

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

COMPARAÇÃO DO PERFIL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
CULTIVARES DE SOJA

Victoria Patricia Peña Arroyó*

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

Orientador: 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 Victoria Patricia Pena Arroyo, realizada em 29/07/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters (UFSCar)

Prof. Dr. João Oiano Neto (EMBRAPA)

Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva (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.

“Si un problema tiene solución, no hace falta preocuparse. Si no tiene solución, preocuparse no sirve de nada.”

PROVERBIO CHINO

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Rodrigo Peña, Norma Arroyo e Elvia Lobo, por seu amor, trabalho e sacrifício em todos esses anos.

A toda a minha família porque, com suas orações, conselhos e palavras de encorajamento, eles me tornaram uma pessoa melhor e, de uma maneira ou de outra, me acompanham em todos os meus sonhos e objetivos.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha gratidão a Deus, por ser meu guia e me acompanhar ao longo da vida, me dando paciência e sabedoria para concluir com êxito meus objetivos propostos.

Aos meus pais, por serem meu pilar fundamental e por terem me apoiado incondicionalmente em toda a minha formação e me deram o exemplo de trabalho e honestidade, e ao meu namorado Yeison, por seu apoio, carinho e paciência neste projeto de estudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters por ser fonte de grande inspiração, pela orientação e contribuição na minha formação durante o mestrado.

Aos meus amigos do laboratório de Produtos Naturais: Josi, Jeniffer, Danilo, Luis Guillermo e Liliam; pela amizade, apoio e troca de experiências.

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais, pelos ensinamentos, suporte e colaboração.

Aos meus amigos: Lara, Karen, Guille, Manuel e Alberto, pela torcida durante este processo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade de desenvolver o Mestrado Acadêmico.

Aos órgãos de fomento, principalmente a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pois sem o apoio financeiro não seria possível à realização deste estudo.

Aos funcionários do PPGQ-UFSCar e técnicos que contribuíram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho.

A todos muito obrigada. Muchas gracias!

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 – Abreviações dos flavonoides e conjugados identificados nas distintas variedades de soja.....	27
TABELA 4.2 – Isoflavonas detectadas por LC-MS nas cultivares P1, P2, P3, P4 e soja selvagem P5.....	38
TABELA 4.3 – Flavonóis detectados por LC-MS nas cultivares P1, P2, P3, P4 e soja selvagem P5.....	39
TABELA A.1 – Flavonoides detectados por LC-MS na cultivar BRS 257 (P1).....	75
TABELA A.2 – Isoflavonas detectadas por LC-MS na cultivar PI 229358 (P2).....	76
TABELA A.3 – Flavonóis detectados por LC-MS na cultivar PI 229358 (P2).....	77
TABELA A.4 – Isoflavonas detectadas por LC-MS na cultivar IAC 100 (P3).....	78
TABELA A.5 – Flavonóis detectados por LC-MS na cultivar IAC 100 (P3).....	79
TABELA A.6 – Isoflavonas detectadas por LC-MS na cultivar IACPL - 1 (P4).....	80
TABELA A.7 – Flavonóis detectados por LC-MS na cultivar IACPL - 1 (P4).....	81
TABELA A.8 – Isoflavonas detectadas por LC-MS na soja selvagem PI 407270 (P5)	82
TABELA A.9 – Flavonóis detectados por LC-MS na soja selvagem PI 407270 (P5).....	83

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Estágios fenológicos da soja e estágios de maior ocorrência de algumas pragas desfolhadoras na cultura.....	4
FIGURA 1.2 – Caminhos de dispersão da soja do centro de origem para outras regiões do mundo.....	6
FIGURA 1.3 – Lagartas nas formas verde (a) e escura (b) de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , lagarta de <i>Spodoptera frugiperda</i> (c) e sintoma da injúria causada na folha de soja (d).....	8
FIGURA 1.4 – Categorias de defesa da planta contra herbívoros.....	10
FIGURA 1.5 – Estruturas químicas das principais classes de flavonoides na forma aglicona a) flavona (apigenina), b) flavonol (quercetina), c) flavanona (naringenina), d) flavanonol (taxifolina), e) flavanol (catequina) e f) isoflavona (daidzeína).....	16
FIGURA 3. 1 – Esquema de coleta das amostras no estágio de desenvolvimento V3 para os genótipos estudados. U, folhas unifolioladas velhas; T1, folhas trifolioladas intermédias e T2, folhas trifolioladas mais jovens.....	22
FIGURA 4.1 – Estruturas sugeridas para as a) isoflavonas e b) flavonóis identificados nas variedades P1, P2, P3, P4 e P5.....	26
FIGURA 4.2 – Espectros de massas para as isoflavonas glicosiladas a) Daidzeína-hex, b) Genisteína-hex e c) Gliciteína-hex, detectadas nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.....	28
FIGURA 4.3 – Espectros de massas para os conjugados de kaempferol a) Kaempferol-hex-hex-ram-2, b) Kaempferol-hex-ram-3 e c) Kaempferol-hex-2 detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.....	32

FIGURA 4.4 - Espectros de massas para os conjugados de quercetina a) Quercetina-hex-hex-ram-2, b) Quercetina-hex-ram-3 e c) Quercetina-hex-2, detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.....	34
FIGURA 4.5 - Espectros de massas para os conjugados de isoramnetina a) Isoramnetina-hex-ram-ram-2, b) Isoramnetina-hex-ram-3 e c) Isoramnetina-hex-2, detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.....	35
FIGURA 4.6 – Abundâncias relativas ($\text{Área.g}^{-1}.\text{mL}^{-1}$) das somatórias dos conjugados de daidzeína e formononetina nas folhas dos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5 no estágio de desenvolvimento V3.....	46
FIGURA 4.7 – Abundâncias relativas ($\text{Área.g}^{-1}.\text{mL}^{-1}$) das somatórias dos conjugados de genisteína e gliciteína nas folhas dos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5 no estágio de desenvolvimento V3.....	47
FIGURA 4.8 – Abundâncias relativas ($\text{Área.g}^{-1}.\text{mL}^{-1}$) das somatórias dos conjugados de afrormosina e kaempferol nas folhas dos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5 no estágio de desenvolvimento V3.....	48
FIGURA 4.9 – Abundâncias relativas ($\text{Área.g}^{-1}.\text{mL}^{-1}$) das somatórias dos conjugados de quercetina e isoramnetina nas folhas dos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5 no estágio de desenvolvimento V3.....	49
FIGURA A.1 – Cromatogramas de EIC para conjugados de daidzeína nos extratos de folhas dos genótipos a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 e e) P5.....	66
FIGURA A.2 – Espectros de massas para os conjugados de daidzeína a) Daidzeína-mal-hex e b) Daidzeína detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.....	66
FIGURA A.3 – Cromatogramas de EIC para conjugados de formononetina nos extratos de folhas dos genótipos a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 e e) P5.....	67

FIGURA A.4 – Espectros de massas para os conjugados de formononetina a) Formononetina-hex- 1 e b) Formononetina-mal-hex detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.....	67
FIGURA A.5 – Cromatogramas de EIC para conjugados de genisteína nos extratos de folhas dos genótipos a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 e e) P5.....	68
FIGURA A.6 – Espectros de massas para os conjugados de genisteína a) Genisteína-feruloil-hex e b) Genisteína-mal-hex-2 detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.....	68
FIGURA A-7 – Cromatogramas de EIC para conjugados de gliciteína nos extratos de folhas dos genótipos a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 e e) P5.....	69
FIGURA A.8 – Espectros de massas para a) Gliciteína-mal-hex, b) Afrormosina-hex-2 e c) Afrormosina-mal-hex-2 detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.....	69
FIGURA A.9 – Cromatogramas de EIC para conjugados de afrormosina nos extratos de folhas dos genótipos a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 e e) P5.....	70
FIGURA A.10 – Cromatogramas de EIC para conjugados de kaempferol nos extratos de folhas dos genótipos a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 e e) P5.....	70
FIGURA A.11 – Espectros de massas para os conjugados de kaempferol a) Kaempferol-hex-ram-ram-1 e b) Kaempferol-hex-hex-1 detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.....	71
FIGURA A.12 – Cromatogramas de EIC para conjugados de metilkaempferol nos extratos de folhas dos genótipos a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 e e) P5.....	71
FIGURA A.13 – Espectros de massas para os conjugados de metilkaempferol a) Metilkaempferol-hex e b) Metilkaempferol-mal-hex-1 detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.....	72

FIGURA A.14 – Cromatogramas de EIC para conjugados de quercetina nos extratos de folhas dos genótipos a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 e e) P5.....	72
FIGURA A.15 – Espectros de massas para os conjugados de quercetina e isoramnetina a) Quercetina-hex-ram-ram b) Quercetina-hex-hex-1 e c) Isoramnetina-hex-hex-ram detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.....	73
FIGURA A.16 – Cromatogramas de EIC para conjugados de isoramnetina nos extratos de folhas dos genótipos a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 e e) P5.....	74
FIGURA A.17 – Abundâncias relativas de flavonoides (Área. g ⁻¹ . mL ⁻¹) nas folhas da cultivar BRS 257 (P1) no estágio de desenvolvimento V3.....	84
FIGURA A.18 – Abundâncias relativas de isoflavonas (Área. g ⁻¹ . mL ⁻¹) nas folhas da cultivar PI229358 (P2) no estágio de desenvolvimento V3.....	85
FIGURA A.19 – Abundâncias relativas de flavonóis (Área. g ⁻¹ . mL ⁻¹) nas folhas da cultivar PI229358 (P2) no estágio de desenvolvimento V3.....	86
FIGURA A.20 – Abundâncias relativas de isoflavonas (Área. g ⁻¹ . mL ⁻¹) nas folhas da cultivar IAC100 (P3) no estágio de desenvolvimento V3.....	87
FIGURA A.21 – Abundâncias relativas de flavonóis (Área. g ⁻¹ . mL ⁻¹) nas folhas da cultivar IAC100 (P3) no estágio de desenvolvimento V3.....	88
FIGURA A.22 – Abundâncias relativas de isoflavonas (Área. g ⁻¹ . mL ⁻¹) nas folhas da cultivar IACPL-1 (P4) no estágio de desenvolvimento V3.....	89
FIGURA A.23 – Abundâncias relativas de flavonóis (Área. g ⁻¹ . mL ⁻¹) nas folhas da cultivar IACPL-1 (P4) no estágio de desenvolvimento V3.....	90
FIGURA A.24 – Abundâncias relativas de isoflavonas (Área. g ⁻¹ . mL ⁻¹) nas folhas de soja selvagem PI407270 (P5) no estágio de desenvolvimento V3.....	91
FIGURA A.25 – Abundâncias relativas de flavonóis (Área. g ⁻¹ . mL ⁻¹) nas folhas de soja selvagem PI407270 (P5) no estágio de desenvolvimento V3.....	92

RESUMO

COMPARAÇÃO DO PERFIL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE CULTIVARES DE SOJA. A soja, (*Glycine max*), é uma das culturas mais importantes no cenário socioeconômico mundial, em especial no Brasil. No entanto, esta cultura é constantemente atacada por distintas pragas. A resistência das plantas contra herbívoros ocorre em parte pela produção de metabólitos secundários, como os flavonoides. Tanto a soja selvagem como as variedades cultivadas exibem diferentes níveis de resistência a pragas agrícolas, o que pode ser consequência da variabilidade nos seus perfis de metabólitos secundários. Assim, identificar estas substâncias entre distintos genótipos e entender o papel que têm nos mecanismos de interação inseto-planta é importante para uma caracterização mais abrangente e confiável da resistência da soja. Deste modo, este trabalho propõe-se comparar o perfil de metabólitos secundários entre 4 variedades de soja cultivada resistentes (PI 229358 e IAC 100) e susceptíveis (BRS 257 e IAC PL-1) a pragas e uma variedade de soja selvagem (PI 407270). Foi analisado o perfil químico em folhas jovens e velhas no estágio de desenvolvimento V3. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação e as diferentes amostras foram extraídas e analisadas por LC-MS. A análise do perfil de flavonoides nas 5 variedades permitiu a identificação de 18 conjugados de isoflavonas (daidzeína, genisteína e gliciteína), alguns dos quais estavam presentes em maior abundância nas folhas velhas. Também foram detectados 39 flavonóis, incluindo conjugados de kaempferol e quercetina; acumulados em sua maioria nas folhas jovens. Ademais, foi evidenciado que a soja selvagem apresenta níveis mais altos de flavonoides nas suas folhas mais jovens, em contraste com as variedades cultivadas. Estas informações nos permitirão entender a dinâmica dos flavonóides nos mecanismos de interação inseto-planta e deste modo, contribuir na criação de variedades resistentes e novos alvos para o manejo de pragas agrícolas, contribuindo para o desenvolvimento sustentável da agricultura.

ABSTRACT

COMPARISON OF THE SECONDARY METABOLITES PROFILE OF SOYBEAN CULTIVARS. Soybean (*Glycine max*) is one of the most important crops in the world socioeconomic scenario, especially in Brazil. However, this crop is constantly attacked by different pests. Plant resistance against herbivores occurs partially through the production of secondary metabolites such as flavonoids. Wild soybeans and cultivated varieties exhibit different levels of resistance to agricultural pests, which may be a consequence of the variability in their secondary metabolite profiles. Thus, identifying these substances among different genotypes and understanding their role in the insect-plant interaction mechanisms is important for a more comprehensive and reliable characterization of soybean resistance. This work proposes to compare the profile of secondary metabolites between 4 cultivated soybean varieties resistant (PI 229358 and IAC 100) and susceptible (BRS 257 and IAC PL-1) to pests and a wild soybean variety (PI 407270). The chemical profile of young and old leaves in the V3 development stage was analyzed. Plants were grown in a greenhouse and different samples were extracted and analyzed by LC-MS. The analysis of the flavonoid profile in the 5 varieties allowed the identification of 18 isoflavone conjugates (daidzein, genistein and glycitein), some of which were present in greater abundance in old leaves. 39 flavonols were also detected, including kaempferol and quercetin conjugates; accumulated mostly in young leaves. Furthermore, it was shown that wild soybeans have higher levels of flavonoids in their younger leaves, in contrast to cultivated varieties. This information will allow us to understand the dynamics of flavonoids in the insect-plant interaction mechanisms and contribute to the creation of resistant varieties and new targets for the management of agricultural pests, contributing to the sustainable development of agriculture.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Características da soja.....	2
1.2 – Domesticação da soja.....	4
1.3 – Pragas que atacam as folhas da soja.....	8
1.4 – Interações entre planta e herbívoro.....	9
1.5 – Estratégias de defesas de plantas contra herbívoros.....	9
1.5.1 – Respostas de defesa em plantas.....	11
1.5.2 – Respostas de defesa da soja.....	13
1.6 – Flavonoides como defesas químicas da soja.....	15
2 – OBJETIVOS.....	20
3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	21
3.1 – Sementes de soja e crescimento das plantas.....	21
3.2 – Coleta e extração de material vegetal.....	21
3.3 – Análises cromatográficas.....	23
3.4 – Análise de Dados.....	24
4 – RESULTADOS E DISCUSÃO.....	25
4.1 – Identificação de flavonoides presentes nos extratos.....	25
4.1.1 – Identificação de isoflavonas	27
4.1.2 – Identificação de flavonóis	30

4.1.3 – Composição de flavonoides nos genótipos estudados e diferenças gerais	36
4.2 – Quantificação relativa de flavonoides	43
4.2.1 – Abundância relativa de flavonoides	44
4.3 – Estudo comparativo das abundâncias relativas de flavonoides.....	45
5 – CONCLUSÕES.....	52
6 – REFERÊNCIAS.....	54
7 – APENDICE.....	66

1 – INTRODUÇÃO

A soja, [*Glycine max* (L.) Merrill], é uma das culturas mais importantes no cenário socioeconômico mundial. Devido ao seu elevado valor nutricional, com alto teor de proteínas, lipídios e carboidratos, tem sido considerada uma das leguminosas de maior cultivo e consumo no mundo^{1,2}. Tanto a soja cultivada (*Glycine max*) como seu parente selvagem (*Glycine soja*) pertencem à família vegetal Fabaceae, do gênero *Glycine* e subgênero *Soja*³ e são originárias da China⁴. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA (2021) o Brasil é o maior produtor de soja no mundo com 135,409 milhões de toneladas produzidas em uma área de 38,502 milhões de hectares. Hoje em dia, o Brasil vem contando com uma crescente produção no seu campo agrícola, tanto em qualidade, quanto em diversidade e quantidade de produtos. Isto é, o Brasil é o país que mostra a maior capacidade de expansão da área cultivada, tendo potencial de multiplicar a sua atual produção e suprir em grande medida a crescente demanda pelo grão⁵, pois se estima que o consumo alimentar esteja aumentando mais rápido que a produção e conseqüentemente induzirá um déficit de grãos e soja⁶.

Mesmo que o aumento na produtividade das lavouras de soja seja evidente, sua cultura é geralmente afetada pela perda de diversidade genética obtida durante o processo de domesticação, o que limita o potencial de reprodução de variedades de soja com elevada tolerância ao estresse ambiental e às características de resistência contra pragas⁷. Isso faz com que as plantas sejam constantemente atacadas por distintos herbívoros, que podem causar lesões e limitar sua produção, ocasionando enormes perdas desde o plantio até a pós-colheita. O surgimento deste tipo de ameaça tem chamado a atenção de diversos setores produtivos da soja, os quais têm buscado controlar tais pragas e diminuir o risco de perdas de produtividade da cultura. Dentre os diversos fatores que têm afetado negativamente a produção da soja nos últimos anos, tem se destacado o

ataque de lagartas, consideradas um dos principais grupos de pragas da cultura no Brasil⁸. O controle dessas pragas é geralmente baseado em produtos químicos, que são mais eficientes e fáceis de adquirir. No entanto, o mal uso desses pesticidas facilita o desenvolvimento de pragas mais resistentes, causando impactos negativos na saúde humana e no meio ambiente ¹.

As plantas possuem vários mecanismos para se defender contra o ataque de herbívoros, dentre os quais se destaca a produção de metabólitos secundários capazes de modificar o comportamento de insetos ou inibir o seu crescimento e desenvolvimento, como alcaloides, flavonoides, terpenoides, etc. No entanto, alguns insetos conseguem adaptar-se e minimizar os efeitos nocivos causados por essas defesas químicas. Assim, em contraste com *Glycine max*, a soja selvagem pode se adaptar mais facilmente a condições ambientais intensas e geralmente apresenta maior resistência a insetos e patógenos, o que possivelmente está associado às funções defensivas dos compostos acumulados em seus tecidos. Nesse contexto, identificar essas substâncias e entender o papel que tem nos mecanismos de interação inseto-planta representa um grande potencial para o desenvolvimento de novas variedades resistentes e novos alvos para o manejo de pragas agrícolas, contribuindo para o desenvolvimento sustentável da agricultura e proteção ambiental⁹⁻¹⁴.

1.1 – Características da soja

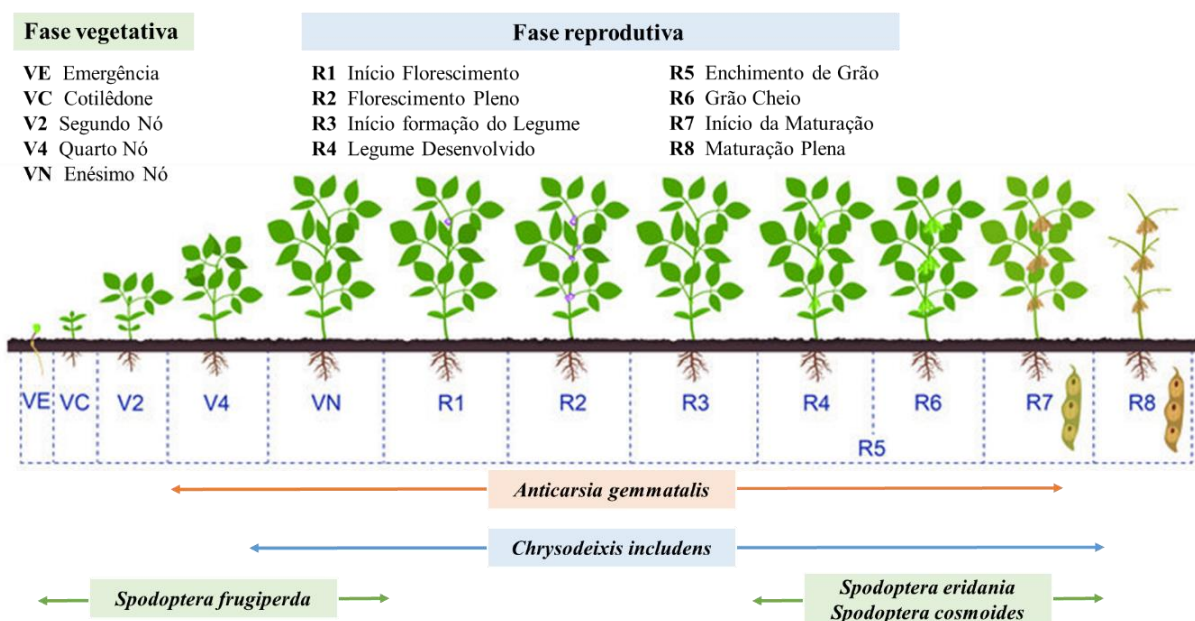
Glycine max é uma cultura anual, da família das leguminosas, gênero *Glycine*, subgênero *Soja*. É uma planta herbácea e de reprodução autógama, que manifesta certa variação em alguns traços morfológicos que são influenciados pelo ambiente. A soja pode se desenvolver mais facilmente com temperaturas acima de 13°C (preferivelmente entre 20 e 30°C), a necessidade de água na planta vai aumentando com o seu desenvolvimento, principalmente no período de germinação-emergência e floração-enchimento de grãos ¹⁵.

O sistema radicular da soja é composto de uma raiz principal e de numerosas raízes secundárias distribuídas em quatro fileiras e destas se derivam radículas terciárias. Uma das características da espécie é a associação simbiótica com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, sendo que estas promovem a fixação do nitrogênio do ar e o disponibiliza para a planta de forma assimilável (nitrato) por meio de estruturas especializadas nas raízes da soja, chamadas nódulos¹⁶.

O caule da cultura é herbáceo, ereto, pubescente, com porte variável de 0,60 m a 1,50 m e ramificado, com os ramos inferiores mais alongados e todos os ramos formando ângulos variáveis com a haste principal. O hábito de crescimento da planta pode ser determinado (que se caracteriza pelo cessamento do crescimento após o surgimento das primeiras flores), semideterminado ou indeterminado (caracterizado pelo crescimento de folhas mesmo depois do início da floração) de acordo com as características do ápice principal do caule e da cultivar¹⁷. A soja apresenta três tipos de folhas sendo elas: as cotiledonares que são as iniciais; as simples ou unifolioladas que aparecem também no início do desenvolvimento e são opostas uma a outra; as compostas ou trifolioladas que aparecem logo após as unifolioladas e arranjam-se alternadamente sobre a haste, de maneira dística e permanecem até a senescência. As flores da soja nascem em racemos terminais ou axilares e a cor da flor pode ser branca, amarela ou púrpura dependendo da variedade. Os frutos são vagens achatadas, pubescentes, de cor cinza, amarela ou preta e as sementes possuem forma arredondada, achatada ou alongada, a coloração e o tamanho são variados^{16,18,19}.

Com o propósito de definir e descrever os estágios fenológicos da soja, FEHR e CAVINESS^{20,21} desenvolveram uma metodologia que considera duas principais fases durante todo o ciclo da planta: a fase vegetativa, que abrange desde a germinação e emergência até o início do florescimento, e a fase reprodutiva que se inicia com o florescimento e se estende até a maturação fisiológica dos grãos como mostrado na FIGURA 1.1.

FIGURA 1.1 – Estágios fenológicos da soja e estágios de maior ocorrência de algumas pragas desfolhadoras na cultura. Adaptado de FEHR e CAVINESS²¹.



1.2 – Domesticação da soja

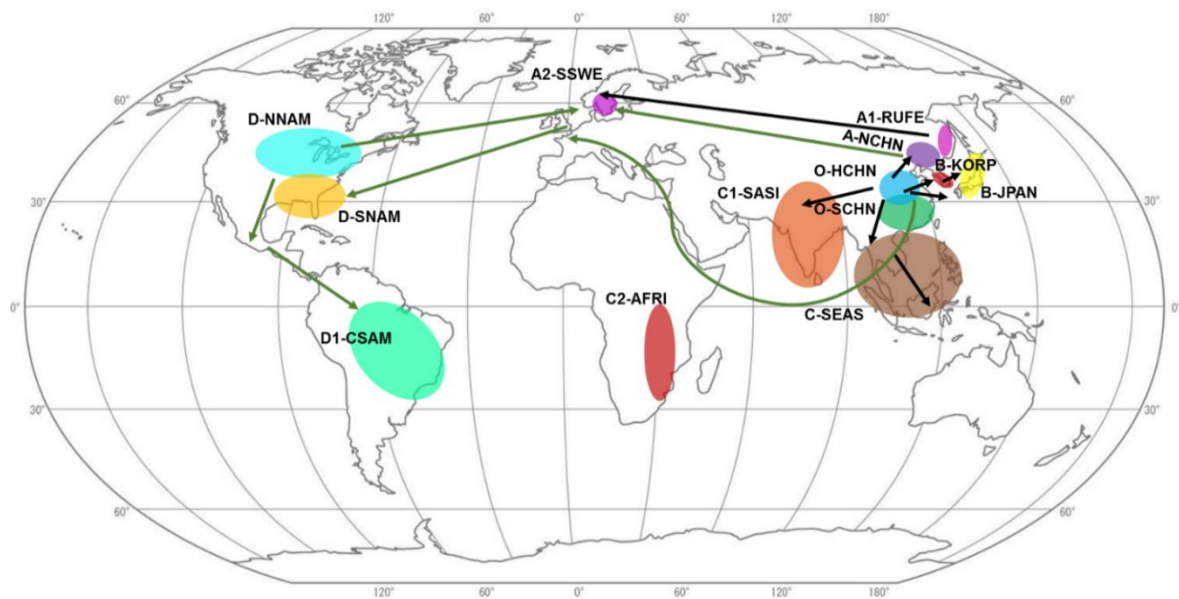
O termo domesticação refere-se ao processo coevolutivo que acontece quando as plantas selvagens são cultivadas pelo homem, originando novas espécies e/ou populações diferenciadas que são cruciais para a sobrevivência humana. Em outras palavras, é um processo de especiação e/ou transformação de espécies que se dá quando o domesticador começa a controlar a reprodução e a dispersão da raça domesticada com a intenção de resolver suas necessidades. Então, a domesticação pode ser vista como uma resposta evolutiva natural à herbivoria, a fim de apoiar uma relação mutualista, tendo em conta que não só o ser humano é beneficiado neste processo, mas também as culturas domesticadas que aumentaram sua aptidão levando a incrementos no seu tamanho e disseminação fora de seus centros geográficos de origem^{22,23}.

Estima-se que a soja cultivada foi domesticada a partir da soja selvagem (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) há 6000-9000 anos em regiões ao longo do Rio Amarelo ou Vale de Huang-Huai na China Central e foi introduzida na Coréia e no Japão há cerca de 2000 anos, na América do Norte em 1765 e na América Central e do Sul ao longo da primeira metade do século XX^{24,25}. O processo de domesticação provavelmente aconteceu por um longo intervalo de tempo, possibilitando frequentes introgressões entre as populações silvestres e cultivadas no decurso desse período⁷. Embora a origem da domesticação da soja tem sido ambígua por causa da carência de dados arqueológicos e estudos moleculares, recentemente foram obtidos avanços no sequenciamento do genoma de *Glycine max* e *Glycine soja* e, com as descobertas arqueológicas dos últimos anos, foram reveladas novas informações sobre a história desta cultura⁴. No trabalho de LIU et al.²⁶ foi caracterizada a difusão histórica e evolutiva da soja cultivada no mundo através de uma análise filogeográfica que proporciona uma explicação para o modelo de dispersão da soja por meio de quatro vertentes: partindo dos centros de origem Vales Huang-Huai e Vales de Changjiang (O-HCHN e O-SCHN respectivamente) na China para *i*) o norte (por sua vez, nordeste da China (A-NCHN), Rússia (A1-RUFE) e sul da Suécia / Europa (A2-SSWE)), *ii*) o leste (península coreana (B-KORP) e Japão (B-JPAN)), *iii*) sul (sudeste da Ásia (C-SEAS), sul da Ásia (C1-SASI) e África (C2-AFRI)) e *iv*) do nordeste da China para o oeste (Europa, norte dos Estados Unidos (D-NNAM), sul dos Estados Unidos (D-SNAM) e América do Sul (D1-CSAM)). Os supostos caminhos de dispersão da soja da China para outras regiões do mundo são mostrados na FIGURA 1.2.

