



**JULIANA ARRIEL TORRES**

**OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS EM ÁGUA RESIDUÁRIA DO  
PROCESSAMENTO DO CAFÉ**

**LAVRAS - MG**

**2014**

**JULIANA ARRIEL TORRES**

**OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ÁGUA  
RESIDUÁRIA DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Angelita Duarte Corrêa

Coorientadores

Dra. Maria Cristina Silva

Dr. Custódio Donizete dos Santos

**LAVRAS – MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Torres, Juliana Arriel.

Oxidação enzimática de compostos fenólicos em água residuária do processamento do café / Juliana Arriel Torres. – Lavras : UFLA, 2014.

106 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Angelita Duarte Corrêa.

Bibliografia.

1. Biocatálise ambiental. 2. Peroxidase. 3. Frutos do cafeeiro. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.23

**JULIANA ARRIEL TORRES**

**OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ÁGUA  
RESIDUÁRIA DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2014.

Dr. Cláudio Milton Montenegro Campos      UFLA

Dra. Luciana Lopes Silva Pereira              UFLA

Dra. Angelita Duarte Corrêa  
Orientadora

Dra. Maria Cristina Silva  
Dr. Custódio Donizete dos Santos  
Coorientadores

**LAVRAS – MG**

**2014**

*A Deus, por tornar possível a realização de mais este sonho e por me iluminar em todos os meus passos.*

*À minha mãe, por sempre acreditar no meu potencial me dando forças para nunca desistir dos meus sonhos.*

*Aos meus irmãos, pelo incentivo e pelo amor.*

*Aos meus sobrinhos, Luiz Fernando e Pedro Henrique pela continuidade.*

*Ao meu namorado Guilherme, pela força, amor e paciência.*

*A todos os meus familiares e amigos que sempre estiveram presentes e me apoiaram em todas as etapas da minha vida torcendo pela minha felicidade. Em especial às amigas Maria Cristina, Pricila e Laís pela amizade sincera.*

*À minha orientadora Angelita, pela confiança e oportunidade.*

DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu amparo e me dar forças para continuar essa caminhada em busca dos meus objetivos e por fazer deste sonho uma realidade.

Aos meus pais, Carlinda e Joel, que me agraciaram com o dom da vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade e responsabilidade.

À minha família, em especial aos meus queridos irmãos Fernando e Valério, e aos meus queridos tios Antero e Antônia, pela torcida e por sempre acreditarem e me incentivarem a correr atrás dos meus ideais.

À minha orientadora Angelita, por me conceder mais esta oportunidade, pela confiança, apoio e experiência.

À minha amiga e co-orientadora Maria Cristina, por me transmitir seus conhecimentos em mais esta etapa, por acreditar em mim mais uma vez, por esclarecer minhas dúvidas e pela paciência nos meus momentos de desespero.

Ao Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos, pela co-orientação e experiência transmitida.

À minha querida amiga e companheira de trabalho Pricila, por toda a ajuda, companheirismo e amizade. Por sempre estar disposta a me ajudar a qualquer hora e momento.

Ao meu namorado Guilherme, que apesar da distância sempre faz parte da minha vida, pelo amor, pelas palavras de força e pela paciência nos meus momentos de estresse.

À minha querida amiga Laís, pelos momentos de alegria e pela amizade sincera.

A todos do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química: Rodrigo, Ana Paula, Valquíria, Lucas, Vinícius, Mariana, Denise, Rafaela, Mariene, Adnéia, Tamara, Anderson, Estela, pela amizade.

A todos os professores e funcionários, em especial Paulo, Xulita, Cidinha, Ângela e Shirley.

Ao Eli, funcionário da Emater, pela disponibilidade e ajuda nas coletas das minhas amostras nas fazendas visitadas.

Ao programa de Pós-graduação em Agroquímica, pela oportunidade.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos.

E finalmente, mais uma vez àquela pessoa que sempre se doou por inteira, rezando, torcendo, acreditando, sofrendo, rindo e lutando comigo, por estar presente em mais esta etapa alcançada em minha vida e pelo amor incondicional, não bastaria aqui somente um muito obrigado minha amada mãe!

## RESUMO

O café é um dos produtos agrícolas de grande importância para o Brasil, principalmente para o estado de Minas Gerais, e é sem dúvida de notória importância e expressividade para sua economia. O processamento pós-colheita do café por via úmida consiste na utilização de grande quantidade de água em todo o processo, resultando em um café de qualidade superior, além de reduzir os custos e espaço de secagem. Entretanto, o efluente resultante é rico em compostos inorgânicos e orgânicos, entre eles os compostos fenólicos, os quais são altamente tóxicos e alguns deles quando liberados no meio ambiente podem se acumular em águas subterrâneas e superficiais e no solo, nas diferentes cadeias alimentares, sendo persistentes no meio ambiente e tóxicos aos microrganismos no tratamento biológico. As peroxidases são biocatalisadores utilizados na remoção de poluentes orgânicos, com potencial utilização no tratamento de efluentes contendo fenóis. Neste trabalho, objetivou-se identificar e quantificar os compostos fenólicos da água residuária do processamento do café (ARC), avaliar diferentes fontes de peroxidase na oxidação do ácido cafeico e na oxidação dos compostos fenólicos da ARC, na presença e ausência de aditivos químicos. A ARC apresentou um teor de compostos fenólicos totais de 233,56 mg L<sup>-1</sup> e o ácido cafeico foi o composto fenólico majoritário. A peroxidase do nabo (PEN) se mostrou eficiente na oxidação do ácido cafeico, atingindo uma porcentagem de 51,05% em apenas 15 minutos de reação. No entanto, a eficiência deste catalisador se mostrou dependente do pH, das concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e enzima utilizadas. A maior porcentagem de oxidação foi obtida em pH 8, em uma razão molar ácido cafeico: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1:7 e utilizando uma concentração de enzima de 14,43 U mL<sup>-1</sup>. A PEN apresentou um potencial de oxidação do ácido cafeico (75,99% ± 0,48) superior à peroxidase das cascas de soja (PCS) e as enzimas comerciais *horseradish peroxidase* (HPR) e peroxidase de soja (PES). Entretanto, na oxidação da ARC, a HPR foi mais eficiente com 74,37% ± 0,16 de oxidação, seguida da PEN com 67,59% ± 0,11. Não houve influência na oxidação da ARC pela PCS na presença de polietilenoglicol e Triton X-100. O alto teor de compostos fenólicos encontrado na ARC justifica a necessidade de tratamento deste efluente antes do seu descarte em corpos hídricos receptores ou até mesmo antes de serem submetidos a outros tipos de tratamentos. O tratamento proposto pode ser eficiente na oxidação de compostos fenólicos em ARC, podendo ser associado com os processos de tratamento biológico convencionais.

Palavras-chave: Biocatálise ambiental. Peroxidase. Compostos fenólicos. Oxidação enzimática. Água residuária. Frutos do cafeeiro.

## ABSTRACT

Coffee is one of the agricultural products of great importance to Brazil, mainly to the state of Minas Gerais, and is undoubtedly of remarkable importance and expressiveness to their economy. The post-harvest processing of wet coffee consists in the use of a large amount of water throughout the process, resulting in a high-quality coffee, besides reducing costs and drying space. However, the resulting effluent is rich in inorganic and organic compounds, including phenolic compounds, which are highly toxic and some of them, when released into the environment, can accumulate in ground and surface water, as well as in the soil, in different food chains, being persistent in the environment and toxic to microorganisms in the biological treatment. Peroxidases are biocatalysts used in the removal of organic pollutants, with potential use in the treatment of effluents containing phenols. The objective of this study was to identify and quantify the phenolic compounds from coffee processing wastewater (CPW), evaluate different peroxidase sources in the oxidation of caffeic acid and in the oxidation of phenolic compounds from CPW, in the presence and absence of chemical additives. CPW presented a content of total phenolic compounds of 233.56 mg L<sup>-1</sup> and caffeic acid was the major phenolic compound. Turnip peroxidase (TPE) proved efficient in the oxidation of caffeic acid, reaching a percentage of 51.05% in only 15 minutes of reaction. Nevertheless, the efficiency of this catalyst showed dependent on pH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations and enzyme used. The highest percentage of oxidation was obtained at pH 8, in a molar ratio caffeic acid:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of 1:7, and using an enzyme concentration of 14.43 U mL<sup>-1</sup>. TPE presented an oxidation potential of caffeic acid (75.99% ± 0.48) higher than the peroxidase extracted from the soybean hulls (SHP) and the commercial enzymes horseradish peroxidase (HPR) and soybean peroxidase (CSP). However, in the oxidation of CPW, HPR was more efficient, with 74.37% ± 0.16 oxidation, followed by TPE, with 67.59% ± 0.11. There was no influence on the oxidation of CPW by SHP in the presence of polyethylene glycol and Triton X-100. The high content of phenolic compounds found in CPW justifies the need for a treatment of this effluent before its discharge into receiving water bodies, or even before being subjected to other types of treatments. The proposed treatment can be effective in the oxidation of phenolic compounds in CPW and may be associated with conventional biological treatment processes.

**Keywords:** Environmental biocatalysis. Peroxidase. Phenolic compounds. Enzymatic oxidation. Wastewater. Coffee fruits.



## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	11
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	49
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	51
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO</b> .....	67
	<b>ARTIGO 1 Enzymatic oxidation of phenolic compounds in coffee processing wastewater</b> .....	67
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	69
<b>2</b>	<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	74
<b>3</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	82
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONS</b> .....	97
	<b>REFERENCES</b> .....	99

## **PRIMEIRA PARTE**

### **APRESENTAÇÃO**

Somente as citações bibliográficas que aparecem na introdução, no referencial teórico e nas considerações finais constam nas referências bibliográficas.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item artigo.

## 1 INTRODUÇÃO

Preservação e conservação ambiental são temas de extrema importância nos dias atuais, e a água é um dos recursos naturais que vem sendo tema de muitas discussões. O desenvolvimento da agroindústria nos últimos anos trouxe com ele grandes problemas a respeito da quantidade de resíduos gerados por este setor, além de grandes volumes de água utilizados.

O café é uma das principais culturas de plantação em crescimento em todo o mundo e é uma das bebidas populares mais consumidas (BISHT; SISODIA, 2010; SELVAMURUGAN; DORAISAMY; MAHESWARI, 2010). O Brasil é o maior produtor e exportador de café e o segundo maior consumidor do produto (BRASIL, 2013). O café é processado por via úmida ou por via seca. O método de processamento via úmida apesar de reduzir o custo de secagem dos grãos e proporcionar uma bebida de maior qualidade, gera grandes volumes de águas residuárias ricas em materiais orgânicos e inorgânicos com alto poder poluente, além de uma grande quantidade de sólidos sedimentáveis, açúcares, proteínas, compostos fenólicos, elevada demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO).

Os compostos fenólicos são altamente tóxicos e alguns deles quando liberados no meio ambiente podem se acumular em águas subterrâneas e superficiais e no solo. Além disso, podem bioacumular-se nas diferentes cadeias alimentares, mesmo em baixas concentrações, sendo persistentes no meio ambiente e tóxicos aos microrganismos no tratamento biológico.

Algumas alternativas são propostas para a destinação e/ou diminuição da água residuária do processamento do café, como a implantação de lagoas anaeróbicas, filtros anaeróbicos, reatores, entre outros. Porém, como cada alternativa apresenta diversas limitações ou desvantagens, vários aspectos devem ser levados em consideração para a escolha do melhor método.

Alguns métodos são ineficazes na remoção de poluentes específicos em águas residuárias tais como os compostos fenólicos, e por esta razão, mais atenção tem sido dada ao desenvolvimento de alternativas e/ou tecnologias complementares.

Dentro deste contexto, destaca-se a aplicação de biocatalisadores que ainda não são utilizados no tratamento de águas residuárias provenientes do processamento do café, os quais poderiam ser empregados reduzindo a carga de compostos fenólicos, a fim de diminuir a toxicidade aos microrganismos no tratamento biológico, enquanto que como uma tecnologia complementar removeriam estes compostos biorefratários.

A utilização de enzimas provenientes de microrganismos ou plantas no tratamento de efluentes e na remoção de poluentes orgânicos mostra-se uma alternativa promissora devido ao seu apelo ecológico. Vantagens dos processos enzimáticos sobre os processos convencionais incluem: aplicação sobre uma ampla faixa de compostos orgânicos, incluindo compostos biorefratários; ação sobre, ou na presença de muitas substâncias tóxicas para os microrganismos; custo reduzido de implementação e operação; independência da aclimação da biomassa; ausência de geração da biomassa; além do fácil processo de controle e do mínimo impacto ambiental.

As peroxidases podem catalisar a oxidação de compostos fenólicos na presença de peróxido de hidrogênio, formando radicais. A fonte vegetal de peroxidase mais relatada na literatura é a raiz-forte (horseradish peroxidase - HPR). A disponibilidade limitada da planta eleva os custos de produção da enzima e inviabilizam economicamente a sua utilização no tratamento de efluentes líquidos para remover compostos biorefratários. Portanto, há um interesse crescente por novas fontes desta enzima e por processos de obtenção de baixo custo que possibilitem a sua utilização como biocatalisador ambiental.

Em contrapartida, no Brasil, cascas de grãos de soja, ricas em peroxidase, representam um resíduo gerado em abundância na industrialização de alimentos, o que torna favorável o emprego deste resíduo como fonte de enzima peroxidase em bioprocessos e em outras aplicações.

Além de cascas de soja, em trabalhos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa, a raiz do nabo apresentou-se como uma fonte rica em peroxidase. Portanto, além das cascas, também utilizou-se a raiz do nabo como fonte desta enzima.

### **1.1 Objetivo geral**

Identificar e quantificar os compostos fenólicos da água residuária do processamento do café (ARC), avaliar diferentes fontes de peroxidase na oxidação do ácido cafeico e na oxidação dos compostos fenólicos da ARC, na presença e ausência de aditivos químicos.

### **1.2 Objetivos específicos**

- a) identificar e quantificar os compostos fenólicos na ARC;
- b) avaliar o potencial de oxidação do ácido cafeico por peroxidase de nabo;
- c) definir alguns parâmetros reacionais importantes na oxidação do ácido cafeico pela peroxidase de nabo como tempo de reação, pH, concentração de peróxido de hidrogênio e de enzima;
- d) realizar a oxidação do ácido cafeico com diferentes fontes de peroxidase;
- e) realizar a oxidação da ARC com diferentes fontes de peroxidase.

- f) Avaliar a influência de aditivos como o polietilenoglicol e o surfactante Triton X-100 na oxidação da ARC.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Considerações gerais sobre o café

A Etiópia é o país onde o café se originou e, posteriormente, ele teria migrado para Arábia, em data não estabelecida. Admite-se, contudo, que já no século XV os árabes tomavam café, cabendo a eles a exclusividade da lavoura até o século XVII. Assim, considerando-se esta a primeira região em que o uso do café se difundiu em larga escala, pode-se dizer que a denominação de uma de suas principais espécies comerciais – *Coffea arabica* – é bastante apropriada (FERRÃO, 2004).

A entrada das primeiras sementes de café plantadas no Brasil deu-se em 1727, por intermédio de Francisco de Melo Palheta, sargento-mor, oficial de linha do Exército Português, que na época veio ao Brasil a fim de resolver questões de fronteiras (FERRÃO, 2004).

O café é uma das principais culturas de plantação em crescimento em todo o mundo, e é uma das bebidas populares mais consumidas (BISHT; SISODIA, 2010; SELVAMURUGAN; DORAISAMY; MAHESWARI, 2010). Somente nos Estados Unidos, existem 108 milhões de consumidores de café, e esses números representam apenas uma fração da população global, um grande número de pessoas que incorporam o café como uma parte importante em suas práticas culturais (BISHT; SISODIA, 2010). Cerca de 60 países tropicais e subtropicais produzem café extensivamente, sendo para alguns deles o principal produto de exportação agrícola (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

O café, no Brasil, destaca-se econômica e socialmente desde a chegada das primeiras mudas e diante de sua rápida adaptação ao solo e clima, o produto adquiriu importância no mercado, transformando-se em um dos principais itens

de exportação, desde o Império até os dias atuais (BRASIL, 2013). É um dos produtos agrícolas de grande importância para o estado de Minas Gerais e para o país, e é sem dúvida de notória importância e expressividade para sua economia no que diz respeito ao mercado de trabalho e à geração de empregos diretos e indiretos, geração de impostos e fixação de mão de obra no meio rural, proporcionando melhoria nas condições financeiras regionais (RIGUEIRA et al., 2007).

Devido à diversidade de regiões ocupadas pela cultura do café, o país produz tipos variados do produto, fato que possibilita atender às diferentes demandas mundiais, referentes ao paladar e até aos preços (BRASIL, 2013).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, sendo responsável por 35% da produção mundial, e segundo maior consumidor do produto, apresentando, atualmente, um parque cafeeiro estimado em 2,3 milhões de hectares. São cerca de 287 mil produtores que, fazendo parte de associações e cooperativas, distribuem-se em 15 estados: Acre, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo. Com dimensões continentais, o país possui uma variedade de climas, relevos, altitudes e latitudes que permitem a produção de uma ampla gama de tipos e qualidades de cafés (BRASIL, 2013; DUARTE; PEREIRA; FARAH, 2010).

A safra de 2013 foi de 49,15 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado, dos quais 38,29 milhões da espécie Arábica e 10,86 milhões da espécie Conilon. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2012), a primeira estimativa para a produção da safra cafeeira (espécies arábica e conilon) em 2014, indica que o país deverá colher entre 46,53 e 50,15 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado.

A bebida de café é conhecida como um estimulante, propriedade atribuída principalmente à cafeína, entretanto, o número de compostos químicos

identificados nesta bebida é grande e alguns deles têm muitos atributos benéficos. Além disso, os subprodutos da indústria do café, que são em muitos casos não tratados adequadamente e, portanto causam uma preocupação do ponto de vista ambiental, são também uma fonte potencial de compostos com propriedades funcionais (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

## **2.2 Composição do fruto do cafeeiro**

O fruto do cafeeiro consiste de uma casca exterior lisa resistente ou pericarpo, geralmente verde em frutos verdes, mas que torna-se vermelho-violeta ou vermelho escuro quando maduro. O pericarpo cobre a polpa macia amarelada, fibrosa e doce, ou mesocarpo. Esta é seguida por uma camada de mucilagem (também chamada de camada de pectina) translúcida, incolor, fina, viscosa e altamente hidratada. Então, existe um endocarpo fino de cor amarelada também chamado de pergaminho. Finalmente, uma película prateada cobre cada hemisfério do grão de café (endosperma) (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012). Os componentes do fruto do cafeeiro são mostrados na Figura 1.

