

Wendell Jacinto Pereira

Laboratório de Química de Proteínas –
Universidade Federal de Goiás.

wendell.j.p@hotmail.com

Rômulo Roosevelt da Silva Filho

Laboratório de Química de Proteínas –
Universidade Federal de Goiás.

doctoroosevelt@hotmail.com

Marcos Antônio Pereira Junior

Laboratório de Química de Proteínas –
Universidade Federal de Goiás.

marcao_jr1@hotmail.com

Karla de Aleluia Batista

Laboratório de Química de Proteínas –
Universidade Federal de Goiás.

karla-batista@hotmail.com

Kátia Flávia Fernandes

Laboratório de Química de Proteínas –
Universidade Federal de Goiás.

katia@icb.ufg.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Endereço: BR-153 – Quadra Área
75.132-903 – Anápolis – revista.prp@ueg.br

Coordenação:

GERÊNCIA DE PESQUISA

Coordenação de Projetos e Publicações

Artigo Original

Recebido em: 13/08/2012

Avaliado em: 12/09/2012

Publicação: 20 de Dezembro de 2012

USO DE GOMA DE CAJUEIRO EM SUBSTITUIÇÃO AO ÁGAR EM MEIO DE CULTURA

RESUMO

O cajueiro da espécie *Anacardium occidentale*, encontrado em várias regiões do país, produz exsudato gomoso cuja composição apresenta grande quantidade de polissacarídeos. Os polissacarídeos da goma do cajueiro apresenta grande potencial para aplicações biotecnológicas, seja por ser fonte de carboidratos complexos, seja por suas propriedades funcionais como, por exemplo, sua capacidade de formar filmes e géis. Nesse trabalho avaliou-se a viabilidade da utilização do polissacarídeo de goma de cajueiro (PEJU) como substituto para o ágar em meios de cultura sólidos, utilizados comumente em microbiologia. Definiu-se a proporção mais adequada entre o PEJU e o ágar, e os parâmetros avaliados para na avaliação dos meios foram: perda de umidade, alteração da textura durante armazenamento e a capacidade de promover o crescimento de microrganismos. A substituição do ágar pelo PEJU nos meios de cultura foi de boa eficiência, promovendo condições de crescimento microbiano similares aos meios de cultura controle.

Palavras-Chave: Microrganismos; Microbiologia; PEJU.

ABSTRACT

Anacardium occidentale, a tree that can be found in many regions in Brazil, produces a gummous exudates with a large quantity of polysaccharides and. These polysaccharides present great potential for biotechnological applications as source of complex carbohydrates or due to its functional properties, such as gel and film formation. In this research, the viability of using the cashew gum polysaccharide (CGP) as substitute for agar in solid culture media was evaluated. After determination of the best proportion between CGP and agar in media formulation, the following parameters were evaluated: moisture loss, changes in texture during storage and the capacity to promote microbial growth. The CGP presented good efficiency in substituting agar the in the texted culture media, promoting microbial growth conditions similar to control media.

Keywords: Microorganisms, Microbiology; grow

1. INTRODUÇÃO

As gomas podem ser definidas de forma ampla como substâncias incolores, inodoras, insípidas e não tóxicas, sendo substâncias poliméricas que em solvente apropriado podem formar soluções altamente viscosas ou até mesmo géis (ALI, ZIADA e BLUNDEN; 2009). O termo goma denota especificamente um grupo de polissacarídeos (glicanas) e seus derivados, que hidratam em água quente ou fria, formando uma solução viscosa ou dispersão de baixa concentração (ZOHURIAAN E SHOKROLAHI, 2004). São substâncias químicas de elevada massa molecular, hidrofílicas, com propriedades coloidais, produzindo em solventes orgânicos como clorofórmio, acetona e etanol suspensões altamente viscosas, com funções espessantes, gelificantes, emulsificantes, estabilizantes e aglutinantes (LIMA, 2001).