Por sua vez, a propagação da soja no Brasil se deu a partir da região sul, a qual foi incluída em novas zonas de cultivo devido à incorporação de tecnologias modernas, como o uso de sementes de melhor condição fisiológica, genética e sanitária, a aplicação do sistema de semeadura direta, a melhoria da soja para baixas latitudes e maior resistência a pragas e doenças³. Este processo

trouxe consigo múltiplas variedades crioulas de soja adaptadas a diferentes regiões para cultivo em sistemas agrícolas²⁷ com cultivares melhoradas, plantas eretas e de alto desempenho, que atendem às necessidades do ser humano²⁸.

FIGURA 1.2 – Caminhos de dispersão da soja do centro de origem para outras regiões do mundo. As setas indicam direções da dispersão da soja. As setas verdes (→) mostram o caminho da domesticação da soja desde o nordeste da China até América do Sul. Treze populações regionais são indicadas em elipses de cores diferentes. Adaptado de LIU et al.²⁶



Contudo, a teoria prevalente sugere que a domesticação das culturas e o crescimento global síncrono da agricultura modificaram os ecossistemas e tiveram várias repercussões evolutivas nas plantas como a redução da diversidade genética e perda da resistência aos herbívoros²⁹⁻³¹. Existem indícios de que a domesticação de culturas pode alterar as interações entre plantas, insetos e seus inimigos naturais, e geralmente estas plantas sofrem dramáticas modificações morfológicas e fisiológicas (conhecidas como síndrome da domesticação): atributos físicos exagerados, morfologias mais simples³², alterações do conteúdo nutricional^{33,34} e defesas reduzidas^{23,35,36} em contraste com seu progenitor selvagem.

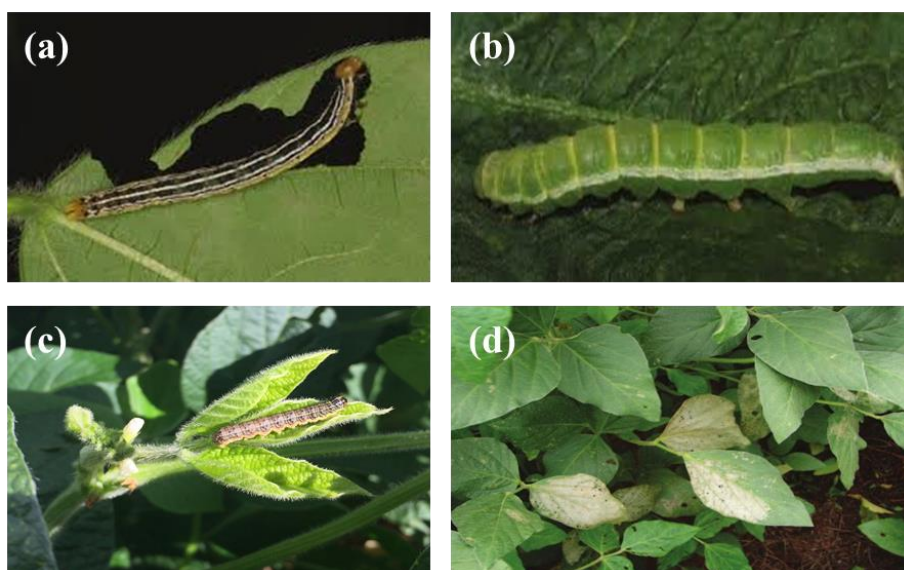
Nesse sentido, devido a sua diversidade genética, a soja selvagem é uma fonte proveitosa para o estudo de atributos de defesa e pode proporcionar informações valiosas para melhorar as características agrônômicas e defensivas da soja cultivada. Um estudo recente revelou através de comparações transcriptômicas que a alteração da expressão gênica é extensa entre soja selvagem e cultivada, e que *Glycine soja* passou por uma evolução acelerada em todo seu genoma, o qual lhe permite adaptar-se e enfrentar diferentes condições e ambientes em comparação com *Glycine max*³⁷. Do mesmo modo, BIAN et al.³⁸ mostraram mediante análises moleculares e genéticas da soja selvagem que uma proteína é a responsável por melhorar a tolerância ao estresse salino em *Glycine soja* mediante o aumento da biossíntese de flavonoides nas raízes da planta, evidenciando como os flavonoides estão envolvidos nas respostas ao estresse abiótico na soja³⁸.

Por outro lado, foram investigados os perfis químicos e a atividade antioxidante entre soja preta selvagem e cultivada, revelando diferenças no perfil metabólico das plantas e uma atividade antioxidante maior em soja preta selvagem em comparação com soja preta cultivada³⁹. Similarmente, HYEON et al.⁴⁰ examinaram as variações metabólicas induzidas pela domesticação da soja preta. Os resultados desse estudo mostraram diferenças notáveis no perfil metabólico das cultivares: a soja preta selvagem mostrou quantidades maiores de flavonóides e fenilpropanóides, enquanto a soja preta cultivada apresentou altos níveis de aminoácidos, polissacarídeos e ácidos graxos. Além disso, a soja selvagem tem sido empregada para encontrar traços de resistência ao pulgão da soja (*Aphis glycines* Matsumura) e à lagarta *Spodoptera litura* Fabricius que são consideradas pragas da soja com resistência a alguns inseticidas^{41,42}. Deste modo, tem sido evidenciado que o uso linhagens de *Glycine soja* se mostra promissor no desenvolvimento de variedades resistentes a pragas e como fonte de nova variação genética para o melhoramento das culturas modernas.

1.3 – Pragas que atacam as folhas da soja

A desfolha das lavouras de soja durante vários de seus estágios de desenvolvimento é causada por diferentes espécies de herbívoros que conseguem afetar o rendimento e a qualidade da produção (FIGURA 1.1). Entre as principais espécies de pragas se destacam a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*; a lagarta falsa-medideira, *Chrysodeixis includens*; a lagarta-das-maçãs, *Heliothis virescens* e as lagartas do gênero *Spodoptera*, tais como *S. frugiperda*, *S. cosmioides* e *S. eridania*. A primeira é considerada uma das principais pragas desfolhadoras da soja no Brasil podendo causar 100% de desfolha na planta, caso não seja controlada (FIGURA 1.3 (a) e (b)). O controle desse inseto geralmente é realizado pelo uso de inseticidas sintéticos e pelo cultivo de variedades de soja que contêm proteínas inseticidas da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae)^{14,43-46}. Por outro lado, a lagarta falsa-medideira, a lagarta-das-maçãs e as lagartas do gênero *Spodoptera* podem se alimentar de folhas, flores, vagens e dos grãos da soja, sendo consideradas pragas com alto potencial de danos na cultura.

FIGURA 1.3 – Lagartas nas formas verde (a) e escura (b) de *Anticarsia gemmatalis*, lagarta de *Spodoptera frugiperda* (c) e sintoma da injúria causada na folha de soja (d). Adaptado de MOSCARDI et al.⁴⁷



1.4 – Interações entre planta e herbívoro

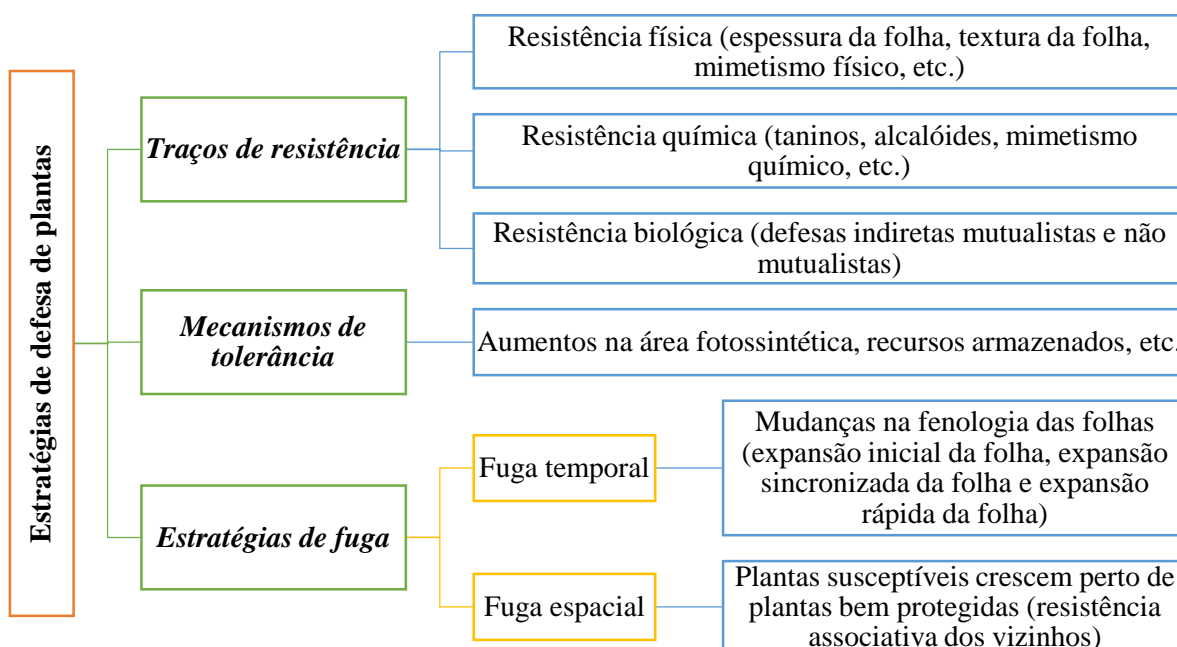
Plantas e insetos coexistem há pelo menos 350 milhões de anos. Durante esse período, uma série de interações foram estabelecidas. Para a planta, essas interações podem ser favoráveis, como a polinização mediada por insetos e propagação de sementes; ou prejudiciais, como é o caso da herbivoria⁴⁸. Os insetos desenvolveram mecanismos sensoriais que lhes permitem encontrar fontes de alimento, escapar de predadores, detectar e desenvolver comportamentos que dependem de compostos químicos, causando atração ou repulsão por parte da planta⁴⁹. Por sua vez, as plantas têm seus próprios mecanismos de reconhecimento de pragas, através de padrões moleculares associados a danos. Após o reconhecimento do dano pelo herbívoro, a planta é defendida por meio de antibiose (intoxicação) e antixenose (deterrença). No entanto, alguns herbívoros têm a capacidade de desabilitar essas respostas injetando efetores e manipulando o metabolismo da planta⁵⁰.

1.5 – Estratégias de defesas de plantas contra herbívoros

As plantas são atacadas por uma variedade de organismos, entre as quais podem ser destacados patógenos e herbívoros. O estresse causado por esses organismos sobre o desenvolvimento das plantas levou-as a desenvolver variadas estratégias defensivas que podem ser divididas em três mecanismos básicos: 1) traços de resistência, que incluem características físicas como tricomas, espinhos e folhas endurecidas; características químicas (como terpenoides; compostos fenólicos; compostos de nitrogenados; taninos, lignina e celulose; hormônios vegetais; inibidores de protease; e compostos voláteis) ou características bióticas (por exemplo, manter ou aumentar a atividade de inimigos naturais de seus atacantes) que conseguem ferir, matar ou retardar o crescimento e reprodução do herbívoro, 2) tolerância, que é considerada um mecanismo de compensação para diminuir os efeitos prejudiciais da herbivoria através de mudanças fenológicas, o aumento da eficiência fotossintética, ativação de meristemas dormentes, fazendo

uso de recursos reservados, mudando o modo de alocação de recursos, etc. e 3) estratégias de fuga (por exemplo, quando plantas altamente susceptíveis crescem perto de plantas bem protegidas) que reduzem a probabilidade de plantas serem encontradas por herbívoros. Essas estratégias defensivas podem ser de natureza constitutiva, enquanto outras são induzidas somente após a percepção de uma agressão para permitir a alocação de recursos ótimos⁵¹⁻⁵⁵ (veja-se a FIGURA 1.4).

FIGURA 1.4 – Categorias de defesa da planta contra herbívoros. Adaptado de GONG e ZHANG⁵⁴



A distinção entre defesas constitutivas e induzidas não é absoluta, visto que muitas defesas fazem parte de ambas classes e os traços relacionados a estas podem atuar também em outros processos fisiológicos primários e secundários. As defesas constitutivas são aquelas características que se encontram pré-formadas na planta, por exemplo, camadas de cera, tricomas e espinhos, inclusive podem ser metabolitos secundários e revestimentos protetores. Mesmo que, estejam presentes quando a planta não está sob ataque, constata-se que este tipo de defesa é também aumentada durante a herbivoria. Pelo contrário, as

defesas induzidas encontram-se desligadas até que o ataque do herbívoro seja reconhecido, isto permite reduzir o custo metabólico da defesa para as plantas. As defesas induzidas por herbívoros podem variar qualitativa e quantitativamente nos seguintes casos: a) segundo a espécie de herbívoro que efetua o dano na planta, b) o hábito alimentar do inseto, c) o estágio fisiológico e d) a espécie da planta hospedeira⁵⁶⁻⁵⁸.

Além disso, são observados dois tipos de defesas: diretas e indiretas. Defesas diretas afetam diretamente o desenvolvimento, crescimento e digestão de insetos herbívoros⁵⁹. As defesas indiretas correspondem ao uso de compostos voláteis que servem para atrair predadores ou parasitoides dos insetos herbívoros⁶⁰. Por exemplo, ácaros micófagos ou onívoros podem utilizar metabólitos vegetais voláteis como pista para encontrar plantas que abrigam fungos patogênicos foliares⁵⁷. Embora, as defesas diretas e indiretas são reiteradamente vistas de maneira independente, é conhecido que alguns compostos relacionados às defesas indiretas podem afetar o comportamento dos herbívoros e compostos ligados à defesa direta podem similarmente prejudicar o desenvolvimento dos inimigos naturais do herbívoro⁶¹.

1.5.1 – Respostas de defesa em plantas

Como foi mencionado anteriormente, as plantas podem se defender de seus atacantes mediante a produção de barreiras físicas ou compostos especializados bioativos que podem ser induzíveis e parte da defesa constitutiva, e estes atributos podem ter ações repelentes, antinutritivas ou tóxicas sobre os herbívoros^{62,63}.

Para se alimentar, os insetos-herbívoros devem entrar em contato com a superfície da planta. Diante disso, a primeira linha de defesa, em resposta ao ataque de herbívoros, é a parede celular vegetal, que através do processo de lignificação torna o tecido menos mais rígido perturbando a alimentação dos insetos. Do mesmo modo, outra reação defensiva da planta envolve a elaboração

de tecido neoplasmático que dificulta o acesso da larva na planta⁶⁴. As plantas também usam tricomas, espinhos, cabelos e folhas endurecidas como defesa morfológica, capazes de promover a proteção da planta e impossibilitar o movimento e alimentação de artrópodes⁶⁵.

A reação de uma planta aos danos provocados por herbívoros abrange a resposta a lesões e o reconhecimento de certas moléculas provenientes de insetos (como componentes da secreção oral e fluido de oviposição). Essas moléculas desencadeiam vias de sinalização que acionam a resposta de defesa da planta mediante a produção de várias substâncias como proteínas antinutricionais, que interferem na capacidade dos insetos de digerir o material vegetal^{62,66}.

Em leguminosas, as principais defesas químicas dentro do endosperma derivam de proteínas antinutricionais como lectinas, inibidores de protease e amilase⁶⁷. No entanto, no trabalho de HUDAIB et al.⁶⁸ encontraram-se altas quantidades de glicosídeos e flavonoides no endosperma de variedades de feijão resistentes (*Phaseolus vulgaris*), em contraste com variedades susceptíveis (*Vigna unguiculata*). Estes metabólitos contribuem com a resistência contra *C. maculatus*, contendo a oviposição e evitando o desenvolvimento larval, sugerindo que a resistência das sementes é resultado da combinação dos metabólitos secundários e de outros mecanismos antiherbivoria relacionados com proteínas defensivas como inibidores de α -amilase e protease.

As plantas produzem uma diversidade de substâncias com composição química complexa que regularmente funcionam como defesas contra insetos herbívoros e que lhe proporcionam uma série de adaptações fisiológicas, como fornecimento de componentes estruturais (por exemplo, ligninas), pigmentação, proteção UV (por exemplo, flavonoides), atração de polinizadores e dispersores de sementes^{69,70}. Estes compostos geralmente são distribuídos diferencialmente entre grupos taxonômicos limitados dentro do reino vegetal e sua produção na planta pode ser afetada pela variação genética e ambiental⁷¹. Os metabólitos secundários pertencem a três grupos: fenólicos (como taninos, flavonóides e

ligninas), compostos nitrogenados (como sinalbin, sinigrina, dhurrina, DIMBOA e DIBOA) e terpenoides⁶³.

1.5.2 – Respostas de defesa da soja

Como foi relatado anteriormente, quando um herbívoro se alimenta de uma planta, diversas respostas de defesa são geradas, vindas de um mecanismo de indução. A planta tem a capacidade de distinguir entre lesões causadas por um inseto ou dano mecânico, como reconhecimento de oviposição, vento e granizo. Essa especialidade permite evitar o desperdício de recursos caros de defesa, já que a fabricação e liberação dessas defesas químicas favorecem as plantas quando são atacadas por herbívoros⁶².

Um componente da estratégia defensiva de plantas são os inibidores de protease (IP). Estas substâncias são geralmente concentradas em tecidos de armazenamento como uma defesa contra herbívoros, no entanto, sua aplicação torna-se eficaz quando é sintetizado em resposta a feridas⁷². Os genes que codificam os IP podem ser ativados pela produção do ácido jasmônico na via da lipoxigenase (LOX). Estes inibidores, quando ingeridos por insetos, diminuem a atividade de proteases digestivas no intestino do inseto, afetando a absorção de nutrientes essenciais para o desenvolvimento e reprodução. Tal como relatado no trabalho de PAIXÃO et al.⁷³ no qual as respostas bioquímicas das larvas *Anticarsia gemmatalis*, alimentadas com uma variedade de soja resistente, mostrou que os agentes que aumentam os IP produzidos pela planta podem causar alterações fisiológicas na capacidade dos insetos para digerir proteínas. No entanto, sabe-se que esta lagarta é capaz de se adaptar aos IP naturais de sua planta hospedeira e ao inibidor sintético da tripsina benzamidina, como mostrado por MOREIRA et al.⁷⁴.

Pesquisas recentes indicam que as plantas também produzem espécies reativas de oxigênio como defesa contra patógenos e herbívoros. As alterações oxidativas podem resultar em ações aumentadas de enzimas oxidativas, como lipoxigenase, peroxidase ou polifenoloxidase. A lipoxigenase é encontrada em leguminosas como a soja e o feijão vermelho, e tem sido observado que a resistência do ácaro na soja está altamente correlacionada com o aumento da peroxidação lipídica e perda de carotenóides devido às lipoxigenases⁷⁵. Acredita-se que o ácido azeláico, benzotiadiazol, ácido giberélico, arpine e ácido jasmônico podem interferir nas respostas das plantas a patógenos e herbívoros ou reproduzir os compostos que o fazem. O estudo realizado por GORDY et al.⁷⁶, mostrou que o tratamento com ácido jasmônico reduz continuamente o crescimento da *Spodoptera frugiperda* alimentada com algodão tratado e soja.

Um fator que pode reduzir os danos causados por insetos, como a *Anticarsia gemmatalis* e a *Caliothrips phaseoli*, assim como também reduzir o ataque de percevejos contra a soja é a radiação ultravioleta-B (UV-B) (λ 280-315 nm). DILLON et al.^{43,77}, mostraram que a exposição das folhas de soja a altos níveis de radiação UV-B pode modular e estimular quantidades de diferentes substâncias defensivas contra insetos, como inibidores da tripsina, quercetina, triglicosídeos de quercetina e triglicosídeos de kaempferol que diminuem o desempenho larval e dificultam a assimilação de aminoácidos no intestino dos insetos. Mais recentemente, o mesmo autor relatou a indução de fitohormônios e flavonoides em vagens não danificadas e danificadas por *Piezodorus guildinii* sob dois níveis de radiação solar UV-B, mostrando que o etileno induzido pela radiação solar UV-B e a herbivoria aumentaram o nível de isoflavonoides (daidzina, genistina, malonil daidzina, malonil genistina e daidzeína) nas vagens da soja⁷⁸.

As defesas morfológicas da soja também desempenham um papel importante contra herbívoros. Muitas plantas aumentam o número de tricomas em folhas novas para evitar danos causados. Sabe-se que alguns cultivares de soja

possuem ampla densidade de tricomas foliares, característica que minimiza o ataque de insetos. Tem sido mostrado que os tricomas desempenham um papel importante na proteção de plantas contra *C. arcuata*, de forma que alguns cultivares apresentam resistência do tipo não preferencial para a alimentação deste herbívoro⁷⁹.

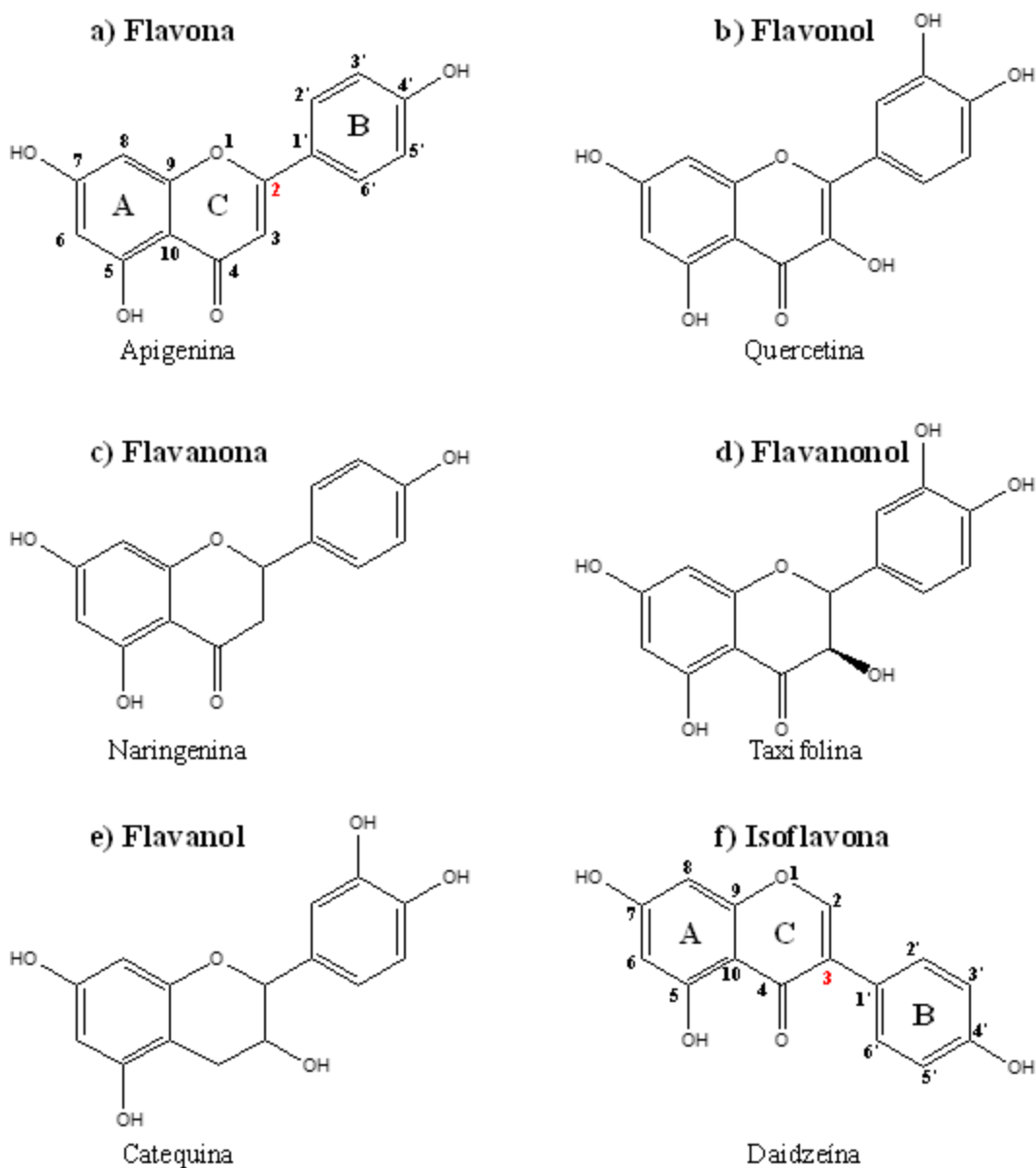
Assim, com o conhecimento dos mecanismos de resistência induzida, é possível prever o tipo de herbívoros que podem ser afetados por essas respostas e desenvolver indutores que possam ser usados em plantas cultivadas e, portanto, criar um sistema natural de defesa contra ameaças causadas por herbívoros. Neste sentido, entender as respostas de indução das plantas é essencial para explicar as interações ecológicas entre as plantas e seus inimigos e, deste modo, projetar mecanismos de proteção para as culturas contra pragas agrícolas.

1.6 – Flavonoides como defesas químicas da soja

Os flavonoides são uma classe de compostos polifenólicos de baixa massa molecular, têm uma estrutura de carbono $C_6-C_3-C_6$ que consiste em dois anéis aromáticos, A e B, unidos por uma ponte de 3 carbonos, geralmente na forma de um anel heterocíclico, C. O anel aromático A é derivado da via acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina pela via do chiquimato. Estes metabólitos podem ser classificados em flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanonóis, flavanóis (ou catequinas) e antocianidinas, o qual vai depender da posição em que o anel B está ligado ao anel C e no estado de oxidação e no grau de saturação do anel heterocíclico (FIGURA 1.5). Por exemplo, as isoflavonas tem o anel B ligado na posição 3 do anel C, enquanto os outros grupos, têm o anel B ligado na posição 2 do anel C. Assim, as alterações no esqueleto de cada classe de flavonoide dão origem a distintas estruturas básicas conhecidas como agliconas (FIGURA 1.5(a-f)). Essas estruturas podem sofrer modificações enzimáticas por meio de processos tais como glicosilação (geralmente na posição 3 ou 7) com açúcares como: *D*-glicose, *L*-ramnose, *D*-

galactose, *D*-xilose e *L*-arabinose, metilação, prenilação, acetilação e sulfatação, formando conjugados com características bioquímicas únicas⁸⁰⁻⁸².

FIGURA 1.5 – Estruturas químicas das principais classes de flavonoides na forma aglicona **a)** flavona (apigenina), **b)** flavonol (quercetina), **c)** flavanona (naringenina), **d)** flavanonol (taxifolina), **e)** flavanol (catequina) e **f)** isoflavona (daidzeína). Adaptado de KU et al⁸².



Os flavonoides estão presentes em diferentes partes da soja em concentrações variadas, desempenhando funções como regulação do estresse oxidativo, participação em sinalizações hormonais, proteção contra a radiação UV e íons metálicos e defesa contra patógenos e insetos. Dentro da grande diversidade estrutural de flavonoides conhecidos, na soja predominam os flavonóis kampferol, quercetina e isorhamnetina e as isoflavonas daidzeína, genisteína e gliciteína, juntamente com seus derivados glicosídeos. Estes metabólitos geralmente são mais proeminentes nos estágios vegetativos em relação com o reprodutivo da soja^{12,83-85}.

Vários estudos relatam que a resistência da soja contra alguns herbívoros está associada à concentração de flavonoides nas sementes e folhas. Por exemplo, foram identificados nas sementes de duas variedades de soja (Dowling resistente e Silvânia susceptível) seis isoflavonoides, incluindo três agliconas (genisteína, daizeína e gliciteína) e três glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), além do flavonol glicosilado rutina. A quantidade total de flavonoides foi maior no cultivar Silvânia comparado com Dowling, indicando que estes compostos não se encontram diretamente relacionados à resistência constitutiva observada nas sementes da variedade Dowling contra *Euschistus heros*².

