mg L⁻¹ no Sistema A e de 0,000 a 0,005 mg L⁻¹ no Sistema B, correspondendo às eficiências de remoção de 93,8% e 96,5%, respectivamente. A redução das concentrações do nitrito nas amostras dos efluentes indica que a aeração contínua contribuiu para a nitrificação durante a operação. A lacase livre não interferiu na remoção do nitrito nesta fase (p -valor = 0,3439).

Com a adição do corante na Fase II, a concentração do nitrito nas amostras do afluente variou de 0,055 a 0,117 mg L⁻¹ no Sistema A e de 0,028 a 0,096 mg L⁻¹ no Sistema B. Nas amostras dos efluentes, a concentração do nitrito variou de 0,002 a 0,003 mg L⁻¹ no Sistema A e de 0,000 a 0,002 mg L⁻¹ no Sistema B, correspondendo às eficiências de remoção de 97,6% e 98,5%, respectivamente. Nesta fase, a lacase livre não interferiu na remoção do nitrito (p -valor = 0,5653). A adição do corante também não influenciou neste parâmetro no Sistema A (p -valor = 0,1158) e nem no Sistema B (p -valor = 0,2767).

Na Figura 40 é apresentada a variação da concentração do nitrato nas amostras dos afluentes e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II ($n = 32$).

Figura 40 – Variação da concentração do Nitrato nas amostras dos afluentes e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II



Fonte: Autoria própria (2025).

Nota: Sistema A = *wetland* com lacase livre (500 U L⁻¹); Sistema B = *wetland* controle (sem lacase). Fase I = sem adição de corante; Fase II = com azul de indigotina a 25 mg L⁻¹.

Nas amostras dos afluentes na Fase I, a concentração do nitrato variou de 8,70 a 9,80 mg L⁻¹ no Sistema A e de 0,20 a 0,70 mg L⁻¹ no Sistema B (Tabela 11). As concentrações elevadas nas amostras do afluente do Sistema A são atribuídas à composição do extrato enzimático, que aumentou a concentração do nitrato de 0,5 para 10,5 mg L⁻¹ nos ensaios preliminares (Tabela 4). Nas amostras dos efluentes, a concentração do nitrato variou de 4,10 a 7,60 mg L⁻¹ no Sistema A e de 4,40 a 8,70 mg L⁻¹ no Sistema B.

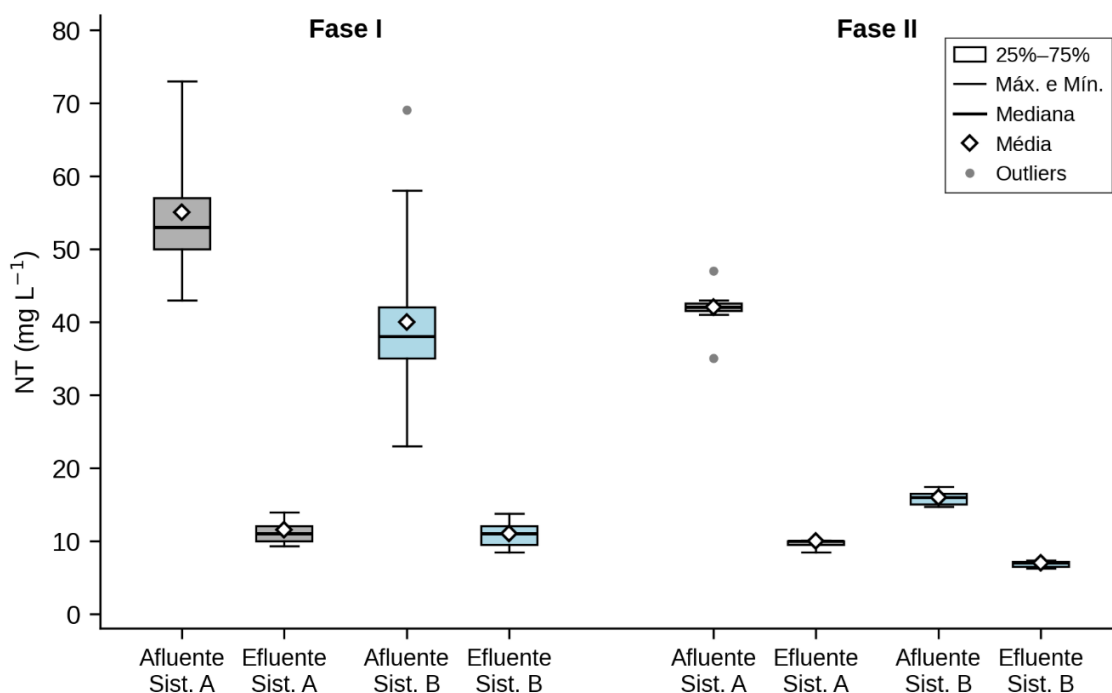
No Sistema A, a redução da concentração do nitrato nas amostras dos efluentes em relação às dos afluentes pode ser atribuída à desnitrificação em microzonas anóxicas do biofilme (Dotro *et al.*, 2017; Kadlec; Wallace, 2009). No Sistema B, o aumento da concentração do nitrato nas amostras dos efluentes em relação às do afluente pode ser resultante da nitrificação, sustentada pela alcalinidade total no afluente de aproximadamente 101 mg CaCO₃ L⁻¹ (Kadlec; Wallace, 2009). Não foi possível realizar comparação das eficiências de remoção entre os sistemas nesta fase, pois no Sistema B houve produção e não remoção do nitrato.

