

RHAYLA GOMES MENEGUIN

**ANÁLISES REOLÓGICAS DE GÉIS ÁGAR/GALACTOMANANA VISANDO
APLICAÇÃO EM MEIOS DE MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL**

CURITIBA

2009

RHAYLA GOMES MENEGUIN

**ANÁLISES REOLÓGICAS DE GÉIS ÁGAR/GALACTOMANANA VISANDO
APLICAÇÃO EM MEIOS DE MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL**

Monografia apresentada para conclusão
do Curso de Ciências Biológicas ao
Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular, Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Joana Léa Meira Silveira
Co-Orientador: Prof^º. Dr^º. Aducto B. P. Netto

CURITIBA

2009

A única maneira de se definir os limites do possível é ir além dele, para o impossível. (Artur Charles Clarke)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Joana Léa Meira Silveira pela oportunidade e confiança, pelos ensinamentos e apoio para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. Adauto B. P. Netto por estar sempre acessível e disposto a ajudar. Obrigada!

À Magda de Fátima Gomes da Silva, Yuri Meneguim, João Vitor Bueno, Pedrina Pegorer da Silva, Aderce Martins de Oliveira, Elizandra Gomes da Silva, Flávia Alice Portezan Miranda e Tatiana Rodrigues Oshikawa, pessoas que eu amo e que desde muito cedo me apoiaram e sempre estiveram ao meu lado nos momentos difíceis, a todos vocês, minha família, muitíssimo obrigado!

Aos meus amigos: Anna Gabrielle Gomes Coutinho, obrigada pelo companheirismo e grande amizade; Ana Patrícia Mykito, minha admiração e imenso carinho; Eduardo Lemons Francisco, pelo apoio, incentivo e empolgação com a nossa profissão; Guilherme Augusto Damásio, obrigada por me ensinar a ser mais tolerante e pelos momentos felizes ao seu lado; Natascha Wosnik, obrigada por me deixar ser sua amiga e fazer parte da minha vida; Rudá Emanuel Egidio Pereira, meu grande amigo, obrigada; Marcelo Burigo, minha admiração pela sua competência e carinho. Estes anos de faculdade não seriam tão especiais sem vocês. Cada um do seu jeito, minha admiração e carinho.

Aos meus colegas e amigos do laboratório, muitíssimo obrigada por todos os ensinamentos. Obrigada, Ana Paula, Lúcia, Larry, Andréa, Elizangela, Heidi, Rogério, Mariana, Marina, Marília, Karen, Nicole, Luciano, e em especial ao Ricardo!

A você, Gabriel Roberto Neves Oliveira, que tornou minha vida muito mais feliz e completa, meu amor, admiração e carinho para sempre.

RESUMO

O ágar é um hidrocolóide muito utilizado em meios de cultura vegetal e microbiano. Este polissacarídeo é extraído de certas espécies de algas vermelhas da família *Rhodophyceae*. Muitos trabalhos vêm ressaltando a importância da escolha do agente gelificante para o processo da micropropagação vegetal, podendo, em alguns casos, favorecer o crescimento *in vitro*, além de potencialmente reduzir o custo do meio de cultura. Levando em consideração os bons resultados, (PEREIRA-NETTO, MENEGUIN, SILVEIRA, 2009), obtidos pelo crescimento diferencial do porta-enxerto da macieira marubakaido (*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh) em meios Murashige & Skoog (MS), gelificados com ágar (6g/L) e substituições parciais por galactomananas de *Schizolobium paraybae* (Vellozo) Blake nas proporções de 6,25; 12,5; 25,0 e 37,5%, procurou-se investigar as possíveis causas do crescimento diferencial do porta-enxerto e investigar a influência do processo de esterilização do meio de cultura por análises reológicas dinâmicas oscilatórias, dinâmicas termo-mecânicas e de arraste e recuperação. Através de medidas reológicas pode-se observar que os valores de G' e G'' para as amostras autoclavadas são menores que tais valores para as amostras não autoclavadas, exceto nas concentrações de 6,25 e 12,5% de galactomanana, indicando que em baixas concentrações a adição de galactomanana é capaz de estruturar e fortalecer de alguma forma o sistema após autoclavagem. As análises por HPSEC-MALLS demonstram a interação entre o ágar e a galactomanana, aliado às análises por GLC, indicam que a não degradação da galactomanana pelo porta-enxerto da macieira, está relacionado aos efeitos sinérgicos decorrentes da mistura dos polissacarídeos ágar e galactomanana e não à disponibilidade de monossacarídeos livres (análises por GLC), derivados da degradação da galactomanana.

Palavras-chave: Galactomanana. *Schizolobium paraybae*. Ágar. Reologia. Micropropagação.

LISTA DE SÍMBOLOS

Pa= N/M ²	Pascal é igual a um Newton por metro cúbico
cPa.....	centi Pascal
°C.....	graus Celsius
mm.....	milímetros
mg/L.....	miligramas por litro
mg/mL.....	miligramas por mililitros
µm.....	micrometros
p/v.....	peso por volume
g/L.....	gramas por litro
M.....	molar
v/v	volume em volume
rpm.....	rotações por minuto
t.....	tempo
J.....	Fator de compliança
F.....	Frequência
τ.....	Tensão de cisalhamento
η.....	viscosidade
η*	viscosidade dinâmica complexa
ω.....	velocidade angular
Hz.....	hertz
G ₁	módulo elástico de Kelvin-Voight
G ₀	módulo elásticos instantâneo
G*.....	módulo complexo
G'.....	módulo elástico ou de armazenamento
G''.....	módulo viscoso ou de perda
$\dot{\gamma}$	taxa de cisalhamento
MS.....	Murashige & Skoog

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVO GERAL	11
1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL	12
2.2 ÁGAR	17
2.3 GALACTOMANANA	21
2.4 <i>SCHIZOLOBIUM PARAHYBAE</i> (VELL.) BLAKE (GUAPURUVU)	27
2.5 REOLOGIA	29
3 FLUXOGRAMA	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	38
4.2 COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA MURASHIGE & SKOOG (1962)	39
4.3 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁGAR/GALACTOMANANA DE GUAPURUVU	39
4.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA	39
4.5 DETERMINAÇÃO DA HOMOGENEIDADE	40
4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES REOLÓGICAS	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 ANÁLISES REOLÓGICAS	43
5.1.1 Análises Dinâmicas Oscilatórias	43
5.1.2 Análise de arraste e recuperação	49
5.1.3 Análises dinâmicas termomecânicas	52
5.2 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA (GLC)	55
5.3 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉERICA DE ALTA EFICIÊNCIA-HPSEC	57
6 CONCLUSÃO	61
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos a busca por substitutos do ágar como agente gelificante tem crescido consideravelmente (CIGDEM; KHALID; ORHAN, 2008). O ágar é muito utilizado em meios de cultura, vegetal e microbiano, pois não apresenta toxicidade, é estável, translúcido e metabolicamente inativo (HENDERSON; KINNERSLEY, 1988). Entretanto, alguns estudos questionam a inatividade biológica e a natureza não tóxica do ágar (DEGERGH, 1983), além de constituir um produto de alto custo, cujas principais marcas são importadas.

Atualmente, muitos trabalhos visam encontrar novas matrizes que possuam propriedades vantajosas e ao mesmo tempo baixo custo. As matrizes utilizadas até então, incluindo o ágar, não apresentam todas as propriedades desejáveis, como por exemplo: neutralidade, fácil disponibilidade e preço competitivo; faltam a elas uma ou mais características. Portanto, vale a pena identificar gelificantes mais adequados, particularmente para cultura de tecidos em escala comercial (LUCYSZYN *et al.*, 2006).

O agente gelificante utilizado para o meio de micropropagação vegetal deve ser firme o suficiente para suportar o enxerto, mas se for muito rígido, o contato entre o meio e o tecido vegetal não será adequado para um crescimento ótimo da planta (BERRIOS *et al.*, 1999).

A maior parte dos meios de cultura é gelificado com ágar, um hidrocolóide extraído da parede celular de certas espécies de algas vermelhas, principalmente *Gracilaria* e *Gelidium*, pertencentes à família *Rhodophyceae*. Estruturalmente é um polissacarídeo de cadeia linear composto pela repetição do dissacarídeo 3-β-D-galactopiranosil-(1→4)-3,6-anidro-α-L-galactopiranosil (ARAKI, 1966).

A galactomanana é sugerida como um biopolímero para uma substituição parcial do ágar (LUCYSZYN *et al.*, 2006; 2007).

Galactomananas estão presentes no endosperma de sementes de várias plantas, a maioria proveniente da família Leguminosae. Apresentam como estrutura genérica uma cadeia principal com unidades de β-D-manopiranosose com ligações (1→4), substituídas no carbono 6 por unidades de α-D-galactopiranosose (DEA; MORRISON, 1975; SONI E BOSE, 1985).

Em trabalho realizado anteriormente (PEREIRA-NETTO, MENEGUIN, SILVEIRA, 2009), a substituição parcial do ágar em meio de cultura por galactomanana obtida de sementes de guapuruvu (*Schizolobium paraybae*), uma espécie nativa da floresta Atlântica, resultou em maior crescimento de partes aéreas do porta-enxerto da macieira marubakaido (*Malus prunifolia*).

Com base nisso esse trabalho se propôs a investigar os meios de cultura utilizados para o crescimento do porta-enxerto da macieira marubakaido por meio de análises reológicas, por GPC e HPSEC-MALLS. Através desses experimentos buscou-se encontrar uma possível explicação para o crescimento diferencial das partes aéreas do material vegetal nos meios de cultura contendo substituições parciais de ágar por galactomanana de guapuruvu.

1.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os meios MS, gelificados com ágar e os substituídos parcialmente por galactomanana de guapuruvu, visando inter-relacionar as propriedades reológicas ao crescimento diferencial do porta enxerto da macieira marubakaido.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Caracterizar as propriedades reológicas de meios de cultura gelificados com misturas de ágar/galactomanana,
- 2 Investigar a influência do processo de autoclavagem nos meios de cultura por análises reológicas,
- 3 Avaliar a incorporação da mistura ágar/galactomanana por cromatografia de gel permeação - HPSEC-MALLS,
- 4 Analisar a composição monossacarídica dos meios de cultura gelificados com misturas de ágar/galactomanana durante o crescimento do porta-enxerto da macieira marubakaido.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micropropagação Vegetal

Na micropropagação, órgãos e tecidos de plantas são introduzidos *in vitro*, estabelecidos e mantidos em culturas assépticas para regenerar novas plantas (HARTIMANN *et al.*, 2002). Os meios nutritivos fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos cultivados e também participam do controle do padrão de desenvolvimento *in vitro*.

A micropropagação vegetal pode ser utilizada como uma poderosa ferramenta na ciência. Dentre as possibilidades, viabiliza a clonagem de várias espécies, a partir de células, órgãos ou pequenos fragmentos de uma planta matriz. É um procedimento de importância prática e potencial na agricultura, com especial enfoque na produção em larga escala de plantas praticamente isentas de patógenos, bem como na pesquisa básica, principalmente em citologia e fisiologia celular. Além disso, podem-se produzir clones de plantas que apresentam dificuldades de propagação via macropropagação. Outra vantagem desta técnica é a produção de mudas independente da época do ano (GEORGE, 1993).

Comercialmente, há um crescente interesse na micropropagação de plantas ornamentais, sendo possível o desenvolvimento de plantas com genótipos melhorados (GLENDON; ERWIN, 2007). *Maranta leuconeura* é uma planta ornamental, monocotiledônea, pertencente à família Marantaceae (BAILEY, 1949). É uma planta com folhagem vistosa, muito utilizada na decoração de ambientes. A *M. leuconeura* é um bom exemplo da aplicação da técnica de cultura de tecidos, pois essa planta não pode ser propagada através da semente, por isso seu tecido meristemático é utilizado para a micropropagação, obtendo-se clones (EBRAIM; IBRAHIM, 2000).

Murashige (1974) determinou três etapas para a micropropagação: 1) estabelecimento de culturas assépticas; 2) multiplicação dos propágulos e 3) preparação para estabelecimento das plantas no solo. Alguns anos mais tarde, Debergh e Maene (1981) propuseram cinco etapas: 1) preparação de plantas matrizes, 2) estabelecimento de culturas assépticas; 3) multiplicação; 4) indução,

alongamento e desenvolvimento de raízes; 5) aclimação em condições de casa-de-vegetação.

A micropropagação inicia-se com a escolha das plantas matrizes, que devem ser vigorosas (CASSELS, 2005) e não podem apresentar sintomas de doenças. A retirada de explantes deve ser preferencialmente a partir de brotações novas formadas durante a fase ativa de crescimento da planta (BONGA; DURZAN, 1987). Explantes oriundos de tecidos juvenis como brotações apicais, embriões zigóticos ou partes de plântulas são considerados os melhores para o cultivo *in vitro* de espécies lenhosas (AHUJA, 1993).

Explantes oriundos de tecidos meristemáticos apresentam grupos de células indiferenciadas, totipotentes, localizadas nos ápices de caules, raízes e nas axilas das folhas que possuem capacidade de se regenerar e se diferenciar em órgãos e tecidos (KYTE E KLEYN, 1996).

Na cultura de tecido as contaminações podem causar grandes prejuízos, deixando o explante inviável para o subcultivo ou levando à morte do material *in vitro*. Esses problemas são maiores quando a contaminação só é detectada durante os subcultivos, causando diminuição da produtividade (CASSELS, 1991).

Antes de iniciar uma cultura *in vitro* é realizada a desinfestação do material vegetal para remover os microorganismos dos tecidos. O hipoclorito de sódio (NaClO) é bastante utilizado para desinfestações e a concentração pode variar de 0,25 a 2% v/v, dependendo do material vegetal e da idade do tecido, sendo que diferentes partes de uma planta apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade das soluções aplicadas (GEORGE, 1993). Dentre os agentes usados para a desinfestação dos explantes incluem-se o cloreto de mercúrio, o ácido clorídrico, o cloreto de benzalcônico, o peróxido de hidrogênio, e os mais comumente utilizados, o hipoclorito de cálcio e o hipoclorito de sódio (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998). Geralmente um surfactante ou um detergente é adicionado à solução para facilitar a sua ação, aumentando o contato da solução com os tecidos (TORRES, 1998). Porém, a adição deste pode, além de diminuir a contaminação, aumentar a toxicidade do hipoclorito para o tecido vegetal (BONGA; DURZAN, 1985).

A multiplicação é a fase da propagação *in vitro* de plantas. Nesta fase os explantes possuem um crescimento uniforme e adequado, por essa razão, o

propósito deste estágio é a multiplicação das gemas ou das microestacas, para posterior enraizamento.

Os meios de cultura utilizados possuem em suas formulações macronutrientes, micronutrientes, carboidratos, geralmente sacarose, e alguns compostos orgânicos como vitaminas e aminoácidos. Essas substâncias são essenciais para o crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS, 1998).

Existem formulações de meios de cultura com altas concentrações de sais, principalmente os íons nitrato e amônio, como a do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). O meio MS é a formulação mais utilizada para Angiospermas (HARRY; THORFE, 1994). O meio de cultura WPM “wood plant médium” (LLOYD ; MCCOWN, 1980) apresenta menores concentrações de sais, especialmente nitrogênio e potássio, quando comparado ao meio MS. Esse geralmente é utilizado em espécies lenhosas quando o meio MS não é eficiente (HARRY; THORFE, 1994).

A composição e concentração dos reguladores vegetais no meio de cultivo são fatores determinantes do crescimento e do padrão de desenvolvimento da maioria dos tecidos em cultura *in vitro* (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). As citocininas fazem parte de uma classe de fitoreguladores que estão diretamente relacionadas com a divisão celular e são utilizados principalmente para a proliferação de gemas axilares, pela capacidade de modificação da dominância apical (GEORGE, 1993). Dentre as citocininas, a cinetina (CIN) e a 6-benzilaminopurina (BAP) são as mais utilizadas, sendo que a BAP tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies, em concentrações que podem variar entre 0,4 a 22,19 μM (GEORGE, 1993). Outro grupo, o das auxinas (AIA-ácido indol acético, ANA- ácido naftaleno acético e AIB- ácido indol 3-butírico), pode ser utilizado nessa fase, porém em baixas concentrações (HARTMANN *et al.*, 2002).

Algumas espécies apresentam alongamento natural de suas brotações durante a fase de multiplicação, podendo ser enraizadas diretamente. O alongamento é utilizado quando as partes aéreas produzidas são muito pequenas, em geral, isso ocorre quando as brotações são cultivadas em meios de cultura com concentrações relativamente altas de citocininas durante a regeneração ou proliferação das brotações (GEORGE, 1996).

A etapa de enraizamento caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo o posterior transplante para condições *ex vitro*. Geralmente, o enraizamento de espécies herbáceas é mais fácil, porém o mesmo não ocorre com as espécies lenhosas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O enraizamento de lenhosas é dependente da relação entre os níveis de auxina e citocinina, participação de outras substâncias reguladoras de crescimento (como por exemplo: giberelinas e ácido abscísico), influência de cofatores e fatores fisiológicos e externos (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

Na indução de raízes *in vitro*, geralmente, os meios de cultura são acrescidos de diferentes tipos e concentrações de auxinas, sendo que esses reguladores são os que mais influenciam no sucesso dessa etapa (ROCHA, 2006). A rizogênese pode ser dividida em três etapas: indução, iniciação e alongamento das raízes. As duas primeiras fases dependem da adição de auxina no meio de cultura, enquanto a auxina geralmente inibe o alongamento das raízes (GEORGE, 1996).

A luminosidade pode interferir na indução e desenvolvimento de raízes. Em alguns tecidos, os períodos de escuro promovem o enraizamento, enquanto em outros, a luz aumenta a formação de raízes. A exposição das brotações a um período escuro pode melhorar a formação de raízes na fase inicial (ECONOMOU; READ, 1987).

Plantas crescendo *in vitro* estão expostas a condições controladas, com alto valor de nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores de crescimento, fonte de carbono, alta umidade relativa do ar, baixa luminosidade e trocas gasosas restritas (SHACKEL; NOVELLO; SUTTER, 1990; PREECE; SUTTER, 1991). Embora essas condições controladas favoreçam o rápido crescimento e multiplicação dos brotos, as plantas podem ter suas chances de sobrevivência reduzidas quando são plantadas no campo (ALBARELLO *et al.*, 2001). Brainerd e Fuchigami (1981) relataram a necessidade da aclimatização das plantas crescendo *in vitro* porque elas são sensíveis e tenras, a cutícula é pouco desenvolvida, resultando em alta transpiração e a parede celular não apresenta rigidez suficiente para a sustentação.

A aclimatização é o processo de transição das plantas *in vitro* para ambientes em condições naturais. Esse processo deve ocorrer progressivamente, de forma que as plantas não sofram estresse ocasionando danos ou até mesmo à morte (SILVA *et al.*, 1995). Para maior sucesso da aclimatização recomenda-se que

seja feita uma pré-aclimatização das plantas. Amoreiras, por exemplo, foram pré-aclimatizadas por um período de 48 horas, dentro de tubos destampados, ainda com meio de cultura, em sala arejada e sombreada com temperatura ambiente de 20 a 22°C (SILVA *et al.*, 1995).

Entre as espécies lenhosas micropropagadas, a macieira é considerada de difícil enraizamento, característica associada a baixas taxas de sobrevivência em condições *ex vitro*, por este motivo, a planta passa por dois estágios, o enraizamento e a aclimatização, simultaneamente. Devido a sua importância econômica (principais estados produtores: Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo) (<http://www.agricultura.gov.br>), o porta-enxerto da macieira marubakaido (*Malus Prunifolia*), vem sendo bastante estudado para obtenção de novos protocolos que ultrapassem os obstáculos da micropropagação e garantam alta produtividade.

Pedrotti e Vontolin (2001) avaliaram diferentes níveis de ácido indol 3-butírico (AIB) no enraizamento *ex vitro* e aclimatização simultânea do porta-enxerto de macieira M.9 (*Malus pumila*). Os melhores resultados para porcentagem de enraizamento (82 e 84%) foram obtidos nos tratamentos com 500 e 1000 mg/L, respectivamente. A concentração de 500mg/L de AIB é a mais efetiva para o enraizamento e sobrevivência das plantas, aos 45 dias após o transplante em casa de vegetação.

Maciel, Vontolin e Pedrotti, (2002) utilizaram um substrato composto por terra roxa estruturada e casca de arroz carbonizada (para o enraizamento, simultâneo com a aclimatização), e esse procedimento foi eficiente comparado com o enraizamento *in vitro*. Nessas condições, foi possível reduzir o tempo e os custos de produção de mudas micropropagadas de macieira marubakaido, podendo viabilizar economicamente o uso comercial desta técnica.

Baixas temperaturas também podem promover maior crescimento de plantas de macieira (*Malus prunifolia*) recém aclimatizadas. Além disso, as folhas de plantas micropropagadas apresentam um efeito inibitório sobre o alongamento dos entrenós e, conseqüentemente no crescimento das plantas, e a sua remoção após uma ou duas semanas de aclimatização, podem beneficiar o crescimento das plantas em casa de vegetação (PEREIRA; FORTES, 2000).

Lima-Nishimura *et al.*, (2003) investigaram a substituição parcial do ágar por xiloglucana de *Hymenaea courbaril* e mostrou que essa mistura pode ser utilizada

como agente gelificante para meios de micropropagação das espécies *Malus prunifolia* e *Malus domestica*. Nesse estudo, houve uma redução de 33% na utilização do ágar, um agente gelificante caro e importado, substituído por um polissacarídeo extraído de uma planta nativa. A adição de xiloglucana favoreceu as etapas de multiplicação e enraizamento para ambas as espécies, além de diminuir a hiperhidricidade durante a fase de multiplicação.