PIUBELLI et al.⁸⁶ verificaram que extratos das folhas de alguns genótipos de soja contêm altas concentrações de rutina e genistina, sendo observado que essas substâncias causam efeitos prejudiciais sobre a fisiologia de *Anticarsia gemmatilis*. Da mesma forma, BENTIVENHA et al.⁸⁷, mostraram que a rutina e genisteína desempenham um papel na resistência de vários cultivares de soja contra o percevejo *Piezodorus guildinii*.

A produção de flavonoides varia dependendo do tipo de herbivoria. O'NEILL et al.⁸⁸, mostraram que o dano foliar pelo besouro-japonês *P. japonica* induziu concentrações significativamente maiores de naringenina metil hexose, kaempferol diglicosídeo, kaempferol triglicosídeo e quercetina triglicosídeo. Os danos causados pela lagarta *V. cardui* aumentaram os níveis de um glicosídeo de

genisteína, enquanto um afídeo que se alimenta do floema, *A. glycines*, não afetou a produção de nenhum composto nas folhas da soja. Similarmente, ROMERO et al.¹⁴, utilizaram dois cultivares comerciais de soja com diferentes níveis de susceptibilidade ao ataque de insetos e duas espécies de insetos com diferentes formas de alimentação. Os resultados mostraram que as larvas de *Spodoptera frugiperda* tiveram um desempenho parecido nos dois cultivares de soja, entretanto, o tripses *Caliothrips phaseoli* teve preferência e se desenvolveu mais rápido em um dos cultivares. Assim, a resistência diferenciada das variedades de soja sobre os insetos podem ser esclarecidas não só pelas defesas induzidas (por exemplo, malonil genisteína e genisteína foram induzidos por tripses), mas também por diferenças nas defesas constitutivas (por exemplo, triglicosídeos de quercetina e diglicosídeos de quercetina estavam presentes apenas na folhagem da variedade DM 4210, enquanto triglicosídeos de kaempferol, diglicosídeos de kaempferol e triglicosídeo de isorhamnetina estavam presentes em níveis mais elevados na variedade DM 5.8i do que no DM 4210, e daizina foi detectada em ambas as plantas) entre os cultivares.

Adicionalmente, CHENG et al.⁸⁹ realizaram um estudo metabolômico integrado por LC-MS e RMN a fim de investigar metabólitos induzidos por um herbicida. Os resultados mostraram a presença de seis compostos prenilados descritos pela primeira vez na soja, incluindo o 7,8-dihidroxi-4'-metoxi-3'-prenilisoflavona e 7-hidroxi-4',8-dimetoxi-3'-prenilisoflavona não relatados anteriormente. Isso ressalta a versatilidade das rotas metabólicas da soja e indica que a prenilação pode estar associada a respostas de defesa. Além disso, verificou-se que o uso de flavonoides individuais em dietas artificiais prejudica o desenvolvimento de herbívoros devido às suas características pró-oxidantes. HOFFMANN-CAMPO et al.¹⁰ avaliaram o efeito de uma dieta contendo rutina (quercetina 3-O-rutinosídeo) no comportamento e nutrição de *Anticarsia gemmatalis* e verificaram que esta substância provocou uma diminuição no peso e consumo das lagartas.

Levando em conta todas estas informações, levantamos a hipótese de que as diferenças nos níveis de resistência entre a soja selvagem e os vários cultivares convencionais existentes estão relacionadas com a variabilidade dos perfis de metabólitos secundários acumulados em seus tecidos. Também pressupomos que a soja selvagem tem perfis de metabólitos secundários diferentes em relação às variedades de soja cultivadas. Nesse contexto, identificar estas substâncias e sua distribuição entre distintos genótipos e entender o papel que têm nos mecanismos de interação inseto-planta é importante para uma caracterização mais abrangente e confiável da resistência da soja.

2 – OBJETIVOS

O presente trabalho se propõe a comparar o perfil químico de flavonoides em folhas de soja jovens e velhas no estágio de desenvolvimento V3 entre quatro variedades de soja cultivada (*G. max*) e para a soja selvagem (*G. soja*) de forma qualitativa (presença ou ausência de substâncias) e quantitativa (diferenças relativas na abundância dessas substâncias). Para isso, são propostos os seguintes objetivos específicos:

- Identificar os flavonoides presentes nas folhas das variedades analisadas com base nos espectros de massas obtidos;
- Quantificar de maneira relativa os flavonoides identificados;
- Comparar o perfil químico de flavonoides entre diferentes tecidos (folhas jovens e velhas) para cada cultivar estudada;
- Comparar os perfis químicos das folhas entre os diferentes genótipos.

3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 – Sementes de soja e crescimento das plantas

As cultivares BRS 257⁹⁰, IAC PL-1⁹¹ (suscetíveis a algumas pragas), PI229358^{9,86,87,91}, IAC100^{2,12,86,87,92} (resistentes a alguns herbívoros) da espécie *Glycine max* e PI407270 (soja selvagem) da espécie *Glycine soja* foram obtidos através do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Soja (Londrina-PR). As sementes de cada variedade foram selecionadas e submetidas à germinação utilizando areia grossa. Logo, as sementes germinadas foram cuidadosamente transplantadas para vasos plásticos N° 02 (1 L) contendo uma mistura de areia grossa, terra vegetal da Spagnhol Plantas Ornamentais (composta de carvão ativado, húmus de minhoca, casca de pínus e terra preta) e substrato da Vida Verde (composto de turfa, carvão vegetal, superfosfato simples e casca de pínus) na proporção (1:1:1).

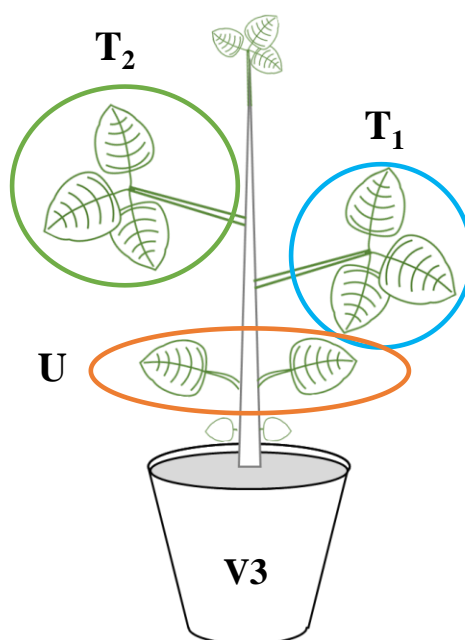
As plantas foram cultivadas em uma casa de vegetação externa (em colaboração com o Departamento de Botânica da UFSCar), mantidas durante 30 dias com temperatura controlada a $25 \pm 5^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de umidade relativa; e irrigadas a cada dois dias até o processo de coleta. Este experimento ocorreu durante o período de janeiro a fevereiro de 2020. Com o propósito de facilitar a interpretação dos dados, as variedades BRS 257, PI229358, IAC100, IAC PL-1 e PI407270 foram nomeadas como P1, P2, P3, P4 e P5, respectivamente.

3.2 – Coleta e extração de material vegetal

A fim de analisar o perfil químico de metabólitos secundários entre tecidos, foram coletadas as folhas trifolioladas mais jovens (última folha totalmente desenvolvida, T2), as folhas trifolioladas mais velhas (primeira folha trifoliolada, T1) e as folhas unifolioladas velhas (a primeira folha próxima ao solo, U) as quais correspondem ao estágio de desenvolvimento V3 (baseado na última folha trifoliolada completamente formada, de acordo com a literatura²⁰), conforme

ilustrado na FIGURA 3.1. As amostras foram coletadas em triplicata biológica. Todas as plantas foram germinadas e iniciaram seu desenvolvimento ao mesmo tempo.

FIGURA 3. 1 – Esquema de coleta das amostras no estágio de desenvolvimento V3 para os genótipos estudados. U, folhas unifolioladas velhas; T1, folhas trifolioladas intermédias e T2, folhas trifolioladas mais jovens.



Todas as amostras de folhas coletadas nesses experimentos foram cortadas, rapidamente pesadas e envolvidas em folhas de papel alumínio e imediatamente imersas em nitrogênio líquido. Posteriormente foram armazenadas em congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o processo de extração, e finalmente analisadas de acordo com as técnicas descritas no item 3.3. abaixo.

As amostras vegetais 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 as folhas U foram adicionados 10 mL do solvente e para as folhas T1 e T2 foram utilizados 15 mL, no caso da soja selvagem foram usados 5 mL de solvente para homogeneizar todas suas

folhas. Posteriormente, as amostras foram processadas usando um homogeneizador Ultra Turrax (IKA-T10 B S32) à temperatura ambiente, e centrifugadas (centrifuga Sorvall Legend MACH 1.6R) a 10.000 rpm, por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e filtrado com filtro de seringa (membrana de nylon, diâmetro do filtro 13 mm e diâmetro do poro 0,22 µm) e transferido para vials e analisado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS).

3.3. – Análises cromatográficas

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 µL de amostra injetada e a separação dos compostos foi obtida em uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1x50mm, 1,8µm) 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) (solvente A) e acetonitrila (TEDIA, High Purity Solvents) (solvente B), ambos contendo 0,1% ácido fórmico (Sigma- Aldrich, Fluka Analytical). O gradiente foi programado da seguinte forma: 0 - 5 min, 10% - 20% B; 5 - 9 min, 20% - 40% B; 9 - 9,10 min, 40% - 100% B; de 9,10 - 12 min foi utilizado 100% B para a limpeza e de 12,10 - 15 min 10% B para retornar às condições iniciais.

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).

3.4 – Análise de Dados

As áreas integradas dos picos foram obtidas a partir dos Cromatogramas de Íons Extraídos (EIC), procurando inicialmente o íon $[M+Na]^+$ correspondente para cada composto. Esses valores foram normalizados ($\text{Área} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) pela massa da amostra e o volume usado durante o processo de extração. Adicionalmente, foram obtidas as abundâncias relativas totais para cada tipo de flavonoide por meio da somatória das áreas normalizadas dos conjugados correspondentes a cada aglicona detectada.

A fim de efetuar as comparações das médias das abundâncias relativas dos flavonoides entre diferentes genótipos e idades das folhas, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) de fator único. Diante das diferenças observadas, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

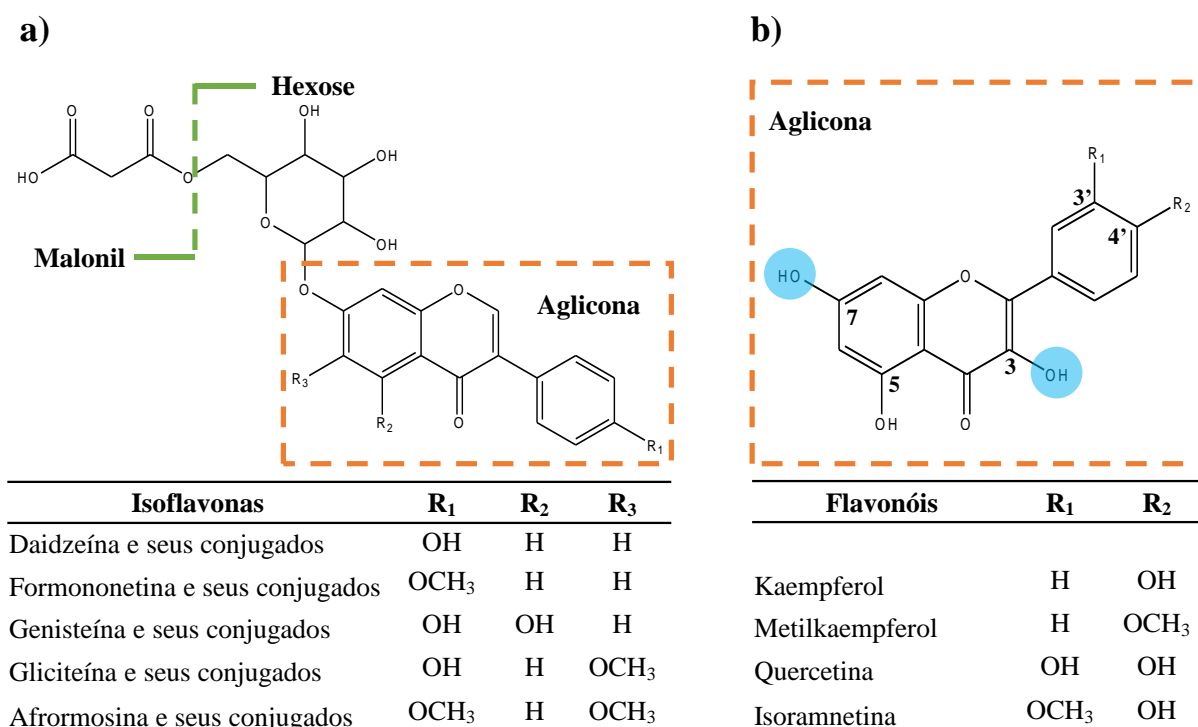
4.1 – Identificação de flavonoides presentes nos extratos

A fim de identificar os perfis químicos dos extratos de folhas correspondentes aos tecidos U, T1 e T2 no estágio de desenvolvimento V3 dos genótipos susceptíveis BRS 257, IAC PL-1 (daqui para frente, P1 e P4); resistentes PI 229358, IAC 100 (daqui para frente, P2 e P3); e selvagem PI 407270 (daqui para frente, P5), inicialmente foi otimizado o método cromatográfico e os parâmetros de massas para possibilitar uma boa separação e caracterização dos flavonoides por meio dos sinais m/z característicos correspondentes a cada aglicona conhecida na soja segundo o descrito na literatura. Os principais flavonoides encontrados na soja são as isoflavonas daidzeína (m/z 255.0652), genisteína (m/z 271.0601) e gliciteína (m/z 285.0757) e os flavonóis kaempferol (m/z 287.0550) e quercetina (m/z 303.0499)^{12,83-85}. Os conjugados de flavonoides geralmente apresentam um padrão de fragmentação que inclui o sinal referente à aglicona respectiva, pelo que, esses sinais foram utilizados como diagnósticos para encontrar conjugados que compartilham uma mesma porção de aglicona. Neste trabalho, também foram examinadas as formas menos comuns, *O*-metiladas dessa classe de composto, como formononetina (m/z 269.0808), afrormosina (m/z 299.0914), metilkaempferol (m/z 301.0707) e isoramnetina (m/z 317.0656). Finalmente, foram procuradas as massas protonadas de outros flavonoides, no entanto, estes últimos não foram detectados nas amostras estudadas. Posteriormente, para cada amostra foram obtidos os cromatogramas de íons extraídos (EIC) referentes aos sinais m/z correspondente para cada aglicona antes mencionada e, por fim, cada composto foi caracterizado individualmente por meio da interpretação cuidadosa de seu espectro de massas.

Foi possível identificar 57 flavonoides os quais foram classificados em 18 isoflavonas, incluindo alguns conjugados de daidzeína, formononetina, genisteína, gliciteína e afrormosina e 39 flavonóis, contendo conjugados de

kaempferol, metilkaempferol, quercetina e isoramnetina dentre as cinco plantas (FIGURA 4.1).

FIGURA 4.1 – Estruturas sugeridas para as **a)** isoflavonas e **b)** flavonóis identificados nas variedades P1, P2, P3, P4 e P5. As posições mais comuns para ocorrerem as substituições glicosídicas nos flavonóis se mostram de cor azul.



Em geral os flavonoides detectados neste trabalho foram encontrados em suas formas maloniladas e glicosiladas, estes últimos distinguiram-se entre glicosídeos do tipo hexose e ramnose. Cada composto caracterizado foi representado por letras diferentes, de acordo com a classe de flavonoide e o tipo de conjugado, como descrito na TABELA 4.1. Além disso, os compostos que apresentaram isômeros foram numerados em ordem crescente de acordo com o tempo de retenção. Por meio da alta resolução do Q-TOF foi possível a determinação das fórmulas moleculares para cada composto e, de forma complementar, estes resultados foram comparados com bancos de dados e dados da literatura para a identificação provisória dos mesmos.

TABELA 4.1 – Abreviações dos flavonoides e conjugados identificados nas distintas variedades de soja

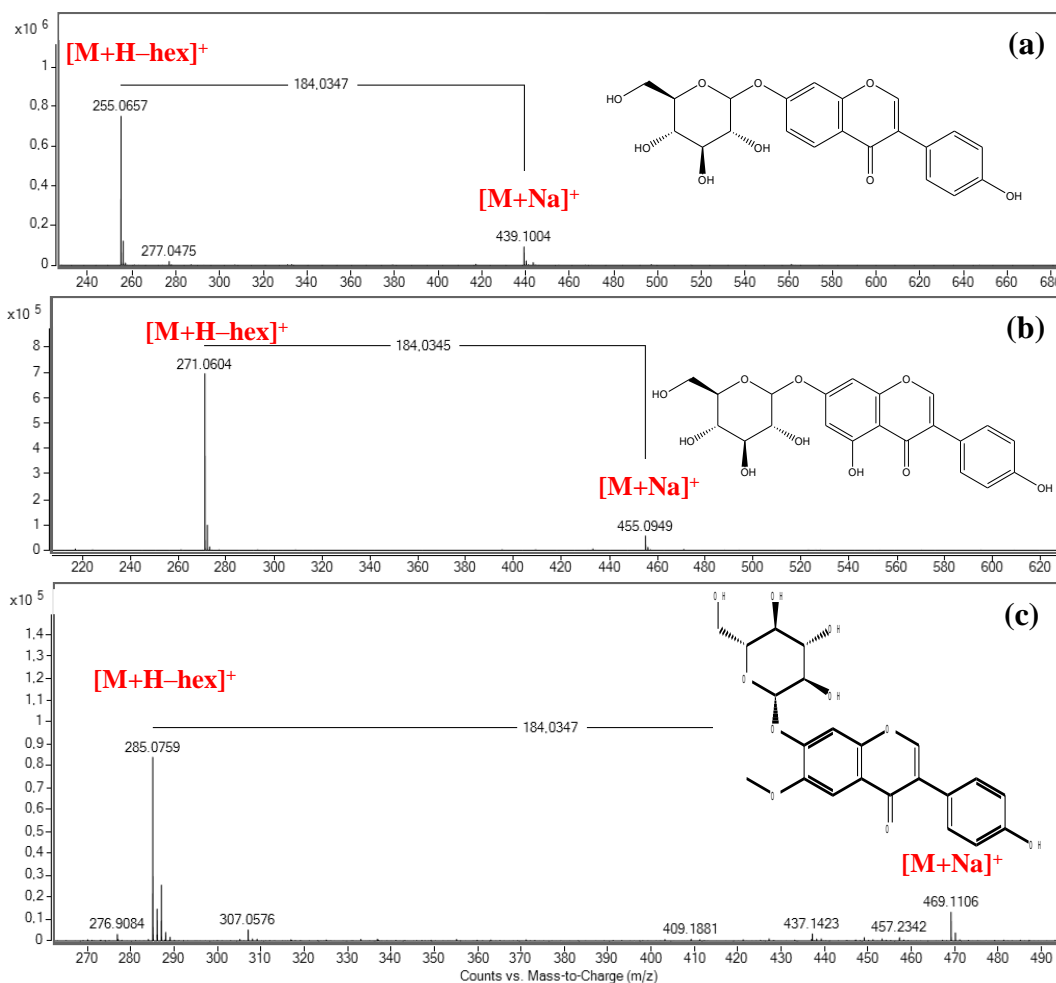
Classe de flavonoide	Abreviatura	Conjugados	Abreviatura
Daidzeína	D		
Formononetina	F	Hexose	hex
Genisteína	G		
Gliciteína	Gl		
Afrososina	A	Ramnose	ram
Kaempferol	K		
Metilkaempferol	Mk	Malonil	mal
Quercetina	Q		
Isoramnetina	I	Feruloil	-

4.1.1 – Identificação de isoflavonas

Em relação às isoflavonas caracterizadas para os distintos genótipos, a partir dos EIC correspondentes aos sinais m/z das agliconas, foi possível caracterizar 18 compostos desta classe. Na FIGURA 4.2 são mostrados os espectros de massas para algumas isoflavonas glicosiladas junto com a respectiva estrutura.

A análise dos EIC para o sinal m/z 255.0652 correspondente ao fragmento daidzeína dos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5 mostraram dois picos nos tempos de retenção (t_r) 4,3 e 6,8 min designados como daidzina (D-hex) e malonil daidzina (D-mal-hex), respectivamente. Além disso, o P2 apresentou adicionalmente o pico com tempo de retenção (t_r) 8,7 min que foi atribuído como daidzeína (D) (FIGURA A.1 (a-e) do apêndice). Os espectros de massas de D-hex, D-mal-hex e D exibiram os íons de aduto de sódio $[M+Na]^+$ m/z 439.1004 (FIGURA 4.2 (a)), m/z 525.1003 (FIGURA A.2 (a)) e m/z 277.0477 (FIGURA A.2 (b)) respectivamente, com as perdas de uma hexose $[M+H-hex]^+$, malonilhexose $[M+H-mal-hex]^+$ e $[M+H]^+$, os quais resultaram fragmentos característicos da daidzeína (m/z 255.0652) de modo respectivo.

FIGURA 4.2 – Espectros de massas para as isoflavonas glicosiladas a) Daidzeína-hex, b) Genisteína-hex e c) Gliciteína-hex, detectadas nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.



Além disso, foram observados no EIC para os sinais de formononetina (m/z 269.0808), que é uma isoflavona *O*-metilada de daidzeína, alguns conjugados desta, sendo possível a identificação dos compostos malonil ononina (F-mal-hex, t_r 9.16 min) e um isômero de ononina (F-hex-1, t_r 8.16 min) em todos os genótipos. Por sua vez, P2 e P4 mostraram um isômero adicional de ononina no tempo de retenção 8.54 min denotado como F-hex-2 como mostrado na FIGURA A.3 (a-e). A interpretação dos espectros de massas para estes compostos mostrou que os isômeros F-hex-1 e F-hex-2 possuem o íon aduto de sódio $[M+Na]^+$ (m/z 453.1160) e (m/z 453.1151) que exibem perdas de uma hexose (184.0350) gerando íons $[M+H-hex]^+$ (m/z 269.0810) correspondente à aglicona da formononetina. Por outro lado, F-mal-hex apresentou os íons

$[M+Na]^+$ (m/z 539.1157) e $[M+H\text{-malonil-hex}]^+$ (m/z 269.0808) o que permite a sua confirmação como malonil ononina. No apêndice deste documento são mostrados os espectros de massas para esses compostos (FIGURA A.4 (a-b)).

Para derivados de genisteína (m/z 271.0601), os EIC revelaram a presença de genistina (G-hex, t_r 6.22 min) e malonil genistina (G-mal-hex-2, t_r 8.00 min). De forma adicional P1, P3 e P5 apresentaram um isômero de G-mal-hex no tempo de retenção 7.69 min denotado como G-mal-hex-1, enquanto que P1 foi a única cultivar em que se detectou genistina ligada com o grupo feruloil (G-feruloil-hex, t_r 7.44 min) e um segundo isômero de malonil genistina (G-mal-hex-3, t_r 8.44 min), (FIGURA A.5 (a-e)). Os dados dos espectros de massas para os conjugados de genisteína mostraram os valores de massas do íon aduto de sódio para G-hex m/z 455.0949 (FIGURA 4.2 (b)), para os isômeros G-mal-hex-1 m/z 541.0949, G-mal-hex-2 m/z 541.0955 (FIGURA A.6 (b)) e G-mal-hex-3 m/z 541.0960, também foram observados os íons fragmentos da correspondente aglicona, mostrando as respectivas perdas de uma hexose e malonilhexose para cada caso. Por outro lado para G-feruloil-hex só foi detectado o íon protonado $[M+H]^+$ (m/z 609.1971) e os íons fragmentos m/z 433.1130 e m/z 271.06 que representam as perdas do grupo feruloil $[M+H\text{-feruloil}]^+$ e feruloilhexose $[M+H\text{-feruloil-hex}]^+$ respectivamente (FIGURA A.6 (a)).

Em relação aos sinais correspondentes à gliciteína (m/z 285.0757), os EIC expuseram vários conjugados desta isoflavona, dos quais só foi possível a identificação de três compostos dentre as cinco plantas. O conjugado no tempo de retenção 4.72 min foi detectado em todas as cultivares, sendo definido como glicitina (Gl-hex). No entanto, P2 e P3 apresentaram um pico aproximadamente ao t_r 7.00 que foi designado como malonil glicitina (Gl-mal-hex) como mostrado na FIGURA A.7 (a-e). Os espectros de massas para Gl-hex e Gl-mal-hex mostraram os íons aduto de sódio $[M+Na]^+$ m/z 469.1106 (FIGURA 4.2 (c)) e m/z 555.1108 (FIGURA A.8 (a)) com perdas de uma hexose $[M+H\text{-hex}]^+$ e malonilhexose $[M+H\text{-malonil-hex}]^+$ respectivamente, e por fim, resultaram nos

fragmentos característicos da aglicona gliciteína (m/z 285.0759). Também, foram identificadas algumas isoflavonas *O*-metiladas de gliciteína (afrormosina, m/z 299.0914). As plantas P2 e P5 exibiram no EIC cinco picos que posteriormente foram identificados como dois isômeros de afrormosina hexose (A-hex-1 (t_r 8.27) e A-hex-2 (t_r 8.67)) e três isômeros de malonil afrormosina hexose (A-mal-hex-1 (t_r 9.04), A-mal-hex-2 (t_r 9.16) e A-mal-hex-3 (t_r 9.57)). Por outro lado, A-hex-1, A-hex-2 e A-mal-hex-2 foram encontrados do mesmo modo em P1 e P3, enquanto que P4 só apresentou o isômero A-hex-2 (FIGURA A.9 (a-e)). Os dados dos espectros de massas para os conjugados destas isoflavonas mostraram os íons aduto de sódio dos isômeros A-hex-1 (m/z 483.1264) e A-hex-2 (m/z 483.1269) (FIGURA A.8 (b)) e para os isômeros do tipo malonilado A-mal-hex-1 $[M+Na]^+$ (m/z 569.1270), A-mal-hex-2 (m/z 569.1265) (FIGURA A.8 (c)) e A-mal-hex-3 (m/z 569.1253). Também foram observados os íons fragmentos $[M+H-hex]^+$ e $[M+H-malonil-hex]^+$ para cada caso particular da correspondente aglicona com m/z 299.0914.

Assim, nos extratos das folhas das variedades estudadas foram encontradas as principais isoflavonas da soja (daidzeína, genisteína e gliciteína) e alguns de seus conjugados, sendo identificados um total de 18 compostos por meio da massa precisa e os íons fragmentos característicos. Estes resultados estão de acordo com vários trabalhos na literatura, onde foi analisado o conteúdo de flavonoides em raízes, folhas e sementes de cultivares de soja e identificados alguns destes compostos⁹³⁻⁹⁹.