Com a adição do corante na Fase II, a concentração do nitrato nas amostras do afluente variou de 7,60 a 9,70 mg L⁻¹ no Sistema A e de 0,30 a 0,70 mg L⁻¹ no Sistema B. Nas amostras dos efluentes, a concentração do nitrato variou de 1,40 a 4,00 mg L⁻¹ no Sistema A e de 0,20 mg L⁻¹ no Sistema B. Nesta fase, foi verificada diferença significativa da concentração do nitrato entre as amostras dos efluentes dos sistemas (*p*-valor = 0,0153), ou seja, a lacase interferiu neste parâmetro na presença do corante.

Na comparação entre as Fases I e II, a adição do corante influenciou na concentração do nitrato no Sistema A (p -valor < 0,0001). A comparação entre fases no Sistema B não foi aplicável pelo mesmo motivo indicado na Fase I. Não se descarta que o azul de indigotina tenha contribuído para o equilíbrio entre nitrificação e desnitrificação observado no Sistema B na Fase II, visto que a degradação do corante pode gerar ácido antranílico, composto que poderia servir como doador de elétrons para bactérias desnitrificantes (Castillo-suárez *et al.*, 2023a). Porém, essa interpretação permanece especulativa, pois não foram realizadas análises de metabólitos intermediários neste estudo.

Na Figura 41 é apresentada a variação do nitrogênio total nas amostras do afluente e dos efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II ($n = 32$).

Figura 41 – Variação do Nitrogênio Total nas amostras do afluente e efluente dos Sistemas A e B nas Fases I e II



Fonte: Autoria própria (2025).

Nota: Sistema A = *wetland* com lacase livre (500 U L⁻¹); Sistema B = *wetland* controle (sem lacase). Fase I = sem adição de corante; Fase II = com azul de indigotina a 25 mg L⁻¹.

Nas amostras do afluente na Fase I, a concentração do NT variou de 42,94 a 73,44 mg L⁻¹ no Sistema A e de 23,37 a 69,44 mg L⁻¹ no Sistema B (Tabela 11). Nas amostras dos efluentes, a concentração do NT variou de 9,31 a 13,90 mg L⁻¹ no Sistema A e de 8,43 a 13,70 mg L⁻¹ no Sistema B, correspondendo às eficiências de remoção de 78,99% e 71,74%, respectivamente. Nesta fase, a lacase livre não interferiu na remoção do NT (p -valor = 0,0664).

Donato *et al.* (2025) verificaram eficiências de remoção de 77% e 70% do NT em WCFV (56 L) vegetados com *E. crassipes* em concreto aerado autoclavado, operados com aeração intermitente de 2,4 e 1,4 L O₂ min⁻¹ em ciclos de 48 h, tratando NT inicial de 32 mg L⁻¹.

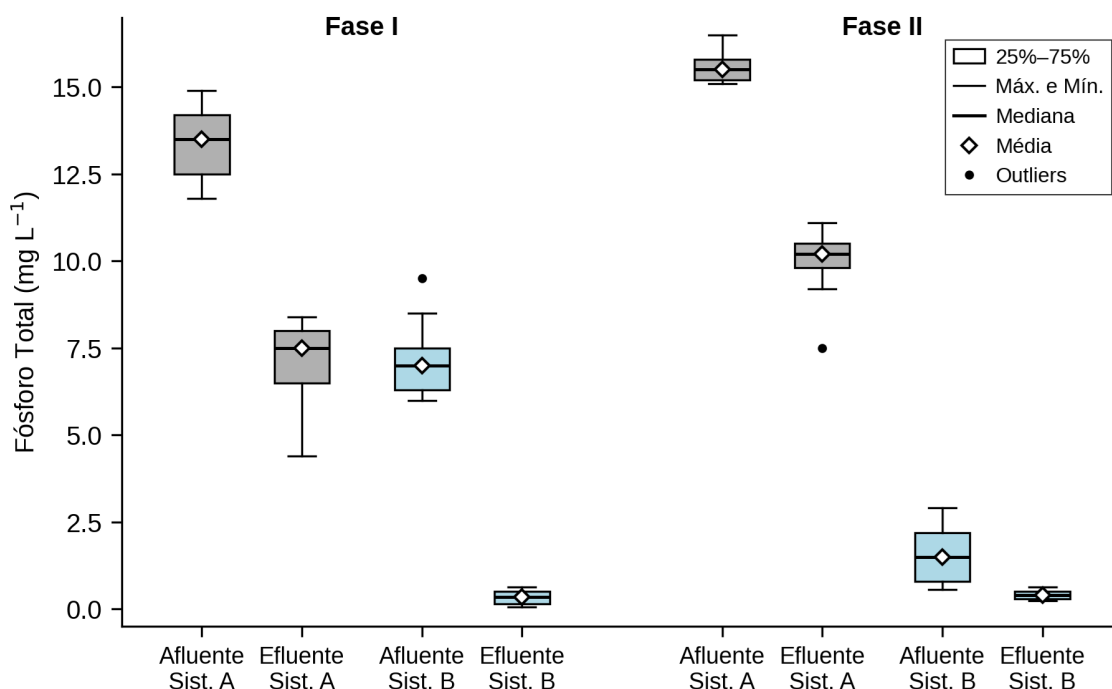
Com a adição do corante na Fase II, a concentração do NT nas amostras do afluente variou de 40,74 a 46,63 mg L⁻¹ no Sistema A e de 14,68 a 17,44 mg L⁻¹ no Sistema B. Nas amostras dos efluentes, a concentração do NT variou de 8,44 a 10,12 mg L⁻¹ no Sistema A e de 6,16 a 7,32 mg L⁻¹ no Sistema B, correspondendo às eficiências de remoção de 78,56% e 58,97%, respectivamente. Nesta fase, foi verificada diferença significativa entre as amostras dos efluentes dos sistemas (p -valor = 0,0008), ou seja, a lacase interferiu neste parâmetro. A adição do corante não alterou a remoção do NT no Sistema A (p -valor = 0,1857). No Sistema B foi verificada diferença significativa entre as fases (p -valor = 0,0350).

