

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RHAYLA GOMES MENEGUIN

**GÉIS DE ÁGAR / GALACTOMANANA DE *SCHIZOLOBBIUM PARAHYBAE* ((VELL.)
BLAKE) (GUAPURUVU): ANÁLISES REOLÓGICAS E POR MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE VARREDURA**

CURITIBA
2012

RHAYLA GOMES MENEGUIN

**GÉIS DE ÁGAR /GALACTOMANANA DE *SCHIZOLOBIUM PARAHYBAE* ((VELL.)
BLAKE) (GUAPURUVU): ANÁLISES REOLÓGICAS E POR MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE VARREDURA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências - Bioquímica,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal
do Paraná, como requisito parcial para a obtenção
de título de mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Joana Léa Meira Silveira

Co- Orientador:

Prof. Dr. Aducto B. de Pereira Netto

CURITIBA

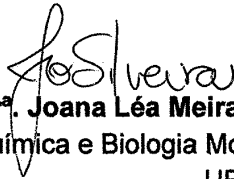
2012

TERMO DE APROVAÇÃO

RHAYLA GOMES MENEGUIN

GÉIS DE ÁGAR / GALACTOMANANA DE *SCHIZOLOBIUM PARAHYBAE* (VELL.)
BLAKE) (GUAPURUVU): ANÁLISES REOLÓGICAS E POR MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE VARREDURA

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Profª. Drª. Joana Léa Meira Silveira (Orientadora)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Setor de Ciências Biológicas
UFPR



Drª. Fernanda Fogagnoli Simas Tosin

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Setor de Ciências Biológicas
UFPR



Profª. Drª. Ana Paula Busato
Faculdade Evangélica do Paraná

Curitiba, 9 de março de 2012.

Dedico esta tese à pessoa que esteve comigo em todos os momentos difíceis e fez-me ver que esta era apenas uma pequena etapa necessária para a realização do meu sonho. Com todo meu amor e admiração a você Gabriel.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, mesmo em pequenos detalhes, conversas ou somente pelo apoio, muito obrigada!

Aos meus familiares, simplesmente, pela companhia, momentos agradáveis, preocupação e carinho em todos os momentos. A vocês meu amor e gratidão.

Ao Gabriel obrigada por tudo. Qualquer palavra a mais não seria suficiente para agradecer o que você representou para mim neste momento.

À minha amiga Louise pela ajuda nas análises de RMN.

Ao Rogério pelas dicas com estatística e todas as outras com os problemas do computador, além de ser uma ótima companhia e um grande amigo.

Ao Luciano pela disponibilidade e empenho em me ajudar com o projeto de um cortador para os meus géis.

Às minhas amigas queridas Patrícia e Louise: sem a presença de vocês estes dois anos teriam sido bem mais difíceis. MUITÍSSIMO obrigada pela amizade.

À Prof^a. Joana e Prof. Aducto pela possibilidade de realização deste trabalho e orientação.

À Prof^a. Célia Regina do departamento de Biologia Celular por me ensinar, fazer o protocolo comigo, ir até a bancada do laboratório e estar sempre disponível para as minhas várias dúvidas com a técnica MEV. Meus agradecimentos e admiração pela sua conduta e dedicação aos alunos.

Ao Prof. Marco do departamento de Biologia Celular pela disponibilidade e ajuda com as análises no Image J.

Aos técnicos do departamento de Bioquímica, Química e do Centro de Microscopia Eletrônica pela ajuda na realização das análises.

Aos meus amigos e colegas do mestrado e do laboratório pelo companheirismo e apoio na realização deste trabalho.

À coordenação e funcionários do Departamento de Bioquímica pelo empenho e organização.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

"Há mais pessoas que desistem do que pessoas que fracassam".

Henry Ford

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo determinar a influência da substituição parcial do agente gelificante ágar por galactomanana de guapuruvu (árvore nativa da Mata Atlântica) (*Schizolobium parahybae*), bem como o efeito do processo de esterilização (autoclavagem), em meios de cultura Murashige & Skoog (MS), os quais serviram de matriz para a micropropagação vegetal de macieiras Marubakaido, em trabalho anteriormente realizado (PEREIRA-NETTO *et al.*, 2012). Os meios MS foram gelificados com os polissacarídeos ágar e galactomanana e nomeados de acordo com a porcentagem de galactomanana presente nas amostras, sendo elas: 6,25%, 12,5%, 25,0% e 37,5% (concentração total 6g/L). A amostra ágar recebeu este nome, pois foi gelificada apenas por este polissacarídeo (6g/L). O perfil reológico destes sistemas foi caracterizado através de análises oscilatórias dinâmicas, de arraste e recuperação e dinâmicas termo-mecânicas. A ultraestrutura dos géis ágar/galactomanana foi estudada por análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Realizaram-se também análises por ^{13}C RMN das amostras ágar, 12,5%, 37,5% e uma fração contendo apenas galactomanana de guapuruvu. As análises reológicas oscilatórias demonstraram o predomínio do caráter sólido ($G' > G''$) para todas as amostras investigadas. O processo de autoclavagem aumentou, significativamente, os valores de G' para todos os géis. Os maiores valores de G' , G'' e η^* estavam nas amostras gelificadas apenas com ágar e os géis binários de ágar/galactomanana mostraram uma tendência de decréscimo nesses parâmetros reológicos à medida que maiores concentrações de galactomanana estão presentes no meio de micropropagação. Nos testes de arraste e recuperação os maiores valores para compliança (J) foram observados nos meios 37,5% não autoclavados ($0,725 \text{ cPA}^{-1}$) e autoclavados ($0,437 \text{ cPA}^{-1}$) indicando a menor resistência desses géis à deformação. As amostras 25,0% e 37,5% mostraram os menores valores de G' e G'' e as menores temperaturas de gelificação ($30 - 32 \text{ }^\circ\text{C}$) nas análises termo-mecânicas. Nas análises por MEV os géis 6,25%, 12,5%, 25,0% e 37,5% mostraram uma rede estrutural fibrosa e porosa, diferente da rede compactada, mas também com presença de poros, da amostra ágar. Os espectros de ^{13}C RMN das amostras 12,5% e 37,5% de ^{13}C RMN apresentaram os sinais característicos de moléculas de galactomanana e agarose. Os resultados obtidos mostraram que o processo de autoclavagem influenciou positivamente os géis (maiores valores de G') e que a substituição do ágar por galactomanana de guapuruvu altera as propriedades mecânicas das amostras (menores valores de G' e J). Ressalta-se que os géis de ágar contendo substituição por galactomanana são favoráveis à micropropagação, pois o incremento de galactomanana tornou-os menos rígidos, com uma malha mais aberta e fibrosa que provavelmente favorece a difusão de água e nutrientes para os explantes.

Palavras-chave: Micropropagação, ágar, galactomanana, *Schizolobium parahybae*, reologia.

ABSTRACT

The aim of the present work was to determine the influence of partial substitution of the gelling agent agar by the guapuruvu galactomannan (a native tree from the Atlantic Forest) (*Schizolobium parahybae*). Another important point was to define the effect of the sterilization process (autoclaving) in Murashige and Skoog culture media (MS), which served as matrix for plant micropropagation of Marubakaido apples previously (PEREIRA-NETO et al., 2012). The MS media were gelled with agar and galactomannan polysaccharide and named according to the percentage of galactomannan present in the samples, which were: 6.25%, 12.5%, 25.0% and 37.5% (total concentration of 6g/L). The rheological profile of these systems was characterized through the following analyses: dynamical oscillatory, creep and recovery, and dynamical thermo-mechanical analysis. The ultrastructure of the gels agar/galactomannan was studied by scanning electron microscopy analysis (SEM). It was also studied ^{13}C NMR analyzes of the samples agar, 12.5%, 37.5% and a fraction containing only guapuruvu galactomannan. In order to analyze the oscillatory rheological behavior, it was observed the predominance of solid character $G' > G''$. The autoclaving process has significantly increased the values of η^* of G' for all gels. The highest values of G' , G'' and η^* were found in the samples that were only gelled with agar. The binary gels of agar/galactomannan showed a decreasing trend in these rheological parameters as higher concentrations of galactomannan were present in the micropropagation media. Concerning the creep and recovery test, the highest values for compliance (J) were observed in 37.5% non-autoclaved (0.725 CPA^{-1}) and autoclaved (0.437 CPA^{-1}) media, indicating a lower resistance to deformation of the gels. Samples 25.0% and 37.5% showed the lowest values of G' and G'' and the lower gelling temperatures (30-32 °C) in the thermo-mechanical analysis. Gels 6.25%, 12.5%, 25.0% and 37.5% showed a fibrous and porous network structure by SEM analysis, which was different from the network compressed but with pores from the agar sample. Spectra of samples 37.0% and 12.5% ^{13}C NMR showed the characteristic signs of agarose and galactomannan molecules. The results indicate that the autoclaving process influenced positively gels (higher value of G') and that the agar substitution for guapuruvu galactomannan did not improve the mechanical properties of the samples (lower values of G' and J). However, these media may be favorable for micropropagation, because the increase of galactomannan turned them less rigid, with a more open fibrous mesh that can promote the diffusion of water and nutrients to the explants.

Keywords: Micropropagation, agar, galactomannan, *Schizolobium parahybae*, rheology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - MICROPROPAGAÇÃO DE MACIERAS. A) EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO PEDAÇOS DE CARVÃO ATIVADO; B) EM GEL; C) 'ROYAL GALA'; D) 'HÚSVÉTI ROZMARING'; E) 'ROYAL GALA'; F) 'MCINTOSH'; G E H) TRANSFERÊNCIA PARA TERRA 'ROYAL GALA'.....21
- FIGURA 2 - ESPÉCIES DE ALGAS DA FAMÍLIA RHODOPHYCEAE REPRESENTANTES DOS GÊNEROS: A) *GRACILARIA*; B) *GELIDIUM*; C) *GELIDIELLA*; D) *PTEROCLADIA*.....23
- FIGURA 3 - SEGMENTO REPRESENTATIVO DE UMA CADEIA DE AGARANA E AGAROSE, AS UNIDADES 3 LIGADAS E 4 LIGADAS SÃO REPRESENTADAS POR A E B, RESPECTIVAMENTE.....24
- FIGURA 4 - SEGMENTO REPRESENTATIVO DE UMA CADEIA DE GALACTOMANANA.....26
- FIGURA 5 - ÁRVORE DE *SCHIZOLOBIUM PARAHYBAE* (GUAPURUVU) ESPÉCIE NATIVA DA MATA ATLÂNTICA (A), SUAS FLORES (B) E SEMENTES (C).....32
- FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE SISTEMAS POLISSACARÍDICOS TÍPICOS: (A) GEL FORTE; (B) SOLUÇÃO CONCENTRADA; (C) SOLUÇÃO DILUÍDA.....40
- FIGURA 7 - REÔMETRO MARS II.....42
- FIGURA 8 - ARRASTE E RECUPERAÇÃO DE: A) CORPO ELÁSTICO, B) CORPO VISCOSO E C) CORPO VISCOELÁSTICO. T₀ = TEMPO INICIAL; T₁= RETIRADA DA TENSÃO; T₂= FINAL DA ANÁLISE.....43
- FIGURA 9 - CURVA DE COMPLIANÇA DE ARRASTE E RECUPERAÇÃO DE UM MATERIAL VISCOELÁSTICO EM FUNÇÃO DO TEMPO.....44
- FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN DO CARBONO TREZE (¹³C) COM AS ATRIBUIÇÕES PARA OS CARBONOS DAS UNIDADES DE β-D-GALACTOPIRANOSIL E 3,6-ANIDRO-α-L-GALACTOPIRANOSIL DAS AMOSTRAS ÁGAR, 12,5% E 37,5%; E UNIDADES DE β-D-MANOPIRANOSE (MAN) E α-D-GALACTOPIRANOSE (GAL) DA GALACTOMANANA DE *S. parahybae* ANÁLISE EM 100 MHZ DE FREQUÊNCIA, EM D₂O, A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ).....49

FIGURA 11 - VARREDURA DE TENSÃO EXECUTADA EM MODO CS DE 0.1 – 100 PA, 1,00 HZ, A 20°C, PARA AS AMOSTRAS: A) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 375% QUE NÃO FORAM AUTOCLAVADAS E AS AMOSTRAS B) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 375% AUTOCLAVADAS A 121 °C POR 1H E 15 MIN.....52

FIGURA 12 - VARREDURA DE FREQUÊNCIA EXECUTADA EM MODO CS DE 0,01 – 100,00 Hz, 1,00 Pa, A 20°C, PARA AS AMOSTRAS: C) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 375% QUE NÃO FORAM AUTOCLAVADAS E AS AMOSTRAS D) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 375% AUTOCLAVADAS A 121 °C POR 1H E 15 MIN.....54

FIGURA 13 – REPRESENTAÇÃO DA MÉDIA DOS VALORES DOS MÓDULOS ELÁSTICOS (G') A 1Hz PARA AMOSTRAS: A) NÃO AUTOCLAVADAS E B) AMOSTRAS AUTOCLAVADAS A 121°C POR 1H E 15MINUTOS. AS LETRAS IGUAIS, DE ACORDO COM TESTE DE TUKEY, INDICAM AMOSTRAS QUE NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE (P=0,05). AS BARRAS VERTICAIS MOSTRAM O ERRO PADRÃO.....58

FIGURA 14 - TESTE DE ARRASTE E RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS: A) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5% QUE NÃO FORAM AUTOCLAVADAS E DAS AMOSTRAS B) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5% AUTOCLAVADAS A 121 °C POR 1H E 15 MIN.....60

FIGURA 15 – VARIAÇÃO DO MÓDULO ELÁSTICO (G') PARA AS AMOSTRAS: A) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5% QUE NÃO FORAM AUTOCLAVADAS; B) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5% AUTOCLAVADAS 121°C POR 1H E 15MINUTOS MEDIDAS DURANTE AQUECIMENTO (10°C A 90°C).....64

FIGURA 16 - VARIAÇÃO DO MÓDULO ELÁSTICO (G') PARA AS AMOSTRAS: A) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5% QUE NÃO FORAM AUTOCLAVADAS; B) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5% AUTOCLAVADAS 121°C POR 1H E 15MINUTOS MEDIDAS DURANTE RESFRIAMENTO (90°C A 10°C).....67

FIGURA 17 - VARIAÇÃO DO MÓDULO ELÁSTICO (G') E VISCOSO (G'') PARA AS AMOSTRAS: A) ÁGAR; B) 6,25%; C) 12,5%; D) 25,0% E E) 37,5% AUTOCLAVADAS 121°C POR 1H E 15MINUTOS , MEDIDAS DURANTE AQUECIMENTO (10°C A 90°C) E POSTERIOR RESFRIAMENTO (90°C A 10°C). SETAS PRETAS INDICAM O SENTIDO DE G' E G'' DURANTE O CICLO AQUECIMENTO-RESFRIAMENTO.....69

FIGURA 18 – MICROSCOPIAS OBTIDAS POR MEV. OBSERVAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL DOS GÉIS DE ÁGAR/GALACTOMANANA (6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5%) E DA AMOSTRA GELIFICADA APENAS COM ÁGAR. AUMENTO DE 100 VEZES.....72

FIGURA 19 - MICROSCOPIAS OBTIDAS POR MEV. OBSERVAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL DOS GÉIS DE ÁGAR/GALACTOMANANA (37,5%) E DA AMOSTRA GELIFICADA APENAS COM ÁGAR. AUMENTO DE 1500 VEZES.....73

FIGURA 20 - MICROSCOPIAS OBTIDAS POR MEV. OBSERVAÇÃO DO PONTO DE QUEBRA DA AMOSTRA GELIFICADA APENAS COM ÁGAR E DOS GÉIS DE ÁGAR/GALACTOMANANA (6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5%). AUMENTO DE 5.000 VEZES.....74

FIGURA 21 – MICROSCOPIAS OBTIDAS POR MEV. OBSERVAÇÃO DO PONTO DE QUEBRA DA AMOSTRA GELIFICADA APENAS COM ÁGAR E DOS GÉIS DE ÁGAR/GALACTOMANANA (6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5%). AUMENTO DE 10.000 VEZES.....76

FIGURA 22 - EFEITO DA ADIÇÃO DE GALACTOMANANA DE *S. paraybae* NA TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DE *M. prunifolia*. AS LETRAS IGUAIS, DE ACORDO COM TESTE DE TUKEY, INDICAM AMOSTRAS QUE NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE (P=0,005) ENTRE SI. AS BARRAS VERTICAIS MOSTRAM O DESVIO PADRÃO. PEREIRA-NETTO *et al.* (2012).....78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DO MEIO MURASHIGE & SKOOG - MS (1962).....	38
TABELA 2 – ATRIBUIÇÕES DOS PICOS DAS ANÁLISES DE RMN DO CARBONO (¹³ C-RMN) DAS AMOSTRAS ÁGAR, 12,5% E 37,5% E ATRIBUIÇÕES DOS PICOS DAS ANÁLISES DE RMN DO CARBONO (¹³ C-RMN) DA GALACTOMANANA DE <i>S. parahybae</i>	50
TABELA 3 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO DAS MISTURAS DE ÁGAR E GALACTOMANANA PARA ANÁLISES REOLÓGICAS.....	51
TABELA 4 – MÉDIA DOS VALORES DE G', G'' E η^* 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).....	55
TABELA 5 – VALORES DE J_0 , G_0 E JR/JMÁX. PARA AS AMOSTRAS PARCIALMENTE SUBSTITUÍDAS POR GALACTOMANANA (6,25; 12,5; 25,0 E 37,5%) E AMOSTRA CONTENDO SOMENTE ÁGAR (CONTROLE) (AUTOCLAVADAS E NÃO AUTOCLAVADAS). O PERÍODO DE ARRASTE FOI DE 300S SOB TENSÃO DE 3PA, E A RECUPERAÇÃO (JR/JMAX.) EM PERÍODO DE 1500S SOB TENSÃO NULA E VALORES DE G_0 QUE REPRESENTA O MODULO ELÁSTICO NO TEMPO T=0.....	61
TABELA 6 – VALORES DE TEMPERATURA DE FUSÃO E DE GELIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PREVIAMENTE AUTOCLAVADAS.....	69

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

γ – deformação

ω – frequência angular (rad/s)

$\dot{\gamma}$ – taxa de cisalhamento (s^{-1})

σ – tensão de cisalhamento (Pa)

η – viscosidade dinâmica (Pa.s)

η^* – viscosidade complexa (Pa.s)

η_{ap} – viscosidade aparente

f – frequência (Hz)

G^* – módulo complexo (Pa)

G' – módulo elástico (Pa)

G'' – módulo viscoso (Pa)

Gal – unidade de galactose

Man – unidade de manose

Man/Gal – razão molar entre manose e galactose de galactomananas

J – compliança (Pa^{-1})

J_0 – compliança instantânea (Pa^{-1})

G_0 – módulo elástico no tempo zero

$J_r/J_{m\acute{a}x.}$ – recuperação (Pa^{-1})

δ - Deslocamento químico em ppm

ppm - Unidade em partes por milhão

Ágar – Meio de cultura MS gelificado com ágar – 100% - (C= 6g/L)

6,25% - Meio de cultura MS gelificado com 6,25% de galactomanana de guapuruvu e

93,75% de ágar. Concentração final de ágar e galactomanana de 6g/L

12,5% - Meio de cultura MS gelificado com 12,5% de galactomanana de guapuruvu e

87,5% de ágar. Concentração final de ágar e galactomanana de 6g/L

25,0% - Meio de cultura MS gelificado com 25,0% de galactomanana de guapuruvu e

75,0% de ágar. Concentração final de ágar e galactomanana de 6g/L

37,5% - Meio de cultura MS gelificado com 37,5% de galactomanana de guapuruvu e 62,5% de ágar. Concentração final de ágar e galactomanana de 6g/L

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 OBJETIVOS.....	19
1.1.1 OBJETIVOS GERAL.....	19
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL.....	20
2.2 ÁGAR: GALACTANA OBTIDA DE ALGAS VERMELHAS (RHODOPHYTA).....	22
2.3 GALACTOMANANAS.....	26
2.4 MISTURAS DE POLISSACARÍDEOS- GÉIS BINÁRIOS.....	29
2.5 INFLUÊNCIA DE AGENTES GELIFICANTES EM MEIOS DE CULTURA PARA MICROPROPAGAÇÃO DE MACIEIRAS.....	30
2.6 <i>SCHIZOLOBIUM PARAHYBAE</i> ((VELL.) BLAKE) (GUAPURUVU) E POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE SUAS SEMENTES.....	32
2.7 REOLOGIA APLICADA A ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS.....	33
2.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) APLICADA A ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS.....	35
3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 OBTENÇÃO DA GALACTOMANANA DE <i>SCHIZOLOBIUM PARAHYBAE</i> (GUAPURUVU).....	37
4.2 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA UTILIZADO PARA A MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DA MACIEIRA MAKUBAKAIDO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁGAR E GALACTOMANANA DE GUAPURUVU	37
4.3 ANÁLISES REOLÓGICAS.....	39
4.3.1 Análises Oscilatórias Dinâmicas.....	39
4.3.2 Análises Dinâmicas Termomecânicas.....	42
4.3.3 Análises de Arraste e Recuperação.....	42
4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	45
4.4.1 Preparação das amostras de géis para a microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	45
4.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	46

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 ANÁLISES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO TREZE.....	47
5.2 ANÁLISES REOLÓGICAS.....	51
5.2.1 Análises Dinâmicas Oscilatórias.....	51
5.2.2 Análises de Arraste e Recuperação.....	59
5.2.3 Análises Dinâmicas termomecânicas.....	63
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	71
6 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	83

1. INTRODUÇÃO

A micropropagação consiste na produção rápida de milhares de clones de uma planta, a partir de uma única célula vegetal somática ou de um pequeno pedaço de tecido vegetal (explante) (HARTIMANN *et al.*, 2002). A maçã é, comercialmente, a mais importante fruta das zonas temperadas e a terceira mais cultivada no mundo (71.8 milhões toneladas/ ano) (FAO, 2011). Maçãs são tradicionalmente propagadas através de métodos vegetativos, como enxertia ou brotamento. No entanto, tais métodos não garantem plantas saudáveis e livres de patógenos, além disso, obtêm-se uma baixa taxa de multiplicação e o cultivo depende da estação do ano. A micropropagação de porta-enxertos da macieira é uma alternativa à propagação vegetativa, e ainda, proporciona uma ótima ferramenta para o estudo e desenvolvimento de novas variedades e linhagens transgênicas (ALDWINCKLE *et al.*, 2009).

O agente gelificante mais utilizado em meio de micropropagação vegetal, incluindo macieiras, é o ágar. Ágar é uma mistura de galactanas solúveis em água, polissacarídeos obtidos de espécies de algas vermelhas, especialmente das ordens Graciliaceae e Gelidiaceae. No entanto, além de representar um componente de alto custo, o ágar pode afetar o crescimento e o desenvolvimento de culturas *in vitro* e, eventualmente, pode causar necrose e hiperhidricidade nos tecidos vegetais (PASQUALETTO *et al.*, 1988).

Alguns trabalhos propuseram a substituição total ou parcial do ágar por outros polissacarídeos. Entre eles, estão: o amido (NAIK; SARKAR, 2001); alginato (ADAHOA; ROSCOE, 1982), carragenana (NORZIAH *et al.*, 2006), isubgol (BABBAR; JAIN, 1998; CIGDEM; KHALID; ORHAN, 2008), xantana (BABBAR, JAIN, 2006) e galactomananas (LUCYSZYN *et al.*, 2006; LUCYSZYN *et al.*, 2007; PEREIRA-NETTO *et al.*, 2012).

Galactomanana é um polissacarídeo de reserva (SHCHERBUKIN; ANULOV, 1993), cuja principal fonte encontra-se no endosperma de sementes de dicotiledôneas, principalmente nos membros da família Leguminosae. Este polímero foi objeto de estudo de trabalho realizado anteriormente (PEREIRA-NETTO *et al.*, 2012), no qual galactomananas de guapuruvu (*Schizolobium parahybae*) foram adicionadas em substituição parcial ao ágar em meios de micropropagação de

macieiras Marubakaido. A mistura de ágar e galactomanana estimularam, significativamente, a formação de brotos e o alongamento dos porta-enxertos de macieiras Marubakaido. Além disso, os autores demonstraram que a estimulação do crescimento não está ligado à degradação da galactomanana. Os resultados obtidos por Pereira-Netto e colaboradores (2012) sugerem que as possíveis vantagens do sistema de micropropagação com substituição parcial do ágar por galactomanana de guapuruvu estejam relacionadas as interações do gel binário.

Este trabalho se propôs a estudar, por meio de análises reológicas e microscopia eletrônica de varredura, a relação entre o modo de interação dos polissacarídeos ágar e galactomanana de guapuruvu, utilizados como agentes gelificantes, e o crescimento diferencial das macieiras micropropagadas em meio MS.

O agente gelificante ágar pode ser substituído, total ou parcialmente, em meios de cultura vegetal, por polissacarídeos alternativos tais como galactomanana e xiloglucana (BABBAR *et al.*, 2005; LUCYSZYN *et al.*, 2006, LUCYSZYN *et al.*, 2007). Esses meios modificados por outro polissacarídeo representam uma alternativa vantajosa para a micropropagação, pois há a possibilidade de redução dos custos por serem componentes mais baratos do que o ágar e ainda, observa-se melhoria no crescimento das plantas micropropagadas.