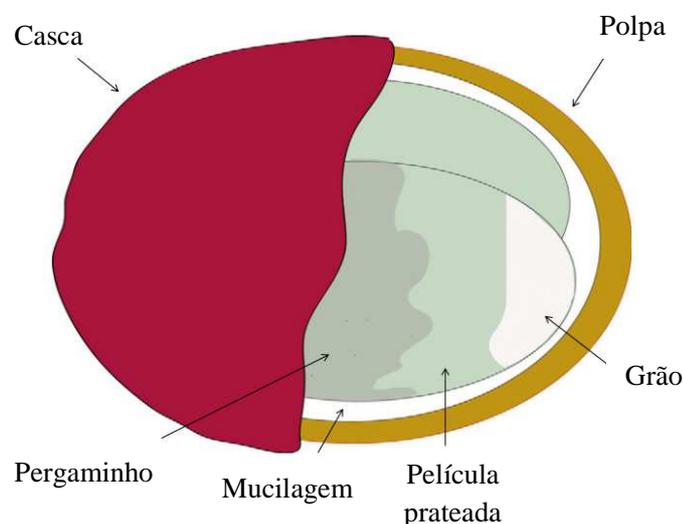


Figura 1 Componentes do fruto do cafeeiro  
 Fonte: Esquivel e Jiménez (2012)

Com base na literatura, observa-se uma grande diversidade sobre a composição química dos componentes do fruto do cafeeiro. Brum (2007) avaliou os teores dos constituintes da polpa em  $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  de matéria seca, sendo: 25,90 de celulose; 16,48 de lignina insolúvel; 1,07 de lignina solúvel; 26,60 de hemiceluloses; 9,65 de cinzas; 3,90 de tanino condensado; 1,85 de nitrogênio; 0,16 de fósforo; 3,65 de potássio; 0,30 de cálcio; 0,07 de magnésio; 0,18 de enxofre. Para o pergaminho os níveis em  $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  de matéria seca foram: 41,20 de celulose; 20,49 de lignina insolúvel; 1,50 de lignina solúvel; 34,77 de hemiceluloses; 1,37 de cinza; 0,70 de tanino condensado; 0,59 de nitrogênio; 0,02 de fósforo; 0,38 de potássio; 0,14 de cálcio; 0,03 de magnésio; 0,06 de enxofre.

De acordo com a revisão de Murthy e Naidu (2012), os componentes orgânicos presentes na polpa de café (em peso seco) incluem celulose (63%), lignina (17%), proteínas (11,5%), hemiceluloses (2,3%), taninos (1,80 a 8,56%),

substâncias pécnicas (6,5%), açúcares redutores (12,4%), açúcares não redutores (2,0%), cafeína (1,3%), ácido clorogênico (2,6%) e ácido cafeico (1,6%).

Informações sobre os taninos na polpa de café são algumas vezes contraditórias e os dados que estão disponíveis são difíceis de interpretar, uma vez que diferentes métodos analíticos têm sido utilizados. Dependendo do tipo de cultivar, o conteúdo de taninos também pode diferir (PANDEY et al., 2000).

Parra et al. (2008) determinaram a composição química da casca dos frutos do cafeeiro melosa em g 100 g<sup>-1</sup> de matéria seca sendo: 9,69 de proteína bruta; 5,95 de matéria mineral; 85,80 de matéria orgânica; 39,37 de fibra detergente neutro; 31,36 de fibra detergente ácido; 1,34 de extrato etéreo; 7,39 de hemicelulose; 8,69 de lignina; 0,30 de cálcio; 0,13 de fósforo total; 0,66 de cafeína; 0,92 de taninos.

Pode haver diferenças nos teores dos constituintes da polpa e das cascas de café, dependendo da eficiência e do modo de processamento, da variedade de culturas, das condições de cultivo, tal como, tipo de solo, etc. (PANDEY et al., 2000).

A mucilagem é composta de 84,2% de água, 8,9% de proteína, 4,1% de açúcar, 0,9% de substâncias pécnicas e 0,7% de cinzas (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

O pergaminho é composto por 40 a 49% de  $\alpha$ -celulose, 25 a 32% de hemicelulose, 33 a 35% de lignina e 0,5 a 1,0% de cinzas (BEKALO; REINHARDT, 2010).

A película prateada pode ser facilmente encontrada como um subproduto do processamento dos frutos do cafeeiro em plantas de torrefação do café, e é atualmente utilizada como combustível ou recomendados como ingrediente funcional para compostagem devido a baixa quantidade de gorduras e açúcares redutores, alto teor de fibras dietéticas solúveis (60%) e marcada atividade antioxidante (BORRELLI et al., 2004).

A caracterização de compostos fenólicos na polpa de café vem sendo estudada e vários tipos de fenóis foram encontrados, como os de baixo peso molecular e taninos, os quais são responsáveis por efeitos anti-nutritivos ou tóxicos quando esta polpa foi testada como ração animal (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1991; RAMIREZ-MARTINEZ, 1988).

É bem conhecido que o processamento pós-colheita tem efeitos pronunciados sobre a composição química de sementes de café, especialmente em componentes solúveis em água tais como açúcares, cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos (SMITH, 1985). Enquanto taninos condensados são os principais compostos fenólicos encontrados na polpa de café, nas sementes, os ácidos clorogênicos estão presentes como uma grande família de compostos fenólicos que representam 6 a 12% dos constituintes do café em massa (FARAH et al., 2006) e são conhecidos por serem responsáveis pela adstringência e pigmentação do café (FARAH; DONANGELO, 2006). Esses ácidos são compostos fenólicos formados pela esterificação de determinados ácidos hidroxicinâmicos, tais como, ácido cafeico, ferúlico e p-cumárico com o ácido quínico. Os principais subgrupos de isômeros de ácidos clorogênicos são os ácidos cafeoilquínicos, feruloilquínicos, dicafeoilquínicos e, em menor quantidade, p-cumaroilquínicos (CLIFFORD, 1999; TRUGO; MACRAE, 1984). Outros compostos fenólicos, tais como taninos, lignanas e antocianinas também estão presentes nas sementes de café, embora em pequenas quantidades (FARAH; DONANGELO, 2006).

Duarte, Pereira e Farah (2010) compararam a composição de alguns tipos de ácidos clorogênicos em sementes de café verdes processados por via úmida e pelo método semi-seco. Os autores observaram que apesar do perfil de distribuição das classes de ácidos clorogênicos em amostras de cafés processados pelo método semi-seco tenha sido semelhante aos processados por via úmida, em média, os processados por via úmida apresentam teores totais de

ácidos clorogênicos significativamente mais altos do que os processados pelo método semi-seco. Esta diferença foi observada em todas as classes de ácidos clorogênicos, com exceção do ácido dicafeoilquínico.

O conteúdo total de ácido clorogênico em grãos de café verde pode variar de acordo com a genética (espécie e cultivar), grau de maturação e, menos importante, as práticas agrícolas, clima e solo. Além disso, esses níveis também podem variar de acordo com a metodologia de análise empregada (FARAH; DONAGELO, 2006). Não só o conteúdo total de ácido clorogênico, mas a sua composição também pode variar consideravelmente durante a maturação dos frutos. Considerando as variações entre espécies e cultivares, um aumento no teor total de ácido clorogênico é observado com a maturação (CLIFFORD; KASI, 1987). Em um certo estágio antes da completa maturação, o conteúdo de ácido clorogênico começa a cair devido a oxidação. Deste ponto em diante, uma associação inversa entre os níveis de ácido clorogênico e a maturação dos frutos de café é observado (FARAH; DONAGELO, 2006).

O mais alto teor de ácido clorogênico no café *Canephora* comparado com o café *Arabica* tem sido amplamente relatado (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1991; FARAH; DONANGELO, 2006). Os ácidos hidroxicinâmicos mais comuns em café são os ácidos cafeico, seguido do ácido ferúlico e do p-cumárico (CLIFFORD et al., 2003).

Ramirez-Martinez (1988), mediante a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, estudou a caracterização de compostos fenólicos na polpa de café e o ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) foi o principal constituinte (42,2%), seguido da epicatequina (21,6%), catequina (2,2%), rutina (2,1%), ácido protocatecuico (1,6%) e ácido ferúlico (1,0%). O autor observou que estes teores não devem ser considerados como valores absolutos, já que o conteúdo dos compostos na polpa de café pode variar de tempos em tempos.

Ramirez-Coronel et al. (2004) quantificaram e caracterizaram os compostos fenólicos presentes na polpa fresca de café, sendo que os que apresentaram os maiores teores em  $\text{g kg}^{-1}$  de matéria seca foram: ácido cafeoilquínico (11,8), ácido p-cumaroilquínico (0,6) e derivados dos ácidos cafeoilquínicos (2,4) respectivamente, seguido dos flavonoides com 0,6 e antocianidinas com 0,4. Para os flavan-3-óis os níveis ( $\text{g kg}^{-1}$  de matéria seca) foram de 0,2 para os monômeros e 20,1 para as protocianidinas.

A presença de cafeína, taninos e outros fenólicos na polpa do fruto do cafeeiro, embora em pequenas quantidades, tem causado sérios problemas de poluição ambiental, uma vez que estes compostos são altamente tóxicos (PANDEY et al., 2000).

### **2.3 Processamento pós-colheita do café**

O método escolhido para preparar o grão de café nos países produtores depende das espécies cultivadas, das condições e dos recursos de cada região (GONZALEZ-RIOS et al., 2007).

O processamento dos frutos do cafeeiro pode ser de duas formas: processamento por via seca ou via úmida (Figura 2). No processamento via seca os frutos são secos na íntegra dando origem ao café natural (também chamado de café coco ou de terreiro). Após o recebimento do café colhido, este passa por um processo de limpeza para a separação de impurezas, como folhas, paus, pedras, terra e selecionado nos seus diversos estágios de maturação (verde, cereja, coco e passa). Esta limpeza, geralmente, é feita com a realização da lavagem do café, utilizando-se lavadores de alvenaria ou metálicos pré-fabricados gerando uma pequena parte de resíduos. Posteriormente, o café passa pela etapa de secagem em terreiros ou secadores, porém devido à heterogeneidade da secagem e conseqüentemente presença de umidade, pode o

produto final apresentar variação da qualidade devido à presença de toxinas de fungos, como por exemplo, o *Aspergillus flavus* (BORÉM, 2008).

O processamento por via úmida consiste na utilização de água no processo de lavagem, separação e retirada da casca (exocarpo) e da mucilagem (mesocarpo), dando origem aos cafés descascados, despulpados e desmucilados (PRADO; CAMPOS, 2008). Além de fazer uso do lavador/separador, usam-se também descascador, peneiras de separação, tanques de fermentação e/ou desmucilador (PIMENTA, 2003).

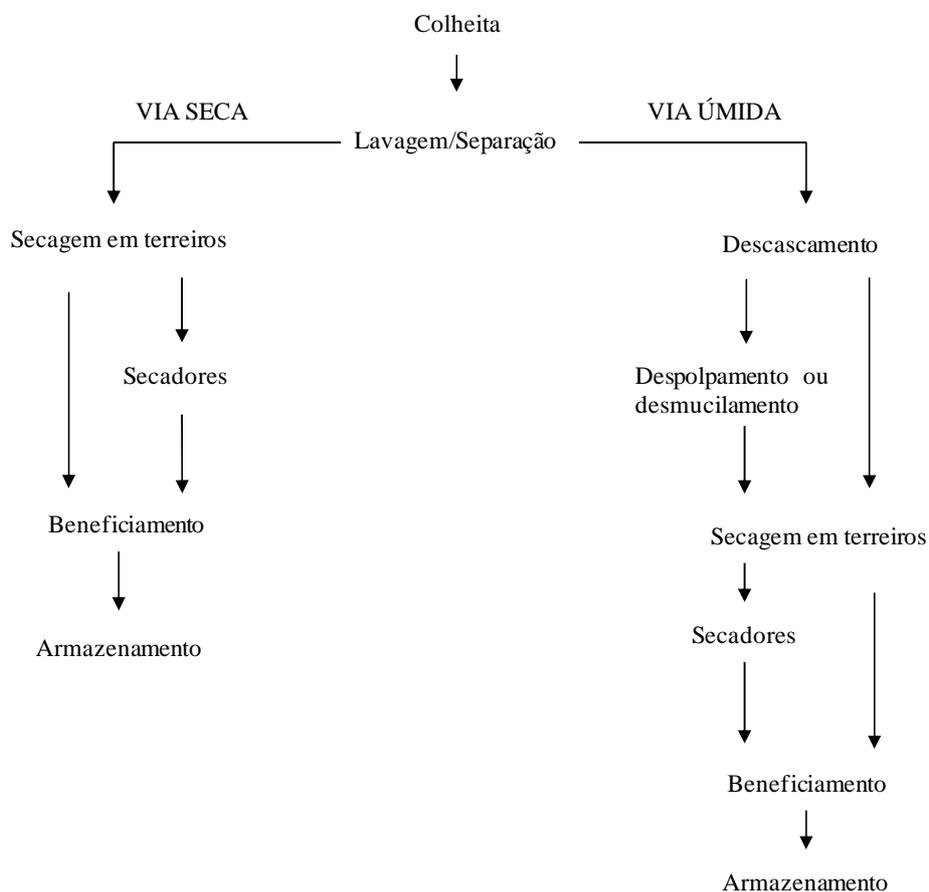


Figura 2 Sequências de operações dos tipos de processamento pós-colheita do café

Fonte: Pimenta (2003)

A primeira etapa do processo de lavagem visa à eliminação de impurezas contidas no café colhido assim como no processamento via seca. A etapa seguinte consiste na separação dos cafés verdes e cereja do café seco ou “bóia”, nome dado por se tratar de um processo em que envolve a densidade do café, logo o café seco acaba boiando na água enquanto os cafés verdes e os cereja afundam. Com isso já se ganha em qualidade, visto que cafés de diferentes teores de água serão secos separadamente (MATIELLO et al., 2005).

Quando se faz o processo de descascamento, há uma separação dos frutos cerejas (frutos que serão descascados) e dos frutos verdes (MATIELLO et al., 2005). O descascador utilizado no processamento via úmida são máquinas que pressionam os frutos (cereja e verde) contra um cilindro de chapa metálica, contendo "mamilos", e um encosto de borracha, fazendo com que as cascas e os grãos dos frutos cerejas saiam por um lado, enquanto os frutos verdes que não rompem suas cascas, por tê-las bem aderidas, acabam saindo por outro (BÁRTHOLO; GUIMARÃES, 1997; MATIELLO, 1999; MATIELLO et al., 2005).

A seguir, os frutos cerejas descascados e as cascas passam por outro cilindro coberto por uma lâmina de cobre, com mamilos, que aprisionam os grãos e os pressionam em um movimento rotativo contra uma barra de borracha, separando assim os grãos ainda com um pouco de mucilagem de um lado, e a polpa com casca e parte da mucilagem do outro (MATIELLO et al., 2005).

O despulpamento é o processo de retirada da mucilagem através de um tanque de fermentação, onde o café após ser descascado, permanece neste tanque de 12 a 36 horas juntamente com a água. A mucilagem é rica em açúcares que possibilitam o desenvolvimento de microrganismos nos grãos, podendo depreciar sua qualidade (MOREIRA, 1999). Nesta etapa, a mucilagem é hidrolisada por enzimas dos tecidos do café e por microrganismos encontrados nas cascas dos frutos (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

O desmucilamento também é um processo de retirada da mucilagem, porém ocorre de forma mecânica, sendo que logo após o descascamento o café passa pelo desmucilador, que retira a mucilagem por atrito entre os grãos e a parede do implemento e ainda pela injeção de água sob pressão (LEITE, 2007). No final da fermentação, os grãos são lavados e secos (DUARTE; PEREIRA; FARAH, 2010). É um processo ainda pouco usado no Brasil, mas que vem

ganhando mais adeptos devido a sujeitar os grãos de café a menores fermentações (PIMENTA, 2003).

O processamento via seca, geralmente utilizado para o café Robusta, é tecnologicamente mais simples do que o processamento via úmida, que é geralmente usado para os grãos de café Arábica (GONZALEZ-RIOS et al., 2007).

A maior vantagem da despulpa completa (retirada da casca, polpa e mucilagem) é evitar a fermentação e o desenvolvimento de fungos nos grãos, que prejudicam a qualidade da bebida do café (MOREIRA, 1999).

#### **2.4 O efluente do processamento úmido do café**

A geração de resíduos e subprodutos é inerente em qualquer setor produtivo. Os setores agro-industriais e alimentícios produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos quanto sólidos. Entre os produtos mais comercializados no mundo, destaca-se o café, sendo superado apenas pelo petróleo e, portanto, a indústria do café é responsável pela geração de grande quantidade de resíduos, como as polpas, cascas e efluentes (MUSSATO et al., 2011; NABAIS et al., 2008), representando uma ameaça ao meio ambiente devido a disposição insegura destes resíduos, que levam a uma poluição da água e da terra em torno das unidades de tratamento (MURTHY; NAIDU, 2012).

O processamento via úmida resulta em um café de qualidade superior quando comparado ao processamento via seca. Atualmente na Índia, cerca de 75% a 80% do café Arábica e 15% a 20% do café Robusta são processados por este método (SELVAMURUGAN et al., 2010). Apesar das inúmeras vantagens como redução dos custos e do espaço de secagem, este tipo de processamento utiliza uma grande quantidade de água nas suas diferentes fases. De acordo com Delgado e Barois (1999), para cada tonelada de grãos de café processados são

consumidos, em média, 4.000 L de água. O efluente resultante é rico em sólidos suspensos totais e dissolvidos contendo uma grande variedade de compostos orgânicos, tais como cafeína, açúcares (frutose, galactose e glicose), proteínas, pectinas e compostos fenólicos (ácidos clorogênico, cafeico e taninos). Devido à alta concentração de poluentes, a sua disposição diretamente em corpos d'água naturais sem tratamento prévio tornou-se indesejável, pois além de poluir o corpo hídrico receptor pode ser perigoso à vida aquática e à saúde humana (BRUNO; OLIVEIRA, 2008; DEVI; SINGH; KUMAR, 2008; GONÇALVES et al., 2008; SELVAMURUGAN; DORAISAMY; MAHESWARI, 2010).

Haddis e Devi (2008) avaliaram a carga poluente das águas residuárias geradas por uma planta de processamento de café na Etiópia, seu efeito em corpos d'água localizado nas proximidades, além do efeito sobre a saúde das comunidades que residem na vizinhança. Todos os parâmetros analisados como pH, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos totais, fosfato e nitrato, excederam os limites estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde. Os autores relataram muitos problemas de saúde graves entre os moradores de áreas próximas, como sensações de tontura, irritações nos olhos, ouvidos e pele, dores no estômago, náuseas e problemas respiratórios.

Segundo Fia et al. (2007), o lançamento de resíduos orgânicos em corpos d'água leva à depleção do oxigênio dissolvido no meio, devido à utilização desse gás pelos microrganismos, durante a decomposição aeróbica. Este decréscimo na concentração do oxigênio dissolvido pode ser fatal para peixes e outros animais aquáticos, assim como originar odores desagradáveis, caracterizando um impacto ambiental que tem concorrido para a piora na qualidade das águas superficiais.

Existem poucas informações sobre vários aspectos das águas residuárias proveniente do processamento úmido dos frutos do cafeeiro, e pouco se conhece

sobre as características físicas, químicas e biológicas dessas águas e sobre o impacto de tais efluentes no meio ambiente e na saúde humana (HADDIS; DEVI, 2008). Apesar de pouco se conhecer sobre as características deste efluente, espera-se que este possua muito dos componentes encontrados na polpa, devido à pressão exercida nos frutos para descascamento dos grãos (GONÇALVES, 2006).

Estudos realizados na distribuição dos macrocomponentes do fruto do cafeeiro do tipo cereja, desde o início do processamento pós-colheita até a sua infusão, permitem constatar que somente 6% do peso do fruto fresco são aproveitados na preparação da bebida. Os 94% restantes, constituídos por água e subprodutos do processo de beneficiamento, na maioria dos casos não recuperados, podem ser fonte de contaminação do meio ambiente (LO MONACO, 2005).