Vários vegetais possuem a capacidade de exsudar gomas que na planta atuam como material selante, além de possuírem agentes com atividade biocida. Das plantas que apresentam exsudato, merece destaque o cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.), por sua distribuição em várias regiões do país e por sua goma rica em monossacarídeos e oligossacarídeos (LIMA, 2001). Anderson e Bell (1975) caracterizaram o exsudato gomoso de cajueiro como contendo 61% de galactose, 14% de arabinose, 7% de ramnose, 8% de glicose e 5% de ácido glicurônico, além de traços de manose, xilose e ácido 4-O-metilglicurônico (menor que 2%). O principal ácido aldobiurônico presente é o ácido 6-O- β -D glicopiranosilurônico-D- galactose; pequenas amostras de análogos de 4-O-metil também estão presentes. Uma banda da hidrólise ácida mostrou somente duas galactobioses, 3-O- β -D- galactopiranosil-D-galactose (maior componente) e 6-O- β - D- galactopiranosil - D- galactose (menor componente). A análise da goma de *Anacardium occidentale* L.(PEJU) indica uma estrutura de galactana altamente ramificada consistindo de cadeia com ligações β - (1-3) e β - (1-6) Dgalactose. A arabinose está

presente como grupo terminal ou em ramificações curtas (1- 2) ligadas com cinco unidades longas. Glicose, ramnose, manose, xilose e ácido urônico estão presentes como grupos terminais.

A caracterização estrutural por cromatografia gasosa e ressonância magnética mostrou que o polissacarídeo é composto por três tipos de unidades de galactana ligadas por C1 e C3, C1 e C6 e C1, C3 e C6, estando a glicose presente na cadeia lateral, com cinco unidades. Estão presentes no heteropolissacarídeo sais de cálcio, magnésio, potássio e sódio, conferindo à goma uma massa molecular média de $1,5 \times 10^4$ kDa (MONTHE E RAO, 1999).

A estrutura e composição da goma do cajueiro, repleta de carboidratos, sugere que assim como outras gomas já descritas na literatura, esta possui grande potencial para utilização como fonte de polissacarídeos de aplicação biotecnológica (WU et al, 2009) (KASHYAP et al, 2001). Além disso, a grande disponibilidade de espécies desse gênero no país e sua ampla faixa geográfica de obtenção fazem com que o polissacarídeo presente em seu exsudato seja uma alternativa de substituição a outros polímeros cuja obtenção é mais onerosa. É o caso do ágar, mistura dos polissacarídeos agarose e agarpectina, um produto utilizado em laboratórios de microbiologia como gelificante para a elaboração de meios de cultura sólidos (WU, et al., 2009). Todo o ágar consumido nos laboratórios do Brasil é importado, o que agrega mais custo às pesquisas.

A grande quantidade e variedade de sacarídeos presentes na goma de cajueiro indicam uma boa capacidade de formar soluções com alta viscosidade e possivelmente a formação de géis. Partindo dessa constatação, o trabalho em questão testou os polissacarídeos da goma do cajueiro da espécie *Anacardium occidentale* e como coloide em meio de cultura visando diminuir a dependência e custos com ágar.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ORIGEM E PURIFICAÇÃO DO PEJU

A goma bruta foi coletada de cajueiros na fazenda da Companhia de Alimentos do Nordeste (CIALNE), município de Pacajus no estado do Ceará. Os nódulos foram triturados e dissolvidos em água destilada na proporção de 20% (p/v) e a mistura mantida em temperatura ambiente por 24 horas para completa dissolução. A solução obtida foi filtrada em nylon (90 fios) e em seguida precipitada com etanol absoluto, na proporção de 1:3. Após decantação 24h de repouso para decantação, o sobrenadante foi descartado, o precipitado (PEJU) lavado com etanol absoluto e por fim seco à temperatura ambiente. O PEJU seco foi triturado e armazenado em frascos hermeticamente fechados, em temperatura ambiente até a sua utilização.

2.2. PRODUÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA MODIFICADOS COM PEJU

Os meios selecionados para avaliação da substituição foram: *Luria-Bertani* (LB, HIMEDIA) Extrato de Levedura Peptona Glicose (YPD, HIMEDIA) e Ágar Batata Dextrose (BDA, HIMEDIA). Foram testadas substituições de ágar por PEJU de forma que a porcentagem final da mistura ágar + PEJU atingisse 1,5% (m/vol) do volume total do meio de cultura. O delineamento experimental dos testes de substituição e os meios avaliados estão representados na Tabela 1.