O crescimento diferencial do porta-enxerto da macieira marubakaido cultivado em meio MS e gelificado com cinco tipos diferentes de ágar comercial foi investigado por Pereira-Netto *et al.*, (2007). Neste trabalho o ágar A7002 e o A7921 apresentaram a melhor taxa de multiplicação e maior quantidade de brotos, esses fatos podem ser explicados por análises de HPSEC-MALLS, que mostram uma baixa polidispersão e menor quantidade de moléculas de alto peso molecular, nesses dois tipos de ágares (A7002 e A7921, Sigma Chemical, St. Louis, MO), quando comparados com os outros três tipos estudados.

2.2 Ágar

Ágar é uma complexa mistura de polissacarídeos obtidos de algumas algas vermelhas conhecidas como agarófitas e atualmente, é o agente gelificante mais utilizado em meios de cultura vegetal e microbiano. Alguns autores indicam que a escolha do agente gelificante é uma importante etapa no processo da micropropagação. (DEGERGH, 1983; EBRAHIM AND IBRAHIM, 2000).

Dois gêneros pertencentes à família *Rhodophyceae*, *Gracilaria* e *Gelidium*, são os responsáveis pela maior parte da produção de ágar no mundo, 44% e 53%, respectivamente; sendo apenas, uma pequena porção (3%) extraída de agarófitas como a *Gelidiella* e *Pterocladia* (MCHUGH, 1991). Embora as espécies de *Gracilaria* produzam, geralmente, ágares com menor poder gelificante, comercialmente, elas são a principal fonte de extração.

Muitos estudos relatam que o rendimento do ágar depende da espécie (LIGNELL; PEDERSÉN, 1989), estação do ano (PRICE; BIELIG, 1992; HURTADO-PONCE; UMEZAKI, 1994), época de colheita (BIRD, 1988), condições de extração e processamento (DURAIRATNAM, 1987) e estágio do ciclo de vida (MARINHO-

SORIANO *et al.*, 1999), logo, todos esses fatores podem influenciar as propriedades gelificantes do ágar.

O ágar é um polissacarídeo cuja estrutura é composta por unidades alternadas de (1→3)-β-D-galactopiranosil e (1→4)- 3,6-anidro-α-L-galactopiranosil (ARAKI, 1956). Agarobiose, com sua estrutura dissacarídica básica presente em todos os ágares, está representada na FIGURA 1. O ágar pode ser fracionado em dois componentes (ARAKI; HIRASE, 1954; HIRASE, 1957). A fração formada por um polissacarídeo neutro e que apresenta maior poder gelificante é denominada agarose, a outra fração, chamada agarpectina, possui a mesma estrutura básica da agarose, no entanto, pode ter algumas unidades monossacarídicas substituídas por ácido cetálico pirúvico, 4,6-o-(1-carboxietilideno) D-galactopiranosil ou por unidades de açúcar metiladas ou sulfatadas (HIRASE, 1957). Dependendo da espécie de agarófita os conteúdos de agarose e agarpectina podem variar, modificando as propriedades físico-químicas, mecânicas e reológicas.

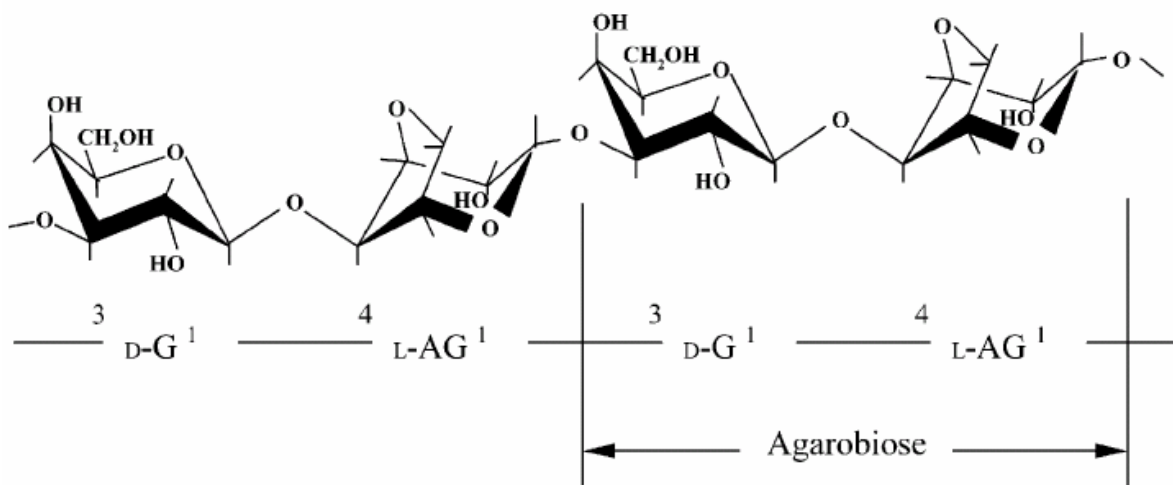


Figura 1-Segmento representativo de uma cadeia de ágar , D-G é β-D-galactopiranosil e L-AG é anidro-3,6-anidro-α-L-galactopiranosil.

Fonte: LABROPOULOS (2002).

A microestrutura e as propriedades mecânicas e reológicas dos géis de ágar podem ser descritas por um modelo nomeado de “rede reticulada” (APLIN; HALL, 1979; DEA; REES, 1987, SCHAFER; STEVENS, 1995). Nesse modelo, a mudança gradual de uma solução homogênea no estado sol para um estado de gel, elástico e não homogêneo, ocorre durante o resfriamento.

No estado de sol, quando a temperatura atinge o ponto de ebulição da água, as moléculas do ágar assumem uma conformação helicoidal aleatória e estão homogeneamente distribuídas na solução (REES, 1972; SERWER, 1983). A gelificação ocorre quando o ágar no estado de sol é resfriado abaixo do seu ponto de gelificação. No estado de gel, as moléculas de ágar se associam umas às outras formando uma rede tridimensional. O modelo cuja estrutura básica é constituída por unidades de duplas hélices é amplamente aceito, sendo que cada cadeia é formada por cerca de 390 unidades de agarobiose e tem peso molecular médio estimado em 120.000 (ARNOTT, 1974). Outros estudos, porém, identificaram diferentes tamanhos de cadeia (SCHAFFER; STEVENS, 1995).

Segundo Arnott (1974), a cavidade ao longo do comprimento das hélices, tem uma largura suficiente para conter moléculas de água. A presença dessas moléculas de água na cavidade das hélices foi posteriormente verificada através de análises por RMN-H (GABRIELSON; EDIRISINGHE, 1996).

Três dos quatro grupos hidroxila (O-2 O-4 O-6 da 3,6-anidro- α -L-galactopiranosil) estão direcionados para a parte externa da hélice e podem formar pontes de hidrogênio com moléculas de água livres ou com hélices vizinhas. Essas pontes de hidrogênio, entre as hélices e no interior delas, são responsáveis por uma organização em um nível superior denominado suprafibras.

As suprafibras podem conter até 10.000 duplas hélices (FIGURA 2) e contribuem significativamente nas propriedades elásticas e na estrutura da rede tridimensional (ARNOTT, 1974; REES, 1972). A suprafibra promove uma diminuição da entropia, pois a rigidez da dupla hélice aumenta (ARNOTT, 1974). Portanto, a rigidez da suprafibra, e consequentemente as propriedades elásticas e reológicas do gel formado pelo ágar, são dependentes das interações entre as duplas hélices.

O ágar é o agente gelificante mais utilizado em meios de cultura de tecidos de plantas. Algumas propriedades fazem com que esse polissacarídeo seja tão utilizado, dentre elas, desta-se a sua natureza não tóxica, estabilidade, transparência e é metabolicamente inativo (HENDERSON; KINNERSLEY, 1988). Entretanto, alguns estudos questionam a inatividade biológica e a natureza não tóxica do ágar (KOHLENBACH; WERNICKE, 1978; DEGERGH, 1983), além disso, as principais marcas que comercializam ágar são importadas, representando um produto de alto custo (KOLENBACH; WERNICKE, 1978).

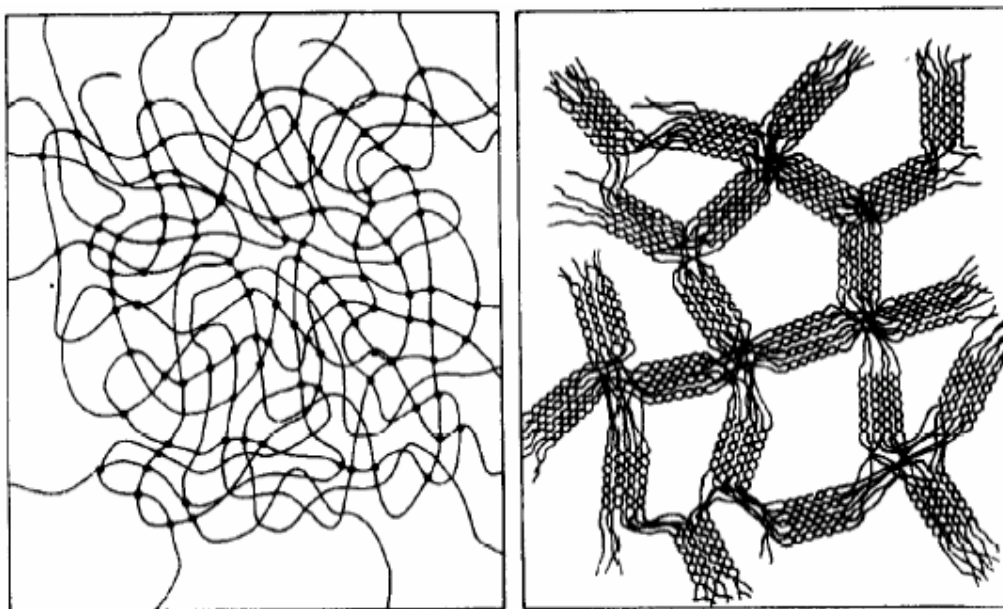


Figura 2- Esquema representando uma rede de um gel de agarose (direita), e uma rede formada por um polissacarídeo (igual concentração) com cadeias dispostas aleatoriamente. O número de hélices representadas no esquema é inferior ao valor real, que pode conter de 10 a 10000 unidades.

Fonte: DEA (1974).

Lahrech, Safouane e Peyrellasse (2005), estudaram as características reológicas do ágar no estado sol. Segundo os autores, a temperatura de fusão do ágar se eleva com um aumento no tamanho da molécula, fato que pode influenciar na possível aplicabilidade industrial desse biopolímero.

Atualmente, muitos trabalhos visam encontrar novas matrizes que possuam propriedades vantajosas e ao mesmo tempo baixo custo. As matrizes utilizadas até então não apresentam todas as propriedades desejáveis, como por exemplo: neutralidade, fácil disponibilidade e preço competitivo; faltam a elas uma ou mais características. Portanto, é importante identificar gelificantes mais adequados, particularmente para cultura de tecidos em escala comercial (LUCYSZYN *et al.*, 2006).

Entre as possibilidades de substituição parcial do ágar podemos citar as galactomananas (DEA, 1972; LUCYSZYN *et al.*, 2006), alginato (ADAHOA; ROSCOE, 1982), carragenana (NORZIAH *et al.*, 2006), isubgol (BABBAR; JAIN, 1998; CIGDEM; KHALID; ORHAN, 2008), xantana (BABBAR; JAIN, 2006).

Norziah *et al.* (2006) investigou as propriedades reológicas da mistura ágar/ κ -carragenana. Os resultados mostraram que a presença de κ -carragenana causa uma diminuição substancial na rigidez do gel (comparado com a amostra 100% ágar). Observou-se também que as propriedades gelificantes do ágar foram mantidas, no entanto, o ponto de gelificação sofreu um decréscimo proporcional ao incremento de κ -carragenana ao sistema.

Carragenana é um polissacarídeo aniônico extraído da parede celular de espécies de algas vermelhas dos gêneros *Gigartina*, *Chondrus*, *Iridae* e *Eucheuma*. Carragenanas são uma família de galactanas sulfatadas, lineares e solúveis em água. São formadas de cadeias de (1→3)- β -D-galactopiranosose e (1→4)- α -D-galactopiranosose ou (1→4)3,6-anidro- α -D-galactopiranosose, formando a unidade repetitiva dissacarídica das carragenanas. Além de galactose e sulfato, outras unidades de carboidratos (como por exemplo, xilose, glucose e ácidos urônicos) e substituintes (como por exemplo, metil e piruvato) podem estar presentes em preparações de carragenanas (VAN DE VELDE; DE RUITER, 2002). Os três tipos principais de carragenanas são *Iota*, *Kappa* e *Lambda*. As duas primeiras contêm unidades de 3,6 anidrogactose e são polímeros formadores de gel e a última contém apenas unidades de galactose e atua como um agente espessante (DE RUITER; RUDOLPH, 1997).

Juntamente com o alginato e o ágar, as carragenanas formam um grupo de substâncias biopoliméricas complexas chamadas ficocolóides, que são colóides, principalmente, de natureza hidrofílica (FERNÁNDEZ *et al.*, 2003). Essa característica confere as carragenanas enorme importância em diferentes indústrias como: alimentícia, farmacêutica e cosmética (THERKELSEN, 1993; IMESON, 2000).

2.3 Galactomananas

Galactomananas constituem o segundo maior grupo de polissacarídeos de reserva com respeito à sua distribuição no mundo vegetal (SHCHERBUKIN; ANULOV, 1993), sendo que a principal fonte de galactomananas está no endosperma de sementes, principalmente nos membros da família *Leguminosae* (aproximadamente 1800 espécies), dividida em três sub-famílias: *Mimosoidae*, *Caesalpinoideae* e *Faboideae*, pertencentes à ordem *Falabes* (CRONQUIST, 1988).

São encontradas também nas espécies das famílias *Palmae*, *Annonaceae*, *Convolvulaceae* e *Loganiaceae* (DEA; MORRISON, 1975). Supõe-se que as galactomananas tenham dupla função fisiológica: retém água por solvatação prevenindo a desidratação, que poderia causar desnaturação protéica e servem como reserva alimentar (DEA; MORRISON, 1975; GLICKSMAN, 1982; REID *et al.*, 1992). Este biopolímero também pode ser obtido a partir de fontes microbianas, especialmente em leveduras e fungos (BRIÉVRE; MARIAT, 1981; AHRAZEM *et al.*, 2002; SASHKOVI *et al.*, 2003; GIMÉNEZ-ABINÁN *et al.*, 2007).

Galactomananas são uma família de polissacarídeos que apresentam como estrutura genérica uma cadeia principal com unidades de β -D-manopiranoose com ligações (1 $\rightarrow$ 4), substituídas em O-6 por unidades de α -D-galactopiranoose (DEA; MORRISON, 1975; DEY, 1978; SONI; BOSE, 1985) (FIGURA 3). As galactomananas da ordem *Fabales* de diferentes grupos taxonômicos diferem em seus graus de substituição por galactose e são encontradas relações manose/galactose entre 1,1 (altamente substituídas) e 5,0 (pouco substituídas) (DEA; MORRISON, 1975). A relação manose/galactose parece ser controlada geneticamente. Em geral, as galactomananas menos substituídas são obtidas de sementes de espécies com mais características plesiomórficas (Caesalpinaceae) e as moderada ou altamente substituídas, de espécies com mais caracteres apomórficos (*Fabaceae*). O alto grau de substituição por galactose é necessário para prevenir a agregação das cadeias de galactomanana que poderia levar à insolubilidade. Durante a embebição da semente, a água entra no endosperma da parede celular, constituído por galactomanana, provocando um entumescimento. Este evento protege o embrião do dessecação, caso a semente seja submetida a uma condição posterior de ausência de água (REID; BEWLEY, 1979).

Poucas sementes têm seu metabolismo de germinação estudado em detalhes, apesar do grande número de espécies que apresentam estoques desse polissacarídeo no seu endosperma (BUCKRIDGE; SANTOS, 2000).

Nas sementes de goma guar (*Cyamopsis tetragonobus*) e feno-grego (*Trigonella foenum-graecum*), em que o endosperma é preenchido principalmente por galactomanana, enzimas hidrolíticas são produzidas por uma camada protéica de aleurona (camada de células que revestem o endosperma da semente) que promovem a quebra da parede celular do estoque do polissacarídeo, seguindo a germinação.

Alguns estudos relacionados com a mobilização de galactomanana em sementes confirmam a presença de três enzimas hidrolíticas nesse processo, liberando manose e galactose como produtos, gerando ao mesmo tempo sacarose. A Figura 3 mostra o esquema de catabolismo da galactomanana (BUCKRIDGE; SANTOS, 2000).

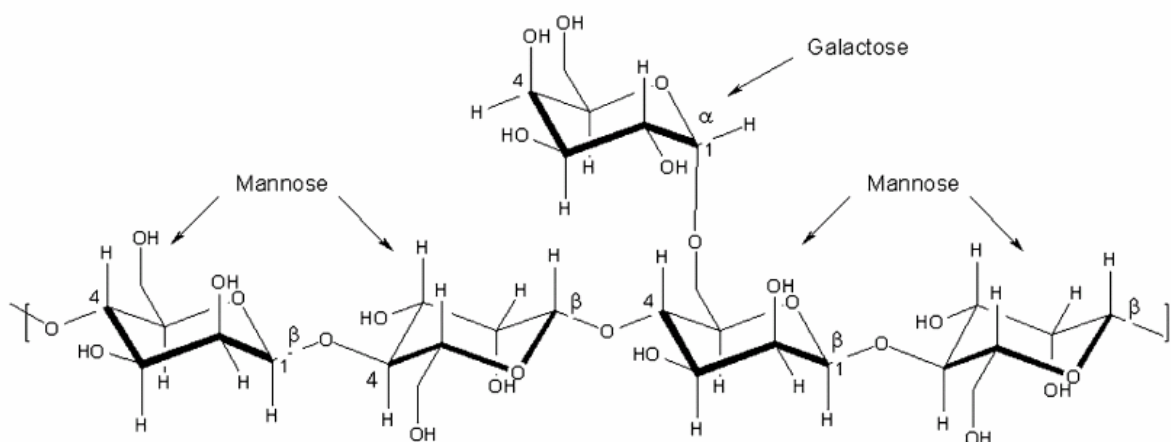


Figura 3- Segmento representativo de uma cadeia de galactomanana.

Fonte: SECOUARD (2006).

Há evidências de que a sacarose proposta na rota (FIGURA 4) é estocada e utilizada no crescimento do embrião e que o amido é temporariamente produzido no cotilédone (REID, 1971; BUCKRIDGE; DIETRICH, 1996). Recentemente, Dirk *et al.*, (1999) propôs que a degradação da parede celular e a síntese do amido estão bioquimicamente relacionadas. McCleary *et al.*, (1976) estudaram a mobilização da galactomanana de goma guar e verificaram que as fosfomanoisomerase e fosfoglucoisomerase tinham atividade no endosperma, sugerindo que essas enzimas são provavelmente responsáveis pela epimerização da manose em glucose usadas na síntese da sacarose. Esses autores desenvolveram embriões com manose e galactose radioativos e demonstraram que os produtos da mobilização da galactomanana na goma guar são usados em diversos processos bioquímicos no desenvolvimento da planta.

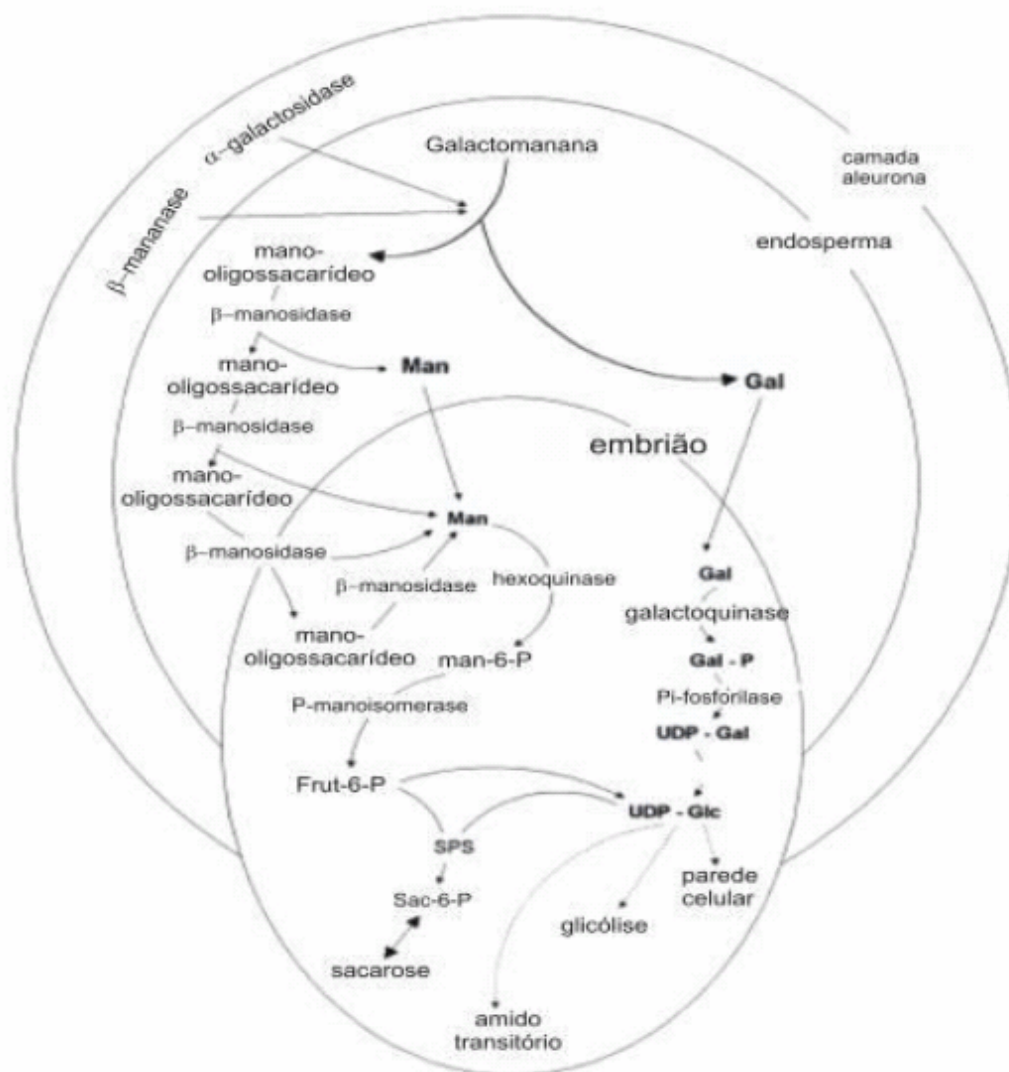


Figura 4- Rota bioquímica envolvendo o catabolismo da galactomanana e seus produtos gerados no embrião da semente da leguminosa. Man: manose; Gal: galactose; SPS: sacarose fosfosintetase; Fru-6-P: frutose-6-fosfato; UDP-gal: galactose uridina difosfato; Sac-6-P: sacarose-6-fosfato; Pi: fosfato inorgânico.