O Brasil enfrenta sérios problemas em relação ao destino final dos vários tipos de resíduos gerados no processamento via úmida dos frutos do cafeeiro, tais como os líquidos (água de lavagem, da despulpa e da desmucilagem) e os sólidos (polpa úmida e casca) (CABANELLAS, 2004).

Um dos resíduos gerados em grande quantidade durante o processamento via úmida do café, as cascas, contêm compostos como taninos, cafeína e compostos fenólicos os quais limitam sua aplicação caracterizando um sério problema de disposição em países produtores de café (PANDEY et al., 2000; SOARES et al., 2000).

Selvamurugan et al. (2010) realizaram algumas análises químicas e bioquímicas de amostras de água residuária do processamento úmido do fruto do cafeeiro e encontraram teores em  $\text{mg L}^{-1}$  de 1.130 a 1.380 de sólidos solúveis totais; 2.390 a 2.820 de sólidos suspensos totais; 3.520 a 4.200 de sólidos totais; 6.420 a 8.840 de DQO; 3.800 a 4.780 de DBO; 125,8 a 173, 2 de nitrogênio; 4,4

a 6,8 de fósforo; 20,4 a 45,8 de potássio; 67,8 a 92,0 de cálcio; 42,5 a 62,1 de magnésio e 7,8 a 13,8 de sódio.

Fia et al. (2010) registraram teores mais elevados de DQO e DBO ( $\text{mg L}^{-1}$ ), 47.071 e 13.471, respectivamente. A concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) dos compostos fenólicos totais, nitrogênio total, fósforo total e potássio foram de 127, 228, 30 e 686, respectivamente. Os teores mais elevados comparados aos de Selvamurugan et al. (2010) provavelmente se deve ao fato de que a água residuária utilizada por Fia et al. (2010) era recirculada em todo o processo, acarretando em um aumento da carga orgânica e de compostos recalcitrantes, como os compostos fenólicos.

## **2.5 Processos utilizados para destinação e/ou diminuição da água residuária do processamento do café**

De acordo com Campos, Prado e Pereira (2010), devido a severa legislação vigente, tanto estadual quanto federal, o lançamento das águas residuárias do processamento do café em corpos hídricos receptores sem devido tratamento prévio é impraticável, uma vez que na maioria dos casos este efluente não atende a nenhum parâmetro de lançamento. Vários trabalhos têm buscado alternativas para destinação e/ou diminuição da água residuária do processamento do café, a fim de atender as crescentes exigências dos órgãos fiscalizadores ambientais. Entretanto, vários aspectos devem ser considerados, uma vez que este efluente possui composição variada, sendo de extrema importância o conhecimento das suas características para uma máxima eficiência do processo sem causar danos ao meio ambiente.

Entre as alternativas utilizadas pode-se citar: lagoas anaeróbicas, reatores anaeróbicos, fertirrigação, recirculação, uso de filtros orgânicos e disposição da água no solo (MELO, 2009).

### **2.5.1 Lagoas anaeróbicas**

Os sistemas anaeróbicos de tratamento de águas residuárias vêm sendo frequentemente utilizados, e nestes processos a decomposição da matéria orgânica e ou inorgânica ocorre na ausência de oxigênio molecular por microrganismos facultativos ou anaeróbicos que a degradam e a utilizam como fonte de alimento (BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

Esta alternativa de tratamento de efluentes está entre as mais simples e eficientes na remoção de matéria orgânica e de macronutrientes, como o nitrogênio e o fósforo, além de apresentar outras vantagens, tais como custo de investimento e manutenção relativamente baixo. Apesar destas vantagens, é uma opção que demanda grandes áreas planas para sua construção (SPERLING, 1996b).

Para implantação destas lagoas vários aspectos devem ser levados em consideração, desde as características do solo, profundidade do lençol freático, presença de povoados próximos as instalações, até o sentido do vento predominante (MATOS, 2003). Quando somente o uso de lagoas anaeróbicas não são suficientes para que a água possa retornar ao meio ambiente com melhor qualidade, em muitos estabelecimentos uma segunda lagoa é colocada, conhecida como lagoa facultativa. Esta última por sua vez, diferencia-se da lagoa anaeróbica por ser menos profunda e por operar com menos carga orgânica, permitindo o desenvolvimento de algas na superfície (SPERLING, 1996a).

### **2.5.2 Reator anaeróbico de manta de lodo**

Os reatores anaeróbicos de manta de lodo (UASB do inglês *upflow anaerobic sludge blanket*) são considerados parte do grupo dos reatores

anaeróbicos de fluxo ascendente, que tem sido aplicado no tratamento de efluentes industriais com alto teor de matéria orgânica, em virtude de algumas vantagens técnicas e econômicas, como baixa produção de lodo, possibilidade de utilização do biogás como combustível, baixo requisito de área, entre outros (BRUNO; OLIVEIRA, 2008; CHERNICHARO, 1997; SPERLING, 1996a). O funcionamento de um reator UASB baseia-se na entrada do afluente na parte inferior do reator prosseguindo em fluxo ascendente até a parte superior do sistema, atravessando três estágios: o leito de lodo, a manta de lodo (biomassa menos densa) e o separador trifásico, onde há a separação dos sólidos em suspensão do biogás (CHERNICHARO, 1997).

As águas residuárias do processamento do café contêm compostos fenólicos geralmente em tais concentrações, que atuam como inibidores da bioatividade de microrganismos em sistemas biológicos. Portanto, o controle da concentração destes compostos no reator é crítica e de vital importância (VEERESH; KUMAR; MEHROTRA, 2005).

### **2.5.3 Fertirrigação**

A reutilização das águas residuárias na irrigação da lavoura tem sido utilizada principalmente devido ao baixo custo da água e ao aproveitamento dos macro e micronutrientes presentes, os quais substituem parte da adubação química. Entretanto, para implantação deste sistema é fundamental que se verifique dois aspectos importantes, que são a salinidade da água e a impermeabilidade do solo. Ambos devem ser analisados conjuntamente, para a determinação do potencial de salinização e sodificação, fatores estes que podem trazer esterilidade do solo.

Entre as vantagens deste método está o aproveitamento da água, o suprimento de parte dos nutrientes essenciais às plantas e a utilização do solo

como tratamento da água residuária. Entretanto, como desvantagens pode-se citar a necessidade de um sistema de irrigação, maior possibilidade de incidência de pragas e doenças, salinização e sodificação do solo, além do gasto com o equipamento e com entupimento de bicos e bocais (MELO, 2009).

#### **2.5.4 Recirculação da água residuária do processamento do café no processo pós-colheita**

O processamento via úmida do café traz como uma desvantagem a utilização de grandes volumes de água, cerca de 4.000 L para cada tonelada de grãos de café processados (DELGADO; BAROIS, 1999), e com o intuito de minimizar o uso deste recurso natural, muitos produtores estão optando pela recirculação da água residuária em todo o processamento (MATOS; CABANELLAS; BRASIL, 2006).

Apesar de ser uma técnica mais fácil de ser aplicada devido ao seu baixo custo e a não necessidade de grande estrutura, quando se faz a recirculação da água ocorre um expressivo aumento na concentração de material suspenso e em solução, podendo comprometer a qualidade final do produto, uma vez que a água em recirculação pode ser veiculadora de fungos e contaminantes. Portanto, para que a recirculação da água não cause uma depreciação dos grãos que ainda serão beneficiados, é de extrema importância que a água residuária passe por um tratamento prévio de curta duração de forma a possibilitar a obtenção de um produto de boa qualidade e com economia de água (MATOS; CABANELLAS; BRASIL, 2006). Além disso, após essa água residuária ser recirculada, ela deve ser submetida a outros processos de tratamento a fim de dar um destino ecologicamente correto para este efluente (MELO, 2009).

### **2.5.5 Filtros orgânicos**

Os filtros orgânicos são muito utilizados se o produtor tem como objetivo reutilizar a água em um sistema de irrigação localizada (por exemplo, o gotejamento) a fim de não ocorrer um entupimento exagerado (MELO, 2009).

A água residuária do processamento do café é muito rica em sólidos em suspensão e dissolvidos e, portanto, não é recomendado a utilização de filtros convencionais de areia dado à sua rápida colmatação superficial e ao impedimento do fluxo normal da água residuária, tornando-se necessária a troca contínua do material filtrante. Desta forma, a busca por materiais orgânicos filtrantes alternativos é uma opção interessante, e entre eles pode-se destacar os subprodutos de atividades agropecuárias e industriais, devido a sua disponibilidade e baixo custo para aquisição (BRANDÃO et al., 2000).

### **2.5.6 Disposição da água residuária do processamento do café no solo**

Entre as várias alternativas propostas para o tratamento das águas residuárias do processamento do café, a disposição deste efluente no solo é a mais usada. O objetivo de se utilizar o solo como meio de tratamento de águas residuárias está ligado ao aproveitamento do filtro natural constituído pelas plantas e pelos microrganismos que, juntamente com suas propriedades de adsorção química e física, possibilitam a remoção de material orgânico e inorgânico presentes nesses efluentes (HUBBARD et al., 1987). Entretanto, para se utilizar deste método é extremamente importante fazer o uso de alguma técnica anteriormente citada para não haver contaminação do meio ambiente por saturação (MELO, 2009).

As principais vantagens deste método está no uso de pequenas áreas, pouca dependência da declividade, baixo custo de implementação, operação e

manutenção, construção simples, entre outros. Entretanto, algumas desvantagens são inevitáveis, como a exalação de odores, possibilidade de desenvolvimento de insetos causadores de doenças, dependência de algumas características do solo, possibilidade de contaminação do lençol freático, alterações físicas e químicas no solo, além de ser dependente da qualidade da água residuária (MELO, 2009).

Acerca destas considerações, ressalta-se as diferentes possibilidades de destinação e/ou tratamento de águas residuárias do processamento do café, suas limitações e vantagens, bem como a necessidade de alternativas complementares para a obtenção de uma tecnologia verde e economicamente viável, a que se dispõe o presente trabalho.

## **2.6 Compostos fenólicos em águas residuárias**

Os compostos fenólicos são uma das maiores classes de metabólicos secundários de plantas envolvidos na defesa contra radiação ultravioleta e na adaptação a condições de estresse ambiental, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Quimicamente, podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxilas. Os compostos fenólicos presentes nos alimentos abrangem ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e cumarinas (MORAES; COLLA, 2006; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

Duas classes de ácidos fenólicos podem ser distinguidas, os derivados do ácido benzoico e os derivados dos ácidos cinâmicos (Figura 3). O conteúdo de ácido hidroxibenzoico em plantas comestíveis é geralmente muito baixo, com exceção de algumas frutas vermelhas, rabanete preto e cebola. Devido a estes ácidos serem encontrados em apenas algumas plantas consumidas pelos seres humanos, eles não têm sido extensivamente estudados e atualmente não são considerados de grande interesse nutricional. Os ácidos hidroxicinâmicos são mais comuns que os hidroxibenzoicos e consistem principalmente dos ácidos p-



LINDSTROM, 1984), devido ao alto grau de toxicidade, bioacumulação nas diferentes cadeias alimentares, mesmo em baixas concentrações e persistência no ambiente, além de ser altamente tóxicos aos microrganismos no tratamento biológico (GONÇALVES et al., 2008; NIELSON et al., 1991; OHLENBUSCH; KUMKE; FRIMMEL, 2000; PUIG; BARCELÓ, 1996). Se essas substâncias forem liberadas no meio ambiente elas podem se acumular em águas superficiais e subterrâneas e no solo (CONIGLIO et al., 2008; GIANFREDA et al., 2003).

O impacto ambiental e a toxicidade destes compostos fenólicos e seus derivados pode variar dependendo do número, tipo e posição dos grupos substituintes no anel do fenol. Muitos deles não são apenas tóxicos em baixas concentrações, mas são também possíveis cancerígenos e desreguladores endócrinos. Portanto, a remoção de tais compostos a partir de uma instalação industrial, antes da sua disposição final é necessária (GONZALEZ; AGOSTINI; MILRAD, 2008; SAKURAI; MASUDA; SAKAKIBARA, 2003; STEEVENSZ et al., 2009).

A Resolução nº 430 do CONAMA, de 13/5/2011, dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Esta resolução estabelece que o controle dos teores máximos de compostos fenólicos em corpos de água é sujeito à análise de “fenóis totais”. Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (2011), os efluentes de quaisquer fontes poluidoras somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, em corpos de água se apresentarem concentrações máximas de fenóis totais de 0,5 mg L<sup>-1</sup>.

Campos, Prado e Pereira (2010) caracterizaram as águas residuárias do processamento do café e encontraram a presença de compostos fenólicos (teor médio de 954,2 mg L<sup>-1</sup>), que ultrapassaram a resolução nº 430 do CONAMA. Segundo os autores, estes compostos são considerados tóxicos, atuando como

inibidores das atividades biológicas de microrganismos e de organismos vegetais e animais (peixes, crustáceos, entre outros), e em excesso, podem interferir no tratamento biológico destes efluentes, inibindo as bactérias e outros microrganismos presentes. O fenol em uma concentração igual ou superior a 1 mg mL<sup>-1</sup> pode afetar a vida aquática (VEERESH; KUMAR; MEHROTRA, 2005).

Bruno e Oliveira (2008) encontraram concentrações médias de fenóis totais na água residuária do beneficiamento de café por via úmida de 80 a 97 mg L<sup>-1</sup>, que excede o permitido para lançamento de efluentes. Fia et al. (2010) também encontraram uma concentração elevada de compostos fenólicos nas águas do processamento dos frutos do cafeeiro, 127,00 mg L<sup>-1</sup>, que ultrapassa o limite permitido.

## **2.7 Uso de enzimas na oxidação de compostos fenólicos**

As tecnologias de tratamento de águas residuárias convencionais que são adotadas em países industrializados são muito caras para construir, operar e manter. Além disso, para cumprir com as normas ambientais rigorosas e para restauração de um ambiente seguro, tornou-se indispensável encontrar tecnologias de tratamento menos dispendiosas e facilmente adaptáveis para estes efluentes (DEVI; SINGH; KUMAR, 2008).

A remoção de compostos fenólicos de águas residuárias pode ser feita por processos físico-químicos ou biológicos. Alguns processos físico-químicos empregados incluem adsorção em carvão ativado, oxidação química, ozonização, sonicação, fotodegradação e oxidação eletrolítica (SONG et al., 2003). Apesar da maioria destes métodos ser eficaz, eles apresentam algumas desvantagens, como elevado custo, purificação incompleta, formação de subprodutos perigosos, baixa eficiência e aplicabilidade limitada a altas

concentrações de fenóis (DIAO et al., 2011; HUSAIN; HUSAIN, 2008; HUSAIN; HUSAIN; KULSHRESTHA, 2009; LIU et al., 2002). Os tratamentos biológicos também sofrem algumas limitações como formação de lodo, reação lenta e formação de produtos secundários que podem ser mais tóxicos (ASHRAF; HUSAIN, 2010).

A aplicação de enzimas para remover contaminantes ambientais e industriais tem sido estudada nos últimos 20 anos. As reações realizadas utilizando técnicas baseadas em enzimas são caracterizadas por uma alta eficiência e seletividade e são significativamente mais benignas para o meio ambiente quando comparadas com os métodos puramente químicos de remediação ambiental (SZATKOWSKI et al., 2011).

O uso de peroxidases (E.C. 1.11.1.7) para remover compostos fenólicos de soluções aquosas foi inicialmente proposto por Klibanov e colaboradores (KLIBANOV et al., 1980; KLIBANOV; MORRIS, 1981) e, desde então, o método tem sido amplamente investigado (AKHTAR; HUSAIN, 2006; AL-ANSARI et al., 2010; ASHRAF; HUSAIN, 2009, 2010; DIAO et al., 2011; QUINTANILLA-GUERRERO et al., 2008).

A biocatálise é a aplicação de enzimas livres ou de células íntegras como agentes catalisadores (BEILEN; LI, 2002). Cada vez mais é reconhecido o uso das enzimas em processos de remediação para tratamento de poluentes específicos. Estas podem atuar em compostos recalcitrantes, para removê-los por precipitação ou transformação em outros produtos inócuos (DURÁN; ESPOSITO, 2000). Podem também mudar as características de um determinado rejeito para torná-lo mais receptivo ao tratamento, ou auxiliar na bioconversão dos rejeitos em produtos de maior valor agregado (KARAM; NICELL, 1997).

Vantagens potenciais dos processos enzimáticos sobre os tratamentos convencionais são: custo reduzido de implementação e operação; operação ao nível traços de compostos orgânicos, ou sobre compostos não removidos por

processos físico-químicos existentes; redução no consumo de agentes oxidantes e ausência de materiais adsorventes para serem dispostos (NICELL et al., 1992); aplicação sobre uma ampla faixa de concentração de contaminantes; ação sobre materiais recalcitrantes; fácil processo de controle e um mínimo impacto ambiental (BÓDALO et al., 2006b; KARAM; NICELL, 1997).

Por estas razões, mais atenção tem sido dada ao desenvolvimento de tecnologias alternativas e/ou complementares para a remoção de poluentes orgânicos tóxicos em águas residuárias (HEJRI; SABOORA, 2009). As considerações apresentadas acima podem viabilizar o uso de processos enzimáticos em substituição aos processos convencionais ou, ainda, favorecer sua utilização em conjunto com os mesmos.

### **2.7.1 Peroxidases**

Peroxidases são oxidoredutases que possuem especificidade por uma ampla variedade de substratos aromáticos, como fenóis, polifenóis, aminas aromáticas primárias e poliaminas aromáticas primárias. Essas enzimas podem ser encontradas em microrganismos, plantas e também em mamíferos. A função biológica das peroxidases envolve síntese de várias biomoléculas e também a detoxificação por meio da destruição de  $H_2O_2$  (VELDE; RANTWIJK; SHELDON, 2001).

As peroxidases são empregadas na indústria devido às suas propriedades catalíticas, à versatilidade de reconhecer diversos substratos e à termoestabilidade. Apresentam aplicações na área de síntese orgânica, remoção de compostos fenólicos em resíduos industriais, construção e aplicação de biossensores, imunoenaios enzimáticos e diminuição de resíduos poluentes de indústria de tecidos, que utilizam estas enzimas em processos de descoloração

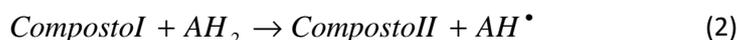
(LOUGHLIN, 2000; MACIEL; GOUVÊA; PASTORE, 2006, 2007; MILAND; SMYTH; FAGAIN, 1996).

A peroxidase de raiz forte ou horseradish peroxidase é a mais conhecida e mais estudada até o presente momento. Trata-se de uma glicoproteína globular com massa molecular de  $42.000 \text{ g mol}^{-1}$ , que tem uma parte proteica (apoenzima) de, aproximadamente,  $34.000 \text{ g mol}^{-1}$  e o restante é composto pelo grupo prostético (tipo heme) que contém o cofator ligado fortemente ao sítio ativo da enzima. Nos vegetais superiores, o cofator ferro no seu estado de oxidação +3 encontra-se ligado a uma molécula de porfirina, compondo o grupo heme, que promove a doação de elétrons na reação de oxidação dos seus substratos aromáticos (DUNFORD, 1999; FORGIARINI, 2006).