Para o teste inicial utilizou-se 3 placas de petri para cada meio de cultura relacionado na Tabela 1. Os meios foram autoclavados a 120°C por 15 min e em seguida 25 mL de meio foram vertidos em cada placa de petri (média). Como critério de seleção inicial observou-se o tempo para solidificação do meio, o aspecto visual comparando-se os meios modificados com o controle e a textura ao perfurar o meio com alça de platina.

Tabela 1- Planejamento Experimental para produção de meios de cultura modificados com PEJU.

Meio de cultura	% ágar*	%PEJU*	Massa ágar + PEJU para 100 ml de meio. (g)
LB CONTROLE	100	0	1,5
LB PEJU 25	75	25	1,5
LB PEJU 50	50	50	1,5
LB PEJU 75	25	75	1,5
LB PEJU 100	0	100	1,5
YPD CONTROLE	100	0	1,5
YPD PEJU 25	75	25	1,5
YPD PEJU 50	50	50	1,5
YPD PEJU 75	25	75	1,5
YPD 100	0	100	1,5
BDA CONTROLE	100	0	1,5
BDA PEJU 25	75	25	1,5
BDA PEJU 50	50	50	1,5
BDA PEJU 75	25	75	1,5
BDA PEJU 100	0	100	1,5

*% em relação à massa final utilizada como agente gelificante (ágar + PEJU).

A substituição que resultou em meio com características mais próximas às do meio controle foi selecionada para a realização dos demais testes para validação do PEJU como substituinte ao ágar na formulação dos meios de cultura sólidos.

2.3. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEIO SELECIONADO

2.3.1. TEXTURA

Para as concentrações de substituição selecionadas foram preparados a cada dois dias placas contendo os meios LB, YPD e BDA controles e PEJU substituídos. Os meios foram armazenados a 4 °C pelo período de doze dias, sendo que no décimo segundo dia foram submetidos ao teste de textura em texturômetro TA-XT (Extralab Brasil), com probe cilíndrico de 6,0 mm de diâmetro e velocidade de movimentação de 1,0 mm/s. O

ponto de parada da probe foi fixado em 3,0 mm após a tensão de ruptura e a grandeza analisada foi força máxima de resistência à penetração (CARUSO, 2009).

2.3.2. CAPACIDADE DE MANUTENÇÃO HIGROSCÓPICA (UMIDADE)

Para as concentrações de substituição selecionadas foram preparadas três placas contendo os meios LB, YPD e BDA controles e PEJU substituídos. Os meios foram armazenados a 4°C pelo período de doze dias. A cada dois dias as placas foram pesadas em balança analítica e a perda da umidade foi calculada de acordo com equação proposta por Silva, et al. (2012), com modificações (Equação 1), onde n é o dia após a confecção do meio.

Equação 1. Cálculo da perda de umidade durante armazenamento.

$$\text{Perda de umidade (\%)} = \left(\frac{\text{Peso no dia n}}{\text{Peso no dia inicial}} \times 100 \right) - 100$$

2.4. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PROMOVER O CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS

Utilizando os meios de cultura com a porcentagem de substituição selecionada anteriormente, avaliou-se a capacidade de crescimento dos microrganismos comparando-se com os meios controles. Os testes para crescimento de microrganismos foram realizados com culturas de bactérias, fungos filamentosos e leveduras já disponíveis no laboratório. As bactérias foram inoculadas em meio LB, os fungos filamentosos e a espécie de levedura *Candida albicans* foram inoculados em meio BDA, e as leveduras (exceto *C. albicans*) em meio YPD, conforme Tabela 2. O crescimento de cada espécie no meio contendo a substituição de ágar por PEJU foi comparado ao

respectivo meio controle utilizando a técnica de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e/ou medição do halo de crescimento (média de duas medições do diâmetro em eixos transversais).

Tabela 2. Organismos utilizados para avaliação do crescimento, meio utilizado, método de avaliação e tempo de crescimento.

