

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**PERFIL QUÍMICO E DINÂMICA ESPACIAL E TEMPORAL  
DE FLAVONOIDES DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merr.].**

**Josicleia Oliveira Costa\***

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
MESTRE EM QUÍMICA, área de  
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA

**Orientador: Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters  
(Bolsista CAPES) \***

**SÃO CARLOS-SP  
2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

## **Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Josicléia Oliveira Costa, realizada em 11/03/2021.

### **Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters (UFSCar)

Prof. Dr. João Oiano Neto (EMBRAPA)

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

*Dedico este trabalho a Deus, o  
centro da minha vida, fé e gratidão.*

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus, o centro da minha vida, fé e força para prosseguir ao longo desta jornada.

Aos meus queridos e amados pais, Maria da Guia Oliveira Costa e Antônio dos Santos Costa por todo amor, carinho e dedicação. Amo vocês infinitamente.

Aos meus irmãos queridos, Saionara, Josiene, Josuel, Josélia, Josualdo e Isabel e por todo amor, apoio e conselhos. Aos meus sobrinhos, Arthur, Lara e Lucca, por todo amor, carinho e momentos especiais.

Aos meus primos e primas da república de Teresina-PI, onde compartilhamos lutas e vitórias. Agradeço por toda parceira e amizade. A todos da minha família que sempre me acolhe com muito amor e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters, pela confiança, paciência, ensinamentos e amizade. Muito obrigada pela oportunidade de trabalhar no seu grupo de pesquisa.

À CAPES, pelo apoio financeiro para realização deste estudo.

Aos professores do Departamento de Química-UFSCar pelos ensinamentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais e DQ especialmente: Victoria Peña, Lilian Miguêz, Amanda Maciel, Lorena Maria, Jeniffer Miho, Danilo Franco e Luis Cuadrado pela amizade, companheirismo e trocas de experiências.

É com coração cheio de gratidão que lhes digo: **MUITO OBRIGADA!**

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. 1: Descrição dos estágios de desenvolvimento da soja. ....	3
TABELA 1. 2: Descrição dos estágios reprodutivos da soja.....	4
TABELA 3. 1: Gradiente de fase móvel para eluição dos analitos por LC-MS. .....	19
TABELA 4. 1: Isoflavonas identificadas nos extratos de soja e analisadas por cromatografia líquida no modo de íon positivo-ESI (+) Q-Tof.....	25
TABELA 4. 2: Flavonóis identificados nos extratos de soja e analisados por cromatografia líquida em modo de íon positivo-ESI (+) Q-Tof.....	37

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. 1: Escala fenológica da soja. Adaptado por TEJO et al, 2019. ....	5
FIGURA 1. 2: Estruturas das subclasses de flavonoides. ....	9
FIGURA 3. 1: Esquema da germinação das sementes de soja BRS 284.....	15
FIGURA 3. 2: Esquema de coletas das amostras dos estágios de desenvolvimento da soja BRS 284.....	17
FIGURA 3. 3: Esquema da extração das amostras de folhas de soja BRS 284. ....	18
FIGURA 4. 1: Cromatograma de Pico de Base (BPC) dos flavonoides encontrados na soja BRS 284.....	23
FIGURA 4. 2: Sugestões das estruturas das isoflavonas encontradas nos extratos da soja.....	26
FIGURA 4. 3: Sugestão da estrutura do coumestano (4-prenilcoumestrol) encontrado na soja.....	26
FIGURA 4. 4: Cromatograma de íons extraídos (EIC) para as principais agliconas das isoflavonas encontradas nos extratos da soja. <b>A</b> daidzeína $m/z$ 255,0600; <b>B</b> gliciteína $m/z$ 285,0700; <b>C</b> genisteína $m/z$ 271,0600.....	27
FIGURA 4. 5: Espectros de massas no modo positivo para daidzeína e conjugados. <b>A1</b> daidzina; <b>A2</b> malonil-daidzina; <b>A3</b> daidzeína. ....	29
FIGURA 4. 6: Espectro de massas no modo positivo para <b>B</b> glicitina.....	30
FIGURA 4. 7: Espectros de massas no modo positivo para genisteína e conjugados. <b>C1</b> genistina; <b>C2</b> malonil-genistina; <b>C3</b> genisteína.....	31
FIGURA 4. 8: Cromatograma de íons extraídos (EIC) para as agliconas das isoflavonas encontradas nos extratos da soja. <b>D</b> 4-prenilcoumestrol $m/z$ 337,1000; <b>E</b> formononetina $m/z$ 269,0812; <b>F</b> Aformosina $m/z$ 299,0900. ...	32
FIGURA 4. 9: Espectros de massas no modo positivo para <b>D</b> 4-prenilcoumestrol; <b>E1</b> ononina; <b>E2</b> formononetina. ....	34

FIGURA 4. 10: Espectros de massas no modo positivo para <b>F1</b> Glc-afroformosina; <b>F2</b> Mal-Glc- afroformosina; <b>F3</b> afroformosina.....	35
FIGURA 4. 11: Cromatograma de íons extraídos (EIC) para aglicona m/z 287,0500 dos flavonóis glicosilados de kaempferol encontrados nos extratos de soja. <b>G1</b> e <b>G2</b> triglicosídeos de kaempferol; <b>G3</b> , <b>G4</b> , <b>G5</b> , <b>G6</b> e <b>G7</b> diglicosídeos de kaempferol; <b>G8</b> monoglicosídeo de kaempferol.....	38
FIGURA 4. 12: Estrutura da aglicona do kaempferol e as posições: 3-OH e 7-OH são mais comuns para substituições glicosídicas em flavonóis.....	40
FIGURA 4. 13: Espectros de massas no modo positivo para os triglicosídeos de kaempferol.....	42
FIGURA 4. 14: Espectro de massas dos diglicosídeos de kaempferol. <b>G3</b> kaempferol-Glc-Glc (1); <b>G4</b> kaempferol-Glc-Glc (2)..	43
FIGURA 4. 15: Espectro de massas dos diglicosídeos de kaempferol. <b>G5</b> kaempferol-Glc-Rha (1); <b>G6</b> kaempferol-Glc-Rha (2); <b>G7</b> kaempferol-Glc-Rha (3).....	44
FIGURA 4. 16: Espectro de massas do monoglicosídeo de kaempferol. <b>G8</b> kaempferol-Glc. Glc= glicose.....	45
FIGURA 4. 17: Abundância relativa da daidzeína e seus conjugados na soja ao longo dos estágios de desenvolvimento e em folhas de diferentes idades. ....	47
FIGURA 4. 18: Abundância relativa da daidzina em diferentes estágios de desenvolvimento da soja e em folhas de diferentes idades para comparar a alocação espacial..	48
FIGURA 4. 19: Abundância relativa da daidzina em folhas velhas dos estágios de desenvolvimento da soja para comparar a alocação temporal.....	48
FIGURA 4. 20: Abundância relativa da formononetina e seus conjugado na soja ao longo dos estágios de desenvolvimento e em folhas de diferentes idades....	49

FIGURA 4. 21: Abundância relativa da ononina em diferentes estágios de desenvolvimento da soja e em folhas de diferentes idades para comparar a alocação espacial.....	50
FIGURA 4. 22: Abundância relativa da ononina em folhas velhas dos estágios de desenvolvimento da soja para comparar a alocação temporal.....	51
FIGURA 4. 23: Abundância relativa da glicitina em diferentes estágios de desenvolvimento da soja e em folhas de diferentes idades para comparar a alocação espacial.....	53
FIGURA 4. 24: Abundância relativa da glicitina em folhas velhas dos estágios de desenvolvimento da soja para comparar a alocação temporal.....	53
FIGURA 4. 25: Abundância relativa da afrormosina e seus conjugados na soja ao longo dos estágios de desenvolvimento e em folhas de diferentes idades....	55
FIGURA 4. 26: Abundância relativa da afrormosina glicosilada em folhas velhas dos estágios de desenvolvimento da soja para comparar a alocação temporal.....	55
FIGURA 4. 27: Abundância relativa da genisteína e seus conjugados na soja ao longo dos estágios de desenvolvimento e em folhas de diferentes idades.....	57
FIGURA 4. 28: Abundância relativa de genistina em diferentes estágios de desenvolvimento da soja e em folhas de diferentes idades para comparar a alocação espacial.....	58
FIGURA 4. 29: Abundância relativa da genistina em folhas velhas dos estágios de desenvolvimento da soja para comparar a alocação temporal.....	58
FIGURA 4. 30: Abundância relativa do 4-prenilcoumestrol em soja ao longo dos estágios de desenvolvimento.....	59

FIGURA 4. 31: Abundância relativa dos triglicosídeos de kaempferol em soja ao longo dos estágios de desenvolvimento e em folhas de diferentes idades....	61
.....	
FIGURA 4. 32: Abundância relativa do triglicosídeo de kaempferol em diferentes estágios de desenvolvimento da soja e em folhas de diferentes idades para comparar a alocação espacial..	62
.....	
FIGURA 4. 33: Abundância relativa do triglicosídeo de kaempferol em folhas imaturas dos estágios de desenvolvimento da soja para comparar a alocação temporal.....	62
.....	
FIGURA 4. 34: Abundância relativa do monoglicosídeo de kaempferol em diferentes estágios de desenvolvimento da soja e em folhas de diferentes idades para comparar a alocação espacial..	63
.....	
FIGURA 4. 35: Abundância relativa do monoglicosídeo de kaempferol em folhas imaturas dos estágios de desenvolvimento da soja para comparar a alocação temporal.....	64
.....	
FIGURA 4. 36: Abundância relativa do diglicosídeo de kaempferol em diferentes estágios de desenvolvimento da soja e em folhas de diferentes idades para comparar a alocação espacial.....	65
.....	
FIGURA 4. 37: Abundância relativa do diglicosídeo de kaempferol em folhas imaturas dos estágios de desenvolvimento da soja para comparar a alocação temporal.....	65
.....	
FIGURA 4. 38: Abundância relativa do diglicosídeo de kaempferol em diferentes estágios de desenvolvimento da soja e em folhas de diferentes idades para comparar a alocação espacial.....	66

## RESUMO

### PERFIL QUÍMICO E DINÂMICA ESPACIAL E TEMPORAL DE FLAVONOIDES DE SOJA [*Glycine max* (L.) Merr.].

A soja (*Glycine max*) é uma espécie de leguminosa originária da China, pertencente à família Fabaceae. A cultura da soja está exposta durante todo o seu ciclo a diferentes fatores como ataque de insetos-praga e as condições ambientais, que podem afetar o desenvolvimento da planta e, conseqüentemente, sua produtividade. Alguns estudos classificam os flavonoides como constituintes relevantes na defesa da soja contra injúria de herbívoros. Apesar do potencial papel de flavonoides contra herbívoros, pouco se sabe sobre a variabilidade e alocação espacial e temporal dessas defesas nas folhas de soja e ao longo dos estágios de desenvolvimento. Diante do exposto, este trabalho visa investigar o perfil químico de um cultivar comercial de soja, comparando o perfil de flavonoides de diferentes folhas ao longo de diferentes estágios de desenvolvimento. As sementes de soja convencional BRS 284, foram germinadas e mantidas em casa de vegetação. Amostras de folhas velhas, jovens e imaturas dos estágios vegetativo emergencial (VE), vegetativo cotiledonar (VC), vegetativos 1, 2, 3, 4 e 5 (V1 a V5), e reprodutivos 1 e 2 (R1 e R2) foram coletadas e extraídas em metanol:água 1:1 (v/v) e os extratos foram analisados por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS). Os principais flavonoides das folhas de soja foram identificados pelos espectros de massas e quantificados de forma relativa. Durante os estágios de desenvolvimento, foram encontrados níveis mais elevados de mono, di e triglicósídeos isoméricos de kaempferol alocados nas folhas imaturas e jovens. Os estágios iniciais, VE e VC, tiveram uma maior concentração de isoflavonas como daidzeína, genisteína e seus glicoconjugados, sendo estes mais abundantes nas folhas velhas. O perfil químico e a dinâmica de alocação dos flavonoides estudados fornecem informações sobre as diferentes estratégias empregadas pela planta para alocar seus recursos e mostram que folhas de diferentes idades possuem diferenças em suas composições, possivelmente de acordo com seu contexto fisiológico e ecológico. Portanto, evidências do papel dos flavonoides constitutivos no mecanismo de defesa da soja ajudarão no desenvolvimento de métodos que podem contribuir para a produtividade agrícola, adaptabilidade e resistência a diversos agentes estressores de maneira mais sustentável.

**Palavras-chave:** Soja, flavonoides, isoflavonas, defesas, metabólitos secundários.

## ABSTRACT

### CHEMICAL PROFILE AND SPATIAL AND TEMPORAL DYNAMICS OF SOYBEAN FLAVONOIDS [*Glycine max* (L.) Merr.].

The soybean (*Glycine max*) is a legume species originally from China, belonging to the Fabaceae family. This crop is exposed throughout its cycle to attack by different species of insect pests, which can affect the plant development and, consequently, its productivity. Some studies classify flavonoids as relevant constituents in the defense of soybean against injury to herbivores. Despite the potential role of flavonoids against herbivores, little is known about the variability and spatial and temporal allocation of these defenses in soybean leaves and throughout its developmental stages. Therefore, this work aims to investigate the chemical profile of a commercial soybean cultivar, comparing the flavonoid profiles from different leaves over different developmental stages. Conventional soybean seeds BRS 284 were germinated and grown in a greenhouse. Samples of old, young and immature leaves from emergency stage (VC), cotyledon stage (VE), vegetative stages 1, 2, 3, 4 and 5 (V1 to V5), and reproductive stages 1 and 2 (R1 and R2) were collected and extracted in 1:1 (v/v) methanol: water, and the extracts were analyzed by LC-MS. The main flavonoids of soybean leaves were identified by mass spectra and relatively quantified. During the developmental stages, higher levels of kaempferol mono, di and isomeric triglycerides found in immature and young leaves were found. The initial stages, emergency vegetative and coethylene vegetative, showed higher concentrations of isoflavones such as daidzein, genistein, glycitein and their glycoconjugates, which are more abundant in old leaves. The chemical profile and allocation dynamics of the studied flavonoids provide information on the different strategies used by the plant to allocate its resources, demonstrating that leaves of different ages differ in their composition, possibly according to their physiological and ecological context. Therefore, evidence of the role of constitutive flavonoids in the defense mechanism of soy will help in the development of methods that can contribute to agricultural productivity, adaptability and resistance to various stressors in a more sustainable way.

**Keywords:** Soybean, flavonoids, isoflavones, defenses, secondary metabolites.

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO .....	1
1. 1- Soja.....	1
1. 2 - Mecanismos de Defesa das Plantas.....	6
1. 3- Principais Defesas da Soja.....	8
1. 4 - Aspectos Relevantes para o Sistema Proposto.....	12
2 - OBJETIVOS.....	13
3- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	14
3. 1 - Obtenção e Cultivo das Plantas.....	14
3. 2 - Coleta das Amostras.....	16
3. 4 - Extração das Amostras.....	18
3. 5 - Condição de Análise por LC-MS.....	19
3. 6 - Análise de Dados.....	21
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4. 1 - Identificação dos Compostos Presentes nos Extratos da Soja BRS 284. .....	22
4. 1. 1 - Identificação das Isoflavonas.....	22
4. 1. 2 - Identificação dos Flavonóis.....	36
4. 2 - Quantificação Relativa dos Flavonoides.....	46
4. 2. 1- Quantificação Relativa, Alocação Espacial e Temporal das Isoflavonas. .....	46
4. 2. 2 - Quantificação relativa, alocação espacial e temporal dos flavonóis	60
4. 3 - Análise da dinâmica de alocação dos flavonoides .....	67
5 - CONCLUSÕES.....	69
6 - REFERÊNCIAS.....	70

## 1- INTRODUÇÃO

A soja é um dos mais antigos produtos agrícolas que a humanidade conhece e um dos alimentos mais cultivados no Brasil e no mundo. De acordo com a safra de 2019/2020, o Brasil consolida-se como o maior produtor e exportador mundial desse grão, multiplicando sua produção para 124,8 milhões de toneladas, sendo o principal item da produção agrícola e uma cultura de grande importância econômica para o país (ARAÚJO, 2008; CONAB, 2020).

A maior parte da soja produzida é empregada na alimentação humana (óleo, leite de soja, tofu) e animal (farelo de soja) devido ao seu alto teor de proteínas e lipídios e possui uma variedade de metabólitos secundários que são responsáveis pelas suas propriedades biológicas como: prevenção de doenças cardiovasculares, atividade estrogênica, antioxidante, antifúngica e antitumoral (FENG et al., 2020; LEE et al., 2019).

### 1.1- Soja

A soja (*Glycine max*) é uma espécie de leguminosa pertencente à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae e tem como centro de origem o continente asiático, na região da antiga Manchúria, na China. Essa leguminosa é uma planta anual que apresenta caule herbáceo e ereto chegando a medir de 80 a 150 cm de comprimento. As suas folhas são unifolioladas opostas e trifolioladas alternadas, com folíolos ovados. Quanto ao ciclo de vida, pode variar de 80 a 200 dias e pode ser interferido por fatores abióticos (temperatura, irradiação, escassez hídrica e entre outros) e do genótipo da cultivar (CANTELLI, 2016; FLORENCIO, 2017; SOUZA, 2014).

A classificação dos estágios fenológicos de desenvolvimento das plantas de soja (Tabelas 1.1 ,1.2 e Figura 1.1) foi proposta por (FEHR e CAVINESS, 1977) a qual são empregadas as letras “V” e “R” para designar os

estágios vegetativos (fases de estabelecimento e desenvolvimento das plantas) e reprodutivos (fases de florescimento e maturação das vagens), respectivamente, seguidos dos índices numéricos que diferenciam estágios específicos nessas duas fases de desenvolvimento da planta, com exceção dos estágios VE (emergência) e VC (cotilédone) (SOUZA, 2014).

TABELA 1. 1: Descrição dos estágios de desenvolvimento da soja.

Símbolo	Denominação	Descrição
VE	Emergência	Os cotilédones estão acima da superfície do solo
VC	Cotilédone desenvolvido	Cotilédones totalmente abertos
V1	Primeiro nó	As folhas unifoliadas estão totalmente abertas
V2	Segundo nó	A primeira folha trifoliada aberta
V3	Terceiro nó	A segunda folha trifoliada aberta
V4	Quarto nó	A terceira folha trifoliada aberta
V5	Quinto nó	A quarta folha trifoliada aberta
V(n)	Enésimo nó	"Enésimo nó ao longo da haste principal com trifólio aberto

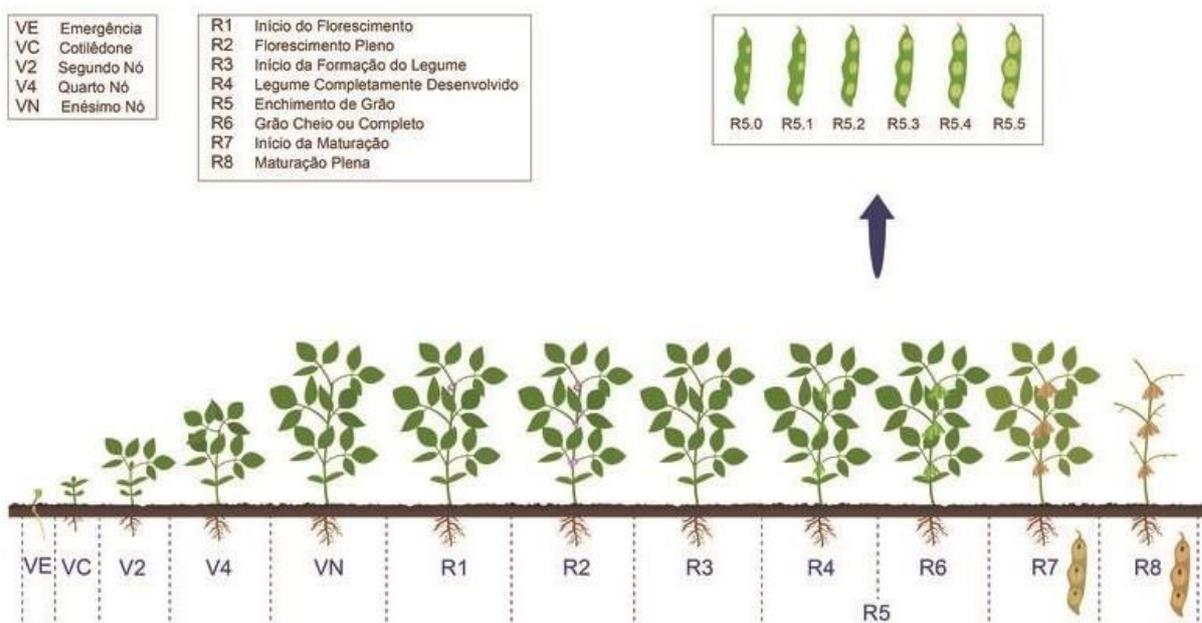
Fonte: (FEHR e CAVINESS,1977).

TABELA 1. 2: Descrição dos estágios reprodutivos da soja.

Símbolo	Denominação	Descrição
R1	Início do florescimento	Uma flor aberta em qualquer nó da haste principal
R2	Florescimento pleno	Uma flor aberta em um dos dois nós superiores da haste principal
R3	Início da frutificação	Vagem com 0,5 a 2 cm em um dos quatro nós superiores da haste principal
R4	Frutificação plena	Maioria das vagens no terço superior da haste principal com comprimento de 2 a 4 cm
R5	Início da granação	Até 10% de granação máxima na maioria das vagens localizadas no terço superior da haste principal
R6	Final da granação	Grão cheio em um dos quatro nós superiores da haste principal
R7	Início da maturação	Uma vagem com coloração de madura na haste principal
R8	Maturação plena	Mais de 95% das vagens com coloração de madura

Fonte: (RITCHIE et al.1982) adaptada por CÂMARA (2006).

FIGURA 1. 1: Escala fenológica da soja. Adaptado por TEJO et al, 2019.



Durante todo o seu ciclo, a cultura da soja está exposta ao ataque de diferentes espécies de insetos-pragas que são responsáveis por cerca de 18% das perdas mundiais na produção agrícola. Destacam-se as lagartas da ordem Lepidoptera, como *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatilis*, além de percevejos fitófagos (MOSCARDI et al., 2012; OERKE, 2006). As condições ambientais, tais como luz, temperatura e nutrientes, também são fatores determinantes para a produtividade da soja (SOUZA, 2014). Por outro lado, a soja é uma fonte rica em vários compostos químicos, como as isoflavonas e os compostos fenólicos, que colaboram para muitos efeitos benéficos à saúde humana e para sua adaptabilidade aos estresses ambientais (YUN et al., 2020).

## 1.2 - Mecanismos de Defesa das Plantas

Por serem organismos sésseis, as plantas produzem uma ampla gama de metabólitos secundários altamente dinâmicos que atuam como resposta de defesa ao ataque de patógenos e insetos herbívoros. Em grande parte, essas defesas devem-se à um conjunto de moléculas pequenas e proteínas tóxicas e dissuasivas que podem impedir a alimentação de insetos não adaptados. As defesas químicas de plantas podem ser divididas entre constitutivas e indutivas (ISAH, 2019; SOARES e MACHADO, 2007; ZHOU et al., 2015).