Fonte: BUCKERIDGE; SANTOS (2000).

Já foram isoladas galactomananas, cuja estrutura difere da estrutura clássica. Galactomananas extraídas das sementes de *Retama raetam* apresentam uma pequena porção de ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ e sua cadeia é composta principalmente por ligações $(1 \rightarrow 3)$ (ISHURD *et al.*, 2004).

A galactomanana de *Cássia absus* apresenta aproximadamente 20% de ligações $(1 \rightarrow 3)$ na cadeia de manana, e a substituição em O-2 por α -D-

galactopirranose, além das convencionais em O-6 (GUDIPAT; RUDRAPATNAM, 1988).

A galactomanana quando solubilizada em água forma uma solução bastante viscosa (NEUKOM, 1989), podendo ser utilizada como agente espessante, estabilizante e imulsificante. Esse polissacarídeo é um material versátil e possui numerosas aplicações na indústria têxtil, farmacêutica, alimentar, na elaboração de cosméticos e na biomedicina (VIEIRA *et al*, 2007).

Galactomananas possuem alta capacidade de se ligar à água e formar soluções viscosas em baixas concentrações. Comparadas com o amido em base igual de massa, as soluções de galactomananas são cinco vezes mais viscosas (WHISTLER; SMART, 1953).

As propriedades da galactomanana que permitem sua utilização para fins comerciais, provêm de dois fatores relacionados à sua estrutura molecular: 1) a cadeia principal de $\beta(1\rightarrow4)$ -D-manana, de conformação rígida, conduz a viscosidade elevada em soluções diluídas; 2) o conteúdo de galactose que determina: o grau de solubilidade em água, a combinação com outros polissacarídeos e a estabilidade em sistemas de congelamento (BULPIN *et al.*, 1990).

As três galactomananas de maior importância para a indústria são a goma guar, goma tara e goma alfarrobo. A goma guar é obtida de sementes da espécie *Cyamopsis tetragonoloba*, razão manose/galactose de 2:1, é uma planta de cultivo anual e cresce principalmente em regiões áridas e semi-áridas do subcontinente Indiano, e também é cultivada na Austrália, África do Sul e Estados Unidos (GOLDSTEIN; ALTER; SEAMAN, 1973).

A goma tara, obtida das sementes de *Caesalpinia spinosa*, é nativa do norte da África e da América do Sul, especialmente do Peru, (MAIER *et al.*, 1993), a relação molar manose/galactose é 3:1. A galactomanana de alfarrobo, carob ou *locust bean*, extraída das sementes de *Ceratonia siliqua*, nativa do sul da Europa, é mais abundante na Espanha, mas também é cultivada na Itália, Grécia, Portugal e outros países mediterrâneos. A razão manose/galactose é de 3,5:1 (DAKIA; WATHELET; PAQUOT, 2007).

As gomas guar, tara e alfarroba são utilizadas, entre outras aplicações, na indústria cosmética (GIBBONS, 1963), na indústria têxtil, como espessante para tinturas, em minérios, como agente floculante; na indústria petroquímica, como

agente de fraturação e auxiliar na perfuração (SEAMAN, 1980); na impermeabilização de explosivos (YANCIK; SCHULZE; RYDLUND, 1972); na liberação controlada de fármacos (BAVEJA *et al.*, 1991); como coagulante no tratamento de água (GOLDSTEIN; ALTER; SEAMAN, 1973).

Atualmente existe uma tendência mundial que visa encontrar sementes que constituam fontes alternativas para extração de gomas (CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009) e que poderão ser utilizadas, por exemplo, na produção de filmes biodegradáveis, tanto para a indústria alimentícia como para material de revestimento. Em especial na América Latina, as possíveis fontes de extração de galactomananas não são bem conhecidas, apesar da rica biodiversidade da flora local (AZERO; ANDRADE, 2002; CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009).

O Brasil apresenta fontes de espécies diversificadas para a extração de galactomananas a partir de sementes que poderiam suprir a demanda de importação desses polissacarídeos, além de incluir a melhoria do valor agregado pela utilização de sementes sem capacidade germinativa.

Com o objetivo de aumentar a exploração nesse nicho do mercado, vários trabalhos na literatura caracterizaram estruturalmente galactomananas de diferentes fontes e relacionaram suas propriedades, incluindo *Mimosa scabrella* (Bracatinga) (GANTER *et al.*, 1988; 1992; 1993; 1995; GANTER E REICHER, 1999), *Senna multijuga* (RECHIA-VARGAS, 1995), *Schizolobium amazonicum* (PETKOWICZ, 1993; 1998), *Schizolobium parahybae* (ZAWADZKI-BAGGIO, 1994), *Apuleia leiocarpa* (LUCYSZYN, 1994), *Dimorphandra gardneriana* tul. (CUNHA *et al.*, 2009). Todas com alto rendimento de extração, em torno de 30% (m/m).

Interações sinérgicas entre polissacarídeos são comercialmente atraentes e assunto de difundida exploração tecnológica (CAIRNS; MILES; BROWNSEY, 1987). Polímeros de custo elevado podem ser substituídos por uma mistura gelificante mais barata, e vários tipos de géis podem ser formados, dependendo da natureza dos componentes, da velocidade e extensão das misturas (MORRIS; MILES, 1986). Um tipo de mistura onde são bem conhecidos os efeitos sinérgicos é aquele envolvendo galactomananas, ágar e carragenana (VIEBKE; PICULELI, 1992).

Andrade *et al.*, (2000) observou que galactomananas extraídas de sementes de *Cássia javanica* apresentam propriedades similares a goma alfarrobo, quando em misturas com k-carragenana. Os resultados obtidos por análises reológicas indicam

que *C. javanica* e goma alfarrobo têm efeitos sinérgicos similares com a k-carragenana.

A literatura apresenta estudos que relatam o uso de galactomananas na substituição parcial do ágar em meio de cultura. Lucysyzn *et al.*, 2005, avaliou os meios com ágar e substituição parcial por galactomanana de guar utilizados na micropropagação do morango. O trabalho relata a influência positiva da mistura ágar/galactomanana na taxa de proliferação, rizogênese e crescimento de brotos.

Shobha e Tharanathan (2009) estudaram o uso de uma enzima não específica (pululanase) produzida por cepas de *Bacillus acidopullulyticus* capaz de remover unidades de galactose de goma guar para obtenção de uma goma modificada que imita as propriedades funcionais da goma alfarrobo. A goma modificada, contendo 21% de galactose e razão manose/galactose de 1:3,5, interage melhor com a xantana, podendo ser considerada boa substituta para as misturas xantana/goma alfarrobo, baseado em estudos reológicos.

Wu *et al.*, (2009) investigou as interações de sinergia entre quatro tipos de galactomananas (feno-grego, goma guar, goma tara e goma alfarrobo) e um polissacarídeo não pectico (NPP) de mucilagem de mostarda amarela. O estudo confirma que não apenas a relação molar manose/galactose, mas também a estrutura fina da molécula de galactomanana determinam a magnitude da interação sinérgica, e esta pode ser modificada por ajustes na porcentagem de galactomanana/NPP, concentração total da mistura e condições de Ph.

2.4 *Schizolobium parahybae* (Vell.) Blake (guapuruvu)

Schizolobium parahybae (guapuruvu) é uma espécie nativa do sul do Brasil (ERNANI, 1994) que pertence à sub-família *Caesalpinaceae*. É uma planta decídua, heliófita, característica e exclusiva da mata atlântica. Apresenta dispersão irregular e descontínua; bastante freqüente nas planícies aluviais ao longo de rios (FIGURA 5). Entre suas características estão o porte esguio e o crescimento rápido, podendo apresentar de 10 a 30 metros de altura. Sua expectativa de vida esta entre 40 a 50 anos. É uma das plantas nativas de mais rápido crescimento, floresce a partir do final de agosto com a planta totalmente despida da folhagem, prolongando-se até meados de outubro.

É muito utilizada para recuperação de áreas degradadas, é fonte do inibidor de quimi tripsina (TELES, 2005), utilizada para confecção de caixas, forros, pranchetas, palitos para fósforo, brinquedos, paisagismo (BACKES, 2004) e em reflorestamentos mistos (CARNEIRO, 1996).

O fruto do Guapuruvu, um legume seco e semelhante a uma gota de água, surge durante os meses de julho a agosto e abre-se por meio de duas valvas espatuladas. Abriga uma semente lisa, brilhante e dura, medindo de 1,5 a 2 cm de largura. Alguns polissacarídeos foram isolados do endosperma das sementes de *S. parahybae* e *S. amazonicum*, dentre eles, galactomananas (GANTER *et al.*, 1995), xantanas (BRESOLIN *et al.*, 1997), arabinanas e mananas (PETKOWICZ; SCHAEFER; REICHER, 2007). A dispersão de seus frutos e sementes ocorre pelo vento e, principalmente, pela gravidade (Árvores do Brasil, 2006).



Figura 5- Árvore de *Schizolobium parahybae* (guapuruvu) espécie nativa da Mata Atlântica (direita) e suas sementes (esquerda).

Fonte: www.ecossistema.bio.br/.../imagens/arvore1.jpg (30/11/2009)

<http://img199.imageshack.us/img199/83/semente.jpg> (01/12/2009)

Galactomananas de duas espécies nativas do Brasil, *Mimosa scabrella* (bracatinga) e *Schizolobium parahybae* (guapuruvu), foram estudadas por (GANTER

et al., 1993; 1995). Suas sementes garantem alto rendimento de galatomanana e razão manose/galactose de 1,1:1 e 3:1, respectivamente.

Zawadzki-Baggio (1992) isolou uma L-arabinofuranana com ligações α (1→5) de cadeia linear, de sementes de *S.parahybae*. Essa estrutura contrasta com o polissacarídeo arabinana, altamente ramificado, previamente encontrado na parede celular de raízes (JOSELEAU, 1983; CAPEK, 1983), sementes (MURALIKRISHNA, 1986), tubos polínicos (RAE, 1985), casca (JOSELEAU, 1977) e frutos (TOMODA, 1973; ERIKSSON, 1996) de varias espécies, que são geralmente associadas com materiais pécticos (STEVENS, 1980).

2.4 Reologia

Para investigar as propriedades de interações de polissacarídeos, métodos reológicos têm sido de grande valia. Em linhas gerais a reologia é a ciência que estuda a deformação e o escoamento da matéria (LAPASIN; PRICL, 1995; BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989), o termo é derivado do grego e significa “ciência do fluxo”, cuja definição originalmente dada por Bingham em 1929, é aceita universalmente (NAÉ, 1993).

O comportamento reológico dos polímeros pode ser fortemente influenciado pela massa molar, ramificações da cadeia polimérica, polaridade, copolimerização, mistura de polímeros, partículas sólidas suspensas, interações polímero-solvente e rigidez da cadeia (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; SHAW, 1975).

Para o estudo da reologia é fundamental entender a diferença entre sólidos e líquidos e fluídos.

Uma substância é sólida se, submetida a uma pressão constante que não provoque a sua ruptura, tender a um estado de equilíbrio estático, de repouso, onde a deformação permanece constante.

Uma substância é líquida se, submetida a uma pressão constante, não atinge jamais um estado de equilíbrio estático, sua deformação aumenta de maneira constante e o fluido escoar indefinidamente. A deformação é irreversível.

Um fluido, ao contrario do sólido, não pode equilibrar uma pressão tangencial de cisalhamento, por menor que ela seja.

Isaac Newton determinou a lei básica da viscosimetria descrevendo o comportamento de fluxo de um líquido ideal, ou seja, a tensão de cisalhamento (τ) é

igual à viscosidade (η) multiplicada pela taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$). A tensão de cisalhamento refere-se à força aplicada tangencialmente sobre uma área e a sua unidade é o Pascal ($\text{Pa}=\text{N}/\text{m}^2$). Quando um fluido é mantido entre duas placas paralelas, onde a superior é móvel e a inferior estacionária, ao se aplicar paralelamente uma força F na placa superior, a velocidade do fluxo gerado é máxima na camada ligada diretamente à placa móvel e decresce paralelamente através das camadas adjacentes do fluido, até chegar a zero na camada ligada à placa estacionária. Isso ocorre devido à resistência interna do fluido, ou seja, sua viscosidade (SCHRAMM, 2006).

O fluxo de líquidos em camadas paralelas infinitamente finas que deslizam umas sobre as outras arrastando consigo as camadas adjacentes é chamado de fluxo laminar. Com o tempo, as camadas líquidas sofrem deformação, e a velocidade com a qual a deformação aumenta em relação ao tempo é chamada de taxa de cisalhamento e a sua unidade é $1/\text{s}$. Matematicamente, a taxa de cisalhamento é definida pela velocidade relativa das camadas líquidas dividida pela distância entre elas, indicando a velocidade com que o líquido flui ao se aplicar uma tensão de cisalhamento sobre eles (SCHRAMM, 2006).

Nos fluidos newtonianos a viscosidade é constante em função da velocidade de cisalhamento, já nos fluidos não newtonianos, a viscosidade varia em função da velocidade de cisalhamento (velocidade relativa de cada camada, um fluido entre duas placas paralelas, em relação à sua altura relativa).

O comportamento newtoniano tem as seguintes características a temperatura e pressão constantes:

- (i) A única tensão gerada no cisalhamento simples é a tensão de cisalhamento.
- (ii) A viscosidade de cisalhamento não varia com a taxa de cisalhamento.
- (iii) A viscosidade é constante como tempo de cisalhamento e a tensão no líquido cai a zero assim que o cisalhamento cessa.
- (iv) A viscosidade medida em diferentes tipos de deformação seguem uma proporção simples, por exemplo, a viscosidade medida num fluxo de extensão uniaxial é sempre o triplo do valor medido no fluxo de cisalhamento simples.

Um fluido que demonstrar qualquer desvio desses comportamentos é um fluido não newtoniano.

Os fluidos newtonianos, pseudoplástico, dilatante, Bingham e Herschel-Bulkley, são independentes do tempo, já os sistemas tixotrópicos e reopéticos são dependentes do tempo. As curvas de fluxo e viscosidade características dos fluidos não newtonianos e newtoniano estão ilustradas na Figura 6.

Nos fluídos pseudoplásticos a viscosidade não é constante, quando aumenta a velocidade de cisalhamento, a viscosidade diminui. Ou seja, o fluido escoar mais facilmente conforme sofre uma agitação mais rápida. A velocidade de deslizamento, ou cisalhamento, aumenta mais rapidamente do que a tensão de cisalhamento, resultando em uma curva convexa. As causas do fluxo pseudoplástico é a ruptura progressiva da estrutura tridimensional do meio líquido quando aumenta a velocidade de cisalhamento e a reconstrução desta estrutura por meio de movimento browniano. Dentre os líquidos pseudoplásticos estão diversas substâncias de importância técnica e comercial, tais como soluções poliméricas, emulsões, suspensões ou dispersões (BARNES, 1989; SCHOTT, 1992).

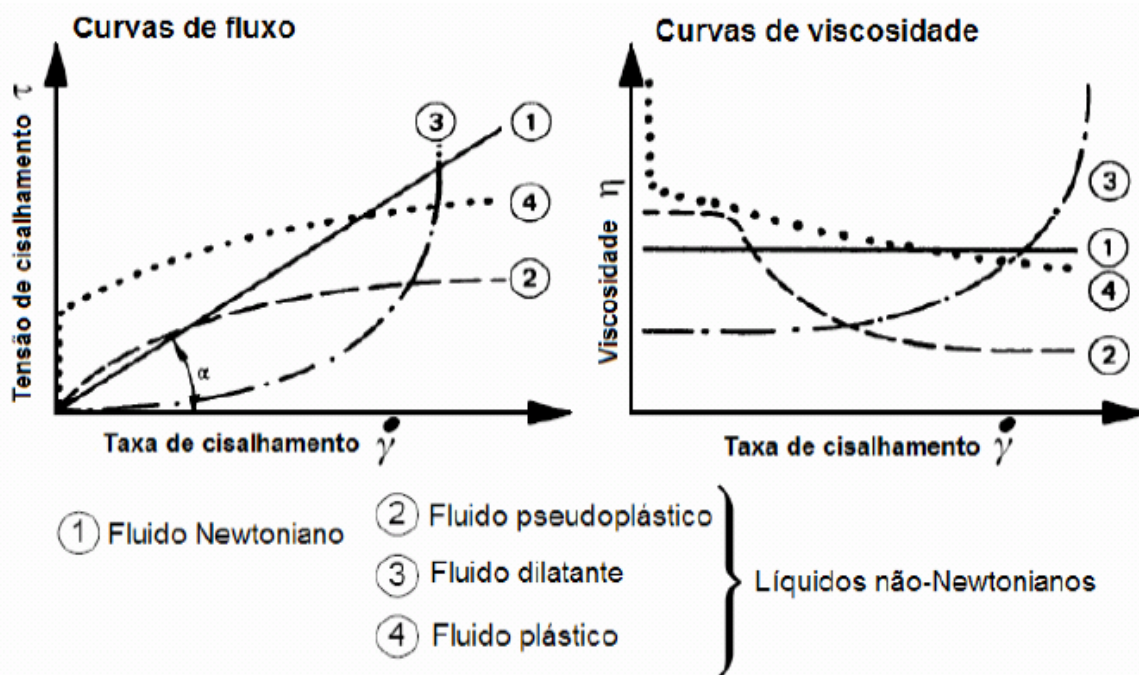


Figura 6 - Curvas de fluxo e viscosidade características de fluídos de comportamento newtoniano e não newtonianos.

Fonte: SCHRAMM (2006).

Um fluido dilatante se comporta de forma oposta ao pseudoplástico, ou seja, a viscosidade aumenta com a velocidade de cisalhamento. Este comportamento manifesta-se nas dispersões concentradas de partículas que não apresentam tendência a associar-se, desde que a quantidade de líquido presente não seja muito maior do que a necessária para preencher os espaços vazios entre as partículas. Quando agitadas lentamente ocorre apenas um deslizamento das partículas na suspensão, porém quando agitadas com rapidez, as partículas se chocam e agrupam-se ao invés de deslizarem umas sobre as outras (SHOTT, 1992). Com o aumento da velocidade de cisalhamento, as partículas exigem mais espaço para o movimento e, se houver líquido disponível para preencher os espaços, o fluido dilata. Entre os sistemas que apresentam este comportamento estão as suspensões de amido, goma arábica, óxido de titânio e as suspensões com alto teor partículas sólidas (GLICKSMAN, 1982).

Nos fluidos plásticos, de Bingham, quando um valor crítico de pressão é atingido, o fluido escoar, comportando-se como um fluido newtoniano. Entre os exemplos destes fluidos estão as pastas, suspensões ou géis de argila, géis de polímeros orgânicos como gelatina, pectina, ágar e metilcelulose, lama de perfuração, tinta óleo, chocolate (SHOTT, 1992).

Fluidos não newtonianos, cujo comportamento reológico é dependente do tempo de cisalhamento, podem ser classificados em tixotrópicos e reopéticos. No primeiro, a viscosidade diminui com o tempo de cisalhamento. Nos fluidos reopéticos, a viscosidade aumenta com o tempo de cisalhamento, mesmo a uma velocidade de cisalhamento constante (SHOTT, 1992).

Para sistemas reais, polissacarídeos, por exemplo, o grau do caráter sólido e líquido pode ser quantificado, através do módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G''), ambos expressos em Pascal (Pa) e que são componentes do módulo de cisalhamento complexo (G^*), que representa a resistência total à deformação (NAÉ, 1993).

