

DETOXIFICAÇÃO DA CASCA DE CAFÉ UTILIZANDO FUNGO COMESTÍVEL DO GÊNERO *Pleurotus*

FAN, L.¹ e SOCCOL, C.R.¹

¹ Laboratório de Processos Biotecnológicos, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-970, Centro Politécnico, Curitiba-PR, Brasil - Telefone: (041)3613196, Fax: (041)2660222 - <soccol@engquim.ufpr.br>

RESUMO: Dez cepas de fungos comestíveis do gênero *Pleurotus* foram avaliadas em relação a sua capacidade de crescer e eliminar os compostos tóxicos, como cafeína, taninos e polifenóis, presentes na casca de café, para posterior uso na alimentação animal. A cepa *P. ostreatus* LPB 09 foi escolhida para os estudos posteriores, por apresentar os melhores resultados em termos de detoxificação na fase inicial de seleção. Os resultados demonstraram que o fungo *P. ostreatus* LPB 09 não degrada completamente a cafeína presente na casca, porém parte desta é incorporada nos corpos de frutificação. Por outro lado, o fungo é capaz de degradar 79,17% do tanino presente na casca de café. O teor da cafeína na casca de café após frutificação foi reduzido para 60,69%. Após frutificação do *P. ostreatus* LPB 09 em casca do café, o resíduo resultante poderá ser utilizado com excelente substrato para alimentação animal, pois seu valor protéico é da ordem de 9,62%.

Palavras-chave: detoxificação, *Pleurotus*, cafeína, tanino.

DETOXICATION OF THE COFFEE PEEL USING EATABLE MUSHROOM OF *Pleurotus* GENUS

ABSTRACT: The objective of this work was to study detoxification of toxicant components such as caffeine, tannins and polifenols in coffee husk, seeking the possibility of obtaining a ration for ruminant and to contribute for the reduction of the environmental pollution. In the medium of PDA and extract of coffee husk verified the 10 strains of *Pleurotus*. The strain *P. ostreatus* LPB 09 was selected for posterior experiments. The results showed that it doesn't degrade caffeine but absorbs it. However the fungus degrades tannins, up to 79,17%. The content of the caffeine in the husk after fermentation in the solid state was reduced among 60,69 to 66,67%, so that the residue is recommended after growth of this fungus for testing in the feeding of ruminant with 9.62% protein.

Key words: detoxification, *Pleurotus*, caffeine, tanin.

INTRODUÇÃO

O Brasil, maior produtor mundial de café, gera anualmente grandes volumes de cascas de café. Esse resíduo poderia ser utilizado na alimentação animal se não existisse a presença de compostos tóxicos, como: cafeína, taninos e polifenóis (TANGO, 1971; BRESSANI, 1979).

Fungos do gênero *Pleurotus* têm a capacidade de metabolizar a atrazina (herbicida aromático clorado) em meio líquido, produzindo compostos dealquilados (MASAPHY et al., 1993). Os basidiomicetos podem ser usados para detoxificar ambientes contaminados porque produzem peroxidases, que são enzimas extracelulares envolvidas na degradação do materiais celulósicos (BARBOSA, 1996; FAN, et al., 1999a, b, 2001). MARTINEZ e SOTO (1985), LOZANO (1990) e BERMUDEZ (1994) trabalharam com *Pleurotus* sobre polpa de café. Evidentemente, a concentração de compostos tóxicos é mais reduzida na polpa do que na casca de café. No Brasil, MAZIERO (1990) testou a casca de café na produção de *Pleurotus*. O autor cita que a polpa de café, quando utilizada isoladamente, não proporcionou colonização total do material. Logo após a inoculação, o micélio era forte e vigoroso, além de se desenvolver rapidamente; após alguns dias o crescimento foi interrompido, não sendo possível dessa forma sua detoxificação.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas estudadas: As cepas de *Pleurotus* utilizadas neste estudo foram: *P. ostreatus* LPB 01, *P. ostreatus* LPB 03, *P. ostreatus* LPB 08, *P. ostreatus* LPB 09, *P. sajor-caju* LPB 19, *P. sajor-caju* LPB 20, *P. ostreatus* LPB 22, *P. ostreatus* LPB 23, *P. ostreatus* LPB 24 e *P. ostreatus* LPB 31, provenientes de bancos internacionais (SOCCOL, 1994) e do Instituto de Botânica de São Paulo (BARBOSA, 1996). As cepas foram mantidas sob refrigeração (4 °C) em meio BDA, sendo repicadas a cada seis meses.