A galactomanana obtida das sementes de *Schizolobium parahybae* foi utilizada como substituta parcial ao gelificante ágar em meios de micropropagação de macieiras Marubakaido (PEREIRA-NETTO *et al.*, 2012), cujos resultados demonstraram que a presença da galactomanana foi benéfica aos explantes das macieiras e que este crescimento diferencial não estava relacionado à disponibilidade dos monossacarídeos, galactose e manose, visto que, não ocorreu a degradação da galactomanana nos meios de cultura. Sendo assim, é provável que a diferença no crescimento dessas plantas esteja relacionada a mudanças na estrutura dos géis parcialmente substituídos por galactomanana de guapuruvu. Este trabalho baseia-se na hipótese de que a organização da rede interna dos géis, com alguma proporção de galactomanana, é alterada de forma a beneficiar de algum modo o crescimento das maçãs micropropagadas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a estrutura interna e as propriedades reológicas dos meios Murashige & Skoog- MS (1962), gelificados com ágar e os substituídos parcialmente por galactomanana de guapuruvu (*Schizolobium paraybae*), visando inter-relacionar tais características ao crescimento diferencial do porta enxerto da macieira marubakaido.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as propriedades reológicas de meios de cultura gelificados com misturas de ágar/galactomanana;
- Determinar a influência do processo de autoclavagem em relação à estrutura das misturas de ágar/galactomanana via análise reológica;
- Analisar as misturas ágar/galactomanana por RMN;
- Avaliar a estrutura das misturas ágar/galactomanana por microscopia eletrônica de varredura (MEV);

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL

Micropropagação consiste no uso de diferentes células somáticas, tecidos ou órgãos de plantas introduzidos *in vitro*, estabelecidos e mantidos em culturas assépticas visando 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* (CALDAS, 1998).

A cultura de tecidos vegetais é feita de um explante que é todo segmento de tecido ou órgão vegetal utilizado para iniciar uma cultura *in vitro*. Pode ser um fragmento de folha, caule, raiz ou qualquer tecido que responda às condições de indução do meio de cultura e que sejam capazes de se regenerar. Essa regeneração é fundamentada na capacidade de proliferação das células vegetais organizarem-se em tecidos e, eventualmente, em plantas completas. Essa capacidade é denominada totipotência e considera que as células vegetais manifestam, em momentos diferentes e sob estímulo apropriado, a potencialidade de iniciar um novo indivíduo multicelular (REINERT; BACKS, 1968; VASIL; VASIL, 1972; VERDEIL *et al.*, 2007; GEORGE, 2008).

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).

A maçã é, comercialmente, a mais importante fruta das zonas temperadas e a terceira mais cultivada no mundo (64,3 milhões toneladas/ ano) atrás da banana (81,3 milhões toneladas/ ano) e da uva (66,3 milhões toneladas/ ano) (FAO, 2009).

Maças são tradicionalmente propagadas através de métodos vegetativos, como enxertia ou brotamento. No entanto, tais métodos não garantem plantas saudáveis e livres de patógenos, além disso, obtêm-se uma baixa taxa de multiplicação e o cultivo depende da estação do ano. A micropropagação de porta-enxertos da macieira resolve os principais problemas relacionados à propagação vegetativa, e ainda, produz plantas mais resistentes e com um crescimento mais rápido do que as plantas produzidas através de métodos convencionais (ALDWINCKLE *et al.*, 2009). (FIGURA 1)

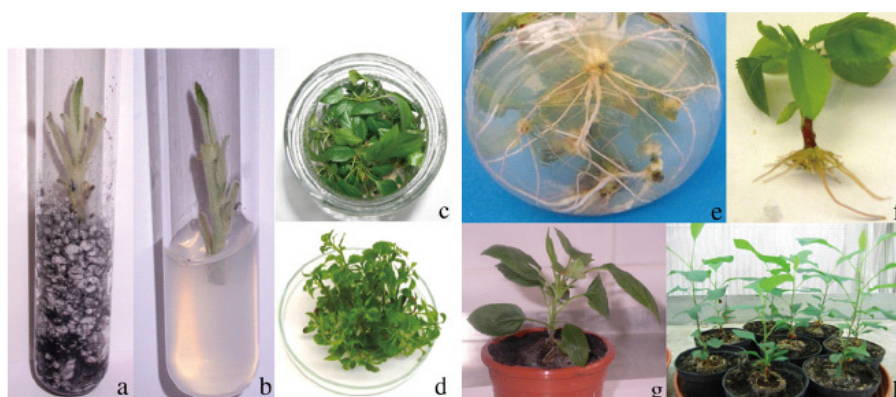


FIGURA1- MICROPROPAGAÇÃO DE MACIERAS. A) EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO PEDAÇOS DE CARVÃO ATIVADO; B) EM GEL; C) 'ROYAL GALA'; D) 'HÚSVÉTI ROZMARING'; E) 'ROYAL GALA'; F) 'MCINTOSH'; G E H) TRANSFERÊNCIA PARA TERRA 'ROYAL GALA'. FONTE: J. DOBRÁNSZKI, J.A. TEIXEIRA DA SILVA (2010).

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 (MOTOSUGI; GAO; SUGIURA, 1995; IGARASHI *et al.*, 2002; MACIEL; VOLTOLINI; PEDROTTI, 2002; LIMA-NISHIMURA *et al.*, 2003; HARADA *et al.*, 2005).

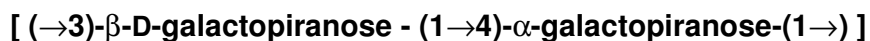
2.2 ÁGAR: GALACTANA OBTIDA DE ALGAS VERMELHAS (RHODOPHYTA)

Algas vermelhas, pertencentes à família *Rhodophyta*, representam uma divisão de plantas com mais de 4000 espécies, sendo a grande maioria de habitat marinho e pouco mais de 100 delas de ambiente de água doce (RAVEN *et al.*, 1996).

Muitos estudos sobre os polissacarídeos presentes em algas vermelhas foram realizados (DUCKWORTH, HONG, YAPHE, 1970; MARINHO-SORIANO *et al.*, 1999; MARINHO-SORIANO, BOURRET, 2003), e acredita-se que essas macromoléculas estejam distribuídas em três diferentes lugares nas algas, executando tarefas distintas, tais como: a) na parede celular das algas, desempenhando um papel estrutural, ou seja, conferindo resistência a parede celular; b) entre as membranas citoplasmáticas, atuando na proteção e como um “cimento” e; c) no espaço intracelular, cumprindo o papel de polissacarídeos de reserva (WATT *et al.*, 2002).

Ágar é uma mistura de galactanas. Dentre os polissacarídeos comercializados, as galactanas obtidas de algas vermelhas (*Rhodophyta*) apresentam grande destaque. Os principais polissacarídeos não fibrilares são as galactanas sulfatadas, constituídos de unidades alternadas de (1→3)-β-D-galactopiranosose e (1→4)-α-galactopiranosose (KNUTSEN *et al.*, 1994).

As galactanas sulfatadas de algas marinhas são polímeros lineares, constituídos por unidades de β-galactopiranosose substituídas glicosidicamente na posição 3 (unidade A) e α-galactopiranosose substituídas glicosidicamente na posição 4 (unidade B) (PERCIVAL; McDOWELL, 1967). A unidade A sempre pertence à série estereoquímica D e a estereoquímica da unidade B é a base para a classificação geral das galactanas, sendo classificadas como agaranas (série L) ou carragenanas (série D) (PAINTER, 1983). Deste modo formam um arranjo alternado entre as unidades A e B (AB)_n.



Unidade A

Unidade B

Uma característica estrutural particular dos polissacarídeos sintetizados pelas algas vermelhas é a presença da unidade B total ou parcialmente ciclizada na forma de 3,6-anidrogactose. As galactanas sulfatadas que apresentam este anidroaçúcar na sua estrutura, podem apresentar propriedades gelificantes ou viscosantes (RENN, 1997) e são denominadas de ficocolóides ou hidrocolóides, pela elevada capacidade que apresentam de formar géis em meios aquosos (GLICKSMAN, 1987).

Ágar é comercialmente importante por sua capacidade de formar géis. 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, ágar com menor poder gelificante, comercialmente, elas são a principal fonte de extração (FIGURA 2).

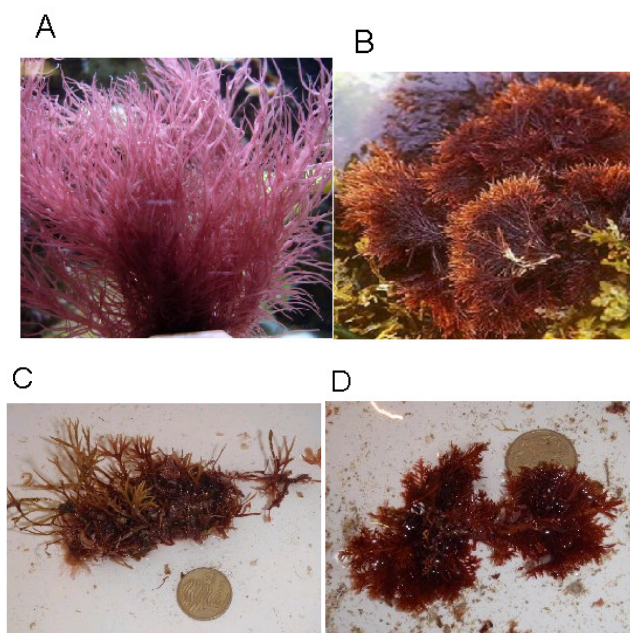


FIGURA 2 - ESPÉCIES DE ALGAS DA FAMÍLIA RHODOPHYCEAE REPRESENTANTES DOS GÊNEROS: A) *GRACILARIA*; B) *GELIDIUM*; C) *GELIDIELLA*; D) *PTEROCLADIA*.

FONTE: [HTTP://WWW.BOLDSYSTEMS.ORG](http://www.boldsystems.org);

[HTTP://WWW.ASTURNATURA.COM/GENERO/GELIDIUM](http://www.asturnatura.com/genero/gelidium);

[HTTP://BIOREUNIUFPB.BLOGSPOT.COM](http://bioreuniufpb.blogspot.com). SITES ACESSADOS EM 19/12/2010.

O ágar pode ser fracionado em dois componentes (ARAKI; HIRASE, 1954; 1960) (FIGURA 3). 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).

Vários estudos relatam que o rendimento, o tipo de substituinte, conteúdos de agarose e agarpectina, e propriedades gelificantes do ágar são influenciados pela: espécie de alga utilizada (CRAIGIE *et al.*, 1984; LAHAYE, 1986; LIGNELL; PEDERSÉN, 1989; LEVY; FRIEDLANDER, 1990); estação do ano (PRICE; BIELIG, 1992; HURTADO-PONCE; UMEZAKI, 1994), época de colheita (BIRD, 1988), condições de extração e processamento (DURAIRATNAM, 1987; REES, 1961; CRAIGIE; LEIGH, 1978) e estágio do ciclo de vida (MARINHO-SORIANO *et al.*, 1999).

A estrutura básica e repetitiva das galactanas é geralmente modificada por diferentes tipos de substituintes, tais como *O*-sulfato, *O*-metil, *O*-glicosil e 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno) (USOV, 1998). A proporção e distribuição dos substituintes mencionados podem alterar as propriedades físico-químicas dos polissacarídeos (YAPHE; DUCKWORTH, 1972; LAHAYE; ROCHAS, 1991; RODRÍGUEZ *et al.*, 2009).

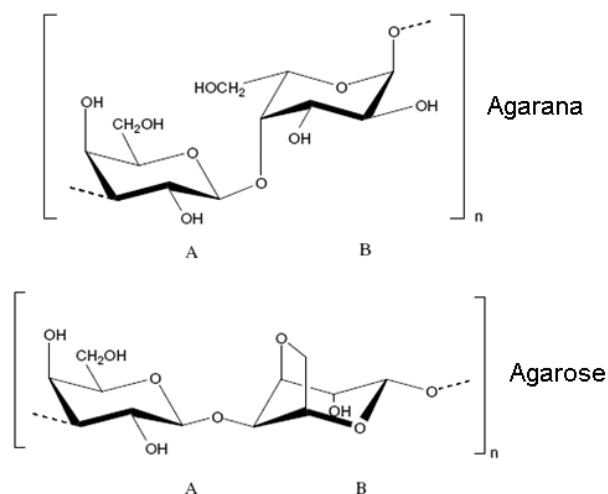


FIGURA 3- SEGMENTO REPRESENTATIVO DE UMA CADEIA DE AGARANA E AGAROSE, AS UNIDADES 3 LIGADAS E 4 LIGADAS SÃO REPRESENTADAS POR A E B, RESPECTIVAMENTE. FONTE: RODRIGUEZ *et al.*, 2002.

As galactanas de algas vermelhas, polissacarídeos nos qual o ágar está incluído, desperta atenções devido ao seu potencial econômico sendo utilizadas em diferentes áreas, como: suporte para culturas bacterianas e meio de separação em cromatografia de coluna e eletroforese (DJABOUROV *et al.*, 1989); na indústria de alimentos, como espessantes e gelificantes (DJABOUROV *et al.*, 1989; WATASE *et al.*, 1989; NORTON *et al.*, 1999), e ainda possuem aplicações na área médica e farmacológica (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005).

O ágar é o agente gelificante mais utilizado em meios de cultura de plantas e de microorganismos. Dentre suas propriedades, destaca-se a sua natureza não tóxica, estabilidade, transparência e o fato de ser 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 o polissacarídeo são importadas, representando um produto de alto custo (KOLENBACH; WERNICKE, 1978).

Atualmente, muitos trabalhos visam encontrar novas matrizes (géis utilizados como suporte para culturas) que possuam propriedades vantajosas e ao mesmo tempo baixo custo (LUCYSZYN *et al.*, 2007; NORZIAH *et al.*, 2006). 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 são citadas na literatura as galactomananas (BABBAR *et al.*, 2005; LUCYSZYN *et al.*, 2006; LUCYSZYN *et al.*, 2007; PEREIRA-NETTO *et al.*, 2012), alginato (ADAHOA; ROSCOE, 1982), carragenana (NORZIAH *et al.*, 2006), isubgol (BABBAR; JAIN, 1998; CIGDEM; KHALID; ORHAN, 2008) e xantana (BABBAR, JAIN, 2006).

2.3 GALACTOMANANAS

As galactomananas obtidas de plantas constituem polissacarídeos de reserva (SHCHERBUKIN; ANULOV, 1993), cuja principal fonte é endosperma de sementes de dicotiledôneas, principalmente os membros da família Leguminosae. Essa é a terceira maior família de fanerógamas após Asteraceae e Orchidaceae. Apresenta distribuição cosmopolita (LEWIS, 1987), com aproximadamente 727 gêneros e 19.325 espécies, que variam de árvores emergentes até ervas diminutas e efêmeras (LEWIS *et al.*, 2005). Recentes estudos filogenéticos sustentam para a família Leguminosae, o reconhecimento de duas subfamílias monofiléticas (Mimosoideae e Faboideae (Papilionoideae)), além de Caesalpinioideae como parafilética (WOJCIECHOWSKI, 2003).

As galactomananas também podem ser obtidas 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).

Esse biopolímero apresenta como estrutura genérica uma cadeia principal com unidades de β -D-manopiranosose com ligações (1 \rightarrow 4), substituídas em O-6 por unidades de α -D-galactopiranosose (DEA; MORRISON, 1975; DEY, 1978; SONI; BOSE, 1985) (FIGURA 4).

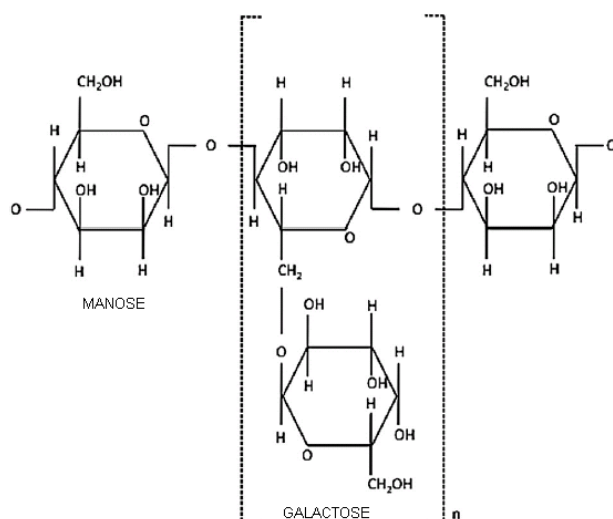


FIGURA 4- SEGMENTO REPRESENTATIVO DE UMA CADEIA DE GALACTOMANANA.
FONTE: CERQUEIRA *et al.* (2011).

Existe uma enorme variedade de galactomananas, com estruturas únicas e diferentes graus de ramificações (Scherbukhin; Anulov, 1993; POLLARD *et al.*, 2010). Normalmente o número de unidades de galactose é determinado pela razão manose/galactose (Man/Gal). A razão manose/galactose pode variar dependendo do grupo taxonômico da fonte de onde o polissacarídeo é extraído, sendo possível obter galactomananas com relações Man/Gal entre 1,1 (altamente substituídas) e 5,0 (pouco substituídas) (Dea; Morrison, 1975).

A proporção de unidades de galactose tem papel fundamental na solubilidade das galactomananas, visto que, à medida que a razão Man/Gal diminui a solubilidade aumenta. Caso, não existam ramificações com o monossacarídeo galactose, tem-se uma manana (cadeia linear de unidades de manose), cuja distribuição das cadeias irá proporcionar interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio entre as hidroxilas *cis* da manose, levando a formação de agregados completamente insolúveis em água (GOYCOOLEA; MORRIS; GIDLEY, 1995).

Quando unidades de galactose estão presentes, ou seja, as cadeias são ramificadas, ocorre um impedimento estérico entre as ligações de hidrogênio intermoleculares, minimizando a formação de agregados. Portanto, o alto grau de substituição por galactose impede a agregação das cadeias de galactomanana. Por outro lado, galactomananas com poucas cadeias laterais (maior razão Man/Gal) podem interagir melhor com outros polissacarídeos devido às longas regiões não substituídas (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005). 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*) (DOYLE, 1997).

A galactomanana quando solubilizada em água forma uma solução bastante viscosa (NEUKOM, 1989), podendo ser utilizada como agente espessante, estabilizante e emulsificante. A variedade de propriedades físico-químicas torna esse polissacarídeo um material bastante versátil utilizado pelo homem de inúmeras formas, entre elas, na indústria têxtil, farmacêutica, alimentícia, cosmética e na biomedicina (VIEIRA *et al.*, 2007; SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005). Recentemente, alguns trabalhos têm mostrado a possibilidade de utilização de galactomananas para a formação de filmes (CERQUEIRA, *et al.*, 2009; MARTINS, *et al.*, 2010; MIKKONEN, *et al.*, 2007).

As duas principais galactomananas utilizadas comercialmente são a goma guar (*Cyamopsis tetragonobus*) e a goma tara (*Caesalpinia spinosa*), com razão Man/Gal de 1,6 e 3,3, respectivamente. (DEA; MORRINSON, 1975; DOYLE *et al.*, 2006). Outra galactomanana comercial comum é a goma cassia extraída de *Cássia tora* cuja relação Man/Gal é ~ 3,0, (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005). A galactomanana de feno-grego *Trigonella foenum-graecum* Man/Gal ~ 1,1 também já é explorada comercialmente (BRUMMER, 2001). Outra galactomanana com potencial econômico é aquela extraída das sementes de *Prosopis juliflora* (Man/Gal 1,2) (FUNAMI *et al.*, 2008).

Atualmente existe uma tendência mundial que visa encontrar sementes que constituam fontes alternativas para extração de gomas, para a indústria (CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009). Em especial na América Latina, as possíveis fontes de extração de galactomananas são pouco conhecidas, apesar da rica biodiversidade da flora local (AZERO; ANDRADE, 2002; CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009). Em 2008, o Brasil apresentou um déficit em relação à demanda de polissacarídeos necessários à indústria, sendo que o país importou dos Estados Unidos US\$ 142.000 e exportou somente US\$ 68.000. Entre os anos de 1993 a 2007 foram importados, aproximadamente, 10.000 toneladas de goma guar (US\$ 1.9/kg). Logo, observa-se uma deficiência na suplementação deste polissacarídeo e de galactomananas, em geral, que possam atender a demanda do mercado brasileiro (CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009).

Com o objetivo de aumentar a exploração de fontes alternativas de galactomananas, vários trabalhos na literatura, incluindo trabalhos realizados pelo grupo de Química de Carboidratos Vegetais da Universidade Federal do Paraná, caracterizaram estruturalmente galactomananas de diferentes fontes e relacionaram suas propriedades, incluindo *Mimosa scabrella* (bracatinga) (GANTER *et al.*, 1988; 1992; 1993; 1995; GANTER; REICHER, 1999), *Senna multijuga* (RECHIA-VARGAS, 1995), *Schizolobium amazonicum* (PETKOWICZ *et al.*, 1993; 1998), *Schizolobium parahybae* (GANTER *et al.*, 1993, 1995; ZAWADZKI-BAGGIO, 1994; PETKOWICZ *et al.* 1998), *Apuleia leiocarpa* (LUCYSZYN, 1994), *Dimorphandra gardneriana* tul. (CUNHA *et al.*, 2009), *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* (SOUZA *et al.*, 2010). Outras espécies, também da família Leguminosae, tiveram suas galactomananas purificadas e caracterizadas, como é o caso das espécies: *Caesalpinia pulcherrima*,

Gleditsia triacanthos, *Adenanthera pavonina* (CERQUEIRA et al., 2009; CERQUEIRA et al., 2011).

2.4 MISTURAS DE POLISSACARÍDEOS- GÉIS BINÁRIOS

Interações sinérgicas entre polissacarídeos são comercialmente atraentes e assunto de difundida exploração tecnológica (CAIRNS; MILES; BROWNSEY, 1987). Vários fatores afetam na magnitude da sinergia entre sistemas poliméricos, incluindo o peso molecular e a viscosidade intrínseca (FERNANDES; GONÇALVES; DOUBLIER, 1991), a concentração de sais (KHOURYIEH et al., 2007; SCHORSCH; GARNIER; DOUBLIER, 1997), a proporção de cada polissacarídeo utilizada na mistura (CUI et al., 1995), a concentração total de polissacarídeos (BRESOLIN et al., 1997; MANNION et al., 1992), a temperatura (MANNION et al., 1992; ZHAN et al., 1993) e o pH (MORRIS; FOSTER, 1994; ROSS-MURPHY; TAKO, 1991; WHITNEY; et al., 1998).

Na literatura, existem muitos estudos relacionados à sinergia que ocorre entre diferentes misturas de polissacarídeos (BRESOLIN, 1999; FERNANDES, 1994; NORZIAH; FOO; KARIM, 2006).

O modo de interação entre os polissacarídeos ágar e galactomanana de alfarroba foi avaliado por experimentos reológicos e por RMN. A interação sinérgica desse sistema foi caracterizada pela formação de zonas de junção entre o ágar e a galactomanana de alfarroba (Man/Gal ~3) em regiões deste polissacarídeo não substituídas por unidades de galactose. Observou-se também que, em concentrações elevadas de ambos, as moléculas de galactomanana se auto associam, levando a uma separação de fase formando uma rede interpenetrante (TURQUOIS TARAVEL; ROCHA, 1993).

O uso de um único agente gelificante, muitas vezes resulta em um gel com baixa coesão, aparência não apreciável, curta durabilidade, alta sinerese, e estabilidade inadequada para serem submetidos a processos industriais e condições ambientais diversas (LUCYSZYN et al., 2007).

Géis mistos com dois ou mais biopolímeros vêm sendo amplamente investigados, entre os exemplos incluem-se: a carragenana e micelas de caseína (JI

et al., 2008), ágar e carragenana (MEENA *et al.*, 2009), amido e pectina (KHONDKARA *et al.* 2006), ágar e galactomanana (TAKO; NAKAMURA, 1988, TURQUOIS; TARAVEL; ROCHAS, 1993; LUCYSZYN *et al.*, 2006), galactomanana e xantana (SHOBHA; THARANATHAN, 2009), pectina e galactomanana (WU *et al.*, 2009), xiloglucana e pectina (ITOH *et al.*, 2008).

2.5 INFLUÊNCIA DE AGENTES GELIFICANTES EM MEIOS DE CULTURA PARA MICROPROPAGAÇÃO DE MACIEIRAS

O agente gelificante mais utilizado em meios de cultura de micropropagação vegetal, incluindo macieiras, é o ágar, cuja concentração varia de 6 a 8 g/L. Ágar é um polissacarídeo obtido de espécies de algas vermelhas, especialmente das ordens Graciliaceae e Gelidiaceae. Apesar de ser o agente gelificante mais utilizado, o ágar representa um componente de alto custo e a literatura relata que este polissacarídeo pode afetar o crescimento e o desenvolvimento de culturas *in vitro* e, eventualmente, pode causar necrose e hiperhidricidade (elevado teor de água no interior das células e tecidos com aspecto translúcido) nos tecidos vegetais (PASQUALETTO *et al.*, 1988).