Os compostos fenólicos são oxidados pela peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio, formando radicais. Em seguida, os radicais reagem rapidamente formando polímeros insolúveis, que podem ser facilmente removidos (KLIBANOV; TU; SCOTT, 1983), enquanto o sobrenadante resultante torna-se livre de compostos fenólicos, com cheiro mais suave, menos turvo e também menos tóxico (BUCHANAN; NICELL, 1998).

A reação de polimerização de fenóis é baseada principalmente no mecanismo de reação de radicais livres (BUCHANAN; NICELL, 1998; NICELL, 1994), e tem sido alvo de pesquisas como uma tecnologia promissora para o tratamento de águas residuárias contendo compostos fenólicos.

A reação em que as peroxidases catalisam a redução do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou outro peróxido orgânico, enquanto um doador de elétrons ( $\text{AH}_2$ ) é oxidado, ocorre em múltiplas etapas, como mostrado a seguir.



No primeiro estágio do processo catalítico ocorre a reação do sítio ativo com o peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é reduzido produzindo água e a enzima é oxidada formando o composto I, uma forma intermediária reativa que apresenta um estado de oxidação mais alto em comparação com a enzima nativa. No segundo estágio da reação, o composto I oxida uma molécula de substrato ( $AH_2$ ), gerando um substrato radicalar e o composto II. Finalmente, o composto II é reduzido por uma segunda molécula de substrato, fazendo com que a enzima retorne a sua forma inicial (HINER et al., 2001).

Os radicais livres formados durante o ciclo ( $AH^\bullet$ ) difundem-se do sítio ativo da enzima para o meio da solução onde eles se acoplam para formar dímeros. Se esses dímeros são solúveis, eles se tornam substratos para outro ciclo enzimático formando oligômeros superiores. O ciclo continua até que os polímeros gerados alcançam seu limite de solubilidade e precipitam da solução (DUNFORD, 1999). Estes polímeros podem ser facilmente removidos por filtração, sedimentação ou centrifugação (ASHRAF; HUSAIN, 2009; KLIBANOV et al., 1980). Acredita-se que a precipitação destes produtos poliméricos seja acompanhada pela remoção de fenóis e outros compostos aromáticos relacionados presentes em águas residuárias (AKHTAR; HUSAIN, 2006).

A maioria das moléculas poliaromáticas solúveis produzidas apresenta características de substrato da enzima, sendo novamente oxidadas pela reação. Conseqüentemente, a demanda de  $H_2O_2$  para a reação global de um substrato aromático é sempre maior do que o previsto pela estequiometria da reação. O

resultado subsequente desta oxidação é a formação de cadeias ainda maiores com solubilidade reduzida (NICELL et al., 1992).

Apesar da reação de polimerização de fenóis apresentar um enorme potencial para remediação de soluções aquosas contaminadas por compostos fenólicos, a sua aplicação é dificultada pela baixa estabilidade operacional da peroxidase como resultado da inativação da enzima, o que aumenta os custos do tratamento. Esta é considerada a principal desvantagem das pesquisas enzimáticas atuais (KIM; CHAE; CHU, 2007).

Klibanov, Tu e Scott (1983) sugeriram que a inativação ocorre durante a reação enzimática devido às interações dos radicais com o sítio ativo da enzima. Nakamoto e Machida (1992), por outro lado, relataram que a inativação da enzima é um resultado do produto polimérico final que adsorve a enzima e co-precipita com ela impedindo o acesso do substrato ao sítio ativo. Outra forma possível de inativação da enzima é devido ao excesso de peróxido de hidrogênio (ARNAO et al., 1990; BAYNTON et al., 1994; WRIGHT; NICELL, 1999). Entre esses processos, o que vai ser dominante em determinada situação depende muito da concentração específica da enzima, peróxido de hidrogênio e substratos redutores (por exemplo, o fenol) (AL-ANSARI et al., 2010).

Outros inconvenientes podem limitar o uso de enzimas em aplicações práticas e remediação de ambientes contaminados. Em ambientes naturais, desvantagens que podem impedir ou diminuir o potencial catalítico dos catalisadores enzimáticos pode depender tanto dos poluentes a serem transformados quanto das enzimas. Em uma área poluída, misturas ou combinações compostas de muitos contaminantes orgânicos (e inorgânicos), ao invés de um único poluente, estão presentes, e a complexidade da poluição pode implicar em possíveis efeitos sinérgicos positivos ou negativos sobre a eficiência da enzima. As enzimas podem reduzir ou até mesmo perder a sua atividade após a transformação de poluentes ou podem apresentar uma baixa estabilidade e

sobrevivência sob condições ambientais muitas vezes adversas (RAO et al., 2010).

Para aumentar a eficiência e a relação custo-eficácia do tratamento enzimático, vários aditivos foram testados devido à capacidade de minimizar a inativação das enzimas. Estes estudos demonstram que a oxidação de fenóis catalisada por peroxidases pode ser melhorada através da adição de aditivos tais como surfactantes (AL-ANSARI et al., 2010; GUANGLEI et al., 2009; KIM; CHAE; CHU, 2007; ZHANG, L. et al., 2012; ZHANG, Y. et al., 2012), polietilenoglicol (PEG) (AL-ANSARI et al., 2010; ASHRAF; HUSAIN, 2009; BÓDALO et al., 2006a, 2007; DIAO et al., 2011; HEJRI; SABOORA, 2009; QUINTANILLA-GUERRERO et al., 2008; YAMADA et al., 2010), quitosana e gelatina (NAKAMOTO; MACHIDA, 1992; WU et al., 1997, 1998).

Acredita-se que o PEG atue como um ‘polímero de sacrifício’: ele desvia os radicais livres gerados durante o processo catalítico impedindo-os de se ligarem covalentemente ao sítio ativo da enzima; alternativamente, ele substitui a enzima na adsorção nos produtos poliméricos sólidos formados durante a reação, devido à sua maior afinidade de partição com os produtos poliméricos comparado as peroxidases (NAKAMOTO; MACHIDA, 1992; WU et al., 1998), impedindo assim que a enzima decante com os sólidos.

Vários estudos sobre os efeitos dos surfactantes nas reações catalisadas enzimaticamente têm sido realizados. Surfactantes são moléculas anfifílicas que possuem partes hidrofóbicas e hidrofílicas. A parte hidrofílica é chamada de cabeça, e a hidrofóbica de cauda. A parte hidrofóbica pode ser constituída por uma única cadeia ou pode conter até quatro cadeias. A cabeça pode ser um grupo polar carregado ou não carregado. De acordo com a natureza dos grupos cabeça, os surfactantes são classificados em aniônicos, catiônicos, não iônicos e zwitterions (anfóteros). Em soluções aquosas os surfactantes podem existir como monômeros (abaixo da concentração micelar crítica) ou sob a forma de micelas

(acima da concentração micelar crítica) e, portanto, o efeito promovido pelo surfactante sobre o comportamento da enzima vai ser dependente da sua forma de organização (BIASUTTI et al., 2008).

Diversos relatos na literatura apontam que a presença de surfactantes podem reduzir as interações entre as enzimas e os produtos da polimerização oxidativa e então, protegê-las da inativação (SAKURAI; MASUDA; SAKAKIBARA, 2003).

Várias possibilidades são consideradas para explicar a capacidade dos surfactantes em suprimir a inativação das enzimas. Os surfactantes, assim como o PEG, poderiam impedir a adsorção da enzima nos produtos poliméricos por se associarem com os produtos. Duas possibilidades são previstas para o comportamento dos surfactantes: ou por particionamento dos produtos formados em quaisquer micelas de surfactante presente ou, alternativamente, por particionamento dos monômeros do surfactante nos agregados do produto, alterando as suas características de superfície de modo que a enzima não adsorva mais (AL-ANSARI et al., 2010).

### **2.7.2 Vegetais utilizados como fonte de peroxidase**

Peroxidases são enzimas solúveis em água e, por isso, são facilmente extraídas homogeneizando a fonte de enzima com água e filtrando o homogeneizado. O filtrado obtido pode ser utilizado diretamente como fonte de enzima bruta de baixa pureza ou pode ser tratado para remover parte das impurezas (REED, 1975).

As peroxidases são encontradas em diversas espécies do reino vegetal e a mais importante, do ponto de vista comercial, é a isolada da raiz forte (*A Armoracia rusticana*) na forma purificada (horseradish peroxidase - HPR). A

raiz forte é geralmente cultivada e colhida em países de clima frio (MACIEL; GOUVÊA; PASTORE, 2006).

A disponibilidade limitada da planta e os custos inerentes aos processos de purificação inviabilizam o uso desta enzima em larga escala. Portanto, é evidente a necessidade da busca de fontes mais acessíveis e a redução do custo de produção destas enzimas, que pode ser obtida otimizando as condições de extração e pela utilização de vegetais contendo alta atividade enzimática, que podem ser aplicados diretamente sem a necessidade de processos dispendiosos de purificação (SILVA et al., 2012).

Fatibello Filho e Vieira (2002) avaliaram o uso de extratos brutos vegetais ricos em peroxidase para a determinação de vários analitos de interesse alimentício, ambiental, farmacêutico, industrial e tecnológico. Os vegetais testados foram pêssego, inhame, mandioca, alcachofra, batata-doce, nabo, rabanete e abobrinha, tendo sido os quatro últimos os que apresentaram maior atividade enzimática. O extrato bruto de jiló também foi utilizado como fonte de peroxidase para a construção de biossensores (OLIVEIRA; VIEIRA, 2006).

Silva et al. (2012) estudaram a obtenção da enzima peroxidase de várias fontes vegetais como o nabo, abobrinha, jiló e batata doce, sendo que a peroxidase de nabo (PEN) apresentou maior atividade enzimática. As melhores condições de extração desta enzima foram padronizadas e o seu potencial na descoloração de corantes têxteis foi avaliado. A PEN se mostrou eficiente na remoção do corante reativo turqueza remazol G 133% (CTR).

O nabo é uma hortaliça anual, de porte herbáceo, pertencente à família Brassicaceae. A parte comestível é a raiz, entretanto, as folhas também são comestíveis e, em alguns lugares, são utilizadas como saladas. O ciclo cultural tem cerca de 40 a 60 dias, na primavera e no verão e de 90 a 100 dias no inverno (PEDRO JÚNIOR et al., 1987).

Além do nabo, a peroxidase de soja tem sido foco de pesquisas para o tratamento de águas residuárias devido suas vastas e baratas fontes comparadas com outras peroxidases, excelente estabilidade térmica, ampla especificidade por substrato e boa adaptabilidade ao ambiente de reação, além da menor susceptibilidade à inativação irreversível por peróxido de hidrogênio comparado a outras peroxidases (AL-ANSARI et al., 2009; MCELDOON; DORDICK, 1996; MCELDOON; POKORA; DORDICK, 1995; STEEVENSZ et al., 2009; WRIGHT; NICELL, 1999).

A soja (*Glycine max* L.) é a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas e corresponde a 49% da área plantada em grãos do país. O aumento da produtividade está associado aos avanços tecnológicos, ao manejo e eficiência dos produtores. O grão é componente essencial na fabricação de rações animais e com uso crescente na alimentação humana encontra-se em franco crescimento (BRASIL, 2013).

O grão de soja constitui uma fonte abundante de peroxidase e novas tecnologias estão sendo desenvolvidas utilizando peroxidase de soja como uma alternativa econômica, de baixo custo para técnicas de oxidação química como: branqueamento de polpa e papel, tratamento de águas residuárias industriais, remediação de solos e sínteses orgânicas (VIERLING; WILCOX, 1996).

A peroxidase de soja (PES) pode ser encontrada ativa em todas as partes da planta de soja, entretanto a atividade nos grãos é muito superior à das folhas e raízes. Nos grãos, a PES encontra-se localizada quase que totalmente nas cascas (99%), e possui a principal função fisiológica de promover uma barreira protetora para o embrião em seu interior.

No Brasil, cascas de grãos de soja, ricas em peroxidase, representam um resíduo gerado em abundância na industrialização de alimentos, representando cerca de 7 a 8% do peso seco do grão, o que torna favorável o emprego deste

resíduo como fonte de enzima peroxidase em bio-processos e em outras aplicações (RESTLE et al., 2004).

Diversos relatos na literatura apontam o uso de peroxidase de soja e de nabo na oxidação de compostos fenólicos: (1) Al-Ansari et al. (2010) avaliaram a oxidação de fenóis em águas residuárias de alcatrão de hulha por extrato bruto de peroxidase de cascas de soja na presença de vários aditivos, e encontraram uma oxidação superior a 95%; (2) Hejri e Saboor (2009) demonstraram que a peroxidase de cascas de soja foi efetiva na eliminação de compostos fenólicos de águas residuárias sintéticas; (3) Quintanilla-Guerrero et al. (2008) compararam o potencial de oxidação de soluções fenólicas sintéticas por peroxidase de nabo livre e imobilizada, e a peroxidase de nabo imobilizada apresentou uma porcentagem de remoção de 95%, superior à peroxidase livre (90%); (4) Duarte-Vázquez et al. (2002) obtiveram 85% de eficiência na remoção de derivados de fenóis em águas residuárias sintéticas com peroxidase de nabo, e quando na presença de PEG, essa eficiência aumentou para 95%.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processamento por via úmida dos frutos do cafeeiro apresenta inúmeras vantagens comparado ao processamento por via seca. Entretanto, gera grandes volumes de águas residuárias (ARC) ricas em compostos fenólicos de alto poder poluente, havendo a necessidade de tratamento deste efluente antes do seu descarte em corpos hídricos receptores. As peroxidases apresentam um grande potencial na oxidação de compostos fenólicos e, portanto, o tratamento enzimático de ARC pode ser empregado como alternativa aos tratamentos convencionais, ou em conjunto com os mesmos.

Neste trabalho observou-se que o ácido cafeico é o principal composto fenólico encontrado na ARC, seguido da catequina e galocatequina. O elevado teor de compostos fenólicos totais ( $233,56 \text{ mg L}^{-1}$ ) encontrado na ARC além de exceder os limites estabelecidos pelo CONAMA ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), trata-se de uma concentração que afeta a atividade dos microrganismos em um tratamento biológico (BOLAÑOS et al., 2001), justificando a necessidade de remoção destes compostos.

A peroxidase de nabo é eficiente na oxidação do ácido cafeico, apresentando uma oxidação de 51,07% em apenas 15 minutos de reação, o que faz da oxidação enzimática um método atrativo, uma vez que os tratamentos convencionais requerem longos períodos de tempo. No entanto, a eficiência deste catalisador é dependente de alguns parâmetros tais como, pH, concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e enzima utilizadas no ensaio.

Após a padronização dos parâmetros ótimos para o melhor desempenho do catalisador foram comparados os potenciais de oxidação de várias fontes enzimáticas, e entre elas a peroxidase de nabo apresentou potencial de oxidação do ácido cafeico (75,99%) superior à peroxidase extraída das cascas de soja

(64,28%), e às enzimas comerciais horseradish peroxidase (67,55%) e peroxidase de soja (64,74%), nas mesmas condições de ensaio.

No ensaio de oxidação com a ARC a maior oxidação foi obtida pela enzima comercial horseradish peroxidase (74,37%), seguida da peroxidase de nabo (67,59%), peroxidase extraída das cascas de soja (65,76%) e peroxidase de soja comercial (65,40%). O controle realizado na ausência de enzima apresenta uma oxidação de 59,04%, podendo estar associado a existência de dois mecanismos de oxidação. Apesar disso, estes resultados mostram que o tratamento proposto pode ser eficiente no tratamento de efluentes contendo compostos fenólicos, visto que os tratamentos convencionais apresentam algumas desvantagens.

A adição de polietilenoglicol e Triton X-100 no meio reacional de oxidação da ARC praticamente não altera a oxidação.

## REFERÊNCIAS

- AKHTAR, S.; HUSAIN, Q. Potential applications of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 7, p. 1228-1235, Nov. 2006.
- AL-ANSARI, M. M. et al. Soybean peroxidase-catalyzed oxidative polymerization of phenols in coal-tar wastewater: comparison of additives. **Journal of Environmental Engineering and Science**, Ottawa, v. 27, n. 11, p. 967-975, Oct. 2010.
- AL-ANSARI, M. M. et al. Soybean peroxidase-catalyzed removal of phenylenediamines and benzenediols from water. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 45, n. 4, p. 253-260, Oct. 2009.
- ARNAO, M. B. et al. Kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1041, n. 1, p. 43-47, Oct. 1990.
- ASHRAF, H.; HUSAIN, Q. Removal of  $\alpha$ -naphthol and other phenolic compounds from polluted water by white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase in the presence of an additive, polyethylene glycol. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, New York, v. 14, n. 4, p. 536-542, Sept. 2009.
- ASHRAF, H.; HUSAIN, Q. Use of DEAE cellulose adsorbed and crosslinked white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase for the removal of  $\alpha$ -naphthol in batch and continuous process. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 64, n. 1, p. 27-31, Jan. 2010.
- BÁRTHOLO, G. F.; GUIMARÃES, P. T. G. Cuidados na colheita e preparo do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 33-42, 1997.

BAYNTON, K. T. et al. Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1206, n. 2, p. 272-278, June 1994.

BEILEN, J. B. V.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 4, p. 338-344, Aug. 2002.

BEKALO, S. A.; REINHARDT, H. W. Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard. **Materials and Structures**, New York, v. 43, n. 8, p. 1049-1060, Oct. 2010.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**. 4<sup>th</sup> ed. Heidelberg: Springer, 2009. 1070 p.

BIASUTTI, M. A. et al. Kinetics of reactions catalyzed by enzymes in solutions of surfactants. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 136, n. 1/2, p. 1-24, Jan. 2008.

BISHT, S.; SISODIA, S. S. Coffea arabica: a wonder gift to medical science. **Journal of Natural Pharmaceuticals**, Mumbai, v. 1, n. 1, p. 58-65, Dec. 2010.

BÓDALO, A. et al. Comparison of commercial peroxidases for removing phenol from water solutions. **Chemosphere**, Oxford, v. 63, n. 4, p. 626-632, Apr. 2006a.

BÓDALO, A. et al. Elimination of 4-chlorophenol from water solutions using commercial peroxidases. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, Lausanne, v. 21, n. 3, p. 279-284, Mar. 2007.

BÓDALO, A. et al. Removal of 4-chlorophenol by soybean peroxidase and hydrogen peroxide in a discontinuous tank reactor. **Desalination**, Amsterdam, v. 195, n. 1/3, p. 51-59, Aug. 2006b.

BOLAÑOS, M. L. R. et al. Phenol degradation in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor under mesophilic conditions. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 167-174, 2001.

BORÉM, F. M. Pós colheita do café. In: \_\_\_\_\_. **Processamento do café**. Lavras: UFLA, 2008. p. 127-158.

BORRELLI, R. C. et al. Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 5, p. 1338-1343, Feb. 2004.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. São Paulo: CETESB, 1993. 764 p.

BRANDÃO, V. S. et al. Tratamento de águas residuárias de suinocultura utilizando filtros orgânicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 3, p. 327-333, set./dez. 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Café no Brasil**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais>>. Acesso em: 25 nov. 2013.

BRUM, S. S. **Caracterização e modificação química de resíduos sólidos do beneficiamento do café para produção de novos materiais**. 2007. 152 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

BRUNO, M.; OLIVEIRA, R. A. Tratamento anaeróbio de águas residuárias do beneficiamento de café por via úmida em reatores UASB em dois estágios. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 364-377, abr./jun. 2008.