O termo módulo de armazenagem ou elástico (G') indica que a energia da força aplicada é temporariamente estocada durante o teste, está relacionada com a medida de elasticidade ou energia armazenada relativa ao caráter sólido do polímero alisado. O termo módulo de perda ou viscoso (G'') diz respeito ao fato de que a energia usada para iniciar o fluxo é irreversivelmente perdida, pois é

convertida em energia térmica e está relacionada ao caráter líquido do polímero (NAÉ, 1993).

A variação de G' , G'' e η^* (viscosidade dinâmica complexa, $\eta^* = G''/\omega$) com a velocidade angular (ω) fornece importantes informações para caracterizar as interações moleculares em sistemas poliméricos.

Se uma substância é puramente viscosa, G' é igual a zero e G'' é igual a G^* .

Se uma substância é puramente elástica, G'' é igual a zero e G' é igual a G^* .

Nesse contexto, é importante identificar a região de comportamento viscoelástico linear, isto é, as condições nas quais existe uma relação linear entre a deformação sofrida e a pressão imposta ao material. A faixa de viscoelasticidade linear é limitada para a faixa de amplitude para qual G^* é constante, a amostra é deformada para o ponto em que a ligação interna temporária da molécula ou agregados são destruídos, e maior parte da energia introduzida é irreversivelmente perdida como calor (FERRY, 1980).

A Figura 7 a mostra o perfil típico (G' , G'' e η^* em função da frequência) para um gel de polissacarídeo. O módulo elástico é maior que o módulo viscoso durante a faixa de frequência analisada, caracterizando uma resposta predominantemente semelhante a de um sólido. A viscosidade dinâmica diminui linearmente com o aumento da frequência.

Na Figura 7 b, o comportamento de fluxo assemelha-se ao de um líquido. À medida que a frequência aumenta G'' aumenta mais do que G' . Em um determinado ponto as curvas se cruzam, e aproximadamente nesta faixa, situa-se o ponto de gelificação.

A Figura 7c ilustra o comportamento típico de uma solução diluída de um polissacarídeo. A viscosidade dinâmica apresenta uma pequena variação com a frequência. O módulo de perda é significativamente maior que o módulo elástico, especialmente em frequências menores. Em altas frequências, a movimentação interna dos segmentos da cadeia torna-se mais importante e G' se aproxima de G'' (NAÉ, 1993).

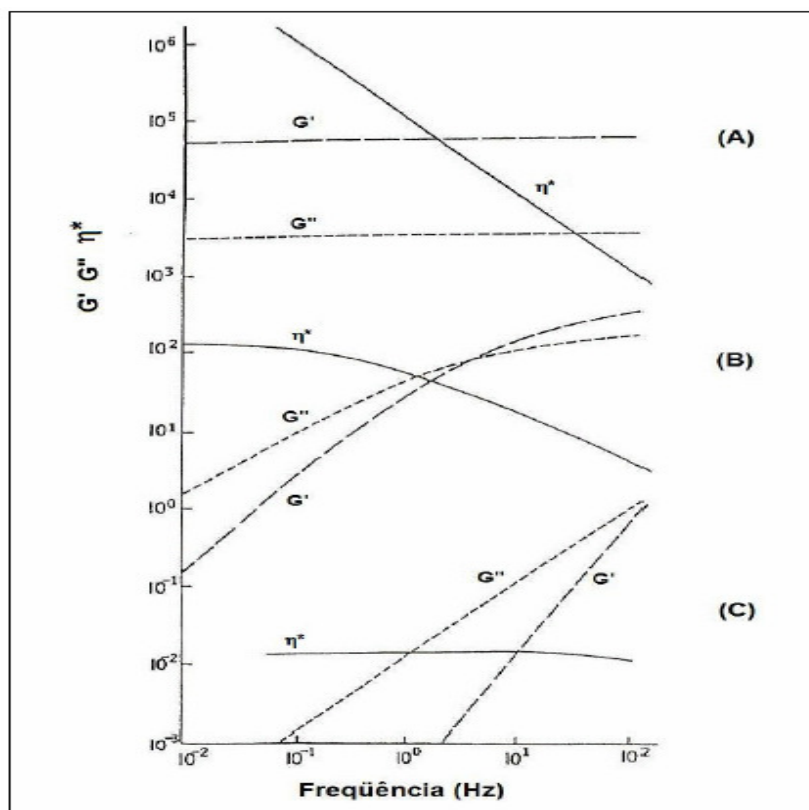


Figura 7- Frequência de oscilação em função de G' , G'' e η^* para: a) gel forte; b) gel fraco; c) solução diluída.

Fonte: Morris (1984).

Desde modo a variação de G' , G'' e η^* com a frequência permite caracterizar o comportamento viscoelástico dos sistemas polissacarídicos.

Para avaliar características viscoelásticas, da possível estrutura de um sistema, e as variações associadas à adição de novos ingredientes na sua composição, o teste de arraste e recuperação é uma análise útil e bastante utilizada (DOLZ, 2008). Este é um teste de viscoelasticidade que permite diferenciar, de forma bastante satisfatória, as respostas elásticas e as respostas viscosas. De forma diferente das medições de força normal, que mostram a dependência entre a taxa de cisalhamento e a viscosidade ou elasticidade, o ensaio de fluência e recuperação introduz um parâmetro adicional de tempo de resposta (dependente da tensão) para o comportamento elástico e viscoso de sólidos e líquidos (SCHRAMM, 2006).

Três comportamentos podem ser observados num teste de arraste e recuperação. A figura 8a representa o comportamento de um corpo elástico ideal, onde toda energia é recuperada. Quando uma tensão é aplicada a um fluido ideal, a

deformação sofrida é inteiramente mantida (Figura 8b). Em um corpo real, que é viscoso e elástico, quando a tensão é removida parte da energia armazenada no corpo será liberada (Figura 8c) (BRUMMER, 2006).

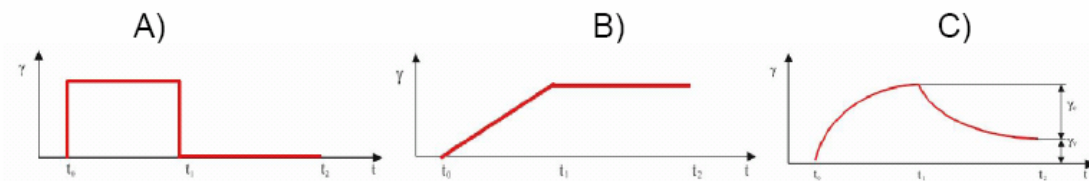


Figura 8- Arraste e recuperação de a) corpo elástico, b) corpo viscoso e c) corpo viscoelástico. T_0 = tempo inicial; T_1 = retirada da tensão; T_2 = final da análise.

Fonte: BRUMMER (2006).

A teoria da fluência e recuperação e seu tratamento matemático usam modelos de molas e amortecedores, sozinhos ou combinados, para correlacionar a aplicação da tensão com as reações de deformação dependentes do tempo. A comparação de fluidos reais com substâncias modelo e suas respostas não podem ser correlacionadas para distinguir estruturas moleculares, porém, em polímeros fundidos, por exemplo, ela ajuda a entender a viscoelasticidade (SCHRAMM, 2006). Ao entender o comportamento dos fluidos viscoelásticos como simultaneamente viscoso e elástico, Maxwell define empiricamente a sua lei constitutiva, através de uma analogia com um sistema mecânico mola/amortecedor (associação em série). Outro modelo foi proposto por Kelvin-Voight (representa um sólido viscoelástico), em que a associação é em paralelo. Os dois modelos anteriores, de sólido viscoelástico e líquido viscoelástico, são muito simples para se assumir que materiais viscoelásticos reais possam ser representados reologicamente por ambos. O modelo de Burger com um sólido de Kelvin-Voight e um líquido de Maxwell ligados em série representam muito melhor os materiais reais (FIGURA 9).

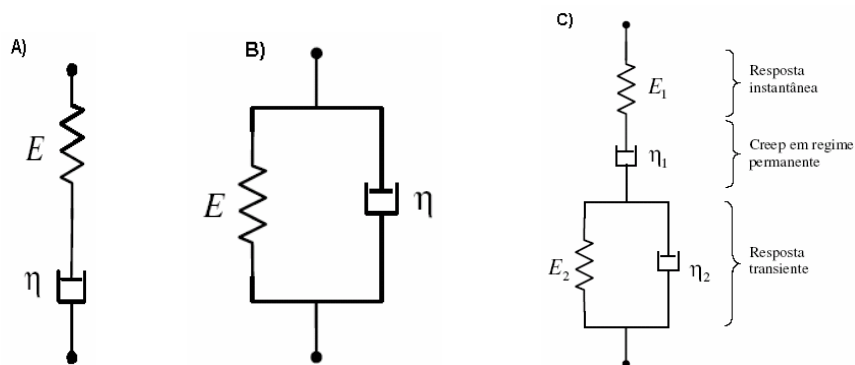


Figura 9 - 9a: Modelo de Maxwell (associação em série), 9b: Modelo de Kelvin-Voight (associação em paralelo) e 9c: Modelo de Burger (Junção dos modelos).

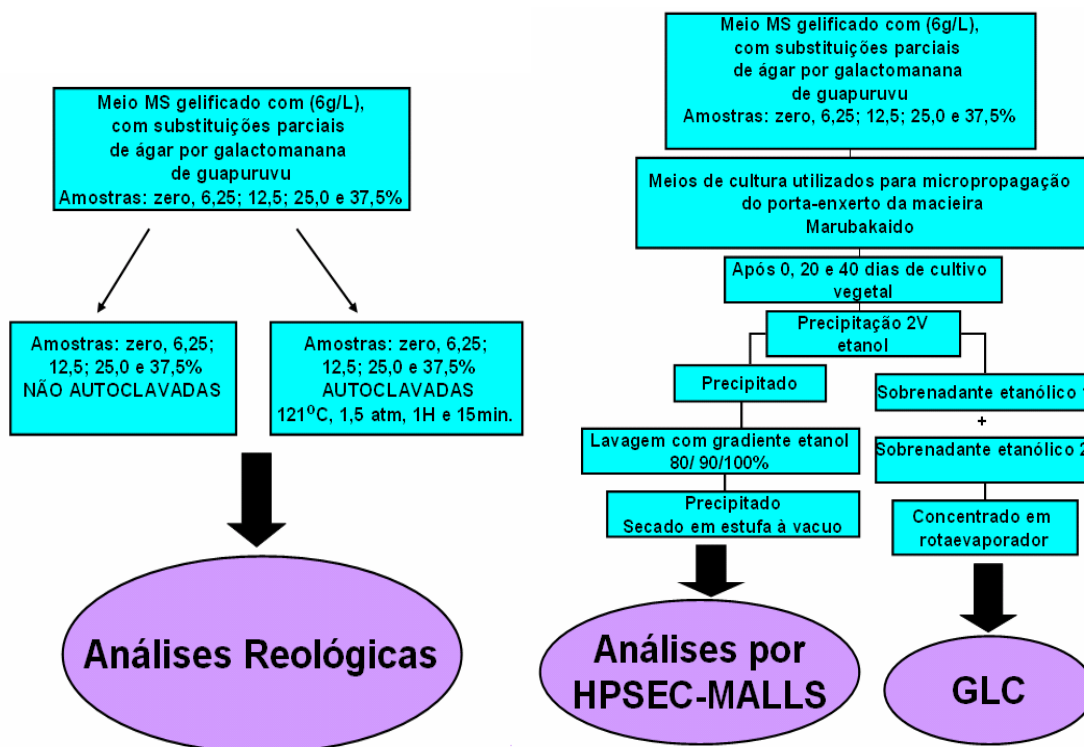
Fonte: Adaptado de SCHRAMM (2006).

No modelo de Burger, o sistema de deformação por unidade de tensão é chamado de compliança, J , em função do tempo, e corresponde a seguinte equação (STEFFE, 1996):

$$J(t) = \frac{1}{G_0} + \frac{1}{G_1} \left[1 - \exp\left(\frac{-tG_1}{\eta_1}\right) \right] + \frac{t}{\eta_0}$$

$J(t)$ representa os valores de compliança (quão complacente é um material) durante todo tempo t , G_0 é o módulo elástico instantâneo da unidade de Maxwell e G_1 representa o módulo elástico de Kelvin-Voight. O amortecedor de Maxwell representa a viscosidade residual, η_0 , e o amortecedor de Kelvin-Voight é chamado de viscosidade interna, η_1 . Obtendo-se os valores de G_0 , G_1 , η_0 e η_1 , é possível comparar a estrutura interna de diferentes sistemas. O modelo de Burger pode ser aplicado, satisfatoriamente em sistemas tais como, emulsões, suspensões, géis, e até mesmo na deformação de fios de seda (DAS; GHOSH, 2006).

3 FLUXOGRAMA



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da Galactomanana de *Schizolobium parahybae* (guapuruvu)

As sementes de *Schizolobium parahybae* (Guapuruvu) foram fornecidas pelo Viveiro Mata Atlântica – São Paulo. As sementes foram aquecidas em banho-maria fervente por 30 minutos para a inativação enzimática. O endosperma foi retirado, seco a temperatura ambiente por 48 horas, e moído em seguida. Após este procedimento, as sementes moídas, secas e deslipidificadas (com uma mistura tolueno:etanol (2:1, v/v), em aparelho extrator de Soxhlet) foram submetidas à extração aquosa em agitador mecânico à 25°C por 1 hora. A solução foi centrifugada duas vezes (10.000 rpm, 10 min) em centrífuga refrigerada HITACHI CR21E a 25°C. O sobrenadante foi tratado com 1 volume de etanol 96°GL. O precipitado obtido foi separado do sobrenadante etanólico por centrifugação e lavado em concentrações progressivas de etanol (80%, 90%, 100%). Em seguida foi colocado em estufa a vácuo por três dias para secagem completa.

4.2 Composição do meio de cultura Murashige & Skoog- MS (1962)

As misturas de ágar/galactomana foram utilizadas como agentes gelificantes do meio MS, composto pelos seguintes sais e aditivos orgânicos:

Tabela 1. Composição do meio Murashige & Skoog- MS (1962).

(NH ₄ NO ₃) 20.6 ml/L	Aditivos orgânicos
(H ₃ BO ₃) 6.2 mg/l	i-Inositol 100 mg/l
(CaCl ₂ · 2H ₂ O) 440 mg/l	Niacina 0.5 mg/l
(Co Cl ₂ · 6H ₂ O) 0.025 mg/l	Piridoxina 0.5 mg/l
(MgSO ₄ · 7H ₂ O) 370 mg/l	Tiamina 0.1 mg/l
(CuSO ₄ · 5H ₂ O) 0.025 mg/l	Glicina (recristalizada) 2.0 g/l
(KH ₂ PO ₄) 170 mg/l	Sacarose 30 g/l
(FeSO ₄ · 7H ₂ O) 27.8 mg/l	
(KNO ₃) 1.900 mg/l	
(MnSO ₄ · 4H ₂ O) 22.3 mg/l	
(KI) 0.83 mg/l	
(Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O) 0.25 mg/l	
(ZnSO ₄ · 7H ₂ O) 8.6 mg/l	
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O 37.2 mg/lb	

4.3 Preparação do meio de cultura utilizado para a micropropagação do porta-enxerto da macieira Makubakaido com diferentes concentrações de ágar e galactomanana de guapuruvu

A galactomanana de guapuruvu foi solubilizada em meio de cultura MS com concentração de 6g do polissacarídeo para cada 1L do meio. A solução permaneceu sob agitação por 15 horas a 25°C. Foram preparadas quatro frações contendo respectivamente 6,25; 12,5; 25; 37,5% de galactomanana de guapuruvu e à porcentagem restante do meio adicionou-se a solução MS e ágar em pó (volume e peso calculados de acordo com a proporção de galactomanana). Além destas frações foi preparada uma amostra contendo somente ágar – fração controle. O pH do meio de cultura resultante foi ajustado para 5,7 com KOH 1M. Em seguida, as amostras foram aquecidas em forno de microondas á 96°C e retiradas imediatamente após o meio de cultura entrar em ebulição (aproximadamente 1 minuto). As amostras foram separadas igualmente em dois frascos, sendo que um foi autoclavado a 121°C; 1,5 atm, por 1h15min (tempo total do ciclo de esterelização) e o outro permaneceu à temperatura ambiente (sem autoclavagem). Estes experimentos foram sempre realizados em triplicatas.

4.4 Análise por Cromatografia de exclusão Estérica de Alta Eficiência-HPSEC

Os meios de cultivo contendo gel de ágar/galactomanana utilizadas para a micropropagação do porta-enxerto da macieira marubakaido nos tempos 20 e 40 dias e no tempo 0 (meio controle, não utilizado para o crescimento do porta-enxerto), foram analisados em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) Waters modelo 2410 acoplado a detector de espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS) Wyatt Technology modelo Dawn DSP, com 18 canais acoplados em série. Utilizou-se quatro colunas de gel de permeação Waters em série, com limites de exclusão de $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹. As análises foram efetuadas a 25°C utilizando como eluente solução de NaNO₂ 0,1 mol⁻¹ contendo NaN₃ 200 ppm, com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, monitorado através de bomba peristáltica Waters 515.

As partes aéreas cultivadas foram retiradas do meio de cultura para as amostras 20 e 40 dias, contendo as diferentes combinações de galactomanana e ágar. Os meios de cultura que não receberam o porta-enxerto da macieira (tempo zero) também foram submetidos ao procedimento descrito abaixo. Em seguida, os meios foram tratados com dois volumes de etanol absoluto. O precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação (10.000 rpm, 10 min, 25°C) e lavado em concentrações progressivas de etanol (80%, 90%, 100%). Os géis do tempo zero também foram tratados com etanol e centrifugados, nas mesmas condições citadas acima.

Uma parte do precipitado obtido das amostras contendo diferentes concentrações de galactomanana (0; 6,25%; 12,5%; 25,0; 37,5%) foram solubilizadas em nitrito de sódio (NaNO_2) 0,1 mol/L contendo azida de sódio (NaN_3) 0,2 g/L, sendo utilizado 3 mg de cada precipitado para 1mL de solvente (3mg/ml). As amostras foram previamente colocadas em banho-maria a 70°C e permaneceram solubilizando em agitador magnético por 24h.

Todas as amostras foram filtradas através de membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,22 μm .

4.5 Determinação da composição monossacarídica

O sobrenadante etanólico resultante das lavagens, com concentrações progressivas de etanol (80%, 90%, 100%), dos meios contendo diferentes concentrações de galactomanana (0; 6,25%; 12,5%; 25,0%; 37,5%) para os tempos de cultivo do porta-enxerto de 0, 20 e 40 dias foram secos em rotaevaporador.

Em seguida, as amostras foram reduzidas e acetiladas. Os monossacarídeos foram reduzidos na presença de boroidreto de sódio (NaBH_4), por 2 horas em meio aquoso, a 25°C (WOLFROM E THOMPSON, 1963a). Os íons hidreto (H^-) fornecidos pelo agente redutor (NaBH_4) promovem redução dos grupamentos carbonila dos monossacarídeos, formando alditóis. Em seguida adicionou-se resina LEWATIT S-100 (resina trocadora de cátions na forma ácida) para decompor o excesso de agente redutor e remover os cátions Na^+ . Após a filtração (em algodão), as soluções foram concentradas até a secura e lavadas sucessivamente com 2,5 ml de metanol (quatro vezes) para a remoção do ácido bórico remanescente por co-distilação com metanol, na forma de borato de trimetila. Os alditóis secos foram acetilados com

piridina (agente catalisador) - anidrido acético (agente acetilante) (1:1 v/v) durante 12 h a 25 °C em tubos de hidrólise hermeticamente fechados (WOLFROM E THOMPSON, 1963b).

Este processo foi interrompido com a adição de gelo moído e os acetatos de alditóis extraídos com 2ml de clorofórmio (CHCl_3). A piridina residual presente na fração clorofórmica foi removida por lavagens sucessivas com solução aquosa de sulfato de cobre (CuSO_4) a 5% (p/v), formando-se um complexo azul solúvel em água. A fase clorofórmica foi lavada sucessivas vezes com água destilada, evaporada a 25 °C e analisada por cromatografia líquido-gasosa (GLC).

As análises por GLC foram realizadas em cromatógrafo HEWLETT-PACKARD 5890 A II, equipado com detector de ionização de chama (FID), utilizando nitrogênio (N_2) como gás de arraste, com fluxo de 2ml/min. Foi utilizada uma coluna capilar [30 m x 0,25 mm (d.i.)] DB-225, com espessura de filme 0,25 μm , sendo a temperatura do detector 300 °C e do injetor 250 °C (SLONEKER, 1972).

4.6 Análises reológicas

As propriedades viscoelásticas foram realizadas em reômetro HAAKE RS75 Rheostress acoplado a um banho termostatizado HAAKE K15 e termocirculador de água DC5B3, e a um controlador térmico TC 81 (Peltier), utilizando o sensor placa-placa PP20Ti (gap=1 mm). A temperatura ambiente manteve-se em 23°C.

Previamente às análises reológicas, foi determinada a inércia do equipamento para descontar os valores das forças centrífuga e centrípeta geradas durante os experimentos.

Para as análises reológicas as amostras do meio com ágar e das misturas de ágar/galactomanana (6,25%; 12,5%; 25,0%; 37,5%) foram separadas igualmente em dois frascos, sendo que um foi autoclavado a 121°C por 1h15min (1,5 atm) e o outro permaneceu à temperatura ambiente (sem autoclavagem). Estes experimentos foram realizados em triplicata.