Com base nos resultados apresentados, as eficiências de remoção do NT obtidas neste estudo superam a faixa de 40 a 55% reportada por Vymazal (2007) para *wetlands* verticais convencionais sem aeração, o que pode estar relacionado ao efeito da aeração contínua sobre a nitrificação e desnitrificação simultâneas nos sistemas (Nivala; Murphy; Freeman, 2020; Dotro *et al.*, 2017).

5.6.3.4 Fósforo Total

Na Figura 42 é apresentada a variação da concentração do fósforo total nas amostras dos afluentes e efluentes dos Sistemas A e B nas Fases I e II ($n = 32$).

Figura 42 – Variação do Fósforo Total nas amostras do afluente e efluente dos Sistemas A e B nas Fases I e II



Fonte: Autoria própria (2025).

Nota: Sistema A = *wetland* com lacase livre (500 U L⁻¹); Sistema B = *wetland* controle (sem lacase). Fase I = sem adição de corante; Fase II = com azul de indigotina a 25 mg L⁻¹.

Nas amostras do afluente na Fase I, a concentração do PT variou de 11,79 a 14,90 mg L⁻¹ no Sistema A e de 5,98 a 9,48 mg L⁻¹ no Sistema B (Tabela 11). As maiores concentrações

do PT nas amostras do afluente no Sistema A são atribuídas à presença de KH_2PO_4 no meio de cultivo de *Trametes villosa*, incorporado ao sistema com o extrato bruto da lacase.

Nos ensaios preliminares, a adição do extrato enzimático a 500 U L^{-1} acarretou no aumento da concentração do PT para $17,86 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 4). Nas amostras dos efluentes, a concentração do PT variou de $4,43$ a $8,40 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema A e de $0,06$ a $0,63 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema B, correspondendo às eficiências de remoção de $50,0\%$ e $95,1\%$.

A remoção do PT pode ser atribuída à adsorção do fosfato nos óxidos de ferro e alumínio presentes na cerâmica vermelha (Cabral *et al.*, 2021), com contribuição da precipitação química e da assimilação por plantas e microrganismos (Vymazal, 2010). Nesta fase, foi verificada diferença significativa do PT entre as amostras dos efluentes dos sistemas (p -valor = $0,0008$), ou seja, a lacase interferiu neste parâmetro.

A menor eficiência de remoção do Sistema A pode estar relacionada à maior concentração do PT no afluente, que pode ter saturado os sítios de adsorção do material cerâmico.

Souza (2023) verificaram redução na eficiência de remoção do fósforo com o aumento da carga afluente em WCFV (12 L) vegetados com *E. crassipes* em fragmentos de placas de gesso acartonado, sem aeração, em ciclos de 48 h, tratando PT inicial de 19 mg L^{-1} . Lima *et al.* (2018) obtiveram 87% de eficiência de remoção do PT em WCFV (12 L) vegetado com *E. crassipes* em fragmentos de cerâmica vermelha, sem aeração, em ciclos de 48 h, tratando PT inicial de 19 mg L^{-1} . Donato *et al.* (2025) verificaram eficiências de remoção de 97% e 94% do PT em WCFV (56 L) vegetados com *E. crassipes* em concreto aerado autoclavado, operados com aeração intermitente de $2,4$ e $1,4 \text{ L O}_2 \text{ min}^{-1}$ em ciclos de 48 h, tratando PT inicial de 10 mg L^{-1} .

Com a adição do corante na Fase II, a concentração do PT nas amostras do afluente variou de $15,07$ a $16,52 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema A e de $0,56$ a $2,91 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema B. Nas amostras dos efluentes, a concentração do PT variou de $7,66$ a $11,14 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema A e de $0,23$ a $0,63 \text{ mg L}^{-1}$ no Sistema B, correspondendo às eficiências de remoção de $36,35\%$ e $67,21\%$. Nesta fase, foi verificada diferença significativa entre as amostras dos efluentes dos sistemas (p -valor = $0,0089$), ou seja, a lacase interferiu na remoção deste parâmetro. A maior eficiência de remoção do Sistema B pode estar relacionada à menor concentração do PT no afluente nesta etapa. Silva (2023) obteve eficiências de remoção de 84% e 85% do PT em WCFV (12 L) vegetado com *E. crassipes* em fragmentos de cerâmica vermelha, sem aeração, em ciclos de 24 e 48 h, tratando PT inicial de 12 a 16 mg L^{-1} .

Na comparação entre as Fases I e II, a adição do corante não alterou a remoção do PT no Sistema A (p -valor = $0,1177$). No Sistema B foi verificada diferença significativa entre as fases (p -valor = $0,0130$), o que pode estar relacionado à redução na concentração do PT no afluente nesta etapa.