BUCHANAN, I. D.; NICELL, J. A. Kinetics of peroxidase interactions in the presence of a protective additive. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester, v. 72, n. 1, p. 23-32, May 1998.

CABANELLAS, C. F. G. **Tratamento da água sob recirculação, em escala Laboratorial, na despolpa dos Frutos do cafeeiro**. 2004. 103 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

CAMPOS, C. M. M.; PRADO, M. A. C.; PEREIRA, E. L. Caracterização físico-química, bioquímica e energética da água residuária do café processado por via úmida. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 4, p. 514-524, jul./ago. 2010.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios**. Belo Horizonte: UFMG/DESA, 1997. 246 p.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 372, n. 3, p. 362-372, Mar. 1999.

CLIFFORD, M. N. et al. Hierarchical Scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of Chlorogenic acids. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Washington, v. 51, n. 10, p. 2900-2911, Apr. 2003.

CLIFFORD, M. N.; KASI, T. The influence of coffee bean maturity on the content of chlorogenic acids, caffeine and trigonelline. **Food Chemistry**, Barking, v. 26, n. 1, p. 59-69, Feb. 1987.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. **Food Chemistry**, Barking, v. 40, n. 1, p. 35-42, May 1991.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: café, safra 2012 segunda estimativa, maio 2012**. Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 14 jan. 2014.

CONIGLIO, M. S. et al. Application of *Brassica napus* hairy root cultures for phenol removal from aqueous solutions. **Chemosphere**, Oxford, v. 72, n. 7, p. 1035-1042, July 2008.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, dá outras Providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.

DELGADO, E. A.; BAROIS, I. Lombricompostaje de la pulpa de café em México. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY IN THE COFFEE AGROINDUSTRY, 1., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: UEM, 1999. p. 335-343.

DEVI, R.; SINGH, V.; KUMAR, A. COD and BOD reduction from coffee processing wastewater using Avacado peel carbon. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, n. 6, p. 1853-1860, Apr. 2008.

DIAO, M. et al. Biodepollution of wastewater containing phenolic compounds from leather industry by plant peroxidases. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 22, n. 2, p. 389-396, Apr. 2011.

DUARTE, G. S.; PEREIRA, A. A.; FARAH, A. Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. **Food Chemistry**, Barking, v. 118, n. 3, p. 851-855, Feb. 2010.

DUARTE-VÁZQUEZ, M. A. et al. Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L var purple top white globe) peroxidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester, v. 78, n. 1, p. 42-47, Jan. 2002.

DUNFORD, H. B. **Heme peroxidases**. New York: Wiley-VHC, 1999. 532 p.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase: like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, New York, v. 28, n. 2, p. 83-99, Nov. 2000.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, Barking, v. 46, n. 2, p. 488-495, May 2012.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 23-36, Jan./Mar. 2006.

FARAH, A. et al. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated Arabica coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 54, n. 2, p. 374-381, Jan. 2006.

FATIBELLO FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 455-464, maio 2002.

FERRÃO, A. M. A. **Arquitetura do café**. Campinas: UNICAMP; São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 2004. 296 p.

FIA, R. et al. Coeficientes de degradação da matéria orgânica de água residuária da lavagem e descascamento dos frutos do cafeeiro em condições anóxica e aeróbica. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, MG, v. 15, n. 1, p. 45-54, jan./mar. 2007.

FIA, R. et al. Tratamento das águas do processamento dos frutos do cafeeiro em filtro anaeróbico seguido por sistema alagado construído: II., remoção de nutrientes e compostos fenólicos. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 30, n. 6, p. 1203-1213, dez. 2010.

FORGIARINI, E. **Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima horseradish peroxidase (HRP)**. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

GIANFREDA, L. et al. Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. **Water Research**, Oxford, v. 37, n. 13, p. 3205-3215, July 2003.

GONÇALVES, M. **Caracterização e oxidação dos compostos orgânicos das águas residuárias da despolpa úmida dos frutos do cafeeiro**. 2006. 112 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

GONÇALVES, M. et al. Materiais à base de óxido de ferro para oxidação de compostos presentes no efluente da despolpa do café. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1636-1640, set. 2008.

GONZALEZ, P. S.; AGOSTINI, E.; MILRAD, S. R. Comparison of the removal of 2, 4-dichlorophenol and phenol from polluted water, by peroxidases from tomato hairy roots, and protective effect of polyethylene glycol. **Chemosphere**, Oxford, v. 70, n. 6, p. 982-989, Jan. 2008.

GONZÁLEZ-RÍOS, O. et al. Impact of “ecological” post-harvest processing on the volatile fraction of coffee beans: I., green coffee. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 3/4, p. 289-296, May 2007.

GUANGLEI, J. I. et al. Effects of nonionic surfactant Triton X-100 on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A. **Journal of Environmental Sciences**, Los Angeles, v. 21, n. 11, p. 1486-1490, Nov. 2009.

HADDIS, A.; DEVI, R. Effect of effluent generated from coffee processing plant on the water bodies and human health in its vicinity. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 259-262, Mar. 2008.

HEJRI, S.; SABOORA, A. Removal of phenolic compounds from synthetic wastewaters by enzymatic treatments. **Journal of Science**, Ames, v. 35, n. 1, p. 13-19, July 2009.

HINER, A. N. P. et al. Catalase-like oxygen production by horseradish peroxidase must predominantly be an enzyme-catalyzed reaction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 392, n. 2, p. 295-302, Aug. 2001.

HUBBARD, R. D. et al. Surface runoff and shallow ground water quality as affected by center pivot applied dairy cattle waste. **Transactions of ASAE**, Saint Joseph, v. 30, n. 2, p. 430-437, 1987.

HUSAIN, M.; HUSAIN, Q. Application of redox mediators in the treatment of organic pollutants by using oxidoreductive enzymes: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v. 38, n. 1, p. 1-42, Jan. 2008.

HUSAIN, Q.; HUSAIN, M.; KULSHRESTHA, Y. Remediation and treatment of organopollutants mediated by peroxidases: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 29, n. 2, p. 94-119, June 2009.

KARAM, J.; NICELL, J. Potential application of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, London, v. 69, n. 2, p. 141-153, June 1997.

KIM, E. Y.; CHAE, H. J.; CHU, K. H. Enzymatic oxidation of aqueous pentachlorophenol. **Journal of Environmental Sciences**, Los Angeles, v. 19, n. 9, p. 1032-1036, Jan. 2007.

KLIBANOV, A. M. et al. Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waste waters. **Journal of Applied Biochemistry**, New York, v. 2, p. 414-421, 1980.

KLIBANOV, A. M.; MORRIS, E. D. Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 3, n. 2, p. 119-122, Apr. 1981.

KLIBANOV, A. M.; TU, T. M.; SCOTT, K. P. Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste water. **Science**, London, v. 221, n. 4607, p. 259-261, July 1983.

KRINGSTAD, K. P.; LINDSTROM, K. Spent liquors from pulp bleaching. **Environmental Science and Technology**, New York, v. 18, n. 8, p. 236A-248A, Aug. 1984.

LEITE, S. L. O futuro do café cereja descascado. In: SALVA, T. J. G. (Ed.). **Cafés de qualidade: aspectos tecnológicos, científicos e comerciais**. Campinas: IAC, 2007. p. 167-198.

LIU, J. Z. et al. Increased thermostability and phenol removal efficiency by chemical modified horseradish peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 18, n. 4/6, p. 225-232, Oct. 2002.

LO MONACO, P. A. **Fertirrigação do cafeeiro com águas residuárias da lavagem e despolpa de seus frutos**. 2005. 93 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

LOUGHLIN, W. A. Biotransformation in organic synthesis. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, n. 1, p. 49-62, Aug. 2000.

MACIEL, H. P. F.; GOUVÊA, C. M. C. P.; PASTORE, G. M. Extração e caracterização parcial de peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Ciências e Tecnologias de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 221-225, abr./jun. 2007.

MACIEL, H. P. F.; GOUVÊA, C. M. C. P.; PASTORE, G. M. Obtenção de nova fonte de peroxidase de folha de *Copaifera langsdorffii* Desf com alta atividade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 735-739, out./dez. 2006.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 79, n. 5, p. 727-747, May 2004.

MATOS, A. T. Tratamento e destinação final dos resíduos gerados no beneficiamento do fruto do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Produção integrada de café**. Viçosa, MG: UFV, 2003. p. 647-708.

MATOS, A. T.; CABANELLAS, C. F. G.; BRASIL, M. S. Ensaio de sedimentação em água utilizada no descascamento/despolpa de frutos do cafeeiro. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, MG, v. 14, n. 3, p. 148-155, jul./set. 2006.

MATIELLO, J. B. **Quentes como o café**: indicações de uso de equipamentos, produtos e serviços para a cafeicultura. Rio de Janeiro: MAA/PROCAFÉ, 1999. 140 p.

MATIELLO, J. B. et al. **Cultura de café no Brasil**: novo manual de recomendações. Varginha: MAPA/PORCAFÉ, 2005. 438 p.

MCELDOON, J. P.; DORDICK, J. S. Unusual thermal stability of soybean peroxidase. **Biotechnology Progress**, New York, v. 12, n. 4, p. 555-558, July/Aug. 1996.

MCELDOON, J. P.; POKORA, A. R.; DORDICK, J. S. Lignin peroxidase-type activity of soybean peroxidase. **Enzyme and Microbiology Technology**, New York, v. 17, n. 4, p. 359-365, Apr. 1995.

MELO, A. C. P. **Utilização de água residuária do processo pós-colheita do café na produção de mudas de cafeeiro**. 2009. 48 p. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2009.

MILAND, E.; SMYTH, M. R.; FAGAIN, C. O. Modification of horseradish peroxidase with bifunctional N-hydroxysuccinimide esters: effects on molecular stability. **Enzyme Microbial Technology**, Amsterdam, v. 19, n. 4, p. 242-249, Sept. 1996.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 109-122, nov. 2006.

MOREIRA, A. C. O tesouro redescoberto. **Revista Panorama Rural**, São Paulo, v. 1, n. 6, p. 16-41, 1999.

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

MUSSATTO, S. I. et al. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. **Food and Bioprocess Technology**, Chicago, v. 4, n. 5, p. 661-672, Mar. 2011.

NABAIS, J. M. V. et al. Production of activated carbons from coffee endocarp by CO<sub>2</sub> and steam activation. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 89, n. 3, p. 262-268, Mar. 2008.

NAKAMOTO, S.; MACHIDA, N. Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase-catalyzed reaction using additives. **Water Research**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 49-54, Jan. 1992.

NICELL, J. A. Kinetics of horshadish peroxidase-catalysed polymerization and precipitation of aqueous 4-clorofenol. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, v. 60, n. 2, p. 203-215, 1994.

NICELL, J. A. et al. Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds from wastewater. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 157-164, 1992.

NIELSON, A. H. et al. Distribution, fate persistence of organochlorine compounds formed during production of bleached pulp. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 30, n. 1/2, p. 3-41, 1991.

OHLENBUSCH, G.; KUMKE, M. U.; FRIMMEL, F. H. Sorption of phenols to dissolved organic matter investigated by solid phase microextraction. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 253, n. 1/3, p. 63-74, May 2000.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 932-939, set./out. 2006.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-162, Oct. 2000.

PARRA, A. R. P. et al. Utilização da casca de café na alimentação de suínos nas fases de crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 37, n. 3, p. 433-442, 2008.

PEDRO JÚNIOR, M. J. et al. **Instruções agrícolas para o Estado de São Paulo**. 4. ed. Campinas: UNICAMP, 1987. 231 p.

PIMENTA, C. J. **Qualidade de café**. Lavras: UFLA, 2003. 304 p.

PRADO, M. A. C.; CAMPOS, C. M. M. Produção de biogás no tratamento dos efluentes líquidos do processamento de *Coffea arabica* L. em reator anaeróbico UASB para o potencial aproveitamento na secagem do café. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 938-947, maio/jun. 2008.

PUIG, D.; BARCELÓ, D. Determination of phenolic compounds in water and waste water. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 15, n. 8, p. 362-375, Sept. 1996.

QUINTANILLA-GUERRERO, F. et al. Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, n. 18, p. 8605-8611, Dec. 2008.

RAMIREZ-CORONEL, M. A. et al. Characterization and estimation of Proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by thiolysis-high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 5, p. 1344-1349, Feb. 2004.

RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Phenolic compounds in coffee pulp: quantitative determination by HPLC. **Journal of the Science of Food Agriculture**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 135-144, 1988.

RAO, M. A. et al. Role of enzymes in the remediation of polluted environments. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 10, n. 3, p. 333-353, July 2010.

REED, G. **Enzymes in food processing**: a series of monographs. New York: Academic, 1975. 555 p.

RESTLE, J. et al. Substituição do grão de sorgo por casca de soja na dieta de novilhos terminados em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 4, p. 1009-1015, 2004.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: E. Blücher, 2004. 157 p.

RIGUEIRA, R. J. A. et al. Caracterização da qualidade do café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes condições de secagem e armazenagem. **Revista Engenharia na Agricultura**, Viçosa, MG, v. 15, n. 2, p. 151-167, abr./jun. 2007.

SAKURAI, A.; MASUDA, M.; SAKAKIBARA, M. Effect of surfactants on phenol removal by the method of polymerization and precipitation catalysed by *Coprinus cinereus* peroxidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester, v. 78, n. 9, p. 952-958, Sept. 2003.

SELVAMURUGAN, M.; DORAISAMY, P.; MAHESWARI, M. An integrated treatment system for coffee processing wastewater using anaerobic and aerobic process. **Ecological Engineering**, New York, v. 36, n. 12, p. 1686-1690, Dec. 2010.

SELVAMURUGAN, M. et al. High rate anaerobic treatment of coffee processing wastewater using upflow anaerobic hybrid reactor. **Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering**, Tehran, v. 7, n. 2, p. 129-136, Mar. 2010.

SILVA, M. C. et al. Obtention of plant peroxidase and its potential for the decolorization of the reactive dye Remazol Turquoise G 133%. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 65, n. 4, p. 669-675, 2012.

SMITH, A. W. Agricultural practices. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee chemistry**. Amsterdam: Elsevier Applied Science, 1985. p. 18-23.

SOARES, M. et al. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 35, n. 8, p. 857-861, Mar. 2000.

SONG, H. Y. et al. Treatment of aqueous chlorophenol by phthalic anhydride-modified horseradish peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 22, n. 1/2, p. 37-44, Apr. 2003.

SPERLING, M. von. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**: princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Belo Horizonte: UFMG, 1996a. 246 p.

SPERLING, M. von. **Lagoas de estabilização**: princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Belo Horizonte: UFMG, 1996b. 134 p.

STEEVENSZ, A. et al. Comparison of soybean peroxidase with laccase in the removal of phenol from synthetic and refinery wastewater samples. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester, v. 84, n. 5, p. 761-769, May 2009.

SZATKOWSKI, L. et al. Oxidative dechlorination of halogenated phenols catalyzed by two distinct enzymes: horseradish peroxidase and dehaloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 505, n. 1, p. 22-32, Jan. 2011.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. **Food Chemistry**, Barking, v. 15, n. 3, p. 219-227, 1984.

VEERESH, G. S.; KUMAR, P.; MEHROTRA, I. Treatment of phenol and cresols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review. **Water Research**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 154-170, Jan. 2005.

VELDE, F. van de; RANTWIJK, F. van; SHELDON, R. A. Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 19, n. 6, p. 73-80, Feb. 2001.

VIERLING, R. A.; WILCOX, J. R. Microplate assay for soybean seed coat peroxidase activity. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 24, n. 3, p. 485-494, 1996.

WRIGHT, H.; NICELL, J. A. Characterization of soybean peroxidase for treatment of aqueous phenols. **Bioresource Technology**, New York, v. 70, n. 1, p. 69-79, Oct. 1999.

WU, Y. et al. Comparison of additives in the removal of phenolic compounds by peroxidase-catalyzed polymerization. **Water Research**, Oxford, v. 31, n. 11, p. 2699-2704, Nov. 1997.

WU, Y. et al. A model for the protective effect of additives on the activity of horseradish peroxidase in the removal of phenol. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 22, n. 5, p. 315-322, Apr. 1998.

YAMADA, K. et al. Determination of optimum process parameters for

peroxidase-catalysed treatment of bisphenol A and application to the removal of

bisphenol derivatives. **Environmental Technology**, London, v. 31, n. 3, p. 243-256, Feb. 2010.

ZHANG, L. et al. Enzymatic polymerization of phenol catalyzed by horseradish peroxidase in aqueous micelle system. **European Polymer Journal**, New York, v. 48, n. 3, p. 580-585, Mar. 2012.

ZHANG, Y. et al. Effect of Triton X-100 on the removal of aqueous phenol by laccase analyzed with a combined approach of experiments and molecular docking. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 97, p. 7-12, Sept. 2012.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**ENZYMATIC OXIDATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN COFFEE  
PROCESSING WASTEWATER**

Juliana Arriel Torres<sup>1\*</sup>, Pricila Maria Batista Chagas<sup>1</sup>, Maria Cristina Silva<sup>2</sup>,  
Custódio Donizete dos Santos<sup>1</sup>, Angelita Duarte Corrêa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica, Departamento de Química, Universidade Federal  
de Lavras,  
CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil.

<sup>2</sup>Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais,  
CEP 30421-169, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Corresponding authors

Juliana Arriel Torres, Angelita Duarte Corrêa

Laboratório de Bioquímica, Departamento de Química, Universidade Federal de  
Lavras

CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil.

Phone: +(55) 35 38212293/9822 4347, +(55) 35 38291272

Email: julianaarriel@hotmail.com, angelita@dqi.ufla.br

### ABSTRACT

Peroxidases can be used in the treatment of wastewater containing phenolic compounds. The effluent from the wet processing of coffee fruits contain a high content of these pollutants. This study evaluated the potential use of different peroxidase sources in the oxidation of caffeic acid and of total phenolic compounds in coffee processing wastewater (CPW). The identification and quantification of phenolic compounds in CPW was performed by high performance liquid chromatography and caffeic acid was the major phenolic compound found. Some factors, such as reaction time, pH (2 at 10.6), amount of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (8.0 at  $80 \text{ mmol L}^{-1}$ ) and enzyme ( $0.0673$  at  $31.25 \text{ U mL}^{-1}$ ) were evaluated, in order to determine the optimum conditions for the enzyme performance for maximum oxidation of caffeic acid. The turnip peroxidase (TPE) proved efficient in the oxidation of caffeic acid, reaching an oxidation of 51.05% in just 15 minutes of reaction at pH 8.0 and using  $56 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ . However, in the oxidation of the CPW, the horseradish peroxidase (HPR) was more efficient with  $74.37\% \pm 0.16$  oxidation, followed by TPE with  $67.59\% \pm 0.11$ . The effect of polyethyleneglycol and Triton X-100 dose on the oxidation of CPW was also evaluated and increase in the oxidation were not observed. Enzymatic oxidation presents potential as a viable alternative and/or as a complementary technology in the oxidation of phenolic compounds in CPW.

Keywords: Environmental biocatalysis. Peroxidase. Phenolic compounds. Enzymatic oxidation. Wastewater. Coffee fruits.