As defesas constitutivas são metabólitos expressos constantemente nas plantas, podendo ser composta por substâncias químicas naturais provenientes do metabolismo secundário (tais como, alcaloides, terpenoides, antocianinas, quinonas e fenóis), algumas biomoléculas oriundas do metabolismo primário e estruturas morfológicas (tricomas, cabelos, espinhos e folhas mais espessas) (AOYAMA e LABINAS, 2012; DE FREITAS et al., 2018; SOARES e MACHADO, 2007).

As defesas decorrentes da resistência induzida estão relacionadas com a mudança fisiológica e morfológica resultante ao dano causado por herbívoro às plantas. À vista disso, os sistemas de defesa induzíveis permitem que mais energia seja direcionada para o crescimento e reprodução na ausência de herbivoria, sendo uma forma de conservação de recursos (EL-WAKEIL et al. 2010; MACDONALD e BACH, 2005).

A resistência induzida vem sendo investigada em várias espécies de vegetais importantes para agricultura, incluindo arroz, tomate, trigo e soja. Na literatura existem muitos exemplos de compostos de diferentes classes como fenólicos, alcaloides e glucosinolatos empregados na defesa das plantas (BI E FELTON, 1995; HOFFMANN-CAMPO et al. 2001; PIUBELLI et al. 2005).

O gossipol (diterpeno dimérico do algodão) mostrou-se um bom repelente contra diferentes insetos e nocivo para *Heliothis virescens* (lagarta do tabaco). Também foi visto que os compostos fenólicos (quercetina-3-O-glucosilgalactosídeo, genisteína e rutina) encontrados em extrato etanólico de folha de soja demonstraram-se bioativos e coibidores do crescimento do inseto *Trichoplusia ni* (Hübner) (FÜRSTENBERG-HÄGG et al., 2013; HOFFMANN-CAMPO et al., 2001). Vale ressaltar que os fenólicos têm diversos efeitos nas plantas e nas suas interações com outros organismos e são relevantes para estratégia de defesa das mesmas. Ressalta-se que essa defesa varia com o tipo e modo de ação dos indivíduos envolvidos na interação (APPEL, 1993).

Ensaio de alimentação com folhas de *Arabidopsis thaliana* mostraram que a variação de glucosinolatos dentro de uma folha afeta o padrão de forrageamento de *Helicoverpa armígera* (KÖHLER et al., 2015). De maneira similar, o alcaloide nicotina dificulta a alimentação dos insetos e inibe receptores neurais de mamíferos (AGRAWAL et al., 2012).

Além das estratégias de resistência constitutivas e induzidas, plantas também utilizam mecanismos de defesa indiretos que são focados em atrair animais de outros níveis tróficos para que esses combatam o herbívoro. São baseados em sua grande maioria na liberação de compostos orgânicos voláteis (VOCs) que irão atrair predadores através do aroma (ALJBORY e CHEN, 2017). A estratégia de defesa usada pela planta vai depender da idade da planta, do inseto envolvido na interação e do estímulo percebido durante a ação. Como visto, essas defesas têm potencial de afetar a sobrevivência, fecundidade e o desenvolvimento de insetos fitófagos (WAR et al. 2012; ZHOU et al., 2015).

### 1.3- Principais Defesas da Soja

Cada fase de desenvolvimento da planta de soja (estabelecimento da plântula, crescimento vegetativo e produção de sementes) está sujeito a estresses bióticos (animais, insetos, patógenos,) e abióticos (radiação ultravioleta, temperatura, deficiência hídrica e outros) que podem afetar o seu desenvolvimento e conseqüentemente, sua produtividade (BOEGE e MARQUIS, 2005; PICHERSKY e LEWINSOHN, 2011). Por outro lado, a soja utiliza compostos orgânicos oriundos do seu metabolismo secundário para resistir aos estresses e aos danos causados por agentes bióticos e abióticos (ZHOU et al., 2015).

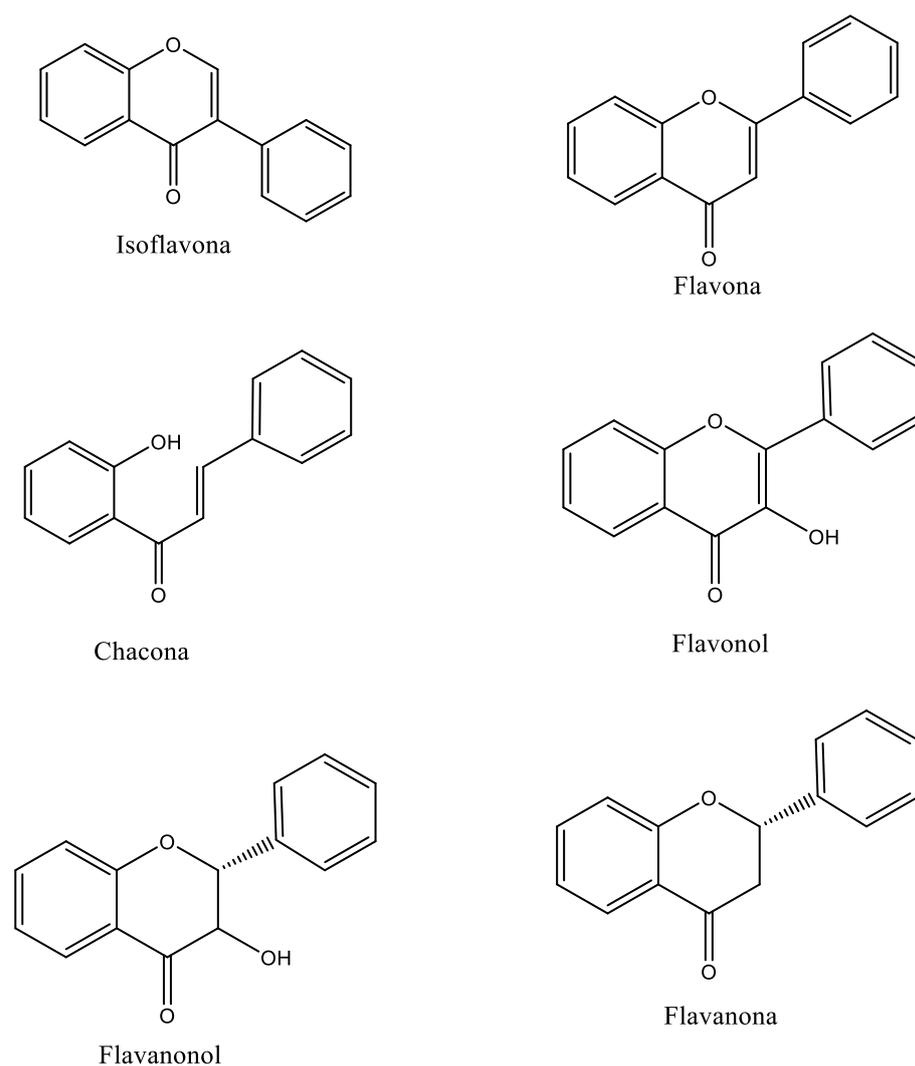
Esses compostos orgânicos, denominados metabólitos secundários, não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução da planta, porém desempenham um papel importante na adaptação, sobrevivência e evolução da espécie (WAR et al., 2018). Dentre os tipos de metabólitos secundários que estão envolvidos na defesa das plantas contra insetos, destaca-se os compostos nitrogenados (alcaloides, aminoácidos não proteicos e glicosídeos cianogênicos); terpenoides (óleos essenciais, triterpenos e saponinas) e compostos fenólicos (ligninas, flavonoides e taninos) (WAR et al., 2012).

Dentre os metabólitos secundários produzidos pela soja, os flavonoides são os principais compostos. Os flavonoides englobam uma grande família de substâncias químicas fenólicas amplamente distribuídas nas plantas, que funcionam como inibidores de enzimas, pigmentos, defesa contra perturbações de fitopatógenos e herbívoros e proteção frente à radiação ultravioleta. Especificamente na soja, muitos estudos na literatura apontam para a atuação desses fenólicos na defesa contra insetos herbívoros, causando mortalidade da fase imatura, menor crescimento e ganho de peso e aumento no ciclo de vida do inseto (PIUBELLI et al., 2009). Assim, os flavonoides podem funcionar como atraentes, deterrentes, repelentes ou tóxicos aos insetos,

dependendo de sua concentração na planta (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001; SIMMONDS, 2001; SOUZA, 2014).

Os flavonoides são oriundos de uma rota biossintética mista, com parte do seu esqueleto difenilpropano ( $C_6-C_3-C_6$ ) formado pela via do chiquimato e outra parte pela via do acetato (CUYCKENS e CLAEYS, 2004; GOMÉZ, 2018; PEREIRA et al., 2016). Esses polifenóis naturais podem ser classificados em diferentes subclasses que se dividem de acordo com os padrões de oxidação e substituição, tais como: flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanonóis, flavonóis, antocianidinas e chalconas, como visto na (Figura 1.2) (DE VILLIERS et al., 2015; PEREIRA et al., 2016).

FIGURA 1. 2: Estruturas das subclasses de flavonoides.



Sabe-se que a estrutura e a função dos flavonoides variam de acordo com sua substituição como a glicosilação, esterificação, hidroxilação e metilação entre outros. Essas alterações estruturais são importantes para modificar a polaridade, toxicidade, solubilidade e direcionamento intracelular dos flavonoides estocado nos vacúolos das células das plantas (HARBORNE, 1994; RIBANI, 2006).

Diferentes subclasses de flavonoides são encontradas em leguminosas, mas a soja apresenta apenas isoflavonas e flavonóis. As principais isoflavonas encontradas na soja são genisteína e daidzeína, predominando nas suas formas glicosiladas (genistina e daidzina) e malonilglicosiladas (6''-*O*-malonil-genistina e 6''-*O*-malonil-daidzina) as quais encontram-se em altos níveis nas sementes e nos primeiros estágios de vida, logo após a germinação (ROMANI et al., 2003). Por outro lado, os flavonóis do tipo quercetina e kaempferol predominam em níveis elevados nas folhas de plantas adultas e são encontrados nas formas mono, di ou triglicosiladas. Na soja, a concentração e o tipo de flavonoide variam de acordo com diversos fatores, como as partes da planta e seus estágios de desenvolvimento (CUYCKENS e CLAEYS, 2004; KACHLICKI et al., 2016; HOFFMANN-CAMPO et al, 2006; STRACKE et al., 2010; PEREIRA et al., 2016).

Estudos mostram a toxicidade desses compostos frente aos danos causados por insetos, em que a presença de rutina e genisteína foi relatada em alguns genótipos de soja e demonstraram efeitos negativos no comportamento alimentar e nos parâmetros biológicos (desenvolvimento larval, sobrevivência e peso das pupas) de larvas da *Anticarsia gemmatalis* (PIUBELLI et al., 2005), *Trichoplusia ni* (Hübner) (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001) e *Spodoptera frugiperda* (BENTIVENHA et al., 2018; SILVA et al., 2016). As isoflavonas coumestrol, phaseol e afrormosina foram isoladas de frações metanólicas das folhas de soja e causaram mortalidade de *Pseudoplusia includens*. Daidzeína,

quando incorporada à dieta artificial, inibiu significativamente o crescimento de larvas de *Spodoptera litura* três dias após a alimentação (ZHOU et al., 2011).

As folhas de soja danificadas por *Anticarsia gemmatalis* exibem diferenças na composição química, com aumento dos níveis de isoflavonas, possivelmente devido a uma resposta induzida relacionada a mecanismos de defesa (BORTOLI et al., 2012). Os danos da *Spodoptera litura* em folhas de soja resultaram em um acúmulo induzido da flavona 4',7'-diidroxiflavona e das isoflavonas agliconas (daidzeína e formononetina) e daidzina (BENTIVENHA et al., 2018; MURAKAMI et al., 2014). A identificação e variação desses compostos químicos nas folhas de soja como defesa da planta confirmam a importância da busca por mais informações sobre a influência desses nas interações planta-inseto (PIUBELLI et al., 2005).

## **1.4 - Aspectos Relevantes para o Sistema Proposto**

As cultivares resistentes de soja costumam apresentar concentração de flavonoides mais altas, os quais parecem ter um papel importante na resistência das plantas contra diferentes estresses. Estudos realizados com dieta artificial e folhas demonstraram que flavonoides reduzem a massa dos insetos e causam a prolongação dos seus estágios larvais (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001; NEGRA, 2019; PIUBELLI, et al., 2005).

Embora seja descrita a identificação de vários flavonoides na soja e seus possíveis efeitos na defesa frente a insetos herbívoros e outros estresses, pouco se sabe sobre a variação, a alocação espacial e temporal desses compostos distribuídos nas folhas de diferentes idades da soja ao longo dos estágios de desenvolvimento, as suas funções ecológicas e fisiológicas na planta. Essas informações fornecerão evidências das diferentes estratégias de alocação dos flavonoides constitutivos utilizados pela soja. Portanto, o estudo desses compostos contribuirá para o entendimento da sua função na interação planta-inseto.

## 2 - OBJETIVOS

Este trabalho visa investigar o perfil químico de um genótipo comercial (BRS 284) da soja (*Glycine max*) ao longo de diferentes estágios de desenvolvimento (alocação temporal) e em diferentes folhas (alocação espacial). Nesse contexto, são propostos os seguintes objetivos específicos:

- Identificar os flavonoides presentes nas folhas de soja analisadas com base nos espectros de massas obtidos;
- Quantificar de maneira relativa os flavonoides identificados;
- Comparar os perfis químicos das folhas entre diferentes estágios de desenvolvimento da planta (VE, VC, V1, V2, V3, V4, V5, R1 e R2);
- Comparar os perfis químicos entre diferentes folhas (imaturas, jovens e velhas).

### **3- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

#### **3.1 - Obtenção e Cultivo das Plantas**

As sementes de soja (*Glicine max*) do genótipo BRS 284, cultivar não transgênica, foram cedidas pela Empresa Di Solo Sementes (São Carlos-SP). As sementes foram selecionadas e germinadas em sementeiras, com uma mistura de terra vegetal da Spagnol Plantas Ornamentais, composta de (carvão ativado, húmus de minhoca, casca de pínus e terra preta), substrato da Vida Verde (turfa, carvão vegetal, superfosfato simples e casca de pínus) e areia grossa na proporção (1:1:1) e mantidas na casa de vegetação do Departamento de Botânica da UFSCar a  $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$  e  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa. Quando emergiram os cotilédones, as plântulas destinadas às análises nos estágios VE, VC, V1 e V2 foram cuidadosamente transplantadas para vasos plásticos N° 02 (1L) e os estágios V3, V4, V5, R1 e R2 para vasos N° 04 (4,9L), a fim de evitar estresse das raízes por falta de espaço e irrigadas sempre que necessário (Figura 3.1). Este experimento ocorreu durante o período de outubro a dezembro de 2019.

FIGURA 3. 1: Esquema da germinação das sementes de soja BRS 284.



**Vaso n° 02 (1L)**



**(VE,VC,V1 e V2)**

**Vaso n° 04 (4,9L)**

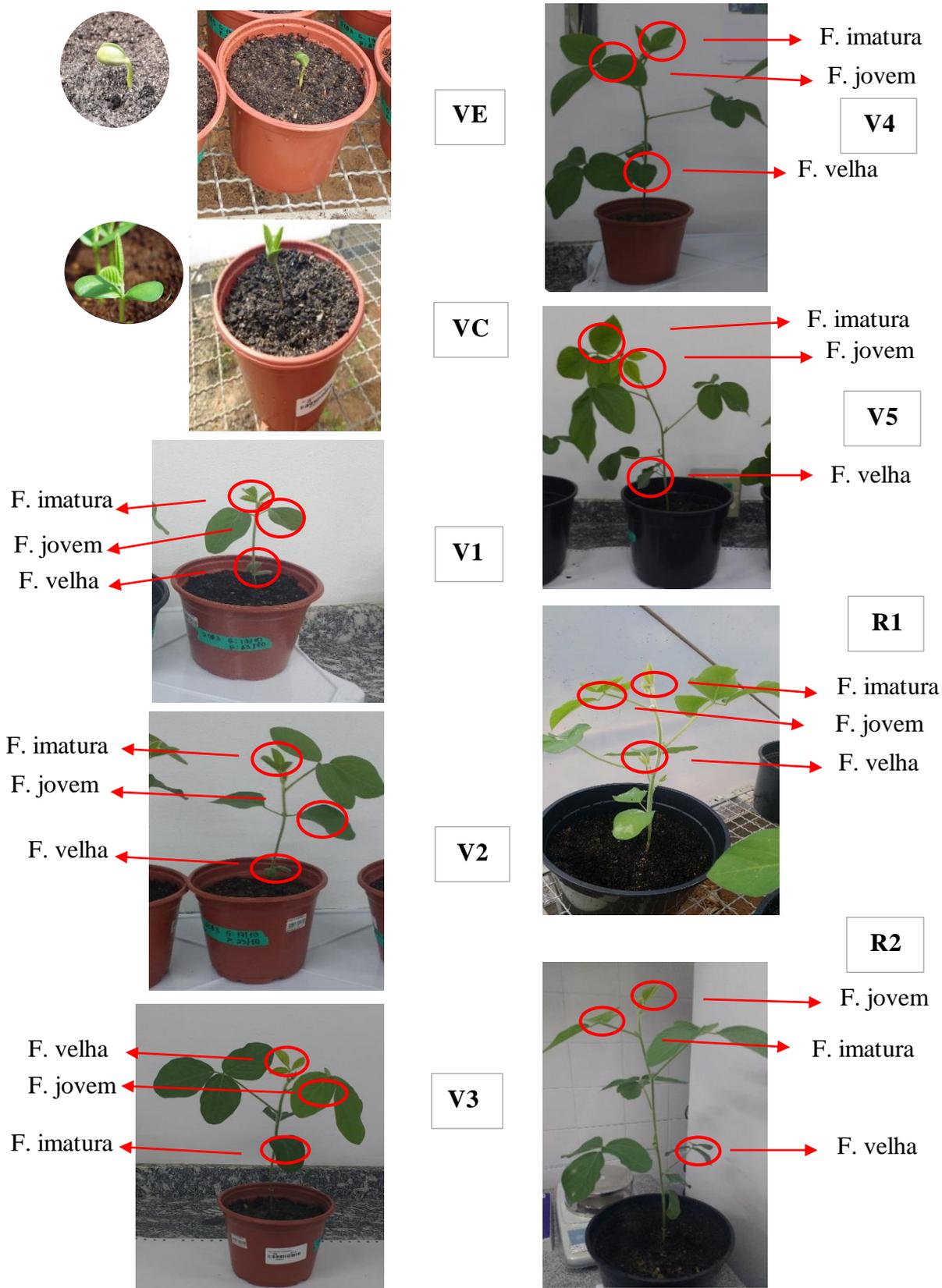


**(V3, V4, V5, R1 e R2)**

### 3. 2 - Coleta das Amostras

Nas plantas amostradas no estágio VE foi coletado somente o cotilédone em expansão, enquanto no estágio VC foram coletados o cotilédone já desenvolvido e a primeira folha unifoliolada imatura. Para os estágios V1, V2, V3, V4, V5, R1 e R2 três folhas de diferentes idades foram coletadas: velha (a primeira folha próxima ao solo), jovem (última folha superior totalmente desenvolvida) e imatura (última folha superior que não se encontra totalmente estendida); as quais correspondem a diferentes folhas em cada estágio, conforme ilustrado na Figura 3.2. Para as coletas das amostras em cada estágio foram utilizadas três plantas (triplicata biológica). Ao todo foram investigados 9 estágios, usando 27 plantas e um total de 75 amostras. As plantas foram transferidas da casa de vegetação para o laboratório e devido ao estresse do deslocamento, mantidas em repouso por 30 minutos. Em seguida, as folhas frescas foram coletadas com auxílio de uma tesoura, rapidamente pesadas e envolvidas em folhas de papel alumínio e imersas em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em um ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a etapa de extração.

FIGURA 3. 2: Esquema de coletas das amostras dos estágios de desenvolvimento da soja BRS 284.



### 3. 4 - Extração das Amostras

As amostras de folhas congeladas foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL em solvente extrator metanol (Synth) destilado:água Milli-Q 1:1 (v/v). O volume da mistura dos solventes foi ajustado de acordo com a massa de cada amostra para facilitar a homogeneização. Para folhas dos estágios VE, VC, V1 e V2 foram adicionados de 5 a 10 mL do solvente e para os estágios V3, V4, V5, R1 e R2 foram utilizados de 10 a 15 mL.

As amostras foram processadas usando um homogeneizador Ultra Turrax (IKA-T10 B S32) e centrifugadas a 10000 g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes resultantes filtrados através de filtros de seringa de nylon (Analítica), com diâmetro de 13 mm e poros de 0,22 µm. Os filtrados foram transferidos para tubos Falcon de 15 mL e mantidos a 4°C até as análises por LC-MS (Figura 3.3).

FIGURA 3. 3: Esquema da extração das amostras de folhas de soja BRS 284.



### 3.5 - Condição de Análise por LC-MS

Os extratos obtidos após a filtração foram diluídos 1:1 com metanol grau MS (Sharlau) e analisados por LC-MS em um instrumento Agilent 6545 Q-ToF. O analisador é acoplado a um sistema UPLC Agilent 1260 Infinity II. As condições cromatográficas e espectrométricas foram otimizadas baseando-se nos parâmetros já utilizados em trabalhos desenvolvidos no grupo de pesquisa com flavonoides.

Utilizou-se um sistema binário de bombas com 1  $\mu$ L de amostra injetada, e a separação dos compostos orgânicos foi obtida em uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1x50mm, 1,8 $\mu$ m) mantida a 35 °C e utilizando um fluxo de 0,4 mL/min. A fase móvel foi composta por água Milli-Q (LC-PARK, Direct-Q) como o solvente A acetonitrila (TEDIA, High Purity Solvents) o solvente B, ambos contendo 0,1% ácido fórmico (Sigma- Aldrich, Fluka Analytical) grau massas aproximadamente 98% de pureza. O gradiente de eluição utilizado encontra-se na (Tabela 3.2).

TABELA 3. 1: Gradiente de fase móvel para eluição dos analitos por LC-MS.

<b>Time(min)</b>	<b>A%</b>	<b>B%</b>
0,01	90	10
5,00	80	20
9,00	60	40
9,10	0	100
12,00	0	100
12,10	90	10
15,00	90	10

As condições do espectrômetro de massas foram definidas como segue: temperatura do gás de secagem 325 °C; taxa de fluxo de gás de secagem 12 (L/min); pressão do gás do nebulizador 25 psi; temperatura do gás de revestimento 350 °C; taxa de fluxo do gás de bainha 11 (L/min); voltagem do capilar 3500 V; voltagem do nozzle 1000 V em modo de íons positivos e varredura entre  $m/z$  100 e 1000 Da. Os dados foram adquiridos com o Mass Hunter Acquisition B.08.00 e analisados por meio do Mass Hunter Qualitative Software, versão B.08.00 (Agilent Technologies, CA, EUA).