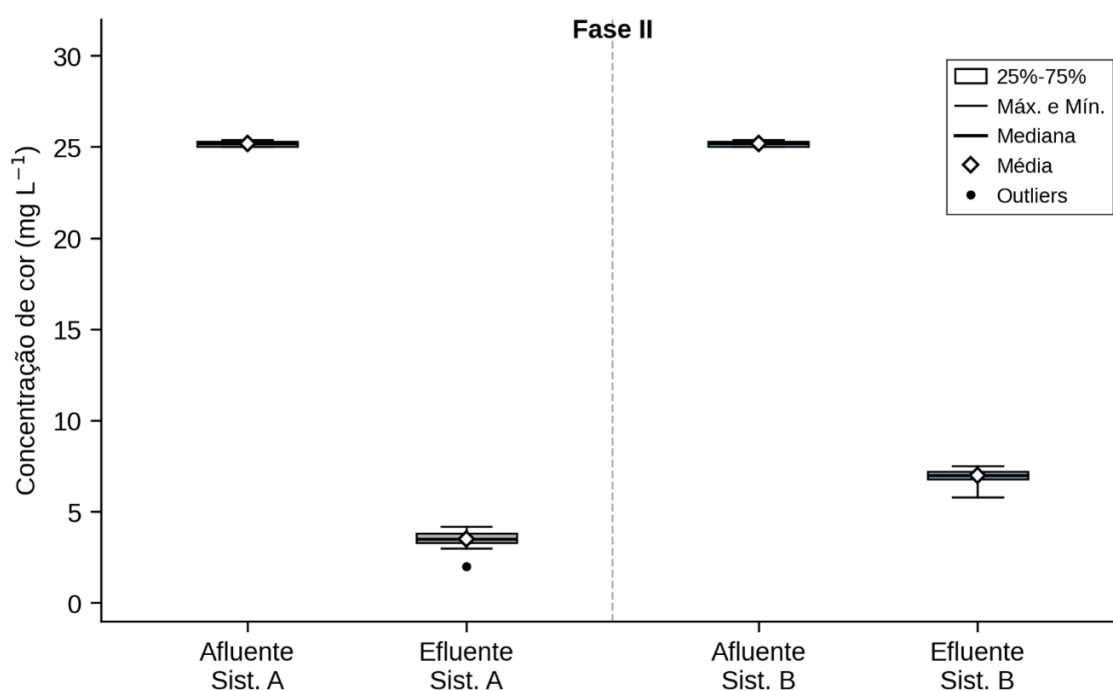
5.6.4 Comportamento do azul de indigotina nos sistemas avaliados

A descoloração do azul de indigotina foi avaliada na Fase II com o objetivo de verificar a capacidade dos sistemas em reduzir a concentração do corante ao longo do tratamento. Essa análise permitiu comparar o comportamento dos Sistemas A e B, considerando a influência do extrato bruto de lacase no Sistema A e os processos naturais de remoção associados ao wetland construído no Sistema B.

5.6.4.1 Sistemas de wetlands construídos

Na Figura 43 é apresentada a variação das concentrações do azul de indigotina nas amostras do afluente e dos efluentes dos Sistemas A e B na Fase II ($n = 32$).

Figura 43 – Variação dos valores de concentração de cor nas amostras do afluente e efluente dos Sistemas A e B na Fase II



Fonte: Autoria própria (2026).

Nota: Sistema A = *wetland* com lacase livre (500 U L⁻¹); Sistema B = *wetland* controle (sem lacase). Fase II = com azul de indigotina a 25 mg L⁻¹.

Na Fase II, o azul de indigotina foi adicionado aos dois sistemas na concentração de 25 mg L⁻¹ a cada ciclo. Nas amostras do afluente, a concentração do corante variou de 25,00 a 25,58 mg L⁻¹ no Sistema A e de 25,00 a 25,70 mg L⁻¹ no Sistema B (Tabela 12), indicando reprodutibilidade na preparação das soluções. Nas amostras dos efluentes, a concentração do corante variou de 1,70 a 4,10 mg L⁻¹ no Sistema A e de 5,80 a 7,50 mg L⁻¹ no Sistema B, correspondendo às eficiências de remoção de 86,32% e 72,81%. A descoloração do corante foi confirmada pela diferença significativa entre as amostras do afluente e dos efluentes em ambos os sistemas (p -valor $< 0,0001$). Foi verificada diferença significativa da concentração

do corante entre as amostras dos efluentes dos sistemas (p -valor = 0,0009), ou seja, a lacase interferiu na descoloração do azul de indigotina, com eficiência de remoção superior no Sistema A. A comparação entre as Fases I e II não foi aplicável para este parâmetro, pois o azul de indigotina foi adicionado exclusivamente na Fase II.

Tabela 12 – Concentração de cor (mg L^{-1}) no afluente e efluente dos Sistemas A e B e eficiências de remoção (%) ao longo da Fase II ($n = 8$)

Nº	Sistema A (com lacase)			Sistema B (controle)		
	Afluente (mg L^{-1})	Efluente (mg L^{-1})	Remoção (%)	Afluente (mg L^{-1})	Efluente (mg L^{-1})	Remoção (%)
1	25,58	4,10	83,97	25,70	6,97	72,86
2	25,20	3,80	84,92	25,30	6,53	74,19
3	25,20	3,60	85,71	25,30	6,97	72,45
4	25,00	3,70	85,20	25,20	7,30	71,03
5	25,10	3,80	84,86	25,10	6,64	73,55
6	25,00	3,30	86,74	25,00	7,30	70,88
7	25,10	3,50	85,92	25,30	7,50	70,54
8	25,30	1,70	93,22	25,40	5,80	77,01
Média	25,19	3,44	86,32	25,29	6,88	72,81
Mín	25,00	1,70	83,97	25,00	5,80	70,54
Máx	25,58	4,10	93,22	25,70	7,50	77,01
DP	0,19	0,74	2,91	0,21	0,55	2,15
CV	0,01	0,22	0,03	0,01	0,08	0,03

Fonte: Autoria própria (2026).