Inicialmente realizou-se uma varredura de tensão na frequência de 1Hz para verificação da faixa viscoelástica linear e seleção da tensão que seria empregada nas análises de varredura de frequência, rampas de temperatura e teste de arraste e recuperação. Nesta região os módulos elástico (G') e viscoso (G'') permanecem constantes com a variação da deformação, indicando que não ocorre perturbação

significativa na estrutura do polímero. As varreduras de tensão foram feitas para o intervalo de 1 a 10Pa a 1Hz.

As análises dinâmicas por varredura de frequência foram feitas a partir da determinação da região viscoelástica dos géis, sendo o valor escolhido 4Pa. Todas as análises foram realizadas em triplicata numa amplitude de 0,1 a 10 Hz (23°C).

O comportamento reológico da transição sol-gel dos géis foi analisado através de rampas de temperatura. Os módulos elástico (G') e viscoso (G'') foram observados durante aquecimento de 5°C a 95°C e posterior resfriamento de 95°C a 5°C, com gradiente de 2 °C/minuto e frequência a 1Hz. Para essa análise utilizou-se o reômetro já citado, acoplado a um sistema de controle de temperatura Peltier (TC81).

Os géis foram submetidos ao teste de arraste e recuperação para investigação das suas propriedades viscoelásticas. Esta análise consiste na medida da deformação da amostra por um período de tempo pré-estabelecido sob uma tensão constante, em seguida ocorre à recuperação total, parcial ou nula da deformação em função do cancelamento da tensão aplicada, e a medida desta recuperação é observada durante mais um período de tempo pré-estabelecido (SCHRAMM, 2006). O teste é composto por duas etapas. Na primeira, denominada arraste, uma tensão de 4Pa é aplicada e os valores da deformação são mensurados por um período de 300s, após este intervalo, segunda etapa, denominada recuperação, a tensão é removida e os valores da deformação são analisados por um período de 300s. A partir deste teste, é possível obter os valores da compliança, ela define o quão complacente é uma amostra. Quanto mais alta for a compliança, mais fácil será deformar uma amostra por uma tensão aplicada (SCHRAMM, 2006).

As análises oscilatórias dinâmicas foram tratadas com teste estatístico de Tukey, $p=0,005$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises Reológicas

5.1.1 Análises Dinâmicas Oscilatórias

Muitos trabalhos vêm explorando a utilização de polímeros como constituintes de meios de cultura vegetal (JAIN, 2002; LUCYSZYN *et al.*, 2006; 2007; NORZIAH *et al.*, 2006; PEREIRA-NETTO *et al.*, 2007; CIGDEM; KHALID; ORHAN, 2008; ANDRIOLA *et al.*, 2009).

As análises reológicas foram realizadas com a finalidade de verificar o efeito da substituição parcial do ágar por galactomanana de *S. parahybae*, bem como a influência do processo de esterilização dos meios de culturas gelificados por estes polissacarídeos. Para isso foram aplicadas diferentes técnicas de análises reológicas: dinâmicas oscilatórias, dinâmicas termomecânicas e arraste e recuperação.

Duas classes de amostras foram comparadas entre si, sendo agrupadas da seguinte forma: 1) submetidas à autoclavagem e; 2) amostras não autoclavadas.

As análises oscilatórias são sensíveis à composição química e a estrutura física das amostras e foram realizadas com o intuito de conhecer as propriedades viscoelásticas e estruturais das misturas analisadas.

Para realização de uma análise reológica é necessário conhecer a região viscoelástica linear das amostras, ou seja, a região onde G' (módulo de cisalhamento elástico ou de armazenamento) e G'' (módulo de cisalhamento viscoso ou de perda) são independentes da tensão ou deformação aplicadas ao sistema. Nessas condições a tensão, ou deformação, aplicada não altera a estrutura física do sistema em estudo. As varreduras de tensão foram realizadas no intervalo de 1 a 10 Pa com frequência fixa de 1 Hz. A partir da determinação da região viscoelástica linear, os valores dos módulos de cisalhamento elástico (G') e viscoso (G'') foram avaliados para o intervalo de frequência de 0,1 a 10 Hz, com tensão aplicada de 4 Pa para todas as amostras.

As figuras 10 e 11 ilustram a varredura de frequência das amostras com substituições parciais de ágar por galactomanana que não foram autoclavadas (FIGURA 10), e as submetidas ao processo de autoclavagem (FIGURA 11). Para

todas as amostras analisadas $G' > G''$, em média na ordem de 10 vezes, mas em frequências superiores a 1Hz, observa-se que os módulos G' e G'' passam a ser dependentes da frequência. Na faixa de frequências entre 0,1 a 2Hz os géis possuem caráter de gel forte, porém acima de 2Hz esse comportamento passa a ser perturbado, mostrando que as estruturas dos géis podem estar sendo modificadas.

O maior valor de G' é encontrado no meio gelificado apenas com ágar (não autoclavado). Esse comportamento foi observado em misturas de ágar e κ -carragenana. A substituição gradual do ágar causou um decréscimo proporcional à adição da κ -carragenana, sendo que os maiores valores de G' foram encontrados em meios contendo somente ágar (NORZIAH *et al.*, 2006). Lucyscyn *et al.*, (2006) mostrou que o gel formado pela mistura de ágar e galactomanana de goma guar (0,3/0,3) (v./v.) são mais viscoelásticos (valores menores de G' e G'') quando comparado com o gel composto somente por ágar 0,6% (p/v.).

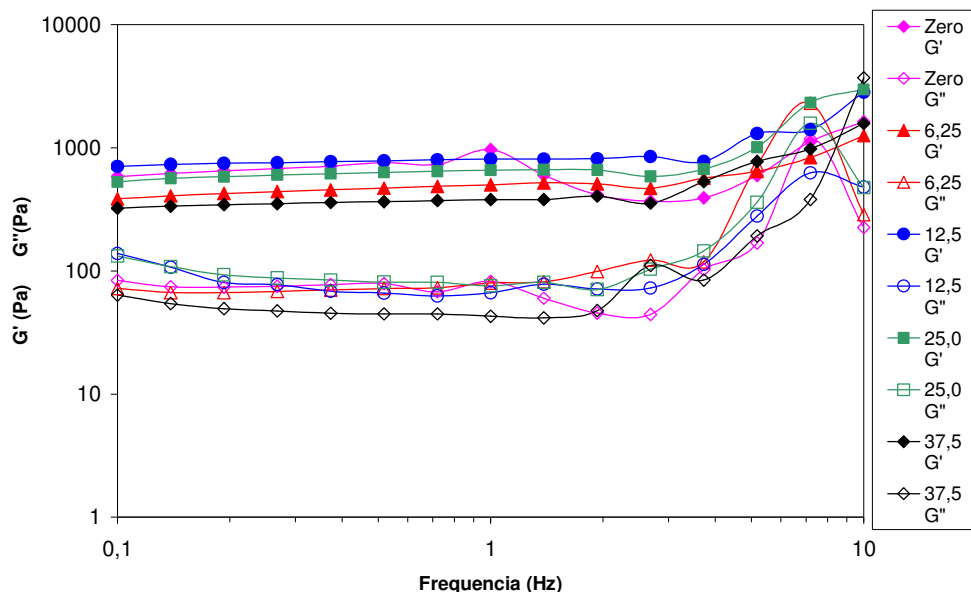


Figura 10 - Varredura de frequência das amostras: zero, 6.25%, 12.5%, 25.0% e 37.5% a 25°C que não foram autoclavadas.

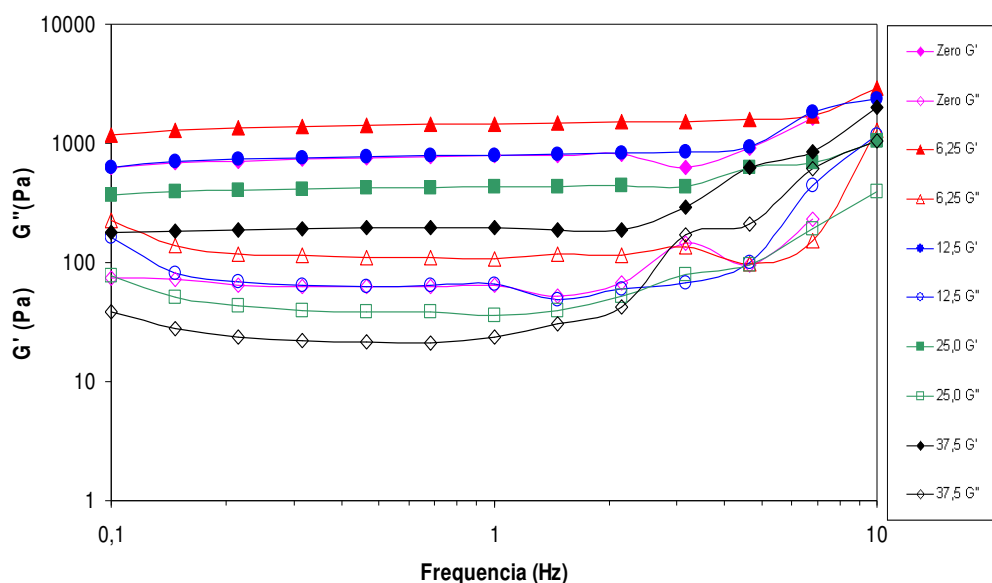


Figura 11 - Varredura de frequência das amostras: zero, 6.25%, 12.5%, 25.0% e 37.5% autoclavadas a 121°C por 1h e 15 minutos.

Com o intuito de avaliar se a diferença entre as misturas ágar/ galactomanana eram significativas entre as amostras não autoclavadas foi realizado a média dos valores dos módulos elástico (G') (azul) e viscoso (G'') (rosa) a 1Hz (FIGURA 12).

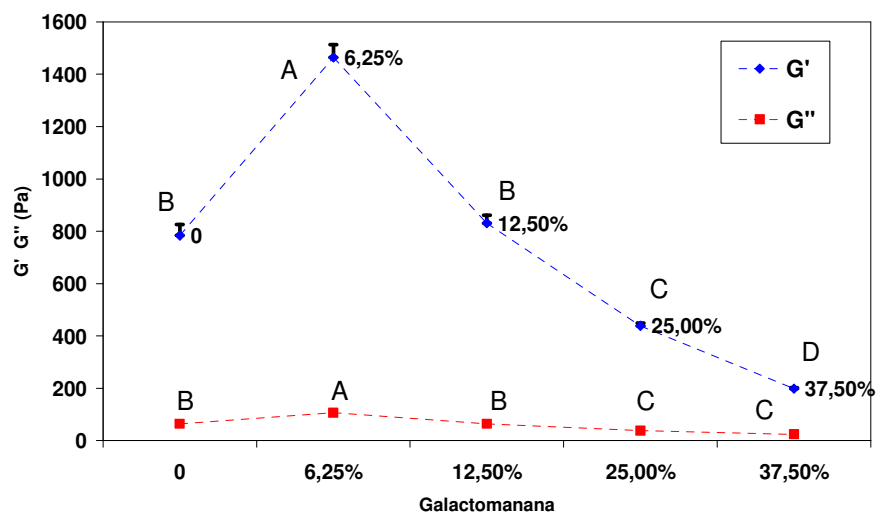


Figura 12 - Representação da média dos valores dos módulos elástico (G') (azul) e viscoso (G'') (rosa) a 1HZ para amostras não autoclavadas. As letras, de acordo com Teste de Tukey, indicam amostras que não diferem significativamente ($p=0,05$). As barras verticais mostram o erro padrão.

Observa-se que diferenças significativas ocorrem entre as amostras zero e 37,5%, demonstrando que este grau de substituição do ágar é capaz de propiciar uma interação entre as cadeias dos dois polímeros que resulta numa modificação significativa da estrutura do gel. A substituição do ágar por galactomanana nas concentrações 12,5 e 25%, apesar de terem causado uma diminuição de G' não podem, estatisticamente, serem consideradas diferentes do meio gelificado apenas com ágar.

A amostra 6,25%, apesar de não apresentar o mesmo perfil de queda do valor de G' proporcional à sua concentração de galactomanana, pode ser considerada, de acordo com teste de Tukey igual às amostras 12,5; 25,0 e 37,5%. A igualdade, em termos estatísticos das amostras analisadas, representa a dificuldade de replicabilidade, neste caso, da análise reológica, indicando que, quando as amostras não são submetidas ao processo de autoclavagem, observa-se uma tendência na diminuição de G' e G'' , diretamente proporcional ao incremento de galactomanana no meio, porém a rede estrutural formada não apresenta diferenças significativas, exceto para as amostras que estão nos pontos extremos (zero e 37,5%).

Esterilização é um método no qual o produto final é submetido a um ambiente capaz de destruir microorganismos, até um grau que pode ser considerado aceito para aquele determinado experimento. A esterilização dita terminal, pode ser realizada de diferentes formas, entre elas, autoclavagem, esterilização por óxido de etileno, irradiação- γ e pelo calor (*dry heat*). Todo meio de cultura utilizado para micropropagação vegetal deve ser esterilizado antes de receber o material vegetal em questão. Apesar de ser um processo obrigatório, a influência da esterilização em soluções contendo polímeros, é pouco relatada na literatura. (OVIATT; BRANT, 1993; BINDAL *et al.*, 2003).

Autoclavagem de uma solução de quitosana a 2% (p/v.), por apenas 10 minutos, resultou num decréscimo de 30% no peso molecular, diminuição da viscosidade dinâmica, e numa substancial diminuição das propriedades mecânicas do gel. No entanto, a esterilização não prejudicou a formação do gel a 37°C (JARRY, 2001).

Bindal *et al.*, (2003) observou a influência do processo de autoclavagem para a goma guar e carbomer 940P e não encontrou uma mudança significativa para os valores da viscosidade aparente. O mesmo comportamento não foi observado para

a xantana e para a hidroxietilcelulose que apresentaram uma redução significativa da viscosidade aparente.

Andiola *et al.*, (2009) estudou o efeito de diferentes métodos de esterilização nas propriedades termo-mecânicas do hidrogel de xiloglucana de *Tamarindus indica* após degalactosilição. As propriedades do hidrogel foram preservadas para as amostras que foram submetidas ao processo de esterilização por irradiação- γ e autoclavagem a 121°C, 1atm durante 20 minutos. A temperatura de transição sol-gel foi similar para todas as amostras e para a amostra controle.

Neste trabalho observou-se que o processo de esterilização influenciou nas propriedades reológicas dos meios gelificados com diferentes proporções de ágar e galactomanana (FIGURA 13).

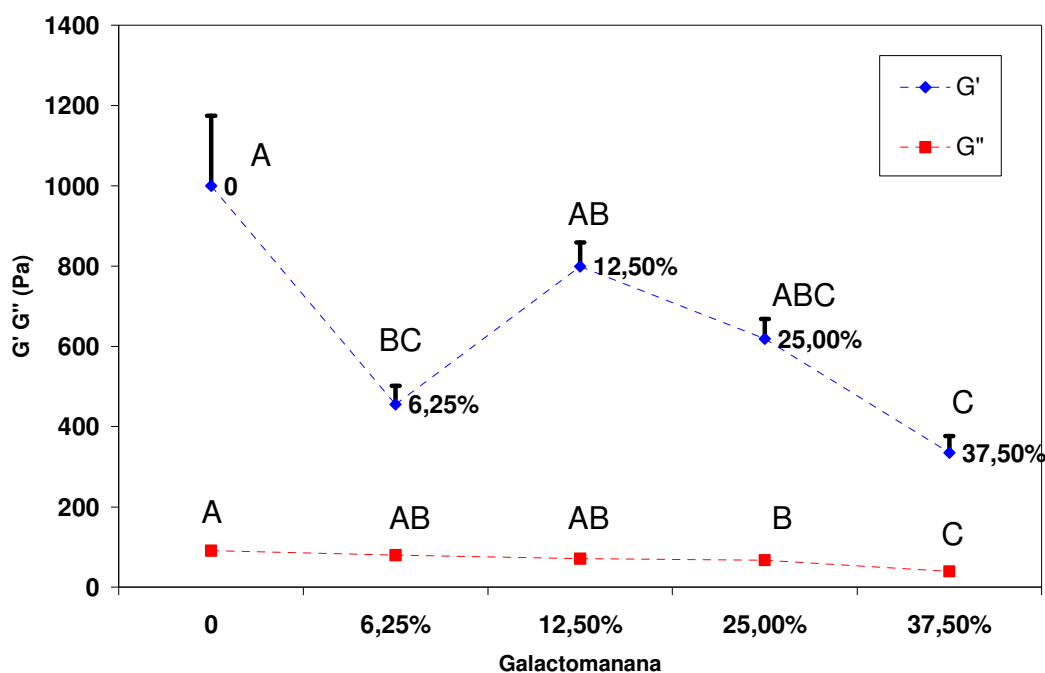


Figura 13 - Representação da média dos valores dos módulos elástico (G') (azul) e viscoso (G'') (rosa) a 1HZ para amostras autoclavadas a 121°C por 1h e 15minutos. As letras, de acordo com Teste de Tukey, indicam amostras que não diferem significativamente ($p=0,005$) si. As barras verticais mostram o erro padrão.

Os resultados indicam uma tendência de decréscimo dos valores de G' e G'' à medida que maiores concentrações de galactomanana estão presentes no meio de micropropagação, comportamento similar ao das amostras que não foram

autoclavadas. No entanto, observa-se uma diferença bastante evidente para o valor médio de G' da amostra 6,25%. Neste grau de substituição do ágar por galactomanana ocorre uma interação favorável na estruturação do gel, resultando em maiores valores de G' e G'' , indicando que a adição de galactomanana, em concentrações menores, é benéfica ao sistema, pois favorece a reestruturação da rede tridimensional do gel na sua transição sol-gel após o processo de esterilização.

O valor médio de G' entre as amostras autoclavadas e não autoclavadas estão representados na Figura 14.

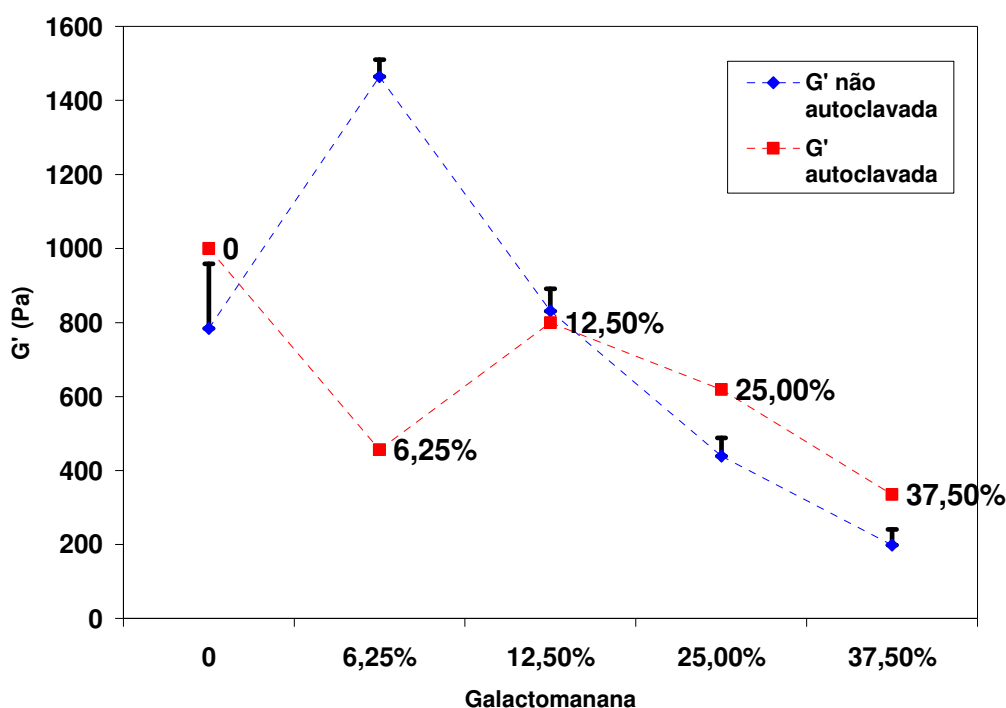


Figura 14 - Representação da média dos valores do módulo elástico (G') a 1HZ para amostras não autoclavadas (azul) e autoclavadas a 121°C por 1h e 15minutos (rosa).

A partir dos resultados obtidos na varredura de frequência, um valor de frequência foi escolhido (1Hz), para que fosse possível realizar uma comparação entre os módulos elástico e viscoso das amostras. O valor médio das triplicatas de cada amostra e o desvio padrão estão representados na tabela 2.

Tabela 2 - Média dos valores de G' e G'' medidos a 1Hz para as amostras parcialmente substituídas por galactomanana (6,25; 12,5; 25,0 e 37,5%) e amostra contendo somente ágar (zero) (autoclavadas e não autoclavadas).

	Amostras	Não autoclavadas	Autoclavadas
G' a 1Hz	Zero	999,67+-174,57	784,00 +- 41,68
	6,25%	455,90 +- 46,11	1464,25 +-48,74
	12,5%	799,07 +- 59,78	831,00 +- 30,17
	25,0%	618,70 +- 49,52	439,00 +- 10,17
	37,5%	334,64 +- 42,29	198,50 +- 3,10
G'' a 1Hz	Zero	90,84 +- 5,17	64,33 +- 1,20
	6,25%	79,79 +- 6,16	106,25 +- 5,88
	12,5%	70,75 +- 3,56	64,00 +- 2,68
	25,0%	67,04 +- 3,13	37,75 +- 2,40
	37,5%	39,81 +- 5,10	23,75 +- 0,95

De acordo com os valores apresentados na tabela 3 pode-se observar que os valores de G' e G'' para as amostras autoclavadas são menores que os valores para as amostras não autoclavadas, exceto na concentração de 6,25. Esses resultados corroboram para a hipótese de que concentrações baixas de galactomanana propiciam uma melhor reestruturação do gel, e este fato pode explicar o crescimento diferencial dos porta-enxertos da macieira marubakaido, visto que, a galactomanana não está sendo degradada e portanto seus monossacarídeos não constituem uma fonte nutricional para a macieira.