O crescimento diferencial do porta-enxerto da macieira Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh) e da variedade Jonagored (*Malus domestica*) foi estudado por Lima-Nishimura *et al.*, 2003. Nesse estudo o gelificante ágar foi parcialmente substituídos por xiloglucanas extraídas de sementes de *Hymenaea courbaril* (4 g/L ágar e 2 g/L xiloglucana p/v) e este meio foi comparado àquele gelificado apenas com ágar (0.6% p/v). A substituição parcial do ágar, neste estudo, resultou em maiores taxas de multiplicação e aumento do crescimento das partes aéreas das maçãs, além disso, nesses meios modificados a ocorrência de hiperhidricidade foi menor. A incorporação da xiloglucana no meio de cultura foi benéfica ao crescimento das maçãs e ainda representou um componente de custo reduzido, por se tratar de um polissacarídeo extraído de uma árvore nativa do Brasil.

Mohan e colaboradores (2004) utilizaram o bagaço de cana-de-açúcar como uma alternativa mais barata de suporte em culturas de Marubakaido e observaram um aumento de 22% na taxa de enraizamento dessas plantas.

Outro polissacarídeo utilizado em substituição parcial do ágar, na micropropagação vegetal, é o amido. No entanto, existem desvantagens em seu uso decorrentes da presença de amilases no meio, o que resulta em uma progressiva diminuição da consistência do meio durante o período de cultura. Isso pode causar hiperhidricidade e a conseqüente morte dos explantes (ZIMMERMAN *et al.*, 1985). Portanto, esta é a razão principal para o uso limitado de amido como um agente de gelificação em cultura de tecidos (NAIK; SARKAR, 2001), mesmo sendo um gelificante de baixo custo.

As galactomananas foram utilizadas em substituições parciais com o ágar durante a proliferação de brotos de maçãs Marubakaido (LUCYSYZN *et al.*, 2005). A mistura desses polissacarídeos resultou em maior taxa de multiplicação de brotos e, principalmente, grande redução na ocorrência de hiperhidricidade (2,5 agar/cassia, 6,6 agar/guar e 19,3 agar).

Lucysyzn e colaboradores (2006) realizaram a substituição parcial do ágar por galactomananas como agente gelificante no meio de cultura para o processo de micropropagação de brotos de morangueiro. Os autores observaram que essa mistura, influenciou na taxa de proliferação, rizogênese e crescimento dos brotos. Segundo os autores, os resultados encontrados nos experimentos *in vitro* podem estar relacionados ao caráter neutro das galactomananas, que quando combinada ao ágar podem dar origem a um meio mais viscoelástico. A formação de um gel menos rígido ajuda e/ou facilita a difusão de água e nutrientes no meio (LUCYSYZN *et al.*, 2005) e, conseqüentemente, o crescimento de células e brotos.

Recentemente Pereira-Netto *et al.* (2012) demonstraram que a mistura de ágar e galactomanana extraída de sementes de *Schizolobium paraybae* estimularam, significativamente, a formação de brotos e o alongamento dos porta-enxertos de macieiras Marubakaido. Além disso, demonstrou-se que a estimulação do crescimento não estava ligada à degradação da galactomanana. Visto isso, é possível que as vantagens encontradas estejam relacionadas a estrutura do gel binário formado (hipótese que será abordada neste trabalho).

Portanto, a substituição total ou parcial do ágar por outros polissacarídeos resulta, de acordo com os exemplos citados acima, não somente em uma melhoria na taxa de multiplicação dos brotos, como também, representa uma possibilidade de redução de custos, visto que, pode-se reduzir o valor da micropropagação em até 90% dependendo do agente gelificante escolhido (BABBAR *et al.*, 2005).

2.6 *SCHIZOLOBIUM PARAHYBAE* ((VELL.) BLAKE) (GUAPURUVU) E POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE SUAS SEMENTES

Schizolobium parahybae (guapuruvu) (FIGURA 5) é uma espécie nativa da Mata Atlântica, cuja classificação, de acordo com o Sistema de Classificação de Cronquist, obedece à seguinte hierarquia: Reino: Plantae; Divisão: Magnoliophyta (Angiospermae); Classe: Magnoliopsida (Dicotyledonae); Ordem: Fabales; Família: Caesalpiniaceae; Gênero: *Schizolobium*; Espécie: *Schizolobium parahybae* (Vellozo) S . F. Blake; Contrib. U. S. Nat. Herb. 20: 240, 1919. (ERNANI, 1994)

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 das sementes de *S. parahybae* (Man/Gal ~ 3,0) e *S. amazonicum* e caracterizados estruturalmente, dentre eles, galactomananas (GANTER *et al.*, 1995), arabinanas e mananas (PETKOWICZ; SCHAEFER; REICHER, 2007).

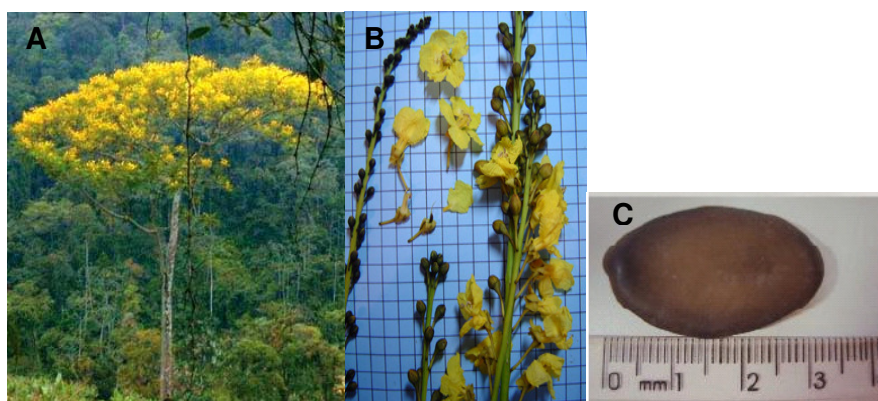


FIGURA 5- ÁRVORE DE *SCHIZOLOBIUM PARAHYBAE* (GUAPURUVU) ESPÉCIE NATIVA DA MATA ATLÂNTICA (A), SUAS FLORES (B) E SEMENTES (C).

FUNTE: [HTTP://WWW.UFSM.BR/HERBARIOFLORESTAL/IMG/ESPECIES/GUAPURUVU_EXTRA.JPG](http://www.ufsm.br/herbarioflorestal/img/especies/guapuruvu_extra.jpg) ACESSADO EM 03/01/2011.

Petkowicz e colaboradores (1998) compararam as galactomananas obtidas *Schizolobium parahybae* (guapuruvu), *S. amazonicum* e *Cássia fastuosa*, e observaram que as três espécies apresentaram a mesma razão Man/Gal, e através da análise dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise parcial constataram que a estrutura fina é igual para as espécies de *Schizolobium*, porém diferente para a *C. fastuosa*.

Através de técnicas reológicas, calorimetria diferencial de varredura, Bresolin *et al.* (1998), estudaram os aspectos conformacionais da xantana nas interações entre xantana e galactomanana de *Schizolobium parahybae*, e encontraram menor temperatura de formação de gel em relação à descrita na literatura, devido a distribuição das unidades de galactose na cadeia principal e a razão Man/Gal, que é de 3.

Ganter e colaboradores (1995) verificaram a distribuição de unidades de D-galactose ao longo da cadeia principal de manose através de ^{13}C RMN para galactomananas de bracinga, guapuruvu e barbatimão. A bracinga caracteriza-se pela presença de duas substituições seguidas na cadeia de manose. Para guapuruvu e barbatimão, ocorre uma substituição a cada duas unidades de manose. Análises de RMN ^{13}C revelaram a presença de regiões não-substituídas. Os resultados, obtidos pelos autores, são consistentes com o arranjo aleatório das unidades de D-galactose nas três galactomananas.

2.7 REOLOGIA APLICADA A ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS

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).

A grande maioria das aplicações de polissacarídeos está associada à capacidade que eles possuem de alterar propriedades físicas do meio onde se encontram, resultando em soluções de alta viscosidade ou criando redes intermoleculares coesivas (MORRIS, 1995). Pensando nisso, inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas com a finalidade de avaliar o comportamento de diferentes polissacarídeos, individualmente, e, em misturas, quando submetidos a diferentes condições de processo (FERNANDES, 1991; BRESOLIN *et al.*, 1998; BRESOLIN *et al.*, 1999; NORZIAH; FOO; KARIM, 2006; SHOBHA *et al.*, 2009; VRIESMANN; SILVEIRA; PETKOWICZ, 2010).

Viana-Filho (2009) estudou a incorporação de galactomananas e xiloglucanas, espécies nativas, e dos polissacarídeos comerciais xantana, hialuronato de sódio e fucogel na preparação de emulsões óleo-em-água (O/A). O perfil reológico da emulsão pode ser modulado pela combinação de polissacarídeos, que conferem características desejadas ou novas ao produto. Existe a possibilidade das galactomananas substituírem parcialmente a xantana em ~ 55% devido à interação sinérgica entre estes dois biopolímeros, gerando redução de custos. Os polissacarídeos extraídos das sementes de *Schizolobium parahybae* (guapuruvu), *Mimosa scabrella* (bracatinga) e *Hymenaea Courbaril* (copaíba) demonstraram o potencial de aplicabilidade de elementos da biodiversidade brasileira na indústria cosmética. Por meio de testes de arraste e recuperação, termo-mecânicos e oscilatórios dinâmicos observa-se que ocorre interação sinérgica entre as galactomananas e a xantana neste sistema complexo, podendo esta interação reduzir custos de produção.

Análises reológicas não oscilatórias e oscilatórias dinâmicas do gel binário de ágar e galactomanana extraída de *Cassia fastuosa* (cássia) e *Cyamopsis tetragonolobus* (goma guar) revelaram que, em termos de resistência do gel, a melhor interação ocorreu em um meio de cultura gelificado com ágar e galactomanana de cássia, confirmando que a galactomanana menos substituída promove uma melhor interação com ágar do que a outra mais substituída (goma guar). Os parâmetros reológicos G' , G'' e η^* mostraram que as misturas do ágar com ambas as galactomananas são mais viscoelásticas que a amostra gelificada apenas com o polissacarídeo ágar (6 g/L); o caráter sólido das amostras decresce na

seguinte ordem: ágar (6 g/L, p/v) > ágar/cassia (3/3 g/L, p/v) > ágar/goma guar (3/3, g/L, p/v) (LUCYSZYN *et al.*, 2006).

2.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) APLICADA A ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS

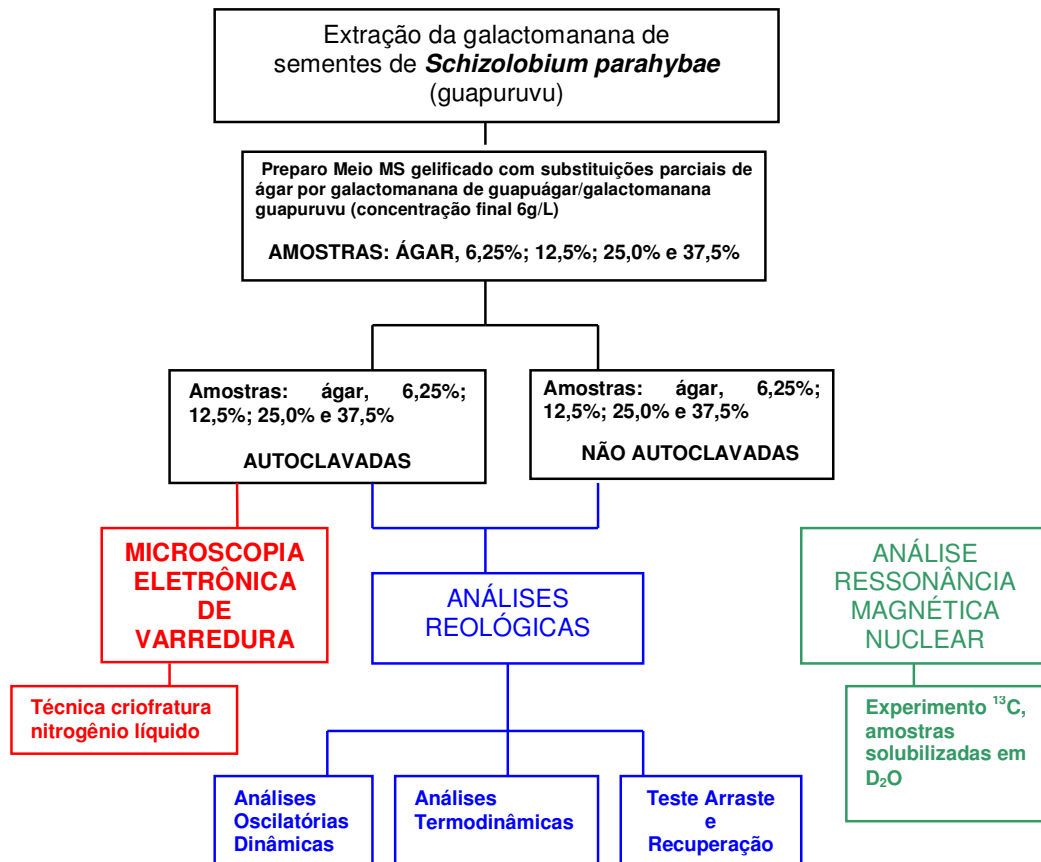
Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é um instrumento muito versátil e usado rotineiramente para a análise micro estrutural de materiais sólidos. Apesar da complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é uma imagem, em geral, de fácil interpretação (KALAB, 1993).

As imagens obtidas nas análises por MEV podem ser utilizadas juntamente com estudos reológicos de diversos polissacarídeos visando investigar a estrutura desses materiais (FLORENT GUILLOU *et al.*, 2009; FARAHNAKY *et al.*, 2010). Recentemente, a união desses dois métodos de análise vem sendo utilizada para estudar a microestrutura de misturas de polissacarídeos (DUNSTAN, 2001; MEDINA-TORRES, 2006; LOVEDEEP KAUR *et al.*, 2007; DONATO; KOLODZIEJCZYK; ROUVET, 2011; FAROUK *et al.*, 2010; THRIMAWITHANA *et al.*, 2010).

Hassan; Frank; Elsoda (2003) utilizaram a técnica de Crio-MEV para determinar a contribuição da adição de um exopolissacarídeo bacteriano na microestrutura de dois tipos de queijo (Karish e Feta).

O gel formado pelo polissacarídeo extraído de sementes de *Plantago ovata* Forsk (goma psyllium) foi caracterizado microscópica e reologicamente. Testes oscilatórios dinâmicos foram realizados em função da concentração (2, 2.5 e 3% v/v); temperatura (5–95 °C) e pH (2,5–10). Diante das condições de análises, as amostras apresentaram caráter de gel fraco com valores de G' maiores que G'' , e temperatura de fusão a aproximadamente 40 °C. A semelhança observada nos experimentos reológicos não foram confirmadas nas análises microscópicas, que mostraram diferenças no tamanho e na distribuição dos poros dos géis variando a concentração, temperatura e pH (FARAHNAKY *et al.*, 2010).

3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



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 seco a temperatura ambiente (23°C) por 48 horas, e moído em seguida. Após este procedimento, as sementes foram deslipidificadas com uma mistura tolueno:etanol (2:1, v/v), em aparelho extrator de Soxhlet). Em seguida foram submetidas à extração aquosa em agitador mecânico à 23°C por 1 hora. A mistura foi centrifugada duas vezes (10.000 rpm, 10 min) em centrífuga refrigerada HITACHI CR21E a 23°C. 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 à vácuo para secagem.

4.2 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA UTILIZADO PARA A MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DA MACIEIRA MAKUBAKAIDO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁGAR E GALACTOMANANA DE GUAPURUVU

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

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DO MEIO MURASHIGE & SKOOG- MS (1962).

Sais	Aditivos Orgânicos
NH ₄ NO ₃ (20,6 mg/l)	i-Inositol (100mg/l)
H ₃ BO ₃ (6,2 mg/l)	Niacina (0,5mg/l)
CaCl ₂ . 2H ₂ O (440 mg/l)	Piridoxina (0,5mg/l)
CoCl ₂ . 6H ₂ O (0,025 mg/l)	Tiamina (0,1 mg/l)
MgSO ₄ . 7H ₂ O (370 mg/l)	Glicina (recristalizado) (2,0mg/l)
CuSO ₄ . 5H ₂ O (0,025 mg/l)	Sacarose (30g/l)
KH ₂ PO ₄ (170 mg/l)	
FeSO ₄ . 7H ₂ O (27,8 mg/l)	
KNO ₃ (1,9 mg/l)	
KI (0,83 mg/l)	
Na ₂ MoO ₄ . 4H ₂ O (22,3 mg/l)	
ZnSO ₄ . 7H ₂ O (8,6 mg/l)	
Na ₂ EDTA . 2H ₂ O (37,2 mg/l)	

A galactomanana obtida de sementes de guapuruvu foi solubilizada em meio de cultura MS com concentração de 6g do polissacarídeo para cada 1L do meio (6g/L). A solução permaneceu sob agitação por 20 horas a temperatura ambiente (23 a 25°C). Foram preparadas quatro misturas binárias contendo respectivamente 6,25 %; 12,5%; 25,0% e 37,5% de galactomanana de guapuruvu (solução [6g/L]) sendo a concentração final de 6g/L de agente gelificante completada com ágar em pó (Ágar Sigma). Além destas misturas binárias preparou-se uma amostra contendo somente ágar (6g/L) – fração controle. A porcentagem de galactomanana adicionada aos meios foi determinada em estudos anteriores, sendo que a mistura binária galactomanana/ágar contendo 37,5% de galactomanana foi a porcentagem máxima possível que resultou em meio de cultura gelificado. (PEREIRA-NETTO *et al.*, 2012). O pH do meio de cultura resultante foi ajustado para 5,7-5,8 (condição ótima para micropropagação do porta-enxerto da macieira marubakaido) com KOH 1M. Em seguida, as amostras foram aquecidas em forno de microondas a 96°C e retiradas imediatamente após o meio de cultura entrar em ebulição (aproximadamente 1 minuto). As amostras nas diferentes concentrações foram divididas igualmente em dois frascos, sendo que um foi autoclavado a 121°C; 1,5 atm, por 1h15min (tempo total do ciclo de esterilização) e o outro permaneceu à temperatura ambiente (sem autoclavagem).

4.3 ANÁLISES REOLÓGICAS

4.3.1 Análises Oscilatórias Dinâmicas

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 á deformação (NAÉ, 1993).

O termo módulo de armazenamento ou elástico (G') indica que a energia da força aplicada que é temporariamente estocada durante o teste, está relacionada com a medida de elasticidade ou energia armazenada relativa ao caráter sólido do polímero analisado. O termo modulo 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^* (SCHRAMM, 2006).

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, garantindo que a amostra não seja deformada para o ponto em que a ligação interna temporária da molécula ou dos agregados seja destruída, e a maior parte da energia introduzida é irreversivelmente perdida como calor (FERRY, 1980).

A FIGURA 6A mostra o perfil típico de G' , G'' e η^* em função da freqüência para um gel de polissacarídeo. O módulo elástico é maior que o módulo viscoso durante a faixa de freqüência analisada, caracterizando uma resposta predominantemente semelhante a de um sólido. Quanto maior o valor de G' , maior é

o caráter sólido do gel e as deformações serão elásticas ou recuperáveis (RAO, 1992; WALTER, 1998). A viscosidade dinâmica complexa η^* diminui linearmente com aumento da frequência (MORRIS, 1995).

Na FIGURA 6B, 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 partir do qual G' é maior que G'' e há predomínio do caráter sólido (KAVANAGH; ROSS-MURPHY, 1998; MORRIS, 1983).

A FIGURA 6C 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). A viscosidade dinâmica complexa η^* apresenta um comportamento essencialmente linear com o aumento da frequência (MORRIS, 1983).

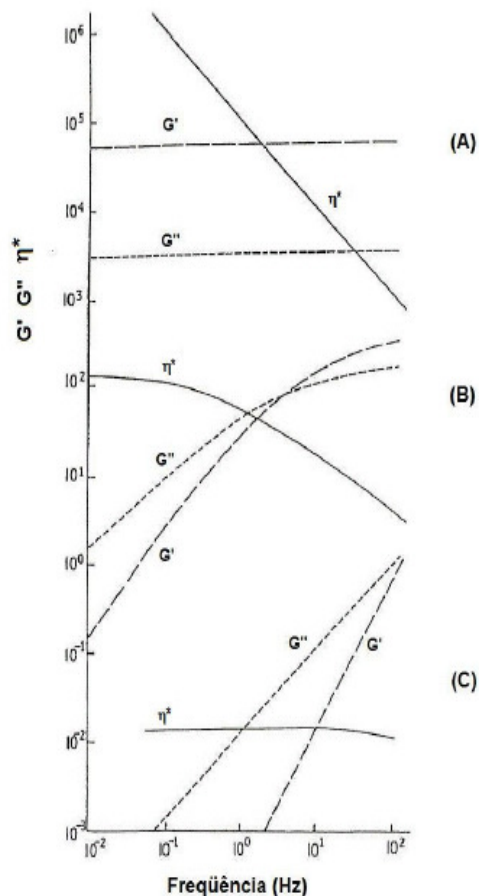


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE SISTEMAS POLISSACARÍDICOS TÍPICOS: (A) GEL FORTE; (B) SOLUÇÃO CONCENTRADA; (C) SOLUÇÃO DILUÍDA. ADAPTADO DE: MORRIS (1995).

As análises reológicas foram realizadas em reômetro MARS II acoplado a um banho termostaticado HAAKE K15 e termocirculador de água DC5B3, e a um controlador térmico TC 81 (Peltier), utilizando o sensor placa-placa P20TiL (gap=2 mm) (FIGURA 7). Previamente às análises reológicas, foi realizado a inércia do equipamento e do sensor para descontar os valores das forças centrífuga e centrípeta geradas durante os experimentos.

Para as análises reológicas foram utilizadas as amostras autoclavadas e não autoclavadas do meio de cultura contendo ágar (controle) e das misturas de ágar/galactomanana (6,25%; 12,5%; 25,0%; 37,5%), sendo a concentração final dos polissacarídeos de 6g/L.

Inicialmente procedeu-se uma varredura de tensão na frequência de 1Hz para avaliar a região viscoelástica linear (RVL) e seleção da tensão empregada nas

análises de varredura de frequência, rampas de temperatura e teste de arraste e recuperação. A RVL foi estabelecida para que não ocorram desvios dos modelos que descrevem o comportamento dos materiais, e para que a deformação causada não destrua as ligações internas temporárias de moléculas ou agregados, gerando perda de viscosidade e perda irreversível de parte da energia em forma de calor (MALKIN, 1994; SCHRAMM, 2006). Nesta região os módulos elástico (G') e viscoso (G'') permanecem constantes com a variação da deformação, indicando que não ocorreu perturbação significativa na estrutura do polímero. As varreduras de tensão foram feitas para o intervalo de 0,1 a 100 Pa a 1Hz.

As análises dinâmicas por varredura de frequência foram feitas a partir da determinação da região viscoelástica dos géis, sendo o valor escolhido 1Pa. As análises foram realizadas em modo CS variando a amplitude de 0,1 a 100 Hz a 20°C, gerando o espectro mecânico das amostras, onde foram determinados os valores dos módulos elástico (G'), viscoso (G'') e viscosidade complexa ($* \eta$) em função da frequência. Com estas informações foi possível caracterizar o perfil viscoelástico característico do sistemas formado (SCHRAMM, 2006). Todas as análises foram realizadas , pelo menos, em triplicatas.



FIGURA 7 - REÔMETRO MARS II.

4.3.2 Análises Dinâmicas Termomecânicas

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 10°C a 90°C e posterior resfriamento de 90°C a 10°C, com gradiente de 3°C/minuto e frequência a 1Hz. Os experimentos foram realizados na região viscoelástica linear.

Para essa análise utilizou-se o reômetro já citado, acoplado a um sistema de controle de temperatura Peltier (TC81).

4.3.3 Análises de Arraste e Recuperação

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).

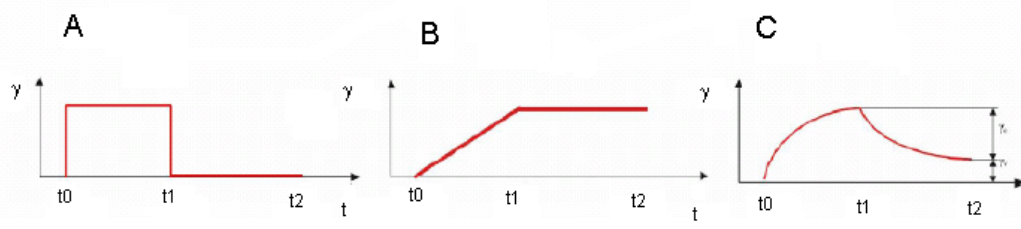


FIGURA 8- ARRASTE E RECUPERAÇÃO DE: A)CORPO ELÁSTICO, B) CORPO VISCOOSO E C) CORPO VISCOELÁSTICO. T0 = TEMPO INICIAL; T1= RETIRADA DA TENSÃO; T2= FINAL DA ANÁLISE.