Seleção de cepas. As cepas foram inoculadas em ágar base de casca de café. O meio de cultivo foi preparado de acordo com SOCCOL (1994) e distribuído em placas de Petri com 9 cm de diâmetro.

A inoculação do meio foi feita através do uso de um disco de 5 mm de diâmetro contendo uma cultura preservada em ágar-batata-dextrose (BDA). As placas foram inoculadas na região central. As culturas foram incubadas em estufa a 24 °C. O experimento foi conduzido em triplicata. Durante uma semana,

procedeu-se à avaliação da velocidade de crescimento radial (mm/dia). A velocidade de crescimento radial foi avaliada medindo-se o diâmetro da colônia com um paquímetro. O valor obtido em milímetros foi dividido pela duração de cultivo, para que se pudesse obter a velocidade de crescimento radial em mm/dia (SOCCOL et al., 1994).

A avaliação da biomassa foi realizada como descrito a seguir: o agar contendo o micélio foi removido da placa e transferido para um copo de béquer. O conjunto foi aquecido em banho-maria até que se processasse a fusão do agar. O micélio foi então separado por filtração, num funil de Büchner contendo papel-filtro Whatman nº 1 previamente tarado. Após a filtração, o material foi lavado várias vezes com água fervente, para total eliminação do agar que porventura pudesse permanecer retido no papel-filtro. O papel-filtro é seco a 105 °C por 24 horas e a biomassa calculada por diferença de peso (EL-ZALAKI e HAMZA, 1979; MARTIN, 1983; CHAHAL, 1989; CHAHAL e HACHEY, 1990; CAI et al., 1993; SOCCOL et al., 1994, 1995, 1999).

Efeito de cafeína e tanino sobre a cepa selecionada. Utiliza BDA com adição de diferente concentração de cafeína e tanino. A metodologia de inoculação e avaliação foram semelhantes às descritas anteriormente.

Análise de cafeína e tanino O método espectrofotométrico para determinação de cafeína foi retirado do manual do Instituto Adolfo Lutz (1985), usando clorofórmio como solvente. A concentração de taninos foi determinada de acordo com o método descrito em manual do Ministério da Agricultura (1986).

Detoxificação da casca de café. Foi realizada por fermentação no estado sólido em saco plástico. Os experimentos foram conduzidos de acordo com Fan et al. (2000a, b, c.).

Todos os resultados apresentados neste trabalho representam a média de três determinações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção de cepas de *Pleurotus* à base de extrato de casca de café. Foram utilizadas 10 cepas de *Pleurotus* em relação ao crescimento radial do micélio e a produção de biomassa em agar extrato de casca de café durante nove dias. Os resultados do comportamento das cepas de *Pleurotus* sp. em agar extrato de

casca de café, em placa de Petri, são mostrados na Tabela 1. Os dados representam a média de três medidas.

Tabela 1 - Seleção de cepas de *Pleurotus* à base de extrato de casca de café após nove dias

Cepa	Velocidade de crescimento radial (mm/dia)	Biomassa (mg/placa)
<i>P. ostreatus</i> LPB 01	9,50 ± 1,38	40,10 ± 1,84
<i>P. ostreatus</i> LPB 22	9,34 ± 1,53	35,70 ± 0,00
<i>P. ostreatus</i> LPB 08	9,03 ± 2,85	31,90 ± 4,80
<i>P. sajor-caju</i> LPB 20	8,98 ± 2,07	24,50 ± 2,30
<i>P. ostreatus</i> LPB 23	8,95 ± 1,80	25,60 ± 6,00
<i>P. ostreatus</i> LPB 24	8,82 ± 1,25	18,80 ± 0,56
<i>P. ostreatus</i> LPB 31	8,80 ± 1,22	15,80 ± 0,36
<i>P. ostreatus</i> LPB 09	9,68 ± 1,67	43,40 ± 0,14
<i>P. sajor-caju</i> LPB 19	8,12 ± 1,81	22,30 ± 2,00
<i>P. ostreatus</i> LPB 03	6,55 ± 1,73	14,20 ± 0,35

Observa-se que todas as cepas tiveram crescimento micelial neste tipo de substrato. A cepa *P. ostreatus* LPB 09 apresentou maior velocidade de crescimento radial - 9,68 mm/dia - e produziu a maior biomassa - 43,40 mg/placa - após nove dias de cultura. Por isso, a cepa *P. ostreatus* LPB 09 foi escolhida para detoxificação de casca de café utilizando a técnica da fermentação no estado sólido.