5.1.2 Análise de arraste e recuperação

Com o intuito de investigar a facilidade de deformação das amostras, ou seja, a complacência, realizou-se o teste de arraste e recuperação. Para todas as análises a tensão escolhida foi de 4Pa, nesta tensão as curvas de compliança mostraram-se semelhantes, indicando que a estrutura não estava sendo comprometida (SCHRAMM, 2006). Durante 300s este valor de tensão é aplicado na amostra, que reage com um determinado valor de deformação. Após esse tempo a tensão é retirada e verifica-se a capacidade do material de voltar para sua estrutura original, ou seja, seu caráter elástico.

A forma das curvas é típica de materiais viscoelásticos, que exibem uma resposta de deformação não linear frente a tensão aplicada, após uma deformação instantânea inicial, devido à habilidade de recuperação parcial da estrutura pelo armazenamento de energia, uma parte das ligações entre as unidades estruturais foram rompidas na primeira fase da análise e parte da estrutura não foi recuperada,

sendo esta energia dissipada causando uma deformação permanente no material (STEFFE, 1996; RAO, 1999).

A adição de galactomanana ao sistema e o processo de autoclavagem alteraram o comportamento viscoelástico das amostras analisadas (FIGURA 15 A e B).

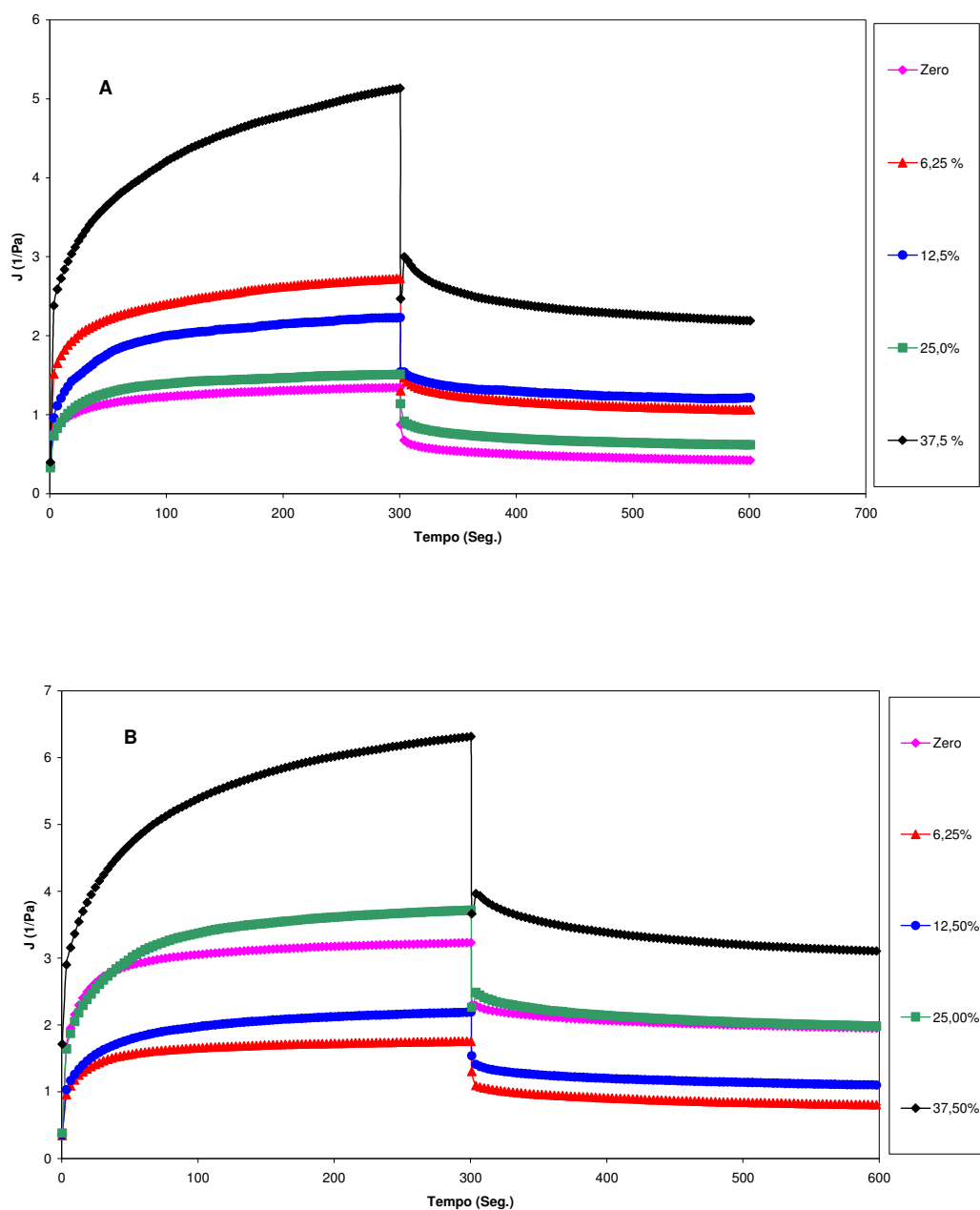


Figura 15 - Teste de Arraste e Recuperação das amostras: A) zero, 6.25, 12.5, 25.0 e 37.5% que não foram autoclavadas e das amostras B) zero, 6.25, 12.5, 25.0 e 37.5% autoclavadas a 121°C por 1h e 15 min.

Na tabela 3 estão representados os valores máximos da compliança ($J_{\text{máx.}}$) atingidos ao final do período de 300s sob tensão de 4Pa, os valores do módulo elástico no tempo zero (G_0) e a recuperação exibida por cada amostra. A recuperação foi determinada pela relação $J_r/J_{\text{máx.}}$ (1/cPa).

Tabela 3- Valores da compliança máxima $J_{\text{máx.}}$, G_0 e $J_r/J_{\text{máx.}}$ para as amostras parcialmente substituídas por galactomanana (6,25; 12,5; 25,0 e 37,5%) e amostra contendo somente ágar (zero) (autoclavadas e não autoclavadas). Em período de arraste de 300s sob tensão de 4Pa, e recuperação $J_r/J_{\text{máx.}}$ em período de recuperação de 300s sob tensão nula e valores de G_0 que representa o módulo elástico no tempo $t=0$.

Amostras não autoclavadas	$J_{\text{máx.}}$ (1/cPa)	$J_r/J_{\text{máx.}}$ (1/cPa)	G_0 (Pa)
Zero	0,336	69%	319,7
6,25%	0,681	61%	162,5
12,5%	0,557	46%	188,1
25,0%	0,378	59%	284,0
37,5%	1,335	54%	89,53

Amostras autoclavadas	$J_{\text{máx.}}$ (1/cPa)	$J_r/J_{\text{máx.}}$ (1/cPa)	G_0 (Pa)
Zero	0,832	39%	128,2
6,25%	0,439	54%	239,0
12,5%	0,548	50%	199,4
25,0%	0,829	48%	117,1
37,5%	1,579	51%	71,5

A compliança (J) reflete a facilidade com que um material é deformado, quanto maior o valor de J, menor a resistência oferecida pelo material à deformação. Para as amostras que não foram autoclavadas o menor valor de J foi encontrado no meio gelificado apenas com ágar, que apresentou o valor $J_{\text{máx.}} = 0,336 \text{ cPa}^{-1}$, demonstrando a maior resistência entre os meios não autoclavados. O sistema contendo apenas ágar como agente gelificante também apresentou os maiores valores de recuperação $J_r/J_{\text{máx.}} = 69\%$ e o maior valor para o módulo elástico no tempo zero, $G_0 = 319,7 \text{ Pa}$.

A adição de 37,5% de galactomanana ao sistema causou uma diminuição significativa na resistência à deformação, apresentando os maiores valores de $J_{\text{máx.}}$ e o menor valor para G_0 , $1,335 \text{ cPa}^{-1}$ e $89,53 \text{ Pa}$, respectivamente. A partir desses resultados e da análise por varredura de frequência observa-se uma tendência na diminuição da força do gel à medida que maiores concentrações de galactomanana

são adicionadas ao sistema. Correlacionando ainda estes dois testes reológicos, verifica-se o mesmo comportamento para a amostra 6,25%, que em ambos os testes demonstram a formação de um gel, cujo caráter sólido e a capacidade de deformação não são proporcionais à adição de galactomanana, como ocorre para as outras amostras (12,5; 25,0 e 37,5%).

De acordo com o teste de arraste e recuperação, as amostras autoclavadas 6,25% e 12,5 % apresentam os menores valores de $J_{\text{máx}}$, $0,439 \text{ cPA}^{-1}$ e $0,548 \text{ cPA}^{-1}$, respectivamente. Esses dados confirmam a hipótese de que a substituição parcial de ágar por galactomanana em baixas concentrações é capaz de estruturar e fortalecer de alguma forma o sistema, visto que a amostra zero apresentou valores de $J_{\text{máx}}=0,832 \text{ cPA}^{-1}$ superiores às amostras 6,25 e 12,5 % e valores de $G_0=128,2 \text{ Pa}$ e $J_r/J_{\text{máx}}= 39\%$ inferiores, demonstrando maior complacência do gel. Portanto, a adição de galactomanana ao meio de cultura é vantajosa.

5.1.3 Análises dinâmicas termomecânicas

Com a finalidade de observar o efeito da temperatura sob o processo de gelificação do sistema foi realizado o estudo de influência da temperatura em função dos valores de G' e G'' para a mistura ágar/galactomanana autoclavadas e não autoclavadas. A faixa de variação de temperatura foi de 5 a 95°C com velocidade de $2^\circ\text{C}/\text{min.}$, com a medida de frequência fixa de 1Hz e tensão de cisalhamento fixa de 4Pa. A variação dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') foi observada durante o aquecimento para 95°C e posterior resfriamento para 5°C .

Durante o aquecimento, ambos os módulos G' e G'' decaem discretamente até aproximadamente 60°C , para todos os sistemas autoclavados ou não autoclavados, a partir dessa temperatura observa-se uma queda proeminente, entre 75 e 95°C , para os valores de G' e uma queda mais sutil para G'' , resultando no cruzamento dos módulos elástico e viscoso, que determina o ponto de transição do estado gel-sol, ou seja, o ponto de fusão do gel. Uma tendência similar foi encontrada para misturas de κ -carragenana/goma alfarrobo (LUNDIN; HERMANSSON, 1997) e κ -carragenana/konjac glucomanana (KOHYAMA; IIDA; NISHINARI, 1993) e ágar/ κ -carragenana (NORZIAH *et al.*, 2006). O mesmo comportamento não ocorre com gel formado por amido extraído do arroz basmati, que apresenta o maior valor de G' a 82°C (AHMED *et al.*, 2006).

O ponto de transição gel-sol ocorre entre 89 e 95°C para as amostras que não foram autoclavadas (FIGURA 16A, 16B) e entre 80 e 85°C para as amostras autoclavadas (FIGURA 16C, 16D), estes valores estão próximos do ponto de fusão do ágar que está por volta de 85°C (ARMISEN; GALATAS, 1993).

Observa-se que para as amostras autoclavadas, foi necessária uma temperatura menor para a mudança de estado físico do gel, ou seja, uma maior facilidade na transição sol-gel, do que as amostras que não foram autoclavadas, mostrando que após o processo de esterilização menos energia deve ser fornecida ao sistema para que ocorra uma transição de fase.

Através do comportamento dos sistemas para a análise termomecânica durante o aquecimento, demonstrou-se que a adição de galactomanana não influenciou significativamente no ponto de fusão das amostras; que as maiores diferenças nos módulos elástico e viscoso são observadas entre o meio sem adição de galactomanana e o meio contendo a concentração máxima desse polissacarídeo (37,5%) e que o processo de esterilização causa uma diminuição na força dos géis, mas como foi observado nas outras análises reológicas, o incremento de galactomanana em baixas concentrações é benéfico para a estrutura do gel formado, quando estes são submetidos a temperaturas elevadas (121°C), como no processo de autoclavagem.

Bindal *et al.*, (2003) relatou uma diminuição da viscosidade aparente em soluções de goma guar a 0,2; 0,3 e 0,4% após o processo de esterilização por 30 minutos. Entretanto para uma solução a 0,5% não foi observado uma redução na viscosidade aparente. Launay *et al.*, (1997) observou que as interações entre as cadeias de goma guar não são muito sensíveis a elevadas temperaturas. Maier *et al.*, (1993), provavelmente, observou o mesmo fenômeno quando mostrou que a viscosidade aparente de soluções de goma guar decai com o aumento da temperatura (temperatura máxima do experimento foi 90°C), porém ocorre uma recuperação total dos valores da viscosidade quando as soluções são resfriadas até temperatura ambiente. Portanto, é possível que interações intermoleculares entre as cadeias de galactomanana de goma guar, em soluções com concentrações acima de 0,5%, não sejam alteradas irreversivelmente a 121°C (temperatura utilizada no processo de esterilização) (BINDAL *et al.*, 2003).

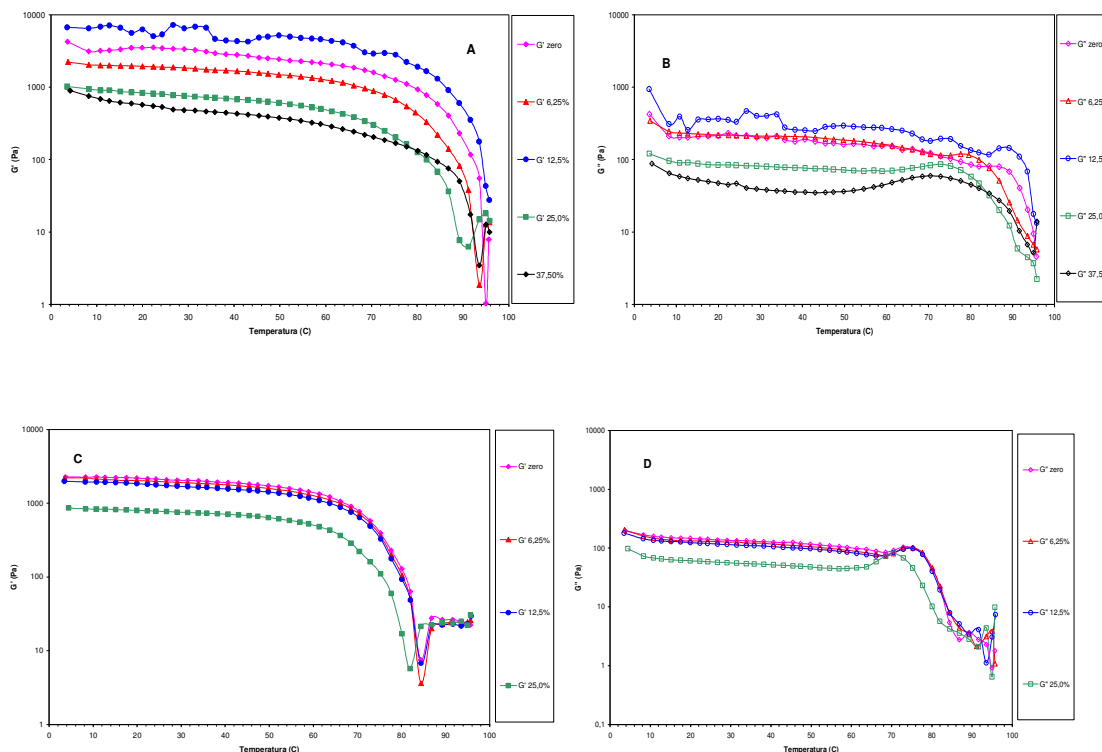


Figura 16 - Variação do módulo elástico (G') para amostras não autoclavadas (A); variação do módulo viscoso (G'') para amostras não autoclavadas (B); variação do módulo elástico (G') para amostras autoclavadas 121°C por 1h e 15min. (C); variação do módulo viscoso (G'') para amostras autoclavadas 121°C por 1h e 15min. (D), medidos durante o aquecimento(5 a 95°C).

Durante a mesma análise a amostra começa a ser resfriada e retorna, novamente, a 5°C. Nessa fase da análise é possível observar o ponto em que ocorre a mudança de estado físico (transição sol-gel) e avaliar os valores de G' e G'' , que indicam o grau de recuperação do gel, após o ciclo de temperatura. Para as amostras não autoclavadas o ponto de transição sol-gel, ou seja o ponto de gelificação, ocorre entre 38 e 45°C (FIGURA 17A, 17B). Observa-se também que, exceto a amostra 37,5%, todas as demais apresentaram valores de G' , na fase final do resfriamento, superiores aos valores de G' do início da análise (fase de aquecimento), mostrando que para concentrações de galactomananas próximas a 37,5% as interações entre esse polissacarídeo e o ágar dão origem a um gel menos estruturado que para as demais combinações.

Para os meios autoclavados o ponto de gelificação ocorre entre 29 e 35°C (Figura 17C, 17D). Como observado para os meio não autoclavados, os valores de G' na fase final do resfriamento também foram superiores aos da fase inicial de aquecimento.

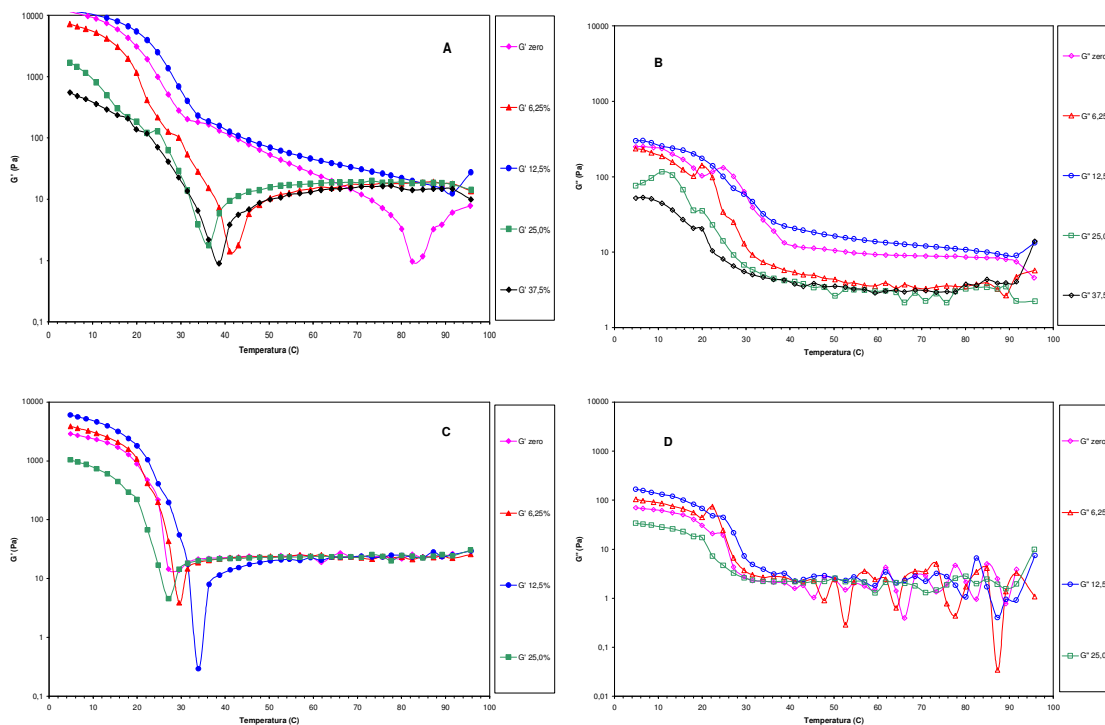


Figura 17 - Variação do módulo elástico (G') para amostras não autoclavadas (A); variação do módulo viscoso (G'') para amostras não autoclavadas (B); variação do módulo elástico (G') para amostras autoclavadas 121°C por 1h e 15min. (C); variação do módulo viscoso (G'') para amostras autoclavadas 121°C por 1h e 15min. (D), medidos durante o resfriamento (95 a 5 °C).

5.2 Análise por Cromatografia líquido gasosa (GLC)

Com o objetivo de investigar uma possível degradação e/ou consumo da galactomanana, presente no meio MS durante o cultivo do porta-enxerto da macieira marubakaido (*M. prunifolia*), nos tempos 0, 20 e 40 dias, foi analisada a composição monossacarídica do sobrenadante etanólico, após previa redução e acetilação. Os

resultados mostram que, para todas as amostras analisadas, há presença dos monossacarídeos manose e glucose (tabela 4).

Tabela 4. Análise do sobrenadante etanólico dos meios de cultivo após 0, 20 e 40 dias por GLC. Man: manitol; Glc: glucitol.