Nota: n - número de campanha; DP - desvio padrão; CV - coeficiente de variação (adimensional); Mín. - valor mínimo; Máx. - valor máximo; Remoção (%) - eficiência de remoção calculada em relação ao afluente do respectivo sistema. Sistema A = *wetland* com lacase livre (500 U L^{-1}); Sistema B = *wetland* controle (sem lacase). Fase II = operação com azul de indigotina a 25 mg L^{-1} .

A descoloração do corante nos dois sistema no sistema B pode ser atribuída à adsorção de compostos orgânicos aromáticos pelos óxidos de ferro e alumínio presentes na cerâmica vermelha (Cabral *et al.*, 2021), com contribuição da degradação biológica pelo biofilme microbiano desenvolvido durante a Fase I. No Sistema A, a lacase livre adicionada a cada ciclo contribuiu com a oxidação da molécula de indigotina, resultando em eficiência de remoção superior à do Sistema B. Hordieieva *et al.* (2023) obtiveram remoções superiores a 90% do índigo carmim utilizando o sistema TEMPO/lacase/ O_2 . As eficiências inferiores obtidas neste estudo podem estar relacionadas à presença de matéria orgânica e compostos inorgânicos na água do córrego, que competem com o corante pelo sítio ativo da enzima, conforme observado nos ensaios preliminares, nos quais a remoção em água do córrego foi inferior à obtida em água destilada (Tabela 4). A atividade enzimática da lacase diminui ao longo do ciclo de 48 h (Seção 4.3.2), o que pode ter influenciado a eficiência de remoção no Sistema A.

6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

6.1 Conclusões

A aplicação de lacase produzida por *Trametes villosa* em *wetlands* construídos de fluxo vertical subsuperficial preenchidos com tijolo cerâmico foi avaliada no tratamento de água do córrego Ribeirão dos Müller e na descoloração do azul de indigotina, ao longo de 162 dias de operação. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que:

- a produção da lacase a partir de *Trametes villosa* cultivado em resíduos agroindustriais foi viável, atingindo atividade máxima de 9.106,44 U L⁻¹ no 12º dia de cultivo, valor suficiente para padronização do extrato a 500 U L⁻¹ e aplicação em todos os ensaios subsequentes;
- na comparação dos *wetlands* com e sem adição de lacase livre, não foi verificada diferença significativa na remoção de matéria orgânica e nutrientes entre os sistemas (p-valor > 0,05 para a maioria dos parâmetros), porém a lacase contribuiu significativamente para a descoloração do azul de indigotina na Fase II, com eficiência de 86,32% no Sistema A e 72,81% no Sistema B (p-valor = 0,0009);
- a imobilização da lacase em resíduos da construção civil é tecnicamente viável apenas em tijolo cerâmico, pois o concreto aerado autoclavado apresentou interferência analítica que inviabilizou a determinação espectrofotométrica da atividade enzimática. A otimização do protocolo, com adição da enzima 30 minutos antes do glutaraldeído (TAS E), elevou a atividade recuperada de 2% para 17,21%;
- na comparação em bancada entre as formas livre e imobilizada, a lacase livre alcançou descoloração do azul de indigotina entre 49,0 e 58,1% por ciclo e a lacase imobilizada entre 19,3 e 25,5%, mantendo 75,7% da capacidade catalítica ao longo de três ciclos consecutivos de 48 h. Quando normalizada pelo número de doses enzimáticas aplicadas, a lacase imobilizada alcançou 67,1% de descoloração por dose, valor 28% superior ao da lacase livre (52,5%), ou seja, o biocatalisador imobilizado apresentou melhor aproveitamento enzimático e permitiu o reúso sem reposição do extrato.

Frente às hipóteses da pesquisa, confirma-se que a adição de lacase produzida por *Trametes villosa* amplia a descoloração do corante azul de indigotina nos *wetlands* construídos, e que os resíduos da construção civil, especificamente o tijolo cerâmico, permitem a imobilização da enzima com retenção de atividade catalítica.

6.2 Recomendações para trabalhos futuros

A continuidade desta pesquisa pode incorporar diferentes desdobramentos experimentais que ampliam o entendimento dos mecanismos envolvidos e o potencial de aplicação dos sistemas avaliados.

A inclusão de controles adicionais nos *wetlands* construídos, como unidades sem macrófitas, com enzima inativada e com substrato sem enzima, permitiria isolar as contribuições individuais dos mecanismos de adsorção, ação microbiana, fitoextração e ação enzimática, atribuindo causalidade aos resultados observados.

O monitoramento da atividade enzimática ao longo do tempo no leito dos *wetlands*, com balanço entre afluente e efluente, possibilitaria quantificar a estabilidade da lacase em condições operacionais reais e identificar perdas por lixiviação, inibição pela matriz ou inativação progressiva.

A aplicação contínua da lacase imobilizada em tijolo cerâmico como componente do leito filtrante dos *wetlands* constitui o passo seguinte natural desta pesquisa, permitindo avaliar se a imobilização confere vantagens operacionais de longo prazo em relação à aplicação da lacase livre. A avaliação de ciclos sucessivos de reúso em escala piloto complementaria os resultados de bancada apresentados nesta dissertação.