4.1.2 - Identificação de flavonóis

Em relação aos compostos do tipo flavonol, para todas as cultivares e para a soja selvagem foram detectados conjugados contendo os respectivos sinais das agliconas do kaempferol e quercetina, assim como também alguns conjugados de suas respectivas formas *O*-metiladas (metilkaempferol e

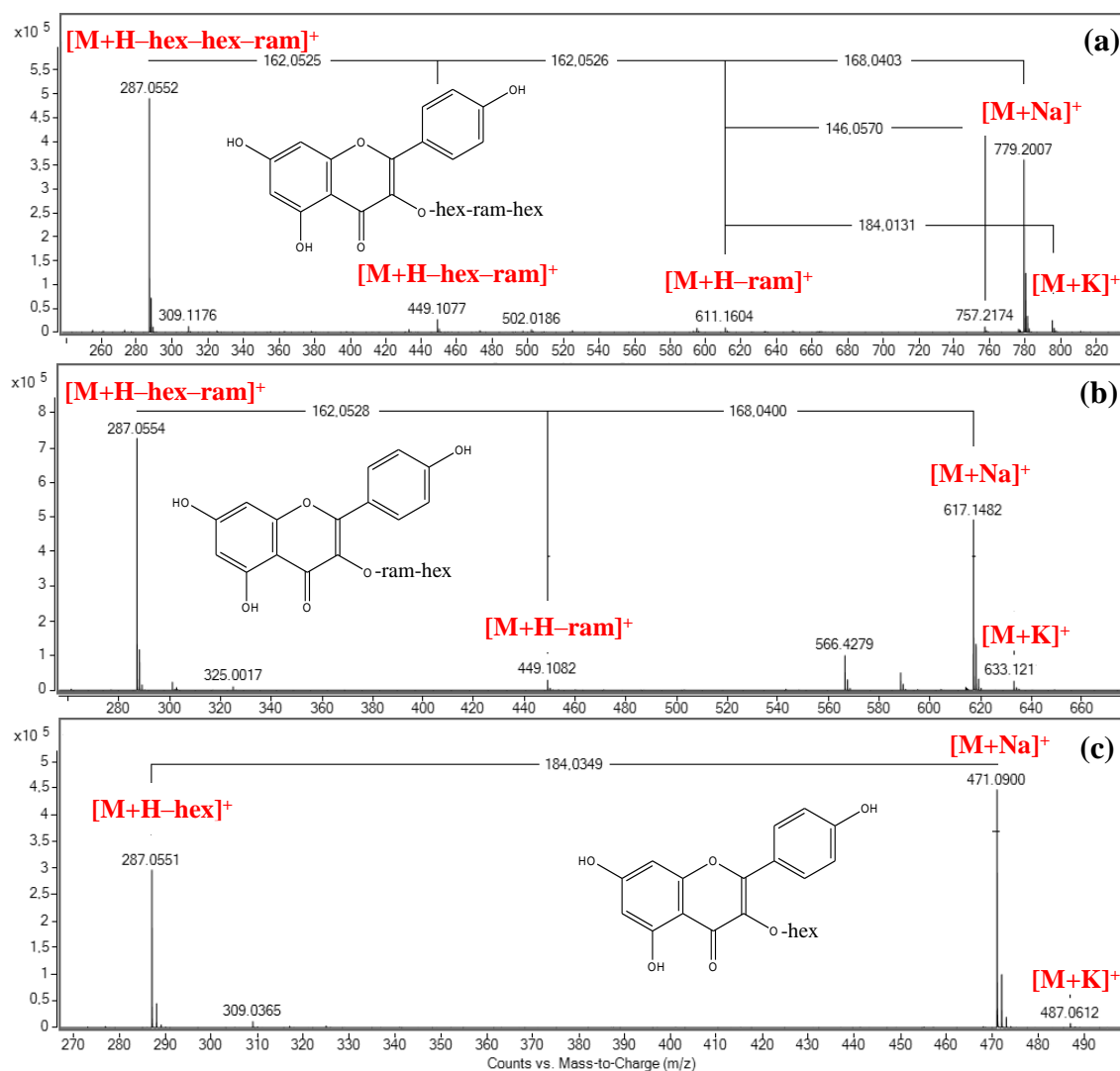
isoramnetina respectivamente). Estes compostos mostraram-se presentes nas formas mono, di e triglicosídeos.

Na FIGURA A.10 são mostrados os EIC para os conjugados de kaempferol nos extratos de folhas das variedades estudadas. Os EIC para os derivados de kaempferol (m/z 287.0550) mostraram um total de 17 flavonoides dentre as cinco variedades, classificados em seis triglicosídeos denotados como K-hex-hex-hex (t_r 3.90 min), K-hex-hex-ram-1 (t_r 4.51 min), K-hex-hex-ram-2 (t_r 4.75 min), K-hex-hex-ram-3 (t_r 4.90 min), K-hex-ram-ram-1 (t_r 5.34 min) e K-hex-ram-ram-2 (t_r 5.48 min); seis diglicosídeos denotados como K-hex-hex-1 (t_r 5.34 min), K-hex-hex-2 (t_r 5.46 min), K-hex-ram-1 (t_r 6.00 min), K-hex-ram-2 (t_r 6.20 min), K-hex-ram-3 (t_r 6.60 min) e K-hex-ram-4 (t_r 7.03 min); dois glicosídeos denotados como K-hex-1 (t_r 7.00 min) e K-hex-2 (t_r 7.33 min). Percebeu-se em algumas variedades que os compostos K-hex-hex-1, K-hex-hex-2 e K-hex-1 foram detectados no mesmo tempo de retenção de K-hex-ram-ram-1, K-hex-ram-ram-2 e K-hex-ram-4 segundo cada caso, indicando uma co-eluição como mostrado na FIGURA A.10 (a-e).

Os espectros de massas para os triglicosídeos do tipo K-hex-hex-hex, K-hex-hex-ram, K-hex-ram-ram, os diglicosídeos da classe K-hex-hex, K-hex-ram e os glicosídeos K-hex mostraram os íons adutos de sódio $[M+Na]^+$ (m/z 795.1955, m/z 779.2007, m/z 763.2057, m/z 633.1429, m/z 617.1482 e m/z 471.0900 na devida ordem), os adutos de potássio $[M+K]^+$ e o fragmento da respectiva aglicona (kaempferol m/z 287.0550). Por outro lado, K-hex-hex-ram-1 foi o único composto deste tipo que mostrou o íon $[M+H]^+$ com m/z 757.2174. Na FIGURA 4.3 são apresentados os espectros de massas para alguns exemplos representativos de cada tipo de flavonoide identificado nas cinco plantas estudadas junto com sua possível estrutura (de caráter ilustrativo). Desta maneira, foram observados os íons que mostraram a correspondente perda de açúcares, por exemplo para os triglicosídeos e diglicosídeos foram identificados os íons fragmentos $[M+H-ram]^+$, o qual representam uma porção de uma ramnose,

enquanto que para K-hex-hex-1 foi observado o fragmento $[M+H-hex]^+$ devido à perda de uma hexose, adicionalmente K-hex-hex-ram-1, e os isômeros K-hex-ram-ram-1 e K-hex-ram-ram-2 mostraram as perdas de $[M+H-hex-ram]^+$ e $[M+H-ram-ram]^+$ respectivamente. Em referência ao kaempferol hexose (K-hex-2), observou-se o respectivo íon com m/z 287.0551 que representa a aglicona kaempferol e a perda de 184.03 que corresponde a $[M+H-hex]^+$ (FIGURA 4.3 (a-c) e FIGURA A.11 (a-b)).

FIGURA 4.3 – Espectros de massas para os conjugados de kaempferol a) Kaempferol-hex-hex-ram-2, b) Kaempferol-hex-ram-3 e c) Kaempferol-hex-2 detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.

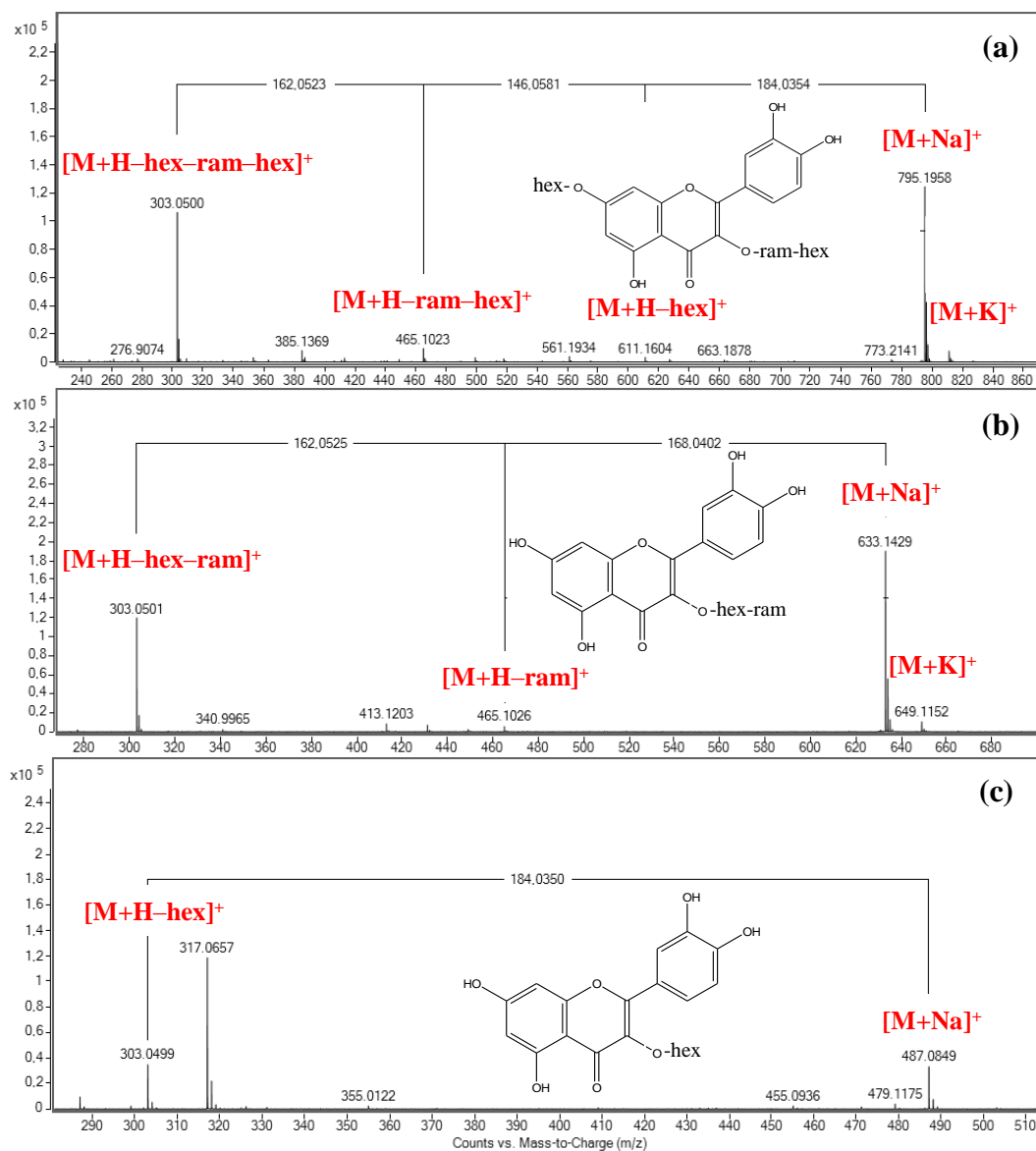


Além disso, foram identificados alguns flavonóis *O*-metilados de kaempferol (metilkaempferol hexose (Mk-hex) e dois isômeros de metilkaempferol hexose malonilado (Mk-mal-hex-1 e Mk-mal-hex-2) nos tempos de retenção 7.60, 8.17 e 8.52 min, respectivamente), com exceção do genótipo P1, como mostrado na FIGURA A.12 (a-e)). Assim, os dados dos espectros de massa de estes flavonóis mostraram os íons aduto de sódio para Mk-hex (m/z 485.1045) (FIGURA A.13 (a)) e os isômeros Mk-mal-hex-1 e Mk-mal-hex-2 (m/z 571.1059) (FIGURA A.13 (b)), como também foram observados os íons fragmentos $[M+H-hex]^+$ e $[M+H-malonil-hex]^+$ para cada caso particular mostrando a correspondente aglicona com m/z 301.0707, adicionalmente Mk-mal-hex-1 exibiu o íon $[M+H]^+$ (m/z 301.0707).

Para os conjugados da quercetina (m/z 303.0499), os EIC mostraram um total de 22 flavonoides dentre todas as variedades (a exceção da cultivar susceptível P1) classificados em três triglicosídeos Q-hex-hex-ram-1 (t_r 3.93 min), Q-hex-hex-ram-2 (t_r 4.03 min) e Q-hex-ram-ram (t_r 4.50 min); seis diglicosídeos denotados como Q-hex-hex-1, Q-hex-hex-2, Q-hex-ram-1, Q-hex-ram-2, Q-hex-ram-3 e Q-hex-ram-4 (tempos de retenção 4.43, 4.54, 5.16, 5.30, 5.80 e 5.94 min na devida ordem); e dois glicosídeos denotados como Q-hex-1 (t_r 6.13 min) e Q-hex-2 (t_r 6.30 min) (FIGURA A.14 (a-e)).

Os espectros de massas para os triglicosídeos do tipo Q-hex-hex-ram, Q-hex-ram-ram, os diglicosídeos da classe Q-hex-hex, Q-hex-ram e os glicosídeos Q-hex mostraram os íons adutos de sódio $[M+Na]^+$ (m/z 795.1958, m/z 779.2007, m/z 649.1374, m/z 633.1429 e m/z 487.0849 respectivamente), em alguns casos os adutos de potássio $[M+K]^+$ e o fragmento característico da aglicona quercetina (m/z 303.0500). Diante disso, foram observados os íons que mostraram a correspondente perda de açúcares, como os fragmentos $[M+H-ram]^+$, $[M+H-hex]^+$, $[M+H-hex-ram]^+$, $[M+H-ram-ram]^+$ e $[M+H-hex-hex]^+$ (FIGURA 4.4 (a-c) e FIGURA A.15 (a-b)).

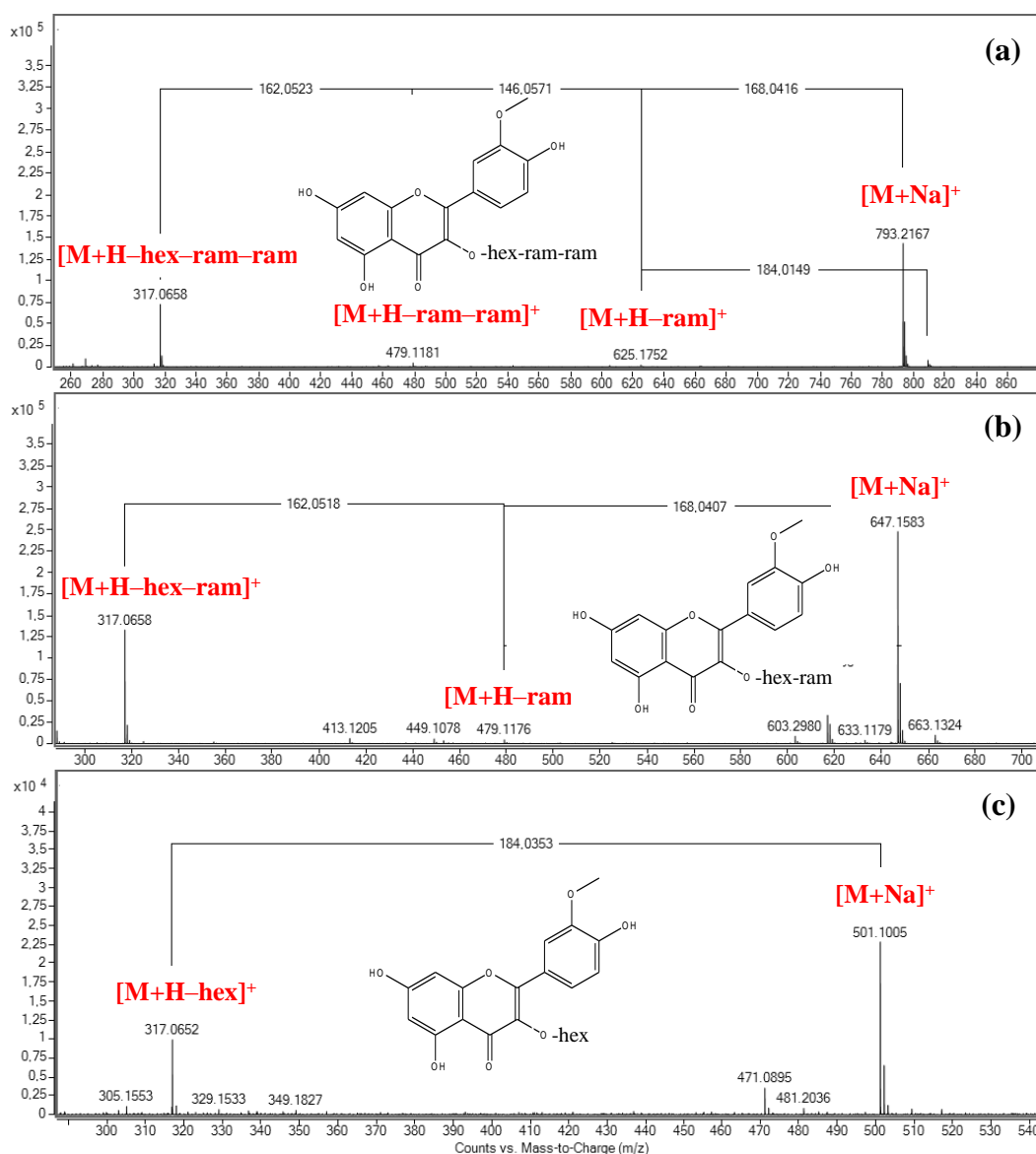
FIGURA 4.4 - Espectros de massas para os conjugados de quercetina a) Quercetina-hex-hex-ram-2, b) Quercetina-hex-ram-3 e c) Quercetina-hex-2, detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.



Finalmente, a análise dos EIC dos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5 permitiu a identificação de alguns flavonóis *O*-metilados da quercetina (isoramnetina m/z 317.0656): quatro triglicosídeos denotados como I-hex-hex-ram (tr 4.95 min), I-hex-ram-ram-1 (tr 5.54 min), I-hex-ram-ram-2 (tr 5.68 min) e I-hex-ram-ram-3 (tr 5.97 min); cinco diglicosídeos nomeados como I-hex-hex (tr 5.54 min, indicando co-eluição com I-hex-ram-ram-1 em algumas plantas), I-hex-ram-1 (tr 6.32 min), I-hex-ram-2 (tr 6.60 min), I-hex-ram-3 (tr 7.02 min) e I-hex-ram-4 (tr 7.18 min) e os glicosídeos I-hex-1 e I-hex-2 nos tempos de retenção

7.31 e 7.47 min respectivamente, como pode ser visto na FIGURA A.16 (a-e). Os dados dos espectros de massa correspondentes a estes flavonóis mostraram os íons aduto de sódio para os isômeros do tipo I-hex-hex-ram (m/z 809.2117), I-hex-ram-ram (m/z 793.2167), I-hex-ram (m/z 647.1583) e I-hex (m/z 501.1005) (veja a FIGURA 4.5 (a-c) e FIGURA A.15 (c)). Por outro lado, foram também observados os íons fragmentos $[M+H-ram]^+$, $[M+H-hex]^+$, $[M+H-hex-ram]^+$, $[M+H-ram-ram]^+$ e $[M+H-hex-ram]^+$, como mostrado na FIGURA 4.5 (a-c) e FIGURA A.15 (c).

FIGURA 4.5 - Espectros de massas para os conjugados de isoramnetina **a)** Isoramnetina-hex-ram-ram-2, **b)** Isoramnetina-hex-ram-3 e **c)** Isoramnetina-hex-2, detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.



Deste modo, foi verificado que a maioria dos flavonoides caracterizados apresentaram maior intensidade do íon aduto de sódio $[M+Na]^+$ em relação ao íons $[M+H]^+$. Também foi observada uma excelente concordância entre os dados teóricos e experimentais, uma vez que foram obtidos erros abaixo de 5 ppm, mostrando a alta precisão de massa para as identificações dos compostos.

Embora, não seja possível afirmar as posições dos substituintes e a diferenciação dos isômeros através dos espectros de massas, as sugestões das estruturas foram feitas por meio da análise dos padrões de fragmentação obtidos (onde só foi possível diferenciar o número de glicoconjugados e distinguir entre ramnose e hexose) e considerando os compostos já reportados na literatura^{43,84,94,95,100–102}.

4.1.3 – Composição de flavonoides nos genótipos estudados e diferenças gerais

Na TABELA 4.2 e TABELA 4.3 são resumidos os flavonoides detectados nas folhas das quatro cultivares estudadas (susceptíveis ressaltadas de laranja e resistentes de cor azul) e da soja selvagem (cor verde). Os dados mostrados incluem: *i*) os compostos identificados, representados com códigos de letras para cada classe de substância que possuem a mesma aglicona seguido do tipo de conjugado, *ii*) os tempos de retenção, *iii*) a fórmula molecular e os valores m/z de $[M+Na]^+$ *iv*) teóricos e *v*) experimentais, *vi*) o erro em ppm, *vii*) lista de possíveis compostos e referências sobre estes. Os flavonoides estão classificados segundo o tipo de aglicona e apresentados em ordem crescente de tempo de retenção. As massas teóricas ou exatas usadas para calcular o erro de massa (em ppm) foram obtidas fazendo uso do software de tratamento de dados Mass Hunter Qualitative® (Agilent). De maneira similar, no apêndice deste documento são mostrados os flavonoides identificados para cada cultivar e soja selvagem de forma independente (TABELAS A.1 – A.9).

Nos perfis químicos de isoflavonas (TABELA 4.2), destacam-se os conjugados glicosilados como D-hex, G-hex, Gl-hex e malonil glicosilados como D-mal-hex, F-mal-hex e A-mal-hex. Estes resultados estão de acordo com os observados em vários trabalhos nos quais foram estudados os perfis químicos das sementes, brotos e folhas de soja^{93-97,101}.

TABELA 4.2 – Isoflavonas detectadas por LC-MS nas cultivares P1, P2, P3, P4 e soja selvagem P5.

Abreviação	tr (min)	Fórmula Molecular	[M+Na] ⁺ Teórico	[M+Na] ⁺ Experimental	Erro (ppm)	Genótipos					Possíveis compostos
						Susceptíveis		Resistentes		Selvagem	
						P1 BRS257	P4 IACPL-1	P2 PI229358	P3 IAC100	P5 PI407270	
D-hex	4.34	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	439.1000	439.1004	-0.911	X	X	X	X	X	Daidzina ^{93-97,101}
D-mal-hex	6.84	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂	525.1003	525.1004	-0.190	X	X	X	X	X	Malonil daidzina ^{93,94,96,97,101}
D	8.70	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	277.0471	277.0461	3.610			X			Daidzeína ⁹³⁻⁹⁵
F-hex-1	8.16	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	453.1156	453.1156	0.000	X	X	X	X	X	Ononina ^{94,98,99}
F-hex-2	8.54	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	453.1156	453.1158	-0.441	X	X	X	X		
F-mal-hex	9.16	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	539.1160	539.1158	0.371	X	X	X	X	X	Malonil ononina ^{98,99}
G-hex	6.22	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	455.0949	455.0952	-0.659	X	X	X	X	X	Genistina ^{93-97,101}
G-Feruloil-hex	7.44	C ₃₂ H ₃₂ O ₁₂	609.1967‡	609.1971‡	-0.657	X					Feruloil genistina
G-mal-hex-1	7.69	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	541.0953	541.0949	0.739	X			X	X	
G-mal-hex-2	8.00	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	541.0953	541.0955	-0.370	X	X	X	X	X	Malonil genistina ^{93,94,96,97}
G-mal-hex-3	8.44	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	541.0953	541.0960	-1.294	X					
Gl-hex	4.72	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	469.1105	469.1102	0.640	X	X	X	X	X	Glicitina ⁹³⁻⁹⁶
Gl-mal-hex-1	7.00	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	555.1109	555.1108	0.180			X			Malonil glicitina ^{93,94,96}
A-hex-1	8.27	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	483.1262	483.1261	0.207	X		X	X	X	Afrormosina-hexose ^{95,99}
A-hex-2	8.67	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	483.1262	483.1260	0.414	X	X	X	X	X	
A-mal-hex-1	9.04	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₃	569.1266	569.1270	-0.703			X		X	
A-mal-hex-2	9.16	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₃	569.1266	569.1268	-0.351	X		X	X	X	Malonil afrormosina-hexose ⁹⁹
A-mal-hex-3	9.57	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₃	569.1266	569.1253	2.284			X		X	

‡ valor correspondente ao ion [M+H]⁺

TABELA 4.3 – Flavonóis detectados por LC-MS nas variedades P1, P2, P3, P4 e soja selvagem P5.

Continua

Abreviação	tr (min)	Fórmula Molecular	[M+Na] ⁺ Teórico	[M+Na] ⁺ Experimental	Erro (ppm)	Genótipos					Possíveis compostos
						Susceptíveis		Resistentes		Selvagem	
						P1 BRS257	P4 IACPL-1	P2 PI229358	P3 IAC100	P5 PI407270	
K-hex-hex-hex	3.90	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	795.1954	795.1955	-0.126		X				Kaempferol-hexose-hexose-hexose ¹⁰⁰
K-hex-hex-ram-1	4.51	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	779.2005	779.2010	-0.642		X				Kaempferol-hexose-hexose-ramnose ^{101,103}
K-hex-hex-ram-2	4.75	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	779.2005	779.2012	-0.898	X		X	X		
K-hex-hex-ram-3	4.90	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	779.2005	779.2011	-0.770			X	X		
K-hex-ram-ram-1	5.34	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	763.2056	763.2055	0.131	X		X		X	Kaempferol-hexose-ramnose-ramnose ^{101,103}
K-hex-ram-ram-2	5.48	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	763.2056	763.2064	-1.048	X		X			
K-hex-hex-1	5.34	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1423	0.474		X	X	X	X	Kaempferol-hexose-hexose ^{101,103}
K-hex-hex-2	5.46	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1425	0.158		X	X			
K-hex-ram-1	6.00	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	617.1477	617.1477	0.000		X				Kaempferol-hexose-ramnose ^{94,101,103}
K-hex-ram-2	6.20	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	617.1477	617.1478	-0.162		X				
K-hex-ram-3	6.60	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	617.1477	617.1477	0.000	X		X	X	X	
K-hex-ram-4	7.03	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	617.1477	617.1479	-0.324	X		X	X	X	
K-hex-1	7.00	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	471.0898	471.0900	-0.425		X	X	X	X	Kaempferol-hexose ⁹⁵
K-hex-2	7.33	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	471.0898	471.0895	0.637	X	X	X	X	X	
Mk-hex	7.60	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	485.1054	485.1053	0.206		X	X	X	X	Metilkaempferol-hexose
Mk-mal-hex-1	8.17	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₄	571.1058	571.1058	0.000		X		X	X	Malonil metilkaempferol-hexose
Mk-mal-hex-2	8.52	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₄	571.1058	571.1046	2.101					X	
Q-hex-hex-ram-1	3.93	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	795.1954	795.1955	-0.126			X	X	X	Quercetina-hexose-hexose-ramnose ^{101,103}
Q-hex-hex-ram-2	4.03	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	795.1954	795.1960	-0.755			X	X		
Q-hex-ram-ram	4.50	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	779.2005	779.2002	0.385		X	X		X	Quercetina-hexose-ramnose-ramnose ^{101,103}

TABELA 4.3 – Flavonóis detectados por LC-MS nas cultivares P1, P2, P3, P4 e soja selvagem P5.

Conclusão

Abreviação	tr (min)	Fórmula Molecular	[M+Na] ⁺ Teórico	[M+Na] ⁺ Experimental	Erro (ppm)	Genótipos					Possíveis compostos
						Susceptíveis		Resistentes		Selvagem	
						P1 BRS257	P4 IACPL-1	P2 PI229358	P3 IAC100	P5 PI407270	
Q-hex-hex-1	4.43	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	649.1375	649.1377	-0.308		X	X	X	X	Quercetina-hexose-hexose ¹⁰¹
Q-hex-hex-2	4.54	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	649.1375	649.1375	0.000		X	X	X		
Q-hex-ram-1	5.16	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1422	0.632		X				Quercetina-hexose-ramnose ^{94,95,101,103}
Q-hex-ram-2	5.30	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1425	0.158		X				
Q-hex-ram-3	5.80	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1421	0.790			X	X	X	
Q-hex-ram-4	5.94	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1420	0.948			X	X	X	
Q-hex-1	6.13	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	487.0847	487.0848	-0.205		X		X	X	Quercetina-hexose ^{84,95,101}
Q-hex-2	6.30	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	487.0847	487.0848	-0.205		X	X	X	X	
I-hex-hex-ram	4.95	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₁	809.2111	809.2114	-0.371			X	X		Isorhamnetina-hexose-hexose-ramnose ¹⁰³
I-hex-ram-ram-1	5.54	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	793.2162	793.2154	1.009			X			
I-hex-ram-ram-2	5.68	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	793.2162	793.2164	-0.252			X		X	Isorhamnetina-hexose-ramnose ¹⁰³
I-hex-ram-ram-3	5.97	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	793.2162	793.2162	0.000			X		X	
I-hex-hex	5.54	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	663.1532	663.1535	-0.452		X	X			Isorhamnetina-hexose-hexose ¹⁰⁰
I-hex-ram-1	6.32	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	647.1583	647.1585	-0.309		X			X	
I-hex-ram-2	6.60	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	647.1583	647.1593	-1.545		X				Isorhamnetina-hexose-ramnose ¹⁰²
I-hex-ram-3	7.02	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	647.1583	647.1584	-0.155			X	X	X	
I-hex-ram-4	7.18	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	647.1583	647.1578	0.773			X	X	X	
I-hex-1	7.31	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	501.1003	501.1001	0.399		X		X	X	
I-hex-2	7.47	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	501.1003	501.1003	0.000		X		X	X	

Desta maneira, pode-se dizer que os perfis qualitativos de isoflavonas dentre as cinco plantas são semelhantes. No entanto, é interessante mencionar algumas diferenças, por exemplo, os conjugados de genisteína G-feruloil-hex e G-mal-hex-3 foram encontrados somente em P1, da mesma forma para D e Gl-mal-hex-1, os quais são metabólitos restritos a P2. As diferenças também foram percebidas para os isômeros A-mal-hex-1 e A-mal-hex-3 sendo observados apenas na planta resistente P2 e na selvagem P5.