FONTE: BRUMMER (2006).

A compliança (J) é uma propriedade do material semelhante à viscosidade η no fluxo contínuo, quanto mais alta for a compliança, mais facilmente o material é deformado, quando submetido a uma tensão constante aplicada (SCHRAMM, 2006). A curva típica de compliança de arraste e recuperação de um material viscoelástico (FIGURA 9) pode ser dividida em seis regiões principais:

A-B é a região de compliança instantânea J_0 , na qual as ligações entre as diferentes unidades estruturais são alongadas elasticamente. Nesta região, se a tensão é removida, a estrutura da amostra pode se recuperar completamente.

A região B-C corresponde à deformação elástica atrasada de compliança J_A , onde as ligações são quebradas e refeitas, mas nem todas estas ligações se rompem e se refazem na mesma razão.

C-D é a região linear da compliança Newtoniana J_N , em que as unidades estruturais deslizam umas sobre as outras devido à ruptura das ligações.

Quando a tensão é removida em D, a recuperação consiste em uma parte elástica instantânea D-E, e uma parte elástica atrasada E-F. Devido à quebra das ligações entre unidades estruturais ter ocorrido na região C-D, uma parte da estrutura não é recuperada em F-G.

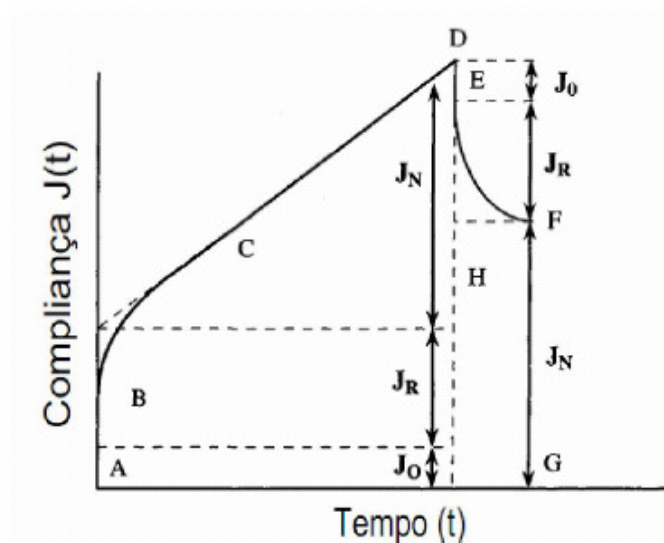


FIGURA 9 – CURVA DE COMPLIANÇA DE ARRASTE E RECUPERAÇÃO DE UM MATERIAL VISCOELÁSTICO EM FUNÇÃO DO TEMPO.
FONTE: RAO (1999).

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 a recuperação total, parcial ou nula da deformação em função do cancelamento da tensão aplicada, e a medida desta recuperação é observada durante um período de tempo que deve ser pré-estabelecido em cada experimento (SCHRAMM, 2006).

O teste é composto por duas etapas. Na primeira, denominada arraste, uma tensão de 3Pa é aplicada e os valores da deformação são mensurados por um período de 300s. Após este intervalo, numa segunda etapa, denominada recuperação, a tensão é removida e os valores da deformação são analisados por um período de 900s. A partir deste teste, é possível obter os valores da compliance, ela define o quão complacente é uma amostra. Quanto mais alta for a compliance, mais fácil será deformar uma amostra por uma tensão aplicada (SCHRAMM, 2006).

Os experimentos de arraste e recuperação foram realizados no modo CD. Todos os resultados das análises oscilatórias dinâmicas foram tratados com testes estatísticos de Tukey, $p=0,05$.

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

4.4.1 Preparação das amostras de géis para a microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras bastante hidratadas não podem ser observadas diretamente usando o MEV, fato que pode ser contornado utilizando-se a técnica de criofratura.

A Crio-microscopia eletrônica de varredura (Crio-MEV) fornece uma solução para muitos dos problemas associados ao MEV convencional (SARGENT, 1988). Nesta técnica, amostras são estabilizadas através de um congelamento rápido, resultando em amostras ainda hidratadas. Amostras preparadas para o Crio-MEV perdem água de uma forma controlada, por isso espera-se encontrar imagens mais representativas da estrutura de alguns componentes altamente hidratados, como os polissacarídeos, por exemplo (ECHLIN, 1992; SERP *et al.*, 2002a, b).

Durante o congelamento, a formação de gelo causa alterações físicas e químicas na amostra, sendo que, a taxa de formação e a forma do gelo dependem de dois fatores: a temperatura e o tempo de congelamento. Esse problema pode ser resolvido utilizando o nitrogênio para congelar amostras que serão crio-observadas, uma vez que a água não formará gelo cristalino, mas sim uma estrutura amorfa, denominada de gelo vítreo. Esta técnica provoca um dano mínimo à micro estrutura da amostra (FUJIKAWA; KURODA, 2000). No momento da análise das imagens no Crio-MEV a água da amostra passa do estado sólido para vapor (sublimação), permitindo a visualização adequada do material estudado.

As amostras foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura modelo JSM 6360LV (Jeol), pela técnica de criofratura (SERPE *et al.*, 2002 a, b).

Os géis autoclavados, contendo substituições de ágar por galactomanana e a amostra controle (ágar 6g/l) foram utilizadas para análises no MEV. Após a gelificação das amostras, retirou-se dos respectivos frascos os géis, com ajuda de bisturi e pinça, cubos de aproximadamente 8cm³ que foram transferidos para ependorfs de 2ml.

Para realização da técnica de criofratura as amostras devem ser fixadas com soluções de glicerol em tampão cacodilato nas concentrações 15%, 30% e 50%, por 15 minutos em cada solução. Em seguida, os géis foram congelados rapidamente

em nitrogênio líquido (-196 °C) e fraturados pela ação de uma força mecânica. Após a fratura as amostras foram novamente fixadas em concentrações progressivas de soluções de glicerol em tampão cacodilato (15%, 30% e 50%). Após este procedimento, as amostras foram desidratadas com etanol nas seguintes concentrações: 20%, 40%, 60%, 80% e 100%. Em cada solução etanólica as amostras permaneceram por 20 minutos.

Por fim, os géis foram levados ao CME (Centro de Microscopia Eletrônica) da Universidade Federal do Paraná para a determinação do ponto crítico – desidratação do material, pela troca do solvente etanol por CO₂ líquido. O passo seguinte à realização do ponto crítico é a metalização – deposição de uma camada de ouro na amostra para torná-la condutora de elétrons. Os suportes – peça metálica em formato cilíndrico onde são depositadas as amostras - foram guardados em dessecador no próprio CME até o momento da visualização. Estes experimentos foram realizados em colaboração com a Prof^a Célia Regina do Departamento de Biologia Celular, UFPR.

4.5 ANÁLISES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A galactomanana de guapuruvu, o ágar e as misturas ágar/galactomanana 12,5% e 37,5% foram analisados por RMN de carbono treze. As análises de RMN foram realizadas no espectrofotômetro BRUKER, modelo AVANCE DRX-400, incorporando transformador Fourier (FT), com ressonância de ¹³C, de 100 e 100MHz, respectivamente, utilizando a temperatura de 70°C para os polissacarídeos. A amostra foi dissolvida em D₂O a 70°C na concentração de 10 mg/ml. Os experimentos foram realizados utilizando tubo de 10 mm de diâmetro externo. Os deslocamentos foram expressos em ppm, utilizando a ressonância dos grupos CH₃ da acetona como padrão interno (¹³C, δ30.2).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO TREZE

As misturas de ágar e galactomanana nas proporções de 12,5% e 37,5% foram comparadas com os espectros dos polissacarídeos isolados: ágar e galactomanana de guapuruvu.

Diversos trabalhos na literatura apresentam a estrutura química de galactomananas obtidas de sementes de diferentes espécies a partir das análises de RMN. Os resultados obtidos por diferentes autores demonstram a similaridade nos deslocamentos químicos desses polissacarídeos. Dessa forma, a ressonância do carbono (^{13}C) pode ser atribuída baseada em dados reportados na literatura (GRASDALEN; PAINTER, 1980; PETKOWICZ *et al.*, 1998; JOSHI; KAPOOR, 2003; VIEIRA *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2009).

A galactomanana extraída do endosperma das sementes de guapuruvu foi analisada por espectroscopia de RMN ^{13}C . Na região anomérica, os sinais em δ 98,9 ppm e 100,1 ppm são referentes às unidades de α -D-galactopiranosose e β -D-manopiranosose para campo mais baixo, dos carbonos substituídos e não substituídos (entre δ 68 – 80) e regiões do C-6 da Gal (δ 61,3) e da Man substituídos (δ 66,7) e não substituídos (δ 60,7) para campo mais alto (GANTER *et al.*, 1993; GANTER *et al.*, 1995) (FIGURA 10).

As amostras ágar, 12,5% e 37,5% foram analisadas por espectrometria de RMN ^{13}C . O espectro de RMN ^{13}C da amostra de ágar realizada neste trabalho é semelhante ao apresentado por Rodríguez *et al.* (2008) para uma amostra de uma agarose extraída de *Gracilaria gracilis*, uma espécie da família Rhodophyta, confirmando que a fração é também constituída por este tipo de molécula.

Na região anomérica observa-se a presença de dois sinais, um em 101,9 ppm, referente ao C-1 de unidades (1 \rightarrow 3)- β -D-galactopiranosil (G) e outro em 97,8 ppm referente ao C-1 de unidades (1 \rightarrow 4)- 3,6-anidro- α -L-galactopiranosil (LA); nomenclatura proposta por Knustsen (1994). Os sinais em 60,7 ppm e 68,9 ppm referem-se aos C-6 das unidades G e LA, respectivamente. Os deslocamentos em

70,7, 82,7, 69,2 e 75,8 ppm referem-se, respectivamente, aos carbonos 2, 3, 4 e 5 das unidades G. Para as unidades LA os sinais 69,5, 79,6, 76,9 e 75,1 ppm correspondem aos carbonos 2, 3, 4 e 5 (FIGURA 10).

Exceto o sinal referente ao C-6 da unidade G, visualizado apenas em 37,5%, todos os outros deslocamentos foram observados nas amostras que continham o gelificante ágar.

A partir da comparação dos espectros da amostra ágar com os espectros dos géis binários de ágar/galactomanana 12,5% e 37,5% observou-se que não ocorreu alargamento e deslocamento dos sinais, referentes às unidades de agarose, à medida que galactomanana foi adicionada ao sistema.

TURQUOIS *et al.* (1993) estudou o modo de interação do gel binário de ágar e galactomanana de alfarroba por meio de análises de RMN ^{13}C . Os experimentos foram realizados a 25 °C e 80 °C. Os espectros obtidos na temperatura de 80 °C permitiram a visualização de todos os sinais dos polissacarídeos ágar e galactomanana. Na análise a 25 °C relatou o desaparecimento de todos os picos da agarose, diminuição na intensidade dos picos referentes à galactomanana e deslocamento de alguns sinais. Levando em conta, a razão Man/Gal e a proporção de decréscimo na intensidade dos picos, segundo o autor, partes da cadeia de galactomanana com menor razão Man/Gal foram influenciadas pela adição de agarose, enquanto que partes mais substituída por unidades de manose ~ 3,0 não sofreram influência das moléculas de agarose.

Sendo assim, os espectros obtidos neste trabalho estão em consonância com o trabalho de Turquois *et al.* (1993) para os espectros analisados a 80 °C, visto que, as variáveis, temperatura e razão Man/Gal, que não influenciaram no deslocamento e na intensidade dos sinais, foram semelhantes às utilizadas neste trabalho, quais sejam: temperatura da análise 70 °C e razão Man/Gal da galactomanana de *Schizolobium parahybae* (guapuruvu) 3:1 (GANTER *et al.*, 1993; GANTER *et al.*, 1995).

Os espectros dos géis binários 12,5% e 37,5% apresentaram sinais referentes aos polissacarídeos ágar e galactomanana. Na amostra 12,5% a resolução do espectro permitiu a visualização de alguns picos atribuídos às unidades de galactomanana, no entanto, foi na amostra 37,5%, com a maior proporção de galactomanana que a presença desse polissacarídeo pode ser visualizada (FIGURA 10).

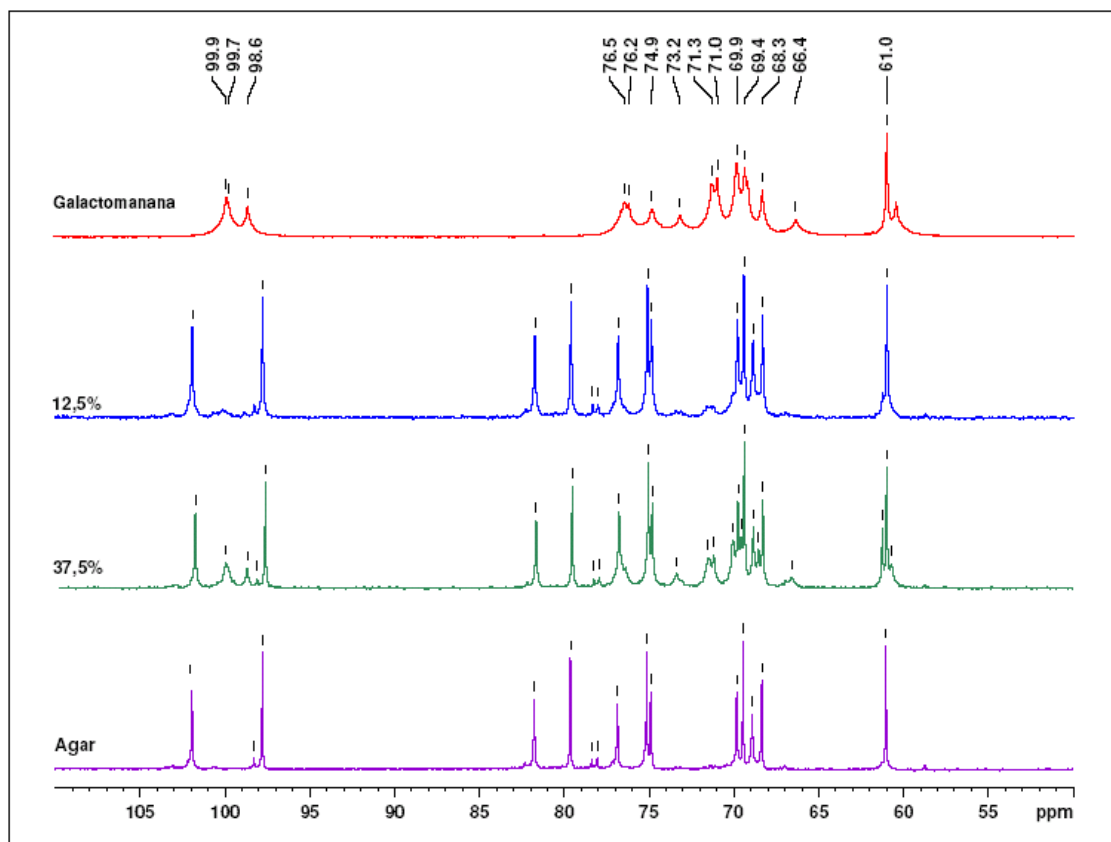


FIGURA 10 – ESPECTRO DE RMN DO CARBONO TREZE (^{13}C) COM AS ATRIBUIÇÕES PARA OS CARBONOS DAS UNIDADES DE β -D-GALACTOPIRANOSIL E 3,6-ANIDRO- α -L-GALACTOPIRANOSIL DAS AMOSTRAS ÁGAR, 12,5% E 37,5%; E UNIDADES DE β -D-MANOPIRANOSE (MAN) E α -D-GALACTOPIRANOSE (GAL) DA GALACTOMANANA DE *S. parahybae* ANÁLISE EM 100 MHZ DE FREQUÊNCIA, EM D_2O , A 70 °C. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm (δ).

Na tabela 2 estão descritas as atribuições de sinais para os carbonos das unidades estruturais do ágar, β -D-galactopiranosil e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosil e da galactomanana de guapuruvu, α -D-galactopiranoose e β -D-manopiranoose. Os mesmos sinais para as unidades dos polissacarídeos ágar e galactomanana foram observados nos géis 12,5% e 37,5%.

TABELA 2 - ATRIBUIÇÕES DE SINAIS DAS ANÁLISES DE RMN DE CARBONO (RMN ^{13}C) DAS AMOSTRAS ÁGAR, 12,5% E 37,5% DA GALACTOMANANA DE *S. parahybae*.

Unidade estrutural	Deslocamentos químicos
β-D-galactopiranosil	
C-1	101.9
C-2	69.8
C-3	81.8
C-4	68.4
C-5	74.9
C-6	60.7
3,6-anidro-α-L-galactopiranosil	
C-1	97.8
C-2	69.5
C-3	79.6
C-4	76.9
C-5	75.1
C-6	68.9
α-D-Galactopiranose	
C-1	98,9
C-2	68,6
C-3	69,6
C-4	69,5
C-5	71,3
C-6	61,3
β-D-Manopiranose	
C-1	100,1 (continua)
C-2	(70,1)*
C-3	71,6
C-4	76,5 (76,7) *
C-5	75,1 (73,5) *
C-6	60,7 (66,7) *

Leg.: * deslocamentos (δ) dos carbonos em parênteses pertencentes às unidades β -D-Man substituídas por α -D-Gal

5.2 ANÁLISES REOLÓGICAS

5.2.1 Análises Oscilatórias Dinâmicas

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 cultura MS gelificados por estes polissacarídeos. Para isso, analisaram-se diferentes percentagens de cada polímero nas misturas, conforme demonstrado na Tabela 3.

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

TABELA 3. VALORES DE CONCENTRAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA DE ÁGAR E GALACTOMANANA PARA ANÁLISES REOLÓGICAS.

Concentração de Ágar (%)	Concentração de Galactomanana (%)
100	0
93,75	6,25
87,5	12,5
75,0	25,0
62,5	37,5

Para as varreduras de tensão foram realizados ensaios com diferentes frequências (1Hz, 2Hz e 3Hz) porque a região de viscoelasticidade linear (RVL) é dependente da frequência, sendo, os melhores resultados, ou seja, aqueles com maior reprodutibilidade, encontrados a frequência fixa de 1Hz. Esta análise foi realizada no intervalo de 0,1 a 100 Pa.

Os valores de deformação utilizados em análises reológicas de polissacarídeos normalmente variam de 1 a 10% (BHATTACHARYA, 1999; CHRONAKIS; KASAPIS; RICHARDSON, 1996; COURRAZE; GROSSIORDI, 1991). A deformação empregada nas varreduras de frequência deste estudo foi de 1Pa. A FIGURA 11 ilustra o perfil obtido para as amostras que não foram autoclavadas e dos géis autoclavados.

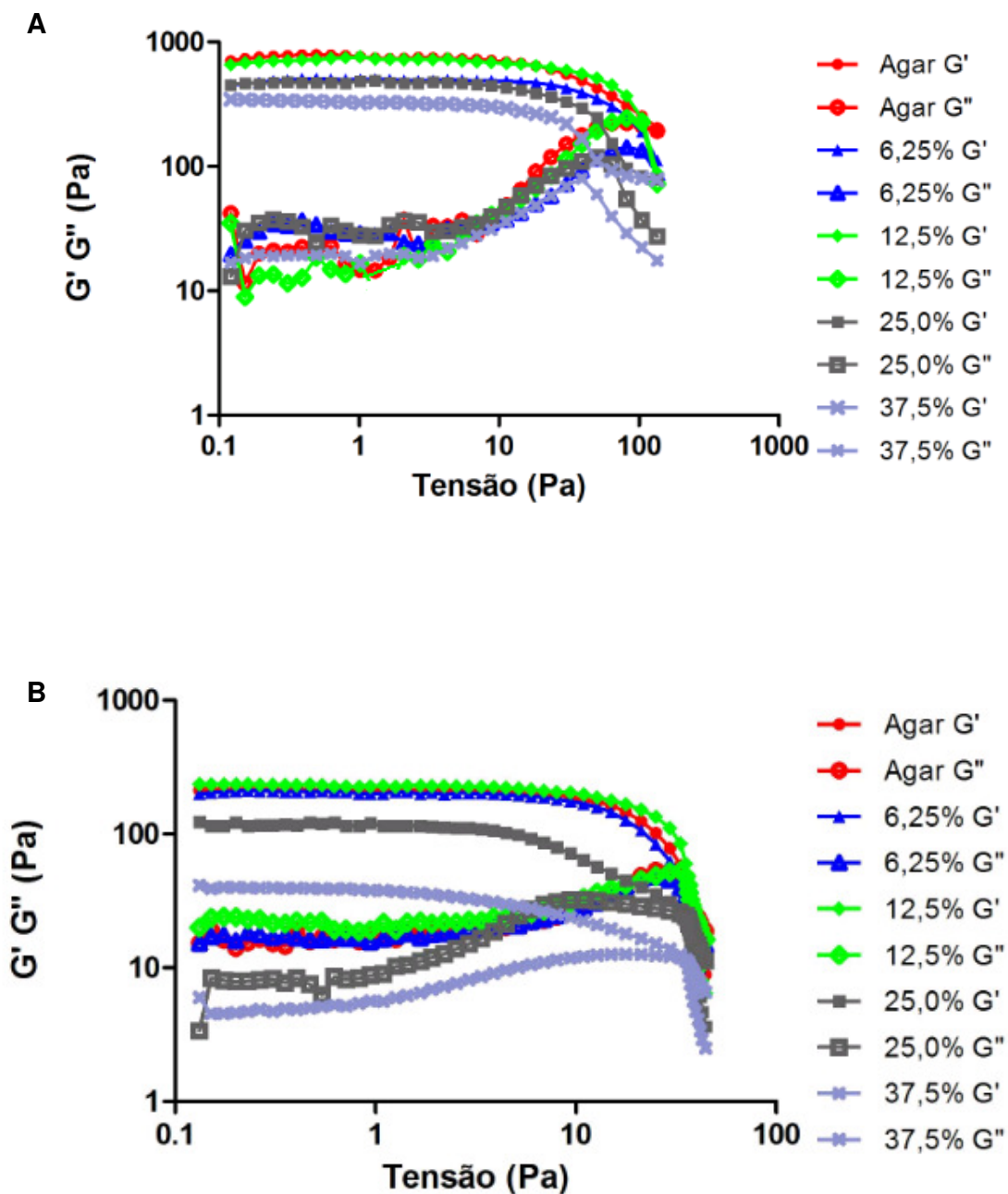


FIGURA 11 – VARREDURA DE TENSÃO EXECUTADA EM MODO CS DE 0.1 – 100 PA, 1,00 HZ, A 20°C, PARA AS AMOSTRAS: A) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5% QUE NÃO FORAM AUTOCLAVADAS E AS AMOSTRAS B) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5% AUTOCLAVADAS A 121°C POR 1H E 15 MIN.

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 100 Hz, com tensão aplicada de 1Pa para todas as amostras. Dessa forma, a RVL foi estabelecida para que não ocorram desvios dos modelos que descrevem o comportamento dos materiais, e para que a deformação causada não destrua as ligações internas temporárias de moléculas ou agregados, gerando perda de viscosidade e perda irreversível de parte da energia em forma de calor (MALKIN, 1994; SCHRAMM, 2006), o que poderia resultar em análises não representativas da estrutura real dos géis, durante os testes oscilatórios.

As varreduras de frequência dos géis autoclavados e não autoclavados mostram que os géis apresentam um comportamento típico de um gel. Para todas as amostras analisadas observou-se o predomínio do caráter sólido $G' > G''$, em média na ordem de 10 vezes, perfil característico de um gel rígido. Estes espectros mecânicos fornecem evidências experimentais de que a mobilidade da cadeia global de moléculas dentro da rede dos géis é muito baixa, ou seja, ocorre a formação de uma rede tridimensional (NORZIAH *et al.*, 2006).

Foi evidenciado, no entanto, para todos os sistemas analisados, uma variação no comportamento dos parâmetros reológicos G' e G'' . A partir de determinado momento, os módulos tornaram-se dependentes da frequência. Na faixa de frequência de 0,1 a 4 Hz os géis mostraram caráter de gel forte, porém acima de 4 Hz esse comportamento passa a ser perturbado, mostrando que as estruturas dos géis podem estar sendo modificadas (FIGURA 12).