Espécie	Categoria	Meio de cultura	Tempo	Análise de crescimento
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactérias	LB	24 h	UFC
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Bacillus subtilis</i>				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Leveduras	YPD	48 h	
<i>Pichia pastoris</i>			96 h	
<i>Candida albicans</i>			48 h	
<i>Aspergillus niger</i>	Fungos	BDA	96 h	Diâmetro do halo
<i>Penicillium sp.</i>	filamentosos			

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os testes foram realizados em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey para comparação das médias, utilizando nível de significância de $P < 0,05$. O programa utilizado para a análise dos dados foi o Statistica 7.0 (StatSoftInc, Tulsa, OK, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a extração obteve-se o polissacarídeo denominado PEJU conforme visualizado na Figura 1. A avaliação das características de tempo de solidificação, o aspecto visual e textura ao perfurar o meio com alça de platina revelou que os meios contendo 50% de PEJU foram os que apresentaram melhores propriedades para a substituição do Ágar, mantendo características próximas àsquelas do meio controle.



Figura 1. Coma do cajueiro (esquerda) e polissacarídeo extraído - PEJU (direita).

Os meios contendo 75 % de substituição apresentaram capacidade de solidificação. No entanto, estes meios apresentaram tempo elevado de solidificação (>40min) quando comparado com os meios controles (< 10min). Além do tempo de solidificação elevado, os meios com 75% de PEJU apresentaram baixa resistência ao manuseio com alça de platina tornando-os inviáveis para a inoculação de microrganismos. Já os meios contendo 100% de PEJU não solidificaram na proporção de massa volume utilizada nestes experimentos.

Quanto à perda de umidade, nenhum dos meios substituídos com PEJU (BDA, LB e YPD) apresentou diferença significativa quando comparados com os meios controles (Figura 2).

No que se refere à análise de textura, os meios BDA, LB e YPD substituídos por PEJU apresentaram textura significativamente menor quando comparados com os meios controles em todos os períodos avaliados (Tabela 3). Contudo esta diminuição na textura não ocasionou dificuldades nos procedimentos de manuseio e inoculação dos microrganismos.