### 3. 6 - Análise de Dados

As áreas integradas dos picos foram registradas de acordo com os Cromatogramas de Íons Extraídos (EIC) dos íons  $[M+Na]^+$  característicos para cada glicosídeo. Esses valores foram normalizados pela massa da amostra e o volume de extração (área.  $g^{-1}$ .  $mL^{-1}$ ). A fim de efetuar as comparações das médias das concentrações relativas dos flavonoides entre diferentes estágios de desenvolvimento e idades das folhas, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA). Diante das diferenças observadas, foi aplicado o teste ANOVA de fator único com pós teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas utilizando o software RStudio.

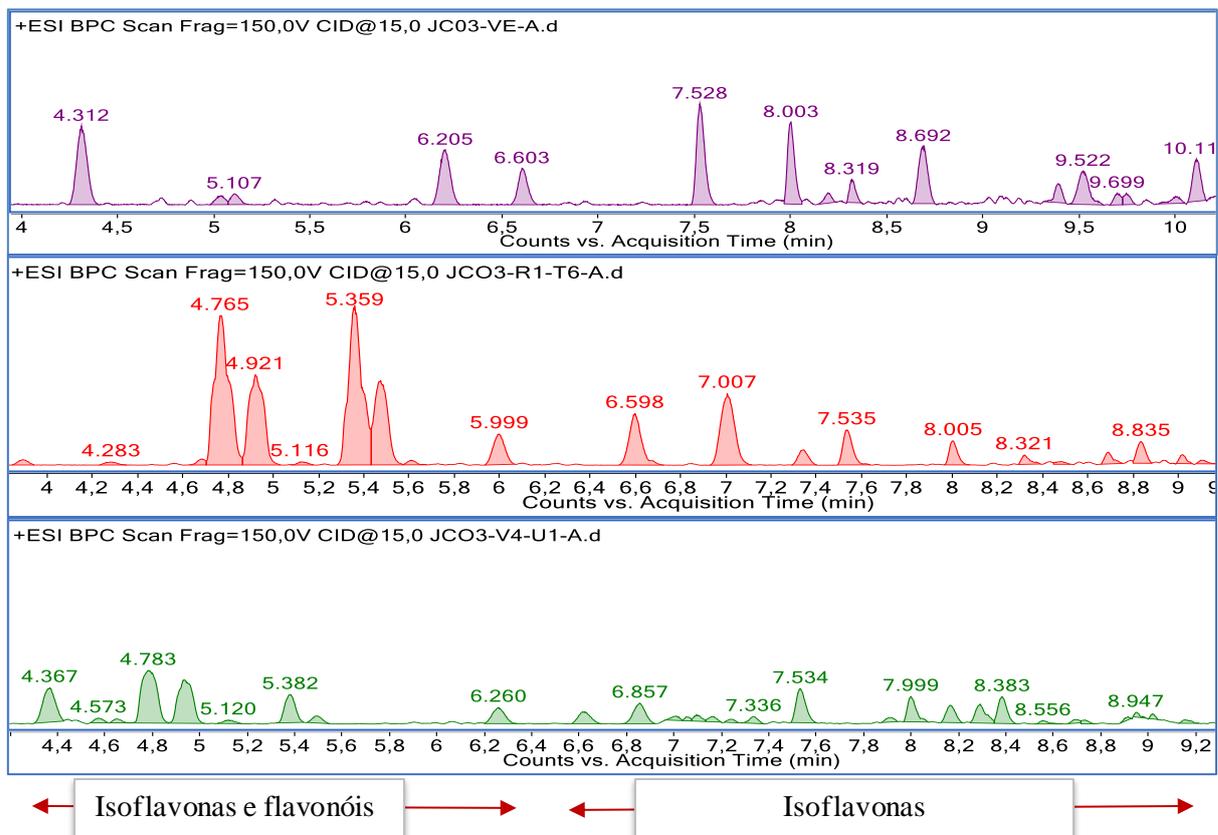
## **4- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4. 1 - Identificação dos Compostos Presentes nos Extratos da Soja BRS 284.**

#### **4. 1. 1 - Identificação das Isoflavonas**

Para identificação dos perfis químicos dos extratos de folhas frescas de diferentes estágios de desenvolvimento da soja convencional, BRS 284, o método cromatográfico e os parâmetros ESI (+)-MS foram otimizados a fim de possibilitar uma separação adequada dos analitos e a identificação dos flavonoides através das razões  $m/z$  dos íons  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$ , onde M representa a massa molecular do analito em questão. Essa triagem de compostos foi realizada tendo como base os flavonoides presentes na soja e derivados descritos na literatura. Diante disso, foi possível identificar nos extratos de folhas de idades e estágios diferentes, vinte e um flavonoides pertencentes às classes de isoflavonas e flavonóis. Na (Figura 4.1) são apresentados os Cromatogramas de Pico de Base (BPC) desses compostos encontrados.

FIGURA 4. 1: Cromatograma de Pico de Base (BPC) dos flavonoides encontrados na soja BRS 284.



A partir dos Cromatogramas de Íons Extraídos (EIC) relativos aos sinais  $m/z$  das agliconas, dos tempos de retenção e dos espectros de massas, foi possível sugerir treze isoflavonas. As sugestões de identificação para os picos encontram-se na (Tabela 4.1), representadas por códigos de letras para cada classe de substâncias que possuem a mesma porção aglicona e em ordem crescente de tempo de retenção. As massas teóricas ou exatas utilizadas para o cálculo do erro de massa em (ppm) foram obtidas no software de tratamentos de dados do equipamento, Mass Hunter Qualitative® (Agilent). Nos extratos foliares estão presentes as principais isoflavonas de soja, daidzeína e genisteína, bem como suas formas glicoconjugadas. Outras isoflavonas menos recorrentes em soja como formononetina, afrormosina e 4-prenilcoumestrol (phaseol) também foram identificadas.

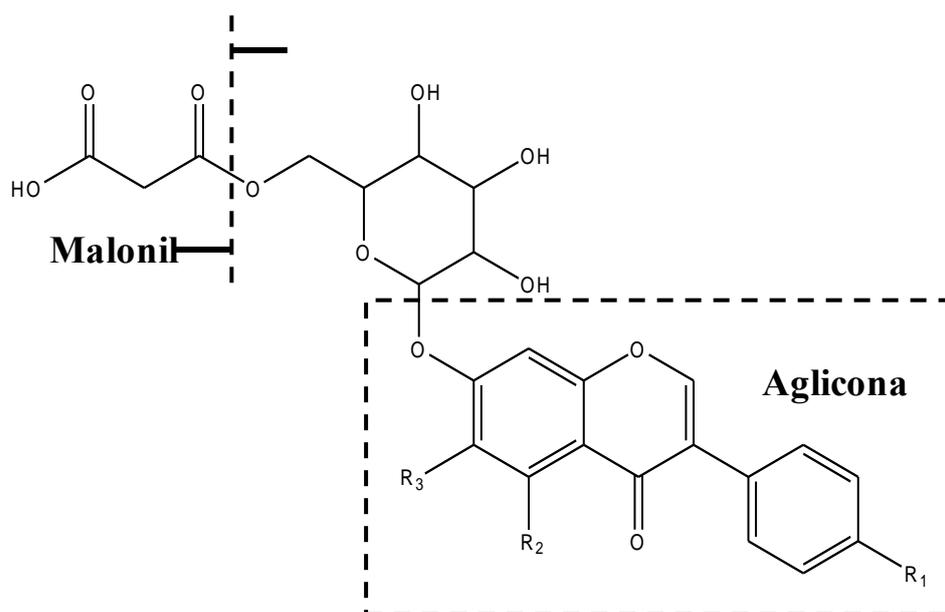
É importante mencionar que, devido à indisponibilidade de padrões comerciais, não foi possível a confirmação da identificação dos compostos. Embora não tenhamos informação sobre as posições dos substituintes e os espectros de massas não permitam a diferenciação dos isômeros, as sugestões das estruturas levaram em conta padrões estruturais comuns e compostos específicos já relatados na soja na literatura.

A maioria dos flavonoides identificados apresentaram íons moleculares protonados  $[M+H]^+$  e adutos de sódio  $[M+Na]^+$ . Glicoconjugados de isoflavonas apresentaram sinais para íons  $[M+Na]^+$  muito mais intensos do que  $[M+H]^+$  nos espectros de massas. Os conjugados de glicose e malonil-glicose foram representados como: Glc e Mal-Glc, respectivamente. As sugestões das estruturas das isoflavonas encontradas na soja BRS 284 estão demonstradas nas (Figuras 4.2 e 4.3)

TABELA 4. 1: Isoflavonas identificadas nos extratos de soja e analisadas por cromatografia líquida no modo de íon positivo-ESI (+) Q-Tof.

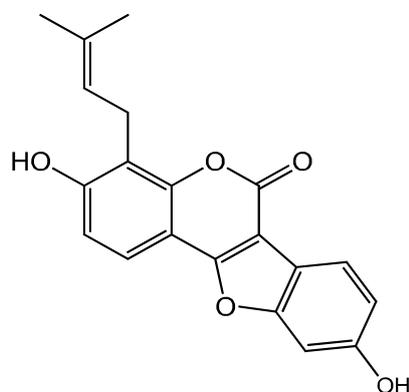
Classe	Tempo de retenção	Composto	Espécie Iônica	Teórica (m/z)	Experimental (m/z)	Erro (ppm)	Massa Monoisotópica (m/z)
<b>A1</b>	4,31	Daidzina	[M+Na] <sup>+</sup>	439,1000	439,1005	-1,14	255,0651; 439,1005
<b>B</b>	4,70	Glicitina	[M+Na] <sup>+</sup>	469,1105	469,1115	-2,13	285,0755; 469,1099
<b>C1</b>	6,21	Genistina	[M+Na] <sup>+</sup>	455,0949	455,0940	1,98	271,0604; 455,0940
<b>A2</b>	6,80	Malonil-daidzina	[M+Na] <sup>+</sup>	525,1003	525,1003	0,00	255,0654; 525,1003
<b>C2</b>	8,02	Malonil-genistina	[M+Na] <sup>+</sup>	541,0953	541,0940	2,40	271,0601; 541,0940
<b>E1</b>	8,14	Ononina	[M+Na] <sup>+</sup>	453,1164	453,1156	1,77	269,0805; 453,1156
<b>F1</b>	8,20	Glc-Afrormosina	[M+Na] <sup>+</sup>	483,1267	483,1265	0,41	299,0920; 483,1265
<b>A3</b>	8,68	Daidzeína	[M+H] <sup>+</sup>	255,065 2	255,0650	0,78	255,0645
<b>F2</b>	9,15	Mal-Glc-afrormosina	[M+Na] <sup>+</sup>	569,1266	569,1261	0,88	299,0992; 569,1261
<b>D</b>	9,39	4-prenilcoumestrol	[M+H] <sup>+</sup>	337,1071	337,1074	-0,89	337,1074
<b>C3</b>	10,11	Genisteína	[M+H] <sup>+</sup>	271,0601	271,0600	0,37	271,0600
<b>E2</b>	10,58	Formononetina	[M+H] <sup>+</sup>	269,0808	269,0812	-1,49	269,0812
<b>F3</b>	10,61	Afrormosina	[M+H] <sup>+</sup>	299,0919	299,0920	-0,33	299,0920

FIGURA 4. 2: Sugestões das estruturas das isoflavonas encontradas nos extratos da soja.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Daidzeína e seus conjugados	OH	H	H
Formononetina e ononina	OCH <sub>3</sub>	H	H
Genisteína e seus conjugados	OH	OH	H
Gliciteína e seus conjugados	OH	H	OCH <sub>3</sub>
Afromosina e seus conjugados	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>

FIGURA 4. 3: Sugestão da estrutura do coumestano (4-prenilcoumestrol) encontrado na soja.



A (Figura 4.4) mostra os Cromatogramas de Íons Extraídos (EIC) para  $m/z$  255,0600, 285,0700 e 271,0600, sinais  $[M+H]^+$  correspondentes à daidzeína, gliciteína e genisteína, respectivamente. Como esses sinais também estão presentes como fragmentos nos conjugados desses compostos, os EIC foram usados para identificá-los de acordo com a natureza da porção aglicona.

As isoflavonas glicosiladas, daidzina, glicitina e genistina, foram identificadas a partir das informações dos espectros de massas dos compostos **A1**, **B** e **C1** (Figuras 4.5, 4.6 e 4.7), que mostram íons  $[M+Na]^+$   $m/z$  439,1003; 469,1099; 455,0951 com perdas de uma glicose e sódio (184,03), gerando íons  $m/z$  255,0655; 285,0755 e 271,0606 correspondentes das agliconas de cada composto. Os conjugados de malonil-daidzina e malonil-genistina foram identificados com base nos tempos de retenção e nos espectros de massas **A2** e **C2** (Figuras 4.5 e 4.7), os quais exibem íons  $[M+Na]^+$   $m/z$  525,1009 e 541,0963 que geram fragmentos de  $m/z$  255,0657 e 271,0606 resultantes às perdas de (248,05) equivalentes às porções de malonil-glicose.

Para daidzeína e genisteína, os espectros de massas **A3** e **C3** (Figuras 4.5 e 4.7) mostram íons  $[M+H]^+$   $m/z$  255,0657 e 271,0606 bastante intensos sem perdas características de moléculas neutras. Essas informações, juntamente o tempo de retenção alto em relação aos glicoconjugados, sugerem a presença dessas isoflavonas nos extratos de folhas frescas da soja.

As isoflavonas daidzeína, genisteína e gliciteína são particularmente abundantes na família Fabaceae, especialmente na soja. Estudos sobre o padrão de fragmentação, identificação e quantificação desses compostos são bastantes difundidos na literatura. Os erros de massa menores que 5 ppm também reforçam as sugestões dos compostos supracitados (CAVALIERE, 2007; HUTABARAT, 2000; VUKICS et al., 2008; KACHLICKI et al., 2008; REN, 2017; GOMÉZ, 2018; HO et al, 2002; ZHAO et al., 2015).

FIGURA 4. 4: Cromatograma de íons extraídos (EIC) para as principais agliconas das isoflavonas encontradas nos extratos da soja. **A** daidzeína  $m/z$  255,0600; **B** gliciteína  $m/z$  285,0700; **C** genisteína  $m/z$  271,0600.

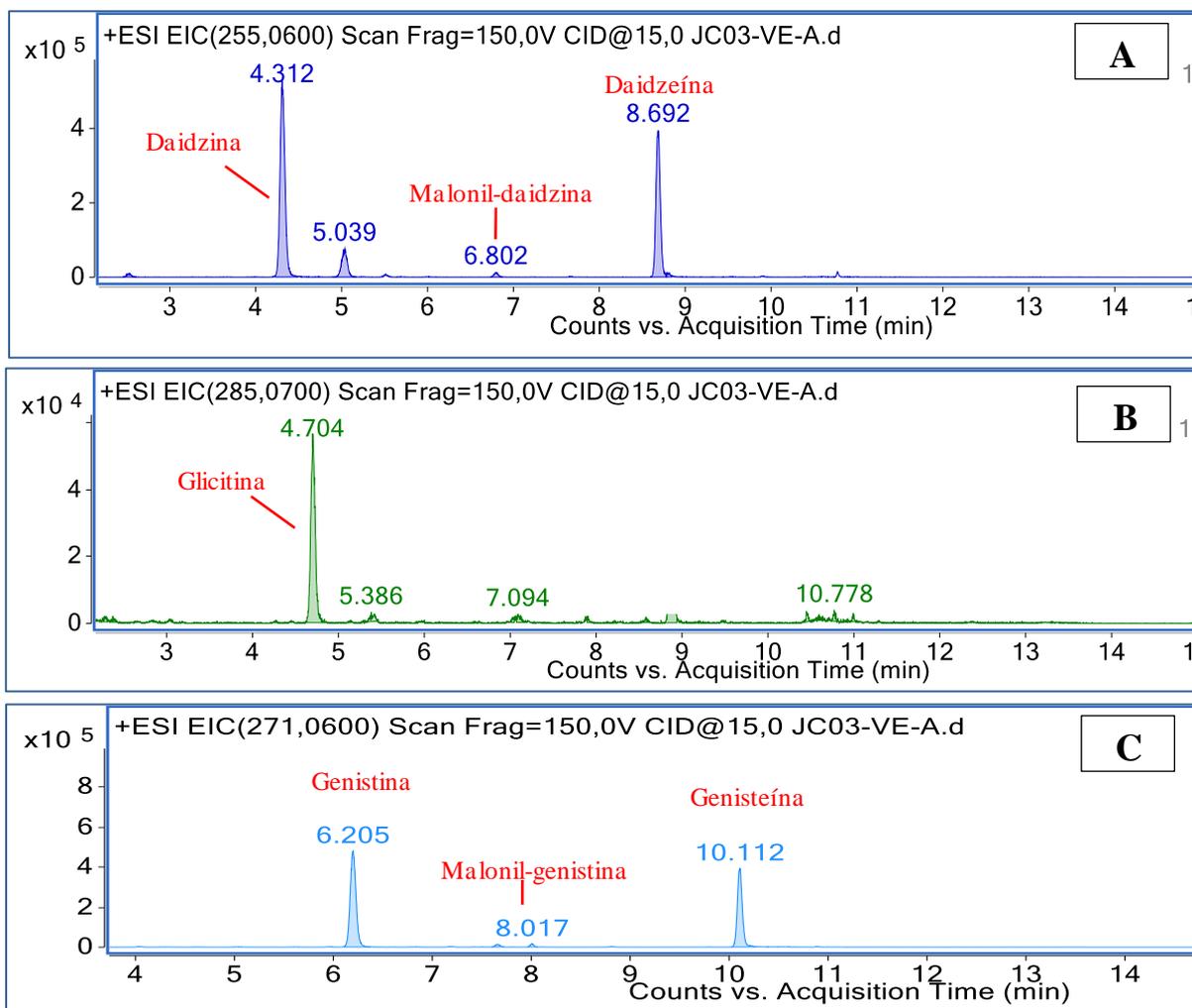


FIGURA 4. 5: Espectros de massas no modo positivo para daidzeína e conjugados. **A1** daidzina; **A2** malonil-daidzina; **A3** daidzeína.