## 1 INTRODUCTION

The presence of different aromatic compounds in wastewater from several industries is a matter of great environmental concern (ASHRAF; HUSAIN, 2010b). Phenols and their derivatives occur in the wastewater of many industries, such as coal conversion, oil refining, manufacturing of plastics, paper, pulp, resins, textiles, iron, steel production (ASHRAF; HUSAIN, 2009; LIU et al., 2002) and notably in coffee processing wastewater (CPW) (FIA et al., 2010).

These substances, once released into the environment, may accumulate in groundwater, surface water and soil (CONIGLIO et al., 2008; GIANFREDA et al., 2003). Beyond the high degree of toxicity, bioaccumulation in various food chains, even at low concentrations, and persistence in the environment (RODRIGUES et al., 2010), phenolic compounds are highly recalcitrant and toxic to the microorganisms in the biological treatment. Removal of phenol along with other pollutants from industrial wastewater streams before their discharge into receiving water bodies is thus obligatory (BAJAJ et al., 2008). The CONAMA Resolution N<sup>o</sup> 430 from 05/13/2011 states that any effluents from polluting sources can only be released directly or indirectly into water bodies if their maximum phenol concentration is 0.5 mg L<sup>-1</sup>.

Coffee is a major plantation crop grown worldwide and is one of the most popular beverages consumed throughout the world (SELVAMURUGAN; DORAISAMY; MAHESWARI, 2010). About 60 tropical and subtropical countries produce coffee extensively and, for some of them, it is the main agricultural export product (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012). Brazil, the largest producer and coffee exporter, and the second largest consumer of the product, has currently a coffee crop estimated at 2.3 million hectares. There are about

287.000 producers, part of associations and cooperatives, are distributed in 15 states (BRASIL, 2013).

Coffee is processed either by wet or dry method. The wet method of processing results in a coffee of superior quality, compared to the dry method. Wet processing of coffee uses a lot of water at different stages of its processing. The resultant effluent is rich in total suspended and dissolved solids, containing a wide variety of organic compounds, such as caffeine, sugars and phenolic compounds, unsuitable for direct disposal in soil or waterways (GONÇALVES et al., 2008). There is little information about wastewater from the coffee wet processing, and little is known about the physical, chemical and biological status. If the wastewater emanating from these operations is discharged into natural water bodies without treatment, it will pollute the receiving water body (SHANMUKHAPPA et al., 1998).

Pulping water can be further reused for harvest depulping on the same day, but this results in an increase in organic matter and a decrease in pH. The high acidity of this effluent may deplete the life supporting oxygen from the water bodies it is joining (HADDIS; DEVI, 2008).

The removal of phenolics from wastewater can be achieved either by physico-chemical or biological processes. Some of the physico-chemical processes employed for the removal of phenolic compounds from industrial wastewater include activated carbon adsorption, chemical oxidation, ozonation, sonication, photodegradation and electrolytic oxidation (SONG et al., 2003). However, these methods have their own drawbacks, such as high cost, incomplete purification, formation of hazardous by-products, low efficiency and applicability to a limited concentration range (DIAO et al., 2011; HUSAIN; HUSAIN, 2008; HUSAIN; HUSAIN; KULSHRESTHA, 2009; LIU et al., 2002). Nevertheless, these methods are not suitable for treating moderate to high concentrations of phenols (DIAO et al., 2011). The biological treatment of

aromatic compounds also has several limitations, such as the sludge formation, slow reaction and formation of side products, which at times are even more toxic (ASHRAF; HUSAIN, 2010b).

For these reasons, more attention has been paid the development of alternative and/or complementary technologies for the removal of toxic organic pollutants in wastewater (HEJRI; SABOORA, 2009). It was also found from previous studies that only little work has been done to analyze various aspects of coffee processing, as well as the impact of such effluent on the surrounding environment and human health. Thus, it is necessary to develop economically viable and eco-friendly technologies for handling such type of wastewaters (HADDIS; DEVI, 2008).

The enzymatic method has some advantages over conventional methods of treatment, which include: applicability over a broad range of pH, temperature, salinity and contaminant concentration, action on recalcitrant materials, simplicity in controlling the process and minimal environmental impact (BÓDALO et al., 2006b; KARAM; NICELL, 1997). The application of oxidoreductive enzymes, such as peroxidases, to catalyse the oxidation of aromatic compounds from wastewater has been widely investigated (AKHTAR; HUSAIN, 2006; AL-ANSARI et al., 2010; ASHRAF; HUSAIN; HUSAIN; KULSHRESTHA, 2009; ASHRAF; HUSAIN, 2010b; DIAO et al., 2011; QUINTANILLA-GUERRERO et al., 2008). In the presence of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), which acts as an electron acceptor, peroxidases ( $H_2O_2$  donor oxidoreductase, E.C.1.11.1.7) are able to catalyze the oxidative polymerization of phenolic compounds to form insoluble polymers (WARD et al., 2001).

The involvement of peroxidases in the oxidative polymerization of phenols was previously demonstrated by several authors (BUCHANAN; NICELL, 1997; KLIBANOV et al., 1980; WRIGHT; NICELL, 1999). Most reports on the detoxification of wastewater contaminated with phenols, cresols

and chlorophenols have used horseradish peroxidase (HUSAIN; HUSAIN; KULSHRESTHA, 2009), which is usually cultivated and harvested in cold climate countries (MACIEL; GOUVÊA; PASTORE , 2006). Due to the widespread use of peroxidases, mainly as an environmental biocatalyst, there is a growing interest in new sources of this enzyme (SILVA et al., 2012b). Recently, peroxidases from other sources, such as soybean (AL-ANSARI et al., 2010), turnip (QUINTANILLA-GUERRERO et al., 2008) and bitter melon (AKHTAR; HUSAIN, 2006) have been suggested as alternatives to horseradish.

Although the peroxidase-mediated oxidative coupling process has an enormous potential for the remediation of aqueous solutions contaminated by phenolic compounds, its application is hampered by the low operational stability of peroxidase as a result of enzyme inactivation, which increases treatment costs. Klivanov, Tu and Scott (1983) suggested that this inactivation occurred during the enzymatic reaction, due to the interactions of phenoxy radicals with the enzyme's active site.

On the other hand, Nakamoto and Machida (1992) have reported that enzyme inactivation is a result of the end-product polymer, which adsorbs the enzyme and coprecipitates it, hindering the access of the substrate to the enzyme's active site. Another possible way for the inactivation of the enzyme is due to excess hydrogen peroxide (ARNAO et al., 1990; BAYNTON et al., 1994; WRIGHT; NICELL, 1999). Which of these might be dominant in a given situation depends very much on the specific concentrations of the enzyme, peroxide, and the reducing substrate (e.g. phenol) (AL-ANSARI et al., 2010).

To enhance the efficacy and cost-effectiveness of the enzymatic approach, various additives have been tested for their ability to minimize enzyme inactivation. These studies have shown that the oxidation of phenols catalyzed by peroxidases can be enhanced by adding additives, such as surfactants (AL-ANSARI et al., 2010; GUANGLEI et al., 2009; KIM; CHAE;

CHU, 2007; ZHANG, L. et al., 2012; ZHANG, Y. et al., 2012), polyethylene glycol (PEG) (AL-ANSARI et al., 2010; ASHRAF; HUSAIN, 2009; BÓDALO et al., 2006a, 2007; DIAO et al., 2011; HEJRI; SABOORA, 2009; QUINTANILLA-GUERRERO et al., 2008; YAMADA et al., 2010), among others.

Studies involving the enzymatic removal of phenolic compounds from real effluents are limited, mainly for CPW. In this context, the objectives of this study included the identification and quantification of phenolic compounds from CPW, the evaluation of different peroxidase sources in the degradation of caffeic acid, a phenolic compound, and in the total phenolic oxidation of CPW, with the addition or not of chemical additives.

## **2 MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Chemicals and reagents**

Catalase (EC 1.11.1.6  $\geq 10.000$  units per mg protein) and horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7) were purchased from Sigma-Aldrich. Soybean peroxidase (EC 1.11.1.7) was kindly provided by Bio-Research Products. Polyethylene glycol (average molecular mass of 4000 Da) and Triton X-100 were purchased from Vetec. Acetic acid and methanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

The phenolic standards used were: caffeic acid, gallic acid, galloyl catechin, 3,4-dihydroxybenzene, catechin, chlorogenic acid, epigallocatechin, vanillic acid, epicatechin, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, m-coumaric acid, o-coumaric acid, resveratrol, ellagic acid, salicylic acid, all Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Milli-Q system and nylon membrane were obtained from Millipore (Billerica, MA, USA).

Horseradish peroxidase (HPR) and soybean peroxidase (CSP) were used in aqueous solution (30 mg of the commercial enzyme in 5 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 7.0 and 26 mg of the commercial enzyme in 20 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> citrate phosphate buffer, pH 6.0, respectively). After the preparation, the enzymes were stored at an average temperature of 4 °C.

### **2.2 2.2 Coffee processing wastewater**

#### **2.2.1 Collection**

The coffee processing wastewater (CPW) was obtained on a farm located in Bom Sucesso, Minas Gerais. This water was collected in a storage tank on the farm, where all the processing effluent is mixed. After collecting the samples, the effluent was stored in amber bottles at 4 °C.

### **2.2.2 Identification and quantification of phenolic compounds from CPW**

A high-performance liquid chromatography (HPLC) system was used for separation, identification and quantification of the phenolic compounds present in the wastewater from the coffee fruits processing. Chromatographic analyses were performed using an Agilent HPLC equipment model 1100, equipped with a binary pump, an auto injector and a detector with diode array at a wavelength of 280 nm. The wastewater and the standards were separated on an Ascentis C<sub>18</sub> column (25 cm x 4.6 mm, 5 µm), attached to an Ascentis C<sub>18</sub> pre-column (2 cm x 4.0 mm, 5 µm). The mobile phase was composed of the following solutions: 2% acetic acid (A) and methanol:water:acetic acid (70:28:2 v/v/v) (B). Analyses were performed in a total time of 50 min at 15 °C, in a gradient-type system: 100 % solvent A from 0.01 to 5 min, 70 % solvent A from 5 to 25 min, 60 % solvent A from 25 to 43 min, 55% solvent A from 43 to 50 min. Solvent A was increased to 100%, seeking to maintain a balanced column. The flux used in all tests was 1 mL min<sup>-1</sup> and the injection volume was 20 µL.

The stock standard solutions were prepared in methanol in a concentration range from 0.1 to 127.72 mg L<sup>-1</sup>. Acetic acid and methanol were used to prepare the mobile phase and ultrapure water was obtained by the Milli-Q system.

The wastewater was initially injected into the pre-column to remove impurities that could damage the chromatographic column. The wastewater and the standards were filtered on a 0.45 µm nylon membrane and then injected

directly into the chromatographic system in three replications. The phenolic compounds in the wastewater were identified by comparison with the retention times of the standards. Quantification was performed by the construction of analytical curves.

### **2.3 Obtention of the enzymatic extract**

The enzyme was extracted from turnip roots purchased from the local market. The roots (with peel) were washed in water and cut into small uniform pieces. Turnip roots (30 g) were homogenized in a blender with 100 mL of 0.05 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 6.5, containing 0.2 mol L<sup>-1</sup> NaCl for 30 s. The homogenate was filtered in organza cloth and centrifuged at 10000 x g for 15 min, at 4 °C (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002). The obtained solution was subjected to precipitation by adding cold acetone until reaching 65% (v/v). After a rest from 12 to 14 h, at -18 °C, the homogenate was centrifuged at 11000 x g for 15 min, at 4 °C. The precipitate obtained after the removal of the acetone by a treatment in gridge during 72 h was redissolved in phosphate buffer, pH 7.0 and then used for the studies on phenolic compound oxidation (SILVA et al., 2012a).

To obtain the soybean seed hull extracts, the seeds were immersed in distilled water for 24 h and hull removal was performed manually. The procedure for the extraction of peroxidase was made similarly to the turnip roots, differing only in the amount the plant tissue used, which was 15 g of seed hull.

## 2.4 Enzymatic activity

The enzymatic activity was determined according to Khan and Robinson (1994, with modifications) by using the following reaction medium: 1.5 mL of 1% guaiacol (v/v) (Vetec, 97%, v/v), 0.4 mL of 98 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Vetec, PA), 0.1 mL enzyme (kept in ice bath) and 1.2 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer pH 7.0 for turnip peroxidase (TPE) and horseradish peroxidase (HPR), and 1.2 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> citrate phosphate buffer pH 6.0 for the peroxidase extracted from soybean seed hulls (SHP) and commercial soybean peroxidase (CSP). The reaction was carried out for 3 min at 30 °C in a Spectrovision spectrophotometer coupled to a thermostatic bath.

One unit of peroxidase activity (U) represents the formation of 1 μmol tetraguaiacol per minute of reaction in the assay conditions and it was calculated by using data relative to the linear portion of the curve (KHAN; ROBINSON, 1994).

## 2.5 Reaction time

The first part of this study was to optimize the reaction conditions for the oxidation of caffeic acid in the presence the turnip peroxidase. A caffeic acid solution (2.13 mmol L<sup>-1</sup>) was prepared in 2% ethanol/water. The choice of this phenolic was based on the fact that caffeic acid is one of the major phenolic compounds found in CPW, according to the results of the HPLC analysis in the present study.

Initially, the enzymatic reactions were conducted in phosphate buffer, 0.1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7.0 (1.2 mL), containing: (1) 40 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.4 mL), (2) caffeic acid at a concentration of 2.13 mmol L<sup>-1</sup> (1.5 mL) and 0.1 mL enzymatic solution (16.83 U mL<sup>-1</sup>) and incubated at 30 °C, to estimate the optimum contact

time. Controls were carried out in the absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The reaction mixture was stirred continuously. Aliquots of the reaction mixture were withdrawn at 5 min intervals up to 180 min, and the enzymatic reaction was stopped by adding 0.1 mL catalase solution (1.2 mg of the commercial enzyme in 1.0 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 7.0) (DIAO et al., 2011, with modifications).

The insoluble product was removed by centrifugation at 3000 x g, for 10 min at 25 °C. The residual concentration of caffeic acid was measured by the colorimetric method of Folin and Denis, using caffeic acid as standard (AOAC, 2005). The calculation to determine the oxidized caffeic acid percentage was made according to Eq. (1):

$$\text{Oxidation of caffeic acid (\%)} = \left( \frac{\text{caffeic acid concentration}_{\text{initial}} - \text{caffeic acid concentration}_{\text{final}}}{\text{caffeic acid concentration}_{\text{initial}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Three repetitions were carried out for each treatment.

## 2.6 Effect of pH

2.13 mmol L<sup>-1</sup> (1.5 mL) caffeic acid were incubated with TPE (16.83 U mL<sup>-1</sup>) in the buffers of different pH values (2 to 10.6) in the presence of 40 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.4 mL) for 30 min at 30 °C. The buffers used were citrate phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>, pH 2.0 to 7.0), phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7.0), tris-HCl buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7.0 to 9.0) and glycine-NaOH buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>, pH 10.0 and 10.6). After 30 min, the reaction was stopped by the addition of a catalase solution (1.2 mg of the commercial enzyme in 1.0 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 7.0). The controls were carried out in the absence of enzyme. The insoluble product and the residual concentration of caffeic acid were carried according to item 2.5.

## **2.7 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

2.13 mmol L<sup>-1</sup> (1.5 mL) caffeic acid were incubated with TPE (5.41 U mL<sup>-1</sup>) with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations from 8.0 to 80 mmol L<sup>-1</sup> (0.4 mL) in a 0.1 mol L<sup>-1</sup> tris-HCl buffer, pH 8.0 for 30 min at 30 °C. The enzymatic reaction was stopped by adding 0.1 mL catalase solution (1.2 mg of the commercial enzyme in 1.0 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 7.0). The controls were carried out in the absence of enzyme. The insoluble product and the residual concentration of caffeic acid were carried according to item 2.5.

## **2.8 Effect of enzyme concentration**

2.13 mmol L<sup>-1</sup> (1.5mL) caffeic acid were incubated with increasing concentrations of TPE (0.0673 U mL<sup>-1</sup> to 31.25 U mL<sup>-1</sup>) in the presence 56 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.4 mL) in a 0.1 mol L<sup>-1</sup> tris-HCl buffer, pH 8.0 for 30 min at 30 °C. The enzymatic reaction was stopped by adding 0.1 mL catalase solution (1.2 mg of the commercial enzyme in 1.0 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 7.0). The insoluble product and the residual concentration of caffeic acid were carried according to item 2.5.

## **2.9 Caffeic acid oxidation by different sources of peroxidase**

After optimization of the reaction conditions for the oxidation of caffeic acid by TPE, the assays were carried out proposing the evaluation of the potential of different peroxidase sources: SHP, CSP and HPR on the degradation of caffeic acid, for comparison purposes.

The enzymatic reactions were conducted in a 0.1 mol L<sup>-1</sup> tris-HCl buffer, pH 8.0 (1.2 mL), containing: (1) 56 mmol L<sup>-1</sup> (0.4 mL) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (2) caffeic acid solution at a concentration of 2.13 mmol L<sup>-1</sup> (1.5 mL) and 0.1 mL of peroxidase different sources: peroxidase extracted from soybean seed hulls - SHP (29.93 U mL<sup>-1</sup>), commercial soybean peroxidase - CSP (29.57 U mL<sup>-1</sup>) and horseradish peroxidase - HPR (29.20 U mL<sup>-1</sup>) for 30 min at 30 °C. The enzymatic reaction was stopped by adding 0.1 mL catalase solution (1.2 mg of the commercial enzyme in 1.0 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 7.0). The insoluble product and the residual concentration of caffeic acid were carried according to item 2.5.

#### **2.10 General procedure for the oxidation of CPW**

Wastewater samples were previously centrifuged at 10000 x g for 10 min to remove interfering impurities. The supernatant was analyzed in order to determine the initial concentration of phenolic compounds by the colorimetric method of Folin and Denis, using caffeic acid as standard (AOAC, 2005).

The enzymatic reactions were conducted in a 0.1 mol L<sup>-1</sup> tris-HCl buffer, pH 8.0 (1.2 mL), containing: (1) 56 mmol L<sup>-1</sup> (0.4 mL) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (2) CPW (1.5 mL) and 0.1 mL of peroxidase from different sources: TPE (31.25 U mL<sup>-1</sup>), SHP (29.93 U mL<sup>-1</sup>), CSP (29.57 U mL<sup>-1</sup>) and HPR (29.20 U mL<sup>-1</sup>) at 30 °C. The reaction mixture was stirred continuously during 30 min. The enzymatic reaction was stopped by adding 0.1 mL catalase solution (1.2 mg of the commercial enzyme in 1.0 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 7.0). The controls were carried out in the absence of enzyme and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The insoluble product and the residual concentration of phenolic compounds were carried according to item 2.5.