Fração	Composição monossacarídica ^a					
	0 Dias		20 dias		40 dias	
	man ^a	glc ^a	man ^a	glc ^a	man ^a	glc ^a
Zero	24,7	75,1	21,8	78,2	23,9	76,1
6,25%	25,5	74,3	21,6	78,4	23,4	76,4
12,5%	23,9	76,0	21,6	78,4	23,1	76,9
25,0%	22,1	77,3	21,4	78,6	22,5	77,5
37,5%	24,1	75,1	22,9	77,1	21,8	78,2
a) Acetatos de alditóis obtidos por g.l.c- moles %						

A sacarose é um dissacarídeo composto por glucose e frutose. A ação de enzimas do porta-enxerto da macieira é responsável pela degradação da sacarose (constituente do meio MS) e justifica a presença de glucose no sobrenadante etanólico. A ocorrência de manitol acontece porque a frutose (que é uma cetose) é reduzida na presença de NaBH₄. Esse processo ocorre devido a uma reação de hidrogenação da frutose, que é uma molécula insaturada, no carbono dois, formando os alditóis glucitol e manitol que são epímeros, pois diferem somente na configuração ao redor de um único átomo de carbono. (FIGURA 18)

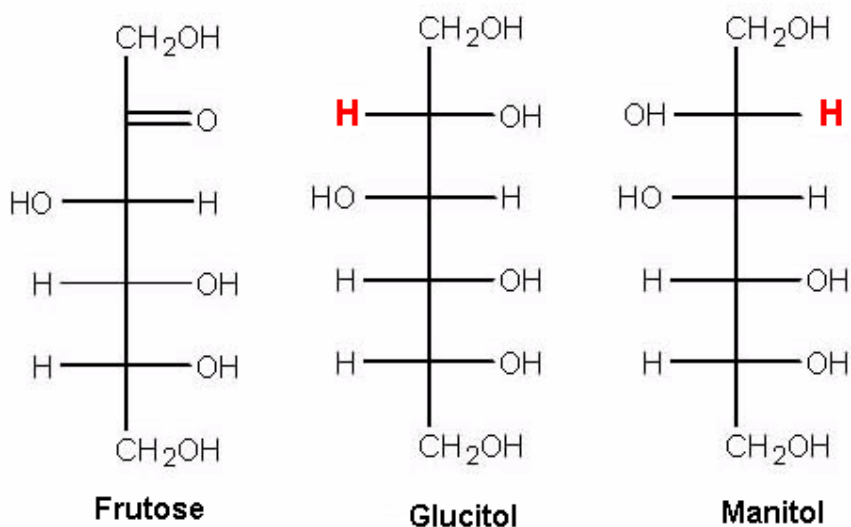


Figura 18. Estrutura dos monossacarídeos frutose (cetose) é reduzida aos alditois glucitol e manitol que são epímeros.

Fonte: Lehninger (2006).

A proporção de manitol encontrada nas diferentes frações e no meio controle se mantém constante, ou seja, se esse polissacarídeo estivesse sendo utilizado pela planta, encontrariam-se concentrações crescentes de manose, além da presença da galactose, também em concentrações progressivas. A variação de manitol nos meios contendo 6,25% e 37,5% de substituição do ágar por galactomanana é 21,6-25,5% e 21,8-24,1, respectivamente. Outra discrepância está no fato de que, nos meios contendo somente ágar também foram encontrados sinais de manitol, em proporções semelhantes àsquelas dos meios com substituições por galatomanana.

Portanto, de acordo com os resultados pode-se concluir que a galactomanana não foi degradada em galactose e manose por enzimas do porta-enxerto da macieira marubakaido, logo, diferenças no crescimento dos porta-enxertos não estão relacionadas à disponibilidade desses monossacarídeos livres no meio de cultura, mas provavelmente a uma mudança na estrutura dos géis com substituições por galactomanana.

5.3 Análise por HPSEC-MALLS

Todas as frações de meios de cultura obtidas, após 0, 20 e 40 dias de cultivo da macieira *M. prunifolia*, foram submetidas à análise por HPSEC-MALLS. O intuito foi observar a incorporação das diferentes proporções de galactomanana no meio MS contendo ágar. A Figura 19 demonstra o perfil de eluição dos géis de ágar com substituições parciais de galactomanana que serviram de matriz para o cultivo do porta-enxerto por 40 dias. As amostras correspondentes a 0, 20 e 40 dias de cultivo da macieira, apresentaram perfis de eluição semelhantes por HPSEC-MALLS. A Figura 19a mostra o perfil de eluição do meio de cultura sem adição de galactomanana (zero - meio controle) obtida por detector índice de refração -RI e espalhamento de luz a 90° -MALLS. O índice de refração fornece um sinal proporcional à concentração, enquanto que a resposta do espalhamento de luz é diretamente proporcional à massa molecular. O detector de espalhamento de luz mostra um pico heterogêneo eluindo entre 35 e 50 minutos, com valor máximo em 45 minutos. Esse pico máximo coincide com uma máxima intensidade do detector de índice de refração indicando a presença de um polímero com massa molecular menor, em elevada concentração, o ágar. Uma resposta similar foi reportada por Pereira-Netto et al., (2007), em investigação de meios de cultura gelificados com cinco tipos de ágar.

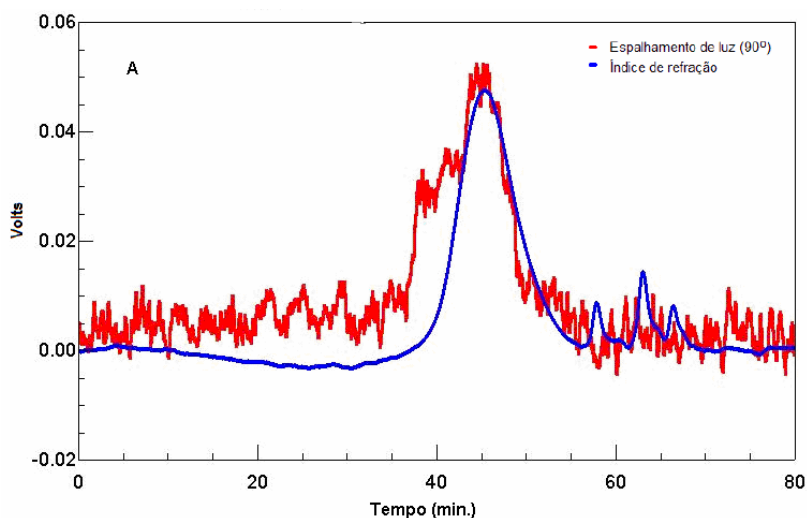
À medida que o ágar é parcialmente substituído por galactomanana (Figura 19b, 19c, 19d e 19e), observa-se a presença de um pico eluindo entre 35 e 40 minutos, detectado por espalhamento de luz, que coincide com um pico de menor intensidade no índice de refração indicando a presença de um polímero com massa molecular maior e em concentrações crescentes, diretamente proporcional a adição de galactomanana no meio de cultura MS.

Na Figura 19 a, a resposta do índice de refração mostra um alargamento do pico maior, eluindo em 45 minutos, que corresponde a maior concentração de ágar dos meios de cultura. No perfil de eluição das amostras que contêm galactomanana (Figura 19b, 19c, 19d e 19e), observa-se um único pico alargado, detectado por RI, indicando uma co-eluição que caracteriza a interação entre dois componentes, do meio de cultura, com elevada massa molecular, galactomanana e ágar. A formação de um ombro crescente à esquerda do pico máximo, proporcional à concentração de galactomanana, evidencia a interação entre o ágar e a galactomanana no meio de cultura.

Todas as amostras apresentam três picos estreitos eluindo entre 55 e 70 minutos, detectados apenas por RI, indicam componentes presentes no meio de cultura de menor massa molecular.

É conhecido que as propriedades de soluções de certas misturas de biopolímeros são diferentes do sistema puro (DEA; MORRISON, 1975). Um grande aumento na viscosidade ou formação de gel, em concentrações inferiores às quais se formariam em sistemas com um único polímero, pode ser encontrado (GIDLEY; ROBINSON, 1990).

As análises por HPSEC-MALLS que demonstram a interação entre o ágar e a galactomanana, aliado às análises por GLC que indicam a não degradação da galactomanana pelo porta-enxerto da macieira, permitem concluir que o crescimento diferencial da macieira marubakaido, não está relacionado à disponibilidade de monossacarídeos livres, derivados da degradação da galactomanana, mas sim, como resultado de efeitos sinérgicos decorrentes da mistura dos polissacarídeos ágar e galactomanana.



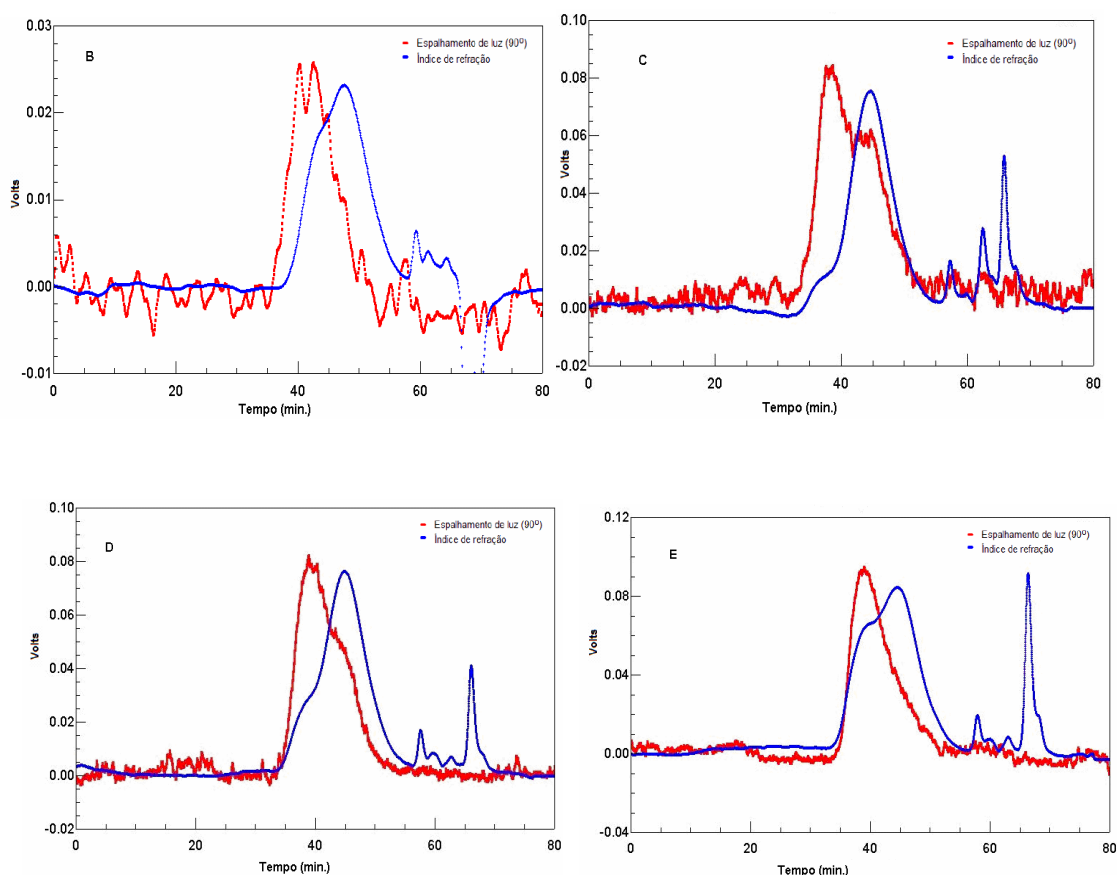


Figura 19- Perfil de eluição por HPSEC-MALLS após 40 dias, para: (A) zero; (B) 6,25%; (C) 12,5%; (D) 25,0%; (E) 37,5%. Vermelho – detector de espalhamento de luz, azul – detector de índice de refração.

Os resultados obtidos para as amostras após 0, 20 e 40 dias de cultivo do porta-enxerto, mostraram-se semelhantes, ou seja, os polissacarídeos utilizados como agentes gelificantes do meio MS podem ser considerados estáveis, propriedade apreciável para utilização em cultivo de tecidos. Segundo Lucyszyn *et al*, (2005), as substituições parciais de ágar por guar ou por galactomanana de *Cássia faustuosa* podem ser armazenadas por aproximadamente 12 meses, sem perder as características de gel forte.

6 CONCLUSÕES

O meio controle e as misturas de ágar/galactomanana apresentam caráter de gel.

A adição de galactomanana ao sistema e o processo de autoclavagem alteraram o comportamento viscoelástico das amostras analisadas.

O processo de esterilização por autoclave diminui a força do gel.

A incorporação de galactomanana nas concentrações 6,25 e 12,5%, ao meio cultura, fortalecem a estrutura do gel quando este é submetido ao processo de esterilização.

Sem o processo de esterilização, a adição da galactomanana tende a diminuir a força do gel.

A galactomanana não está sendo degradada em galactose e manose, mostrando que diferenças no crescimento dos porta-enxertos, provavelmente estão relacionadas a uma mudança na estrutura dos géis com substituições por galactomanana.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAHOA, E. N.; ROSCOE, D. H. Alginate: an alternative to agar in plant protoplast culture. **Plant Science Letters**, v. 25, p. 61-66, 1982.

AHMED, J.; RAMASWAMY, H. S.; AYAD, A.; ALLI, I. Thermal and dynamic rheology of insoluble starch from basmati rice. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 278-287, 2008.

AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; LEAL, J. A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Fungal cell wall galactomannan isolated from *Apodus deciduus*. **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 1503-1506, 2002.

AHUJA, M. R. Micropropagation á la carte. In: AHUJA, M. R. **Micropropagation of woody plants**. Dordrecht: Kluwer, p. 1-8, 1993.

ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S. F. L.; VIANA, W. R. C.; NEVES, L. J. Anatomia foliar de *Rollinea mucosa* Jacq. (Annonaceae) sob condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 4, n. 1, p. 34-36, 2001.

ANDRADE, C. T.; AZERO, E. G.; LUCIANO, L.; GONÇALVES, M. P. Rheological properties of mixtures of κ -carrageenan from *Hypnea musciformis* and galactomannan from *Cassia javanica*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 27, p. 349-353, 2000.

ANDRIOLA, S. B-G. A.K, RICHARD, C.; BESSODES, M.; SCHERMAN, D.; NARITA, T.; DUCOURET, G.; MERTEN, O-W. The effect of sterilization methods on the thermo-gelation properties of xyloglucan hydrogels. **Polymer Degradation and Stability**, In Press, Accepted Manuscript, 2009.

ANGYAL, S. J. A short note on the epimerization of aldoses. **Carbohydr. Res.**, v. 300, p. 279-281, 1997.

APLIN, J. D.; HALL, L. D. Spin-labelling of agarose gelling-system. **Carbohydr. Res.**, v. 75, p. 17-29, 1979.

ARMISEN, R.; GALATAS. Agar. In: PHILIPS G.O, WILLIAMS, P. A. (Eds.), **Handbook of hydrocolloids**. New York: CRC Press, P. 21-40.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPH, v. 1, p. 261-296, 1998.

ARAKI, C. Proc. 5th Intern. Seaweed Symp., Pergamon, Oxford, p. 3, 1966.

ARAKI, C. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 29, p. 43, 1956.

ARAKI, C.; HIRASE, S. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 27, p. 109, 1954.

ARNOTT, S.; FULMER, A.; SCOTT, W. E.; DEA, I. C. M.; MOORHOUSE, R.; RESS, D. A. The agarose double and its function in agarose gel structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 90, p. 269-272, 1974.

AZERO, E. G.; ANDRADE, C. T. Testing produces for galactomannan purification. **Polymer testing**, v. 21, p.551-556, 2002.

BABBAR, S. B.; JAIN, N. "Psyllium" as an alternative gelling agent for plant tissue culture media. **Plant. Cell. Rep.**, v. 17, p. 318-322, 1998.

BABBAR, S. B.; JAIN, N. Xanthan gum: an economical partial substitute for agar in microbial culture media. **Curr. Microb.**, V. 52, P. 287-292, 2006.

BACKES. P.; IRGANG, B. **Árvores do sul: guia de identificação e interesse ecológico**. Instituto Souza Cruz, p. 326, 2004.

BAIARD, J. K. Industrial gums, polysaccharides and their derivatives. 3 ed. San Diego: Academic Press, p. 605-618, 1993.

BAILEY, L. H. Manual of Cultivated Plants. Macmillan, New York, 1949.

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. F. R. S. **An introduction to rheology**. (3 ed.). Amsterdam: Elsevier, p. 2-16, 1993.

BARNES, H. A.; HUTTON, J.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**, Amsterdam, p. 199, 1989.

BAVEJA, S. K.; RAO, K. V. R.; ARORA, J.; MATHUR, N. K.; VINAYAK, V. K. Chemical investigations of some galactomannan gum as matrix tablets for sustained drug delivery. **Indian J. Chem.**, New Dehli, v. 30b, p. 133, 1991.

BERRIOS, E.F.; GENTZBITTEL, L.; SERIEYS, H.; ALIBERT, G.; SARRAFI, A. Influence of genotype and gelling agents on *in vitro* regeneration by organogenesis in sunflower. **Plant. Cell. Tiss. Cult.**, v. 56, p. 65-69, 1999.

BIÉVRE, C.; MARIAT, F. Preliminary study of a galactomannan extracted from *Conidiobolus coronatus* a fungus pathogenic to man. **Carbohydr. Res.**, v. 95, p. 313-318, 1981.

BINDAL, A.; NARSIMHAN, G.; HEM, S.L, KULSHERHTHA, A. Effect sterilization on the rheology of polymer solution. **Pharm. Dev. Technol.**, v. 8(3), p. 219-228, 2003.

BIRD, K. T. Agar production and quality from *Gracilaria* sp. Strain G-16: Effects of environmental factores. **Bot. Mar.**, V. 31, p. 33-39, 1988.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Aclimatization of aseptically culture apple plants to low relative humadity. **J. Amer. Soc. Hortic. Sci.**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 515-518, 1981.

BRESOLIN, T. M. B.; SANDER, P.C.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; RINAUDO, M.; GANTER, J. L. M. S. Viscosimetric studies on xanthan and galactomannansystems. **Carbohydr. Polym.**, v. 33, p. 131-138, 1997.

BRESOLIN, T. M. B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S. Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 225-231, 2006.

BRUMMER, R. **Rheology essentials of cosmetic and food emulsions**. Berlin: Springer, 2006.

BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, v. 3, p. 416, 1985.

BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, v. 1, v. 2, v. 3, 1987.

BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). **Plant. Sci.**, v. 117, p. 33-43, 1996.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant. Physiol. Biochem.**, v. 38, n. 1/2, p. 141-156, 2000.

BULPIN, P.V.; GIDLEY, M.J.; JEFFCOAT, R.; UNDERWOOD, D. R. Development of a biotechnological process for the modification of galactomannan with plant galactosidase. **Carbohydr. Polym.**, v. 12, p. 155-168, 1990.

CAIRNS, P.; MILES, M. J.; BROWNESEY, G. J. X-ray fibre diffraction studies of synergistic, binary polysaccharides gels. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 160, p. 117-123, 1991.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPH, v. 1, p. 87-132, 1998.

CAPEK, P.; TOMAN, R.; KARDOSOVA, A.; ROSIK, J. Polisaccharides from the roots of the marsh mallow (*Althaea officinalis* L.): structure on arabinan. **Carbohydr. Res.**, v. 117, p. 133-140, 1983.

CARNEIRO, M. A. C. Mycorrhizal fungi and superphosphate on growth of tropical woody species. **Scientia Forestalis**, n. 50, p. 21-36, 1996.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília, DF: EMBRAPA, v.1, 2003.

CASSELS, A. C. Problems in tissue culture: culture contamination. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 31-44, 1991.

CASSELS, A. C. Principles of micropropagation. In: MURCH, S. J.; SAXENA, P. C. **Journal of a single cell to a plant**. USA: Science Publishers, p. 287-308, 2005.

CIGDEM, A. O.; KHALID, M. K.; ORHAN, A. A comparison of the gelling of isubgol, agar and gelrite on in vitro shoot regeneration and rooting of variety Samsun of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 117, p. 174-181, 2008.

CLAIRE, J.; CHAPUT, C.; CHENITE, A.; BUSCHAMANN, M.; RENAUD. M-A.; LEROUX, J-C. Effects of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 58(1), p. 127-135, 2001.

CRONQUIST. The subclasses, orders, and families of dicotyledons. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: Allen Press, p.261-450, 1988.

CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

CUNHA, P. L. R.; VIEIRA, I. G. P.; ARRIAGA, A. M. C.; PAULA, R.C. M.; FEITOSA, J. P.A. Isolation and characterization from *Dimorphandra garneriana* Tul.

Seeds as a potencial guar gum substitute. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 880-885, 2009.

DAKIA, P. A.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ, **Food Chemistry**, v. 102, p. 1368-1374, 2007.

DAS, S.; GHOSH, A. Study of creep, stress relaxation in mulberry (*Bombux mori*) and Tasar (*Antheraea mylitta*) silk. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 99, p. 3077-3084, 2006.

DEA, I.C.M. Conformational origins of polysaccharide solution and gel properties. In: WHISTLER, R.L., BE MILLER, J.N. **Industrial Gums: Polysaccharides and their Derivates**. Academic Press, p. 21, 3. ed., San Diego 1993.

DEA, I. C. M.; MORRISON, A. Chemistry and intractions of seed galactomannans. **Adv. Carbohydrate chemistry biochemistry**, v. 31, p. 241-312, 1975.

DEA, I. C. M.; RESS, D. A. Affinity interactions between agarose and α -1,4-glycans: a model for polysaccharides associations in agal cell walls. **Carbohy. Polym.**, v. 7, p. 183- 224, 1987.

DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiol. Plant**, v. 59, p 270-276, 1983.

DEBERGH, P.C.; MAENE, L. J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, v. 14, p. 335-345, 1981.