Efeito de cafeína. A Tabela 2 demonstra o efeito de diferentes concentrações de cafeína sobre *P. ostreatus* LPB 09 com relação ao crescimento micelial e à produção de biomassa em BDA após seis dias de cultura. Com o aumento da concentração de cafeína, a velocidade de crescimento de micélio e a produção de biomassa diminuiram até zero com concentração de 2.500 ppm (mg/L).

Nada há na literatura a respeito de efeito de cafeína sobre o crescimento de *Pleurotus*. TAN (1989) afirmou que a concentração de 50 a 100 ppm tem efeito positivo para micélio de *Lentinus edodes* e que adição de 300 ppm ou acima inibe crescimento de micélio e frutificação.

Tabela 2 - Efeito de cafeína sobre *P. ostreatus* LPB 09 em BDA após seis dias

Concentração de cafeína (mg/1L)	Crescimento radial de micélio (mm/dia)	Biomassa (mg/placa)
0	13,12 ± 0,21	55,32 ± 1,43
30	12,56 ± 0,43	53,44 ± 2,36
50	12,23 ± 0,26	52,76 ± 1,28
100	11,02 ± 0,32	47,29 ± 1,55
500	8,13 ± 0,42	32,56 ± 2,35
1000	4,52 ± 0,41	12,37 ± 2,44
2500	0	0

Efeito de ácido tânico. A Tabela 3 demonstra o efeito de diferentes concentrações de ácido tânico sobre o crescimento micelial de *P. ostreatus* LPB 09 em BDA suplementado com diferentes concentrações de tanino, após sete dias de cultivo. Com aumento da concentração de ácido tânico, a velocidade de crescimento radial e a produção de biomassa reduziram para 0,82 mm/dia e 1,33 mg/placa em concentrações de tanino da ordem de 10.000 mg/1L. A concentração de 100 mg/L de tanino no meio de cultivo apresentou efeito estimulante na produção de micélio e na produção de biomassa. Em concentrações de 500 mg/1L, o tanino apresentou efeito negativo para o crescimento.

Tabela 3 - Efeito de ácido tânico sobre *P. ostreatus* LPB 09 em BDA

Código	Concentração de ácido tânico ppm (mg/1L)	Crescimento radial de micélio (mm/dia)	Biomassa (mg/placa)
0	0	11,29 ± 0,11	50,12 ± 1,55
1	100	11,76 ± 0,23	52,84 ± 1,76
2	500	8,71 ± 0,00	43,06 ± 1,21
3	1000	2,72 ± 0,24	10,20 ± 1,12
4	5000	1,58 ± 0,34	3,27 ± 1,56
5	10000	0,82 ± 0,11	1,33 ± 0,12

Wong et al. (1991) verificaram que o *P. sajor-caju* é capaz de degradar o tanino presente na borra de café; Cai et al. (1993) constataram que os monômeros derivados da lignina em baixas concentrações reduzidas são capazes de estimular o crescimento de *Pleurotus*. Em nosso trabalho pudemos constatar que concentrações de tanino inferiores a 100 mg/L são capazes de estimular o crescimento de *Pleurotus*.

Degradação da cafeína por *P. ostreatus* LPB 09. A Tabela 4 mostra o efeito da cafeína sobre *P. ostreatus* LPB 09 em BDA. Observa-se que o micélio não degrada a cafeína, porém concentra essa cafeína em sua biomassa, ou seja, o micélio absorve a cafeína, pois as concentrações de cafeína estão calculadas em mg/g de micélio seco. Observa-se que a concentração de cafeína presente no micélio aumenta proporcionalmente ao aumento no meio de cultura, e isso demonstra que o *P. ostreatus* não é capaz de degradar a cafeína, mas sim de absorvê-la.

Tabela 4 - Efeito de diferentes concentrações de cafeína sobre *P. ostreatus* LPB 09 em BDA

Concentração de cafeína inicial em mg/L de BDA	Concentração de cafeína em micélio deste fungo (mg/g)	Concentração de cafeína final em mg/L de BDA
0	0	0
30	65,67	0
50	134,23	4,02
100	378,66	58,00
500	916,25	399,49
1000	1385,27	860,02

Degradação do ácido tânico. A Tabela 5 mostra o efeito de ácido tânico sobre o *P. ostreatus* LPB 09 em BDA. Observa-se que a concentração desse ácido no interior do micélio em qualquer experimento foi de zero, mas no meio de BDA ela foi reduzida. Isso demonstra que o micélio é capaz de degradar o ácido tânico presente no meio de cultura e casca de café.

TAN (1989) realizou estudos sobre o efeito do ácido tânico (concentrações de 500 a 1000 ppm) no crescimento de *L. edodes*. Os resultados demonstram que o ácido tânico nessas concentrações exerce efeito tóxico sobre o crescimento do fungo *L. edodes*. WONG (1991) demonstrou em seus experimentos que o fungo *P. sajor-caju* foi capaz de degradar o tanino presente na casca de café.