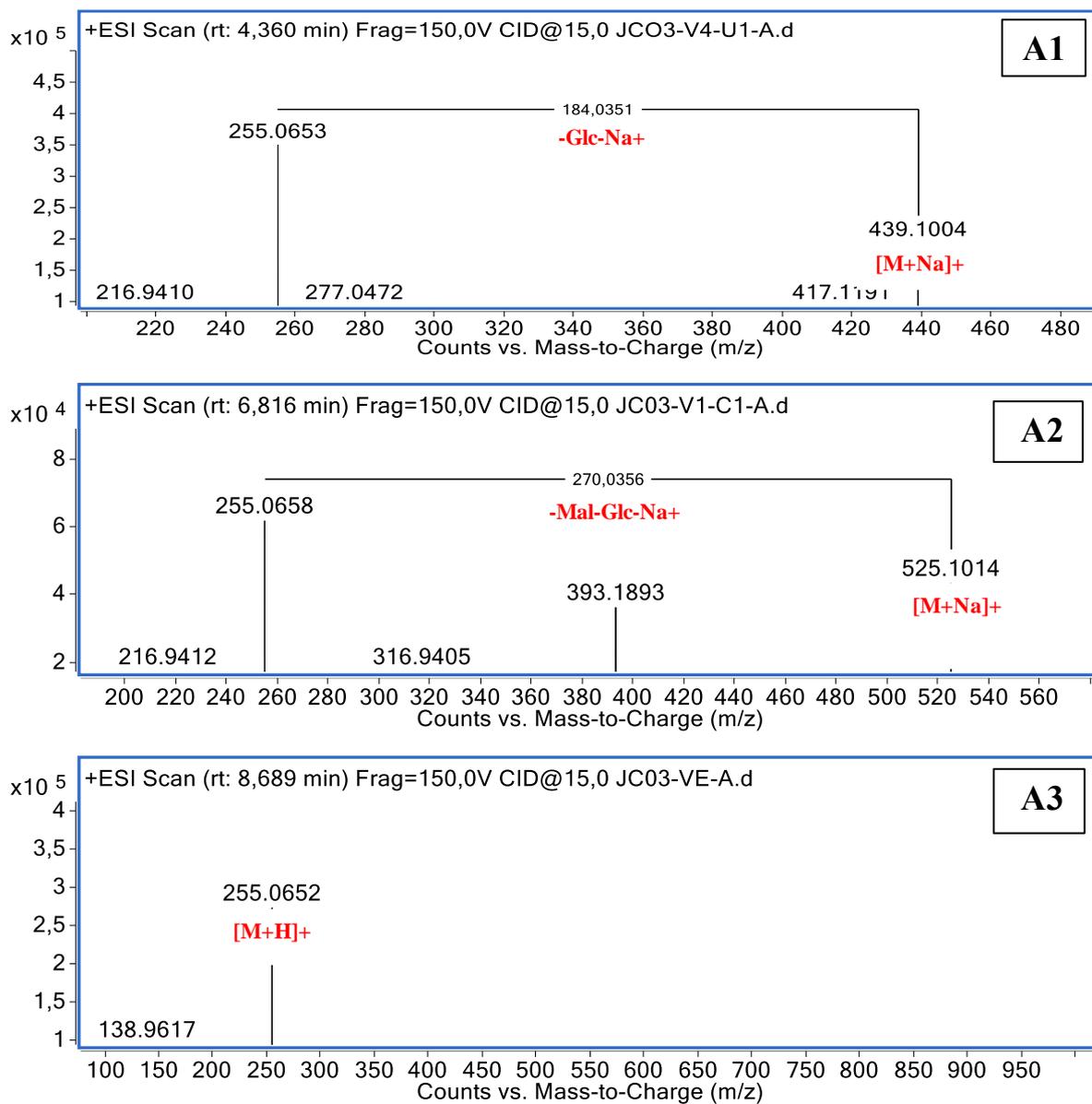


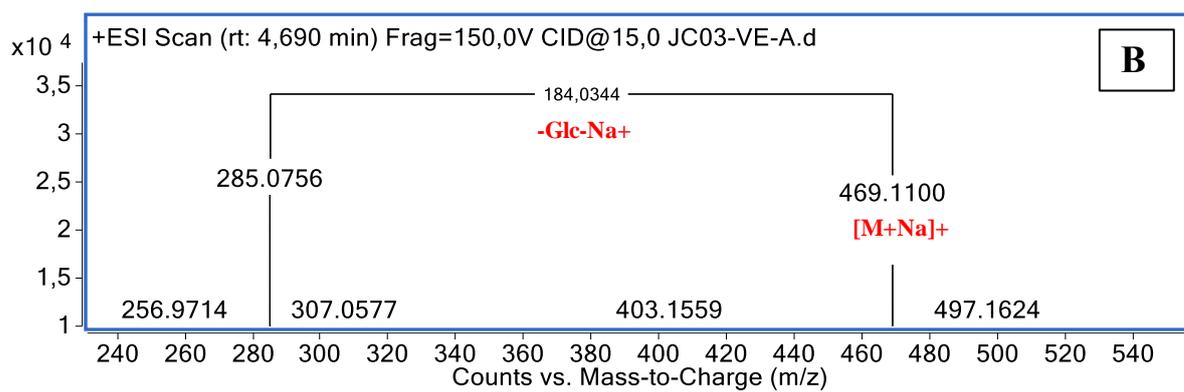
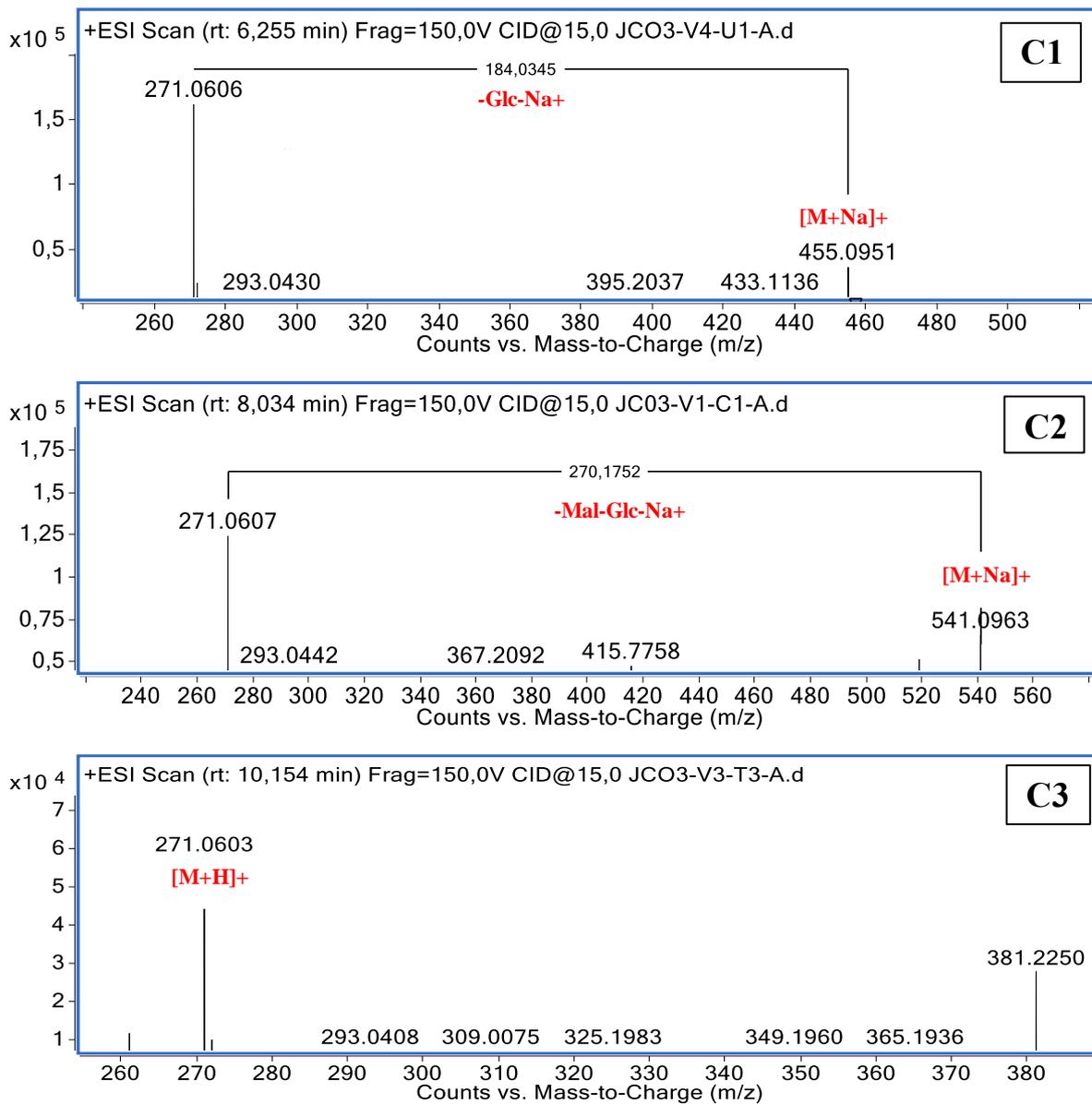
FIGURA 4. 6: Espectro de massas no modo positivo para **B** glicitina.

FIGURA 4. 7: Espectros de massas no modo positivo para genisteína e conjugados. **C1** genistina; **C2** malonil-genistina; **C3** genisteína.



Na figura 4.8 mostra-se os cromatogramas de íons extraídos em relação às agliconas de  $m/z$  337,100; 269,0800 e 299,0900 e seus respectivos tempos de retenção. Esses íons  $[M+H]^+$  foram atribuídos ao coumestano (4-prenilcoumestrol) protonado e às isoflavonas formononetina e afrormosina, respectivamente. As identificações desses compostos e conjugados deram-se a partir das análises dos espectros de massas e dos tempos de retenção e comparação com estudos que detectaram essas moléculas em folhas de soja por LC-MS no modo positivo (YUK et al., 2011a; YUK et al., 2011b). Para os glicosídeos de formononetina (ononina) e afrormosina, observa-se nos espectros de massas **E1** e **F1** (Figuras 4.9 e 4.10) perdas de glicose e sódio (184,03) a partir dos íons  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  453,1169 e 483,1270, restando somente os fragmentos  $m/z$  269,0817; 299,0918 das agliconas.

No espectro **F2** da Mal-Glc-afrormosina, (Figura 4.10) observa-se uma transição partindo do íon  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  569,1278, originando o fragmento de maior intensidade  $m/z$  299,0920 condizente a perda de malonilglicose (248,05). Vale mencionar que os compostos 4-prenilcoumestrol, formononetina e afrormosina são metabólitos restritos a cultivares específicas de soja, sendo menos comuns que as outras isoflavonas identificadas. Diante disso, uma análise mais robusta do padrão de fragmentação possibilitará uma maior certeza dos compostos sugeridos acima.

FIGURA 4. 8: Cromatograma de íons extraídos (EIC) para as agliconas das isoflavonas encontradas nos extratos da soja. **D** 4-prenilcoumestrol  $m/z$  337,1000; **E** formononetina  $m/z$  269,0812; **F** Afroomsina  $m/z$  299,0900.

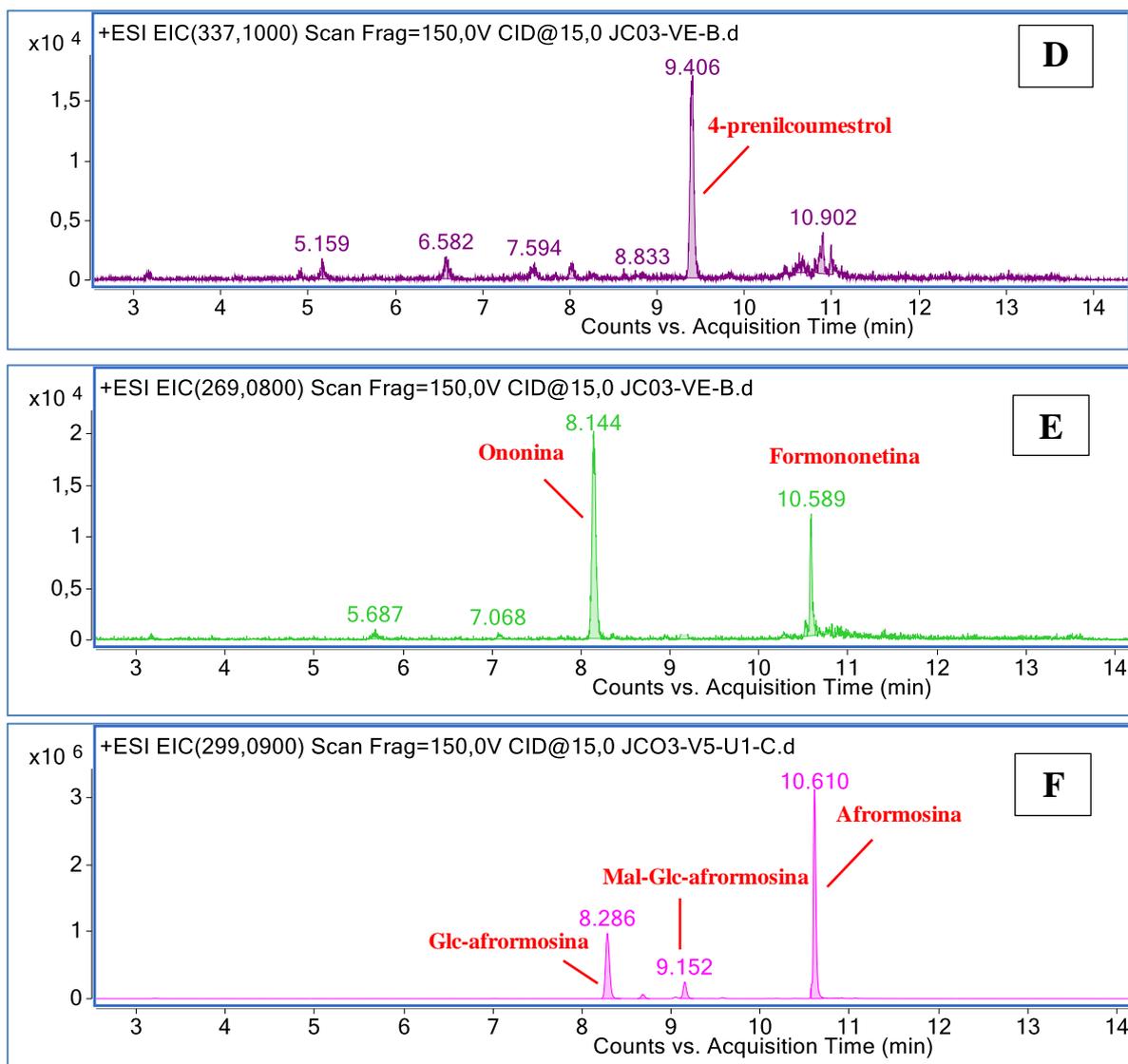


FIGURA 4. 9: Espectros de massas no modo positivo para **D** 4-prenilcoumestrol; **E1** ononina; **E2** formononetina.

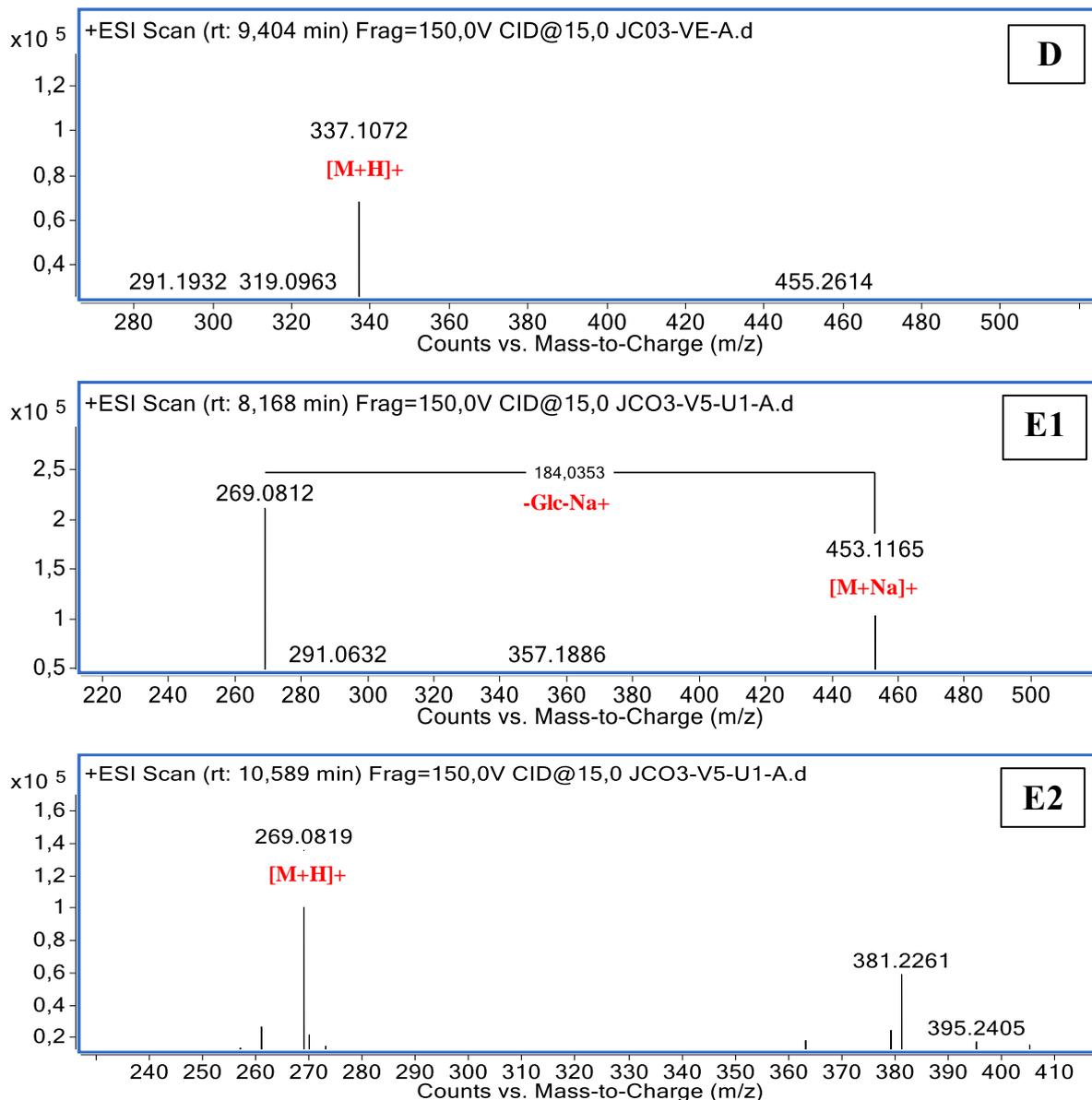
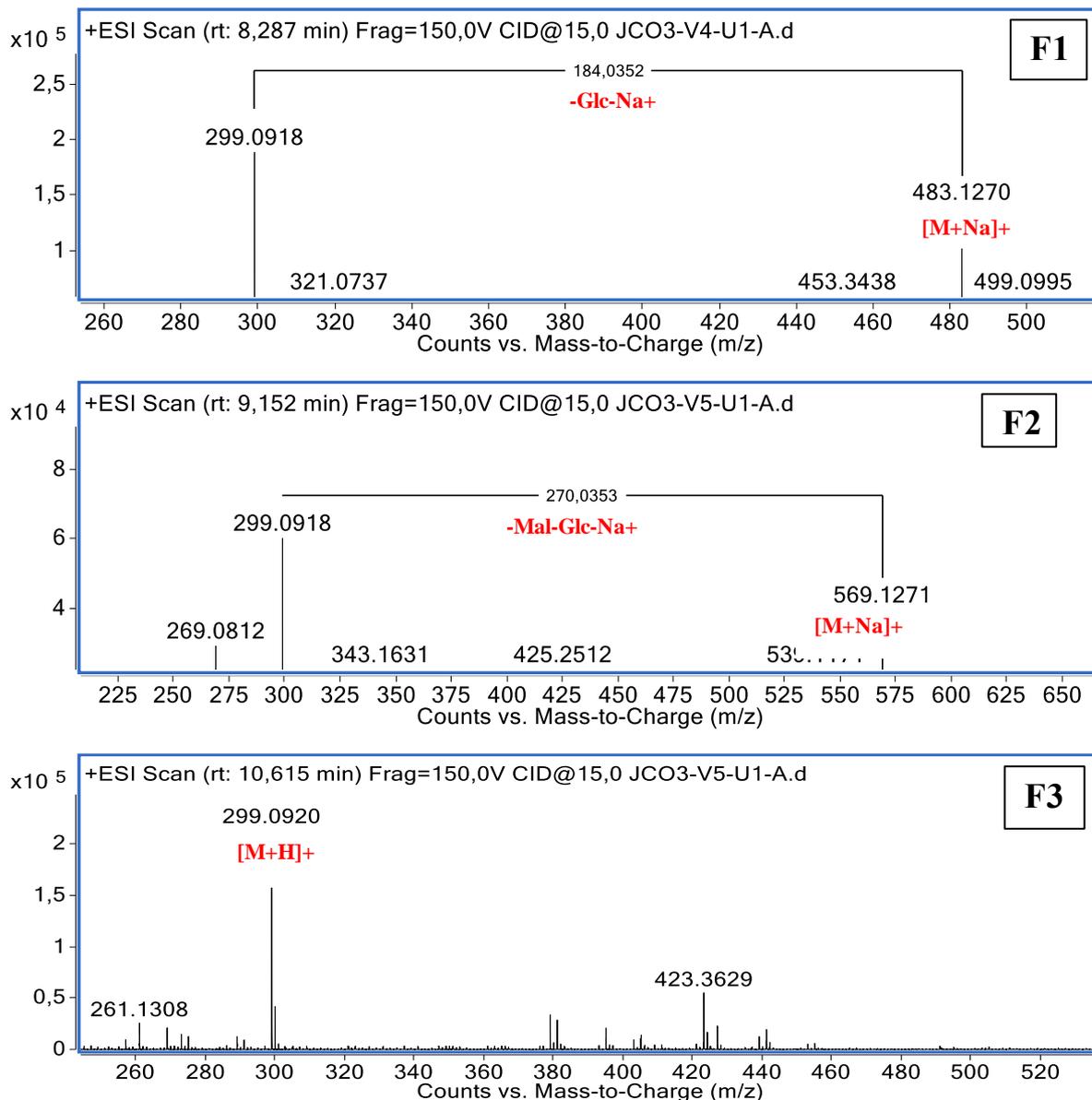


FIGURA 4. 10: Espectros de massas no modo positivo para **F1** Glc-afroformosina; **F2** Mal-Glc- afroformosina; **F3** afroformosina.



#### **4. 1. 2 - Identificação dos Flavonóis**

Dentre os flavonoides identificados, detectou-se oito flavonóis contendo a porção aglicona do kaempferol. Esses compostos mostraram-se presentes nas formas mono, di e triglicosídeos e apresentaram sinais para íons  $[M+Na]^+$  mais intensos do que  $[M+H]^+$  nos espectros de massas. Na (Tabela 4.2) tem-se a caracterização dessas substâncias com código da classe, tempo de retenção e as massas monoisotópicas.

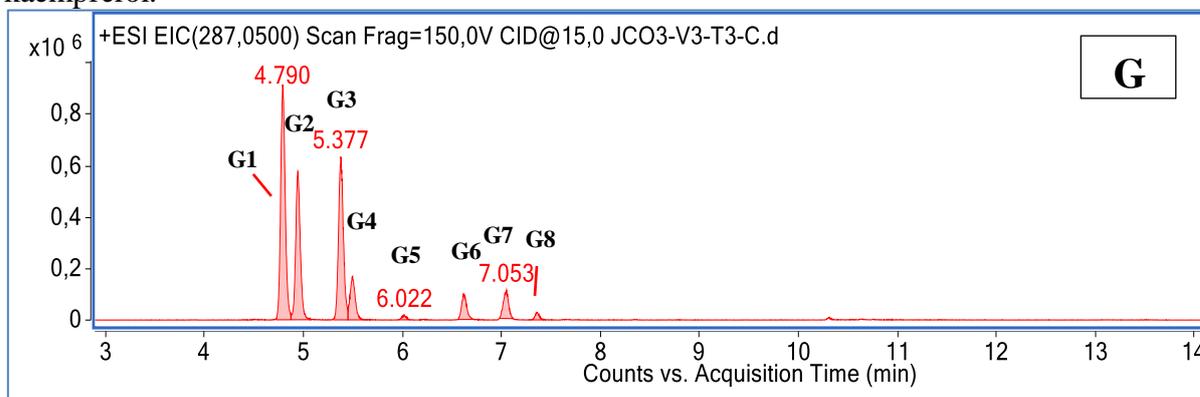
TABELA 4. 2: Flavonóis identificados nos extratos de soja e analisados por cromatografia líquida em modo de íon positivo-ESI (+) Q-Tof.

Classe	Tempo de retenção	Composto	Espécie iônica	Teórica (m/z)	Experimental (m/z)	Erro (ppm)	Massa monoisotópica (m/z)
<b>G1</b>	4,74	Kaempferol-Glc-Glc-Rha (1)	[M+Na] <sup>+</sup>	779,2005	779,2008	-0,39	287,0558; 449,1087; 779,2008
<b>G2</b>	4,90	Kaempferol-Glc-Glc-Rha (2)	[M+Na] <sup>+</sup>	779,2005	779,2006	-0,13	287,0558; 449,1088; 779,2006
<b>G3</b>	5,31	Kaempferol-Glc-Glc (1)	[M+Na] <sup>+</sup>	633,1426	633,1431	-0,79	287,0557; 449,1083; 633,1431
<b>G4</b>	5,43	Kaempferol-Glc-Glc (2)	[M+Na] <sup>+</sup>	633,1426	633,1433	-1,11	287,0557; 449,1083; 633,1433
<b>G5</b>	5,97	Kaempferol-Glc-Rha (1)	[M+Na] <sup>+</sup>	617,1477	617,1485	-1,30	287,0556; 617,1475
<b>G6</b>	6,57	Kaempferol-Glc-Rha (2)	[M+Na] <sup>+</sup>	617,1477	617,1489	-1,94	287,0560; 617,1489
<b>G7</b>	7,02	Kaempferol-Glc-Rha (3)	[M+Na] <sup>+</sup>	617,1477	617,1479	-0,32	287,0553; 617,1479
<b>G8</b>	7,34	Kaempferol-Glc (1)	[M+Na] <sup>+</sup>	471,0898	471,0897	0,21	287,0555; 471,0897

Os picos dos compostos **G1-G8** (Figura 4.11) com tempos de retenção (4,79; 4,94; 5,34; 5,50; 6,02; 6,63; 7,03; 7,35 min) foram identificados como glicosídeos de kaempferol por causa do fragmento principal comum, íon  $m/z$  287,0554, correspondente à aglicona do kaempferol no modo positivo, resultantes das clivagens das unidades glicosídicas.

Os metabólitos dos flavonóis encontrados nos extratos de soja, (componentes **G1-G8**, Figura 4.11) possuíam íons idênticos  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  779,2008 (picos **G1** e **G2**, triglicosídeos de kaempferol); 633,1426, (picos, **G3-G7** diglicosídeos de kaempferol) e 417,0898 (pico **G8**, monoglicosídeo de kaempferol). As identificações para esses glicosídeos de kaempferol foram sugeridas de acordo com as diferentes perdas das unidades de hexose e desoxiexose e com a polaridade dos compostos inferida pelos tempos de retenção.

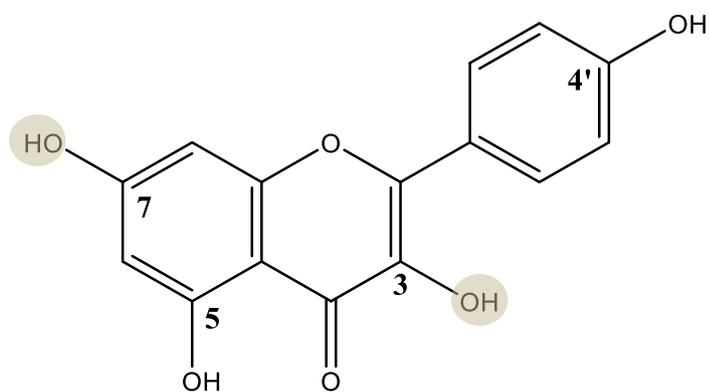
FIGURA 4. 11: Cromatograma de íons extraídos (EIC) para aglicona  $m/z$  287,0500 dos flavonóis glicosilados de kaempferol encontrados nos extratos de soja. **G1** e **G2** triglicosídeos de kaempferol; **G3**, **G4**, **G5**, **G6** e **G7** diglicosídeos de kaempferol; **G8** monoglicosídeo de kaempferol.