A análise dos produtos intermediários da degradação do azul de indigotina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) permitiria diferenciar a descoloração da degradação efetiva do corante e identificar metabólitos eventualmente formados. De forma complementar, ensaios ecotoxicológicos com *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri* nos efluentes tratados forneceriam evidências sobre a inocuidade dos subprodutos gerados.

O sequenciamento do biofilme do substrato cerâmico permitiria identificar os microrganismos ativos nos processos de nitrificação e desnitrificação, e verificar a presença de bactérias do gênero *Pseudomonas* na presença da indigotina, contribuindo para confirmar ou descartar a hipótese do ácido antranílico levantada neste trabalho.

A purificação parcial do extrato enzimático ou a reformulação do meio de cultivo com menor teor de fósforo e carbono orgânico reduziria a interferência do extrato na qualidade do afluente, tornando os afluentes dos sistemas comparáveis e isolando o efeito catalítico da lacase.

A aplicação dos sistemas a micropoluentes recalcitrantes de relevância ambiental, como fármacos (diclofenaco, paracetamol) e hormônios (17 β -estradiol, etinilestradiol), ampliaria a contribuição da pesquisa para o tratamento descentralizado de águas contaminadas por compostos emergentes.

A operação dos sistemas ao longo de um ciclo anual completo permitiria avaliar o efeito das variações térmicas sobre o desempenho da macrófita, do biofilme e da atividade enzimática residual, especialmente nas condições do clima subtropical úmido de Curitiba.

A avaliação dos sistemas com efluentes reais provenientes de indústrias têxteis ou alimentícias, em substituição à adição artificial do corante em matriz de córrego, forneceria base experimental mais próxima das condições reais de aplicação e permitiria verificar se as eficiências de descoloração observadas neste estudo se mantêm frente à complexidade química de efluentes industriais.

REFERÊNCIAS

- AccuWeather. **Histórico de tempo: Curitiba, Paraná**, . 2026. Acesso em: fev. 2026. Disponível em: <https://www.accuweather.com>.
- AL-SAREJI, O. J. *et al.* Efficient removal of pharmaceutical contaminants from water and wastewater using immobilized laccase on activated carbon derived from pomegranate peels. **Scientific Reports**, v. 13,, p. 11933, 2023.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 23. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2017.
- ARREGUI, L. *et al.* Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. **Microbial Cell Factories**, v. 18,, p. 200, 2019.
- Associação Brasileira de Resíduos e Meio Ambiente (ABREMA). **Panorama dos resíduos sólidos no Brasil 2025**. São Paulo: ABREMA, 2025.
- AURIOL, M. *et al.* Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater. **Water Research**, v. 41, n. 15, p. 3281–3288, 2007.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006.
- BARBOSA, A. A.; FERRAZ, A. V.; SANTOS, G. A. Caracterização química, mecânica e morfológica do gesso obtido do pólo do Araripe. **Cerâmica**, v. 60,, p. 501–508, 2014.
- BENNY, C. K.; CHAKRABORTY, S. Dyeing wastewater treatment in horizontal-vertical constructed wetland using organic waste media. **Journal of Environmental Management**, v. 331,, p. 117213, 2023.
- BLISS, S. N. *et al.* Removal of 17 α -ethynylestradiol and β -estradiol using bench-scale constructed wetlands. **Water Science & Technology**, v. 85, n. 12, p. 3408–3417, 2022.
- BOCK, E. On the solubility of anhydrous calcium sulphate and of gypsum in concentrated solutions of sodium chloride at 25 °C, 30 °C, 40 °C, and 50 °C. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 39,, p. 1746–1751, 1961.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Letters**, v. 267, n. 1, p. 99–102, 1990.
- BRAGA, D. M. *et al.* Production and immobilization of laccases from monoculture and co-culture of *Trametes villosa* and *Pycnoporus sanguineus* for sustainable biodegradation of ciprofloxacin. **Process Biochemistry**, v. 141,, p. 132–143, 2024.
- Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução nº 307, de 5 de julho de 2002**, . 2002. Estabelece diretrizes, critérios e procedimentos para a gestão dos resíduos da construção civil. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 jul. 2002.
- BRIX, H. Functions of macrophytes in constructed wetlands. **Water Science and Technology**, v. 29, n. 4, p. 71–78, 1994.
- CABRAL, L. L. **Carvão ativado de casca de maracujá como adsorvente alternativo na remoção de corantes alimentícios sintéticos em solução aquosa mono e multicomponente**. 2022. Dissertação (Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental)) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná Curitiba 2022.

CABRAL, L. L. *et al.* Adsorption and desorption of phosphate onto chemically and thermochemically pre-activated red ceramic waste: characteristics, batch studies, and mechanisms. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9,, p. 106695, 2021.

CASTILLO-SUÁREZ, L. A. *et al.* A critical review of textile industry wastewater: green technologies for the removal of indigo dyes. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 20,, p. 1–34, 2023.

CASTILLO-SUÁREZ, L. A. *et al.* A critical review of textile industry wastewater: green technologies for the removal of indigo dyes. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 20,, p. 10553–10590, 2023.

CAVALCANTI, R.; PÓVOAS, Y. V. Análise da influência da composição granulométrica do resíduo de gesso nas propriedades do revestimento interno de parede. **Revista de Engenharia e Pesquisa Aplicada**, v. 2,, p. 25–30, 2016.