DEENU, K.; LOPINA, S.; MICHELLE, M.; EVANCHO-CHAPMAN, SCHMIDT, S.; DONOVAN, D. Effects of sterilization on poly (ethylene glycol) hydrogels. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 87A(3), p. 608-617, 2008.

DE RUITER, G. A.; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science Technology**, v. 8, p. 339-429, 1997.

DEY P, M. Biochemistry of Plant Galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, San Diego, p. 341-376, 1978.

DIRK, L. M. A.; VAN DER KROL, A. R.; VREUDENHIL, D.; HILHORST, H. W. M.; BEWLEY, J.D. Galactomannan, soluble sugar and starch mobilization following germination of *Trigonella foenum-graecum* seeds, **Plant. Physiol. Biochem.**, v. 37, p.42-50, 1999.

DOLZ, M.; HERNADEZ, M. J.; DELEGIDO, J. Creep and recovery experimental investigation of low oil content food emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 421-427, 2008.

DURAIRATMAM, M. Studies of the yield of agar, gel strength and quality of agar of *Gracilaria edulis* (Gmel.) Silva from Brazil. **Hidrobiologia**, v. 151/152, 509-512, 1987.

DZIEZAK, J. D. A focus on gums. **Food technology**, Chicago, v. 45, n.3, p 116-132, 1991.

EBRAHIM, M. K. H.; IBRAHIM, I. A. Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation of *Maranta leuconeura* cv. Kerchoviava. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 96, p 211-221, 2000.

ECONOMOU, A.; READ, P. E. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. **Hort. Science**, Alexandria, v. 22, n. 5, p. 751-754, 1987.

ERIKSSON, I.; ANDERSSON, R.; WESTERLUND, E.; AMAN, P. Structural features of an arabinan fragment isolated from the water-soluble fraction of dehulled rapeseed. **Carbohydr. Res.**, v. 281, n.1, p. 161-172, 1996.

FASOLO, F. M.; PREDIERI, S. *In vivo* rooting of gf 655-2 peach rootstock and kiwi cv. "Hayward" microcuttings. **Acta Horticulturae**, New York, v. 227, p 500-503, 1988.

FERNÁNDEZ, J.P.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, J. A.; TOJO, E.; ANDRADE, J. M. Quantification of k-, l- x- carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. **Analytica Chimica Acta.**, v. 480, p. 23-37, 2003.

GABRIELSON, L.; EDIRISINGHE, M. J. On the dispersion of fine ceramic powders in polymers. **Journal of Material Science Letters**, v. 15, n. 13, p. 1105-1107, 1996.

GANGRADE, N. K.; GADDIPATI, N. B.; GANESAN, M. G.; REDDY, I. K. Tópical ophthalmic formulations: basic considerations. In: **Ocular Therapeutics and Drug Delivery**; REDDY, I. K., Ed., Technomic: Lancaster, PA, p. 387-390, 1996.

GANTER, J. L. M. S. **Galactomanana de sementes de *Mimosa scabrella* (Bracatinga)**, Curitiba, 1988. Dissertação de Mestrado em Bioquímica- Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.

GANTER, J. L. M. S.; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F; LEITNER, S. C.; SIERAKOWSKI, M. R.; REICHER, F. Structural studies on galactomannans from Brazilian seeds. **J. Carbohydr. Chem.**, v.12, p. 753, 1993.

GANTER, J. L. M. S.; HEYRAUD, A.; PETKOWICZ, C. L. O.; RINAUDO, M.; REICHER, F. Galactomannans from brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17, p. 13, 1995.

GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Water-soluble galactomannans form seeds of *Mimosaceae spp.* **Bioresearch Technol.**, v. 68, n. 1, p. 55-62, 1999.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1: The Technology, Great Britaln: Exegetics Limited, p. 574, 1993.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics Limited: England, 2nd Edition, v. 2, 1996.

GIBBONS, R. A. Polydispersity. **Nature**, London, v. 200, p. 665, 1963.

GIDLEY, M. J.; ROBINSON, N. J. Techniques for studying interaction between polysaccharides. In: *Methods in Plant Biochemistry*, (ed.) DEY, P.M.; HARBONE, J. B. New York: Academic Press, p. 607-616, 1990.

GIMÉNEZ-ABIÉN, M.I.; BERNABÉ, M; LEAL, J. A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; PRIETO, A. Structure of a galctomannan isolated from the cell wall of the fungus *Lineolata rhizophorae*. **Carbohydr. Res.**, v. 342, p. 2599-2603, 2007.

GLENDON, D. A.; ERWIN, J. In vitro propagation of *Watsonia* Species. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 88, p. 135- 145, 2007.

GLICKSMAN, M. Gelling hydrocolloids in food product application. In: BLANSHARD, J. M. V.; MITCHEL, J. R. (Ed.). **Polysaccharides in Food**. Butterworths: London, p 185-204, 1979.

GLICKSMAN, M. Funcional properties of hydrocolloids. **Food Hydrocolloids**, BocaRatton, CRC, v.3, p.47-99, 1982.

GLICKSMAN, M. Red seaweed Extracts (Ágar, Carrageenan, Furcellaran). In: GLICKSMAN, M. (Ed.). **Food Hydrocolloids 2**. Boca Raton: CRC Press, p 73-114, 1983.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/ CNPH, v. 1, p. 183-260, 1998.

GOLDSTEIN, A. M.; ALTER, E.N.; SEAMAN, J. K. Guar gum. In: **Industrial Gums** (ed.) WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J. N. San Diego: Academic Press, p. 303-321.

GUDIPATI, M.; RUDRAPATNAM, N. T. Heterogeneity and structural investigation of galactomannans isolated from the seeds of *Cassia serica*. **Carbohy. Res.**, v. 182, p. 119-125, 1988.

HARRY, I. S.; THORPE, T.A. In vitro culture of forest trees. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 539-560, 1994.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**. (7ed.). New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HENDERSON, W. E.; KINNERSLEY, A. M. Corn starch as an alternative gelling agent for plant tissue culture. **Plant Cell and Organ Culture**, Dordrecht: Kluwer Academic, v. 15, p 17-22, 1988.

HERALD, C. J. Locust/Carob bean gum. Propagation of *Bambusa vulgaris* (yellow bamboo) through nodal bud culture. **The Journal of Horticultural Science**, Gembloux, v. 70, n. 3, p. 469-475, 1995.

HIRASE, S. **Bull. Chem. Soc. Japan**, v. 30, p. 68, 1957.

HIRASE, S. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, V. 30, P. 75, 1975.

HURTADO-PONCE, A. Q.; UMEZAKI, I. Physical properties of agar gel from *Gracilaria* (Rhodophyta) of Philippines. **Bot. Mat**, v. 31, p. 171-174.

IMESON, A. P. Carrageenan. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Eds), **Handbook of hydrocolloids**. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd., p. 87-102, 2000.

ISHURD, O.; KERMAGI, A.; ZGHEEL, F.; FLEFLA, M.; ELMABRUK, M.; YALIN, W.; KENNEDY, J. F.; YUANJIANG, P. Structural aspects of water-soluble galctomannans isolated from seeds of *Retama raetam*. **Carbohydr. Polym.**, v. 58, p. 41-44, 2004.

JOSELEAU, J. P.; CHAMBAT, G.; LANVERS, M. Arrabinans from the roots of horsebean (*Vicia faba*). **Carbohydr. Res.**, v. 122, p. 107-113, 1983.

JOSELEAU, J. P.; CHAMBAT, G.; VIGNON, M.; BARNOUD, F. Chemical an ^{13}C N.M.R. studies from two arabinans from the inner bark of young stems of *Rosa glauca*. **Carbohydr. Res.**, v. 58, n.1, p. 165-175, 1977.

KOHYAMA, K.; IIDA, H.; NISHINARI, K. A mixed system composed of different molecular weights konjac glucomannan and kappa-carrageenan: large deformation and dynamic viscoelastic study. **Food Hydrocolloids**, v. 7, p. 213-226, 1993.

KOLENBACH, H. W.; WERNICKE, W. Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. *Z. Pflanzenphysiol*, v. 86, p 463-472, 1978.

KYTE, L.; KLEYN, J. **Plants from test tubes, an introduction to micropropagation**. (3Ed.). Portland: Timber Press, p. 240, 1996.

LABROPOULOS, K. C.; NIESZ, D. E.; DANFORTH, S. C.; KEVREKIDIS, P.G. Dynamic rheology of agar gels: theory and experiments. Part I. Development of a rheological model. **Carbohydr. Polym.**, v. 50, p 393-406, 2002.

LAHRECH, Kh.; SAFOUANE, A.; PEYRELLASSE, J. Sol state formation and melting of agar gels rheological study. **Physica A**, v. 358, p. 205-211, 2005.

LAPASIN R.; PRICL, S. Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications. London: **Blackie Academic & Professional**, p. 602, 1995.

LAUNAY, B.; CUVELIER, G.; MARTINEZ-REVES, S. Viscosity of locust bean, guar and xanthan gum solutions in the Newtonian domain: a critical examination. **Carbohydr. Polym.**, v. 34, p. 385-395, 1997.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. (4 ed.). São paulo: Sarvier, p. 1202, 2006.

LIGNELL, A.; PEDERSÉN, M. Agar composition as a function of morphology and grown rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). **Bot. Mar.**, v. 32, p. 219-227, 1989.

LIMA-NISHIMURA, N.; QUOIRIN, M.; NADDAF, Y. G.; WIHELM, H.M.; RIBAS, L. L. F.; SIERAKOWSKI, M. R. A xyloglucan from seeds of the native brazilian species *Hymenaea courbaril* for micropropagation of Marubakaido and Jonagored apples. **Plant Cell. Rep.**, v. 21, p. 402-407, 2003.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Intern. PL. Propag. Soc. Proceed.**, v. 30, p. 421-427, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, v. 1, p. 368, 2002.

LUCYSZYN, N. **Galactomananas: novas fontes de biopolímeros e aplicações na indústria alimentícia**. Curitiba, 1994. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LUCYSZYN, N.; QUOIRIN, M.; KOEHLER, H. S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R. Ágar/galactomannan blends for strawberry (*Fragaria X ananassa* Duchesne) cv. Pelican micropropagation. **Scientia Horticulturae**, v. 107, p 358-364, 2006.

LUCYSZYN, N.; QUOIRIN, M.; HOMMA, M. M.; SIERAKOWSKI, M. R. Agar/galactomannan gels applied to shoot regeneration from tobacco leaves. **Biologia Platarum**, v. 51, n. 1, 173-176, 2007.

LUNDIN, L.; HERMANSSON, A. M. Rheology and microstructure of Ca- and Na-k-carrageenan and locust bean gum gels. **Carbohydr. Polym.**, v. 34, 365-367, 1997.

McCLEARY, B. V.; MATHESON, N.K. e SMALL, D.M. Galactomannas and galatoglucomannas in the legume seed endosperms: structural requeriments for b-D-mannase hydrolysis. **Phytochemistry**, v.15, p.1441-1447, 1976.

MACIEL, S. C.; VOLTOLINI, J. A.; PEDROTTI, E. L. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira marubakaido micropropagado. **Rev. Bras. Fructi.**, Jaboticabal, v. 24, n.2, p. 289-292, 2002.

MAIER, H.; ANDERSON, M.; KARL, C.; MAGNUSON, K. Guar, locust bean, tara and fenugreek gums. In: **Industrial gums**; WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N., Eds.; Academic: New York, p. 193-195, 1993.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E.; DE CASABAINCA, M. L.; MAURY, L. Agar from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria bursa-pastoris*. **Bioresour. Technol.**, v. 67, p. 1-5, 1999.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Bioresource Technology**, Shannon, v. 90, p. 329-333, 2003.

McHUGH, D. J. Worldwide distribution of commercial sources of seaweeds including *Gelidium*. **Hydrobiologia**, v. 221, p. 19-21, 1991.

MURALIKRISHNA, G.; THARANATHAN, R. N. Structural feature of an arabinan of cowpea (*Vigna sinensis*). **Food Chemistry**, v. 22, p. 245-250, 1986.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**. Palo Alto, v. 25, p. 135-166, 1974.

NAÉ, H. N. Introduction of rheology. In: **Rheological properties of cosmetics and toiletries**. Ed: LABA, D. New York: Maecel Dekker, p. 9-33, 1993.

NEUKOM, H. Galactomannan: properties and applications. **Lebensm-Wiss and Technol.**, London, v. 22, p. 41-45, 1989.

NORZIAH, M. H.; FOO, S. L.; KARIM, A. ABD. Rheological studies on mixture of agar (*Gracilaria changii*) and k-carrageenan. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 204-217, 2006.

OVIATT, H. W.; BRANT, D. A. Thermal treatment of semi-dilute aqueous xanthan solutions yields weak gels with properties resembling hyaluronic acid. *J. Biol. Macromol.*, v. 15, p. 3-10, 1993.

PEDROTTI, E. N.; VOLTOLINI, J. A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira M.9. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 23, p.234-239, 2001.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Desfolhamento e baixa temperatura em plantas micropropagadas de macieira como forma de superar a parada do crescimento durante a aclimatização. **R. Brás. Fisiol. Veg.**, v. 12(2), p. 135-145, 2000.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 417-420, 2001.

PEREIRA-NETTO, B. A, PETKOWICZ, O. L. C, CRUZ-SILVA, C. T. A, GAZZONI, T. M, MELLO, A. F. P, SILVEIRA, M. L. J. Differential performance of marubakaido apple rootstock shoots grown in cultura media containing different agar brands: dynamic rheological analysis. **The Society for *in vitro* Biology**, p. 356-363, 2007.

PEREIRA-NETTO, A. B.; MENEGUIN, R. G.; SILVEIRA, J. L. M. A galactomannan-driven enhancement of the in vitro multiplication rate for the maubakaido apple rootstock (*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh) is not related to the polysaccharide degradation. **Plant Cell Report**, submetido, 2009.

PETKOWICZ, C. L. O.; SCHAEFER, S.; REICHER, F. The mannan from *Schizolobium parahybae* endosperm is not a reserve polysaccharide. **Carbohydr. Polym.**, v. 69, p. 659-664, 2007.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERNAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer, p. 71-93, 1991.

PRICE, I. R.; BIELIG, L. M. Agar yield from *Gracilaria edulis* (Gracilariales, Rhodophyta) in the Townsville Region, eastern tropical Australia. **Bot. Mar.**, v. 35, p. 457-460, 1992.

RAE, A. L.; HARRIS, P. J.; BACIC, A.; CLARKE, A. E. **Planta**, v. 166, p. 128, 1985.

RECHIA, C. G. V. *et al.* Polysaccharides from the of *Senna multijuga*. **Int. J. Bio. Macro.**, v. 17, n. 6, p. 409-412, 1995.

REID, J. S. G. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (Legum). **Planta**, v. 100, p. 131-142, 1971.

REID, J.S.G. e BEWLEY, J.D. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek. (*trigonella foenum-graecum* L.) an endospermic leguminous seed, **Planta**, v. 147, p. 145, 1979.

REID, J.S.G; EDWARDS, M.E.; GLIDLEY, M.J. & CLARK, A.H. Mechanism and regulation of galactomannan biosynthesis in developing leguminous seeds. **Biochemistry of Plant Polysaccharides**, v.20, n.1, p. 23-26, 1992.

RESS, D. A. **Chemistry and Industry**, v. 8, p. 630, 1972.

ROCHA, P. S. R. **Propagação in vitro de porta-enxertos de *Prunus* ssp.** P. 101. Tese (Doutorado em Fruticultura de Clima Temperado)- Faculdade de Agronomia Eliseu maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

SEAMANN, J. K. Guar gum e locust bean gum. In: **Handbook of Water Soluble Gumas and Resins**. DAVIDSON, R. L. New York: Mc Graw-Hill, 19800.

SECOUARD, S.; GRISEL, M.; MALHIAC, C. Flavour release study as a way to explain xantha-galactomannan interactions. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1237-1244, 2007.

SERWER, P. Agarose gels: properties and use for electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 4, p. 375- 382, 1983.

SHACKEL, K. A.; NOVELLO, V.; SUTTER, E. G. Stomacal function and cuticular conductante in wholw tissue-cultured apple shoots. Journal of the American Society for Horticultural Science, v. 115, p. 468-472, 1990.

SCHAFER, S. E.; STEVENS, E. S. A reexamination of the double-helix model for agarose gels using optical rotation. **Biopolymers**, v. 36, 103-108, 1995.

SCHERBUKHIN, V. D.; ANULOV, O. V. Legume Seed Galactomannan (Review). **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 35 (3), p. 229-224, 1999.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. Tradução e adaptação: Cheila Mothé *et al.* São Paulo: Artliber, 2006.

SHASHKOV, A. S.; STRESHINSKAYA, G. M.; KOSMACHEVSKAYA, L. N.; SENCHENKOVA, S. N.; EVUTUSHENKO, L. I.; NAUMOVA. I. B. NMR-based identification of cell wall galactomannan of *Streptomyces* sp. VKM Ac-2125. **Carbohydr. Res.**, v. 338, p. 2021-2024, 2003.

SHAW, D. J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**. São Paulo, Editora Edgard Clucher Ltda, p. 1884, 1975.

SHCHERBUKHIN, V. D. Galactomannas of native flora (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscou, v. 29, n.6, p. 599-606, 1993.

SHOBHA, M. S.; THARANATHAN, R. N. Rheological behavior of pullulanase-treated guar galactomannan on co-gelation white xanthan. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 749-754, 2009.

SCHOTT, H. Reologia. In : GENNARO, A. R. **Remington: Farmácia**, Buenos Aires: Ed. Med. Panamericana, v.2, p. 461, 1992.

SILVA, A. T.; PASQUAL, M.; ISHIDA, J.S.; ANTUNES, L. E. C. Aclimação de plantas provenientes da cultura *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 43-48, 1995.

SONI, S. K.; BOSE, S. Seed galactomannans and their structures. **J. Scient. Industr. Res.**, v. 44, p. 544-547, 1985.

SPECK, J. C. The Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein transformation. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, Academic Press Inc, New York, p. 63-103, 1958.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. (2 ed.). Michigan: Freeman, 1996.

STEVENS, B. J. H.; SELVENDRAN, R. R. Structural investigation of an arabinan from cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata). **Phytochemistry**, v. 19, n.4, p. 559-564, 1980.

TAKASAKI, Y.; HINOKI, K.; KATAOKA, Y.; FUKUYAMA, S.; NISHIMURA, N.; HAYASHI, S.; IMADA, K. Enzymatic production of D-mannose from D-fructose by mannose isomerase. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, n. 3, p. 237-239, 1993.

TELES, R. C. A. pH dependence thermal stability of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahybae* seeds. **J. Biophys**, v. 88, n. 5, p. 3509-3517, 2005.

THERKLESEN, G. H. Carrageenam. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. (Eds), **Industrial Gums: Polysaccharides and their Derivates**. Sam Diego: Academic Press Inc., P. 145-180, 1993.

TOMODA, M. ..; TAKAHASHI, M.; NAKATSUKA, S. Chem. Pharm. Bull., v. 24, n. 4, p. 707, 1973.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPH, v. 1, 1998.

VAN DE VELDE, F.; DE RUITER, G. A. In: STEIBÜCHEL, A.; DEBAETS, S.; VANDAMME, E. J. (Eds), **Biopolymers: Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes**. WILWY-VHC: WEINHEIM, v. 6, p. 245-274, 2002.

VICENTINI, L. S. **Propagação vegetative *in vitro* de imbuia (*Ocotea porosa* Ness) e sassafrás (*Ocotea odorifera* Vellozo)**. p. 68. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

VIEBKE, C.; PICULELL, L. Adsorption of galactomannas onto agarose. **Carbohydr. Polym.**, v. 29, n. 1, p. 1-5, 1996.

VIEIRA, I. G. P.; MENDES, F. N. P.; GALLÃO, M. I.; BRITO, E. S. NMR study of galactomannas from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). **Food Chem.**, v. 101, p. 70-73, 2007.

WHISTLER, R. L.; SMART, L. C. Polysaccharide Chemistry. New York: Academic Press, p 493, 1953.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem.** New York, v. 2, p. 65, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylion. **Methods Carbohydr. Chem.** New York, v. 2, p. 211, 1963b.

WU, Y.; CUI, W.; ESKIN, N. A. M.; GOFF, H. D. Rheological investigation of synergistic interactions between galactomannans and non-pectic polysaccharides fraction from water soluble yellow mustard mucilage. **Carbohydr. Polym.**, v. 78, p. 112-116, 2009.

YANCIK, J. J.; SCHULZE, R. E.; RYDLUND, P.H. Blasting agents containing guar gum. **Chem. Abstr.**, v. 76, p. 10118-1028, 1972.

ZAWADZKI-BAGGIO, S. F.; SIERAKOWSKI, M. R.; CORRÊA, J. B. C.; REICHER, F. A. Linear (1→5) α -L-arabinofuran form the seeds of guapuruvu (*Stryphnodendron parahybum*). **Carbohy. Res.**, Amsterdam, v. 233, p. 265-269, 1992.

ZAWADZKI-BAGGIO, S. F. Arabinana e Galactomanana de *Schizolobium parahybum*; Estudo de Biossíntese de Galactomananas. Curitiba, 1994. Tese de Doutorado em Bioquímica-Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.

ZHAN, D. F.; RIDOUT, M. J.; BROWNSEY, G. J.; MORRIS, V.J. Xanthan-locust bean interactions and gelation. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 21, p. 53-58, 1993.