Os espectros de massas de íons positivos dos compostos **G1** e **G2** (Figura 4.13), foram caracterizados como triglicosídeos isoméricos de kaempferol, os quais mostram íons  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  779,2008 com perdas de duas unidades de glicose (162,05) e unidade ramnose (146,0421), originando sinais intensos de  $m/z$  287,0500 referentes às agliconas.

O kaempferol na sua forma aglicona possui várias posições que podem ser substituídas e os três substituintes glicosídicos podem estar teoricamente ligados à aglicona em quaisquer das três posições ou ainda ligados em outra unidade de açúcar. As diferenças em seus tempos de retenção poderiam ser explicadas pela polaridade diferente de suas agliconas (VUKICS et al., 2008). Na Figura 4.12 tem-se a estrutura da aglicona do kaempferol com as possíveis posições que podem ocorrer as glicosilações.

FIGURA 4. 12: Estrutura da aglicona do kaempferol e as posições: 3-OH e 7-OH são mais comuns para substituições glicosídicas em flavonóis.



Os picos **G3** e **G4** (Figura 4.11) foram identificados como diglicosídeos de kaempferol por causa da clivagem de uma porção de glicose (162,05) e outra de glicose+sódio (184,03) (Figura 4.14). Os picos **G5**, **G6** e **G7** (Figura 4.11) também foram caracterizados como diglicosídeos, porém, com perdas de glicose (162,05) e ramnose+sódio (168,04) (Figura 4.15), resultando, assim, nos íons fragmentos de  $m/z$  287,0500 de maior intensidade correspondentes à aglicona kaempferol. Por fim, o pico **G8** (Figura 4.11) de menor polaridade em relação aos outros compostos, foi sugerido como monoglicosídeo de kaempferol, sendo observado no seu espectro somente uma perda de glicose+sódio (184,03) (Figura 4.16).

Estudos relatam que os glicoconjugados de kaempferol e quercetina são os flavonoides mais abundantes nas folhas de soja e amplamente encontrados em vários genótipos dessa leguminosa. Porém, neste trabalho não foram detectados conjugados de quercetina. Possivelmente, essa diferença de metabólitos secundários entre cultivares de soja pode estar relacionado com fatores genéticos (GOMÉZ et al., 2018; Ho et al., 2002; VICKS et al., 2008).

FIGURA 4. 13: Espectros de massas no modo positivo para os triglicosídeos de kaempferol. **G1** kaempferol-Glc-Glc-Rha (1); **G2** kaempferol-Glc-Glc-Rha (2). Glc= glicose, Rha= rhamnose.

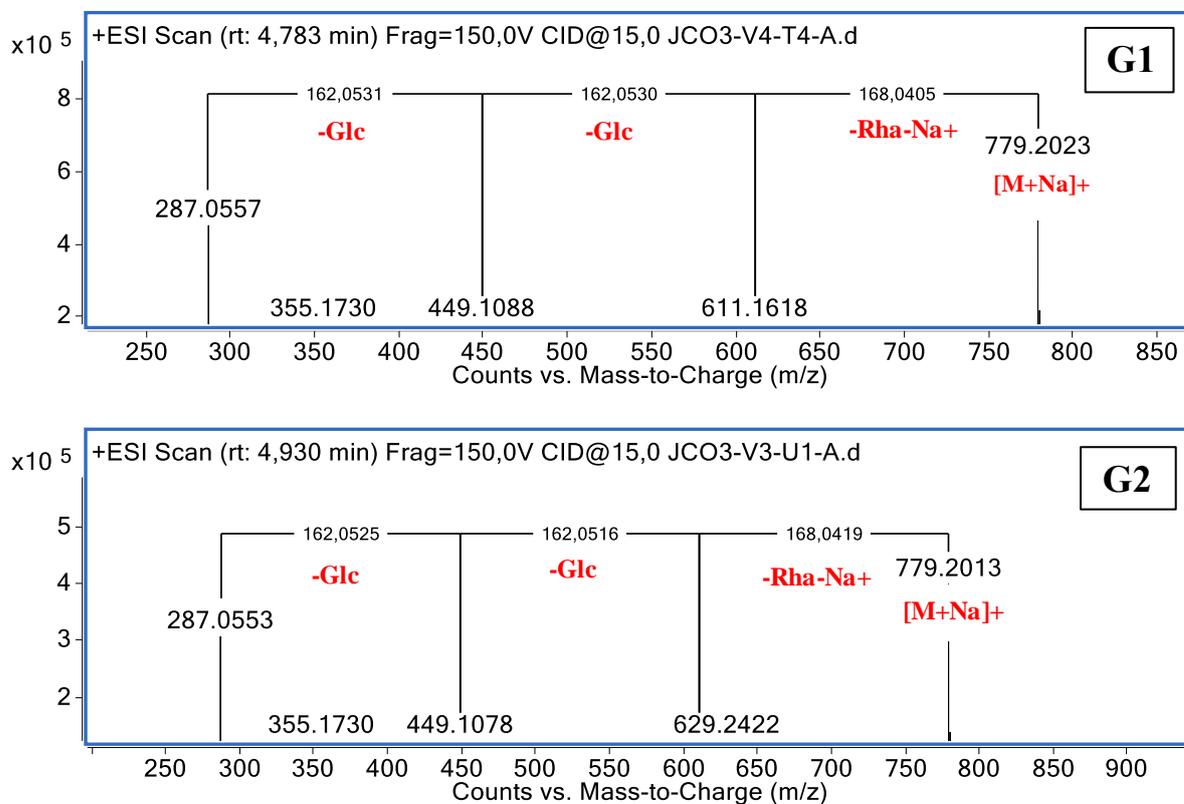


FIGURA 4. 14: Espectro de massas dos diglicosídeos de kaempferol. **G3** kaempferol-Glc-Glc (1); **G4** kaempferol-Glc-Glc (2). Glc = glicose.

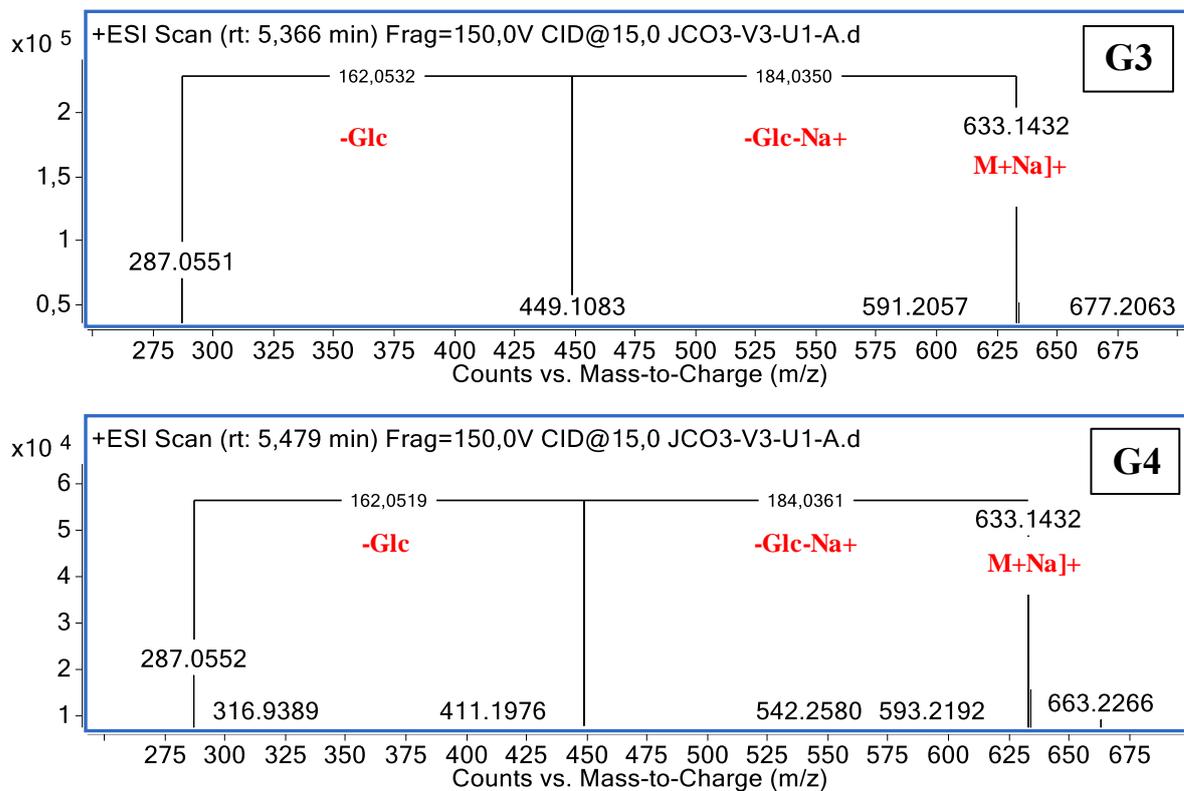


FIGURA 4. 15: Espectro de massas dos diglicosídeos de kaempferol. **G5** kaempferol-Glc-Rha (1); **G6** kaempferol-Glc-Rha (2); **G7** kaempferol-Glc-Rha (3). Glc= glicose, Rha= rhamnose.

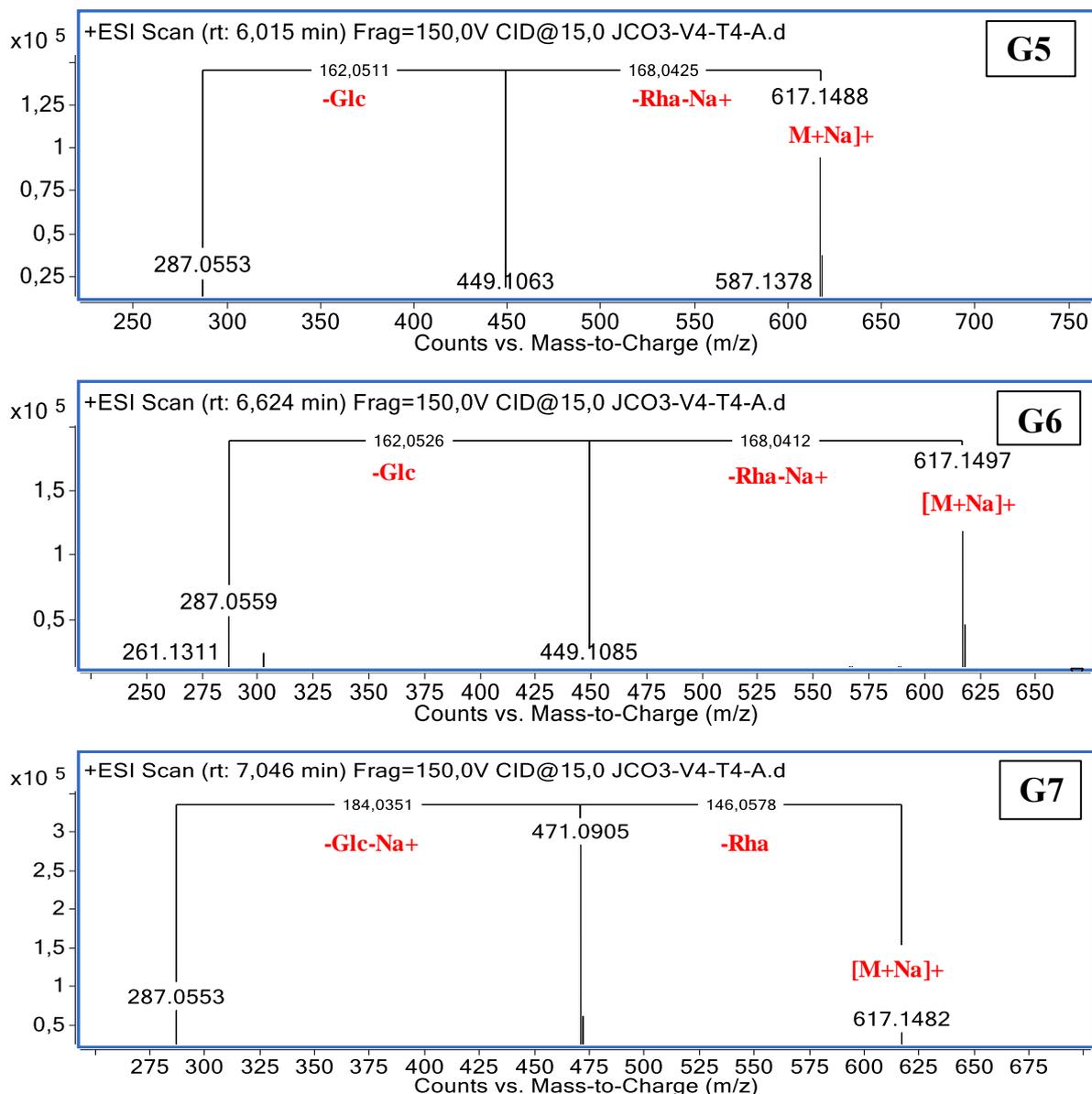
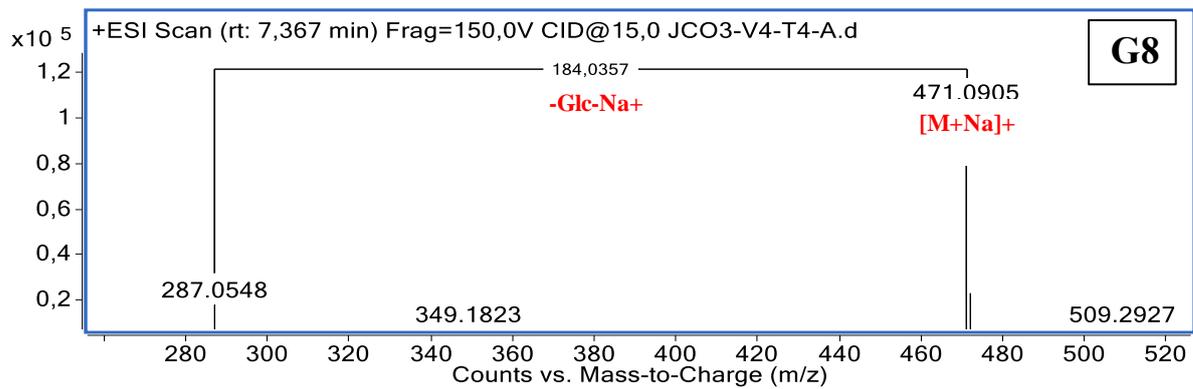


FIGURA 4. 16: Espectro de massas do monoglicosídeo de kaempferol. **G8** kaempferol-Glc.  
Glc= glicose.



## **4. 2 - Quantificação Relativa dos Flavonoides**

### **4. 2. 1 - Quantificação Relativa, Alocação Espacial e Temporal das Isoflavonas.**

A partir das áreas integradas normalizadas dos EIC dos íons  $[M+Na]^+$  foi possível realizar uma quantificação relativa para os compostos identificados. Os testes estatísticos foram realizados com as médias das abundâncias relativas dos glicosídeos das isoflavonas identificadas, pois esses metabólitos são armazenados em maior quantidade e apresentaram menor variação na concentração em relação às outras formas (aglicona e malonil-glicose).

Como apresentado na figura 4.17, os níveis maiores de daidzina são alocados espacialmente nas folhas velhas, os quais diferem estatisticamente das folhas jovens e imaturas para os estágios V1, V2, V3, V4, V5, R1 e R2. Por outro lado, no estágio VC, as folhas imatura e velha não apresentam diferença significativa entre si. Diante disso, para avaliar a dinâmica temporal da daidzina, comparou-se as folhas velhas entre os estágios como mostrado na figura 4.18.

Em relação à quantidade de daidzina nas folhas velhas, pode-se constatar que somente as folhas velhas dos estágios V3 e R1 apresentam diferença significativa em relação aos demais estágios de desenvolvimento, sendo menos acumulada nessas fases. Isso pode estar relacionado ao fato de que, ao longo do seu desenvolvimento, a planta perde a folha velha (maior idade) durante algumas transições de um estágio para o outro (V2 para V3 e V4 para R1). Também observa-se uma tendência de aumento da abundância relativa da daidzina na folha velha no decorrer do desenvolvimento da soja.

FIGURA 4. 17: Abundância relativa da daidzeína e seus conjugados na soja ao longo dos estágios de desenvolvimento e em folhas de diferentes idades. (V = folha velha; J = folha jovem; e I = folha imatura). ( $\pm$  erro padrão da média).

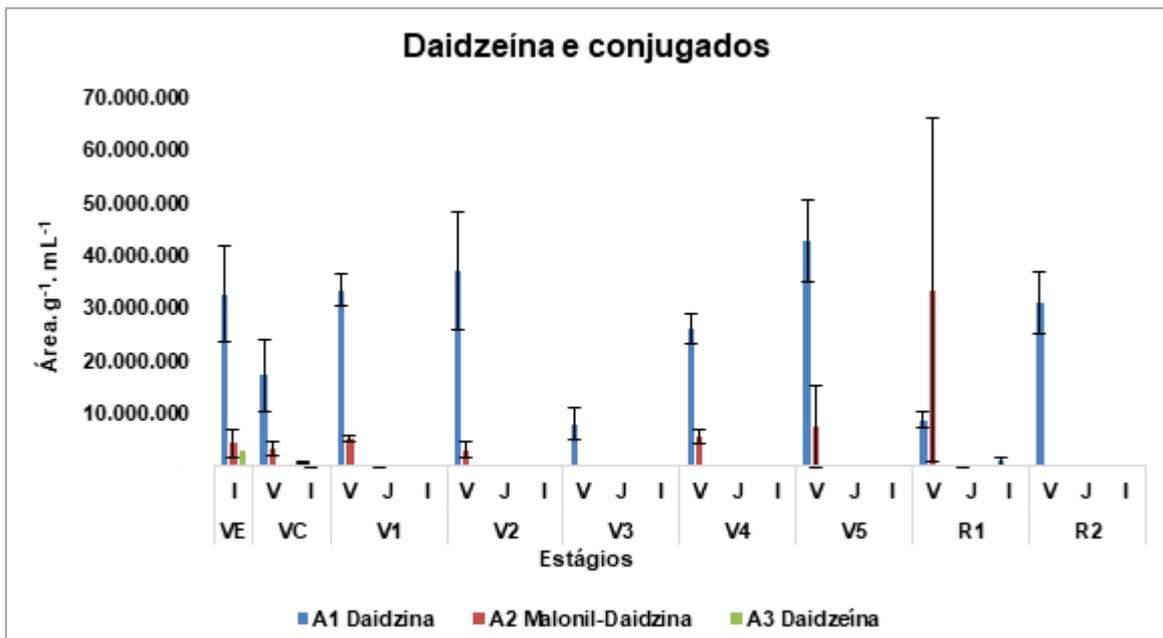


FIGURA 4. 18: Abundância relativa da daidzina em diferentes estágios de desenvolvimento da soja e em folhas de diferentes idades para comparar a alocação espacial. (V = vegetativo; R = reprodutivo). Barras identificadas com as mesmas letras dentro de cada grupo, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade ( $P < 0,05$ ). ( $\pm$  erro padrão da média).

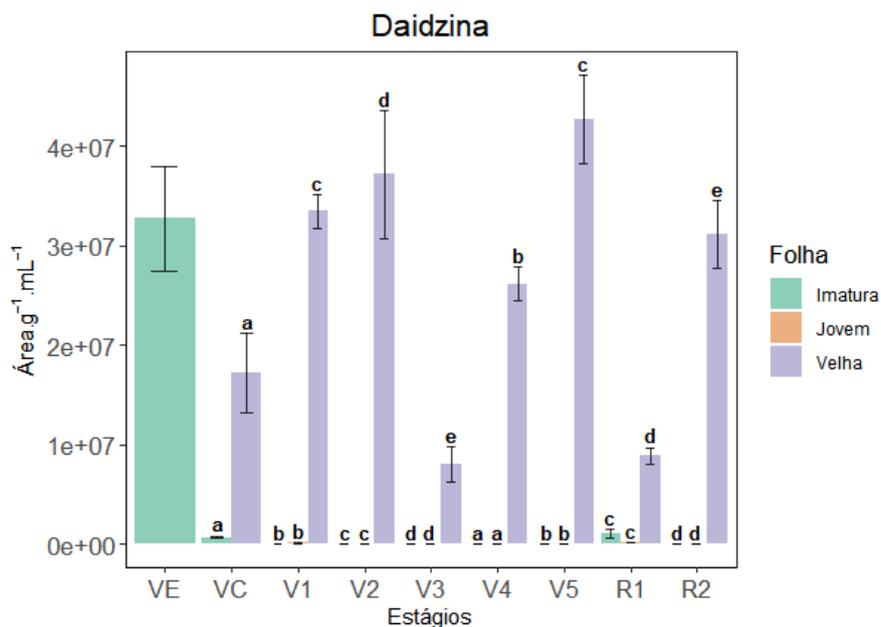
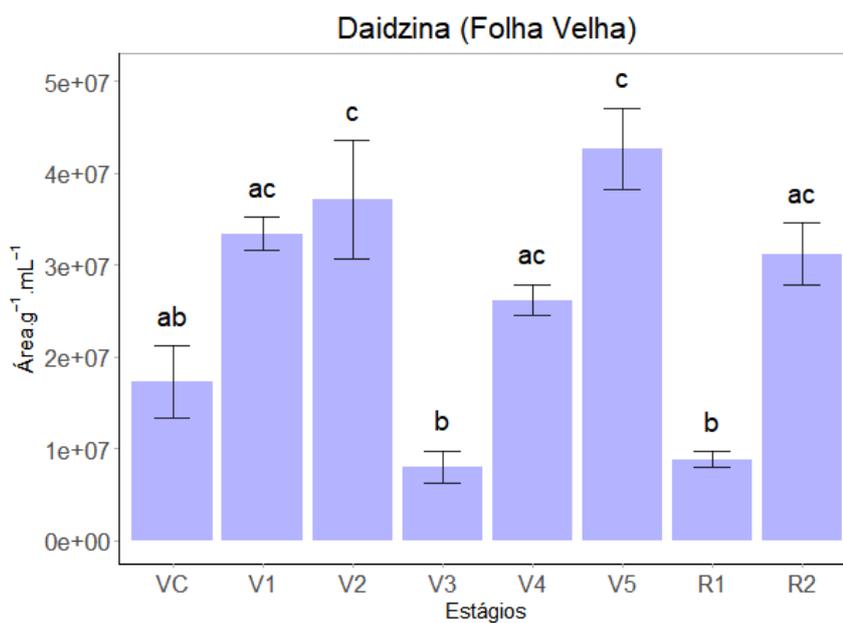


FIGURA 4.19: Abundância relativa da daidzina em folhas velhas dos estágios de desenvolvimento da soja para comparar a alocação temporal. (V = vegetativo; R = reprodutivo). Barras identificadas com as mesmas letras dentro de cada grupo, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade ( $P < 0,05$ ). ( $\pm$  erro padrão da média).