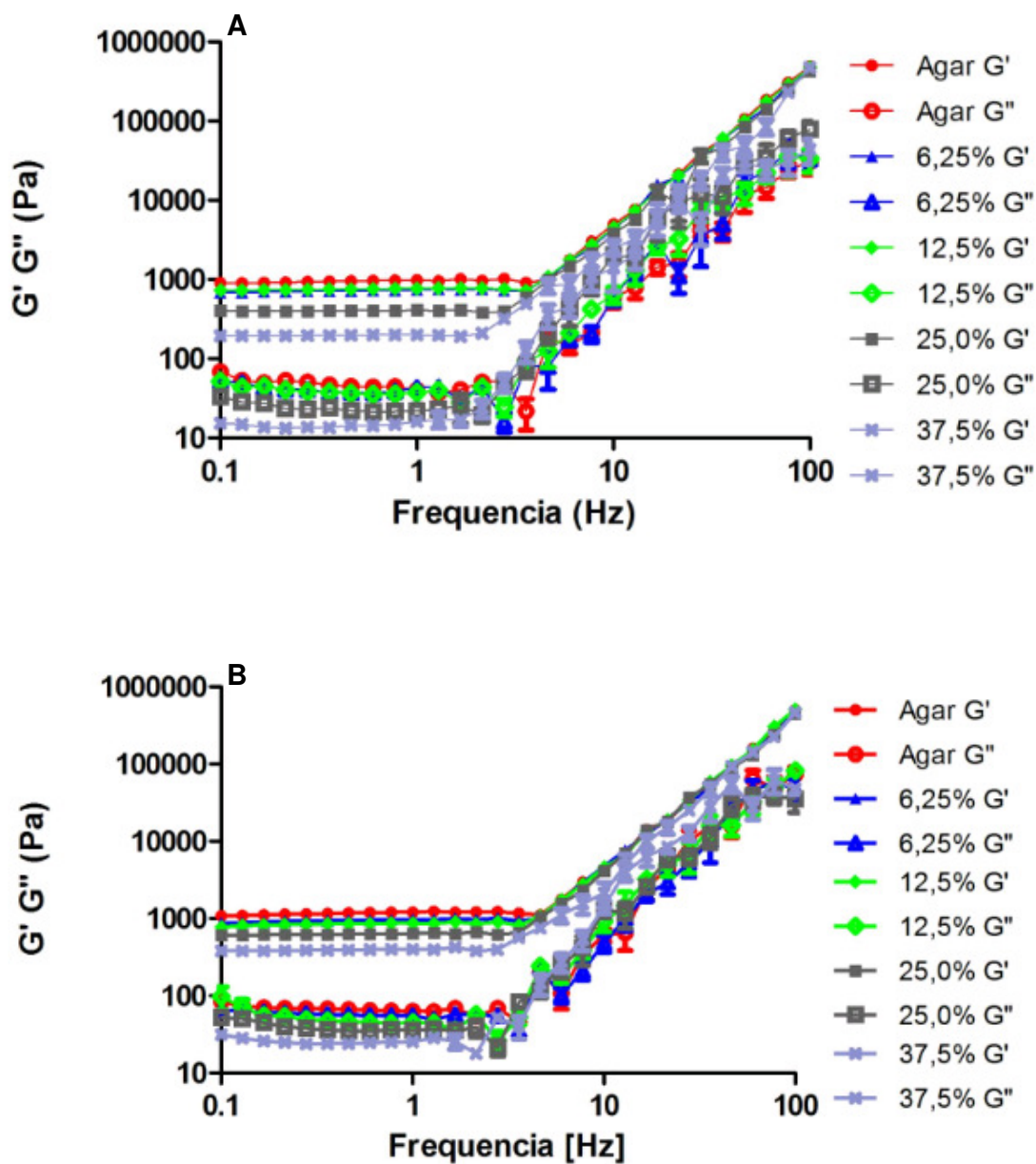


FIGURA 12 – VARREDURA DE FREQUÊNCIA EXECUTADA EM MODO CS DE 0,01 – 100,00 Hz, 1,00 Pa, A 20°C, PARA AS AMOSTRAS: A) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 375% QUE NÃO FORAM AUTOCLAVADAS E AS AMOSTRAS B) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 375% AUTOCLAVADAS A 121°C POR 1H E 15 MIN.

Algumas informações importantes devem ser ressaltadas, à medida que, os parâmetros reológicos são divergentes quanto ao processo de esterilização das amostras e também quanto à adição de galactomanana ao sistema.

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). Neste trabalho o processo de autoclavagem influenciou nas propriedades reológicas dos meios gelificados com diferentes proporções de ágar e galactomanana.

De acordo com os valores apresentados na Tabela 4 pode-se observar que os valores de G' , G'' e η^* são maiores para as amostras autoclavadas do que para as que não passaram por este processo. Testes estatísticos apontaram que o processo de autoclavagem aumentou, significativamente ($p < 0,05$), os valores de G' para todos os géis.

TABELA 4 - MÉDIA DOS VALORES DE G' , G'' E η^* OBTIDOS A 1HZ PARA AS AMOSTRAS PARCIALMENTE SUBSTITUÍDAS POR GALACTOMANANA (6,25; 12,5; 25,0 E 37,5%) E AMOSTRA CONTENDO SOMENTE ÁGAR (AUTOCLAVADAS E NÃO AUTOCLAVADAS).

		Valor Médio de G' , G'' e η^* a 1Hz				
		Ágar	6,25%	12,5%	25,0%	37,5%
G' (Pa)	Não	982,53 ±	745,74 ±	746,06 ±	412,62 ±	199,58 ±
	Autoclavadas	33,3	23,14	31,95	28,08	24,21
	Autoclavadas	1206,66 ± 31,96	990,02 ± 32,18	866,30 ± 17,95	642,72 ± 27,77	400,61 ± 17,96
G'' (Pa)	Não	40,03 ±	34,38 ±	35,12 ±	20,90 ±	17,67 ±
	Autoclavadas	5,54	4,14	5,88	4,26	3,84
	Autoclavadas	63,55 ± 6,91	55,73 ± 5,21	47,18 ± 5,16	35,82 ± 6,91	29,15 ± 2,85
η^* (hPa.s)	Não	1,56 ±	1,21 ±	1,01 ±	0,54 ±	0,33 ±
	Autoclavadas	0,082	0,077	0,098	0,010	0,041
	Autoclavadas	1,88 ± 0,020	1,61 ± 0,006	1,34 ± 0,039	0,85 ± 0,023	0,66 ± 0,068

A menor diferença foi encontrada para o meio 12,5% (746,06 para 866,30 Pa) e, a maior diferença no módulo G' esteve no gel 6,25% (745,74 para 990,02 Pa). É possível que o aumento da energia cinética do sistema, devido ao aumento da temperatura (120 °C) e da pressão, tenha favorecido as interações moleculares

(especialmente as interações hidrofóbicas) das cadeias dos polissacarídeos ágar e galactomanana, o que resultou em géis com redes tridimensionais mais estruturadas e, conseqüentemente, maiores valores de G' .

Resultados semelhantes foram encontrados em um sistema de proteínas do trigo, no qual, após o processo de autoclavagem maiores valores de G' foram observados. Segundo os autores, a essa condição de temperatura e pressão algumas interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto e ligações eletrostáticas, entre as cadeias das proteínas são favorecidas pelo aumento da energia cinética do sistema (COMFORT; HOWELL, 2003).

Por outro lado, existem sistemas em que o processo de esterilização foi responsável por uma diminuição no caráter sólido da amostra testada. A autoclavagem de uma solução de quitosana a 2% (p/v.), por apenas 10 minutos, resultou em um decréscimo de 30% no peso molecular, diminuição da viscosidade dinâmica, e numa substancial diminuição das propriedades mecânicas do gel (JARRY, 2001).

Em alguns casos, não foram observadas mudanças nos parâmetros reológicos das amostras após a autoclavagem. Bindal *et al.*, (2003) observou a influência do processo de autoclavagem para a goma guar 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.

Andriola e colaboradores (2009) estudaram o efeito de diferentes métodos de esterilização nas propriedades termo-mecânicas do hidrogel de xiloglucana de *Tamarindus indica* após degalactosilização. 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.

Sendo assim, não é possível determinar previamente a influência da esterilização nos diferentes sistemas. Neste trabalho, considera-se que o processo de autoclavagem teve uma influência positiva nos meios de cultura, pois não causou a redução dos valores de G' , que na prática estão relacionados com a dureza de um gel.

O principal questionamento deste trabalho foi o efeito, da substituição de ágar por galactomanana de guapuruvu nos parâmetros reológicos dos meios de cultura.

Os resultados dos testes oscilatórios mostraram que a substituição parcial do ágar pela galactomanana causou um decréscimo proporcional nos valores de G' e G'' . Os maiores valores de G' (1206,66 Pa a 1Hz) foram encontrados para a amostra de meio autoclavado contendo somente ágar (TABELA 4 pág. 55). Esse comportamento foi observado em misturas de ágar e κ -carragenana, visto que o maior valor de G' correspondia ao meio gelificado apenas com ágar e à medida que maiores concentrações de κ -carragenana eram adicionadas ao sistema menores valores de G' foram obtidos (NORZIAH *et al.*, 2006). Resultados semelhantes, também, foram observados na mistura formada por ágar e galactomanana de goma guar (LUCYSZYN *et al.*, 2006).

A FIGURA 13A ilustra a média dos valores de G' a 1Hz para as amostras que não foram autoclavadas. Segundo os dados apresentados na figura, a amostra ágar possui os maiores valores de G' (982,53Pa), seguido pelas misturas ágar/galactomanana, cujos valores do módulo elástico decaem, proporcionalmente, ao acréscimo de galactomanana no meio. As amostras 6,25% (745,74Pa) e 12,5% (746,06Pa) não apresentaram diferenças significativas entre elas, provavelmente, porque nessas condições de gelificação (sem autoclavagem) a diferença na concentração de galactomanana não seja suficiente para causar modificações na estrutura dos géis.

Uma diferença observada nos meios autoclavados, além do aumento nos valores de G' , diz respeito à mudança no perfil das amostras 6,25% e 12,5%, que passaram a ter valores de G' significativamente diferentes, 990,02 Pa e 866,30 Pa, respectivamente (FIGURA 13B). Estes resultados sugerem que a adição de galactomanana ao sistema deve interferir na interação entre as cadeias de ágar, proporcionando um afrouxamento na malha tridimensional, do gel que é mais bem visualizado em condições de alta energia (autoclave).

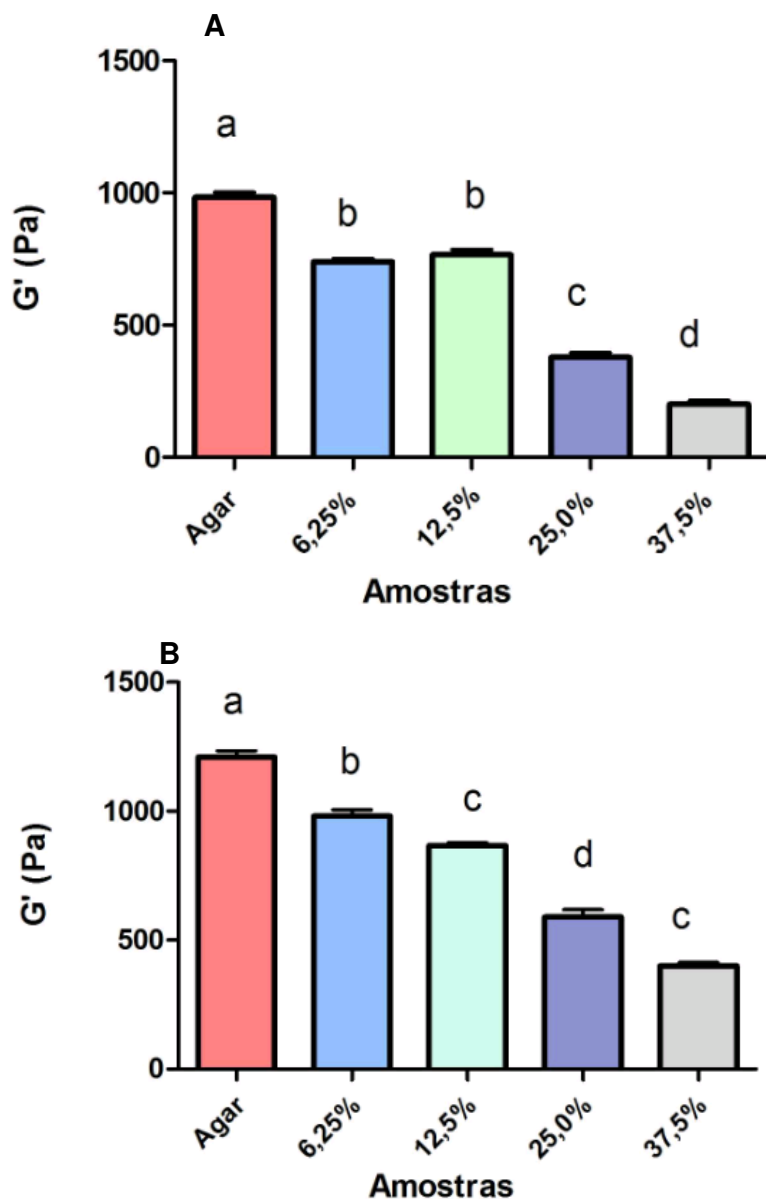


FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO DA MÉDIA DOS VALORES DOS MÓDULOS ELÁSTICOS (G') A 1Hz PARA AMOSTRAS: A) NÃO AUTOCLAVADAS E B) AUTOCLAVADAS A 121°C POR 1H E 15MINUTOS. AS LETRAS IGUAIS, DE ACORDO COM TESTE DE TUKEY, INDICAM AMOSTRAS QUE NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE ($P=0,05$). AS BARRAS VERTICAIS MOSTRAM O ERRO PADRÃO.

Tanto nas amostras não autoclavadas (FIGURA 13A) quanto nas autoclavadas (FIGURA 13B) a presença de galactomanana no sistema em diferentes concentrações, resultou em uma menor rigidez dos géis (menores valores de G'). Este fato fica evidente quando as análises referentes às amostras ágar e 37,5% são confrontadas, pois nas amostras que não foram esterilizadas houve uma

redução de 782,95 Pa nos valores de G' e quando foram autoclavadas um decréscimo de 806,05 Pa.

Na literatura, a teoria mais aceita diz que o aumento de G' resulta da existência de uma rede interpenetrante, na qual as cadeias de dois polímeros se associam formando uma única fase no gel (PICULELLI; NILSSON; MUHRDECK, 1992; NISHINARI *et al.*, 1996). Sabe-se que, pequenas diferenças na estrutura química dos polissacarídeos pode levar a incompatibilidade mútua, ou seja, a não interação entre as cadeias que, geralmente, causa a separação de fases (GARNIER; SCHORSCH; DOUBLIER, 1995).

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que ocorreu uma separação de fases na rede dos géis, ou seja, não ocorreu uma interação sinérgica entre as cadeias dos polissacarídeos ágar e galactomanana de guapuruvu, pois menores valores de G' foram encontrados nos meios de cultura gelificados com substituições por galactomanana de guapuruvu. Resultados similares, a este, foram reportados para os sistemas κ -carragenana/ gelana e ι -carragenana/ gelana (NISHINARI *et al.*, 1996; RODRIGUEZ; TECANTE, 1999).

5.2.2 Análises de Arraste e Recuperação

O efeito da substituição parcial do ágar por galactomanana de *S. parahybae* nas amostras ágar/ galactomanana foi, também, determinado por meio do teste de arraste e recuperação. Entre outras vantagens, essa análise não causa perturbações significativas na estrutura interna do sistema e ainda, pode ser realizada juntamente com outras análises oscilatórias, que permitirão obter informações sobre a estrutura interna da amostra estudada (DOLZ; HERNÁNDEZ; DELEJIDO, 2008).

Para todas as análises a tensão escolhida foi de 3Pa - após análises nas tensões de 1, 2 e 3 Pa - nesta tensão as curvas de compliança mostraram-se semelhantes, indicando que a estrutura não estava sendo comprometida. Durante 300s este valor de tensão foi aplicado na amostra, que reage com um determinado valor de deformação. Após esse tempo, a tensão foi retirada e verificou-se a

capacidade do material de voltar para sua estrutura original, ou seja, seu caráter elástico (SCHRAMM, 2006).

A adição de galactomanana ao sistema e o processo de autoclavagem alteraram o comportamento viscoelástico das amostras analisadas (FIGURA 14 A e B).

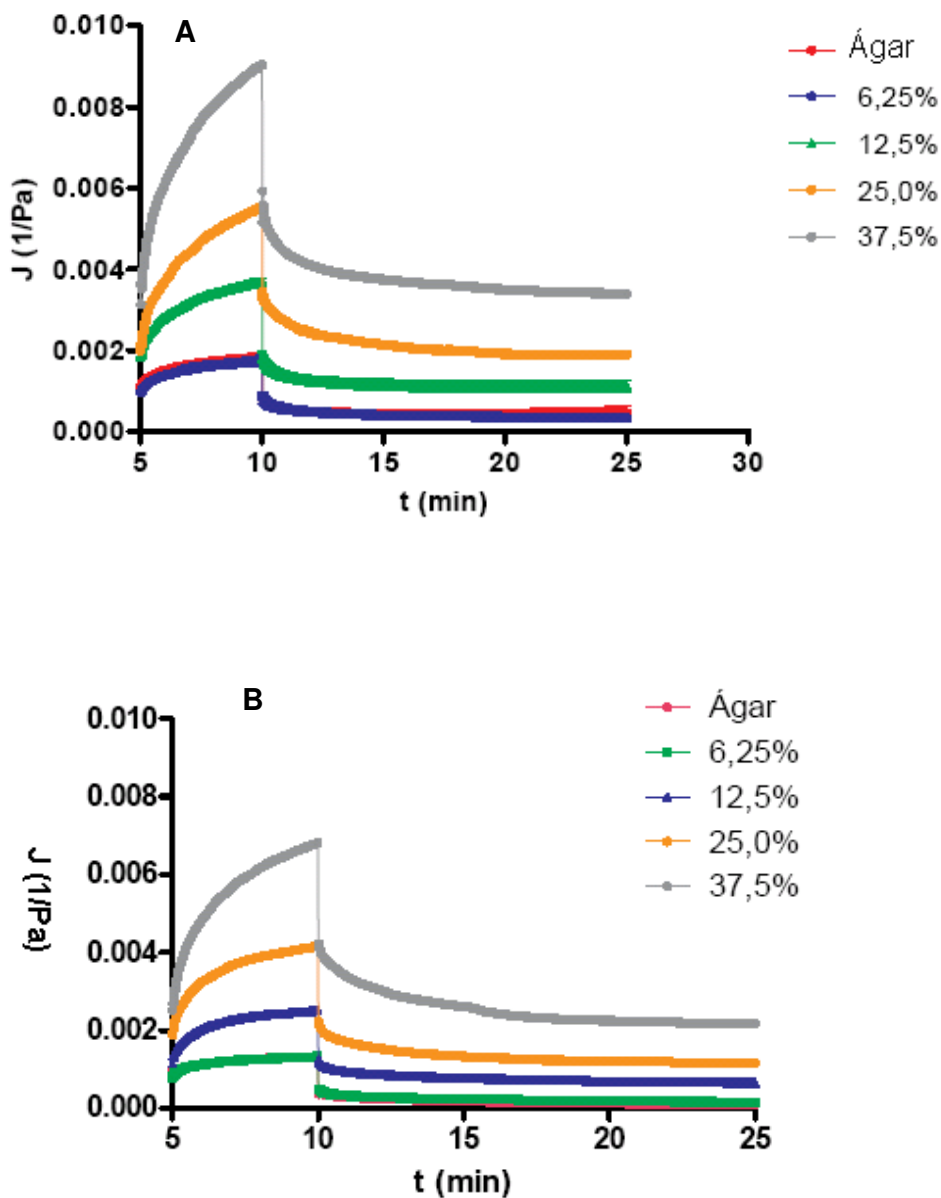


FIGURA 14 - TESTE DE ARRASTE E RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS: A) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5% QUE NÃO FORAM AUTOCLAVADAS E DAS AMOSTRAS B) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5% AUTOCLAVADAS A 121 °C POR 1H E 15 MIN.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores da compliança no instante zero (J_0), os valores do módulo elástico no tempo zero (G_0) e a recuperação exibida em cada amostra. A recuperação foi determinada pela relação J_r/J_{max} . (1/cPa).

TABELA 5 - VALORES DE J_0 , G_0 E $J_r/J_{MÁX}$. PARA AS AMOSTRAS PARCIALMENTE SUBSTITUÍDAS POR GALACTOMANANA (6,25; 12,5; 25,0 E 37,5%) E AMOSTRA CONTENDO SOMENTE ÁGAR (CONTROLE) (AUTOCLAVADAS E NÃO AUTOCLAVADAS).

	Amostras não autoclavadas			Amostras autoclavadas		
	J_0 (1/cPa)	J_r/J_{max} . (1/Pa)	G_0 (Pa)	J_0 (1/cPa)	J_r/J_{max} . (1/cPa)	G_0 (Pa)
Ágar	0,155 ± 0,007	75,89 ± 12,20	633,0 ± 7,35	0,125 ± 0,003	93,14 ± 9,07	805,4 ± 17,21
6,25%	0,213 ± 0,006	75,03 ± 10,82	466,5 ± 19,57	0,124 ± 0,006	91,56 ± 3,76	804,6 ± 37,48
12,5%	0,317 ± 0,006	72,75 ± 5,81	321,6 ± 10,45	0,216 ± 0,001	68,62 ± 5,28	462,6 ± 20,55
25,0%	0,420 ± 0,03	61,32 ± 5,68	240,05 ± 16,15	0,356 ± 0,014	75,51 ± 2,17	270,5 ± 18,39
37,5%	0,725 ± 0,015	68,63 ± 6,18	137,05 ± 3,35	0,437 ± 0,005	63,715 ± 6,47	228,55 ± 2,76

Legenda: O período de arraste foi de 300s sob tensão de 3Pa, e a recuperação (J_r/J_{max} .) em período de 1500s sob tensão nula e valores de G_0 que representa o módulo elástico no tempo $t=0$.

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 os menores valores de J foram encontrados nos meios gelificados apenas com ágar e no meio 6,25%, que apresentaram valores de J_0 muito similares, $0,155 \text{ cPa}^{-1}$ e $0,213 \text{ cPa}^{-1}$, respectivamente. Esses géis também apresentaram os maiores valores de recuperação $J_r/J_{máx} = 75,89\%$ e $75,03\%$ e o maior valor para o módulo elástico no tempo zero, $G_0 = 633,0 \text{ Pa}$ e $466,5 \text{ Pa}$, para os meios ágar e 6,25%, respectivamente (TABELA 5).

A adição de 37,5% de galactomanana ao sistema causou uma diminuição significativa na resistência à deformação, apresentando os maiores valores de J_0 $0,725 \text{ cPa}^{-1}$ e o menor valor para G_0 $137,05 \text{ Pa}$. 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.

De acordo com o teste de arraste e recuperação, as amostras autoclavadas ágar e 6,25% apresentam os menores valores de J_0 , $0,125 \text{ cPa}^{-1}$ e $0,124 \text{ cPa}^{-1}$, respectivamente. Assim como os meios não autoclavados, estas amostras possuem os maiores valores de G_0 e de recuperação $J_r/J_{m\acute{a}x}$. Estes dados mostram que a substituição por galactomanana na concentração de 6,25% não influenciou na complacência desse gel, ou seja, não teve efeito sobre a resistência do sistema quando este é submetido a uma determinada tensão, sugerindo uma estrutura interna bastante similar desta amostra e do meio ágar (DOLZ; HERNÁNDEZ; DELEJIDO, 2008).

O mesmo comportamento observado para as amostras não autoclavadas foi evidenciado nos meios autoclavados, ou seja, conforme o ágar é substituído por concentrações maiores de galactomanana, maiores são os valores de J_0 , e menores os valores de $J_r/J_{m\acute{a}x}$ e G_0 . Essa tendência é observada, igualmente, nas varreduras de frequência (TABELA 4), em que, os maiores valores de G' , módulo relacionado ao caráter sólido de um material, foram observados nos géis com as menores proporções de galactomanana.

Portanto, comparando a resposta elástica e viscosa dos materiais pode-se concluir que os géis mais elásticos, ou seja, aqueles com maiores valores de $J_r/J_{m\acute{a}x}$, são: ágar e 6,25%. Além disso, à medida que maiores concentrações de galactomanana são adicionadas ao sistema, os géis tornam-se cada vez mais viscoelásticos ($J_r/J_{m\acute{a}x}$ menores e J_0 maiores). Sendo assim, não é possível afirmar que a mistura de ágar com galactomanana de guapuruvu exibiram efeito sinérgico, pois os valores de compliança são maiores para os géis binários do que para o meio ágar.

Na mistura entre xantana e glucomanana o efeito de sinergia foi observado, pela redução da compliança da mistura binária quando comparada aos valores das complianças das soluções contendo os polissacarídeos isolados (FITZSIMONS; TOBIN; MORRIS, 2008).

5.2.3 Análises Dinâmicas Termomecânicas

Com a finalidade de observar o efeito da temperatura sob o processo de gelificação do sistema foi realizado o estudo da influência do aquecimento e resfriamento nos valores de G' e G'' para a mistura ágar/galactomanana autoclavadas e não autoclavadas. A faixa de variação de temperatura foi de 10 °C a 90 °C com velocidade de 3 °C/min., com a medida de frequência fixa de 1 Hz e tensão de cisalhamento fixa de 1 Pa. A variação dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') foi observada durante o aquecimento para 90 °C e posterior resfriamento para 10°C.