Mesmo com as diferenças entre os perfis de isoflavonas, não foi possível observar algum padrão aparente em relação às cultivares susceptíveis (P1 e P4) e/ou resistentes (P2 e P3) e soja selvagem (P5). Contudo, algumas das isoflavonas identificadas neste trabalho têm sido descritas como defesas da soja contra alguns herbívoros, como foi reportado no trabalho de PIUBELLI et al.⁸⁶, no qual foi observado que extratos dos genótipos PI 274454, PI 227687 e IAC-100 causaram maior mortalidade nas larvas de *Anticarsia gemmatalis* devido às altas concentrações de genistina (G-hex). Similarmente, DE BORTOLI et al.¹⁰⁴ observaram que genótipos de soja ‘Embrapa 4’ tiveram aumento nos níveis de algumas isoflavonas, do tipo genisteína e afrormosina, nos extratos de folhas com injúria deste mesmo inseto.

Em relação aos flavonóis encontrados nas folhas dos diversos genótipos estudados (TABELA 4.3), foi observada uma maior diversidade nos triglicosídeos de kaempferol, diglicosídeos de kaempferol, quercetina e isoramnetina. Em contrapartida, uma menor variabilidade foi notada para os triglicosídeos de quercetina, glicosídeos de kaempferol, quercetina e isoramnetina e nos compostos do tipo metil kaempferol.

Em relação aos compostos do tipo kaempferol, os perfis químicos se mostraram diferentes dentre as plantas. No entanto, as variedades P3 e P5 apresentaram semelhanças, diferindo apenas pela presença dos compostos K-hex-hex-ram-3 e K-hex-ram-ram-1 em cada caso. Por outro lado, as cultivares susceptíveis P1 e P4 mostraram perfis muito diferentes devido os isômeros K-

hex-hex-hex e K-hex-hex-ram-1, K-hex-ram-1 e K-hex-ram-2 estarem presentes apenas na cultivar P4, além disso, a cultivar P1 parece ter uma menor quantidade de flavonóis no seu perfil químico, onde foi identificado um total de 6 compostos do tipo kaempferol. Cabe destacar que nesta planta não foram detectados flavonoides de quercetina nem isoramnetina. Por sua vez, a cultivar P2 apresentou maior número de triglicosídeos de kaempferol em contraste com P3, P4 e P5. Por fim, as cultivares resistentes P2 e P3 foram as únicas que apresentaram o isômero K-hex-hex-ram-3 no seu perfil.

No que se refere aos compostos do tipo quercetina, os perfis químicos mostraram diferenças significativas entre as plantas estudadas. A soja selvagem (P5) e os genótipos resistentes (P2 e P3) mostraram os isômeros Q-hex-hex-ram-1, Q-hex-ram-3, Q-hex-ram-4, I-hex-ram-3 e I-hex-ram-4 a diferença das cultivares susceptíveis P1 e P4 que não apresentaram esses compostos. Simultaneamente, as cultivares P2 e P3 exibiram também os compostos Q-hex-hex-ram-2 e I-hex-hex-ram nos seus perfis.

É interessante destacar que estes resultados concordam em parte com alguns trabalhos reportados na literatura. ROMANI et al.⁸³ investigaram o conteúdo de flavonóis em distintas partes da soja e encontraram alto teor de derivados de kaempferol e quercetina nas folhas, e menor quantidade em sementes e caule. Da mesma forma, outros autores observaram que os níveis constitutivos de alguns conjugados das classes quercetina, kaempferol e isoramnetina são os mais abundantes nas folhas de alguns genótipos de soja e podem proporcionar resistência à herbivoria^{14,101}, como foi observado no trabalho de O'NEILL et al.⁸⁸, os quais mostraram que os diglicosídeos de kaempferol e triglicosídeos de kaempferol e quercetina estão relacionados com a defesa da soja contra o ataque do besouro *Popillia japonica*. Similarmente, DILLON et al.¹⁰³, estudaram o efeito da radiação solar UV-B sobre a indução de compostos fenólicos em folhas de soja danificadas por *Anticarsia gemmatalis* e observaram que a resistência das plantas mediada pela radiação solar UV-B contra este inseto foi devido a alterações no

conteúdo de dois isômeros triglicosídeos de quercetina (Q-hex-hex-ram) e um triglicosídeo de kaempferol (K-hex-hex-ram). Desta maneira, podemos sugerir que muitos dos flavonoides detectados nas distintas variedades de soja estudadas neste trabalho podem ser importantes fatores que conferem resistência a diversos tipos de estresses.

Em síntese, as principais diferenças qualitativas entre as cultivares resistentes e soja selvagem com respeito às cultivares susceptíveis foram devido à presença das isoflavonas A-mal-hex-1 e A-mal-hex-3; e dos flavonóis K-hex-hex-ram-3, Q-hex-hex-ram-1, Q-hex-hex-ram-2, Q-hex-ram-3, Q-hex-ram-4, I-hex-hex-ram, I-hex-ram-ram-2, I-hex-ram-ram-3, I-hex-ram-3 e I-hex-ram-4 no seus perfis. Embora, vários autores relacionem alguns destes compostos com a resistência da soja a herbívoros, é importante estudar a toxicidade destes metabolitos secundários contra algumas pragas. Também poderia se avaliar a variação na produção e nos níveis de flavonoides dependendo do tipo de indução (seja dano mecânico ou diferentes herbívoros), já que se pressupõe que a herbivoria seja uma força seletiva primária para produção de metabólitos secundários¹⁰⁵; e estes estresses podem provocar respostas diferentes na soja, como alterações na composição e concentração de flavonoides nos seus tecidos^{85,88}.

4.2 – Quantificação relativa de flavonoides

Com base no observado a partir da análise do perfil químico qualitativo dos genótipos estudados, os sinais $[M+Na]^+$ foram selecionados como íons quantitativos para a determinação das abundâncias relativas dos diferentes flavonoides identificados nos três tecidos de cada planta. Deste modo, as áreas utilizadas para obter as abundâncias relativas dos flavonoides em cada amostra foram obtidas a partir do EIC, procurando inicialmente o íon $[M+Na]^+$ correspondente para cada composto e posteriormente normalizando-as pela massa (g) de folhas e volume de solvente (mL) usados durante o processo de extração.

Adicionalmente, foram obtidas as abundâncias relativas totais para cada tipo de flavonoide por meio da somatória das áreas normalizadas dos conjugados correspondentes a cada aglicona detectada anteriormente. Por exemplo, no caso da daidzeína foram identificados dois tipos de conjugados (D-hex e D-mal-hex), portanto são mostradas as somatórias das áreas destes compostos para esta classe de isoflavona. Isto foi feito primeiramente para comparar as abundâncias de cada tipo de composto nos três tecidos de cada variedade individualmente (dados mostrados nas FIGURAS A.17 – A.25) e posteriormente foi feita a mesma comparação dentre todos os genótipos.

4.2.1 – Abundância relativa de flavonoides

Em relação aos resultados das abundâncias relativas totais de isoflavonas para as cultivares estudadas, observou-se na maioria das plantas que tanto os conjugados de daidzeína, formononetina, gliciteína e afrormosina apresentaram maior proporção nas folhas U (folhas velhas) em contraste com os folhas T1 e T2 (folhas intermediárias e jovens, respectivamente). Por sua vez, os conjugados de genisteína e quercetina não mostraram diferenças significativas dentre as folhas. Entretanto, as cultivares P2 e P4 apresentaram maiores abundâncias relativas dos conjugados dos flavonóis kaempferol e isoramnetina em T2 em relação com U e T1 (FIGURAS A.17 – A.25).

Por último, a soja selvagem não mostrou diferença significativa entre as folhas para as isoflavonas, com exceção dos conjugados de afrormosina, onde foi observado que estes compostos possuíam maior proporção em U em contraste com T2 (FIGURA A.24). Para o caso dos conjugados dos flavonóis kaempferol, quercetina e isoramnetina foi observado que T2 possuía maior abundância relativa destes compostos quando comparado com U (FIGURA A.25).

Em resumo, estes resultados sugerem de maneira geral que os conjugados de isoflavonas podem ser encontrados em maior abundância relativa nas folhas velhas (U), enquanto que os conjugados de flavonóis podem estar presentes em maior proporção nas folhas mais jovens (T1 e preferivelmente T2).

Alguns trabalhos têm reportado que os flavonóis podem ter diferentes papéis funcionais relacionadas com a fotoproteção. Entre as principais funções que têm sido conferidas encontram-se a alta eficácia na inibição e redução da geração de espécies reativas de oxigênio, são considerados moduladores do transporte de auxinas (por meio do bloqueio do hormônio) e, portanto, têm um grande potencial para regular o desenvolvimento de órgãos individuais e da planta inteira, sendo considerados como moléculas de sinalização. Os flavonoides podem se acumular nas folhas da planta como resposta ao estresse luminoso, atuando como filtros e evitando assim a morte celular programada, como é o caso dos compostos do tipo kaempferol e derivados de quercetina, sendo este último mais eficaz como antioxidante em contraste com flavonóis mono-hidroxilados¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. A partir destas informações poderia se considerar a possibilidade de que os flavonóis identificados nos tecidos das variedades de soja aqui estudadas não são somente produzidos como defesas constitutivas relacionadas à herbivoria, mas também com o intuito de proteger a planta do estresse abiótico ocasionado pela radiação UV ou simplesmente como reguladores do desenvolvimento da planta.

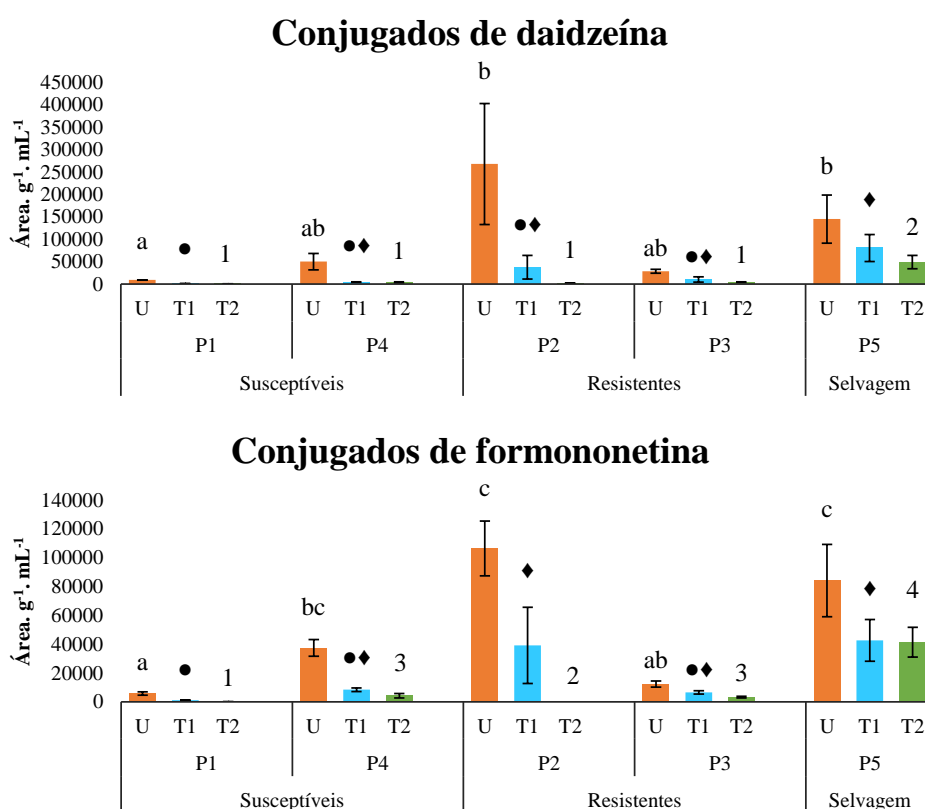
4.3 – Estudo comparativo das abundâncias relativas de flavonoides

Nas FIGURAS 4.6 – 4.9 são mostradas as abundâncias relativas (somatória das áreas para os conjugados de cada classe de flavonoide) dos flavonoides detectados nas folhas U (velha, ■), T1 (intermédiadas, ■) e T2 (jovens, ■) para os genótipos estudados. As comparações são feitas dentre os mesmos tecidos e entre as distintas variedades. As letras no eixo x se referem aos distintos tecidos estudados: U, T1 e T2. As diferenças significativas entre cada tecido se

indicam com letras, caracteres e números diferentes dependendo do tecido e são derivadas do teste de Tukey com 95% de confiabilidade ($P < 0.05$).

Em referência aos resultados das abundâncias relativas dos conjugados de daidzeína, observa-se que quando analisada a folha mais velha (U) a cultivar susceptível P1 se mostra diferente das plantas P2 (resistente) e P5 (selvagem). Por outro lado, a soja selvagem apresentou maior abundância relativa de daidzeína na folha jovem (T2) em contraste com as outras cultivares estudadas (FIGURA 4.6).

FIGURA 4.6 – Abundâncias relativas ($\text{Área.g}^{-1}.\text{mL}^{-1}$) das somatórias dos conjugados de daidzeína e formononetina nas folhas dos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5 no estágio de desenvolvimento V3.

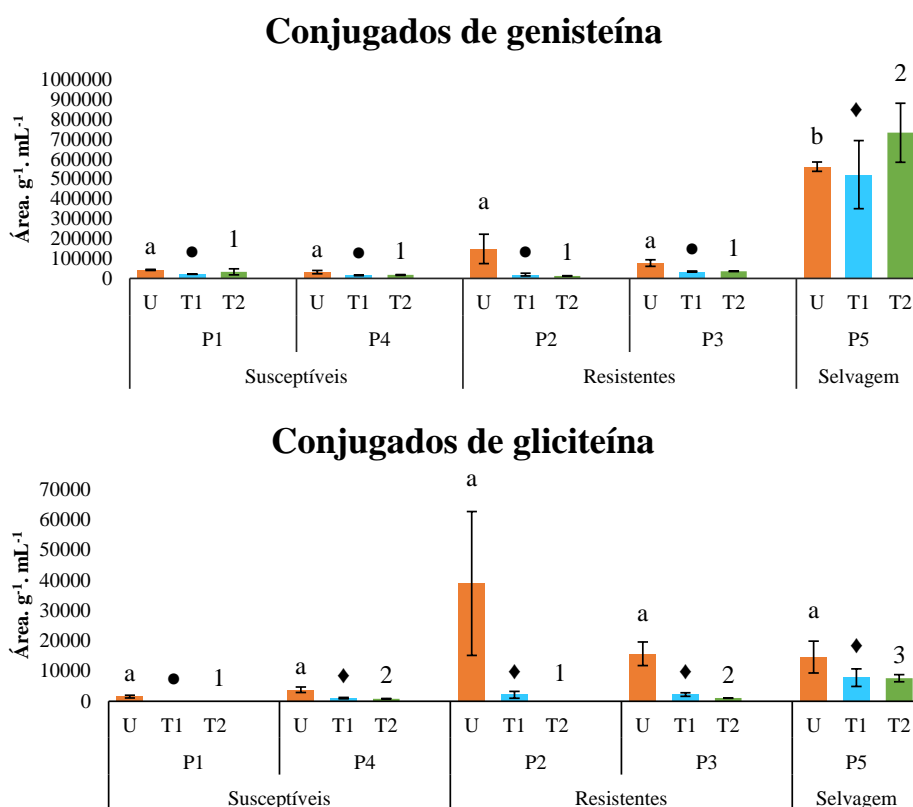


Por sua vez, a cultivares P2, P4 e soja selvagem (P5) apresentaram maior proporção dos conjugados do tipo formononetina comparados com P1 e P3 no tecido U; para a folha T1, P1 mostrou menor abundância com respeito a P2 e P5 e no caso das folhas mais jovens (T2) também se evidenciou menor proporção

deste tipo de isoflavonas, sendo que a soja selvagem teve os níveis mais altos (FIGURA 4.6).

Adicionalmente, a soja selvagem também evidenciou maior abundância relativa de conjugados de genisteína nos três tecidos estudados, em contraste com as cultivares P1, P2, P3 e P4. Para os conjugados de gliciteína, não foram observadas diferenças significativas dentre as cinco plantas e a folha velha. A planta susceptível P1 foi a única que não apresentou este tipo de conjugados no tecido T1 e T2, enquanto que a soja selvagem mostrou maior abundância destes compostos na folha jovem (T2) em contraste com as outras plantas (FIGURA 4.7).

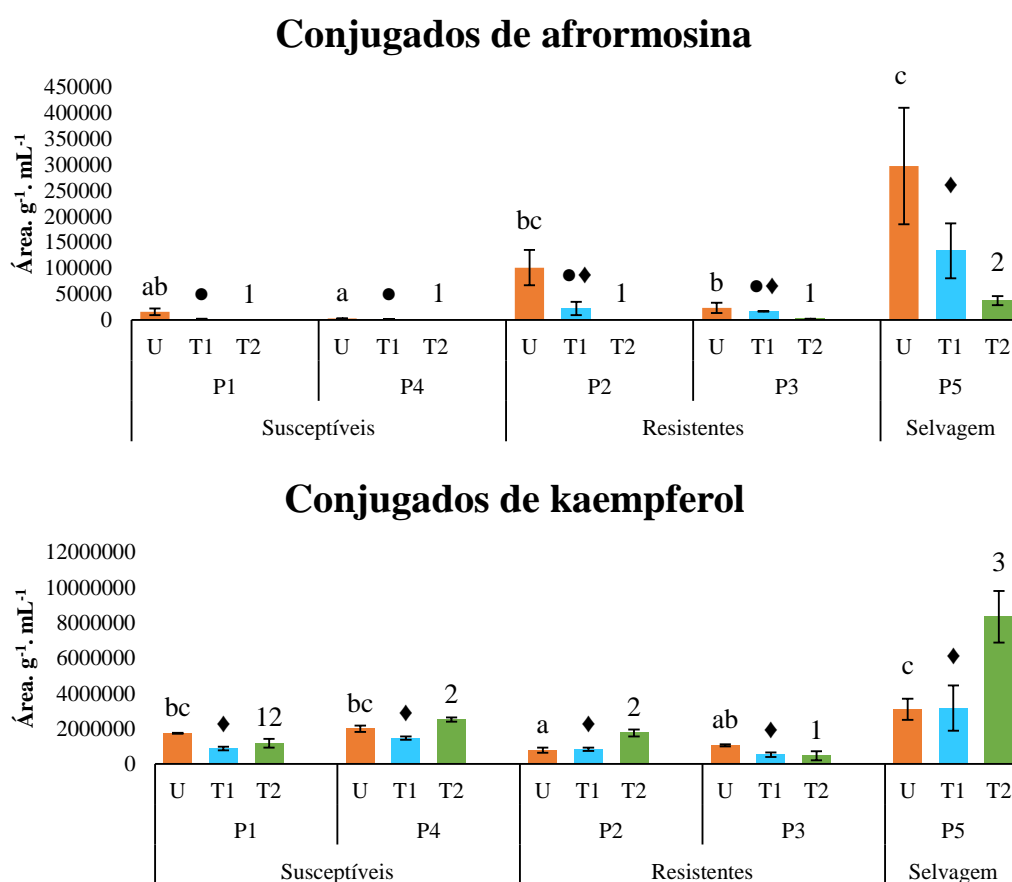
FIGURA 4.7 – Abundâncias relativas (Área.g⁻¹.mL⁻¹) das somatórias dos conjugados de genisteína e gliciteína nas folhas dos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5 no estágio de desenvolvimento V3.



No caso dos conjugados de afrormosina, foi observado que a soja selvagem apresentou maior abundância destes compostos nas folhas velhas com respeito as cultivares P1, P3 e P4, enquanto a variedade resistente P2 mostrou níveis similares neste tecido em relação a P5. Para o tecido T1 a soja selvagem

novamente mostrou maiores proporções em relação às cultivares suscetíveis P1 e P4 e nas folhas jovens (T2) também apresentou abundâncias relativas maiores em contraste com as cultivares (FIGURA 4.8).

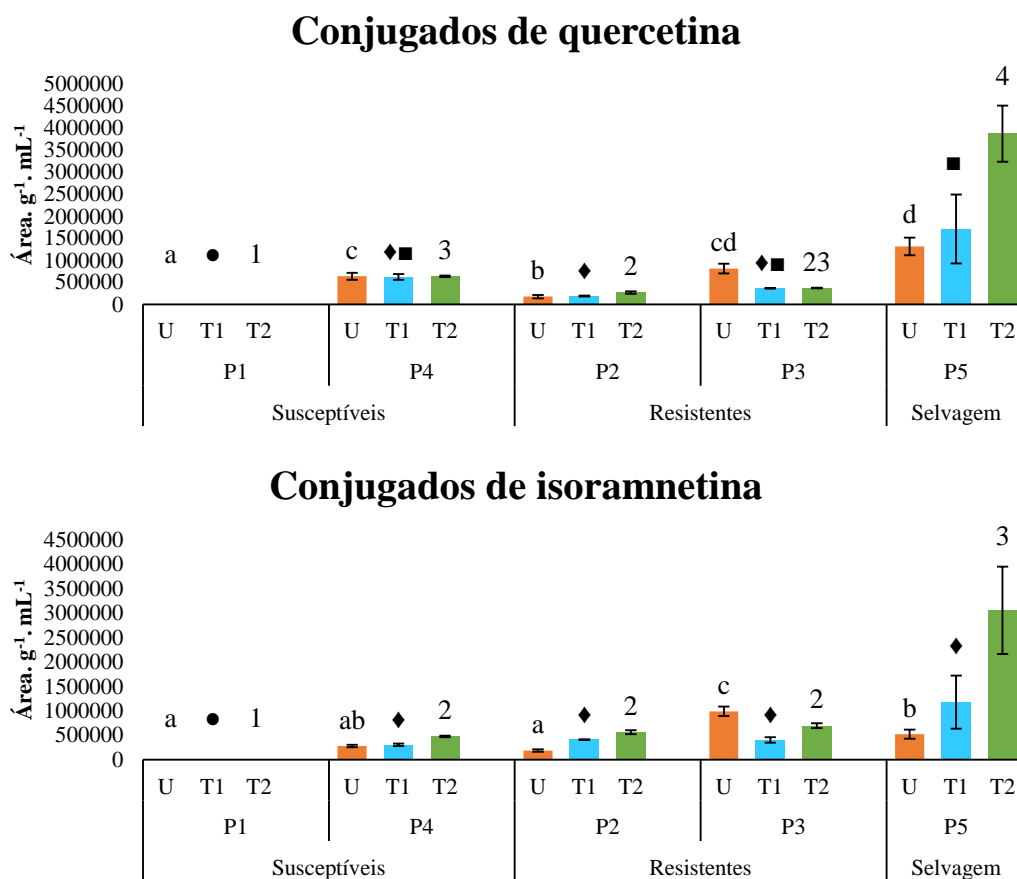
FIGURA 4.8 – Abundâncias relativas ($\text{Área.g}^{-1}.\text{mL}^{-1}$) das somatórias dos conjugados de afrormosina e kaempferol nas folhas das cultivares P1, P2, P3, P4 e soja selvagem P5 no estágio de desenvolvimento V3.



No que se refere aos flavonóis, foi observado que a soja selvagem (P5) apresentou maior abundância de conjugados de kaempferol nas suas folhas velhas em contraste com as cultivares resistentes P2 e P3. Conforme pode ser observado na FIGURA 4.8, as variedades suscetíveis P1 e P4, tiveram maiores níveis destes compostos em contraste com P2. No caso das folhas jovens, a soja selvagem mostrou abundâncias relativas maiores em contraste com todas as outras cultivares estudadas.

Para os conjugados de quercetina também foi observado que a soja selvagem possuía maiores proporções destes compostos nas suas folhas U e T2 em contraste com as variedades susceptíveis P1, P4 e a planta resistente P2, sendo que a cultivar P1 não apresentou níveis destes compostos em seus tecidos. Além disso, para os conjugados do tipo isoramnetina foi observado que a cultivar resistente P3 apresentou maior abundância destes compostos nas suas folhas velhas em contraste com os outros genótipos. Ainda mais, a soja selvagem mostrou maior proporção destes conjugados com respeito a P2. No caso da folha jovem (T2), foi observado que novamente a soja selvagem apresentou maior abundância relativa destes compostos comparada com as variedades estudadas (FIGURA 4.9).

FIGURA 4.9 – Abundâncias relativas ($\text{Área.g}^{-1}.\text{mL}^{-1}$) das somatórias dos conjugados de quercetina e isoramnetina nas folhas dos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5 no estágio de desenvolvimento V3.



As informações obtidas neste trabalho mostram que embora os perfis das plantas (domesticadas e selvagem) sejam similares, elas apresentaram algumas diferenças tanto na composição (majoritariamente no perfil de flavonóis) quanto nos níveis de flavonoides constitutivos que poderiam distinguir as variedades resistentes (P2 e P3) e a soja selvagem (P5) das susceptíveis (P1 e P4). Isto também foi relatado no trabalho de PERLATTI et al.⁸⁴, onde foi encontrada diversidade em termos de composição e discrepâncias nas concentrações de alguns flavonoides entre diferentes variedades de soja. É importante mencionar que a composição de flavonoides, além de depender de fatores ambientais, também está relacionada com fatores genéticos^{87,88}, e portanto as variações na composição e nos níveis de estes compostos nas plantas estudadas pode estar associada com o genótipo.

O fato de que a soja selvagem evidenciou em sua maioria proporções maiores de isoflavonas e flavonóis nas suas folhas em contraste com as cultivares domesticadas está de acordo com alguns trabalhos reportados na literatura, onde tem sido evidenciado que a soja selvagem geralmente mostra quantidades maiores de flavonoides e fenilpropanoides, os quais lhe conferem tolerância ao estresse biótico e abiótico e apresenta níveis menores de aminoácidos, polissacarídeos e ácidos graxos comparados com as variedades cultivadas³⁸⁻⁴⁰. É possível que os altos níveis de flavonoides na soja selvagem tenham sido desenvolvidos como um mecanismo de adaptação ao estresse biótico e abiótico ocasionado pelas condições adversas durante seu crescimento para reduzir os danos associados¹⁰⁹, em contraste com as variedades domesticadas que geralmente apresentam condições otimizadas de cultivo. Além disso, existe a hipótese de que a produção de metabólitos secundários tem custos para a planta, já que esta precisaria utilizar precursores do metabolismo primário para conduzir sua biossíntese (além da disponibilidade de nutrientes adequadas no solo, o que poderia ser difícil para a soja selvagem) e logo definir se concentra esses recursos valiosos no seu

crescimento e desenvolvimento ou na sua defesa^{105,110}. O anterior poderia ser um dos fatores que expliquem os níveis menores de flavonoides, o alto teor de proteínas, lipídios, carboidratos e maior tamanho nas folhas e sementes observados nas plantas cultivadas em contraste com seu progenitor selvagem. Outras características que distinguem a soja selvagem das variedades cultivadas e que poderia explicar sua tolerância ao estresse biótico podem estar relacionadas com alguns traços morfológicos, por exemplo, a soja selvagem apresenta mais ramificações, e esta característica possivelmente seja uma estratégia importante para tolerar a herbivoria, dando-lhe maiores oportunidades de compensar os danos causados por esses tipos de estresses.