A ononina é uma isoflavona *O*-metilada na posição 4' do anel B derivada da daidzina e restrita a alguns genótipos de soja. Neste estudo, essa isoflavona encontra-se em níveis mais baixos em comparação com daidzina e genistina. Nesta cultivar, a ononina está presente desde a emergência do cotilédone VE até a fase de reprodução R2 da planta, alocada exclusivamente nas folhas velhas, as quais diferiram estatisticamente das jovens e imaturas ( $P < 0,05$ ) (Figuras 4.21 e 4.22). Além disso, nota-se que sua concentração nas folhas velhas é crescente durante o período vegetativo e somente nos estágios V4 e V5 apresentam diferença significativa entre si, os quais acumulam níveis maiores dessa isoflavona.

Ao correlacionar a ononina com daidzina, percebe-se similaridade de alocação espacial e temporal desses flavonoides durante o crescimento da soja. Devido à similaridade estrutural e biossintética dessas duas isoflavonas, é possível que a planta diversifique seu perfil químico à medida que se desenvolve, metilando a posição 4' do anel B na estrutura da daidzina já presente nos tecidos e assim originando a ononina, com possibilidade de atuação diferente dentro do perfil químico da soja. Vários estudos relatam que as folhas de soja acumulam formononetina, isoformononetina e conjugados (INGHAM et al., 1981; MURAKAMI et al., 2014; OSMAN e FETT, 1983; WEGULO et al., 2005).

FIGURA 4. 20: Abundância relativa da formononetina e seus conjugado na soja ao longo dos estágios de desenvolvimento e em folhas de diferentes idades. (V = folha velha; J = folha jovem; e I = folha imatura). ( $\pm$  erro padrão da média).

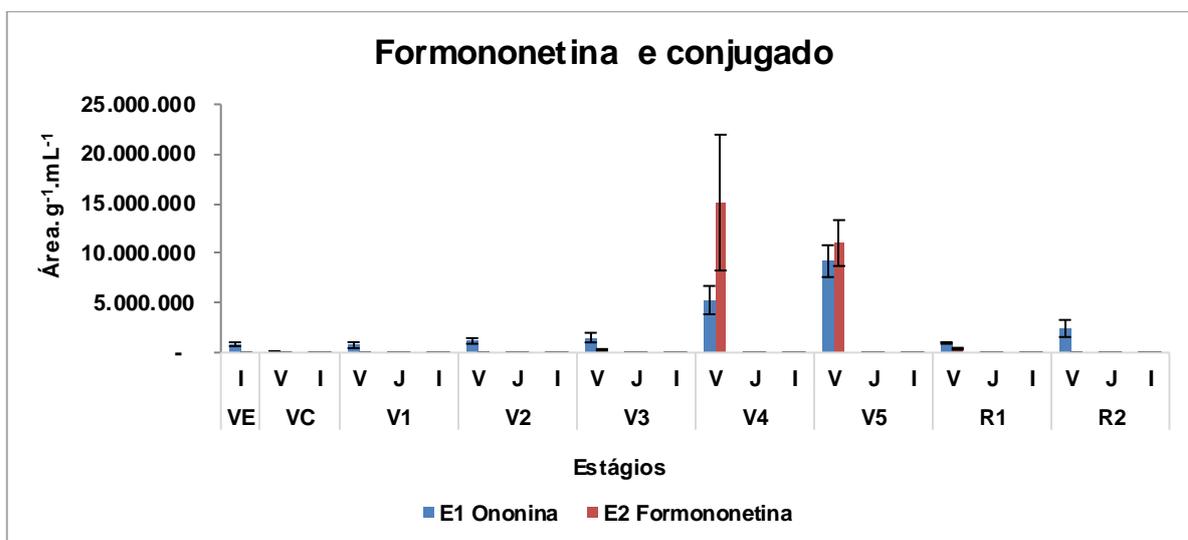


FIGURA 4. 21: Abundância relativa da ononina em diferentes estágios de desenvolvimento da soja e em folhas de diferentes idades para comparar a alocação espacial. (V = vegetativo; R = reprodutivo). Barras identificadas com as mesmas letras dentro de cada grupo, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade ( $P < 0,05$ ). ( $\pm$  erro padrão da média).

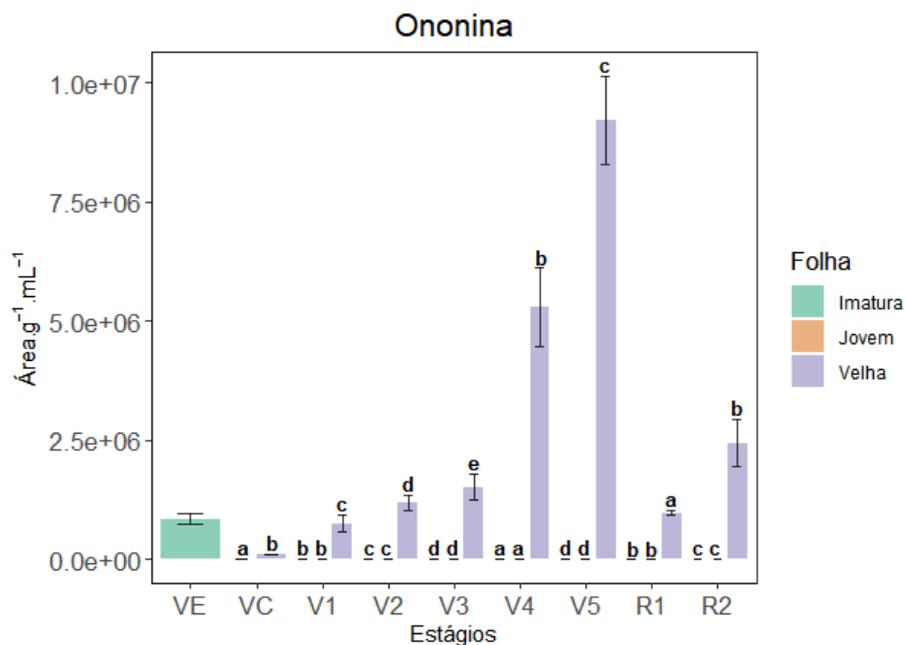
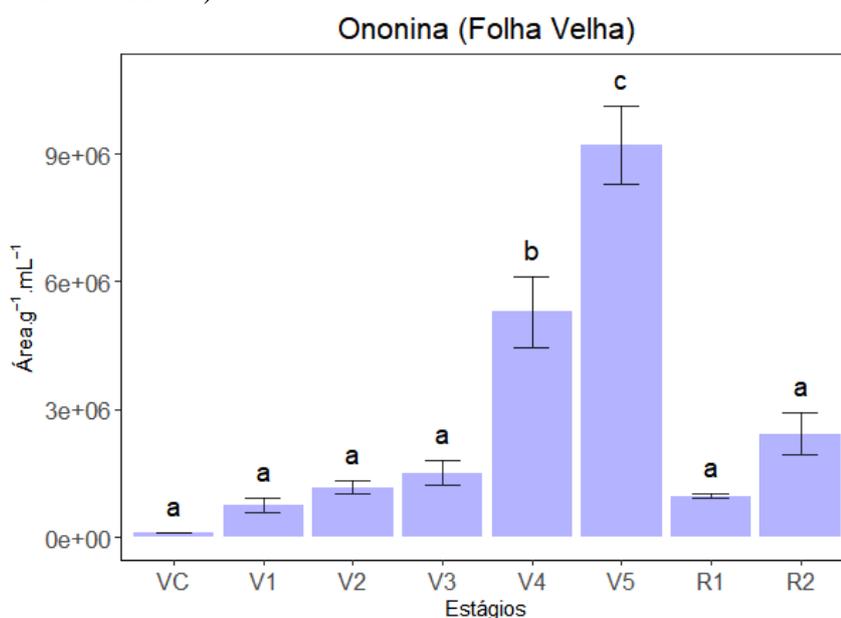


FIGURA 4. 22: Abundância relativa da ononina em folhas velhas dos estágios de desenvolvimento da soja para comparar a alocação temporal. (V = vegetativo; R = reprodutivo). Barras identificadas com as mesmas letras dentro de cada grupo, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade ( $P < 0,05$ ). ( $\pm$  erro padrão da média).



Nos extratos analisados, foi identificado somente um conjugado de gliciteína, a glicitina e, esta foi encontrada em baixa concentração em relação à daidzina e genistina. Na Figura 4.23, a glicitina foi acumulada nos estágios iniciais VE e VC e depois nos estágios finais V4, V5, R1 e R2 sendo alocada apenas nas folhas velhas ( $P < 0,05$ ), semelhante à alocação espacial para daidzina. Apesar de não apresentar diferença significativa entre si, as fases de crescimento V4, V5 e R2 apresentam maior abundância relativa dessa isoflavona na soja (Figura 4.24).

FIGURA 4. 23: Abundância relativa da glicitina em diferentes estágios de desenvolvimento da soja e em folhas de diferentes idades para comparar a alocação espacial. (V = vegetativo; R = reprodutivo). Barras identificadas com as mesmas letras dentro de cada grupo, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade ( $P < 0,05$ ). ( $\pm$  erro padrão da média).

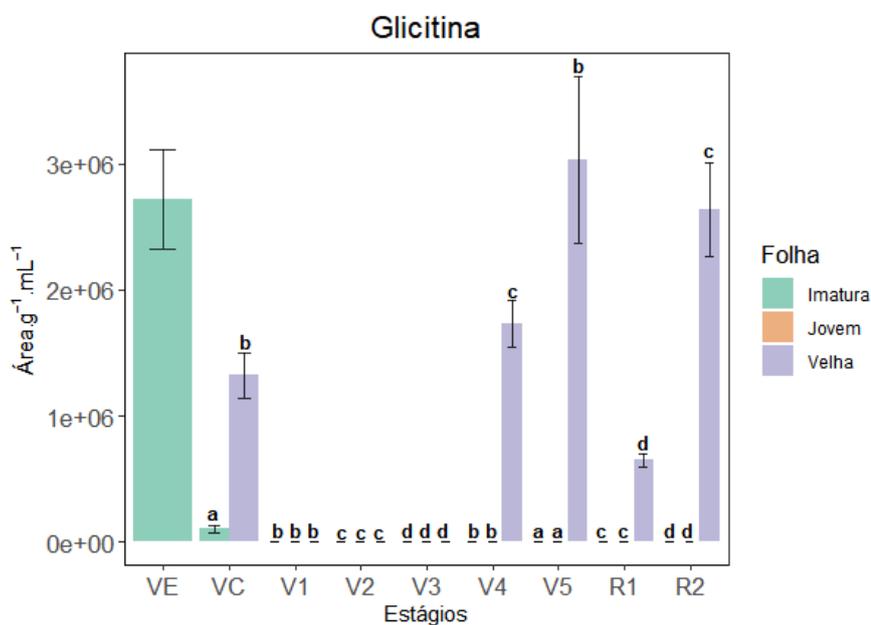
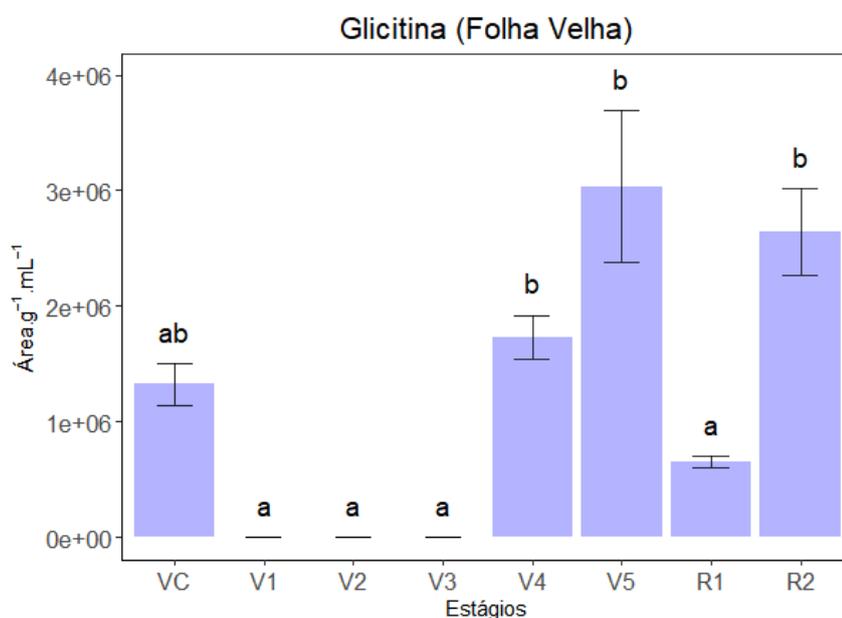


FIGURA 4. 24: Abundância relativa da glicitina em folhas velhas dos estágios de desenvolvimento da soja para comparar a alocação temporal. (V = vegetativo; R = reprodutivo). Barras identificadas com as mesmas letras dentro de cada grupo, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey com com 95% de confiabilidade ( $P < 0,05$ ). ( $\pm$  erro padrão da média).



O glicosídeo de afrormosina é uma isoflavona derivada da glicitina, pouco comum em genótipos de soja, porém, vários estudos identificaram em plantas da família da Fabaceae, principalmente na soja (HERATH et al., 1998; YUK et al., 2011). Na cultivar BRS 284, essa isoflavona foi encontrada apenas nos estágios finais da fase vegetativa sendo mais acumulada nos V4 e V5 e alocada exclusivamente nas folhas velhas (Figura 4.26). À vista disso, é possível, pelo mesmo motivo dos derivados da daidzina, que a planta converta um certo nível de glicitina para afrormosina em estágios finais da fase vegetativa, assim, obtendo um novo composto com propriedades diferentes.

Em estudo semelhante, no qual comparou-se a composição metabólica das folhas de soja em diferentes estágios reprodutivos, foi observado altos níveis de derivados de isoflavonas tais como daidzeína, genisteína e pterocarpanos durante o crescimento da semente na vagem (SONG et al, 2014).

FIGURA 4. 25: Abundância relativa da afroformosina e seus conjugados na soja ao longo dos estágios de desenvolvimento e em folhas de diferentes idades. (V = folha velha; J = folha jovem; e I = folha imatura). ( $\pm$  erro padrão da média).

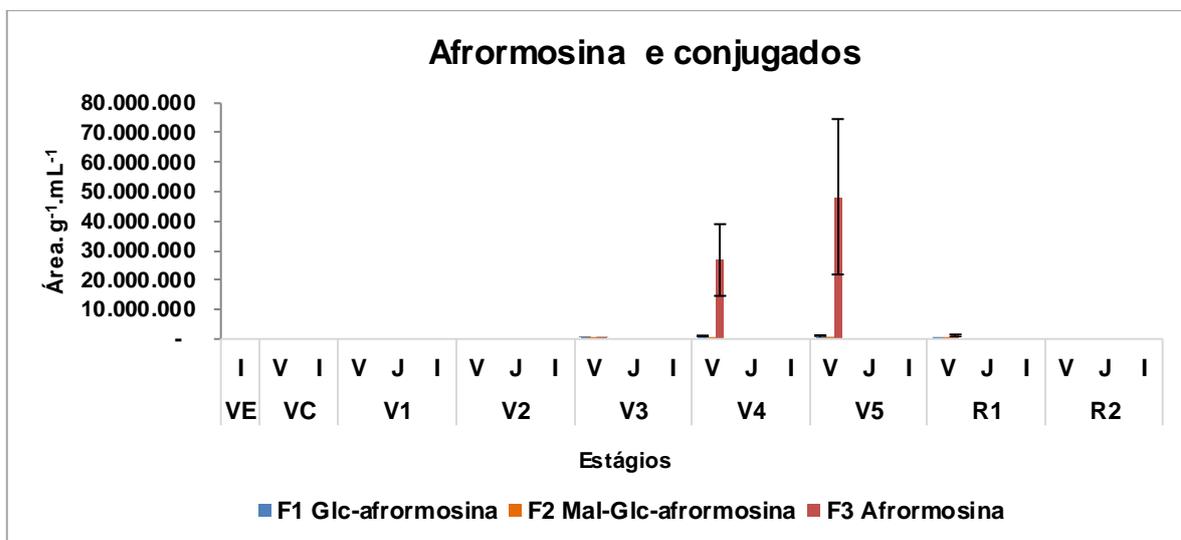
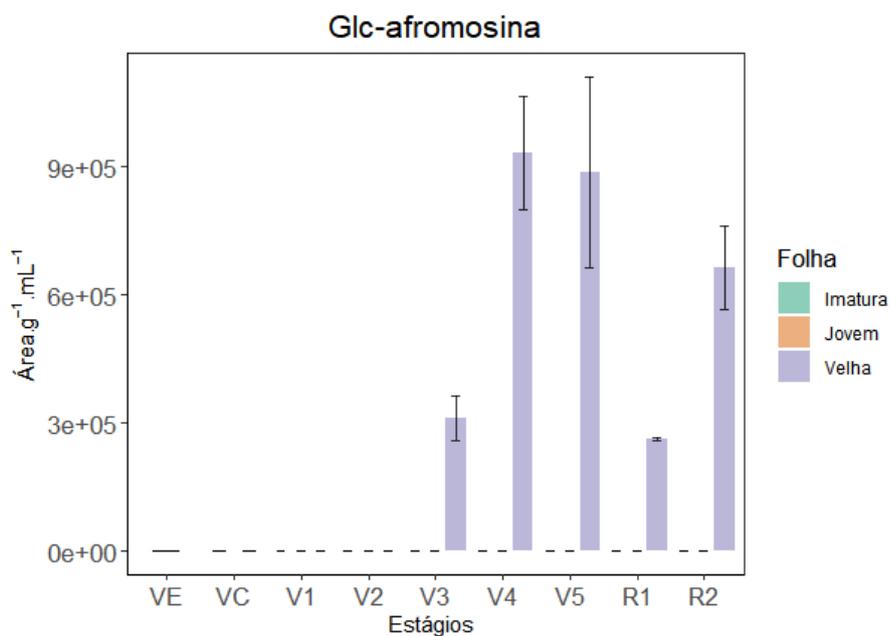


FIGURA 4. 26: Abundância relativa da afroformosina glicosilada em folhas velhas dos estágios de desenvolvimento da soja para comparar a alocação temporal. (V = vegetativo; R = reprodutivo). ( $\pm$  erro padrão da média)



Dentre as isoflavonas encontradas, a genistina é a única isoflavona que se mostrou alocada em todos os estágios e folhas. A partir da análise das médias das abundâncias relativas, é possível afirmar que as folhas velhas, jovens e imaturas dos estágios VE a V5 não apresentam diferenças significativas entre si. No entanto, no estágio R1, a folha velha diferiu da imatura e em R2, a folha velha é diferente significativamente das folhas jovem e imatura ( $P < 0,05$ ) (Figura 4.28)

Devido à maior tendência de alocação de genistina em folhas velhas, comparou-se sua abundância entre os estágios de desenvolvimento. Os resultados mostram que somente o V5 apresentou diferença significativa em relação aos V3, V4, V5, R1 e R2, contudo, V5 não diferiu entre os estágios iniciais VC, V1 e V2 (Figura 4.29). Apesar do padrão de alocação para genistina não ser claro, ou talvez não depender da idade da planta e da folha, é possível perceber que a soja tende a alocá-la em tecidos mais velhos.

Estudos anteriores sugerem que a genistina é a isoflavona mais ativa biologicamente, apresentando atividade antimicrobiana, antifúngica e respostas contra-ataques de diferentes insetos herbívoros (PIUBELLI et al., 2005; ROMANI et al., 2003).

FIGURA 4. 27: Abundância relativa da genisteína e seus conjugados na soja ao longo dos estágios de desenvolvimento e em folhas de diferentes idades. (V = folha velha; J = folha jovem; e I = folha imatura). ( $\pm$  erro padrão da média).

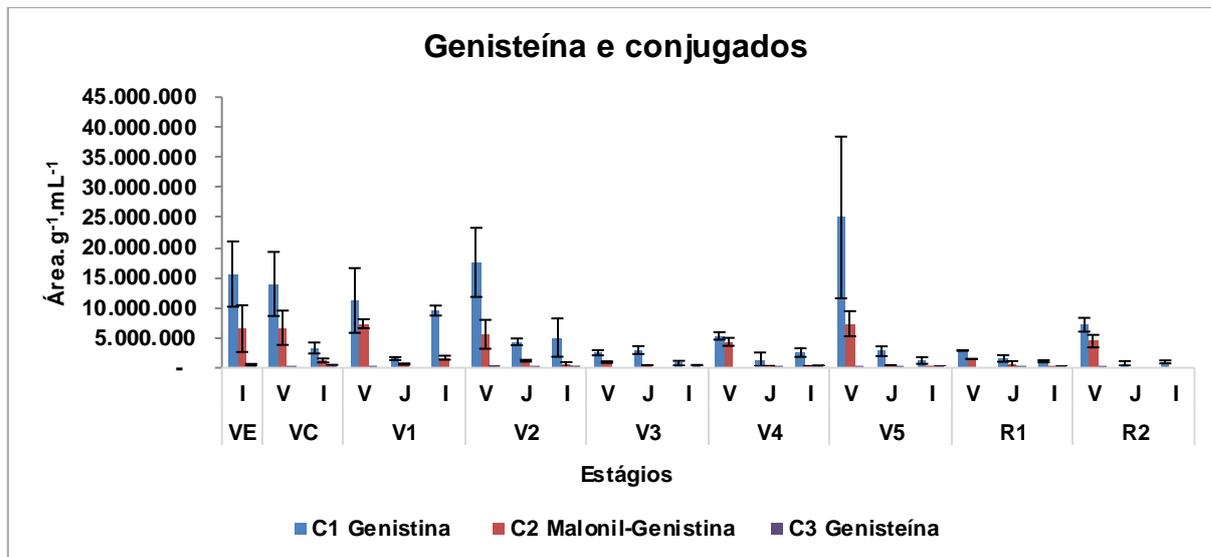


FIGURA 4. 28: Abundância relativa de genistina em diferentes estágios de desenvolvimento da soja e em folhas de diferentes idades para comparar a alocação espacial. (V = vegetativo; R = reprodutivo). Barras identificadas com as mesmas letras dentro de cada grupo, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade ( $P < 0,05$ ). ( $\pm$  erro padrão da média).