Durante o aquecimento, ambos os módulos G' e G'' decaem discretamente até aproximadamente 70 °C (FIGURA 15), para todos os sistemas autoclavados ou não autoclavados, e entre 70 °C e 90 °C observa-se uma queda proeminente para os valores de G' . Esta queda proeminente a partir de 70°C, especialmente nos valores de G' foi encontrada para misturas de κ -carragenana/goma alfarroba (LUNDIN; HERMANSSON, 1997), κ -carragenana/konjac glucomanana (KOHYAMA; IIDA; NISHINARI, 1993), ágar/ κ -carragenana (NORZIAH *et al.*, 2006) e ágar/galactomanana de *Ceratonia siliqua* (OLHERO *et al.*, 2000).

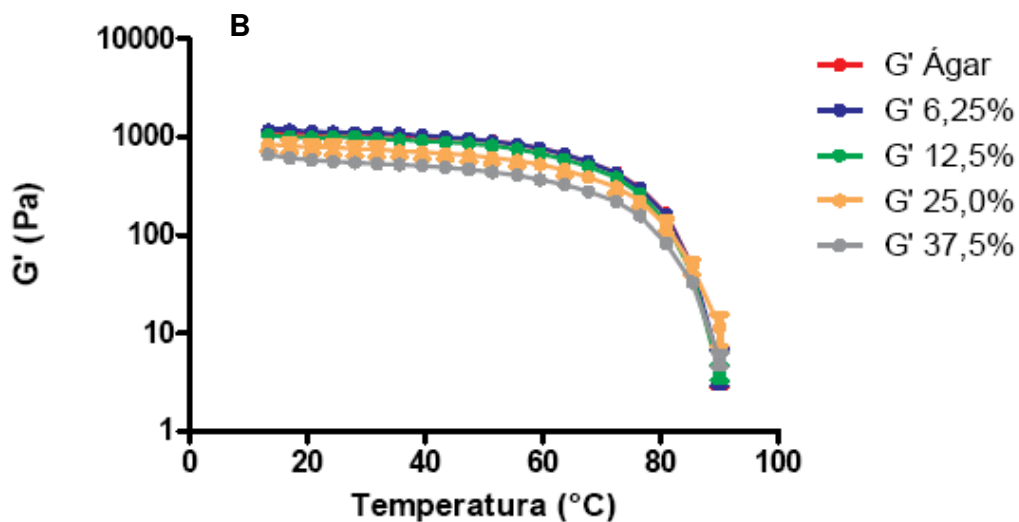
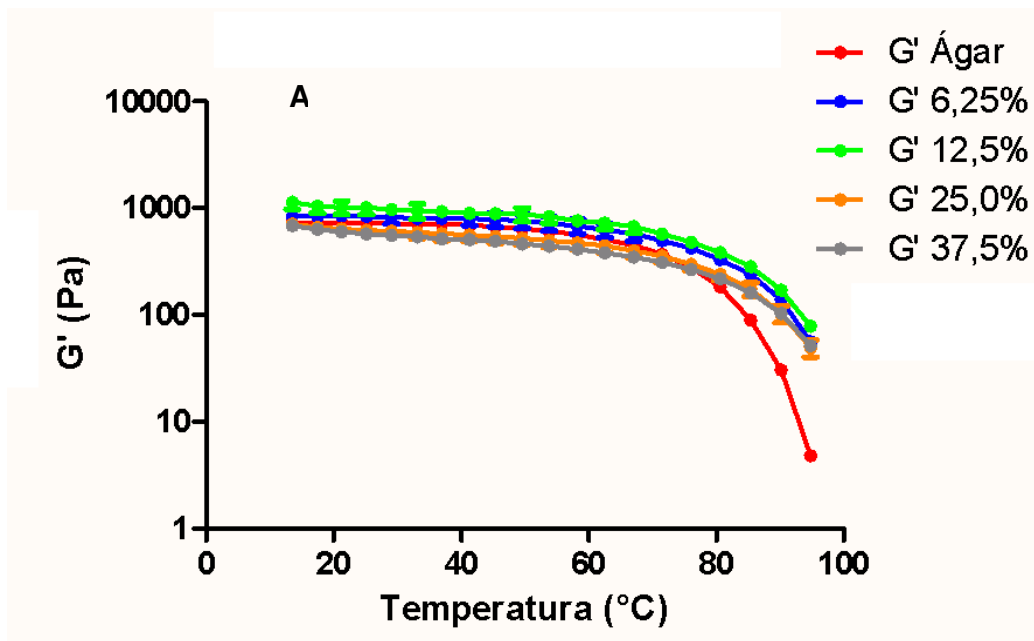


FIGURA 15 – VARIAÇÃO DO MÓDULO ELÁSTICO (G') PARA AS AMOSTRAS: A) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5% QUE NÃO FORAM AUTOCLAVADAS; B) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5% AUTOCLAVADAS 121°C POR 1H E 15MINUTOS MEDIDAS DURANTE AQUECIMENTO (10°C A 90°C).

O ágar é capaz de formar uma solução termo-reversível em meio aquoso, que permanece estável ao longo de uma ampla faixa de temperatura, ou seja, possui uma alta histerese: intervalo de temperatura entre as temperaturas de fusão e gelificação (ALTMAN *et al*, 2004; LABROPOULOS *et al*, 2002). O ágar gelifica a uma temperatura aproximada de 40 °C e sua temperatura de fusão está por volta de 85 °C (ARMISEN; GALATAS, 1993), valor semelhante ao ponto de transição gel-sol encontrado, neste trabalho, para os meios ágar/galactomanana (80- 85 °C).

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. As maiores diferenças no módulo elástico foram observadas entre o meio sem adição de galactomanana e o meio contendo a concentração máxima desse polissacarídeo (37,5%).

Quanto aos meios não autoclavados (FIGURA 15A) observam-se menores valores do módulo elástico (G'), em temperaturas elevadas, para o meio composto apenas pelo polissacarídeo ágar. Além disso, os géis binários ágar/galactomanana mostraram-se menos termoestáveis, quando foram autoclavados (FIGURA 15B), em comparação às mesmas amostras não autoclavadas, pois há uma diminuição nos valores de G' no final do aquecimento próxima de 10 vezes. Isto indica que após um processo de esterilização, quando a amostra é novamente submetida a condições de elevadas temperaturas, ela não é capaz de se reestruturar do mesmo modo que as amostras não esterilizadas.

Este comportamento não foi observado para a amostra ágar, que manteve o mesmo perfil com ou sem o processo de esterilização. É provável, portanto, que a diminuição do caráter sólido das amostras 6,25, 12,5, 25,0 e 37,5% esteja relacionado às interações intermoleculares entre as cadeias de ágar e galactomanana do guapuruvu que são modificadas de forma irreversível nas condições estudadas (autoclave + altas temperaturas).

Bindal e colaboradores (2003) relataram 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), observou o mesmo fenômeno quando mostrou

que a viscosidade aparente de soluções de goma guar decaía com o aumento da temperatura (temperatura máxima do experimento foi 90 °C), porém ocorria uma recuperação total dos valores da viscosidade quando as soluções eram resfriadas até temperatura ambiente.

Após o aquecimento (10 °C a 90 °C) a amostra começa a ser resfriada e retorna, novamente, a 10 °C (FIGURA 16). 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. O ponto de gelificação dos géis foi calculado extrapolando-se a faixa de grande elevação dos valores de G' para interceptar o eixo x (temperatura) (HSIEH; REGENSTEIN; RAO, 1993; NORZIAH *et al.*, 2006). Outro método, mais preciso, que pode ser utilizado na determinação do ponto de gelificação é o cálculo do ponto de inflexão (BUSATO *et al.*, 2009), no entanto, neste trabalho, não foi possível utilizá-lo pela ausência de ponto de inflexão nas curvas dos géis (ponto de inversão da concavidade da curva).

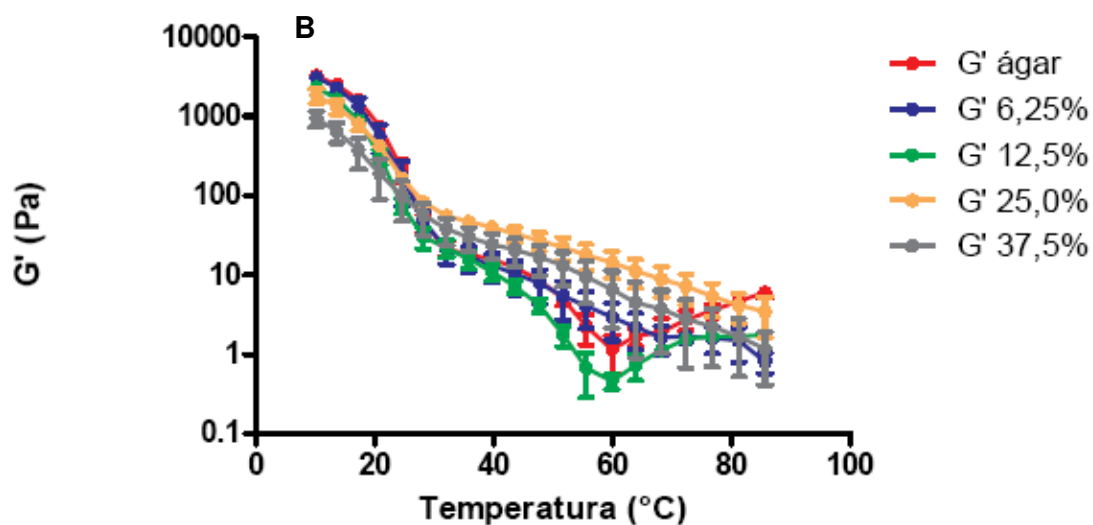
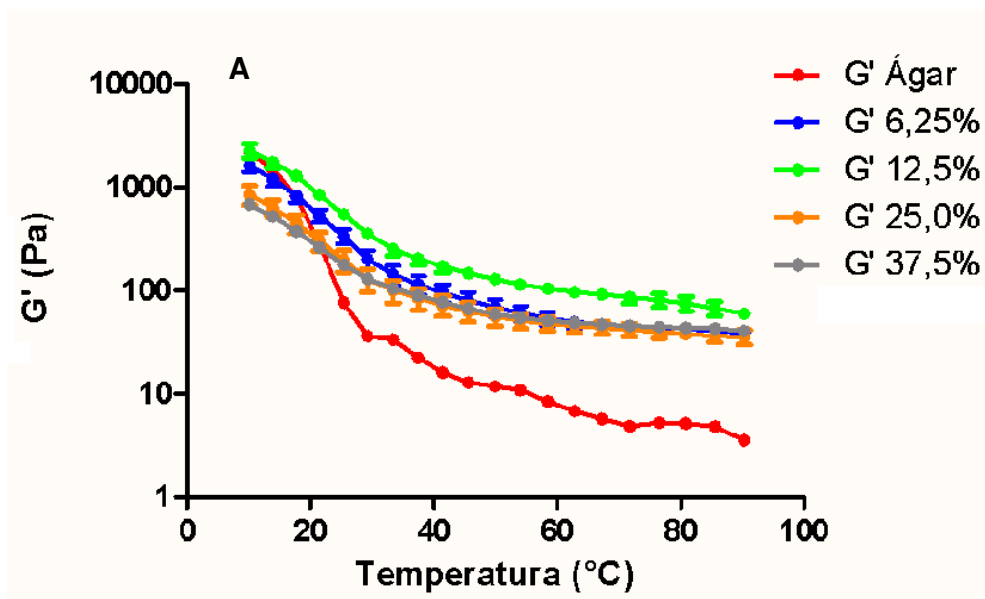


FIGURA 16 – VARIAÇÃO DO MÓDULO ELÁSTICO (G') PARA AS AMOSTRAS: A) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5% QUE NÃO FORAM AUTOCLAVADAS; B) ÁGAR, 6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5% AUTOCLAVADAS 121°C POR 1H E 15MINUTOS MEDIDAS DURANTE RESFRIAMENTO (90°C A 10°C).

O processo de micropropagação exige que os meios, a serem utilizados, passem por um processo de esterilização, sendo assim, os géis autoclavados são os que mimetizam as condições de cultura das macieiras; lembrando que os géis

binários estudados aqui foram utilizados, anteriormente, para analisar o crescimento diferencial de macieiras marubakaido (PEREIRA-NETTO *et al.* 2012).

As análises termo-mecânicas dos meios (ágar, 6,25%, 12,5%, 25,0% e 37,5% - autoclavados) mostraram perfis semelhantes entre o meio ágar e as amostras substituídas por galactomanana de guapuruvu durante o aquecimento (10 – 90 °C). Nesses meios os valores de G' sofrem um decréscimo a partir de 70 °C em ordem de grandeza de cerca de 100 vezes, indicando o ponto de amolecimento das amostras, ou seja, a transição de fase sólida para líquida (FIGURA 17).

Durante a fase de aquecimento os valores de G' apresentam valores sempre superiores aos valores de G'', apontando o predomínio do caráter sólido dessas amostras. Após o termino do ciclo de aquecimento- resfriamento ocorre um ligeiro aumento do módulo elástico (G') em relação ao seu valor inicial . Os dados obtidos para os géis, após o ciclo de aquecimento-resfriamento, sugerem que a estabilidade térmica total pode ser oriunda da simples preservação e estabilização das estruturas formadas durante o resfriamento após o preparo do gel, não havendo indicação da formação de novas associações intermoleculares significantes durante o aquecimento (TSOGA; RICHARDSON; MORRIS, 2004).

A semelhança encontrada entre as amostras durante a fase de aquecimento, não foi observada durante o resfriamento. O meio gelificado apenas com ágar e os meios contendo menores substituições por galactomanana (6,25% e 12,5%) mostraram perfis similares em todo o ciclo aquecimento-resfriamento com temperaturas de gelificação (35 – 40 °C) muito próximas. No entanto, em meios com maiores concentrações de galactomanana (25,0 e 37,5%) observam-se decréscimo nos valores de G' e diminuição da temperatura de gelificação (30 – 35 °C) (TABELA 6).

TABELA 6 – VALORES DE TEMPERATURA DE FUSÃO E DE GELIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PREVIAMENTE AUTOCLAVADAS

Amostras	Temperatura de Fusão	Temperatura de gelificação
Ágar	80 – 90 °C	35 – 40 °C
6,25%	80 – 90 °C	35 – 40 °C
12,5%	80 – 90 °C	35 – 40 °C
25,0%	80 – 90 °C	30 – 35 °C
37,5%	80 – 90 °C	30 – 35 °C

O comportamento dos módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') dos géis autoclavados em um ciclo aquecimento-resfriamento está apresentado na FIGURA 17.

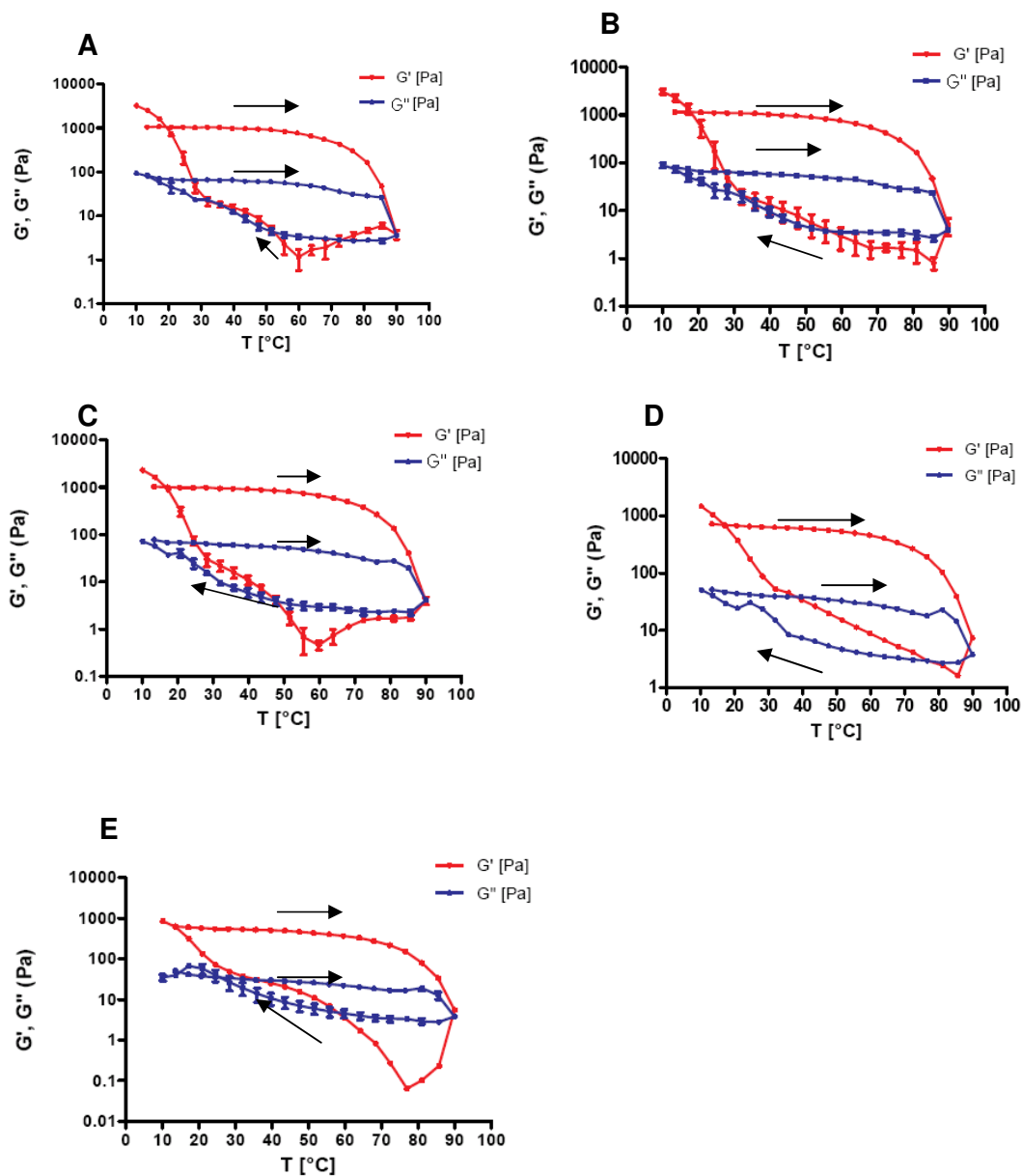


FIGURA 17 – VARIÇÃO DO MÓDULO ELÁSTICO (G') E VISCOSO (G'') PARA AS AMOSTRAS: A) ÁGAR; B) 6,25%; C) 12,5%; D) 25,0% E E) 37,5% AUTOCLAVADAS 121°C POR 1H E 15MINUTOS, MEDIDAS DURANTE AQUECIMENTO (10°C A 90°C) E POSTERIOR RESFRIAMENTO (90°C A 10°C). SETAS PRETAS INDICAM O SENTIDO DE G' E G'' DURANTE O CICLO AQUECIMENTO-RESFRIAMENTO.

Durante a fase de resfriamento do gel ágar e das misturas binárias observam-se duas regiões de transição sol-gel - a primeira entre 60 – 70 °C e a outra entre 30 – 40 °C - este fato pode indicar que o processo de gelificação pode estar ocorrendo em duas etapas, e que apenas em temperaturas mais baixas é que ocorre a gelificação completa dos géis (NORZIAH *et al.*, 2006). Na faixa de temperatura entre 30 – 40 °C, que está próxima à temperatura de gelificação do ágar, é onde se observa, na prática, a solidificação destes meios.

A diminuição dos valores de G' e G'' e as menores temperaturas de gelificação encontrados nos meio 25,0% e 37,5%, confirmam a tendência encontrada nas outras análises reológicas realizadas, ou seja, a substituição de galactomanana de guapuruvu por ágar torna esses géis binários menos rígidos, especialmente, quando maiores concentrações de galactomanana são adicionados ao sistema.

Tendo em vista a semelhança no modo de gelificação das moléculas de carragenana e ágar (ambas galactanas, cuja gelificação ocorre pela formação de duplas hélices; agarose difere das carragenanas na estereoquímica da unidade B) pode-se traçar um paralelo entre o modo de interação da mistura de carragenana/galactomanana e o de ágar/galactomanana. Dea; Morrison (1975) propuseram um modelo de interação entre carragenana/galactomanana em que as duplas hélices das moléculas de carragenana interagem com moléculas de galactomanana nas suas regiões não substituídas por unidades de manose (modelo clássico). Cairns *et al.* (1987, 1991) através de análises de difração de raios X propuseram outro modelo, em que a rede formada por duplas hélices de carragenana apenas contém moléculas de galactomanana em solução, logo este polissacarídeo não tem influência no processo de gelificação da mistura.

Fernandes e colaboradores (1992) estudaram géis binários de κ -carragenana com três diferentes galactomananas (guar, tara e alfarroba) e sugerem a participação das moléculas de galactomanana no processo de gelificação dos sistemas, visto que, menores temperaturas de gelificação foram encontradas quando a galactomanana estava presente no sistema. Apesar dos dados obtidos neste trabalho estarem de acordo com o proposto por Cairns *et al.* (1987,1991), os autores sugerem que galactomananas com maior razão Man/Gal, como a tara, que apresenta razão Man/Gal ~ 3 (semelhante ao da galactomanana de guapuruvu), influenciaram no processo de gelificação da mistura.

Misturas contendo moléculas de galactomanana podem formar uma nova fase no sistema, na qual estas moléculas, dependendo da razão Man/Gal (MCCLEARY; NEUKOM, 1982) formam agregados pela interação das regiões livres de unidades de manose e assim modificam as propriedades das misturas. A formação desses agregados foi sugerida nos trabalhos citados acima e esta hipótese também pode ser mencionada neste trabalho, visto que, em maiores concentrações de galactomanana, nos géis binários, a temperatura de gelificação foi alterada, indicando que a galactomanana de guapuruvu alterou a estrutura dos géis.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para a análise ultraestrutural em MEV dos géis de ágar (controle) e os enriquecidos com galactomanana de guapuruvu nas concentrações de 6,25%; 12,5%; 25,0% e 37,5% foi utilizada a mesma metodologia de preparo dos géis realizado nas análises reológicas. Para as microscopias, a técnica escolhida foi a Crio-MEV, na qual, as amostras são rapidamente congeladas com nitrogênio líquido e posteriormente fraturadas, pois, segundo a literatura, essa é a melhor técnica para observação de materiais altamente hidratados (ECHLIN, 1992; PRAKASH; FRANCIS; SCRIVEN, 2008).

Primeiramente, foram observadas as superfícies externas dos géis nas áreas sem pontos de quebra. Pode-se visualizar nas imagens obtidas que a amostra controle (ágar) apresenta um padrão de superfície lisa e homogênea não encontrada nos géis com substituições parciais de galactomanana de guapuruvu (FIGURA 18). Os géis de ágar com adições de galactomanana apresentaram superfícies lisas em áreas localizadas, mas o que prevalece são regiões com circunvoluções (especialmente observado em 6,25%) e regiões com aspecto mais rugoso (12,5% e 25,0%, principalmente).

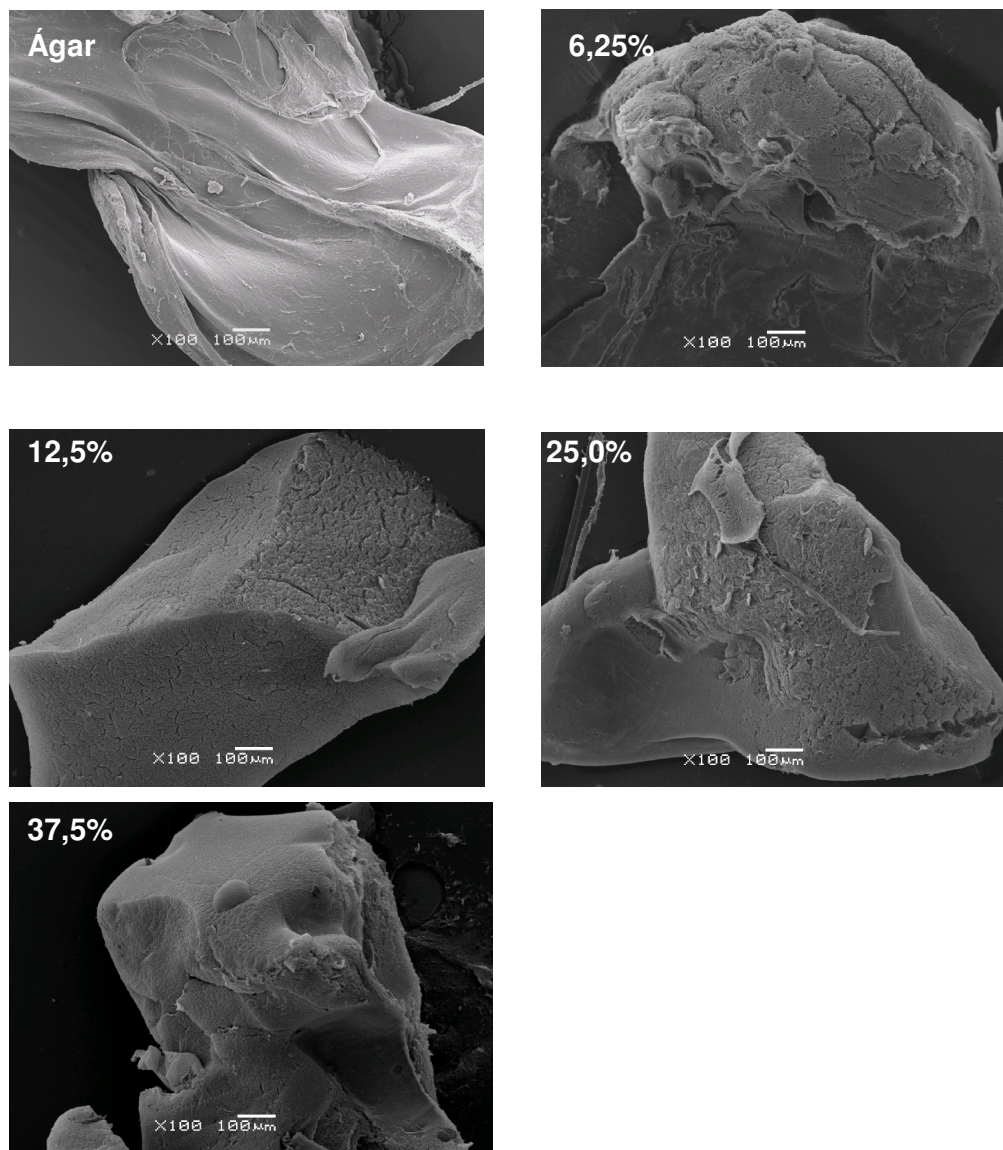


FIGURA 18 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. OBSERVAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL DOS GÉIS DE ÁGAR/GALACTOMANANA (6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5%) E DA AMOSTRA GELIFICADA APENAS COM ÁGAR. AUMENTO DE 100 VEZES.