5 – CONCLUSÕES

A partir dos extratos de diferentes folhas de quatro cultivares de soja domesticada e uma variedade de soja selvagem foram identificados 57 flavonoides, os quais foram classificados em 18 isoflavonas, incluindo alguns conjugados de daidzeína, formononetina, genisteína, gliciteína e afrormosina e 39 flavonóis, dentre os conjugados de kaempferol, metilkaempferol, quercetina e isoramnetina. Os perfis químicos qualitativos de cada genótipo mostraram variabilidade na composição de flavonoides, as principais diferenças qualitativas entre as cultivares resistentes e soja selvagem com respeito às cultivares susceptíveis foram devido à presença das isoflavonas A-mal-hex-1 e A-mal-hex-3; e dos flavonóis K-hex-hex-ram-3, Q-hex-hex-ram-1, Q-hex-hex-ram-2, Q-hex-ram-3, Q-hex-ram-4, I-hex-hex-ram, I-hex-ram-ram-2, I-hex-ram-ram-3, I-hex-ram-3 e I-hex-ram-4 nos seus perfis; não foi observado quercetina e seus conjugados na cultivar P1. Por outro lado, foi observado que os conjugados de isoflavonas podem ser encontrados em maior abundância relativa nas folhas velhas (U), enquanto os conjugados de flavonóis podem estar presentes em maior proporção nas folhas mais jovens (T1 e preferivelmente T2). A soja selvagem evidenciou em grande parte maiores abundâncias relativas das isoflavonas e flavonóis nas suas folhas jovens em comparação com as cultivares domesticadas.

Em síntese, este trabalho mostrou que a maioria das isoflavonas são alocadas nas folhas velhas, enquanto que os flavonóis se acumulam principalmente nas folhas jovens. Além disso, foi evidenciado que a soja selvagem apresenta níveis mais altos de flavonoides em contraste com as variedades cultivadas. Isto sugere que folhas de diferentes idades possuem diferenças em sua composição e que as abundâncias desses compostos diferem de acordo com o genótipo, sendo que os níveis mais baixos nas variedades cultivadas podem ser uma consequência de sua domesticação, uma vez que estas plantas

podem estar concentrando seus recursos energéticos em seu crescimento, desenvolvimento e em menor medida na sua defesa.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram determinar algumas diferenças no perfil químico entre as distintas cultivares de soja (susceptíveis e resistentes a herbívoros), assim como também na soja selvagem. Estas distinções estão relacionadas tanto à composição química quanto à proporção dos flavonoides. Isto aponta que a resistência que apresentam algumas variedades de soja pode ser devido aos maiores níveis de flavonoides presentes nos seus tecidos, e sugere também que o processo de domesticação provocou uma redução dos teores destes compostos nas folhas, o que pode ser um fator que provoca maior susceptibilidade à herbivoria nas plantas cultivadas. Por conseguinte, fica evidenciada a importância do uso da soja selvagem como uma fonte proveitosa no estudo de atributos de defesa e, desta maneira, melhorar as características agronômicas e defensivas da soja cultivada.

Por fim, conhecer o perfil de flavonoides entre os distintos genótipos permitirá entender o papel que têm estes compostos nos mecanismos de interação inseto-planta. Isto facilitará uma caracterização mais abrangente e confiável da resistência da soja contra vários estresses e, deste modo, contribuir na criação de variedades resistentes e novos alvos para o manejo de pragas agrícolas, contribuindo para o desenvolvimento sustentável da agricultura e proteção ambiental.

6 – REFERÊNCIAS

1. LEANDRO FINGER, QUITAISKI, P. P., LANGE, D. & CÂMARA, C. D. "Iguaçu National Park as a fountain of natural predators of soy pragas". *Brazilian J. Dev.* **4**, 3931–3944, 2018.
2. MICHEREFF, M. F. F.; BORGES, M.; LAUMANN, R. A.; DANIEL, D.; LUCIO, C.; BLASSIOLI-MORAES, M. C. "The influence of resistant soybean cultivars on the biological development of *Euschistus heros* (Hemiptera : Pentatomidae)". *J. Plant Interact.* **14**, 544–551, 2019.
3. ROCHA, B. G. .; AMARO, H. T. .; PORTO, E. M. .; GONÇALVES, C. C.; DAVID, A. M. S. .; LOPES, E. B. "Sistema de semeadura cruzada na cultura da soja: avanços e perspectivas". *Rev. Ciências Agrárias* **41**, 376–384, 2018.
4. SEDIVY, E. J., WU, F. & HANZAWA, Y. "Soybean domestication: the origin, genetic architecture and molecular bases". *New Phytol.* **214**, 539–553, 2017.
5. GAZZONI, D. L. & DALL'AGNOL, A. "Soja : quebrando recordes : CESB: 10 anos de máxima produtividade / Realização Comitê Estratégico Soja Brasil (CESB)". *Embrapa Soja* 37–59, 2018.
6. NAWAZ, M. A.; LIN, X.; CHAN, T.-F.; HAM, J.; SHIN, T.-S.; ERCISLI, S.; GOLOKHAVAST, K. S.; LAM, H.-M.; CHUNG, G. "Korean Wild Soybeans (*Glycine soja* Sieb & Zucc.): Geographic Distribution and Germplasm Conservation". *Agronomy* **10**, 214, 2020.
7. KOFSKY, J.; ZHANG, H.; SONG, B.-H. "The Untapped Genetic Reservoir: The Past, Current, and Future Applications of the Wild Soybean (*Glycine soja*)". *Front. Plant Sci.* **9**, 2018.
8. HAAS, B. A.; PASINI, M. P. B.; ENGEL, E.; HORZ, D. C.; VINCENSI, C. P.; MASIERO, C. E. P.; FELTRIN, B. B.; COSTA, R. M. D.; CAMPOS, R. S.; SOUZA, L. M. "Economic efficiency of insecticides on *Anticarsia gemmatalis* on soybean culture". *RevInt Rev. Interdiscip. ensino, Pesqui. e extensão* **6**, 358–365, 2018.
9. HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MAZZARIN, R. M.; LUSTOSA, P. R. "Resistance mechanisms of soybean genotypes: non-preference test of *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lep: Noctuidae)". *Pesqui. Agropecuária Bras.* **29**, 513–519, 1994.

10. HOFFMANN-CAMPO, C. B.; RAMOS NETO, J. A.; OLIVEIRA, M. C. N. DE; OLIVEIRA, L. J. "Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*". *Pesqui. Agropecuária Bras.* **41**, 1453–1459, 2006.
11. WANG, X.; CHEN, H.; SHAN, Z.; HAO, Q.; ZHANG, C.; YANG, Z.; ZHANG, X.; YUAN, S.; QIU, D.; CHEN, S.; JIAO, Y.; ZHOU, X. "Herbivore defense responses and associated herbivore defense mechanism as revealed by comparing a resistant wild soybean with a susceptible cultivar". *Crop J.* **3**, 451–467, 2015.
12. DA GRAÇA, J. P.; UEDA, T. E.; JANEGITZ, T.; VIEIRA, S. S.; SALVADOR, M. C.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; ZINGARETTI, S. M.; POWERS, S. J.; PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. "The natural plant stress elicitor cis-jasmone causes cultivar-dependent reduction in growth of the stink bug, *Euschistus heros* and associated changes in flavonoid concentrations in soybean, *Glycine max*". *Phytochemistry* **131**, 84–91, 2016.
13. CHANG, C.; TIAN, L.; MA, L.; LI, W.; NASIR, F.; LI, X.; TRAN, L. P.; TIAN, C. "Differential responses of molecular mechanisms and physiochemical characters in wild and cultivated soybeans against invasion by the pathogenic *Fusarium oxysporum* Schltdl". *Physiol. Plant.* **166**, 1008–1025, 2019.
14. ROMERO, B.; DILLON, F. M.; ZAVALA, J. A. "Different soybean cultivars respond differentially to damage in a herbivore - specific manner and decrease herbivore performance". *Arthropod. Plant. Interact.* **14**, 89–99, 2019.
15. TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE SOJA - Região Central do Brasil 2011. *Sistemas de Produção* 14 1–255, 2010.
16. COLONNELLI, B. L. "Potencial de produtividade e variabilidade espacial de atributos físicos e químicos do solo em plantio direto de soja no município de Paragominas-PA". Universidade Federal Rural da Amazônia, 2013.
17. PERINI, L. J., FONSECA JÚNIOR, N. D. S., DESTRO, D. & PRETE, C. E. C. "Componentes da produção em cultivares de soja com crescimento determinado e indeterminado". *Semin. Ciências Agrárias* **33**, 2531–2544, 2012.
18. VERNETTI, F. DE J.; GASTAL, M. F. DA C. "Descrição botânica da soja". *Circular Técnica N°7* 1–11, 1979.

19. TEJO, D. P.; FERNANDES, C. H. DOS S.; BURATTO, J. S. "Soja : fenologia, morfologia e fatores que interferem na produtividade". Rev. Científica Eletrônica Agron. da FAEF **35**, 1–9, 2019.
20. FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. "Stage of Development Descriptions for Soybeans, *Glycine Max* (L.) Merrill". Crop Sci. **11**, 929–931, 1971.
21. FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. "Stages of soybean development". Spec. Report. **80**. 1–11, 1977.
22. PURUGGANAN, M. D. "Evolutionary insights into the nature of plant domestication". Curr. Biol. **29**, R705–R714, 2019.
23. SPENGLER, R. N. "Anthropogenic seed dispersal: rethinking the origins of plant domestication". Trends Plant Sci. **25**, 340–348, 2020.
24. ZHOU, Z.; JIANG, Y.; WANG, Z.; GOU, Z.; LYU, J.; LI, W.; YU, Y.; SHU, L.; ZHAO, Y.; MA, Y.; FANG, C.; SHEN, Y.; LIU, T.; LI, C.; LI, Q.; WU, M.; WANG, M.; WU, Y.; DONG, Y.; WAN, W.; WANG, X.; DING, Z.; GAO, Y.; XIANG, H.; ZHU, B.; LEE, S.-H.; WANG, W.; TIAN, Z. "Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean". Nat. Biotechnol. **33**, 408–414, 2015.
25. JEONG, S.-C.; MOON, J.-K.; PARK, S.-K.; KIM, M.-S.; LEE, K.; LEE, S. R.; JEONG, N.; CHOI, M. S.; KIM, N.; KANG, S.-T.; PARK, E. "Genetic diversity patterns and domestication origin of soybean". Theor. Appl. Genet. **132**, 1179–1193, 2019.
26. LIU, X.; HE, J.; WANG, Y.; XING, G.; LI, Y.; YANG, S.; ZHAO, T.; GAI, J. "Geographic differentiation and phylogeographic relationships among world soybean populations. Crop J. **8**, 260–272, 2020.
27. WANG, X.; CHEN, L.; MA, J. "Genomic introgression through interspecific hybridization counteracts genetic bottleneck during soybean domestication". Genome Biol. **20**, 22, 2019.
28. WANG, J.; CHU, S.; ZHANG, H.; ZHU, Y.; CHENG, H.; YU, D. "Development and application of a novel genome-wide SNP array reveals domestication history in soybean". Sci. Rep. **6**, 20728, 2016.

29. MAAG, D.; ERB, M.; BERNAL, J. S.; WOLFENDER, J.-L.; TURLINGS, T. C. J.; GLAUSER, G. "Maize Domestication and anti-herbivore defences: leaf-specific dynamics during early ontogeny of maize and its wild ancestors". *PLoS One*. **10**, e0135722, 2015.
30. WHITEHEAD, S. R.; TURCOTTE, M. M.; POVEDA, K. "Domestication impacts on plant–herbivore interactions: a meta-analysis". *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **372**, 20160034, 2017.
31. SHI, S.; CHANG, J.; TIAN, L.; NASIR, F.; JI, L.; LI, X.; TIAN, C. "Comparative analysis of the rhizomicrobiome of the wild versus cultivated crop: insights from rice and soybean". *Arch. Microbiol.* **201**, 879–888. 2019.
32. SWARM, S. A.; SUN, L.; WANG, X.; WANG, W.; BROWN, P. J.; MA, J.; NELSON, R. L. "Genetic dissection of domestication-related traits in soybean through genotyping-by-sequencing of two interspecific mapping populations". *Theor. Appl. Genet.* **132**, 1195–1209, 2019.
33. YAO, Y.; YOU, Q.; DUAN, G.; REN, J.; CHU, S.; ZHAO, J.; LI, X.; ZHOU, X.; JIAO, Y. "Quantitative trait loci analysis of seed oil content and composition of wild and cultivated soybean". *BMC Plant Biol.* **20**, 1–13, 2020.
34. ZHANG, D.; SUN, L.; LI, S.; WANG, W.; DING, Y.; SWARM, S. A.; LI, L.; WANG, X.; TANG, X.; ZHANG, Z.; TIAN, Z.; BROWN, P. J.; CAI, C.; NELSON, R. L.; MA, J. "Elevation of soybean seed oil content through selection for seed coat shininess". *Nat. Plants* **4**, 30–35, 2018.
35. CHEN, Y. H.; GOLS, R.; BENREY, B. "Crop domestication and its impact on naturally selected trophic interactions". *Annu. Rev. Entomol.* **60**, 35–58, 2015.
36. HERNANDEZ-CUMPLIDO, J.; GIUSTI, M. M.; ZHOU, Y.; KYRYCZENKO-ROTH, V.; CHEN, Y. H.; RODRIGUEZ-SAONA, C. "Testing the 'plant domestication-reduced defense' hypothesis in blueberries: the role of herbivore identity". *Arthropod. Plant. Interact.* **12**, 483–493, 2018.
37. GAO, H.; WANG, Y.; LI, W.; GU, Y.; LAI, Y.; BI, Y.; HE, C. "Transcriptomic comparison reveals genetic variation potentially underlying seed developmental evolution of soybeans". *J. Exp. Bot.* **69**, 5089–5104, 2018.

38. BIAN, X.; LI, W.; NIU, C.; WEI, W.; HU, Y.; HAN, J.; LU, X.; TAO, J.; JIN, M.; QIN, H.; ZHOU, B.; ZHANG, W.; MA, B.; WANG, G.; YU, D.; LAI, Y.; CHEN, S.; ZHANG, J. "A class B heat shock factor selected for during soybean domestication contributes to salt tolerance by promoting flavonoid biosynthesis". *New Phytol.* **225**, 268–283, 2020.
39. XU, J. L.; SHIN, J.-S.; PARK, S.-K.; KANG, S.; JEONG, S.-C.; MOON, J.-K.; CHOI, Y. "Differences in the metabolic profiles and antioxidant activities of wild and cultivated black soybeans evaluated by correlation analysis". *Food Res. Int.* **100**, 166–174, 2017.
40. HYEON, H.; XU, J. L.; KIM, J. K.; CHOI, Y. "Comparative metabolic profiling of cultivated and wild black soybeans reveals distinct metabolic alterations associated with their domestication". *Food Res. Int.* **134**, 109290, 2020.
41. CONZEMIUS, S. R.; HESLER, L. S.; VARENHORST, A. J.; TILMON, K. J. "Resistance to soybean aphid biotype 4 in plant introductions of *Glycine soja*". *Euphytica* **215**, 98, 2019.
42. OKI, N.; KAGA, A.; SHIMIZU, T.; TAKAHASHI, M.; KONO, Y.; TAKAHASHI, M. "QTL mapping of antixenosis resistance to common cutworm (*Spodoptera litura* Fabricius) in wild soybean (*Glycine soja*)". *PLoS One* **12**, e0189440, 2017.
43. DILLON, F. M.; CHLUDIL, H. D.; ZAVALA, J. A. "Solar UV-B radiation modulates chemical defenses against *Anticarsia gemmatilis* larvae in leaves of field-grown soybean". *Phytochemistry* **141**, 27–36, 2017.
44. PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; DE OLIVEIRA, M. C. N. "Baculovirus-resistant *Anticarsia gemmatilis* responds differently to dietary rutin". *Entomol. Exp. Appl.* **119**, 53–60, 2006.
45. BEL, Y.; ZACK, M.; NARVA, K.; ESCRICHE, B. "Specific binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ea toxin, and Cry1Ac and Cry1Fa competition analyses in *Anticarsia gemmatilis* and *Chrysodeixis includens*". *Sci. Rep.* **9**, 18201, 2019.
46. ÁVILA, C. J.; GROGOLLI, J. F. J. "Pragas da soja e seu controle". *Tecnologia e produção: Soja 2013/2014*. Fundação MS 247, 2014.

47. MOSCARDI, F.; BUENO, A. D. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F.; CORSO, I. C.; YANO, S. A. C. "Artrópodes que atacam as folhas da soja. Soja Manejo Integr. Insetos e outros Artrópodes-Praga 860, 2012.
48. MITHÖFER, A.; BOLAND, W.; MAFFEI, M. E. "Chemical ecology of plant-insect interactions". In Annual Plant Reviews online vol. **34** 261–291 (John Wiley & Sons, Ltd), 2018.
49. FRANCO, F. P.; MOURA, D. S.; VIVANCO, J. M.; SILVA-FILHO, M. C. "Plant–insect–pathogen interactions: a naturally complex ménage à trois". *Curr. Opin. Microbiol.* **37**, 54–60, 2017.
50. GIRON, D.; DUBREUIL, G.; BENNETT, A.; DEDEINE, F.; DICKE, M.; DYER, L. A.; ERB, M.; HARRIS, M. O.; HUGUET, E.; KALOSHIAN, I.; KAWAKITA, A.; LOPEZ-VAAMONDE, C.; PALMER, T. M.; PETANIDOU, T.; POULSEN, M.; SALLÉ, A.; SIMON, J.-C.; TERBLANCHE, J. S.; THIÉRY, D.; WHITEMAN, N. K.; WOODS, H. A.; PINCEBOURDE, S. "Promises and challenges in insect-plant interactions". *Entomol. Exp. Appl.* **166**, 319–343, 2018.
51. HANLEY, M. E.; LAMONT, B. B.; FAIRBANKS, M. M.; RAFFERTY, C. M. "Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence". *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* **8**, 157–178, 2007.
52. WOODARD, A. M.; ERVIN, G. N.; MARSICO, T. D. "Host plant defense signaling in response to a coevolved herbivore combats introduced herbivore attack". *Ecol. Evol.* **2**, 1056–1064, 2012.
53. VILELA, A. A.; TOREZAN-SILINGARDI, H. M.; DEL-CLARO, K. "Conditional outcomes in ant–plant–herbivore interactions influenced by sequential flowering". *Flora - Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* **209**, 359–366, 2014.
54. GONG, B.; ZHANG, G. "Interactions between plants and herbivores: A review of plant defense". *Acta Ecol. Sin.* **34**, 325–336, 2014.
55. KANT, M. R.; JONCKHEERE, W.; KNEGT, B.; LEMOS, F.; LIU, J.; SCHIMMEL, B. C. J.; VILLARROEL, C. A.; ATAIDE, L. M. S.; DERMAUW, W.; GLAS, J. J.; EGAS, M.; JANSSEN, A.; VAN LEEUWEN, T.; SCHUURINK, R. C.; SABELIS, M. W.; ALBA, J. M. "Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities". *Ann. Bot.* **115**, 1015–1051, 2015.

56. ALBA, J. M.; GLAS, J. J.; SCHIMMEL, B. C. J.; KANT, M. R. "Avoidance and suppression of plant defenses by herbivores and pathogens". *J. Plant Interact.* **6**, 221–227, 2011.
57. ALJBORY, Z.; CHEN, M.-S. "Indirect plant defense against insect herbivores: a review". *Insect Sci.* **25**, 2–23, 2018.
58. LOPES, A. P. S.; DINIZ, I. R.; MORAES, M. C. B.; BORGES, M.; LAUMANN, R. A. "Defesas induzidas por herbivoria e interações específicas no sistema tritrófico soja-percevejos-parasitoides de ovos". *Pesqui. Agropecuária Bras.* **47**, 875–878, 2012.
59. 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 Signal. Behav.* **7**, 1306–1320, 2012.
60. FLORES, H.; COSIO, E.; VIVANCO, J.; LOYOLA -VARGAS, V. "Mecanismos químicos de defensa en las plantas". *Investig. Cienc.* **68–75**, 2005.
61. GOLS, R. "Direct and indirect chemical defences against insects in a multitrophic framework". *Plant. Cell Environ.* **37**, 1741–1752, 2014.
62. FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. "Plant Defense against Insect Herbivores". *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 10242–10297, 2013.
63. CHEN, M.-S. "Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review". *Insect Sci.* **15**, 101–114, 2008.
64. WIELKOPOLAN, B.; OBREPALSKA-STEPLOWSKA, A. "Three-way interaction among plants, bacteria, and coleopteran insects". *Planta* **244**, 313–332, 2016.
65. RIDDICK, E. W.; SIMMONS, A. M. "Do plant trichomes cause more harm than good to predatory insects?". *Pest Manag. Sci.* **70**, 1655–1665, 2014.
66. NURUL AZMINA ABDUL MALIK; KUMAR, I. S.; NADARAJAH, K. "Elicitor and Receptor Molecules : Orchestrators of Plant Defense and Immunity". *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–34, 2020.

67. VIEGA DE ANDRADE, E. K.; RODRIGUES, R.; DA COSTA VIEIRA BARD, G.; DA SILVA PEREIRA, L.; VENTURY BAPTISTA, K. E.; MENEZES CAVALCANTI, T. F.; AMÂNCIO OLIVEIRA, A. E.; MELO SOUZA, T. A.; GOMES, V. M. "Identification, biochemical characterization and biological role of defense proteins from common bean genotypes seeds in response to *Callosobruchus maculatus* infestation". *J. Stored Prod. Res.* **87**, 101580, 2020.
68. HUDAIB, T.; HAYES, W.; EADY, P. E. "Bioactivity of endosperm extracts from susceptible and resistant bean seeds against *Callosobruchus maculatus*". *J. Stored Prod. Res.* **84**, 101518, 2019.
69. SMILANICH, A. M.; FINCHER, R. M.; DYER, L. A. "Does plant apparency matter? Thirty years of data provide limited support but reveal clear patterns of the effects of plant chemistry on herbivores". *New Phytol.* **210**, 1044–1057, 2016.
70. BECERRA, J. X. "Macroevolutionary and geographical intensification of chemical defense in plants driven by insect herbivore selection pressure". *Curr. Opin. Insect Sci.* **8**, 15–21, 2015.
71. MASSAD, T. J.; FINCHER, R. M.; SMILANICH, A. M.; DYER, L. "A quantitative evaluation of major plant defense hypotheses, nature versus nurture, and chemistry versus ants". *Arthropod. Plant. Interact.* **5**, 125–139, 2011.
72. BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; GATEHOUSE, J. A. "Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors". *Physiol. Entomol.* **29**, 278–290, 2004.
73. SILVA, P. L.; LOURENC, A. L.; SILVA, C. R.; MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA, J. A.; ZANUNCIO, J. C.; OLIVEIRA, M. G. A. "Biochemical Responses of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) in Soybean Cultivars Sprayed with the Protease Inhibitor Berenil". *J. Agric. Food Chem.* **61**, 8034–8038, 2013.
74. MOREIRA, L. F.; CAMPOS, W. G.; RIBEIRO, F. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, M. G. A. "Survival and developmental impairment induced by the trypsin inhibitor bis-benzamidine in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*)". *Crop Prot.* **30**, 1285–1290, 2011.
75. FELTON, G. W.; BI, J. L.; SUMMERS, C. B.; MUELLER, A. J.; DUFFEY, S. S. "Potential role of lipoxygenases in defense against insect herbivory". *J. Chem. Ecol.* **20**, 651–666, 1994.

76. GORDY, J. W.; LEONARD, B. R.; BLOUIN, D.; DAVIS, J. A.; STOUT, M. J. "Comparative effectiveness of potential elicitors of plant resistance against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in Four Crop Plants". PLoS One **10**, e0136689, 2015.
77. DILLON, F. M.; TEJEDOR, M. D.; ILINA, N.; MITHÖFER, A.; PAGANO, E. A.; ZAVALA, J. A.; CHLUDIL, H. D. "Solar UV - B radiation and ethylene play a key role in modulating effective defenses against *Anticarsia gemmatalis* larvae in field - grown soybean". Plant. Cell Environ. **41**, 383–394, 2018.
78. DILLON, F. M.; CHLUDIL, H. D.; MITHÖFER, A.; ZAVALA, J. A. "Solar UVB-inducible ethylene alone induced iso flavonoids in pods of field-grown soybean, an important defense against stink bugs". Environ. Exp. Bot. **178**, 104167, 2020.
79. RODRIGUES, D. DE M.; SOUZA, C. R.; AGUIAR, R. W. DE S.; MELO, A. V. DE; CARDOSO, J.; OOTANI, M. A.; PIRES, W. "Tricomas conferem resistência contra herbivoria de *Cerotoma arcuata* em cultivares de soja". Rev. Agroecossistemas **4**, 33–39, 2012.
80. IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. "A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables". Food Chem. **126**, 1821–1835, 2011.
81. DURAZZO, A.; CAIAZZO, E.; LUCARINI, M.; CICALA, C.; IZZO, A. A.; NOVELLINO, E.; SANTINI, A. "Polyphenols : a concise overview on the chemistry , occurrence , and human health". Phyther. Res. **33**, 2221–2243, 2019.
82. KU, Y.; NG, M.; CHENG, S.; LO, A. W.; XIAO, Z.; SHIN, T.; CHUNG, G.; LAM, H. "Understanding the composition, biosynthesis, accumulation and transport of flavonoids in crops for the promotion of crops as healthy sources of flavonoids for human consumption". Nutrients **12**, 1717, 2020.
83. 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". J. Agric. Food Chem. **51**, 5301–5306, 2003.

84. PERLATTI, B.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ARDILA, J. A.; CARNEIRO, R. L.; SOUZA, B. H. S.; COSTA, E. N.; EDUARDO, W. I.; BOIÇA JUNIOR, A. L.; FORIM, M. R. "Application of a quantitative hplc-esi-ms/ms method for flavonoids in different vegetables matrices". *J. Braz. Chem. Soc.* **27**, 475–483, 2015.
85. LUIZ, P.; SILVA, D. A.; CORDEIRO, G.; SILVA, C. R. D. A.; BARROS, R. A.; SILVA, C. R. D. A.; ZANUNCIO, J. C.; CAMPOS, W. G.; OLIVEIRA, M. G. A. "Does mechanical damage on soybean induces the production of flavonoids?". *Ann. Brazilian Acad. Sci.* **90**, 3415–3422, 2018.
86. PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; NEVES DE OLIVEIRA, M. C. "Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*?". *J. Chem. Ecol.* **31**, 1509–1525, 2005.
87. BENTIVENHA, J. P. F.; CANASSA, V. F.; BALDIN, E. L. L.; BORGUINI, M. G.; LIMA, G. P. P.; ANDRÉ L. LOURENÇÃO. "Role of the rutin and genistein flavonoids in soybean resistance to *Piezodorus guildinii* (Hemiptera : Pentatomidae)". *Arthropod. Plant. Interact.* **12**, 311–320, 2018.
88. O'NEILL, B. F.; ZANGERL, A. R.; DERMODY, O.; BILGIN, D. D.; CASTEEL, C. L.; ZAVALA, J. A.; DELUCIA, E. H.; BERENBAUM, M. R. "Impact of elevated levels of atmospheric co2 and herbivory on flavonoids of soybean (*Glycine max* Linnaeus)". *J. Chem. Ecol.* **36**, 35–45, 2010.
89. CHENG, J.; YUAN, C.; GRAHAM, T. L. "Potential defense-related prenylated isoflavones in lactofen-induced soybean". *Phytochemistry* **72**, 875–881, 2011.
90. UEDA, T. E.; GRAÇA, J. P.; SALVADOR, M. C.; GOIS, M. S.; LUSKI, P.; G.; DIAS, B. F.; VENTURA, M. U.; OLIVEIRA, M. C. N. D. H.; - CAMPO, C. B. "Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e indução dos compostos fenólicos da soja". XI Jorn. Acadêmica da Embrapa Soja, 2016.
91. FUGI, C. G. Q.; LOURENÇÃO, A. L.; PARRA, J. R. P. "Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects". *Sci. Agric.* **62**, 31–35, 2005.
92. OLIVEIRA, L. J.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MAZZARIN, R. M. "Aspectos biológicos e nutricionais de *Anticarsia gemmatalis* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae) em diversos genótipos de soja". *An. da Soc. Entomológica do Bras.* **22**, 547–552, 1993.