COOPER, P. F. *et al.* **Reed Beds and Constructed Wetlands for Wastewater Treatment**. Swindon, UK: WRc Publications, 1996.

DOGDU, G.; YALCUK, A. Indigo dyeing wastewater treatment by eco-friendly constructed wetlands using different bedding media. **Desalination and Water Treatment**, v. 57,, p. 15007–15019, 2016.

DONATO, M. A. *et al.* Intensifying intermittent aeration for optimizing nutrient and hormone removal in vertical-flow constructed wetlands filled with aerated concrete. **Chemosphere**, Amsterdam v. 370,, p. 143941, 2025.

DONG, C.-D. *et al.* Laccase: A potential biocatalyst for pollutant degradation. **Environmental Pollution**, v. 319,, p. 120999, 2023.

DOTRO, G. *et al.* **Treatment Wetlands**. London: IWA Publishing, 2017. v. 7. (Biological Wastewater Treatment Series, v. 7).

EKANAYAKE, E. M. M. S. *et al.* Phytoremediation of synthetic textile dyes: biosorption and enzymatic degradation involved in efficient dye decolorization by *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms and *Pistia stratiotes* L. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28,, p. 20476–20486, 2021.

FAN, Y. *et al.* A novel inhibition mechanism of aniline on nitrification: aniline degradation competes dissolved oxygen with nitrification. **Science of the Total Environment**, v. 770,, p. 145205, 2021.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808–1825, 2013.

GIRAUD, F. *et al.* Biodegradation of anthracene and fluoranthene by fungi isolated from an experimental constructed wetland for wastewater treatment. **Water Research**, v. 35, n. 17, p. 4126–4136, dec 2001.

GODINHO-CASTRO, A. P. *et al.* Incorporation of gypsum waste in ceramic block production: Proposal for a minimal battery of tests to evaluate technical and environmental viability of this recycling process. **Waste Management**, v. 32, n. 1, p. 153–157, 2012.

HASSAN, I. *et al.* Wastewater treatment using constructed wetland: current trends and future potential. **Processes**, v. 9, n. 11, p. 1917, 2021.

HENRY-SILVA, G. G.; CAMARGO, A. F. M. Valor nutritivo de macrófitas aquáticas flutuantes (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*) utilizadas no tratamento de efluentes de aquicultura. **Acta Scientiarum**, Maringá v. 24, n. 2, p. 519–526, 2002.

HORDIEIEVA, I. O. *et al.* Eco-friendly TEMPO/laccase/O₂ biocatalytic system for degradation of Indigo Carmine: operative conditions and laccase inactivation. **RSC Advances**, v. 13, p. 20737–20747, 2023.

HOU, H. *et al.* Enhancement of laccase production by *pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1415–1419, 2004.

HUSSEIN, A.; SCHOLZ, M. Dye wastewater treatment by vertical-flow constructed wetlands. **Ecological Engineering**, v. 101, p. 28–38, 2017.

IWA. **Constructed Wetlands for Pollution Control: Process, Performance, Design and Operation**. London: IWA Publishing, 2000. 156 p. (Scientific and Technical Report, 8).

JAYALAKSHMI, R.; SOUNDARANAYAKI, K.; KANNAN, M. S. Removal of methylene blue dye from textile wastewater using vertical flow constructed wetland. **Materials Today: Proceedings**, v. 77, p. 365–370, 2023.

JEYABALAN, J. *et al.* A review on the laccase assisted decolourization of dyes: recent trends and research progress. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 151, p. 105081, 2023.

KADLEC, R. H.; WALLACE, S. D. **Treatment Wetlands**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2009.

KUJAWA, J. *et al.* Molecular decoration of ceramic supports for highly effective enzyme immobilization — material approach. **Materials**, v. 14, n. 1, p. 201, 2021.

KUJAWA, J. *et al.* Highly effective enzymes immobilization on ceramics: requirements for supports and enzymes. **Science of the Total Environment**, v. 801, p. 149647, 2021.

LEONTIEȘ, A. R. *et al.* Laccase immobilized on chitosan–polyacrylic acid microspheres as highly efficient biocatalyst for naphthol green B and indigo carmine degradation. **Chemical Engineering Journal**, v. 439, p. 135654, 2022.

LIMA, M. X. d. *et al.* Performance of different substrates in constructed wetlands planted with *E. crassipes* treating low-strength sewage under subtropical conditions. **Science of the Total Environment**, v. 630, p. 1365–1373, 2018.

LLORET, L. *et al.* Immobilization of laccase by encapsulation in a sol–gel matrix and its characterization and use for the removal of estrogens. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 6, p. 1570–1579, 2011.

MATOS, A. T. d. *et al.* Influência da espécie vegetal cultivada nas condições redox de sistemas alagados construídos. **Engenharia Agrícola**, v. 30, p. 518–526, 2010.

MODKOVSKI, T. A. ... 2021. Dissertação (Mestrado) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná Curitiba 2021.

MONROY-LICHT, A. *et al.* Unlocking the potential of *Eichhornia crassipes* for wastewater treatment: phytoremediation of aquatic pollutants, a strategy for advancing Sustainable Development Goal-06 clean water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, n. 31, p. 43561–43582, 2024.

MURPHY, C. *et al.* Nitrification cessation and recovery in an aerated saturated vertical subsurface flow treatment wetland: field studies and microscale biofilm modeling. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 125–132, 2016.