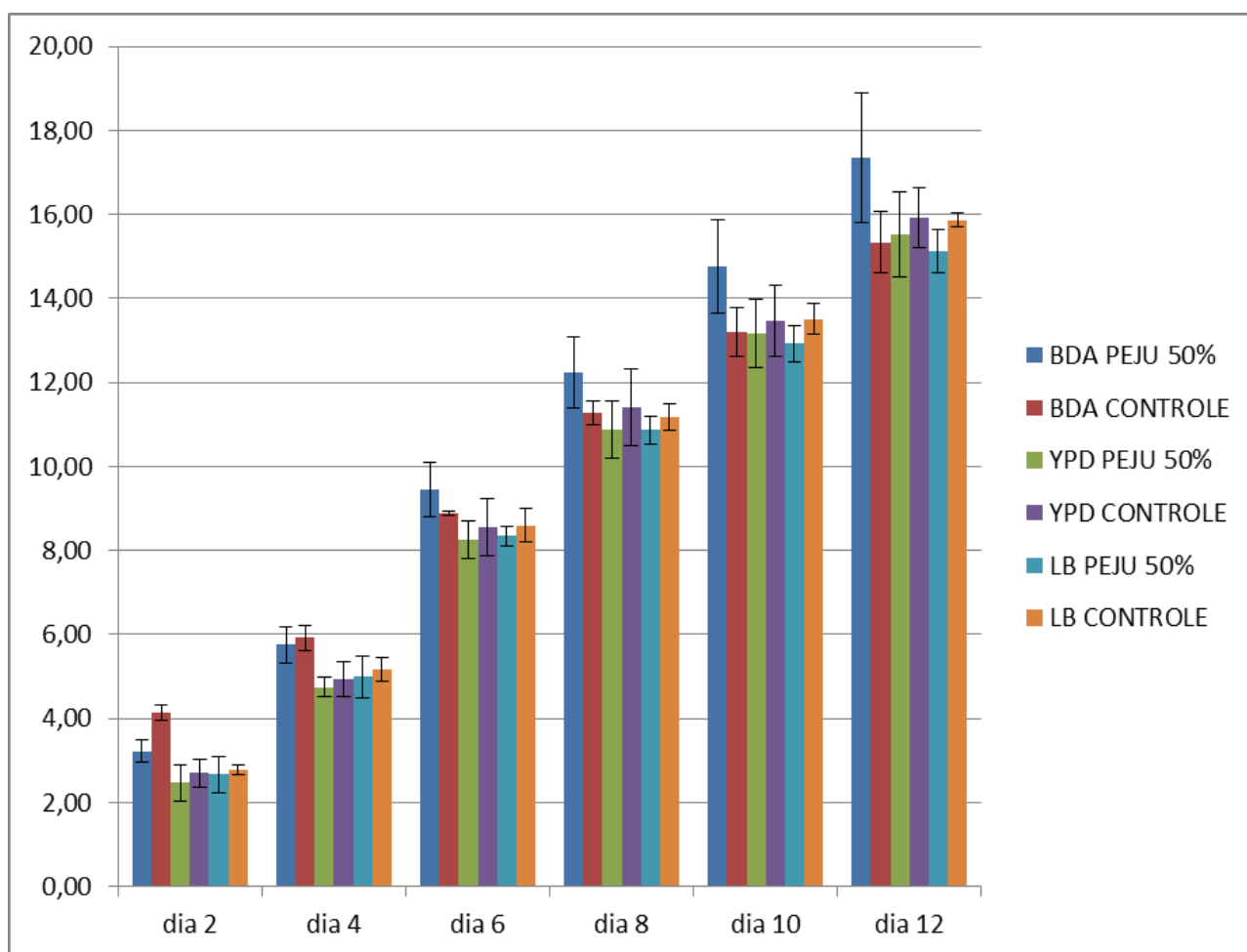


Figura 2. Gráfico da perda de umidade durante os dias para os meios contendo substituição e para os meios controles.

Todos os microrganismos utilizados para o teste mostraram capacidade de desenvolvimento semelhante aos seus controles (Tabela 4), de modo que não houve inibição ou dificuldade de crescimento nos meios contendo a substituição de ágar por PEJU (Figura 3).

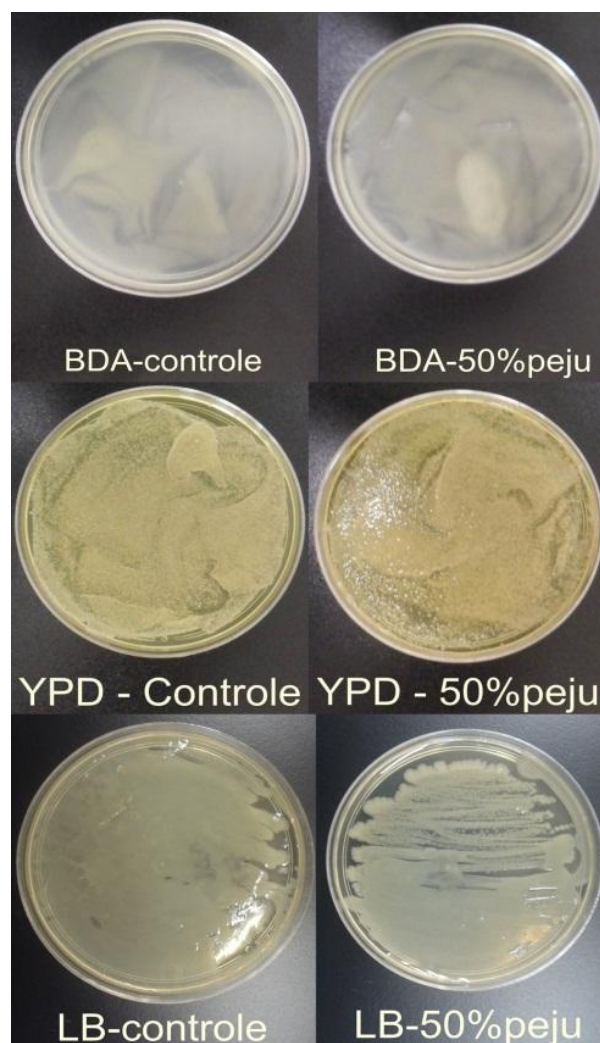


Figura 3. Comparativo do crescimento de microrganismos nos meios substituídos e meios controles. De cima para baixo *T. asperellum*, *S. cerevisiae*, *E. coli*

Tabela 3. Comparação da textura entre os meios contendo a substituição e nos meios controles.