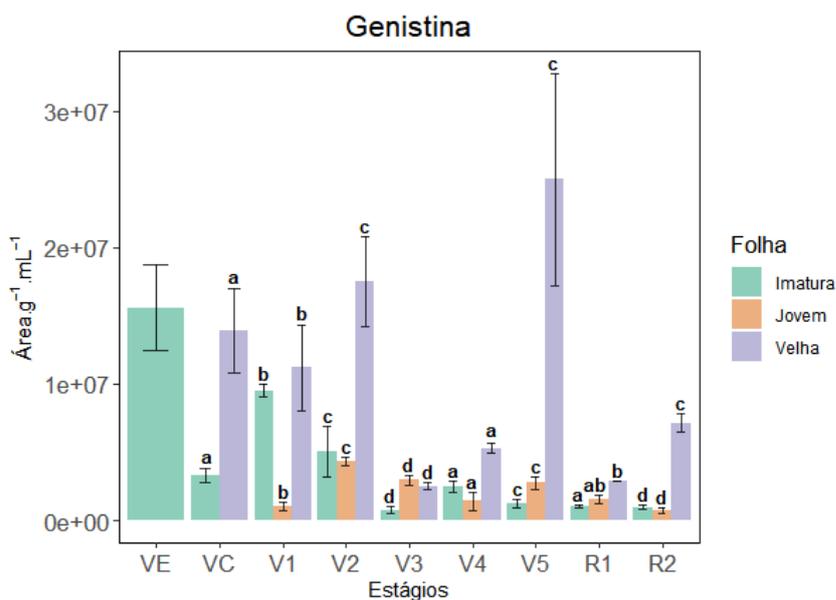
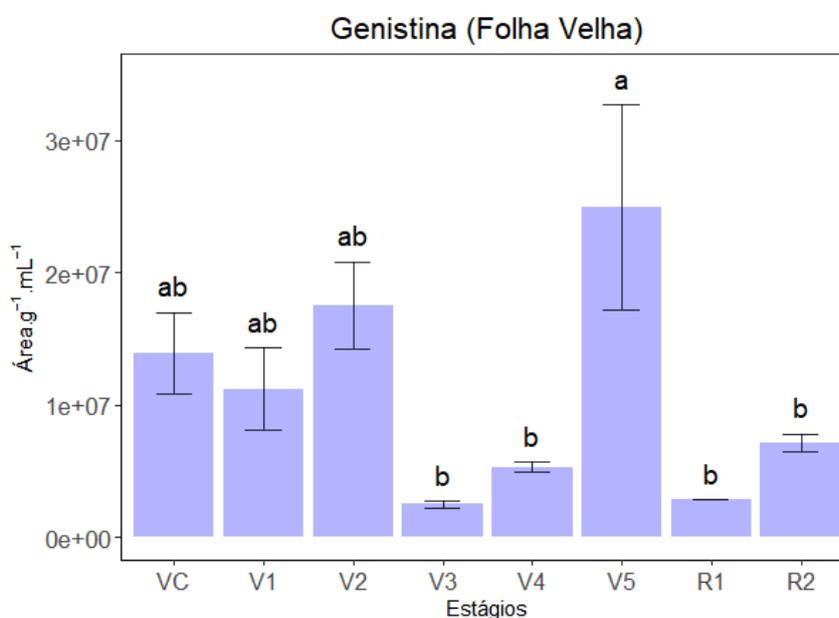
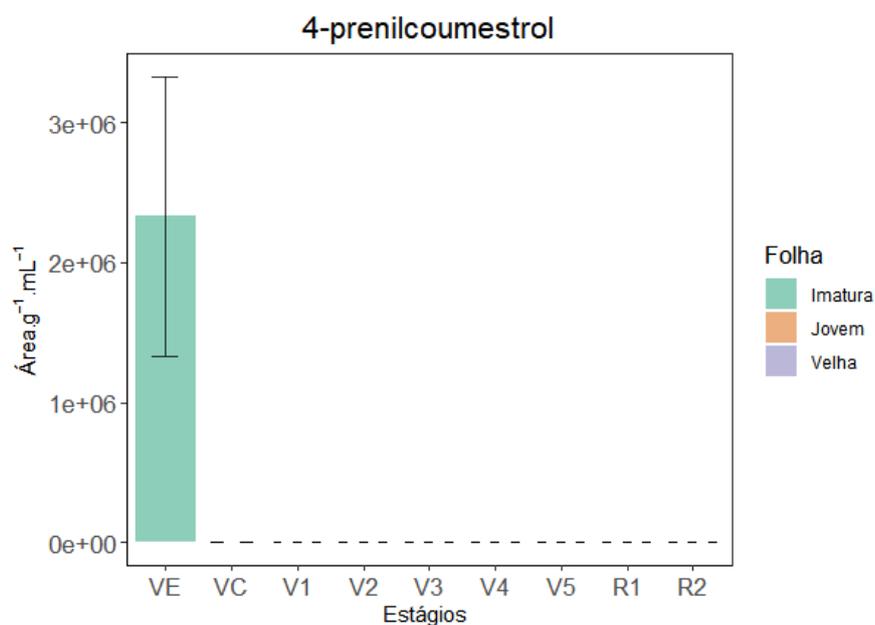


FIGURA 4. 29: Abundância relativa da genistina em folhas velhas dos estágios de desenvolvimento da soja para comparar a alocação temporal. (V = vegetativo; R = reprodutivo). Barras identificadas com as mesmas letras dentro de cada grupo, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade ( $P < 0,05$ ). ( $\pm$  erro padrão da média).



O composto 4-prenilcoumestrol (phaseol) é um coumestano derivado do precursor daidzeína sendo encontrado quase exclusivamente nas plantas da família Fabaceae devido à formação de um anel por uma ciclização incomum nas isoflavona (SIMONS et al., 2010). O phaseol também é um derivado de isoflavona restrito a alguns genótipos específicos de soja e neste trabalho foi identificado apenas no estágio VE (Figura 4.30). Apesar de não ser recorrente em diversas cultivares, alguns estudos relatam a presença dessa substância em altos níveis na fase de maturação dos grãos de soja (YUK et al., 2011a; YUK et al., 2011b).

FIGURA 4. 30: Abundância relativa do 4-prenilcoumestrol em soja ao longo dos estágios de desenvolvimento. (V = vegetativo; R = reprodutivo) ( $\pm$  erro padrão da média).



#### **4. 2. 2 - Quantificação relativa, alocação espacial e temporal dos flavonóis**

A partir das áreas normalizadas dos picos dos (EIC) dos íons  $[M+Na]^+$  foi realizada a quantificação relativa para todos os glicosídeos de kaempferol. Os tratamentos estatísticos foram realizados considerando apenas um dos isômeros de cada classe de glicosídeo (mono, di e triglicosídeos).

Os triglicosídeos isoméricos de kaempferol são mais abundantes nas folhas imaturas e jovens da soja. A concentração relativa desses flavonóis nas folhas imaturas dos estágios V3 e R2 diferiram significativamente das folhas jovens e velhas. Nos estágios VC, V5 e R1 apenas as folhas imaturas e velhas apresentam diferenças nas abundâncias (Figura 4.32). Embora nos outros estágios a abundância nas folhas velhas, jovens e imaturas não mostrem diferenças significativas, percebe-se que esses flavonoides são encontrados em altos níveis nas folhas imaturas em quase todos os estágios de desenvolvimento, excetuando-se o estágio de emergência VE (Figura 4.33).

Esses dados estão de acordo com estudo de Graham (1991), no qual relatou-se que os tecidos foliares primários da soja passam por uma mudança programada do metabolismo de isoflavonas para flavonóis três dias após a germinação e em cinco dias tornam-se amplamente predominadas por glicosídeos de kaempferol, quercetina e isoramnetina.

FIGURA 4. 31: Abundância relativa dos triglicósídeos de kaempferol em soja ao longo dos estágios de desenvolvimento e em folhas de diferentes idades. (V = folha velha; J = folha jovem; e I = folha imatura). ( $\pm$  erro padrão da média).

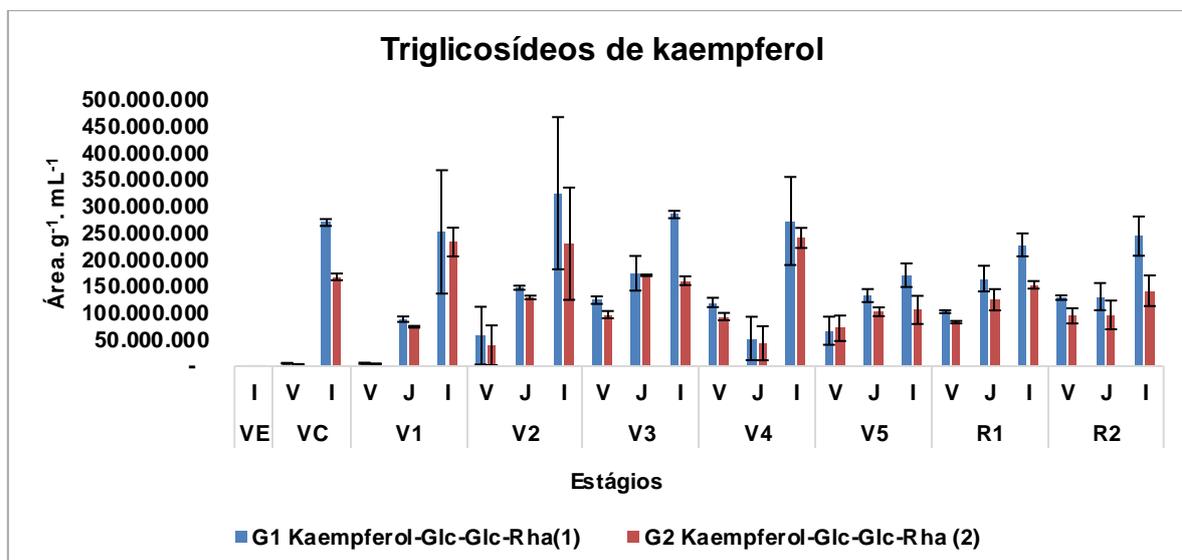


FIGURA 4. 32: Abundância relativa do triglicósido de kaempferol em diferentes estágios de desenvolvimento da soja e em folhas de diferentes idades para comparar a alocação espacial. (V = vegetativo; R = reprodutivo). Barras identificadas com as mesmas letras dentro de cada grupo, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade ( $P < 0,05$ ). ( $\pm$  erro padrão da média).

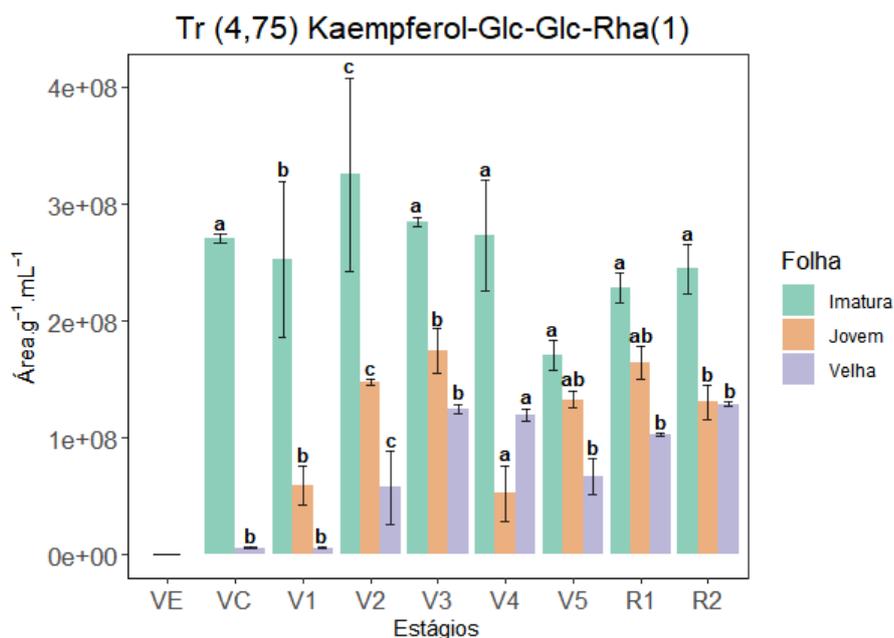
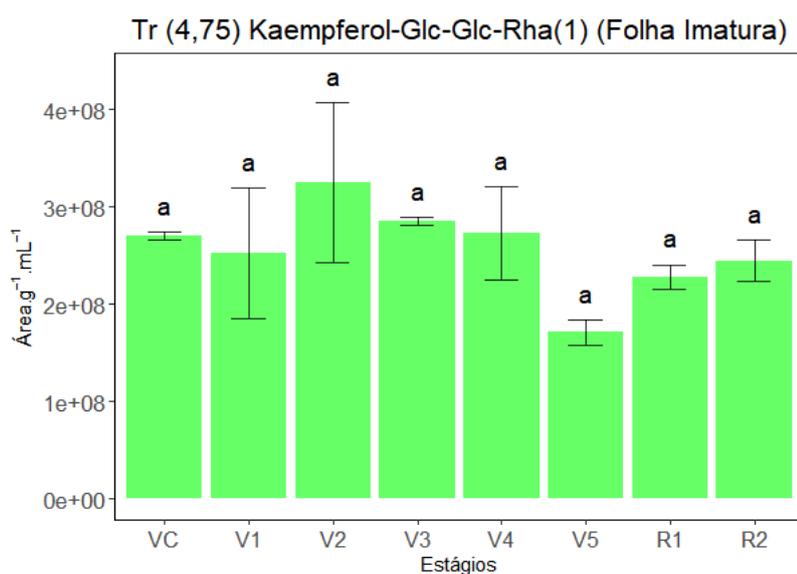


FIGURA 4. 33: Abundância relativa do triglicósido de kaempferol em folhas imaturas dos estágios de desenvolvimento da soja para comparar a alocação temporal. (V = vegetativo; R = reprodutivo). Barras identificadas com as mesmas letras dentro de cada grupo, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade ( $P < 0,05$ ). ( $\pm$  erro padrão da média).



O monoglicosídeo de kaempferol acumulou-se em todas as folhas a partir do estágio V1 a R2. Na maior parte dos estágios é observada uma tendência de alocação similar entre as folhas jovens e imaturas, mas esse composto é encontrado em baixos níveis nas folhas velhas (Figura 4.34).

Ao comparar a abundância desse flavonol entre folhas imaturas ao longo do desenvolvimento da soja, os estágios V2 e V4 são as fases que apresentam maior tendência de alocação desse composto e, somente V4 difere significativamente de todos os estágios em estudo ( $P < 0,05$ ) (Figura 4.35).

Os níveis dos diglicosídeos isoméricos de kaempferol glicose-glicose e glicose-ramnose apresentaram diferença de alocação durante o desenvolvimento da planta. Os isômeros de kaempferol-Glc-Glc foram encontrados em abundância na folha imatura do estágio VC e em níveis baixos nas folhas velhas, jovens e imaturas dos estágios V1, V2, V3, V4, V5, R1 e R2. Em contrapartida, os isômeros de kaempferol-Glc-Rha são os diglicosídeos que mais se acumularam nas folhas imaturas e jovens durante o crescimento da planta e alocados em maior quantidade na folha imatura do estágio V4 (Figuras 4.36, 4.37, 4.38).

FIGURA 4.34: Abundância relativa do monoglicosídeo de kaempferol em diferentes estágios de desenvolvimento da soja e em folhas de diferentes idades para comparar a alocação espacial. (V = vegetativo; R = reprodutivo). Barras identificadas com as mesmas letras dentro de cada grupo, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade ( $P < 0,05$ ). ( $\pm$  erro padrão da média).

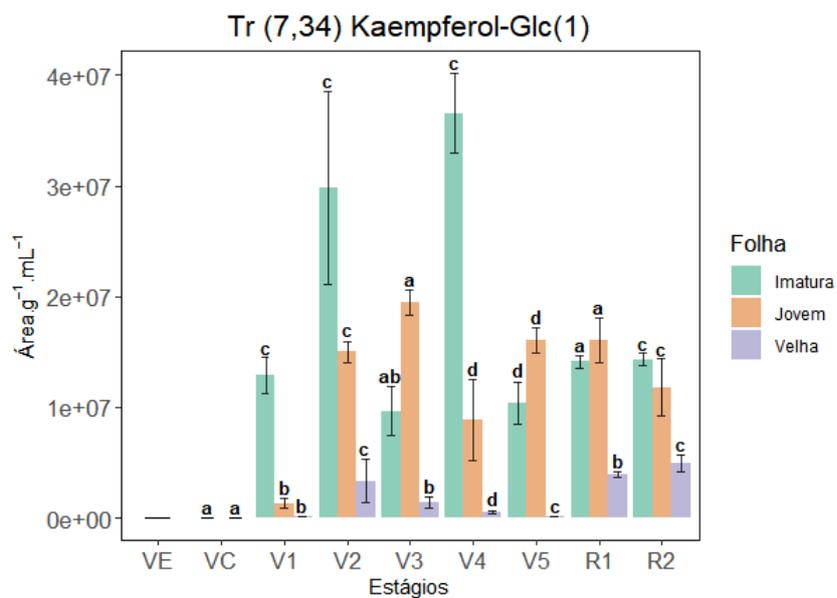


FIGURA 4. 35: Abundância relativa do monoglicosídeo de kaempferol em folhas imaturas dos estágios de desenvolvimento da soja para comparar a alocação temporal. (V = vegetativo; R = reprodutivo). Barras identificadas com as mesmas letras dentro de cada grupo, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade ( $P < 0,05$ ). ( $\pm$  erro padrão da média).

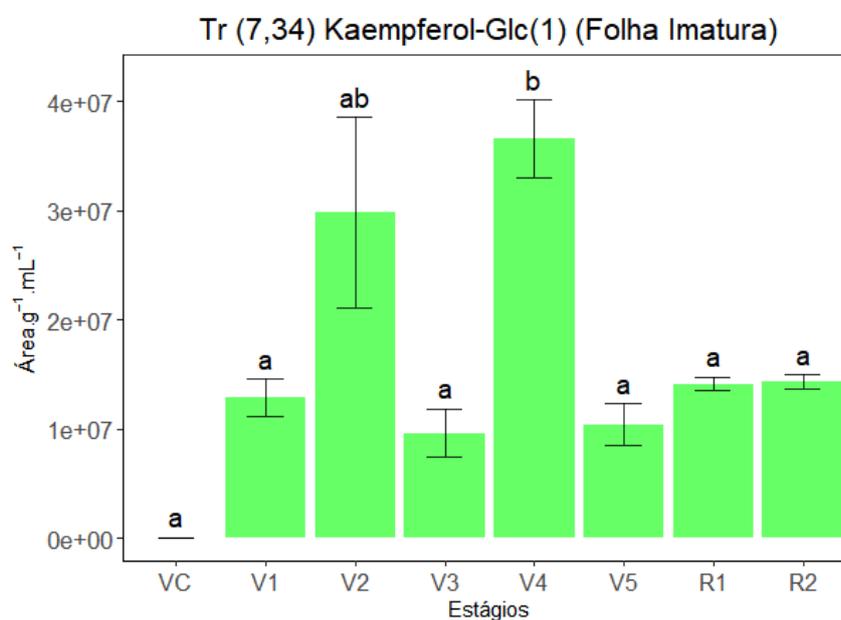


FIGURA 4. 36: Abundância relativa do diglicosídeo de kaempferol em diferentes estágios de desenvolvimento da soja e em folhas de diferentes idades para comparar a alocação espacial. (V = vegetativo; R = reprodutivo). Barras identificadas com as mesmas letras dentro de cada grupo, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade ( $P < 0,05$ ). ( $\pm$  erro padrão da média).

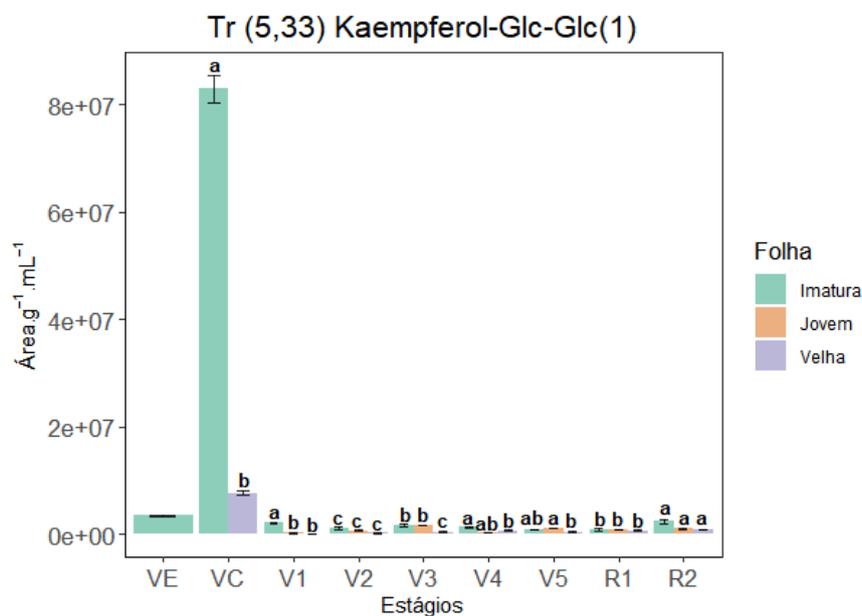


FIGURA 4. 37: Abundância relativa do diglicosídeo de kaempferol em folhas imaturas dos estágios de desenvolvimento da soja para comparar a alocação temporal. (V = vegetativo; R = reprodutivo). Barras identificadas com as mesmas letras dentro de cada grupo, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade ( $P < 0,05$ ). ( $\pm$  erro padrão da média).

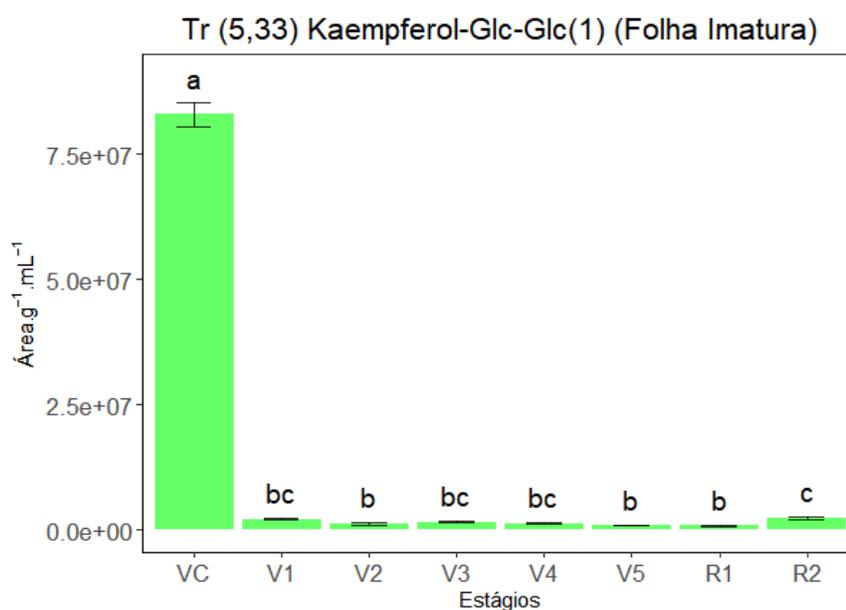
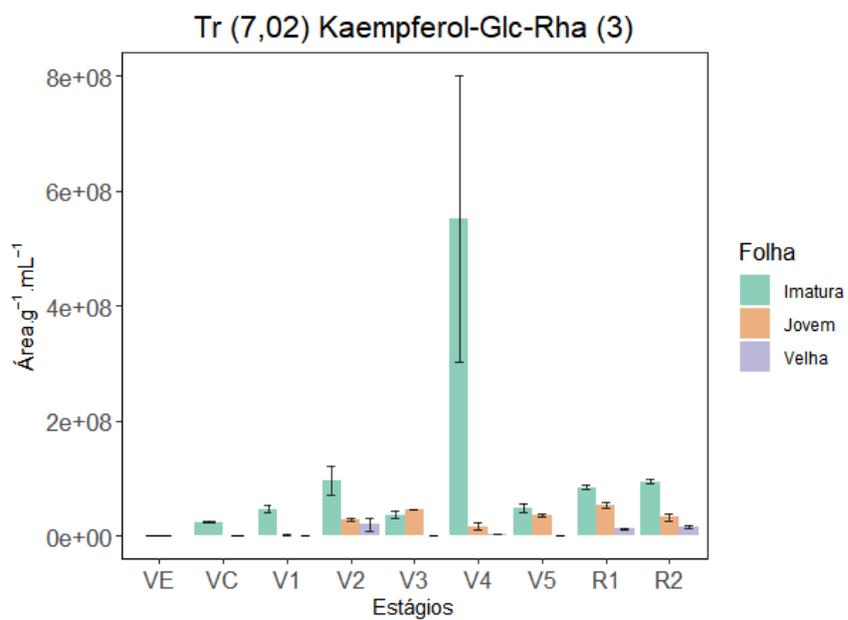


FIGURA 4. 38: Abundância relativa do diglicosídeo de kaempferol em diferentes estágios de desenvolvimento da soja e em folhas de diferentes idades para comparar a alocação espacial. (V = vegetativo; R = reprodutivo). Barras identificadas com as mesmas letras dentro de cada grupo, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade ( $P < 0,05$ ). ( $\pm$  erro padrão da média).