MUSTAPHA, H. I.; BRUGGEN, J. J. A. van; LENS, P. N. L. Assessment of pollutant removal processes and kinetic modelling in vertical flow constructed wetlands at elevated pollutant loading. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 18, p. 18256–18275, 2019.

MUSTAPHA, H. I.; BRUGGEN, J. J. A. van; LENS, P. N. L. Biotreatment of petroleum refinery wastewater in vertical surface-flow constructed wetland vegetated with *Eichhornia crassipes*: lab-scale experimental and kinetic modelling. **International Journal of Phytoremediation**, v. 20, n. 13, p. 1363–1377, 2018.

NETO, J. d. C. M. **Gestão dos resíduos de construção e demolição no Brasil**. São Carlos, SP: RiMa, 2005.

NIVALA, J.; MURPHY, C.; FREEMAN, A. Recent advances in the application, design, and operations & maintenance of aerated treatment wetlands. **Water**, v. 12, n. 4, p. 1188, 2020.

ONG, S.-A. *et al.* Treatment of azo dye Acid Orange 7 containing wastewater using up-flow constructed wetland with and without supplementary aeration. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9049–9057, 2010.

OSMA, J. F.; TOCA-HERRERA, J. L.; RODRÍGUEZ-COUTO, S. Cost analysis in laccase production. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 11, p. 2907–2912, 2011.

RAJENDRAN, S.; KALAIRAJ, A.; SENTHILVELAN, T. A comprehensive review on enzymatic decolorization of various azo dyes using laccase for the abatement of industrial pollution. **Biomass Conversion and Biorefinery**, „, 2024.

REZANIA, S. *et al.* Perspectives of phytoremediation using water hyacinth for removal of heavy metals, organic and inorganic pollutants in wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 163, p. 125–133, 2015.

RIEDI, H. d. P. **Purificação, caracterização e imobilização de lacases de basidiomicetos e seu uso na degradação simultânea de rifampicina e isoniazida**. 2019. Dissertação (Mestrado) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná Curitiba 2019. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental).

RIGUETO, C. V. T. *et al.* Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) roots, an amazon natural waste, as an alternative biosorbent to uptake a reactive textile dye from aqueous solutions. **Ecological Engineering**, v. 150, p. 105817, 2020.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 58, n. 5, p. 406–411, 1986.

RISTEA, M.-E.; ZĂRNESCU, O. Indigo Carmine: between necessity and concern. **Journal of Xenobiotics**, v. 13, p. 509–528, 2023.

RODRÍGUEZ-COUTO, S. Immobilized-laccase bioreactors for wastewater treatment. **Biotechnology Journal**, v. 19, p. 2300354, 2024.

ROWLING, J. K. **Harry Potter e a Ordem da Fênix**. Rio de Janeiro: Rocco, 2003.

SANDOVAL, L. *et al.* Role of Wetland plants and use of ornamental flowering plants in constructed Wetlands for wastewater treatment: A review. **Applied Sciences**, v. 9, n. 4, p. 685, 2019. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2076-3417/9/4/685>.

SEZERINO, P. H. *et al.* Experiências brasileiras com wetlands construídos aplicados ao tratamento de águas residuárias: parâmetros de projeto. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 20, n. 1, p. 143–152, 2015.

SHACKLE, V. J.; FREEMAN, C.; REYNOLDS, B. Carbon supply and the regulation of enzyme activity in constructed wetlands. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 13, p. 1935–1940, 2000.

SILVA, L. d. C. **Cerâmica vermelha, concreto autoclavado e compósito a partir de concreto autoclavado e cimento branco como substrato em wetlands construídos tratando matéria carbonácea, nutrientes e hormônios**. 2023. Dissertação (Mestrado) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná Curitiba 2023. 159 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil).

SILVA, L. d. C. *et al.* Biodegradation and sorption of nutrients and endocrine disruptors in a novel concrete-based substrate in vertical-flow constructed wetlands. **Chemosphere**, v. 346,, p. 140531, 2024.

SOUZA, 2024. Dissertação (Mestrado) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná Curitiba 2024.

SOUZA, A. d. O. **Resíduos de gesso da construção civil como meio suporte de wetlands construídos de fluxo vertical descendente empregado no tratamento de efluente sintético**. 2023. Dissertação (Mestrado) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná Curitiba 2023. 139 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil).

SPERLING, M. von; SEZERINO, P. H. **Dimensionamento de wetlands construídos no Brasil**, . 2018. 65 p. Boletim Wetlands Brasil, Edição Especial. Documento de consenso entre pesquisadores e praticantes. ISSN 2359-0548. Disponível em: <http://gesad.ufsc.br/boletins/>.

TORRES, B. H. C. **Degradação de cafeína por lacase de *Trametes villosa***. 2021. Dissertação (Mestrado) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná Curitiba 2021. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental).

VYMAZAL, J. Constructed wetlands for wastewater treatment. **Water**, v. 2, n. 3, p. 530–549, 2010.

VYMAZAL, J. Plants used in constructed wetlands with horizontal subsurface flow: a review. **Hydrobiologia**, v. 674, n. 1, p. 133–156, 2011.

VYMAZAL, J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. **Science of the Total Environment**, v. 380,, p. 48–65, 2007.

WANG, C. *et al.* The biodegradation of Indigo Carmine by *Bacillus safensis* HL3 spore and toxicity analysis of the degradation products. **Molecules**, v. 27,, p. 8539, 2022.

ZHANG, J. *et al.* Examination of oxygen release from plants in constructed wetlands in different stages of wetland plant life cycle. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 16, p. 9709–9716, 2014.