Meio de cultura	BDA PEJU 50%	BDA CONTROLE	YPD PEJU 50%	YPD CONTROLE	LB PEJU 50%	LB CONTROLE
Força máxima 24h (N)	6,09 ^f ±0,08	20,80 ^d ±0,66	6,72 ^e ±0,12	26,67 ^{b,c,d} ±0,38	6,10 ^c ±0,08	26,83 ^{a,b} ±1,35
Força máxima 72h (N)	6,09 ^f ±0,21	22,02 ^{c,d} ±0,22	5,94 ^e ±0,01	25,14 ^d ±0,50	5,87 ^c ±0,15	31,12 ^a ±0,24
Força máxima 120h (N)	6,36 ^{e,f} ±0,10	21,71 ^{c,d} ±0,32	6,30 ^e ±0,06	25,27 ^{c,d} ±0,41	6,42 ^c ±0,30	24,21 ^b ±0,43
Força máxima 168h (N)	6,30 ^{e,f} ±0,10	24,63 ^b ±1,15	6,71 ^e ±0,18	26,96 ^{b,c,d} ±0,27	6,26 ^c ±0,10	27,97 ^{a,b} ±0,61
Força máxima 216h (N)	6,42 ^{e,f} ±0,50	23,18 ^{b,c} ±1,24	7,57 ^e ±0,48	30,50 ^a ±0,41	7,12 ^c ±0,46	29,71 ^{a,b} ±0,45
Força máxima 264h (N)	7,99 ^e ±0,53	27,52 ^a ±0,84	6,55 ^e ±0,49	28,50 ^{a,b,c} ±0,99	6,46 ^c ±0,43	28,11 ^{a,b} ±1,90
Força máxima 312h (N)	7,31 ^{e,f} ±0,09	27,31 ^a ±0,52	6,55 ^e ±0,49	29,68 ^{a,b} ±3,82	7,33 ^c ±0,12	29,07 ^{a,b} ±7,79

Tabela 4. Crescimento das culturas microbiológicas nos meios substituídos e controles.

Espécie	Meio de cultura	Critério	Tipo do meio	Valor médio (número de colônias ou
<i>Staphylococcus aureus</i>	LB	UFC	Controle	$4,0 \pm 1,0$
			Substituído	$5,0 \pm 1,0$
<i>Eschericcia coli</i>	LB	UFC	Controle	$7,0 \pm 1,0$
			Substituído	$8,0 \pm 1,0$
<i>Bacillus subtilis</i>	LB	UFC	Controle	$3,7 \pm 2,1$
			Substituído	$4,3 \pm 1,2$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YPD	UFC	Controle	$5,0 \pm 1,0$
			Substituído	$4,3 \pm 0,6$
<i>Pichia pastoris</i>	YPD	UFC	Controle	$6,3 \pm 1,3$
			Substituído	$6,7 \pm 3,0$
<i>Candida albicans</i>	BDA	UFC	Controle	$2,7 \pm 1,2$
			Substituído	$4,0 \pm 1,0$
<i>Aspergillus niger</i>	BDA	Diâmetro halo	Controle	$4,4 \pm 0,1$
			Substituído	$4,6 \pm 0,1$
<i>Penicillium sp.</i>	BDA	Diâmetro halo	Controle	$5,2 \pm 0,3$
			Substituído	$5,0 \pm 0,2$

4. CONCLUSÕES

A substituição parcial do ágar por polissacarídeo de PEJU mostra-se viável para a formulação de meios de cultura sólidos. Com exceção da textura, avaliada pela força máxima de rompimento, os meios de cultura contendo a substituição de ágar por 50% de PEJU não tiveram alterações significativas nas características estudadas. Os meios substituídos demonstraram não interferirem no crescimento dos microrganismos sendo, portanto adequados para a utilização em atividades que exijam o cultivo de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. A substituição de ágar por PEJU é uma alternativa viável para reduzir os custos com a fabricação de meios de cultura, proporcionando ainda valorização de matéria prima abundante no Brasil em detrimento do consumo de ágar que é um produto de alto valor agregado de origem estrangeira.