93. LEE, M. J.; CHUNG, I.-M.; KIM, H.; JUNG, M. Y. "High resolution LC–ESI-TOF-mass spectrometry method for fast separation, identification, and quantification of 12 isoflavones in soybeans and soybean products". *Food Chem.* **176**, 254–262, 2015.
94. REN, Q.; WANG, J.; LIU, S.; WANG, F.; WANG, H. "Identification and determination of isoflavones in germinated black soybean sprouts by UHPLC–Q-TOF-MS mass spectrometry and HPLC-DAD". *Int. J. Food Prop.* **20**, 2877–2887, 2017.
95. PENG, H.; LI, W.; LI, H.; DENG, Z.; ZHANG, B. "Extractable and non-extractable bound phenolic compositions and their antioxidant properties in seed coat and cotyledon of black soybean (*Glycine max* (L. merr)". *J. Funct. Foods* **32**, 296–312, 2017.
96. LEE, Y. H.; KIM, B.; HWANG, S.-R.; KIM, K.; LEE, J. H. "Rapid characterization of metabolites in soybean using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS) and screening for α -glucosidase inhibitory and antioxidant properties through different solvent systems". *J. Food Drug Anal.* **26**, 277–291, 2018.
97. GARCÍA-VILLALBA, R.; LEÓN, C.; DINELLI, G.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; GARCIA-CAÑAS, V.; CIFUENTES, A. "Comparative metabolomic study of transgenic versus conventional soybean using capillary electrophoresis–time-of-flight mass spectrometry". *J. Chromatogr. A* **1195**, 164–173, 2008.
98. GAMPE, N.; DARCSI, A.; LOHNER, S.; BÉNI, S.; KURSINSZKI, L. "Characterization and identification of isoflavonoid glycosides in the root of Spiny restharrow (*Ononis spinosa* L.) by HPLC-QTOF-MS, HPLC–MS/MS and NMR". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **123**, 74–81, 2016.
99. FARAG, M. A.; HUHMANN, D. V.; DIXON, R. A.; SUMNER, L. W. "Metabolomics reveals novel pathways and differential mechanistic and elicitor-specific responses in phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in *Medicago truncatula* cell cultures". *Plant Physiol.* **146**, 323–324, 2008.
100. HARBAUM, B.; HUBBERMANN, E. M.; WOLFF, C.; HERGES, R.; ZHU, Z.; SCHWARZ, K. "Identification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in pak choi varieties (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) by HPLC-ESI-MSⁿ and NMR and their quantification by HPLC-DAD". *J. Agric. Food Chem.* **55**, 8251–8260, 2007.

101. 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 gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)". PLoS One **13**, e0205010, 2018.
102. DU, Q. H.; ZHANG, Q. Y.; HAN, T.; JIANG, Y. P.; PENG, C.; XIN, H. L. "Dynamic changes of flavonoids in *Actinidia valvata* leaves at different growing stages measured by HPLC-MS/MS". Chin. J. Nat. Med. **14**, 66–72, 2016.
103. DILLON, F. M.; CHLUDIL, H. D.; ZAVALA, J. A. "Solar UV-B radiation modulates chemical defenses against *Anticarsia gemmatalis* larvae in leaves of field-grown soybean". Phytochemistry **141**, 27–36, 2017.
104. DE BORTOLI, S. A.; MURATA, A. T.; VACARI, A. M.; DE 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". Comun. Sci. **3**, 192–198, 2012.
105. STAMP, N. "Out of the quagmire of plant defense hypotheses". Q. Rev. Biol. **78**, 23–55, 2003.
106. SAMANTA, A.; DAS, G.; DAS, S. "Roles of flavonoids in plants". Carbon N. Y. **100**, 6, 2011.
107. CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K. M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. "Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology". Plant Physiol. Biochem. **72**, 1–20, 2013.
108. AGATI, G.; BRUNETTI, C.; DI FERDINANDO, M.; FERRINI, F.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. "Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past". Plant Physiol. Biochem. **72**, 35–45, 2013.
109. LI, M.; XU, J.; GUO, R.; LIU, Y.; WANG, S.; WANG, H.; ULLAH, A.; SHI, L. "Identifying the metabolomics and physiological differences among soja in the early flowering stage". Plant Physiol. Biochem. **139**, 82–91, 2019.
110. CIPOLLINI, D.; WALTERS, D.; VOELCKEL, C. "Costs of resistance in plants: from theory to evidence". In Annual Plant Reviews online vol. **47** 263–307 (John Wiley & Sons, Ltd), 2017.

7 – APENDICE

FIGURA A.1 – Cromatogramas de EIC para conjugados de daidzeína nos extratos de folhas dos genótipos **a) P1**, **b) P2**, **c) P3**, **d) P4** e **e) P5**.

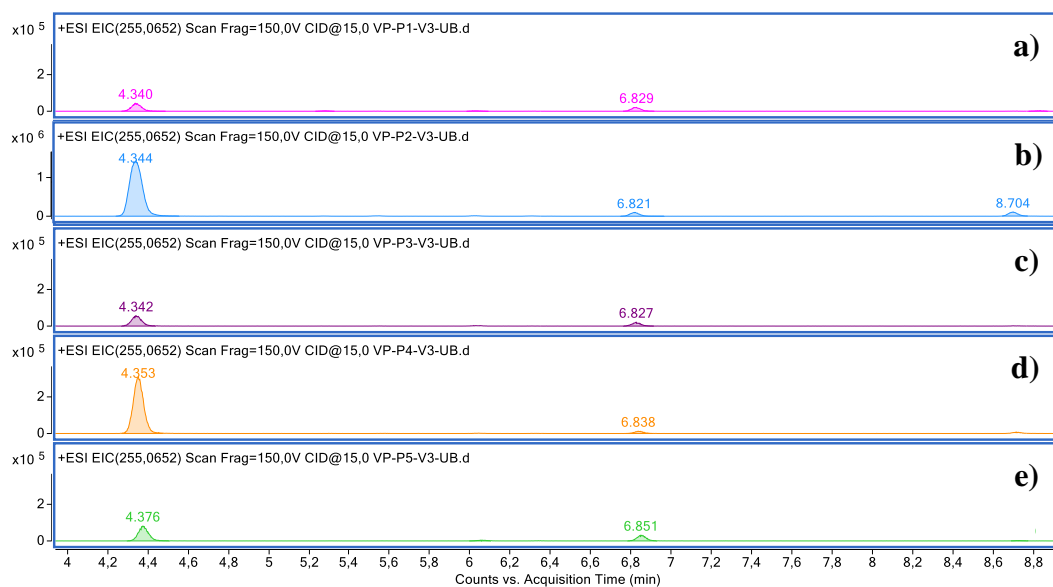


FIGURA A.2 – Espectros de massas para os conjugados de daidzeína **a) Daidzeína-mal-hex** e **b) Daidzeína** detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.

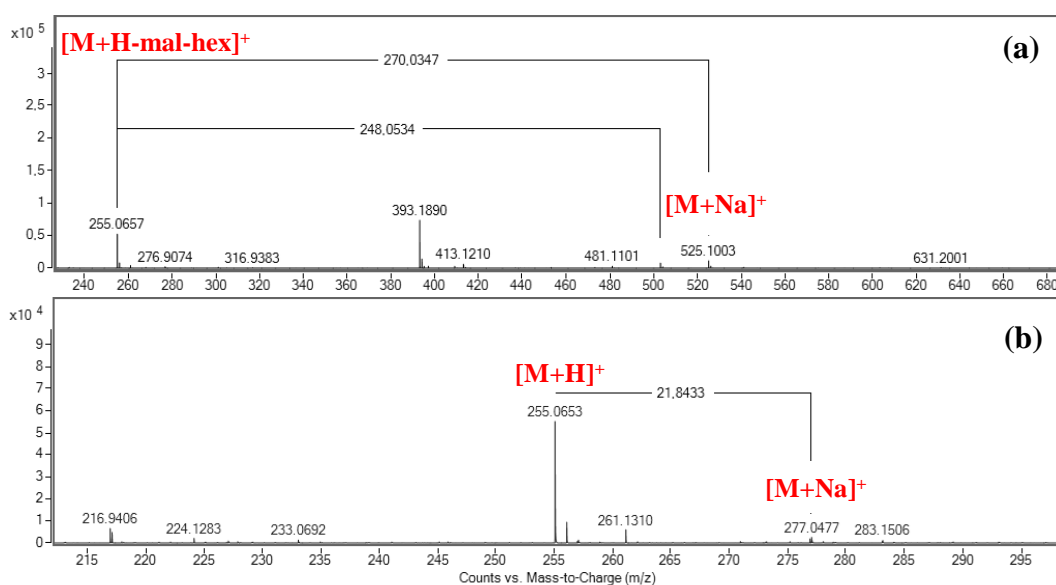


FIGURA A.3 – Cromatogramas de EIC para conjugados de formononetina nos extratos de folhas dos genótipos **a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 e e) P5**.

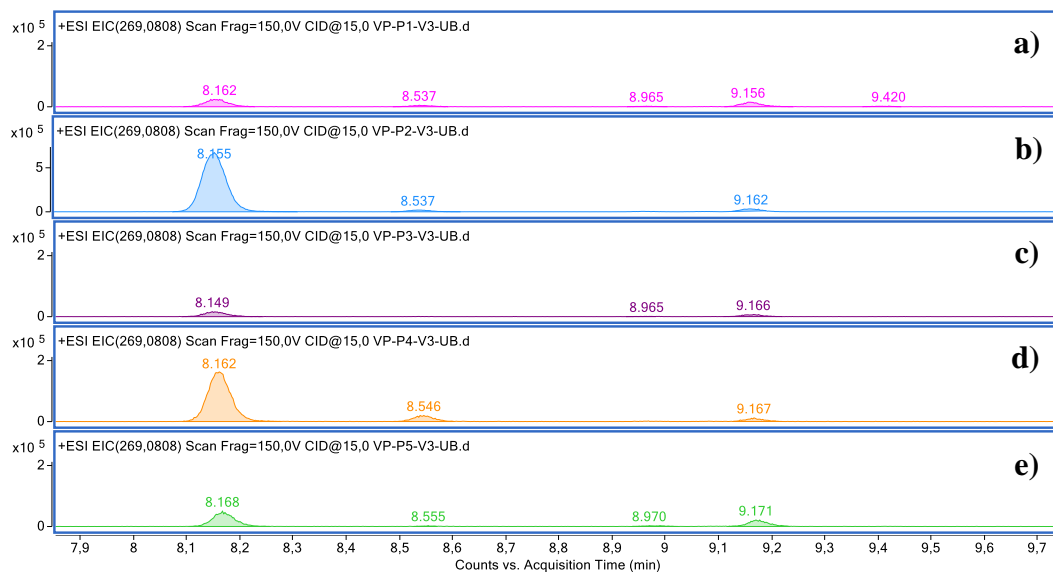


FIGURA A.4 – Espectros de massas para os conjugados de formononetina **a) Formononetina-hex- 1 e b) Formononetina-mal-hex** detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.

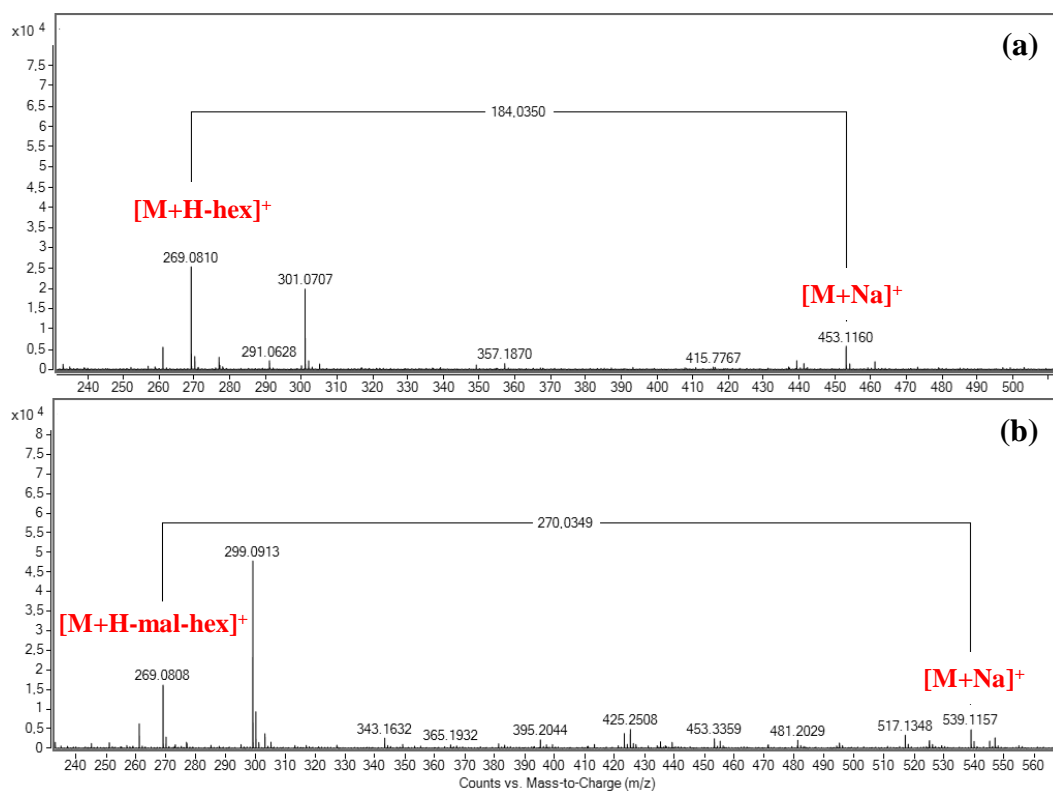


FIGURA A.5 – Cromatogramas de EIC para conjugados de genisteína nos extratos de folhas dos genótipos **a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 e e) P5.**

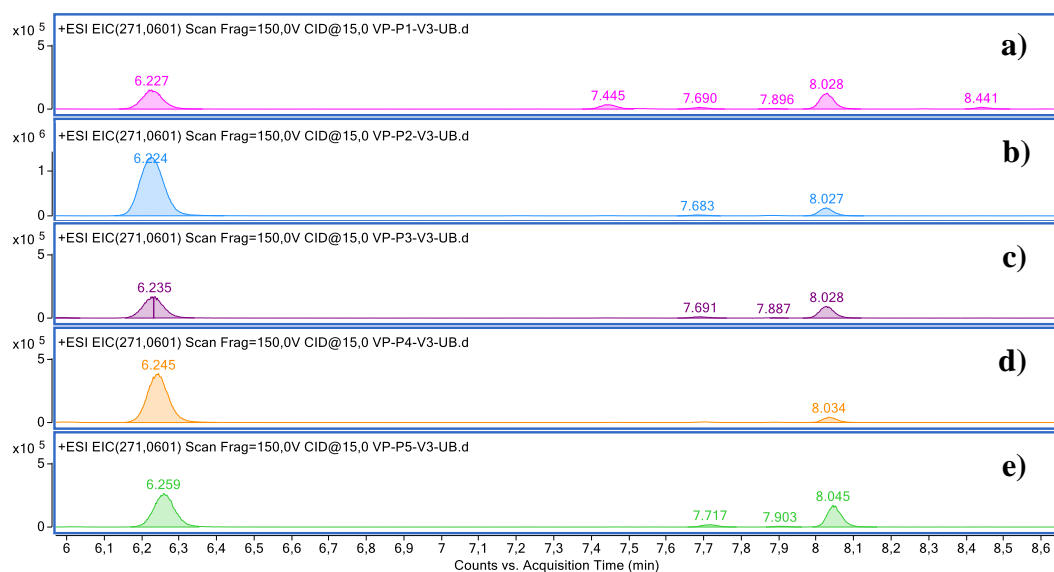


FIGURA A.6 – Espectros de massas para os conjugados de genisteína **a) Genisteína-feruloil-hex e b) Genisteína-mal-hex-2** detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.

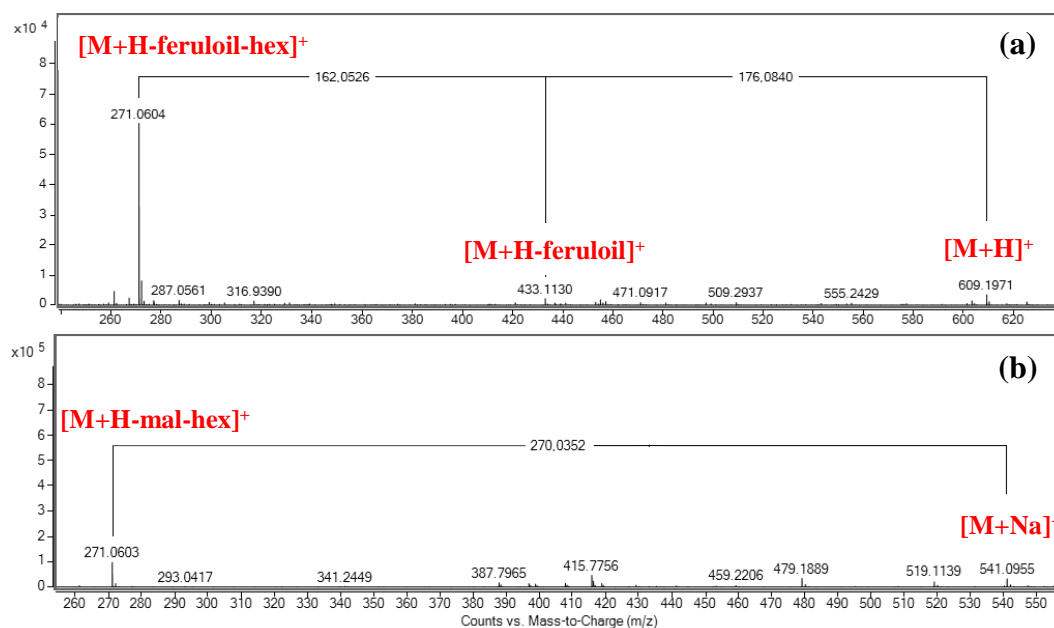


FIGURA A-7 – Cromatogramas de EIC para conjugados de gliciteína nos extratos de folhas dos genótipos a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 e e) P5.

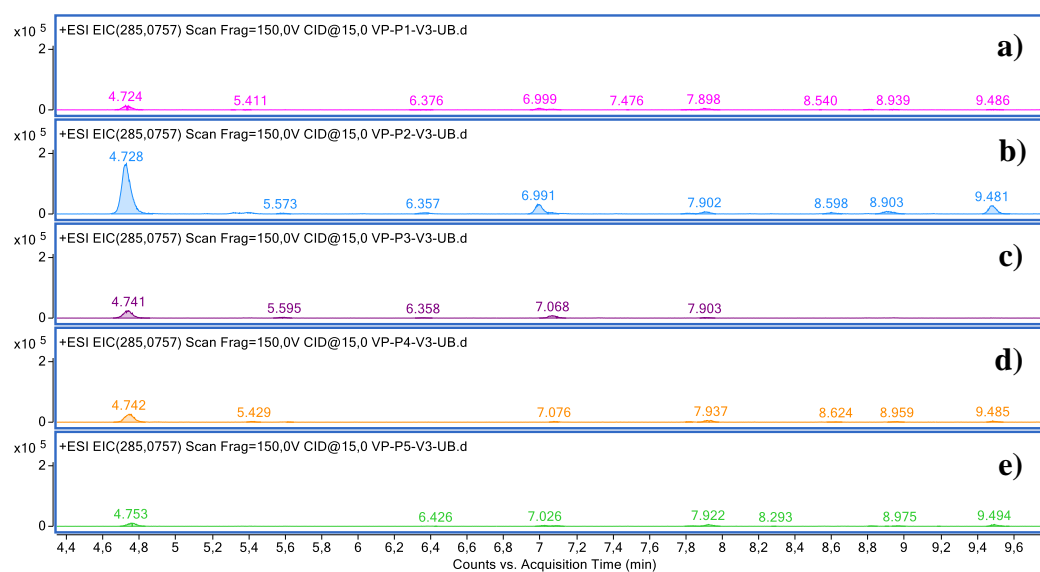


FIGURA A.8 – Espectros de massas para a) Gliciteína-mal-hex, b) Afrormosina-hex-2 e c) Afrormosina-mal-hex-2 detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.

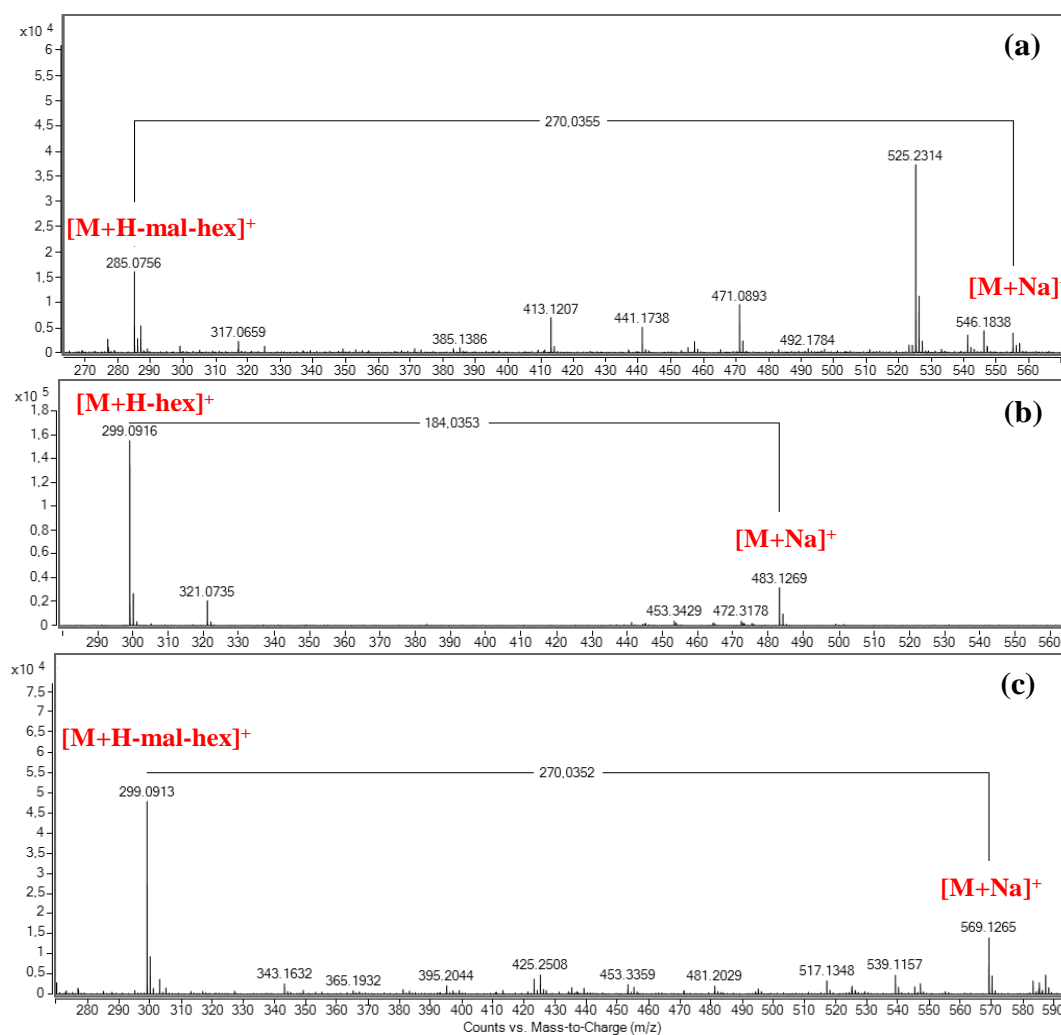


FIGURA A.9 – Cromatogramas de EIC para conjugados de aformosina nos extratos de folhas dos genótipos a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 e e) P5.

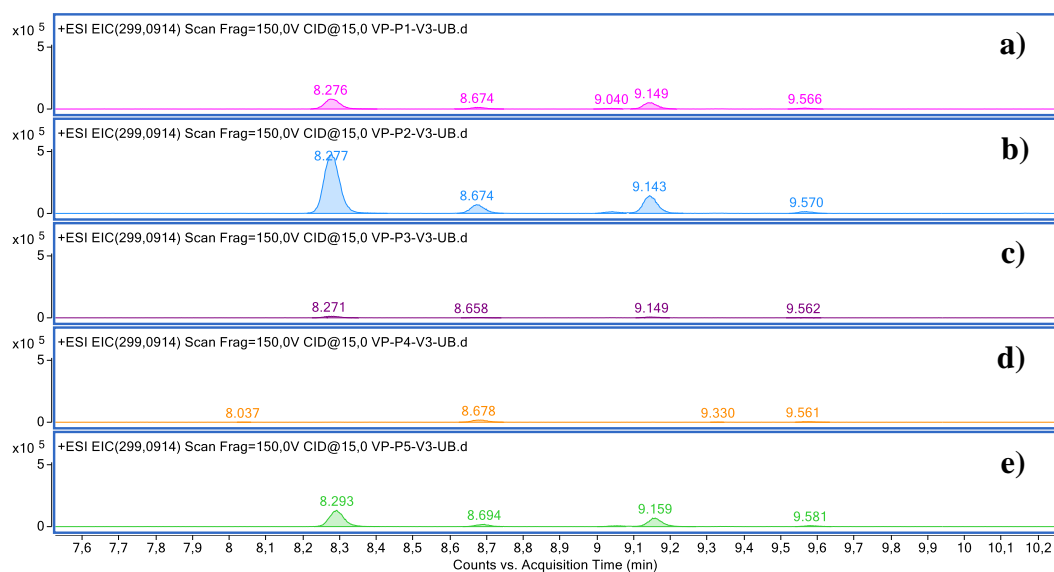


FIGURA A.10 – Cromatogramas de EIC para conjugados de kaempferol nos extratos de folhas dos genótipos a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 e e) P5.

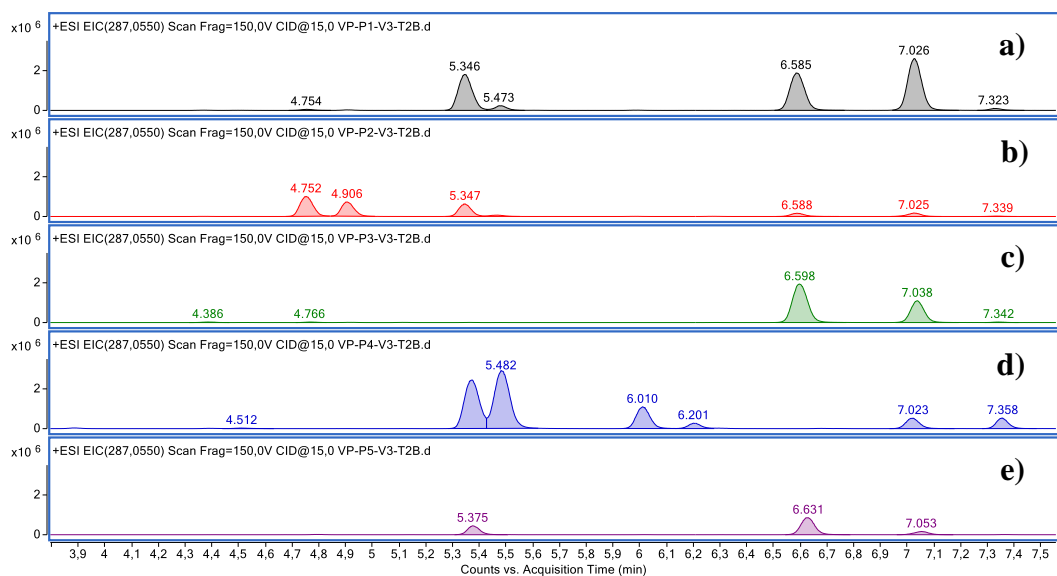


FIGURA A.11 – Espectros de massas para os conjugados de kaempferol **a)** Kaempferol-hex-ram-ram-1 e **b)** Kaempferol-hex-hex-1 detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.