Em maior aumento (ampliação de 1500 vezes) é possível observar claramente a diferença entre a superfície externa do meio contendo apenas o ágar como agente gelificante e da amostra com a maior proporção de galactomanana na composição (37,5%). Aquela apresenta uma superfície lisa, enquanto esta se mostra rugosa com aspecto cerebroíde e bastante porosa (FIGURA 19).

Portanto, já na parte superficial dos meios é possível inferir que a adição de galactomanana ao sistema resulta em modificação na estrutura dos géis, aparentemente tornando-os menos compactados, menos rígidos; fato também

observado nas análises reológicas, em especial nos testes de arraste e recuperação, nos quais os valores de J_0 (compliance) para 37,5% são, significativamente, maiores do que os do ágar, mostrando uma estrutura mais complacente do que o gel com ágar.

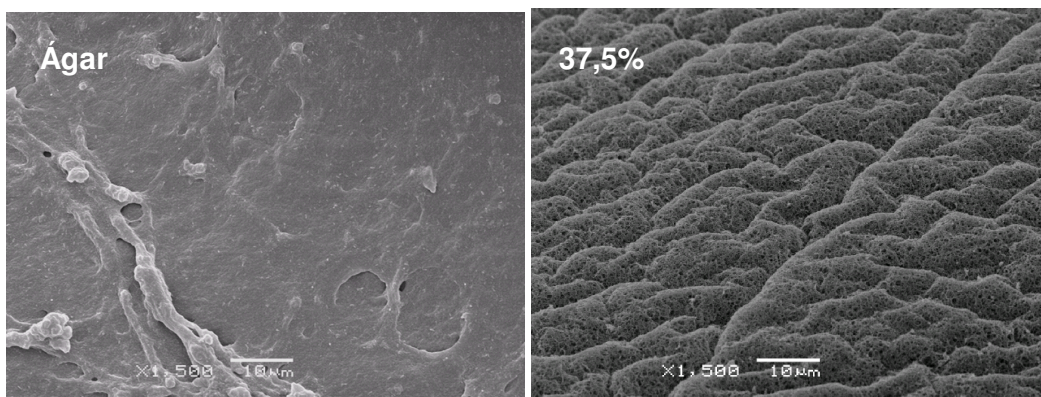


FIGURA 19 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. OBSERVAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL DOS GÉIS DE ÁGAR/GALACTOMANANA (37,5%) E DA AMOSTRA GELIFICADA APENAS COM ÁGAR. AUMENTO DE 1500 VEZES.

O passo seguinte à observação da superfície das amostras foi localizar pontos de quebra, ou seja, partes dos géis que no momento da fratura do material congelado expuseram o interior das amostras e estavam em posição contrária ao suporte de metal.

Assim como na parte superficial das amostras, a análise das regiões internas dos géis mostra diferenças entre o gel de ágar (controle) e os enriquecidos com galactomanana de guapuruvu nas concentrações de 6,25%; 12,5%; 25,0% e 37,5%. No gel de ágar pode-se visualizar uma estrutura de aspecto denso, com poros de tamanho e distribuição heterogênea e, em algumas regiões (sem poros) podem-se observar estruturas fibrosas compondo uma rede bastante compactada (setas vermelhas) (FIGURA 20).

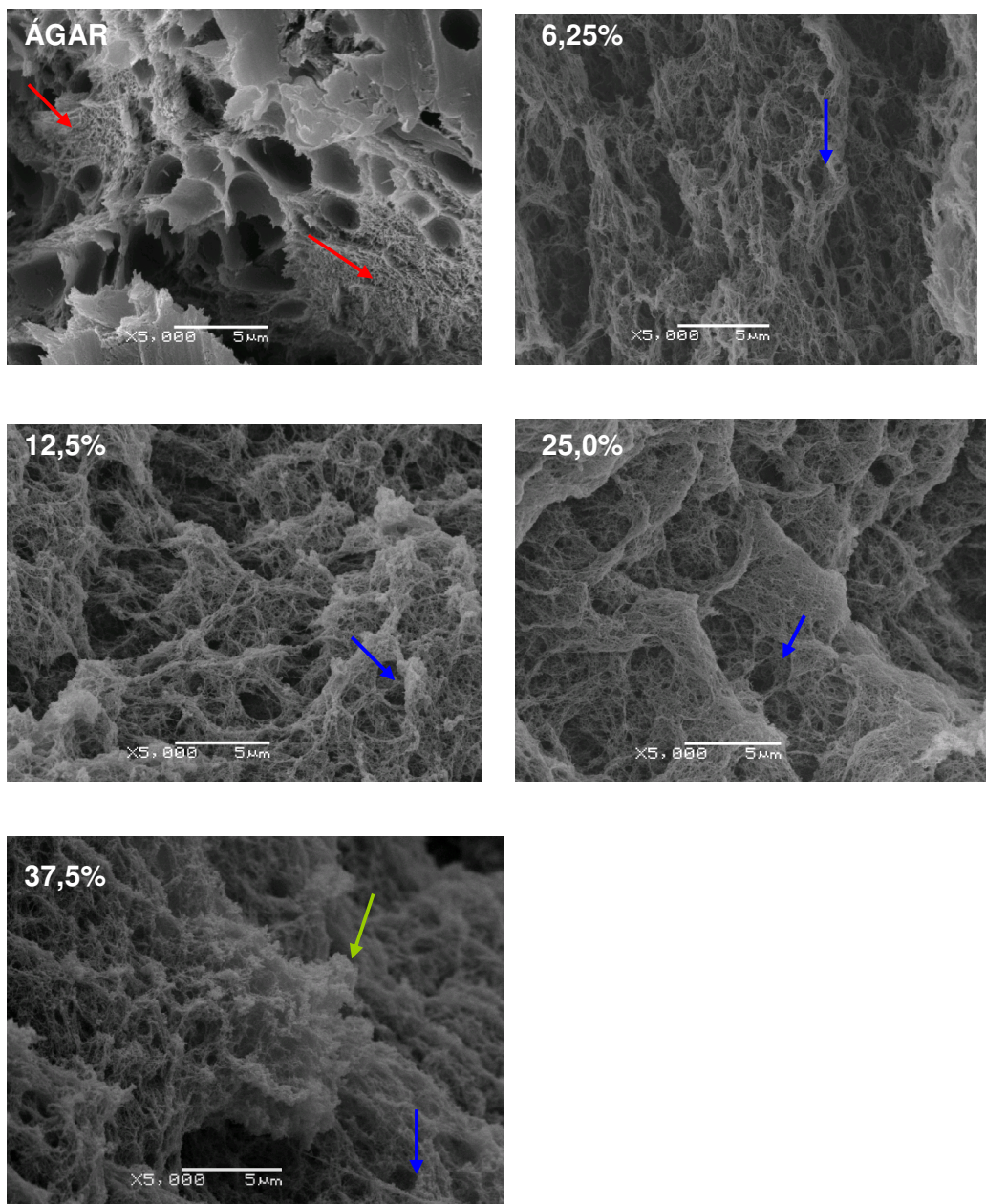


FIGURA 20 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. OBSERVAÇÃO DO PONTO DE QUEBRA DA AMOSTRA GELIFICADA APENAS COM ÁGAR E DOS GÉIS DE ÁGAR/GALACTOMANANA (6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5%). AUMENTO DE 5.000 VEZES. SETAS VERMELHAS: REDE COMPACTADA; SETAS AZUIS: POROS; SETAS VERDES: PEQUENAS ESTRUTURAS VESICULARES/ GLOBULOSAS.

A malha interna dos géis enriquecidos com galactomanana de guapuruvu apresentou um padrão de organização diferente do meio ágar, mas semelhantes entre si. Nestas amostras visualizou-se uma malha constituída por fibras, cuja

organização promoveu a formação de inúmeros poros (setas azuis) distribuídos por toda a parte interna.

Algumas diferenças, mais sutis, puderam ser observadas nos sistemas com galactomanana, principalmente, entre os meios 6,25% e 37,5%. O meio 6,25% é composto por uma estrutura fibrilar, apresentando um padrão interno de polimerização heterogêneo, ou seja, existem regiões com grandes poros e outras mais compactadas (pequenos poros e fibras mais entrelaçadas). No meio 37,5% vê-se pequenas estruturas vesiculares/ globulosas (setas verdes) que devem estar relacionadas á adição de maiores quantidades de galactomanana em concentrações que favorecem a formação de um corpúsculo globular, possivelmente, associações de cadeias de galactomanana.

Os géis 6,25%; 12,5% e 25,0% apresentaram as maiores semelhanças entre si, sendo, formados por uma malha fibrosa e com poros (FIGURA 21). No entanto, a observação das microscopias mostra que: no gel 6,25% a estrutura interna apresenta áreas predominantemente mais compactadas contrastando com grandes poros (setas roxas); o gel 12,5%, visualmente, tem o padrão de polimerização mais homogêneo, com fibras formando uma rede bastante entrelaçada, tendo, um parênquima mais poroso e aparência mais "soft" quando comparado à amostra 6,25% ; o gel 25,0% também se organizou de forma homogênea, como o 12,5%, apresentando uma rede fibrosa bastante entrelaçada, mas a junção das cadeias organizou arquiteturas semelhantes a lamelas/ camadas, intercalando regiões de fibras organizadas e perfurações/ espaços vazios (setas amarelas).

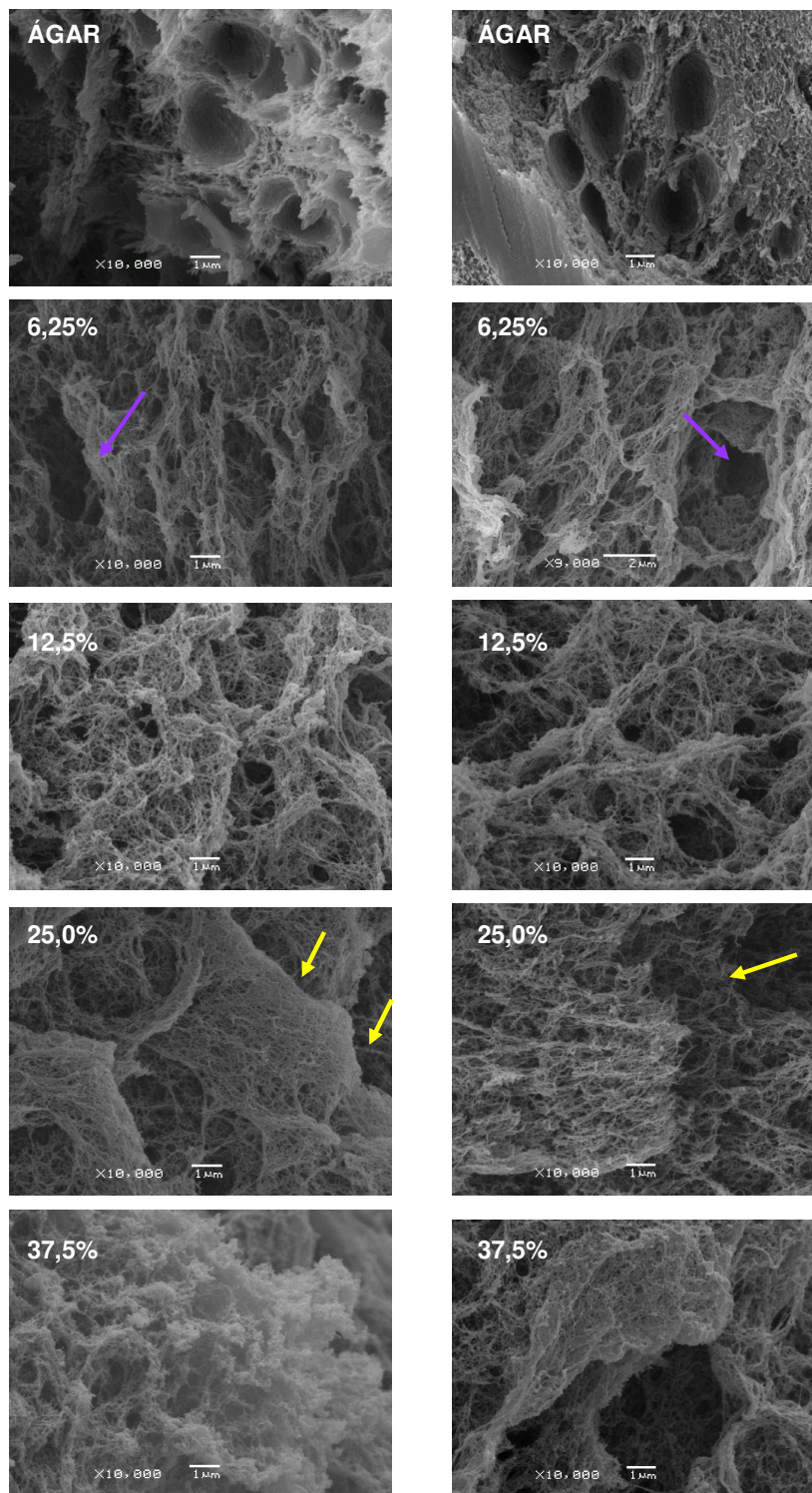


FIGURA 21 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. OBSERVAÇÃO DO PONTO DE QUEBRA DA AMOSTRA GELIFICADA APENAS COM ÁGAR E DOS GÉIS DE ÁGAR/GALACTOMANANA (6,25%; 12,5%; 25,0% E 37,5%). AUMENTO DE 10.000 VEZES. SETAS ROXAS: ÁREAS PREDOMINANTEMENTE MAIS COMPACTADAS CONTRASTANDO COM GRANDES POROS; SETAS AMARELAS: PERFURAÇÕES/ ESPAÇOS VAZIOS.

Os testes oscilatórios dinâmicos (varreduras de frequência) mostraram que entre as amostras autoclavadas, processo que também foi realizado para o MEV, existe uma tendência de redução do módulo elástico (G'), que indica o caráter sólido dos géis, à medida que concentrações maiores de galactomananas são adicionadas aos meios. Esses resultados podem ser relacionados aos padrões de organização da estrutura interna dos materiais, visto que, segundo a descrição acima e a observação das microscopias, o gel de ágar teve a malha mais compactada, coincidindo com os maiores valores de G' (1206,66Pa) entre todos, e os meios acrescidos com galactomanana, mostraram-se mais porosos e com uma rede organizada de forma mais aberta, pelo afrouxamento das fibras.

As amostras 25,0% e 37,5% tiveram os menores valores de G' (642,72Pa e 400,61 Pa), sendo coincidente com a arquitetura de uma rede com espaços vazios (buracos) (25,0%) e uma rede que começou a apresentar granulações em detrimento da rede fibrilar (37,5%). Esses fatores estruturais, possivelmente, estão relacionados com a diminuição do caráter sólido destes géis, em relação à aqueles com menor concentração de galactomanana.

Os valores obtidos para os módulos elásticos (G') e a observação da ultraestrutura dos meios de cultura podem ajudar na elucidação dos resultados encontrados para o crescimento diferencial das macieiras. De acordo com os dados, obtidos em trabalho anteriormente realizado (PEREIRA-NETTO *et al.*, 2012), a adição de galactomanana ao sistema influenciou no crescimento das plantas. Os melhores valores para a taxa de multiplicação foram encontrados nos meios 12,5% e 25,0% (FIGURA 22), com destaque para o meio 12,5%, cuja taxa de multiplicação foi, significativamente, maior do que o meio gelificado apenas com ágar.

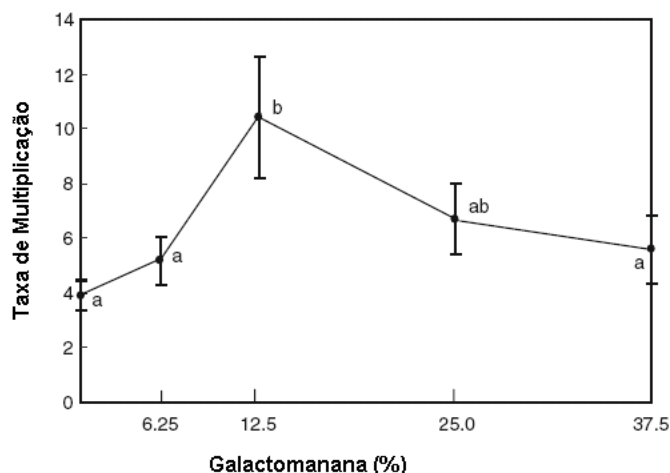


FIGURA 22 – EFEITO DA ADIÇÃO DE GALACTOMANANA DE *S. paraybae* NA TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DE *M. prunifolia*. AS LETRAS IGUAIS, DE ACORDO COM TESTE DE TUKEY, INDICAM AMOSTRAS QUE NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE ($P=0,005$) ENTRE SI. AS BARRAS VERTICAIS MOSTRAM O DESVIO PADRÃO.
 FONTE: PEREIRA-NETTO *et al.* (2012).

Considerando que todos os fatores possivelmente causadores de mudanças no crescimento das plantas, como por exemplo, o pH, as concentrações de sais e fitoreguladores, a temperatura e o fotoperíodo (PASQUAL, 2001) foram padronizados para todos os meios, logo, o crescimento diferencial das macieiras deve estar relacionado à substituição do ágar pela galactomanana e mais, essa variação se deve à rigidez dos géis e à estrutura diferenciada dos meios ágar/galactomanana, ou seja, está relacionado a variações nas propriedades físicas dos meios.

O ágar é utilizado em concentrações que variam de 4 a 10 g/L (CALDAS *et al.*, 1998), mas além de ser considerado o componente de maior custo do meio de cultura (GEORGE, 1993) altas concentrações de ágar promovem a elevação do potencial osmótico do meio, dificultando a difusão dos nutrientes para os explantes reduzindo seu desenvolvimento. Sendo assim, a escolha da quantidade de ágar resulta de um compromisso entre um meio duro que minimize as perdas de água e um meio mole que permite uma melhor difusão dos nutrientes.

Apesar de a substituição de galactomanana no sistema não ter resultado num incremento das propriedades mecânicas (menores valores de G' e maiores valores J) para as plantas estas condições foram benéficas, ou seja, o incremento de

galactomanana nos meios tornou-os menos rígidos, com uma malha mais aberta e fibrosa que deve ter favorecido a difusão de água e nutrientes para o explante. Ao mesmo tempo, a concentração de ágar nesses meios não foi tão reduzida a ponto de aumentar consideravelmente a evaporação de água.

Entretanto, em géis com concentrações mais elevadas de galactomanana (acima de 12,5%) observa-se uma queda na taxa de multiplicação (FIGURA 22) que, provavelmente, indica que estes meios (25,0% e 37,5%) apresentam dificuldade para suportar o peso físico das plantas de maneira efetiva, visto que são os meios menos rígidos (menores de G').

LUCYSZYN e colaboradores (2007) reportaram o efeito da substituição parcial de ágar por galactomanana de *Cassia fastuosa* (cassia) and *Cyamopsis tetragonolobus* (goma guar) na micropropagação *in vitro* de explantes de folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Os explantes cultivados em ágar/guar ou ágar/cassia mostraram diferenças significativas no número de brotos, massa fresca, comprimento da raiz e, no crescimento das folhas, em comparação com os resultados obtidos para meio controle (ágar 6g/L). O crescimento diferencial visto nos meios com substituição de galactomanana foram relacionados aos parâmetros físicos dos géis como a diminuição nos valores de viscosidade aparente. A formação de um gel macio (mais viscoelástico) ajuda e/ou facilita a difusão de água e nutriente no meio e, conseqüentemente, o crescimento de células e brotos.

DOBRÁNSZKI; MAGYAR-TÁBORI; TOMBÁ CZ (2011) estudaram géis binários de ágar/goma guar e phytigel/goma guar na micropropagação de maçãs Galaxy. De acordo com análises reológicas, a presença de goma guar no sistema causou redução no caráter sólido dos géis, e ainda permitiu um aumento na velocidade de difusão de azul de metileno.

Por fim, o meio 12,5% que proporcionou o melhor crescimento nas macieiras deve reunir em suas características estruturais todos os fatores favoráveis ao desenvolvimento de um explante, quais sejam: concentrações ideais de ágar que diminuam a evaporação; meio não muito compactado que facilite a difusão de nutrientes e água; concentração ótima de galactomanana na qual a estrutura interna se organiza em uma malha fibrilar bastante homogênea; e meio rígido o suficiente para manter o explante bem posicionado (PEREIRA-NETTO *et al.*, 2012).

Portanto, é possível inferir que a substituição parcial do ágar por galactomanana de guapuruvu, por reduzir o caráter sólido dos géis binários, aumente a difusão de nutrientes e melhore a disponibilidade de água aos explantes de maçã, e esta característica física adquirida pelos géis com galactomanana, seja a causa das melhores taxas de multiplicação dessas plantas.

6 CONCLUSÕES

O comportamento reológico dos géis binários de ágar e galactomanana foi altamente influenciado pelo processo de autoclavagem e pela porcentagem de galactomanana de guapuruvu substituída em relação ao agente gelificante ágar. Estes efeitos puderam ser avaliados por análises oscilatórias dinâmicas, oscilatórias termo-mecânicas e teste de arraste e recuperação.

De acordo com os resultados obtidos nas análises oscilatórias, a substituição por galactomanana de guapuruvu não promoveu um incremento das propriedades mecânicas dos géis ágar/galactomanana, que apresentaram valores de G' inferiores às amostras ágar. O espectro mecânico mostrou que todas as amostras exibiram predomínio do caráter sólido ($G' > G''$), em média na ordem de 10 vezes, perfil característico de um gel rígido. Os módulos elástico G' e viscoso G'' dos meios ágar, 6,25%, 12,5%, 25,0% e 37,5% evidenciaram que o processo de autoclavagem aumentou o caráter elástico de todas as amostras, onde os sistemas previamente esterilizados apresentaram os maiores valores de G' .

Pela análise de arraste e recuperação foi possível examinar o caráter viscoelástico das amostras no período de tempo de 300s, na qual as amostras ágar e 6,25%, autoclavadas, apresentaram maior resistência a deformação e capacidade de recuperação de ~ 90%, sugerindo a formação de sistemas com estrutura interna mais forte quando comparados aos demais, em contrapartida, o meio 37,5% mostrou uma estrutura interna mais fraca, de menor resistência à deformação, apresentando os maiores valores de compliança.

Através das análises reológicas termo-mecânica observou-se que a diminuição dos valores de G' e G'' e as menores temperaturas de gelificação encontrados nos meios 25,0% e 37,5%, confirmam a tendência de que a substituição de galactomanana de guapuruvu por ágar torna esses géis binários menos rígidos, especialmente, quando maiores concentrações de galactomanana são adicionados ao sistema. Os pontos de amolecimento e gelificação encontrados para todas as amostras estão próximos às temperaturas de mudança de fase do polissacarídeo ágar.

Os espectros de RMN dos géis binários 12,5% e 37,5% apresentaram sinais referentes aos polissacarídeos ágar e galactomanana.

As análises por MEV indicaram que a substituição de galactomanana de guapuruvu modifica a organização da estrutura interna dos géis binários. Especialmente a amostra 12,5% apresentou padrão de polimerização mais homogêneo, com fibras formando uma rede bastante entrelaçada, tendo, um parênquima mais poroso e aparência mais "soft".

Por meio das análises realizadas infere-se que o não incremento nas propriedades mecânicas dos géis, decorrente da substituição parcial do ágar por galactomanana de guapuruvu conferiu a eles uma arquitetura porosa e fibrilar que está relacionada a uma melhor difusão de água e nutrientes, quando estes meios são utilizados para a micropropagação vegetal.

REFERÊNCIAS

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

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.

ALDWINCKLE, H.; MALNOY, M. Plant Regeneration and Transformation in the Rosaceae. In: Nageswara-Rao M, Soneji JR (Eds). **Transgenic Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-39, 2009.