### **2.11 Effect of PEG and Triton X-100 dose on the oxidation of CPW**

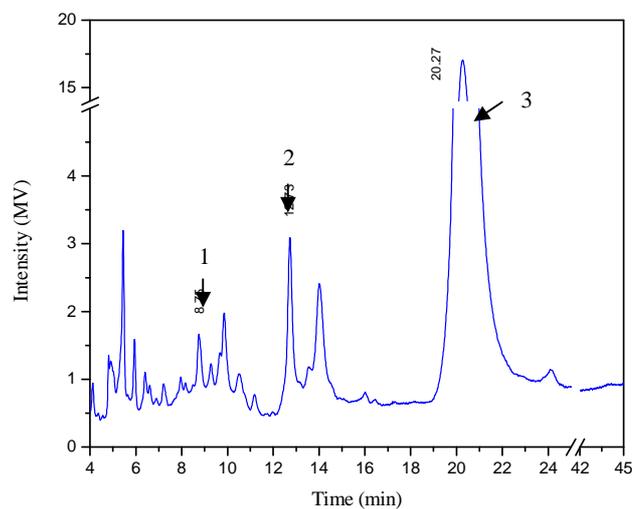
CPW (1.5 mL) was treated by SHP (25.24 U mL<sup>-1</sup>) in the presence of 56 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.4 mL) at concentrations of 0.025; 0.05; 0.10; 0.50 and 1.0 mg mL<sup>-1</sup> (ASHRAF; HUSAIN, 2009; ASHRAF; HUSAIN, 2010a) of PEG and Triton X-100 in a 0.1 mol L<sup>-1</sup> tris-HCl buffer, pH 8.0 at 30 °C for 30 min. The reaction mixture was stirred continuously during 30 min. The enzymatic reaction was stopped by adding 0.1 mL catalase solution (1.2 mg of the commercial enzyme in 1.0 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 7.0). The residual concentration of phenolic compounds was carried according to item 2.5.

### **3 RESULTS AND DISCUSSION**

#### **3.1 Identification and quantification of phenolic compounds in CPW**

The wet method of coffee fruits processing generates large volumes of wastewater rich in various organic and inorganic compounds of high-polluting power. There is little information on the constitution of these effluents, especially in relation to phenolic compounds. In order to identify and quantify the phenolic compounds present in this wastewater (CPW), a sample of the effluent was analyzed by high performance liquid chromatography.

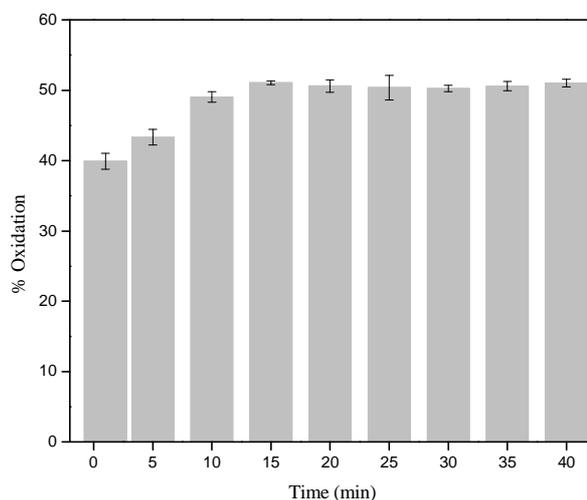
The following phenolic compounds were identified in CPW, in mg L<sup>-1</sup>: caffeic acid (40.08), catechin (8.51) and gallic acid (0.55), the last two are tannin monomers (Graphic 1). It is possible to verify the presence of few other peaks, which were not identified, but which are possibly other phenolic compounds. Caffeic acid was the major phenolic compound found in CPW and was, therefore, chosen for the optimization reactions.



Graphic 1 Chromatogram of phenolic compounds of wastewater from coffee fruits processing. Identification of peaks: 1 galocatechin, 2 – catechin and 3 – caffeic acid

### 3.2 Reaction time

According to Graphic 2, in only 15 min the maximum oxidation of caffeic acid occurred (51.07%) and a further increase in the reaction time had no significant effect on the oxidation. The drastic slowdown may be mainly attributed to the simultaneous decrease of all reacting species or enzyme inactivation (MILAND; SMYTH; FAGAIN, 1996). However, peroxidases are also quickly inactivated through some mechanisms. In treating wastewater, it should be recognized that certain other pollutants may compete for the oxidants ( $O_2$  or  $H_2O_2$ ) (STEEVENSZ et al., 2009).



Graphic 2 Reaction progress on the oxidation of caffeic acid. Reaction conditions: enzyme load -  $16.83 \text{ U mL}^{-1}$ ; concentration in the reaction medium:  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  caffeic acid and  $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$

It is generally observed that peroxidases are faster in oxidizing substrates with predetermined enzyme concentrations (STEEVENSZ et al., 2009), as occurred in the present study. The enzymatic oxidation of phenolic compounds in a short period of time makes this method attractive, since conventional treatments require long periods of time (DUARTE-VÁZQUEZ et al., 2002).

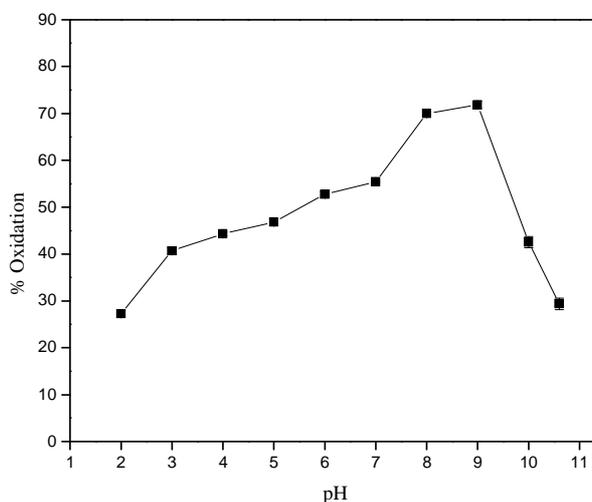
The incubation of TPE with caffeic acid without  $\text{H}_2\text{O}_2$  (control sample) did not result in a change in the concentration of the initial phenolic compound, suggesting that the oxidation is governed only by the peroxidase activity, which was identified by electrophoresis in the crude extract (data not shown). Subsequent experiments were performed for 30 min of reaction time.

Bódalo et al. (2006b) evaluated the removal of 4-chlorophenol ( $2 \text{ mmol L}^{-1}$ ) by soybean peroxidase and  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2 \text{ mmol L}^{-1}$ ) in a discontinuous tank

reactor. The conversion percentage of the phenolic compound, which was also evaluated, exhibited fast kinetics. In only 10 minutes, a conversion of about 99% was attained for an enzyme concentration of  $10^{-4}$  mg mL<sup>-1</sup>.

### 3.3 Effect of pH

In Graphic 3 the effect of different pH values is demonstrated on the oxidation of caffeic acid by TPE. Higher rates of oxidation were observed at pH 8 and 9. The use of pH values close to neutrality has been recommended for the treatment of phenolic effluents. However, at a pH below 5.0 and above 9.0, a decline in the oxidation of caffeic acid was observed. At low pH values, the decrease in caffeic acid oxidation might be attributed to the detachment of the heme prosthetic group from the polypeptide chain, which resulted in the loss of enzyme activity (DEEPA; ARUMUGHAN, 2002).



Graphic 3 Effect of pH on the oxidation of caffeic acid at a concentration of 1 mmol L<sup>-1</sup> in the reaction medium by turnip peroxidase at 16.83 U mL<sup>-1</sup>, at 30 °C for 30 min

The effects of pH on the catalytic efficiencies of different enzymatic coupling reaction systems had been studied extensively and was frequently in the range from 5 to 9 (CONIGLIO et al., 2008). Ashraf and Husain (2009) evaluated the oxidation of  $\alpha$ -naphthol ( $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) by white radish peroxidase. The phenolic compound was oxidized at a pH range from 5.0 to 8.0. Karim and Husain (2009) evaluated the oxidation of bisphenol A ( $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) by bitter gourd peroxidase and also found that, in a pH range from 5.0 to 8.0, it achieved a maximum percentage at pH 7.0.

Máximo et al. (2012) determined the maximum conversion in the concentration of 4-chlorophenol obtained by soybean peroxidase, horseradish peroxidase and artichoke peroxidase as a function of pH. In the case of soybean peroxidase and horseradish peroxidase, the maximum conversion was reached with pH 7.0, while for artichoke peroxidase it was obtained at pH 6.5.

According to Yamada et al. (2010), the optimum pH value depends on experimental parameters, such as the kind of peroxidase and the kind and concentration of phenolic compounds, the position of the substituent groups of some phenols and the additives used to protect the enzymatic activity.

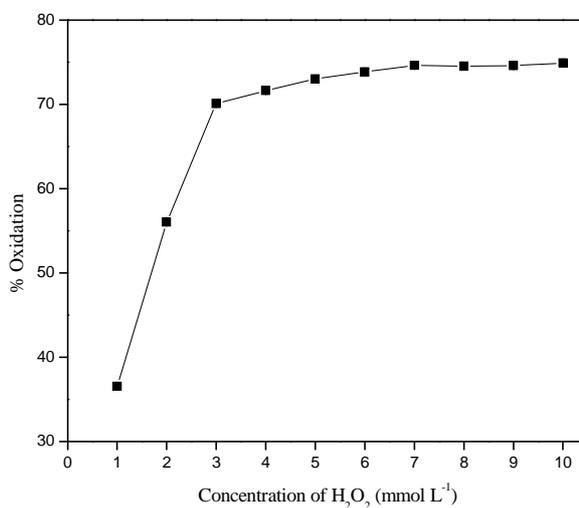
### **3.4 Effect of $\text{H}_2\text{O}_2$**

Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) acts as a co-substrate to activate the enzymatic action of the peroxidase radical. However, the excess of this reagent in the reaction inhibits the enzyme activity and, when present in small quantities, it limits the reaction rate (DUTKA, 1989; MOHAN et al., 2005; WU et al., 1994).

Based on the known mechanism of peroxidases, a minimum hydrogen peroxide: phenol molar ratio of 1: 2 is required for complete conversion. However, it has been demonstrated that some of the dimers produced in the

initial radical coupling stages are also substrates of the enzyme (YU et al., 1994). The radicals diffused from the active sites of peroxidase will link up non-enzymatically to form these dimers. If these dimers are soluble, then they will also be substrates of peroxidase and undergo radicalization by peroxidase, forming higher oligomers. This process will continue until the generated oligomers reach their solubility limit and precipitate in the solutions.  $\text{H}_2\text{O}_2$  is consumed in these series of reactions, since peroxidase can also treat these intermediates (YAMADA et al., 2010). Therefore, as discussed above, this implies that the  $\text{H}_2\text{O}_2$  demand would increase, the peroxide: phenol ratio approaching a limit of 1 for an infinite polymer (STEEVENSZ et al., 2009).

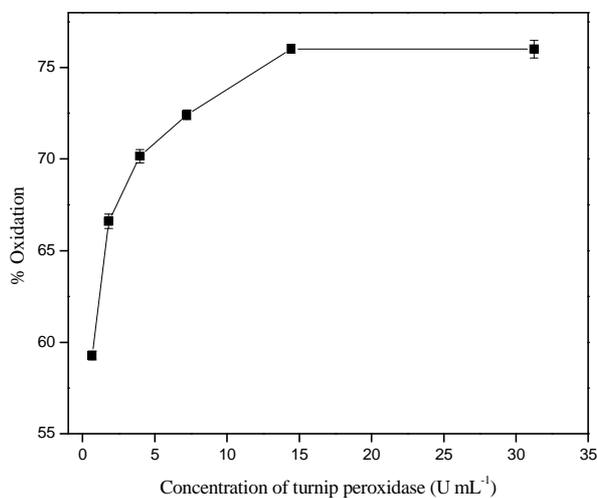
It was observed that for  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations at the range from 3 to 10  $\text{mmol L}^{-1}$  (peroxide:phenol ratio 7:1), there was no significant influence on the performance of the enzyme (Graphic 4). Therefore, the ability of peroxidase to oxidize phenolic compounds was only affected at  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations below 3  $\text{mmol L}^{-1}$ . Controls done in the absence of enzyme to assess the influence of a possible chemical oxidation showed no oxidation percentage.



Graphic 4 Effect of the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the oxidation of caffeic acid at a concentration of 1 mmol L<sup>-1</sup> in the reaction medium by turnip peroxidase at 5.41 U mL<sup>-1</sup>, pH 8.0, at 30 °C for 30 min

### 3.5 Effect of enzyme concentration

Since the biocatalyst has a finite lifetime and the conversion is found to be dependent on the contact time, normally oxidation of phenol is dependent on the amount of catalyst added (ALEMZADEH; NEJATI, 2009). The oxidation of caffeic acid as a function of enzyme concentration is shown in Graphic 5. The increase in the enzyme load is accompanied by an increase in the oxidation of up to 14.43 U mL<sup>-1</sup> (76% phenolic oxidation). When the enzyme concentration increased approximately twice (31.25 U mL<sup>-1</sup>), no influence on the oxidation of the phenolic compound was observed. From these results, it was concluded that high concentrations of enzyme have no significant effects on the oxidation efficiency.



Graphic 5 Effect of the concentration of turnip peroxidase on the oxidation of caffeic acid at a concentration of 1 mmol L<sup>-1</sup> in the reaction medium, pH 8.0, at 30 °C for 30 min

This observation is in agreement with the outcome presented by Karim and Husain (2009). The authors observed that the oxidation of bisphenol A was increased with increasing concentrations of bitter melon peroxidase and its maximum removal was 67% by 0.32 U mL<sup>-1</sup> of peroxidase, and, from this concentration, no increase in the oxidation of bisphenol A was observed.

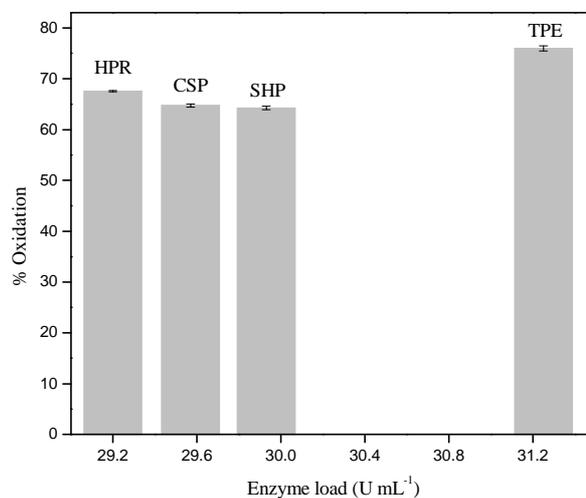
Al-Ansari et al. (2010) also studied the enzymatic oxidation of phenol by soybean peroxidase and, within the enzyme concentrations evaluated by the authors (2 to 14 U mL<sup>-1</sup>), the minimum soybean peroxidase concentration required to achieve 95% oxidation of phenol was 14 U mL<sup>-1</sup>.

Similar results were observed by Kalaiarasan and Palvannan (2014), which studied the effect of enzyme concentration on phenol oxidation. Different concentrations of horseradish peroxidase, from 0.1 to 1 U mL<sup>-1</sup>, were used to compare the efficiency of the stabilized enzyme. It was found that, for 0.1 mmol L<sup>-1</sup> of phenol concentration, increasing enzyme concentrations from 0.1 to 0.9 U

mL<sup>-1</sup> result in the gradual increase in phenol oxidation. A further increase in enzyme concentration has no significant effect on phenol oxidation.

### **3.6 Caffeic acid oxidation by different sources of peroxidase**

A study was conducted to compare the efficiency of the oxidation by different sources of peroxidase. The oxidation of caffeic acid catalyzed by HPR (29.20 U mL<sup>-1</sup>), CSP (29.57 U mL<sup>-1</sup>), SHP (29.93 U mL<sup>-1</sup>) and TPE (31.25 U mL<sup>-1</sup>) are shown in Graphic 6. The highest oxidation (75.99% ± 0.48) was obtained by TPE, followed by HPR (67.55% ± 0.10), CSP (64.74% ± 0.34) and SHP (64.28% ± 0.32). This confirms that the efficiency of peroxidases on catalysis is strongly dependent on the chemical nature of substrates (substrate specificity) and on the botanical source of peroxidase (DIAO et al., 2011). Although CSP has roughly presented the same oxidation of caffeic acid compared with SHP, the latter in turn has the advantage that it is an enzyme extracted from soybean seed hulls, an abundant and cheap residue from soybean-processing industries, which represents a cost reduction, when compared to commercial enzymes normally used, such as HPR and CSP (SILVA et al., 2013).



Graphic 6 Oxidation of caffeic acid by different sources of peroxidase: horseradish peroxidase (HPR), commercial soybean peroxidase (CSP), peroxidase extracted from soybean seed hulls (SHP) and turnip peroxidase (TPE)

TPE presented a higher potential for caffeic acid oxidation when compared to HPR and CSP, without the need for purification. The elimination of purification steps decreases the cost to obtain the enzyme, enabling it to be used as an economically viable alternative in the treatment of wastewaters (SILVA et al., 2012b).

Bódalo et al. (2006a), comparing the action of commercial soybean peroxidase and horseradish peroxidase in the oxidation of phenol, reported that, by employing a concentration of 1800 U mL<sup>-1</sup> for both enzymes, the oxidation efficiency was 41% and 74% for horseradish peroxidase and soybean peroxidase, respectively. Moreover, they observed that soybean peroxidase is slower than horseradish peroxidase, but it is less sensitive to inactivation and/or inhibition effect.

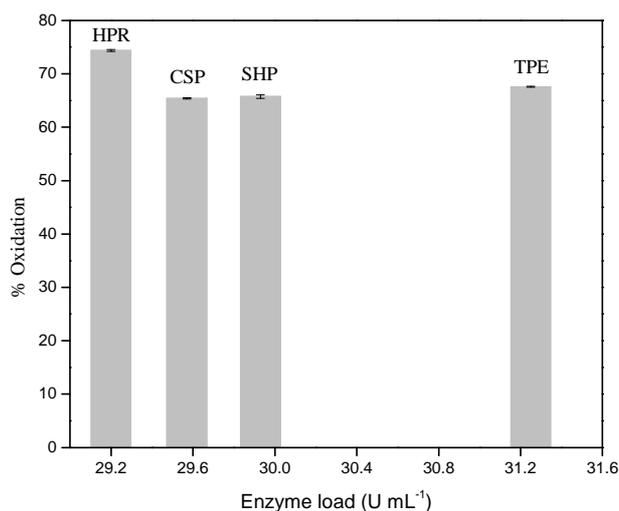
### 3.7 Wastewater oxidation by peroxidase different sources

Research on enzymatic treatments with real industrial phenolic wastewater matrices has been relatively sparse (AL-ANSARI et al., 2010). The wastewater from coffee fruits processing has a high organic load, with chemical oxygen demand of approximately  $7.000 \text{ mg L}^{-1}$  and a large variety of organic compounds such as caffeine, sugars and phenolic compounds unsuitable for direct disposal in soils or watercourses (GONÇALVES et al., 2008).

Campos, Prado and Pereira (2010) noted the considerable presence of phenolic compounds ( $954.2 \text{ mg L}^{-1}$ ) in CPW, which exceed the CONAMA Resolution 430/2011, whose maximum concentration is  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  for release. These compounds are considered toxic, acting as inhibitors of the biological activities of microorganisms, and plant and animal organisms (fish, shellfish, etc.). In excess, they can also interfere with the biological treatment of CPW, both aerobic and anaerobic bacteria, and inhibit other microorganisms. Therefore, it is necessary to treat these effluents before disposal, and the treatment through enzymatic catalysis has shown great potential.