Tabela 5 - Efeito de ácido tânico sobre *P. ostreatus* LPB 09 em meio BDA (mg/L)

Concentração de ácido tânico inicial em BDA	Concentração de ácido tânico em micélio	Concentração de ácido tânico final em BDA
0	0	0
100	0	29,63
500	0	277,09
1000	0	429,45
5000	/	/
10000	/	/

“/” : não teve crescimento, por isso não se verificou.

Detoxificação da casca de café. A Tabela 6 mostra que a concentração de cafeína presente na casca de café foi reduzida em até 60,69% após colonização e frutificação do fungo, porém, como já observado anteriormente, essa cafeína não foi degradada, mas sim acumulada em parte nos corpos de frutificação do cogumelo. Verificou-se que a concentração de cafeína no corpo de frutificação atingiu valores da ordem de $0,157 \pm 0,085\%$ cafeína. A concentração de tanino também foi reduzida significativamente, atingindo valores da ordem de 79,17%. Nos corpos de frutificação não foram encontrados taninos, o que demonstra que o cogumelo é capaz de degradar esse componente presente na casca do café. Esses resultados confirmam os estudos realizados em placa de Petri com o meio BDA suplementado com cafeína ou tanino.

Tabela 6 - Evolução das concentrações de cafeína e tanino durante crescimento e frutificação de *P. ostreatus* LPB 09 em casca de café

Componente	teor inicial	teor final	% redução
Cafeína	$0,65 \pm 0,12$	$0,197 \pm 0,093$	-60,69
tanino	$3,65 \pm 0,21$	$0,76 \pm 0,14$	-79,17

* Teor protéico na casca do café após frutificação do fungo *P. ostreatus* LPB 09 = 9,62%.

CONCLUSÃO

Os estudos demonstram que a cepa *P. ostreatus* LPB 09 foi capaz de reduzir em 60,69% o teor de cafeína na casca de café, porém a cafeína não foi degradada e sim acumulada no micélio e nos corpos de

frutificação do cogumelo. Com relação ao tanino, foi possível comprovar que ocorre degradação deste, com redução da ordem de 79,19% na casca do café. Estudos realizados por Fan et al. (2000) demonstraram que a casca de café é em um excelente substrato para produção de fungos comestíveis do tipo *Pleurotus*, com rendimentos da ordem de 900 g de cogumelos frescos/kg de casca de café seco. Dessa forma, o resíduo obtido após a frutificação do *P. ostreatus* LPB 09 constitui um excelente produto para alimentação animal, pois seu conteúdo protéico é da ordem de 9,62%, e este contém concentrações bastante reduzidas de cafeína e tanino.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi realizado com recursos oriundos do Consórcio Nacional do Café (projeto nº 19.1.999.079.01). Os autores agradecem ao CNPq pelas bolsas de Doutorado e Produtividade em pesquisa recebidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, M.C. Dissertação de mestrado Aproveitamento de resíduos de cassava de mandioca para produção de *Pleurotus*. UFPR, 1996.
- BERMUDEZ, R.C.; TRABA, J.A. Produccion de *Pleurotus sp* cfr. Florida sobre residuales de la agroindustria cafetalera en Cuba. **Micologia Neotropical Aplicada**, 7:47-50, 1994
- BRESSANI, R.E. Antiphysiological factors in coffee pulp. Coffee Pulp: Composition, Technology and Utilization, IDRC Pub. 108E, (1979), Ottawa.
- CAI, Y.J.; BUSWELL, J.A.; CHANG, S.T. Effect of lignin-derived phenolic monomers on the growth of the edible mushrooms *L. edodes*, *P. sajor-caju*, *V. volvacea*. **World J. of Microbiology and Biotechnology**. Oxford, 9:503-507, 1993.
- CHAHAL, D.S. Production of protein-rich mycelial biomass of a mushroom *Pleurotus sajor-caju* on corn stem. **J. of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, 68(5):334-338, 1989
- CHAHAL, D.S. HACHEY, J.M. Use of hemicellulose and cellulose and degradation of lignin by *Pleurotus sajor-caju* grown on corn stalks. **Agricultural and Synthetic Polymers**, 433: 304-310, 1990
- EL-ZALAKI, M.E.; HAMZA, M.A. Edible mushrooms as producers of amylases. **Food Chemistry**, Barking, 4(3):203-213, 1979
- FAN, L.F.; DING, C.K (1990), Handbook of Mushroom Cultivation, Jiangxi Science and Technology Publishing House, Jiangxi, PR China