ALTMAN, N.; COOPER-WHITE, J.J.; DUSTAN, D.E.; STOKES, J.R.; NON-NEWTON, J. **Fluid Mech.**, p. 124 129, 2004.

ANDRIOLA, S.; RICHARD, C.; BESSODES, M.; SCHERMAN, D.; NARITA, T.; DUCOURET, G.; MERTEN, O. The effect of sterilization methods on the thermo gelation properties of xyloglucan hydrogels. **Polymer degradation and stability**, 2009.

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

ARAKI, C.; HIRASE, S. Studies on the chemical constitution of agar-agar. XXI. Re-investigation of methylated agarose of *Gelidium amansii*. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 33, p. 291-295, 1960.

ARMISEN, R. Agar-agar. Lecture in training course T 004 gel, thickeners and stabilizing agents held in Leatherhead, Surrey, organized by Leatherhead. **Food Research Association**, p. 25-28, 1993.

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 Report**, v. 17, p. 318-322, 1998.

BABBAR, S. B.; JAIN, N.; WALIA, N. Guar gum as a gelling agent for plant tissue culture media. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 41, n. 3, p. 258-261, 2005.

BABBAR, S. B.; JAIN, N. Xanthan gum: an economical partial substitute for agar in microbial culture media. **Current Microbiology**, v. 52, p. 287-292, 2006.

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

BAILEY, W. J.; WEIR, I. S. Investigation of Methods for Direct Rheological Model Parameter Estimation. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 21, p. 1-13, 1998.

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

BIÉVRE, C.; MARIAT, F. Preliminary study of a galactomannan extracted from *Conidiobolus coronatus* a fungus pathogenic to man. **Carbohydrate Research**, 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, n. 3, p. 219-228, 2003.

BIRD, K. T. Agar production and quality from *Gracilaria* sp. Strain G-16: Effects of environmental factors. **Botanica Marina**, v. 31, p. 33-39, 1988.

BHATTACHARYA, S. Yield stress and time-dependent rheological properties of mango-pulp. **Journal of Food Science**, v. 64, p. 1029-1033, 1999.

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

BRESOLIN T.M.B.; MILAS M.; RINAUDO M.; REICHER F.; J.L.M.S. GANTER. Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 225–231, 1999).

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

BUSATO A. P.; REICHER F.; DOMINGUES R.; SILVEIRA, J. L. M. Rheological properties of thermally xyloglucan gel from the seeds of *Hymenaea courbaril*. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 410–414, 2009.

CAIRNS, P.; MILES, M. J.; MORRIS, V. J.; BROWNSEY, G. J. X-ray fiber diffraction studies of synergistic, binary polysaccharides gels. **Carbohydrate Research**, v. 160, p. 411–423, 1987.

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 1*, p. 87-132, 1998.

CERQUEIRA, M. A.; PINHEIRO, A. C.; SOUZA, B. W. S.; LIMA, A. M.; RIBEIRO, C.; MIRANDA, C. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate Polymers**, v.75, n. 3, p. 408-414, 2009.

CERQUEIRA, M.A.; BOURBONA, A.I.; PINHEIRO, A.C.; MARTINS, J.T.; SOUZA, B.W.S.; TEIXEIRA, J.A.; VICENTE, A.A. Galactomannans use in the development of edible films/ coatings for food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 662-671, 2011.

CHRONAKIS, I. S.; KASAPIS, S.; RICHARDSON, R. K. Small deformation rheological properties of maltodextrin-milk protein systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, p. 137-148, 1996.

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.

COMFORT, S.; HOWELL N. K. Gelation properties of salt soluble meat protein and soluble wheat protein mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 149–159, 2003.

COURRAZE, G.; GROSSIORD, J. L. Initiation à la rhéologie. 2 ed. *Paris: Lavoisier*, p. 272, 1991.

CRAIGIE, J.S.; LEIGH, C. In Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods, Ed. J.A. Hellebust e J.S. Craigie. *Cambridge University Press*, p. 109-131, 1978.

CRAIGIE, J.S.; WEN, Z.C.. Effect of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). **Can. J Bot.**, v. 62, p. 1665-1670, 1984.

CUI, W.; ESKIN, N. A. M.; BILIADERIS, C. G.; MAZZA, G. Synergistic interactions between yellow mustard polysaccharides and galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, v. 27, p. 123–127, 1995.

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.

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

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

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

DJABOUROV, M. **La Gélification Thermoréversible du Système Eau-Gélatine**. Paris: University of Paris VI - PhD thesis, 1986.

DOBRÁNSZKI, J.; MAGYAR-TÁBORI, K.; TOMBÁCZ, E. Comparison of the rheological and diffusion properties of some gelling agents and blends and their effects on shoot multiplication. **Plant Biotechnology Report**, v. 5, p. 345- 352, 2011.

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.

DONATO, L.; KOLODZIEJCZYK, E.; ROUVET M. Mixtures of whey protein microgels and soluble aggregates as building blocks to control rheology and structure of acid induced cold-set gels. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 734 – 742, 2011.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.; BALLENGER, J.A.; DICKSON, E.E.; KAJITA T. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. **Am. J. Bot.**, v. 84, p. 541-554, 1997.

DUCKWORTH, K. C., HONG, A.P.D. e YAPHE, W. The agar polysaccharides of *Gracilaria* species. **Carbohydrate research**, 1970.

DUSTAN, D. E.; CHEN, Y.; LIAO, M. L.; SALVATORE, R.; BOGER, D .V. Structure and rheology of the k-carragenan/ locust bean gum gels. **Food Hidrocolloids**, v. 15, p. 475 – 485, 2001.

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, p. 509-512, 1987.

ECHILIN, P. Low Temperature Microscopy and Analysis. **Plenum Press**, New York, 1992.

ERNANI, P.E.R. **Espécies Florestais Brasileiras**. Colombo, Ed. Embrapa-SPI, p. 47 e 475, 1994.

FAO, Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação - <https://www.fao.org.br/> - Acesso em 12/02/2012.

FARAHNAKY, A.; ASKARI, H.; MAJZOBI, M.; MESBAHI, G. The impact of concentration, temperature and pH on dynamic rheology of psyllium gels. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 294–301, 2010.

FERNANDES, P. B. Influence of Galactomannan on the Structure and Thermal Behaviour of Xanthan/Galactomannan Mixtures. **Journal of Food Engineering**, v. 24, p. 269-283, 1995.

FERNANDES, P. B.; GONÇALVES, M. P.; DOUBLIER, J. L. A rheological characterization of kappa-carrageenan/galactomannan mixed gels: A comparison of locust bean gum samples. **Carbohydrate Polymers**, v. 16, p. 253–274, 1991.

FERNANDES, P. B.; GONÇALVES, M. P.; DOUBLIER, J. L. Effect of galactomannan addition on the thermal behaviour of κ-carrageenan gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 19, n. 4, p. 261–269, 1992.

FERRY, J. D. **Viscoelastic properties of polymers**. New York: John Wiley and Sons Inc., 1980.

FLORENT GUILLOU; L. ROULEAU; G. PIRNGRUBER; V. VALTCHEV. Synthesis of FAU-type zeolite membrane: An original *in situ* process focusing on the rheological control of gel-like precursor species. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 119, n. 1-3, p. 1-8, 2009.

FITZSIMONS, S. M.; TOBIN, J. T.; MORRIS, E. R. Synergistic binding of konjac glucomannan to xanthan on mixing at room temperature. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 36–46, 2008.

FUJIKAWA, S.; KURODA, K. Cryo-scanning electron microscopic study on freezing behavior of xylem ray parenchyma cells in hardwood species. **Micron.**, v. 31, p. 669–686, 2000.

FUNAMI, T.; KATAOKA, Y.; NODA, S.; HIROE, M.; ISHIHARA, S.; ASAI, I.; TAKAHASHI, R.; NISHINARI, K. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 763, 2008.

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

GANTER, J. L. M. S. *et al.* Study of solution properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa Scabrella*. **Carbohydrate Polymers**, v.17, p. 171-175, 1992.

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 - 19, 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.

GARNIER, C.; SCHORSCH, C.; DOUBLIER, J. L. Phase separation in dextran/locust bean gum mixtures. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, p. 313–317, 1995.

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

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

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ, editors. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht, Netherlands: Springer, p. 29–64, 2008.

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.

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

GLICKSMAN, M. Utilization of seaweed hydrocolloids in the food industry. **Hydrobiologia**, v. 151/152, p. 31-47, 1987.

GOYCOOLEA F.M.; MORRIS E.R.; GIDLEY M.J. Viscosity of galactomannans at alkaline and neutral pH: evidence of hyperentanglement in solution. **Carbohydrate Polymers** 27 (1995), 69–71.

GRASDALEN, H.; SMIDSRØD, O. *Macromolecules*, v. 14, p.229, 1981.

HARADA, T.; KURAHASHI, W.; YANAI, M.; WAKASA, Y.; SATOH, T. Involvement of cell proliferation and cell enlargement in increasing the fruit size of *Malus* species. **Scientia Horticulturae**, v. 105, p. 447–456, 2005.

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

HASSANA, A.N.; FRANKA, J.F.; ELSODAB, M. Observation of bacterial exopolysaccharide in dairy products using cryo-scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, v. 13, p. 755–762, 2003.

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.

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

HSIEH, Y. L.; REGENSTEIN, J. M.; RAO, M. A. Gel point of whey and egg proteins using dynamic rheological data. *Journal of Food Science*, v. 58, n. 1, p. 116–119, 1993.

HURTADO-PONCE, A. Q.; UMEZAKI, I. Physical properties of agar gel from *Gracilaria* (Rhodophyta) of Philippines. **Bot. Mat.**, v. 31, p. 171-174, 1994.

IGARASHI, M.; OGASAWARA, H.; HATSUYAMA, Y.; SAITO, A.; SUZUKI, M. Introduction of rolC into Marubakaidou [*Malus prunifolia* Borkh. var. ringo Asami Mo 84-A] apple rootstock via *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, v. 163, p. 463-473, 2002.

ITOH, K.; YAHABA, M.; TAKAHASHI, A.; TSURUYA, R.; MIYAZAKI, S.; DAIRAKU, M.; TOGASHI, M.; MIKAMI, R. Attwood In situ gelling xyloglucan/pectin formulations for oral sustained drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, p. 95–101, 2008.

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

JOSHI, H.; KAPOOR, V. P. *Cassia grandis* Linn. f. seed galactomannan: structural and crystallographical studies. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1907–1912, 2003.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. *Plants Systematics*. **Sunderland: Sinauer Associates**, p. 464, 1999.

KALAB, M. Practical aspects of electron microscopy in dairy research. **Food Structure**, v. 12, p. 95–114, 1993.

KAVANAGH, G. M.; ROSS-MURPHY, S. B. Rheological characterization of polymer gels. **Progress in Polymers Science**, v. 23, p. 533-562, 1998.

KHOURYIEH, H. A.; HERALD, T. J.; ARAMOUNI, F.; ALAVI, S. Intrinsic viscosity and viscoelastic properties of xanthan/guar mixtures in dilute solutions: Effect of salt concentration on the polymer interactions. **Food Research International**, v. 40, p. 883–893, 2007.

KNUTSEN, S. H.; MYSLABODSKI, D. E.; LARSEN, B.; USOV, A. I. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Bot. Mar.**, v. 37, p. 163-169, 1994.

KOHYAMA, K.; IIDA, H.; NISHINARI, K. A mixed system composed of different molecular weights konjac glucomannan and kappacarrageenan: 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.

KHONDKARA, D.; TESTERA, R. F.; HUDSONB, N.; KARKALASA, J.; MORROW, J. Rheological behaviour of uncross-linked and cross-linked gelatinized waxy maize starch with pectin gels. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1296–1301, 2007.

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. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 393-406, 2002.

LAHAYE, M.; ROCHAS, C.; YAPHE, W. A new procedure for determining the heterogeneity of agar polymers in the cell walls of *Gracilaria* spp. (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Can. J. Bot.**, v. 64, p. 579-585, 1986.

LAHAYE, M.; ROCHAS, C. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. **Hydrobiologia**, v. 221, p. 137–148, 1991.

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

LAUNAY, B.; CUVELIER, G.; MARTINEZ-REYES, S. Viscosity of locust bean, guar and xanthan gum solutions in the Newtonian domain: a critical examination of the log

- (η_{sp}) c vs c master curves. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, n. 3. p. 385–395, 1997.
- LEVY, I.; FRIEDLANDER, M. Strain selection in *Gracilaria* spp. **Bot. Mar.**, v. 33, p. 339-345, 1990.
- LEWIS, G.P. Legumes of Bahia. **Royal Botanic Gardens – Kew**, 1987.
- LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the World. **The Royal Botanic Gardens, Kew**, p. 577, 2005.
- 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.
- LOVEDEEP K.; JASPREET S.O.; MCCARTHY H. Singh Physico-chemical, rheological and structural properties of fractionated potato starches. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 3, p. 383-394, 2007.
- LUCYSZYN, N. **Galactomananas: novas fontes de biopolímeros e aplicações na indústria alimentícia**. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1994.
- LUCYSZYN, N.; QUOIRIN, M.; ANJOS, A.; SIERAKOWSKI, M. R. Blends of agar/galactomannan for Marubakaido apple Rootstock shoot proliferation. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 2, p. 133–137, 2005.
- 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, p. 173-176, 2007.
- LUNDIN, L.; HERMANSSON, A.M. **Understanding synergistic polysaccharide networks using electron microscopy and rheology**. In Food Colloids, Proteins,

Lipids and Polysaccharides, Ed. E. Dickinson and B. Bergenstahl. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1997.

MCCLEARY, B.V.; NEUKOM, H. Effect of enzymic modification on the solution and interaction properties of galactomannans. **Prog. Food Nutr. Sci.**, v. 6, p. 109-18, 1982.

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.

MALKIN, Y. A. Rheology Fundamentals. **Toronto: ChemTec.**, 1994.

MANNION, R. O.; MELIA, C. D.; LAUNAY, B.; CUVELIER, G.; HILL, S. E.; HARDING, S. E. Xanthan/locust bean gum interactions at room temperature. **Carbohydrate Polymers**, v. 19, p. 91–97, 1992.

MARINHO-SORIANO A. E.; BOURRET E. B.; DE CASABIANCA M. L.; MAURY A, L. Agar from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria bursa-pastor*. **Bioresource Technology**, v. 67, p. 1-5, 1999.

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

MARINHO-SORIANO, A. E.; BOURRET, E. B. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). **Bioresour. Technol.**, v. 96, p. 379–382, 2005.

MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; AVIDES, M. C.; VICENTE, A. A. Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58. n. 3, p. 1884-1891, 2010.

MCHUGH, D.J. World wide distribution of commercial sources of seaweeds including *Gelidium*. **Hydrobiologia**, v. 221, p. 19–21, 1991.

MEDINA-TORRES L.; BRITO-DE LA FUENTE E.; GÓMEZ-ALDAPA C.A.; ARAGON-PIÑA A.; TORO-VAZQUEZ J.F. Structural characteristics of gels formed by mixtures

of carrageenan and mucilage gum from *Opuntia ficus indica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 3, p. 299-309, 2006.

MEENA, R.; PRASAD, K.; SIDDHANTA, A.K. Development of a stable hydrogel network based on agar–kappa-carrageenan blend cross-linked with genipin. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 497–509, 2009.

MIKKONEN, K. S.; RITA, H.; HELEN, H.; TALJA, R. A.; HYVONEN, L.; TENKANEN, M. Effect of polysaccharide structure on mechanical and thermal properties of galactomannan-based films. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 3198-3205, 2007.

MORRIS, V. J.; FRANKLIN D.; I'ANSON K.. Rheology and microstructure of dispersions and solutions of the microbial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* (xanthan gum). **Carbohydrate Research**, v. 121, p. 13-30, 1983.

MORRIS, E. R.; FOSTER, T. J. Role of conformation in synergistic interactions of xanthan. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, p. 133–135, 1995.

MOTOSUGI, H.; GAO, Y.; SUGIURA, A.. Rootstock effects on fruit quality of 'Fuji' apples grown with ammonium or nitrate nitrogen in sand culture. **Scientia Horticulturae**, v. 61, p. 205-214, 1995.

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 25 (1974), 135-166.

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

NAIK, P.S.; SARKAR, D. Sago: and alternative cheap gelling agent for potato in vitro culture. **Biol. Plant**, v. 44, n. 2, p. 293–296, 2001.

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

NISHINARI, K.; WATASE, M.; RINAUDO, M.; MILAS, M. **Food Hydrocolloids**, v. 10, p. 277–283, 1996.

NORTON, I. T.; JARDIN, D. A.; FOSTER, T. J. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 225, 1999.

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

OLHERO, S.M.; TARÓÁ, G. A.; COIMBRA, M.A.; FERREIRA J.M.F.. Synergy of polysaccharide mixtures in gelcasting of alumina. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 20, p. 423-429, 2000.

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.

PAINTER, T.J. Algal Polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. **The polysaccharides**, v. 2, p. 195-285, 1983.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, p. 165, 2001.

PASQUALETTO, P.L.; ZIMMERMAN, R.H., Fordham, I. Influence of cations and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivar in vitro. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.14, p. 31–40, 1988.

PERCIVAL, E.; McDOWELL, R.H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. **Academic Press Inc.**, London, p. 127-156, 1967.

PEREIRA-NETTO, A. B.; MENEGUIN, R. G.; BIZ, A.; 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. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. , p. . 2012.

PETKOWICZ, C.L.O.; REICHER, F.; MAZEAU, K. Conformational analysis of galactomannans: from oligomeric segments to polymeric chains. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 25–39, 1998.

PETKOWICZ C.L.O.; VARGAS-RECHIA C.G.; BUSATO A.P.; REICHER F., in: F.M. Lajolo, E.W. Menezes (Eds.), **Carbohidratos em alimentos regionales Iberoamericanos**, USP, São Paulo 1, p. 125–147, 2006.

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

PICULELL, L.; NILSSON, S.; MUHRDECK, P. Effects of small amounts of kappa-carrageenan on the rheology of aqueous iota-carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, v. 18, p. 199–208, 1992.

PRAKASH, S. S.; FRANCIS, L. F.; SCRIVEN, L.E. Microstructure evolution in dry-wet cast polysulfone membranes by cryo-SEM: A hypothesis on macrovoid formation. **Journal of Membrane Science**, v. 313, p. 135–157, 2008.

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.

RAO, M. A. *et al.* Rheological behaviour of heated starch dispersions in excess water: Role of starch granule. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, p. 273-283, 1997.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHORN, S.E. *Biologia vegetal*, 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan, 1996.

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

REINERT J.; BACKS D. Control of totipotency in plant cells growing in vitro. **Nature**, v. 220, p. 1340–1341, 1968.

RENN, D. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. **Trends Biotechnology**, Limerick, v. 15, p. 9-14, 1997.

REES, D.A. Estimation of the relative amounts of isomeric sulphate esters in some sulphated polysaccharides. **J. Chem. Soc.**, v. 5, p. 168-171, 1961.

RODRÍGUEZ, M. C.; MATULEWICA, M. C.; NOSEDA, M. D.; DUCATTI, D. R. B.; LEONARDI, P. I. Agar from *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) of

Patagonic coast of Argentin – Content, structure and physical properties. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1435- 1441, 2009.

RODRIGUEZ-HERNANDEZ, A.I.; TECANTE, A. Dynamic viscoelastic behaviour of gellan-carrageenan and gellan-xanthan gels. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 59–64, 1999.

ROSS-MURPHY, S. B.; MORRIS, V. J.; MORRIS, E. R. Molecular viscoelasticity of xanthan polysaccharide. **Faraday Symposium of the Chemical Society**, v. 18, p. 115–129, 1983.

SARGENT, J. A. The application of cryo-scanning electron microscopy to food research. *Food Microstructure*, v. 7, p. 123–135, 1988.

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

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

SCHORSCH, C.; GARNIER, C.; DOUBLIER, J. Viscoelastic properties of xanthan/galactomannan mixtures: Comparison of guar gum with locust bean gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, p. 165–175, 1997.

SERP, D.; MUELLER, M.; VON STOCKAR, U.; MARISON, I. W. Low-temperature electron microscopy for the study of polysaccharide ultrastructures in hydrogels. I. Theoretical and technical considerations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, p. 243–252, 2002a.

SERP, D.; MUELLER, M.; VON STOCKAR, U.; MARISON, I. W. Low-temperature electron microscopy for the study of polysaccharide ultrastructures in hydrogels. II. Effect of temperature on the structure of Ca²⁺-alginate beads. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, p. 253–259, 2002b.

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. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 2021-2024, 2003.

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

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

SHOBHA, M.S.; KUMAR, A.B.; THARANATHAN, R.N.; KOKA, R.; GAONKAR, A.K. Modification of guar galactomannan the aid of *Aspergillus niger* pectinase. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 62, p. 267-273, 2005.

SITTIKIYOTHIN W.; TORRES D.; GONÇALVES M.P. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, p. 339–350, 2005.

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

SOUZA C. F.; LUCYSZYN N.; FERRAZ F. A.; SIERAKOWSKI M. R. *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* seeds as a new source of partially substituted galactomannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 641–647, 2010.

SRIAMORNSAK, P.; THIRAWONG, N.; CHEEWATANAKORNKOOL, K.; BURAPAPADH, K.; SAE-NGOW, W.. Cryo-Scanning electron microscopy (Cryo-SEM) as a tool for studying the ultrastructure during bead formation by ionotropic gelation of calcium pectinate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 115–122, 2004.

SRIVASTAVA, M.; KAPOOR. V. P. Seed Galactomannans: An Overview. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, p. 295-317, 2005.

TAKO, M.; NAKAMURA, S. Synergistic Interaction between Agarose and D-Galacto-D-Mannan in Aqueous Media. **Agric. Biol. Chem.**, v. 52, n. 4, p. 1071 -1072, 1988.

TAKO, M. Synergistic interaction between xanthan and tara-bean gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 16, p. 239–252, 1991.

THRIMAWITHANA T.R.; YOUNGA S.; DUNSTANB D.E.; ALANY R.G. Texture and rheological characterization of kappa and iota carrageenan in the presence of counter ions. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 69–77, 2010.

TSOGA, A.; RICHARDSON, R. K.; MORRIS, E. R. Role of cosolutes in gelation of high-methoxyl pectin. Part 1. Comparison of sugars and polyols. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 907-919, 2004.

TURQUOIS, T.; TARAVEL, F.; ROCHAS; C. Synergy of the agarose-carob galactomannan blend inferred from NMR and rheological studies. **Carbohydrate Research**, v. 238, p. 27-38, 1993.

USOV, A.I. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. **Food Hydrocolloids**, v. 6, n. 7, p. 9–23, 1992.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 12, p. 301-308, 1998.

VASIL, I.K.; VASIL, V. Totipotency and embryogenesis in plant cell and tissue cultures. **In Vitro Cell Dev Biol – Plant** , v. 8, p. 117–125, 1972.

VERDEIL, J.L; ALEMANN, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T.J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends Plant Science**,v. 12, p. 245–252, 2007.

VIANNA FILHO, R. P. **Aplicação de polissacarídeos em emulsão cosméticas : análises reológicas**. Tese (Mestrado Ciências- Bioquímica) – Setor de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

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

VRIESMANN, L. C.; SILVEIRA, J. L.M.; PETKOWICZ, C. L. O. Rheological behavior of a pectic fraction from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 312–317, 2010.

WALTER, R. H. Polysaccharide Dispersions: Chemistry and Technology in Food. San Diego: Academic Press, 1998.

WATASE, M.; NISHINARI, K.; CLARK, A. H.; ROSS-MURPHY, S. B. Differential scanning calorimetry, rheology, x-ray, and NMR of very concentrated agarose gels. **Macromolecules**, v. 22, n. (3), p. 1196–1201, 1989.

WATT, D. K.; SHAUN, A. S.; O'NEILL, A.; PERCY, A. E.; BRACH, P.J. Isolation and characterisation of a partially methulated galacto- glucorano- xylo- glican, a unique polysaccharide from the red seaweed *Apophloea lyalli*. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 283- 294, 2002.

WHITNEY, S. E. C.; BRIGHAM, J. E.; DARKE, A. H.; REID, G. J. S.; GIDLEY, M. J. Structural aspects of the interaction of mannan-based polysaccharides with bacterial cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 307, p. 299–309, 1998.

WOJCIECHOWSKI, M.F. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21 century perspective. In: B.B. Klinggaard and A. Bruneau (Editors). Advances in Legume systematics, Higher Level Systematics. **Royal Botanical Gardens, Kew**, p. 5 – 35, 2003.

WU, Y.; CUI, W.; ESKIN, N. A. M.; GOFF, H. D. Fractionation and partial characterization of non-pectic polysaccharides from yellow mustard mucilage. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1535–1541, 2009.

YAPHE, W.; DUCKWORTH, M. The relationship between structures and biological properties of agar. **Proc. Int. Seaweed Symp.**, v. 7, p. 15–22, 1972.

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

ZHAN, D. F.; BROWNSEY, M. J.; RIDOUT, M. J.; MORRIS, V. J. Xanthan-locust bean interactions and gelation. **Carbohydrate Polymer**, v. 21, p. 53–58, 1993.

ZIMMERMANN, R.H.; FORDHAM, I. Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 110, n.1, p. 34-38, 1985.