The best reaction conditions found for the oxidation of caffeic acid by TPE (pH 8.0 and  $7 \text{ mmol L}^{-1}$  peroxide for 30 min), were used in the oxidation of CPW. The CPW used in this study showed a concentration of  $233.56 \text{ mg L}^{-1} \pm 5.07$  total phenols, which exceeds the CONAMA Resolution 430/2011. A study was also conducted to compare the efficiency of the oxidation for different sources of peroxidase (Graphic 7). The highest oxidation ( $74.37\% \pm 0.16$ ) was obtained by HPR, followed by TPE ( $67.59\% \pm 0.11$ ), SHP ( $65.76\% \pm 0.33$ ) and CSP ( $65.40\% \pm 0.13$ ), respectively. The controls made without hydrogen peroxide did not cause any oxidation, confirming that peroxidases are activated only in the presence of peroxide. However, the controls performed in the

absence of enzyme showed a percentage of oxidation of 59.04%, suggesting that there were two mechanisms of oxidation, e.g. enzymatic and chemical.



Graphic 7 Oxidation in coffee processing wastewater oxidation by different sources of peroxidase: horseradish peroxidase (HPR), commercial soybean peroxidase (CSP), peroxidase extracted from soybean seed hulls (SHP), turnip peroxidase (TPE), pH 8.0, at 30 °C for 30 min with 7 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

In natural environments, disadvantages that may hinder or diminish the catalytic potential of enzymatic catalysts may depend on both the pollutants to be transformed and the enzymes. In a polluted site, mixtures or composed combinations of many organic (and inorganic) contaminants, rather than a single pollutant, are present, and the complexity of the pollution may entail possible negative or positive synergistic effects on the enzyme efficiency. Enzymes may reduce or even lose their activity upon pollutant transformation or they may present a low stability and survival under very often harsh environmental conditions (RAO et al., 2010).

The data presented in this study suggests that the degradation mechanism of phenolic compounds for CPW has not been predominantly enzymatic. However, these results encourage the use of peroxidases in the treatment of wastewater containing phenolic compounds associated with conventional treatment processes, in order to make it more amenable to biological treatment.

Diao et al. (2011) evaluated the potential use of crude peroxidase from *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* and *Sorghum bicolor* in order to biodegrade wastewater from the leather industry. Without the addition of polyethylene glycol (PEG), the maximal transformation of phenol by the peroxidases of the four plants ranged from 32% to 55%.

The efficiency of the enzymatic treatment could have been higher; however, it should be noted that other compounds present in wastewaters could interfere with the peroxidase-catalyzed oxidation process and therefore further research is required to optimize the process for these conditions (DUARTE-VÁZQUEZ et al., 2002).

Industrial effluents contain various complex mixtures of phenols and other aromatic compounds (ASHRAF; HUSAIN, 2009). One of the approaches carried out to improve the removal of certain phenolic compounds is the enzymatic oxidation of the compound in question, in the presence of another phenolic compound, which is easily oxidized by the enzyme (ROPER et al., 1995). Peroxidases have the ability to co-precipitate certain phenols difficult to remove, including certain non-substrates of peroxidases along with the more easily removable compounds by inducing the formation of mixed polymers that behave similarly to the polymeric products of easily removable compounds (AKHTAR; HUSAIN, 2006; DURAN; ESPOSITO, 2000). This is of great importance, since many industrial effluents contain a variety of phenolic

contaminants; some of them are more amenable to enzymatic treatment to others (AKHTAR; HUSAIN, 2006).

### **3.8 Effect of PEG and Triton X-100 dose on the oxidation of wastewater from coffee fruits processing**

PEG is believed to act as a ‘sacrificial polymer’: it diverts the free radicals generated during the catalytic process from covalently binding to the active site, causing inactivation; alternatively, it substitutes for the enzyme in adsorption onto the solid polymeric products formed during the reaction, because it has a higher partition affinity with the polymer products than peroxidases (NAKAMOTO; MACHIDA, 1992; WU et al., 1998), thereby preventing the enzyme from settling with the solids.

The effects of surfactants on enzymes have been studied previously. It has been reported that the presence of surfactants can reduce the interactions between enzymes and the oxidative polymerization products and protect them from inactivation (SAKURAI; MASUDA; SAKAKIBARA, 2003). In addition, the interactions between enzyme and surfactant can involve the free surfactant molecules and/or the micelles, leading to conformational changes which could modify the catalytic rate constant and/or the enzyme-substrate binding constant, thereby affecting the enzyme’s activity and stability (ABUIN et al., 2005; KARBASSI et al., 2003; YANG et al., 2007).

In this study, SHP showed a promising performance as a biocatalyst in the oxidation of CPW. Given the ability of SHP to oxidize phenolic compounds from wastewater, besides representing one low cost alternative, the influence of the addition of PEG and Triton X-100 on the oxidation of this effluent was evaluated, since this additive has the ability to minimize enzyme inactivation.

It was observed that, with the addition of PEG and Triton X-100, as the concentration of these additives increased, the oxidation of phenolic compounds in CPW hardly changed. The oxidation of phenolic compounds of CPW in the absence of these additives was  $67.72\% \pm 0.26$ . Employing the additive PEG and Triton X-100 at a concentration of  $0.025 \text{ mg mL}^{-1}$ , the oxidation was  $66.40\% \pm 0.89$  and  $64.49\% \pm 0.19$ , respectively, while at a concentration of  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , the oxidation was  $64.72\% \pm 0.26$  for PEG and  $64.82\% \pm 0.42$  for Triton X-100. Thus, these additives did not increase oxidation with the enzyme SHP.

Similar results were also reported by Al-Ansari et al. (2010), who studied the effect of the addition of PEG ( $3.350 \text{ g mol}^{-1}$ ) to increase the efficiency of phenol removal from coal-tar wastewater. At a PEG concentration of  $0.6 \text{ mg mL}^{-1}$  no effect on the removal was observed.

## 4 CONCLUSIONS

The CPW showed a high content of phenolic compounds (233.56 mg L<sup>-1</sup>) that exceeds the maximum permissible concentration for disposal into receiving water bodies. The major phenolic compound found was caffeic acid, followed by catechin and gallic acid. The high concentration of these pollutants justifies the need for treatment of this effluent.

In this study, the enzymatic oxidation showed a promising performance as an alternative and/or complementary technology in the oxidation of phenolic compounds in coffee processing wastewater. Nevertheless, the efficiency of this catalyst is associated to reaction time, pH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and enzyme concentrations used. The oxidation of phenolic compounds in a short period of time (30 min) makes this method attractive, since conventional treatments require extended periods of time.

The enzymes SHP, TPE, as well as the commercial enzymes CSP and HPR are able to catalyze the oxidation of caffeic acid and phenolic compounds of CPW. However, TPE was the enzyme source that showed the highest oxidation potential as an alternative to commercial HPR, presenting an oxidation of 75.99% for caffeic acid and 67.59% for CPW. However, the controls performed in the absence of enzyme showed a oxidation of 59.04% in the experiment performed with CPW, suggesting that there were two mechanisms of oxidation. Anyway, the proposed treatment can be effective in the treatment of effluents containing phenols and can be used as a complementary technology to conventional treatments.

The addition of polyethyleneglycol and Triton X-100 in the reaction medium oxidation CPW with the enzyme SHP practically hardly changed.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would like to thank CAPES, CNPq and FAPEMIG for the financial support.

## REFERENCES

- ABUIN, E.; LISSI, E.; DUARTE, R. Kinetics of *N*-glutaryl-*L*-phenylalanine *p*-nitroanilide hydrolysis catalyzed by  $\alpha$ -chymotrypsin in aqueous solutions of dodecyltrimethylammonium bromide. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 283, n. 2, p. 539-543, Mar. 2005.
- AKHTAR, S., HUSAIN, Q. Potential applications of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 7, p. 1228–1235, Nov. 2006.
- AL-ANSARI, M. M. et al. Soybean peroxidase-catalyzed oxidative polymerization of phenols in coal-tar wastewater: comparison of additives. **Journal of Environmental Engineering and Science**, Ottawa, v. 27, n. 11, p. 967–975, Oct. 2010.
- ALEMZADEH, I.; NEJATI, S. Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 166, n. 2/3, p. 1082-1086, July 2009.
- ARNAO, M. B. et al. Kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1041, n. 1, p. 43-47, Oct. 1990.
- ASHRAF, H.; HUSAIN, Q. Studies on bitter gourd peroxidase catalyzed removal of *p*-bromophenol from wastewater. **Desalination**, Amsterdam, v. 262, p. 267-272, 2010a.
- ASHRAF, H.; HUSAIN, Q. Removal of  $\alpha$ -naphthol and other phenolic compounds from polluted water by white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase in the presence of an additive, polyethylene glycol. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, New York, v. 14, n. 4, p. 536-542, 11 Sept. 2009.

ASHRAF, H.; HUSAIN, Q. Use of DEAE cellulose adsorbed and crosslinked white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase for the removal of  $\alpha$ -naphthol in batch and continuous process. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 64, n. 1, p. 27-31, Jan. 2010b.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (2005) Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 18 ed. Maryland: AOAC 1094p.

BAJAJ, M.; GALLERT, C.; WINTER, J. Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, n. 17, p. 8376-8381, Nov. 2008.

BAYNTON, K.T. et al. Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1206, n. 2, p. 272-278, June 1994.

BÓDALO, A. et al. Comparison of commercial peroxidases for removing phenol from water solutions. **Chemosphere**, Oxford, v. 63, n. 4, p. 626-632, Apr. 2006a.

BÓDALO, A. et al. Elimination of 4-chlorophenol from Water Solutions Using Commercial Peroxidases. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, Lausanne, v. 21, n. 3, p. 279-284, Mar. 2007.

BÓDALO, A. et al. Removal of 4-chlorophenol by soybean peroxidase and hydrogen peroxide in a discontinuous tank reactor. **Desalination**, Amsterdam, v. 195, n. 1/3, p. 51-59, Aug. 2006b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Café no Brasil**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais>>. Acesso em: 25 nov. 2013.

BUCHANAN, I. D.; NICELL, J. A. Model development for horseradish peroxidases catalysed removal of aqueous phenol. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 54, n. 3, p. 251–261, May 1997.

CAMPOS, C. M. M.; PRADO, M. A. C.; PEREIRA, E. L. Caracterização físico-química, bioquímica e energética da água residuária do café processado por via úmida. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 4, p. 514-524, jul./ago. 2010.

CONIGLIO, M. S. et al. Application of *Brassica napus* hairy root cultures for phenol removal from aqueous solutions. **Chemosphere**, Oxford, v. 72, n. 7, p. 1035-1042, July 2008.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, dá outras Providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.

DEEPA, S. S.; ARUMUGHAN, C. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. **Phytochemistry**, New York, v. 61, n. 5, p. 503- 511, Nov. 2002.

DIAO, M. et al. Biodepollution of wastewater containing phenolic compounds from leather industry by plant peroxidases. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 22, n. 2, p. 389-396, Apr. 2011.

DUARTE-VÁZQUEZ, M. A. et al. Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L var purple top white globe) peroxidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester, v. 78, n. 1, p. 42-47, Jan. 2002.

DUTKA, B. **Short-Term Root Elongation Toxicity Bioassay**. Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments, Ottawa: National Water Research Institute, 1989.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, Barking, v. 46, n. 2, p. 488-495, May 2012.

FATIBELLO FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 455-464, maio 2002.

FIA, R. et al. Tratamento das águas do processamento dos frutos do cafeeiro em filtro anaeróbico seguido por sistema alagado construído: II., remoção de nutrientes e compostos fenólicos. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 30, n. 6, p. 1203-1213, dez. 2010.

GIANFREDA, L. et al. Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. **Water Research**, Oxford, v. 37, n. 13, p. 3205-3215, July 2003.

GONÇALVES, M. et al. Materiais à base de óxido de ferro para oxidação de compostos presentes no efluente da despolpa do café. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1636-1640, set. 2008.

GUANGLEI, J. I. et al. Effects of nonionic surfactant Triton X-100 on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A. **Journal of Environmental Sciences**, Los Angeles, v. 21, n. 11, p. 1486-1490, Nov. 2009.

HADDIS, A.; DEVI, R. Effect of effluent generated from coffee processing plant on the water bodies and human health in its vicinity. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 259-262, Mar. 2008.

HEJRI, S.; SABOORA, A. Removal of Phenolic Compounds from Synthetic Wastewaters by Enzymatic Treatments. **Journal of Science**, Ames, v. 35, n. 1, p. 13-19, July 2009.

HUSAIN, M.; HUSAIN, Q. Application of redox mediators in the treatment of organic pollutants by using oxidoreductive enzymes: a review. **Critical Reviews**

in **Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v. 38, n. 1, p. 1-42, Jan. 2008.

HUSAIN, Q.; HUSAIN, M.; KULSHRESTHA, Y. Remediation and treatment of organopollutants mediated by peroxidases: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 29, n. 2, p. 94-119, June 2009.

KALAIARASAN, E.; PALVANNAN, T. Removal of phenols from acidic environment by horseradish peroxidase (HRP): Aqueous thermostabilization of HRP by polysaccharide additives. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 2, p. 625-634, Mar. 2014.

KARAM, J.; NICELL, J. Potential application of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, London, v. 69, n. 2, p. 141-153, June 1997.

KARIM, Z.; HUSAIN, Q. Guaiacol-mediated oxidative degradation and polymerization of bisphenol A catalyzed by bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 59, n. 1/3, p. 185-189, July 2009.

KARBASSI, F.; HAGHBEEN, K.; SABOURY, A. A.; RANJBAR, B.; MOOSAVI MOVAHEDI, A. A. Activity, structural and stability changes of mushroom tyrosinase by sodium dodecyl sulfate. **Colloids and Surfaces B**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 137-143, Oct. 2003.

KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 407-410, May 1994.

KIM, E. Y.; CHAE, H. J.; CHU, K. H. Enzymatic oxidation of aqueous pentachlorophenol. **Journal of Environmental Sciences**, Los Angeles, v. 19, n. 9, p. 1032-1036, Jan. 2007.

KLIBANOV, A. M. Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from wastewaters. **Journal of Applied Biochemistry**, New York, v. 2, p. 414–421, 1980.

KLIBANOV, A.M.; TU, T.M.; SCOTT, K.P. Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste water. **Science**, London, v. 221, n. 4607, p. 259–261, July 1983.

LIU J. Z. et al. Increased thermostability and phenol removal efficiency by chemical modified horseradish peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v.18, n. 4/6, p. 225-232, Oct. 2002.

MACIEL, H. P. F.; GOUVÊA, C. M. C. P.; PASTORE, G. M. Obtenção de nova fonte de peroxidase de folha de *Copaifera langsdorffii* Desf com alta atividade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 735-739, out./dez. 2006.

MÁXIMO, M. F.; GÓMEZ, M.; MURCIA, M. D.; ORTEGA, S.; BARBOSA, D. S.; VAYÁ, G. Screening of three commercial plant peroxidases for the removal of phenolic compounds in membrane bioreactors. **Environmental Technology**, London, v. 33, n. 9, p. 1071-1079, Jan. 2012.

MILAND, E.; SMYTH, M. R.; FAGAIN, C. O. Modification of horseradish peroxidase with bifunctional N-hydroxysuccinimide esters: effects on molecular stability. **Enzyme Microbial Technology**, Amsterdam, v. 19, n. 4, p. 242-249, Sept. 1996.

MOHAN, S. V.; PRASAD, K. K.; RAO, N. C.; SARMA, P. N. Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. **Chemosphere**, Oxford, v. 58, n. 8, p. 1097–1105, Feb. 2005.

NAKAMOTO, S.; MACHIDA, N. Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase-catalyzed reaction using additives. **Water Research**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 49-54, Jan. 1992.

QUINTANILLA-GUERRERO, F. et al. Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, n. 18, p. 8605-8611, Dec. 2008.

RAO, M. A. et al. Role of enzymes in the remediation of polluted environments. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 10, n. 3, p. 333-353, July 2010.

RODRIGUES, G. D.; SILVA, L. H. M.; SILVA, M. C. H. Alternativas verdes para o preparo de amostra e determinação de poluentes fenólicos em água. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 1370-1378, jul. 2010.

SAKURAI, A.; MASUDA, M.; SAKAKIBARA, M. Effect of surfactants on phenol removal by the method of polymerization and precipitation catalysed by *Coprinus cinereus* peroxidase, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester, v. 78, n. 9, p. 952-958, Sept. 2003.

SELVAMURUGAN, M.; DORAISAMY, P.; MAHESWARI, M. An integrated treatment system for coffee processing wastewater using anaerobic and aerobic process. **Ecological Engineering**, New York, v. 36, n. 12, p. 1686-1690, Dec. 2010.

SHANMUKHAPPA, D.R., ANANDA ALWAR, R.P., SRINIVASAN, C.S. Water pollution by coffee processing units and its abatement. **Indian Coffee**, Bangalore, v. 62, n. 10, p. 3-9, 1998.

SILVA, M. C. et al. Decolorization of the phthalocyanine dye reactive blue 21 by turnip peroxidase and assessment of its oxidation products. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 77, p. 9-14, May 2012a.

SILVA, M. C. et al. Obtention of plant peroxidase and its potential for the decolorization of the reactive dye Remazol Turquoise G 133%. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 65, n. 4, p. 669-675, 2012b.

SILVA, M. C. et al. The use of soybean peroxidase in the decolourization of Remazol brilliant blue r and toxicological evaluation of its degradation products. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 89, p. 122-129, May 2013.

SONG, H. Y. et al. Treatment of aqueous chlorophenol by phthalic anhydride-modified horseradish peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 22, n. 1/2, p. 37-44, Apr. 2003.

STEEVENSZ, A. et al. Comparison of soybean peroxidase with laccase in the removal of phenol from synthetic and refinery wastewater samples. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester, v. 84, n. 5, p. 761-769, May 2009.

WARD, G., HADAR, Y., BILKIS, I., KONSTANTINOVSKY, L., DOSORETZ, C.G. Initial steps of ferulic acid polymerization by lignin peroxidase. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 22, p. 18734–18741, June 2001.

WRIGHT, H.; NICELL, J.A. Characterization of soybean peroxidase for treatment of aqueous phenols. **Bioresource Technology**, New York, v. 70, n. 1, p. 69–79, Oct. 1999.

WU, J. et al. Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition mode on enzymatic removal of phenol from wastewater in the presence of polyethylene glycol. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, Ottawa, v. 72, n. 5, p. 881–886, Oct. 1994.

WU, Y. et al. A model for the protective effect of additives on the activity of horseradish peroxidase in the removal of phenol. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 22, n. 5, p. 315–322, Apr. 1998.

YAMADA, K. et al. Determination of optimum process parameters for

peroxidase-catalysed treatment of bisphenol A and application to the removal of

bisphenol derivatives. **Environmental Technology**, London, v. 31, n. 3, p. 243-256, Feb. 2010.

YANG, Z.; DENG, J.; CHEN, L. F. Effect of ionic and non-ionic surfactants on the activity and stability of mushroom tyrosinase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 47, n. 1/2, p. 79-85, June 2007.

YU, J.; TAYLOR, K. E.; ZOU, H.; BISWAS, N.; BEWTRA, J. K. Phenol conversion and dimeric intermediates in horseradish peroxidase-catalyzed phenol removal of water. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 28, n. 12, p. 2154–2160, Nov. 1994.

ZHANG, L. et al. Enzymatic polymerization of phenol catalyzed by horseradish peroxidase in aqueous micelle system. **European Polymer Journal**, New York, v. 48, n. 3, p. 580-585, Mar. 2012a.

ZHANG, Y. et al. Effect of Triton X-100 on the removal of aqueous phenol by laccase analyzed with a combined approach of experiments and molecular docking. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 97, p. 7-12, Sept. 2012b.