5. REFERÊNCIAS

- ALI, B. H.; ZIADA, A.; BLUNDEN, G. Biological effects of gum Arabic: a review of some recent research. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 1-8, 2009.
- ANDERSON, D. M.; BELL, P. C. Structural analysis of the gum polysaccharide from *Anacardium occidentale*. **Analytica Chimica Acta**, v. 79, p. 185-197, 1975.
- CARUSO, M. W. **Análise do efeito combinado da irradiação e do tratamento hidrotérmico nas características de qualidade de mangas para exportação**. 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2009.
- KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.
- LIMA, A.C.; SANTOS, R.A.; ALMEIDA, F.A.G.; BANDEIRA, C.T.; Estimulantes químicos na extração da goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.), **Ciência Rural**, v. 31, n.3, p.409-415, 2001.
- MONTHE, C.G.; RAO, M.A.; Rheological behavior of aqueous dispersions of cashew gum and gum arabic: effect of concentration and blending, **Food Hydrocolloids**, 13, 501-506, 1999.
- SILVA, B. D. S.; ULHOA, C. J.; BATISTA, K. A.; DI-MEDEIROS, M. C.; SILVA-FILHO, R. R.; YAMASHITA, F.; FERNANDES, K. F.; Biodegradable and bioactive CGP/PVA film for fungal growth inhibition, **Carbohydrate Polymer**, 89, 964-970, 2012.
- SILVA, THÂMARA M. **Caracterização de polissacarídeo extraído de goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.) e sua aplicação para imobilização de horseradish peroxidase (HPR)**. 2007. 71f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

ZOHURIAAN, M.J.; SHOKROLAHI, F.; Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing** 23, 575-579, 2004.

WU, Y.; GENG, F.; CHANG, P. R.; YU, J.; MA, X. Effect of ágar on the microstructure and performance of potato starch film. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 299-304, 2009.

Wendell Jacinto Pereira - Bacharelado em Biotecnologia na Universidade Federal de Goiás. Atualmente possui bolsa de Iniciação Científica pelo Centro Nacional de Pesquisa em Arroz e Feijão - Embrapa .Desenvolve pesquisa para avaliação da expressão de genes alvos em *Phaseolus vulgaris* em qPCR

Rômulo Roosevelt da Silva Filho - Graduando em Biotecnologia pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Estagiário do Laboratório de Química de Proteínas no Instituto de Ciências Biológicas II da UFG, onde trabalha com polissacarídeos de plantas do cerrado desde 2010.

Marcos Antônio Pereira Junior - Atualmente é aluno no programa de Pós-Graduação em Ciências Moleculares, em nível Mestrado na Universidade Estadual de Goiás (UEG) e Professor do Centro de Educação Profissional de Anápolis. Tem experiência na área de Biologia Geral e Bioquímica, com ênfase em Microbiologia e caracterização bioquímica e molecular de microrganismos.

Karla de Aleluia Batista - Possui graduação em Farmácia pela Universidade Estadual de Goiás (2007) e mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Goiás (2010). Doutoranda em Biologia pela Universidade Federal de Goiás

Kátia Flávia Fernandes - Graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Ceará (1987), mestrado em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (1991) e doutorado em Química pela Universidade Estadual de Campinas (2000).

Pós doutorado na UEL, área de tecnologia de Alimentos, com projeto de Desenvolvimento de Embalagens Bioativas (2008). Pós doutorado na Universidade de Murica (Espanha) com o projeto de Biorreatores com enzimas imobilizadas para degradação de quitina (2009). Professor da Universidade Federal de Goiás e coordenadora do Laboratório de Química de Proteínas. Tem experiência na área de Bioquímica, com ênfase em Enzimas, atuando principalmente nos seguintes temas: imobilização de enzimas e proteínas; escurecimento enzimático e processamento de alimentos; plantas de cerrado; bioreatores; e síntese de novos materiais, especialmente derivados de polianilina. Atua também como Avaliador da Qualidade de Ensino de Cursos de Graduação em Farmácia e Avaliador Institucional pelo INEP/MEC