- FAN, L.; PANDEY, A.; AND SOCCOL, C.R. (1999a). Cultivation of *Pleurotus sp.* on coffee residues Proc. 3rd International conference on Mushroom Biology and Mushroom Products & AMGA's 26th National Mushroom Industry Conference October 12-16, Sidney, pp.301-310
- FAN LEIFA, A.; PANDY, L.; VANDENBERGHE AND C.R. SOCCOL (1999b) Effect of caffeine on *Pleurotus sp.* and bioremediation of the caffeinated residue The 9th European Congress on Biotechnology Brussels, Belgium 11-15/July/1999. (Title: ECB9/2664).
- FAN, L.; PANDEY, A.; AND SOCCOL, C.R. (2000a), Solid state culturing- an efficient technique to utilize toxic agro-industrial residues, **J. Basic Microbiol.**, 40(3): 177-187.
- FAN, L.; PANDEY, A.; MOHAN, R. AND SOCCOL, C.R. (2000b), Comparison of coffee industry residues for production of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation, **Acta Biotechnol.**, 20 (1):41-52.
- FAN LEIFA, PANDEY, A., MOHAN, R., SOCCOL, C.R. (2000c) Use of Various coffee Industry Residues for the production of *Pleurotus ostreatus* in Solid State Fermentation. **Acta Biotechnologica**, 20(1): 41-52, Germany.
- FAN LEIFA, ASHOK PANDEY, CARLOS R. SOCCOL (2001) Production of mushrooms on brazilian coffee industry residues in the book <<Coffee Biotechnology and Quality>> published by Kluwer Academic Publishers, Edited by T. Sera, C. R. Soccol, A. Pandey & S. Roussos. Chapter 40, pp427-436.
- Instituto Adolfo Lutz, Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. Normas analíticas de Instituto Adolfo Lutz 3rd, São Paulo, IMESP, pp. 189-192, 195-196, 1985.
- LOZANO, J.C. 1990 Produccion comercial del champinon (*Pleurotus ostreatus*) en pulpa de coffee **Fitopatologia Colombiana**, 14:42-47, 1990.
- MA: Ministerio da Agricultura: Secretaria nacional de defesa agropecuaria-laboratorio de referencia vegetal. Metodologia de analise de bebidas e vinagres, 1986.
- MARTIN, A.M. Submerged production of edible mushroom mycelium. **Canadian Institute of Food Science Technolgy Journal**, Ottawa, 16(3):215-217, 1983
- MARTINEZ, C.D.; SOTO, C.; GUZMAN, G. Cultivo de *pleurotus ostreatus* en pulpa de café com paja como substrato. **Revista Mexicana de Micologia** 1:101-108, 1985
- MASAPHY, S.; LEVANON, D. The effect of lignocellulose on lignocellulolytic activity of *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 36:828-832, 1992
- MAZIERO, R. Substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus sp.* Dissertação de Mestrado ao Instituto de Biociências da USP 1990
- SEAPAR: Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento do Paraná SEAPAR: Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento do Paraná Desenvolvimento do Agronegócio no Paraná, MAIO/1998
- SES-Secretaria do Estado da Saúde. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 1985

- SOCCOL, C.R. (1994) Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico. Biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e *Basidiomacromicetos* do gênero *Pleurotus*. Tese de Livre-Docência. UFPR, 228p.
- SOCCOL, C.R. (1995), Aplicações da fermentação no estado sólido na valorização de resíduos agroindustriais, *França-Flash Agricultura*, 4, 3-4.
- SOCCOL, C.R.; LEIFA, F.; WOICIECHOWSKI, A.L.; BRAND, D.; MACHADO, C.M.M.; SOARES, M.; CHRISTEN, P.; PANDEY, A. (1999). Experiência brasileira na valorização biotecnológica de subprodutos da agroindústria do café. In : **Proceedings** III International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agroindustry. Londrina, Brazil,323-328.
- TAN, Y.H.; CHANG, S.T. Effect of growth regulators, enzyme inhibitors and stimulatory additives on the vegetative development and fructification of *L. edodes* Proceedings of the twelfth international congress on the science and cultivation of edible fungi. September, Braunschweig, Germany, 1987.
- TANGO, J.S. Utilização industrial do café e dos seus subprodutos *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL* . São Paulo, Brasil. 28:49-73, 1971.
- WONG, Y. S. WANG, X. Degradation of tannins in spent coffee grounds by *Pleurotus sajor-caju*. **World J. Microbiology and Biotechnology**. Oxford, 7(5):573-574, 1991.