### 4.3 - Análise da dinâmica de alocação dos flavonoides

Diante da análise do perfil de alocação espacial e temporal das isoflavonas, foi visto que a planta diversifica seus metabólitos nas principais fases do seu desenvolvimento, tais como na fase inicial, (o estabelecimento da planta) e na fase final do período vegetativo (a transição para a fase reprodutiva, na qual a planta inicia o processo de sucessão de sua linhagem). Dessa forma, a daidzina, ononina, glicitina, afrormosina parecem depender da idade da folha e da planta. Ao contrário dessas isoflavonas, a dinâmica de alocação para genistina parece ser menos dependente desses fatores. Vale ressaltar que essa diversidade química e variação da concentração dos flavonoides nas folhas de soja, dependem de vários aspectos, tais como genótipo da cultivar, estresse ambiental, insetos, patógeno e condições de crescimento (YUN et al., 2018)

Os glicoconjugados de quercetina e kaempferol são os flavonoides mais encontrados nas folhas de diferentes genótipos de soja e suas abundâncias diferem de acordo com a espécie (YUN et al., 2020). Ao analisar o perfil de alocação para os flavonóis, a cultivar BRS 284, apresentou somente glicosídeos de kaempferol que foram encontrados em níveis altos nas folhas imaturas e jovens nos estágios vegetativos e reprodutivos, que são tecidos mais expostos à radiação ultravioleta. De fato, vários estudos mostraram que os flavonoides desempenham um papel importante na adaptação e resistência das plantas a diversos estresses ambientais como: luz ultravioleta, seca, baixa temperatura, solos ásperos ricos em metais tóxicos, patógenos e insetos. Especificamente na soja, foi visto que os flavonoides constitutivos têm grandes importâncias na defesa contra insetos (MIERZIAK et al., 2014; TREUTTER, 2006; YUN et al., 2020; YUN et al., 2018; ZHOU et al., 2011).

Diversos trabalhos estudaram experimentalmente o efeito da luz azul e UV em folhas de soja e demonstraram que os glicosídeos de kaempferol e quercetina aumentam em resposta à radiação UV na planta. De forma semelhante, esses flavonóis também se acumularam em folhas jovens de *Vicia faba* (feijão-fava) e observou-se um aumento dos glicosídeos de kaempferol por UV-A apenas em órgãos aéreos (DILLON et al., 2018; LIM et al., 2021; NEUGART et al., 2012; YAN et al., 2019).

No presente trabalho, foi observado que a maioria das isoflavonas são alocadas nas folhas velhas, enquanto os flavonóis se acumulam preferencialmente nas folhas jovens e imaturas. Diante do perfil químico e da dinâmica de alocação dos flavonoides estudados, sugere-se que a planta utiliza estratégias diferentes para alocar esses compostos e que folhas de diferentes idades possuem diferenças em suas composições, possivelmente refletindo a fisiologia dos diferentes tecidos.

Este é o primeiro estudo que fornece uma abordagem metabolômica comparativa para revelar a preferência de alocação de flavonoides em folhas de diferentes idades e durante os estágios de crescimento da soja. Dessa forma, evidências do papel dos flavonoides constitutivos da soja ajudarão a entender as suas possíveis ações nas interações da planta com vários agentes estressores e colaborar para o desenvolvimento de métodos que podem contribuir para a produtividade agrícola de maneira mais sustentável.

## 5 - CONCLUSÕES

Nos perfis químicos dos extratos de folhas frescas de soja do genótipo BRS 284 foram identificados vinte e um flavonoides pertencentes às classes de isoflavonas e flavonóis. A maioria das isoflavonas são mais abundantes nos estágios iniciais VE e VC e alocadas preferencialmente nas folhas velhas, exceto para genistina que não apresentou um padrão claro de alocação. A variedade estrutural dos derivados de isoflavonas parece depender da idade da planta e da folha. Os flavonóis são alocados em maior abundância relativa nas folhas imaturas e jovens, amplamente encontrados nos estágios vegetativos, exceto em VE. Os flavonóis encontrados foram mono, di e triglicosídeos isoméricos de kaempferol, não sendo observado quercetina e seus glicoconjugados nesse genótipo.

Evidências do papel constitutivo dos flavonoides da soja ajudarão a entender as suas possíveis ações nas interações da planta com vários agentes estressores e colaborar para o desenvolvimento de métodos que podem contribuir para a produtividade agrícola, adaptabilidade e resistência aos estresses bióticos e abióticos de maneira mais sustentável.

## 6 - REFERÊNCIAS

AGRAWAL, A. A.; PETSCHENKA, G.; BINGHAM, R. A.; WEBER, M. G.; RASMANN, S. “Toxic cardenolides: chemical ecology and coevolution of specialized plant-herbivore interactions”. **New Phytol.**, 194: 28-45, 2012.

ALJBORY, Z.; CHEN, M. “Indirect plant defense against insect herbivores: a review”. *Insect Science*, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 2-23, 2017. **Wiley**.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/1744-7917.12436>.

AOYAMA, E. MITSUKO; LABINAS, A. M. “Características estruturais das plantas contra a herbivoria por insetos”. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 15, n. 8, p. 365-386, 2012.

APPEL, H. M. “Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation”. **Journal Of Chemical Ecology**, [S.L.], v. 19, n. 7, p. 1521-1552, 1993. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00984895>.

ARAÚJO, M.A. “Modelos agrometeorológicos na estimativa da produtividade da cultura da soja na região de Ponto Grossa” – Paraná. 2008. 124f.  
Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Estadual do Paraná – UFP, Curitiba.

BENTIVENHA, J.P. F.; CANASSA, V. F.; BALDIN, E. L. L.; BORGUINI, M. G.; LIMA, G. P. P.; LOURENÇÃO, A. L. “Role of the rutin and genistein flavonoids in soybean resistance to *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: pentatomidae)”. **Arthropod-Plant Interactions**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 311-320, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11829-017-9578-5>.

BI, J.L.; FELTON G.W. “Foliar oxidative stress and insect herbivory primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance”. **J Chem. Ecol.**, 21:1511–1530, 1995.

BOEGE, K.; MARQUIS, R. J. “Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants”. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, p. 441-448, 2005.

CAMPOS, D. A. “Efeito gastroprotetor da 3,6-dimetoxi-6',6'- dimetil-[2',3':7,8]-cromenoflavona isolada de *Lonchocarpus araripensis* Benthann em camundongos e possíveis mecanismos”. Fortaleza, CE: Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, 2008.

CANTELLI, K. C. “Caracterização de linhagens de soja glycine max (l.) merrill para produção de brotos”. 2016. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.

CAVALIERE, C; CUCCI, F; FOGLIA, P; GUARINO, C; SAMPERI, R; LAGANÀ, A. “Flavonoid profile in soybeans by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry”. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, [S.L.], v. 21, n. 14, p. 2177-2187, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.3049>.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. “Acompanhamento de Safra Brasileira de Grãos”. Brasília, v.4, Safra 2019/2020, n.6, Sexto levantamento, 2019. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acessado em: 26 de set. 2020.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. “Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids”. **Journal of Mass Spectrometry**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 1–15, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jms.585>.

DE BORTOLI, A. S; MURATA, A. T; VACARI, A, M; BORTOLI, C, P; RAMALHO, D. G. “Herbivoria em soja: efeito na composição química das folhas e na biologia da lagarta da soja e do percevejo verde pequeno”. **Comunicata Scientiae** 3, v.3, p 192- 198, 2012.

DE FREITAS, M. M; SOUZA, B. H. S.; NOGUEIRA, L; BELLO, M. M; BOIÇA JÚNIOR, A.L. “Soybean defense induction to *Spodoptera cosmioides* herbivory is dependent on plant genotype and leaf position”. **Arthropod-Plant Interactions**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 85-96, 2018. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1007/s11829-017-9556-y>.

DE VILLIERS, A.; VENTER, P.; PASCH, H. “Recent advances and trends in the liquid-chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids”. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1430, p. 16–78, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.077>

NEGRA, B. L. D. “Metabolismo de flavonoides por *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis*”. 2019. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Química, UFSCar, São Carlos, 2019.

DILLON, F.M; TEJEDOR, M.D; ILINA, N; CHLUDIL, H.D; MITHÖFER, A; PAGANO, E. A; ZAVALA J. A. “Solar UV-B radiation and ethylene play a fundamental role in modulating the effective defenses against *Anticarsia gemmatalis* larvae in soybeans grown in the field: ethylene modulates the production of isoflavonoids” **Plant Cell Environ.**, 41, 2, p. 383 - 394, 2018.

EL-WAKEIL N. E.; VOLKMAR C.; SALLAMA A. A. “Jasmonic acid induces resistance to economically important insect pests in winter wheat”. **Pest. Manag. Sci.**, 66:549–554, 2010.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. “Stages of soybean development”. **Ames, Yowa: Yowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service**, 11 p. (Special Report, n. 80), 1977.

FENG, Z.; DING, C.; LI, W.; WANG, D.; CUI, D. “Applications of metabolomics in the research of soybean plant under abiotic stress”. **Food Chemistry**, v. 310, p. 125914, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125914>.

FLORENCIO, V.H. R. “Caracterização de variedades cultivadas de soja de diferentes grupos de maturação em função dos atributos morfológicos, fenológicos e a produtividade”. 2017. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Agrônômica, Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba, 2017.

FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. “Plant defense against insect herbivores”. [s.l: s.n.] v. 14, 2013.

GÓMEZ, J.D.; VITAL, C.E.; OLIVEIRA, M.G.A.; RAMOS, H.J.O. “Broad range flavonoid profiling by LC/MS of soybean genotypes contrasting for resistance to *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae)”. **PLoS ONE**. 13: 11, p. 54-63, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205010>

GRAHAM, L. T. “Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed root exudates”. **Plant. Physiol.** 95:594-603, 1991

HARBORNE, J.B. “Plant polyphenols and their role in plant defence mechanisms”. In: Brouillard R, Jay M, Scalbert A (eds) *Polyphenols*, vol. 94, p.19-26, 1994.

HERATH, H.M.T.B.; DASSANAYAKE, R.s.; PRIYADARSHANI, A.M.A.; SILVA, S.; WANNIGAMA, G.P.; JAMIE, J. “Isoflavonoids and a pterocarpan from *Gliricidia sepium*”. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 47, n. 1, p.117-119, 1998. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(97\)00517-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(97)00517-7).

HO. H.M.; CHEN R.Y.; LEUNG L.K.; CHAN F.L.; HUANG Y.; CHEN Z.Y. “Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soy leaf”. **Biomed Pharmacother.** 56: p. 2899-5, 2002.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; HARBONE, J. B. & MCCAFFERY, A. R. “Pre-ingestive and post-ingestive effects of soyabean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth” **Ent. Exp. et Apl.**, 98: p.181-194, 2001.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; NETO, J. A. R.; OLIVEIRA M. N. C. N.; OLIVEIRA, L. J. “Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*”. **Pesq. Agropec. Bras.**, 41: 10, p. 453-1459, 2006.

HUTABARAT, L.S; GREENFIELD, H; MULHOLLAND, M. “Quantitative determination of isoflavones and coumestrol in soybean by column liquid chromatography”. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 886, p. 55-63, 2000. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)00444-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00444-1).

INGHAM, J.L; KEEN, N.T; MULHEIRN, L. J; LYNE, R. L. “Isoflavonoids formed by induction of soybean leaves”. **Phytochemistry**. 20: p. 795-798, 1981.

ISAH, T. “Stress and defense responses in plant secondary metabolites production”. **Biological Research**, [S.L.], v. 52, n. 1, p. 23-35, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>.

KACHLICKI, P.; EINHORN, J.; MUTH, D.; KERHOAS, L.; STOBIECKI, M. “Evaluation of glycosylation and malonylation patterns in glycoside flavonoids during LC / MS / MS metabolite profiling. **J. Mass Spectrom**, 43, p.572-586, 2008.

KACHLICKI, P.; PIASECKA, A.; STOBIECKI, M.; MARCZAK, L. “Structural characterization of flavonoid glycoconjugates and their derivatives with mass spectrometric techniques”. **Molecules**, [s. l.], v. 21, n. 11, p.1494, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21111494>.

KÖHLER, A.; MAAG, D.; VEYRAT, N.; GLAUSER, G.; WOLFENDER, J.; TURLINGS, T. C. J.; ERB, M. “Within-plant distribution of 1,4-benzoxazin-3-ones contributes to herbivore niche differentiation in maize”. **Plant, Cell & Environment**, [S.L.], v. 38, n. 6, p. 1081-1093, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/pce.12464>.

LEE, E. M.; PARK, S. J.; LEE, J.; LEE, B. M.; SHIN, B. K.; KANG, D. J.; CHOI, H. K.; KIM, Y; LEE, D. Y. “Highly geographical specificity of metabolomic traits among Korean domestic soybeans (*Glycine max*)”. **Food Research International**, [S.L.], v. 120, p. 12-18, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.021>.

LIM, Y. J.; LYU, J. I.; KWON, S. J.; EOM, S. H. "Effects of UV-A radiation on organ-specific accumulation and gene expression of isoflavones and flavonols in soybean sprout". **Food Chemistry**, [S.L.], v. 339, p. 128080-142080, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128080>.

MACDONALD, K. P.; BACH, C. E. "Resistance and tolerance to herbivory in *Salix cordata* are affected by different environmental factors". **Ecological Entomology**, v. 30, p. 581-589, 2005.

MARKHAM, K. R. "Flavones, flavonols and their glycosides". In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Eds.). **Methods in plant biochemistry**. London: Academic Press, p. 197-235, 1989.

MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. "Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment". **Molecules**, 19, 10: 16240-16265, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules191016240>

MOSCARDIF.; BUENO A.F.; SOSA-GOMEZ D.R.; ROGGIA S.; HOFFMANN-CAMPO C.B.; POMARIA.F.; CORSO I.C.; YANO S. A.C. "Artrópodes que atacam as folhas da soja". In: Hoffmann-Campo CB, Corrêa-Ferreira BS, MOSCARDIF (eds) Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes praga. Embrapa, Brasília, pp 213-334, 2012.

MURAKAMI, S.; NAKATA, R.; ABOSHI, T.; YOSHINAGA, N.; TERAISHI, M.; OKUMOTO, Y.; ISHIHARA, A.; MORISAKA, H.; HUFFAKER, A.; SCHMELZ, E. "Insect-induced daidzein, formononetin and their conjugates in soybean leaves". **Metabolites**, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 532-546, 4 jul. 2014 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo4030532>.

NEUGART, S.; KLÄRING H. P.; ZIETZ, M.; SCHREINER, M.; ROHN, S.; KROH, L. W.; KRUMBEIN, A. "O efeito da temperatura e da radiação nas agliconas de flavonóis e glicosídeos de flavonóis da couve (*Brassica oleracea* var. *Sabellica*)". **Food Chemistry**, 133, 4. p. 1456-1465, 2012.

OERKE, E. C. "Crop losses to pests". **The Journal Of Agricultural Science**, [S.L.], v. 144, n. 1, p. 31-43, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1017/s0021859605005708>.

OSMAN, S. F.; FETT, W. F. "Isoflavone glucoside stress metabolites of soybean leaves". **Phytochemistry**. v. 22, p.1921-1923, 1983.

PEREIRA, I. S. P.; RODRIGUES, V. F.; VEGA, R. G. "Flavonoids from the Genus *Solanum*". **Revista Virtual de Química**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 4-26, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20160021>.

- PICKERSKY, E.; LEWINSOHN, E. “Convergent evolution in plant specialized metabolism”. **Plant Biol.**, 62: 549-566, 2011.
- PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H. & OLIVEIRA, M. C. N. “Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*?” **Journal of Chemical Ecology**, 31, p. 1509-1525, 2005.
- PIUBELLI, G.C.; MOSCARDI, F; HOFFMANN-CAMPO, C.B. “Interactions among insect-resistant soybean genotypes extracts with populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: noctuidae) susceptible and resistant to its nucleopolyhedro virus”. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S.L.], v. 81, n. 4, p. 861-871, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0001-37652009000400021>.
- RIBANI, R. H. “Compostos fenólicos em erva-mate e frutas”. Campinas, SP: Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006
- ROMANI, A; VIGNOLINI, P; GALARDI, C; AROLDI, C; VAZZANA, C; HEIMLER, D. “Polyphenolic content in different plant parts of soy cultivars grown under natural conditions”. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 51, n. 18, p. 5301-5306, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf0212136>.
- SILVA, T. F.B.; ALMEIDA, A. C. S.; MOURA, T. L.; SILVA, A. R. F., SILVIA, S. S.; FLÁVIO, G. “Effect of the flavonoid rutin on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)”. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 38, p.165-170, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i2.27956>
- SIMMONDS, M. S. J. “Importance of flavonoids in insect–plant interactions: feeding and oviposition”. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 56, n. 3, p. 245-252, 2001. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00453-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00453-2).
- SIMONS, R; VINCKEN, J.P; BOHIN, M. C.; KUIJPERS, T. F.M.; VERBRUGGEN, M. A.; GRUPPEN, H. “Identification of prenylated pterocarpan and other isoflavonoids in *Rhizopus* spp. elicited soya bean seedlings by electrospray ionisation mass spectrometry”. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 55-65, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.4826>.
- SOARES, A. M.; DOS S.; MACHADO, O. L.T. “Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio”. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. v.1, n.1, p.9-19, 2007.

SONG, H. H; RYU, H. W; LEE, K.J; JEONG, II Y; KIM, D.S; OH, S.R. “Metabolomics investigation of flavonoid synthesis in soybean leaves depending on the growth stage”. **Metabolomics**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 833-841, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-014-0640-3>.

SOUZA, B. “Fatores e mecanismos que influenciam a resistência em soja a *Anticarsia gemmatilis* Hübner e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)”. **Aleph**, [S. l.], v. 23, p. 34-43, 2014.

STRACKE, R; FAVORY, J. J; GRUBER, H; BARTELNIEWOEHNER, L; BARTELS, S; BINKERT, M; FUNK, M; WEISSHAAR, B; ULM, R. “The *Arabidopsis* ZIP transcription factor HY5 regulates expression of the PFG1/MYB12 gene in response to light and ultraviolet-B radiation”. **Plant, Cell & Environment**, [S.L.], v. 8, n. 33, p. 88-103, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02061.x>.

TREUTTER, D. “Significance of flavonoids in plant resistance: a review”. **Environmental Chemistry Letters**. [S.L.], v. 4, n. 3, p. 147-157, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10311-006-0068-8>.

VUKICS, V.; RINGER, T.; KERY, A.; BONN, G. K.; GUTTMAN, A. “Analysis of heartsease (*Viola tricolor* L.) flavonoid glycosides by micro-liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry”. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 11-20, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.017>.

WAR, A. R; PAULRAJ, M G; AHMAD, T; BUHROO, A. A; HUSSAIN, B; IGNACIMUTHU, S; SHARMA, H C. “Mechanisms of plant defense against insect herbivores”. **Plant Signaling & Behavior**, [S.L.], v. 7, n. 10, p. 1306-1320, 2012. Informa Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4161/psb.21663>.

WAR, A. R; TAGGAR, G. K; HUSSAIN, B; TAGGAR, M. S; NAIR, R. M; SHARMA, H:C. “Plant defense against herbivory and Insect adaptations”. **Aob Plants**, [S.L.], p. 1123-1132, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/aobpla/ply037>.

WAR, A.; PAULRAJ M.G.; AHMAD. T.; BUHROO, A. A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA H.C. “Mechanisms of plant defense against insect herbivores”. **Plant Signal Behav.**, 7, p. 235-243, 2012 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4161/psb.21663>, 2012.

WEGULO, S. N; YANG, X. B; MARTINSON, C. A; MURPHY, P.A. “Effects of injury and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* on isoflavone concentrations in soybean”. **J. Plant**. p.749-760, 2005.

YAN, Y; STODDARD, F. L.; NEUGART, S; SADRAS, V. O.; LINDFORS, A; MORALES, L. O; APHALO, PEDRO, J. “Responses of flavonoid profile and associated gene expression to solar blue and UV radiation in two accessions of *Vicia faba* L. from contrasting UV environments”. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 434-447, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/c8pp00567b>.

YUK, H. J; CURTIS-LONG, M. J; RYU, H. W; JANG, K. C., SEO, W. D; KIM, J. Y.(2011a). “Pterocarpan profiles for soybean leaves at different growth stages and investigation of their glycosidase inhibitions”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, p.12683-12690, 2011.

YUK, H. J; LEE, J. H; CURTIS-LONG, M. J; LEE, J. W; KIM, Y. S; RYU, H. W. “The most abundant polyphenol of soy leaves, coumestrol, displays potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity”. **Food Chemistry**, 126, p.1057-1067, 2011.

YUN, D.Y; KANG, Y. G; KIM, E. H; KIM, M; PARK, N.H; CHOI, H.T; GO, G .H; LEE, J. H; PARK, J. S; HONG, Y. S. “Metabolomics approach for understanding geographical dependence of soybean leaf metabolome”. **Food Research International**, [S.L.], v. 106, p. 842-852, 2018. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.061>.

YUN, D.Y; KANG, Y.G; KIM, M; KIM, D; KIM, E. H; HONG, Y.S. “Metabotyping of different soybean genotypes and distinct metabolism in their seeds and leaves”. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 330, p. 127-137, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127198>.

ZHAO, X; MA, F.; LI, P.; LI, G.; ZHANG, L.; ZHANG, Q.; ZHANG, W.; WANG, X. “Simultaneous determination of isoflavones and resveratrols for adulteration detection of soybean and peanut oils by mixed-mode SPE LC-MS/MS”. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 176, p. 465-471, 2015. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.082>.

ZHOU, S.; LOU, Y. R.; TZIN, V.; JANDER, G. “Alteration of plant primary metabolism in response to insect herbivory.” **Plant. Physiol.**, v. 169, p. 1488-1498, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.15.01405>

ZHOU, Y.; LOU, S.; YI, T.; LI, C.; LUO, Q.; HUA, J.; LIU, Y. & HONG “Secondary metabolites from glycine soja and their growth inhibitory effect against *Spodoptera litura*”. **J. Agric. Food Chem.**, 59: p. 6004-6010, 2011.