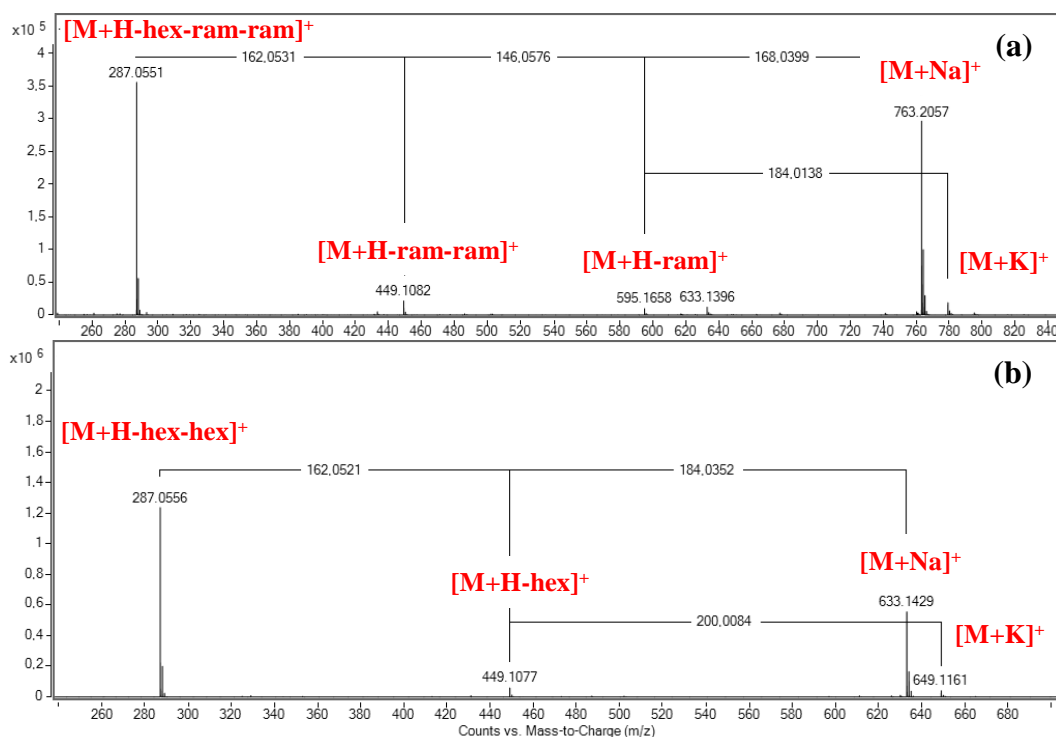


FIGURA A.12 – Cromatogramas de EIC para conjugados de metilkaempferol nos extratos de folhas dos genótipos **a)** P1, **b)** P2, **c)** P3, **d)** P4 e **e)** P5.

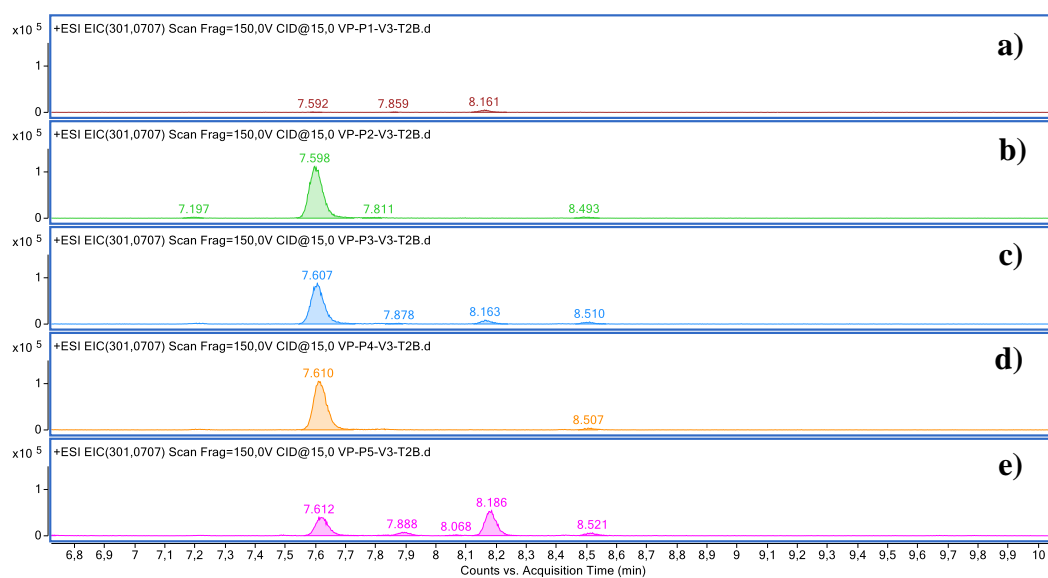


FIGURA A.13 – Espectros de massas para os conjugados de metilkaempferol **a)** Metilkaempferol-hex e **b)** Metilkaempferol-mal-hex-1 detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.

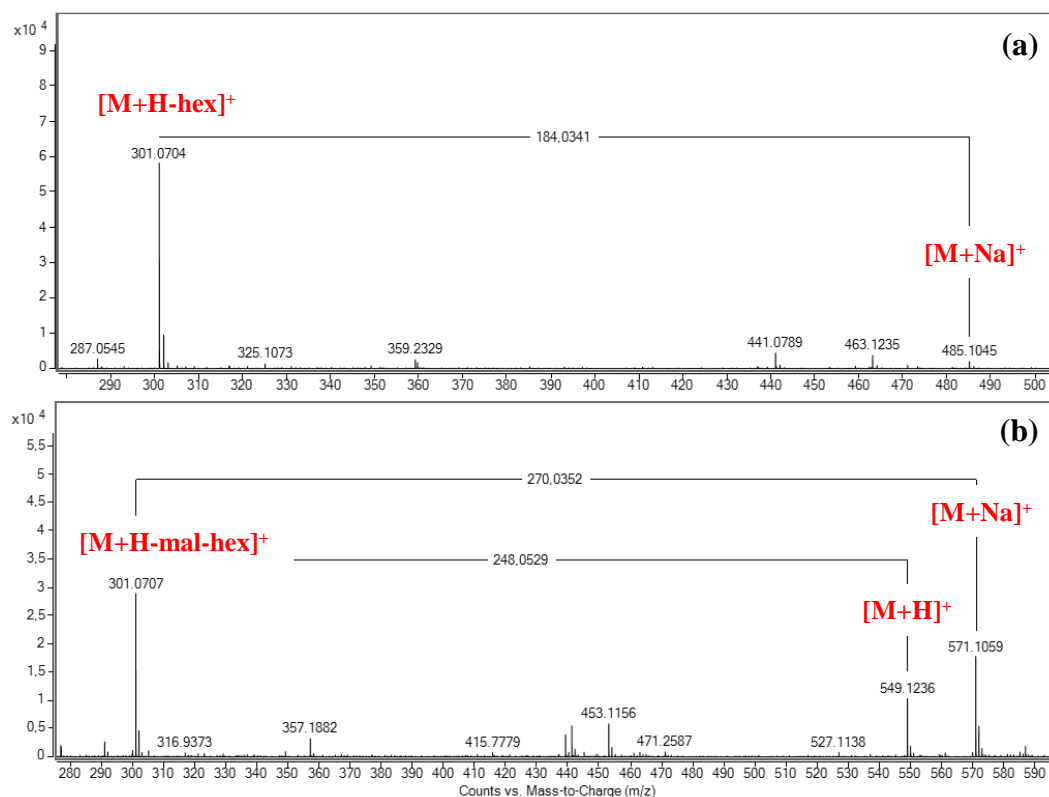


FIGURA A.14 – Cromatogramas de EIC para conjugados de quercetina nos extratos de folhas dos genótipos **a)** P1, **b)** P2, **c)** P3, **d)** P4 e **e)** P5.

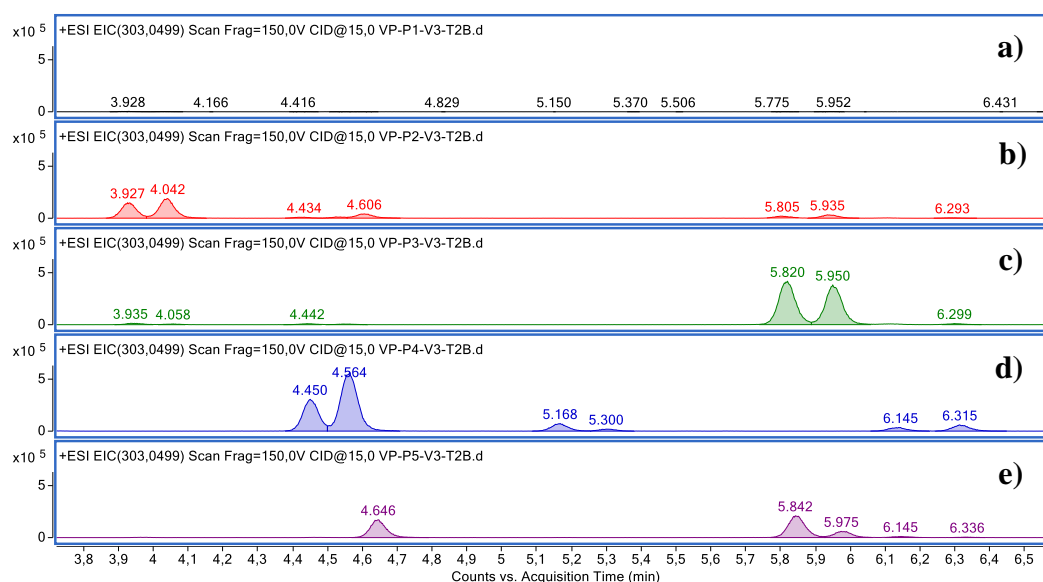


FIGURA A.15 – Espectros de massas para os conjugados de quercetina e isoramnetina a) Quercetina-hex-ram-ram b) Quercetina-hex-hex-1 e c) Isoramnetina-hex-hex-ram detectados nos genótipos P1, P2, P3, P4 e P5.

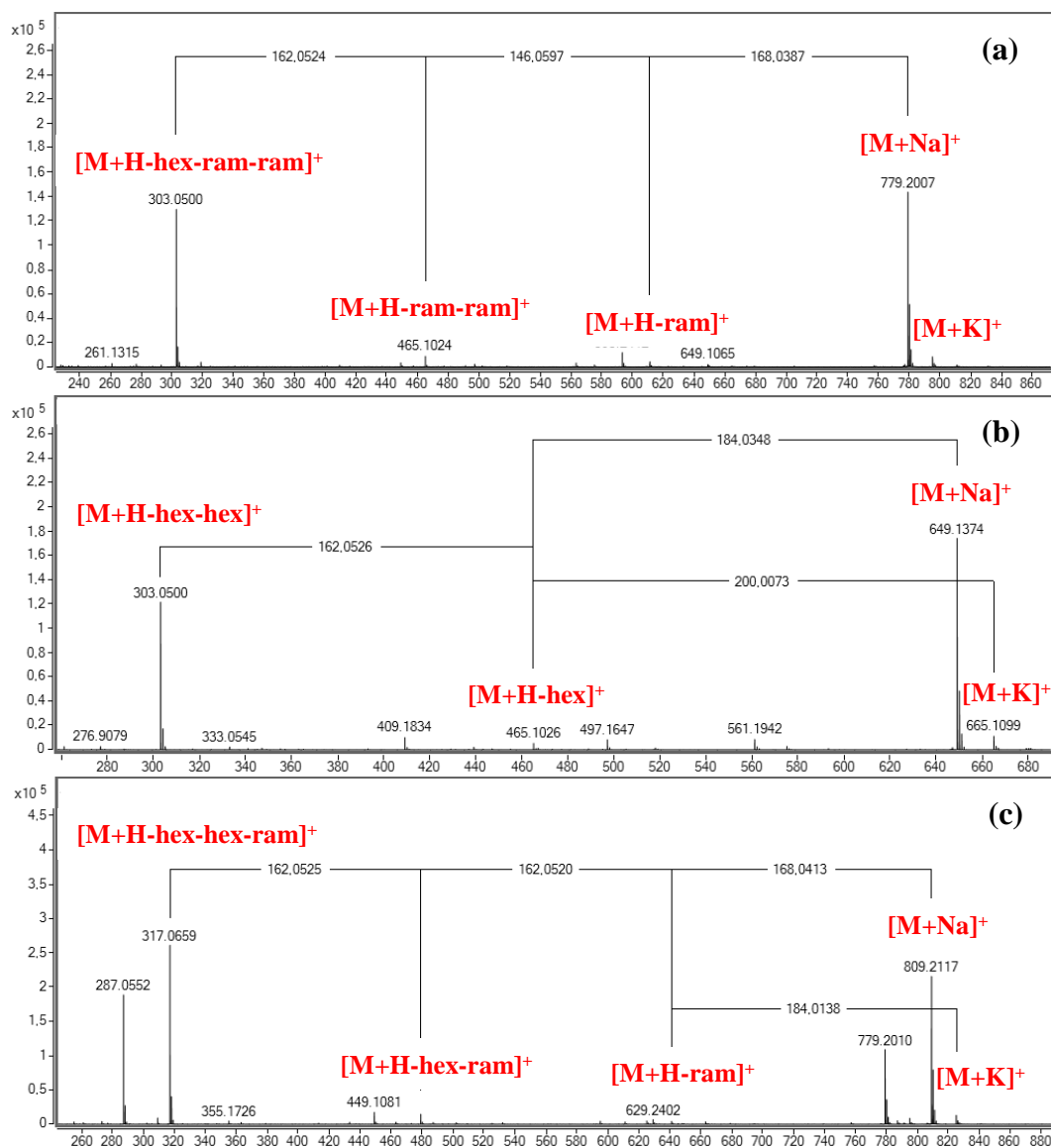


FIGURA A.16 – Cromatogramas de EIC para conjugados de isoramnetina nos extratos de folhas dos genótipos **a) P1, b) P2, c) P3, d) P4 e e) P5.**

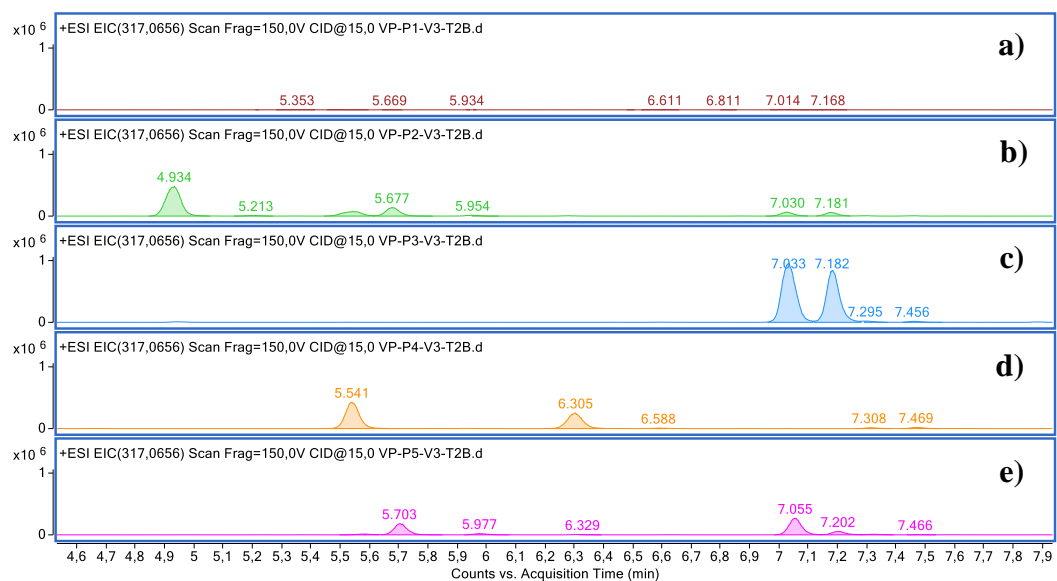


TABELA A.1 – Flavonoides detectados por LC-MS na cultivar BRS 257 (P1).

Abreviação	t _r (min)	Fórmula Molecular	[M+Na] ⁺ Teórico	[M+Na] ⁺ Experimental	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z)	Possíveis compostos
D-hex	4.34	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	439.1000	439.1000	0.000	255.0652	Daidzina
D-mal-hex	6.84	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂	525.1003	525.1002	0.190	255.0653	Malonil daidzina
F-hex-1	8.16	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	453.1156	453.1143	2.869	269.0807	Ononina
F-hex-2	8.54	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	453.1156	453.1152	0.883	269.0806	
F-mal-hex	9.16	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	539.1160	539.1163	-0.556	269.0808	Malonil ononina
G-hex	6.22	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	455.0949	455.0953	-0.879	271.0605	Genistina
G-feruloil- hex	7.44	C ₃₂ H ₃₂ O ₁₂	609.1967	609.1971	-0.657	271.0604 ; 433.1130	Feruloil genistina
G-mal-hex-1	7.69	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	541.0953	541.0949	0.739	271.0600	Malonil genistina
G-mal-hex-2	8.00	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	541.0953	541.0954	-0.185	271.0604 ; 433.1166	
G-mal-hex-3	8.44	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	541.0953	541.0960	-1.294	271.0607	
Gl-hex	4.72	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	469.1105	469.1099	1.279	285.0753	Glicitina
A-hex-1	8.27	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	483.1262	483.1264	-0.414	299.0918	Afrormosina-hexose
A-hex-2	8.67	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	483.1262	483.1273	-2.277	299.0917	
A-mal-hex-2	9.15	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₃	569.1266	569.1265	0.176	299.0915	Malonil afrormosina-hexose
K-hex-hex-ram-2	4.75	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	779.2005	779.2008	-0.385	287.0550 ; 449.1079	Kaempferol-hexose-hexose-ramnose
K-hex-ram-ram-1	5.34	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	763.2056	763.2071	-1.965	287.0556 ; 449.1084 ; 595.1666	Kaempferol-hexose-ramnose-ramnose
K-hex-ram-ram-2	5.48	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	763.2056	763.2064	-1.048	287.0555 ; 449.1072	
K-hex-ram-3	6.60	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	617.1477	617.1487	-1.620	287.0555 ; 449.1086 ; 566.4277	Kaempferol-hexose-ramnose
K-hex-ram-4	7.03	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	617.1477	617.1487	-1.620	287.0557 ; 449.1084	
K-hex-2	7.33	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	471.0898	471.0903	-1.061	287.0549	Kaempferol-hexose

TABELA A.2 – Isoflavonas detectadas por LC-MS na cultivar PI 229358 (P2).

Abreviação	tr (min)	Fórmula Molecular	[M+Na] ⁺ Teórico	[M+Na] ⁺ Experimental	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z)	Possíveis compostos
D-hex	4.34	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	439.1000	439.1004	-0.911	255.0657	Daidzina
D-mal-hex	6.84	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂	525.1003	525.1004	-0.190	255.0651	Malonil daidzina
D	8.70	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	277.0471	277.0461	3.610	255.0655	Daidzeína
F-hex-1	8.16	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	453.1156	453.1156	0.000	269.0811	Ononina
F-hex-2	8.54	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	453.1156	453.1151	1.103	269.0807	
F-mal-hex	9.16	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	539.1160	539.1158	0.371	269.0810	Malonil ononina
G-hex	6.22	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	455.0949	455.0952	-0.659	271.0605	Genistina
G-mal-hex-2	8.00	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	541.0953	541.0955	-0.370	271.0601	Malonil genistina
Gl-hex	4.72	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	469.1105	469.1102	0.640	285.0761	Glicitina
Gl-mal-hex	7.00	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	555.1109	555.1108	0.180	285.0759	Malonil glicitina
A-hex-1	8.27	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	483.1262	483.1261	0.207	299.0913	Afrormosina-hexose
A-hex-2	8.67	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	483.1262	483.1260	0.414	299.0915	
A-mal-hex-1	9.04	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₃	569.1266	569.1270	-0.703	299.0919	Malonil afrormosina-hexose
A-mal-hex-2	9.16	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₃	569.1266	569.1268	-0.351	299.0919	
A-mal-hex-3	9.57	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₃	569.1266	569.1250	2.811	299.0924	

TABELA A.3 – Flavonóis detectados por LC-MS na cultivar PI 229358 (P2).

Abreviação	tr (min)	Fórmula Molecular	[M+Na] ⁺ Teórico	[M+Na] ⁺ Experimental	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z)	Possíveis compostos
K-hex-hex-ram-2	4.75	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	779.2005	779.2012	-0.898	287.0554 ; 449.1083 ; 611.1602	Kaempferol-hexose-hexose-ramnose
K-hex-hex-ram-3	4.90	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	779.2005	779.2011	-0.770	287.0552 ; 449.1080 ; 595.1656	
K-hex-ram-ram-1	5.34	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	763.2056	763.2055	0.131	287.0549 ; 449.1075 ; 595.1659	Kaempferol-hexose-ramnose-ramnose
K-hex-ram-ram-2	5.48	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	763.2056	763.2044	1.572	287.0547 ; 449.1071	
K-hex-hex-1	5.34	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1423	0.474	287.0549 ; 449.1075	Kaempferol-hexose-hexose
K-hex-hex-2	5.46	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1425	0.158	287.0549 ; 449.1071	
K-hex-ram-3	6.60	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	617.1477	617.1477	0.000	287.0550 ; 449.1063	Kaempferol-hexose-ramnose
K-hex-ram-4	7.03	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	617.1477	617.1479	-0.324	287.0551 ; 449.1072	
K-hex-1	7.00	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	471.0898	471.0900	-0.425	287.0547	Kaempferol-hexose
K-hex-2	7.33	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	471.0898	471.0895	0.637	287.0547	
Mk-hex	7.60	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	485.1054	485.1048	1.237	301.0707	Metilkaempferol-hexose
Q-hex-hex-ram-1	3.93	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	795.1954	795.1955	-0.126	303.0499 ; 465.1009 ; 627.1532	Quercetina-hexose-hexose-ramnose
Q-hex-hex-ram-2	4.03	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	795.1954	795.1960	-0.755	303.0502 ; 465.1029 ; 611.1620	
Q-hex-ram-ram	4.60	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	779.2005	779.2015	-1.283	303.0500 ; 465.1047 ; 611,1598	Quercetina hexose-ramnose-ramnose
Q-hex-hex-1	4.43	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	649.1375	649.1377	-0.308	303.0490	Quercetina-hexose-hexose
Q-hex-hex-2	4.54	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	649.1375	649.1375	0.000	303.0490	
Q-hex-ram-3	5.80	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1421	0.790	303.0499	Quercetina-hexose-ramnose
Q-hex-ram-4	5.94	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1420	0.948	303.0498 ; 465.1007	
Q-hex-2	6.30	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	487.0847	487.0857	-2.053	303.0493	Quercetina-hexose
I-hex-hex-ram	4.95	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₁	809.2111	809.2114	-0.371	317.0658 ; 479.1187 ; 641.1688	Isorhamnetina-hexose-hexose-ramnose
I-hex-ram-ram-1	5.54	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	793.2162	793.2154	1.009	317.0657 ; 479.1179 ; 663.1530	
I-hex-ram-ram-2	5.68	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	793.2162	793.2164	-0.252	317.0656 ; 479.1184 ; 625.1765	Isorhamnetina-hexose-ramnose-ramnose
I-hex-ram-ram-3	5.97	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	793.2162	793.2162	0.000	317.0650	
I-hex-hex	5.52	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	663.1532	663.1523	1.357	317.0651 ; 479.1174	Isorhamnetina-hexose-hexose
I-hex-ram-3	7.02	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	647.1583	647.1584	-0.155	317.0656 ; 479.1179	Isorhamnetina-hexose-ramnose
I-hex-ram-4	7.18	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	647.1583	647.1578	0.773	317.0653 ; 479.1165	

TABELA A.4 – Isoflavonas detectadas por LC-MS na cultivar IAC 100 (P3).

Abreviação	tr (min)	Fórmula Molecular	[M+Na] ⁺ Teórico	[M+Na] ⁺ Experimental	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z)	Possíveis compostos
D-hex	4.34	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	439.1000	439.1003	-0.683	255.065	Daidzina
D-mal-hex	6.84	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂	525.1003	525.0994	1.714	255.0647	Malonil daidzina
F-hex-1	8.16	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	453.1156	453.1145	2.428	269.0807	Ononina
F-hex-2	8.54	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	453.1156	453.1163	-1.545	269.0806	
F-mal-hex	9.16	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	539.1160	539.1144	2.968	269.0811	Malonil ononina
G-hex	6.22	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	455.0949	455.0952	-0.659	271.0605	Genistina
G-mal-hex-1	7.69	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	541.0953	541.0959	-1.109	271.0595	Malonil genistina
G-mal-hex-2	8.00	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	541.0953	541.0958	-0.924	271.0605 ; 433.1123	
Gl-hex	4.72	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	469.1105	469.1096	1.919	285.0755	Glicitina
Gl-mal-hex	7.00	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	555.1109	555.1093	2.882	285.0754	Malonil glicitina
A-hex-1	8.27	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	483.1262	483.1264	-0.414	299.0915	Afromosina-hexose
A-hex-2	8.67	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	483.1262	483.1259	0.621	299.0915	
A-mal-hex-2	9.16	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₃	569.1266	569.1263	0.527	299.0913	Malonil afromosina-hexose

TABELA A.5 – Flavonóis detectados por LC-MS na cultivar IAC 100 (P3).

Abreviação	tr (min)	Fórmula Molecular	[M+Na] ⁺ Teórico	[M+Na] ⁺ Experimental	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z)	Possíveis compostos
K-hex-hex-ram-2	4.76	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	779.2005	779.1990	1.925	287.0547	Kaempferol-hexose-hexose-ramnose
K-hex-hex-ram-3	4.90	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	779.2005	779.2006	-0.128	287.0545 ; 449.1085	
K-hex-hex-1	5.34	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1416	1.579	287.0552	Kaempferol-hexose-hexose
K-hex-ram-3	6.59	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	617.1477	617.1480	-0.486	287.0552 ; 449.1069	Kaempferol-hexose-ramnose
K-hex-ram-4	7.03	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	617.1477	617.1474	0.486	287.0550 ; 449.1070	
K-hex-1	7.00	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	471.0898	471.0904	-1.274	287.0554	Kaempferol-hexose
K-hex-2	7.33	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	471.0898	471.0899	-0.212	287.0550	
Mk-hex	7.60	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	485.1054	485.1053	0.206	301.0708	Metilkaempferol-hexose
Q-hex-hex-ram-1	3.93	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	795.1954	795.1945	1.132	303.0501 ; 465.1009	Quercetina-hexose-hexose-ramnose
Q-hex-hex-ram-2	4.03	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	795.1954	795.1935	2.389	303.0501	
Q-hex-hex-1	4.44	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	649.1375	649.1374	0.154	303.0500	Quercetina-hexose-hexose
Q-hex-hex-2	4.54	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	649.1375	649.1381	-0.924	303.0498	
Q-hex-ram-3	5.80	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1429	-0.474	303.0502 ; 465.1025	Quercetina-hexose-ramnose
Q-hex-ram-4	5.94	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1431	-0.790	303.0499 ; 465.1020	
Q-hex-1	6.13	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	487.0847	487.0847	0.000	303.0501	Quercetina-hexose
Q-hex-2	6.30	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	487.0847	487.0854	-1.437	303.0499	
I-hex-hex-ram	4.95	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₁	809.2111	809.2103	0.989	317.0651 ; 663.1896	Isorhamnetina-hexose-hexose-ramnose
I-hex-ram-3	7.02	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	647.1583	647.1579	0.618	317.0655 ; 479.1189	Isorhamnetina-hexose-ramnose
I-hex-ram-4	7.18	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	647.1583	647.1589	-0.927	317.0659 ; 479.1174	
I-hex-1	7.30	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	501.1003	501.0999	0.798	317.0654	Isorhamnetina-hexose
I-hex-2	7.46	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	501.1003	501.1003	0.000	317.0654	

TABELA A.6 – Isoflavonas detectadas por LC-MS na cultivar IACPL - 1 (P4).

Abreviação	tr (min)	Fórmula Molecular	[M+Na] ⁺ Teórico	[M+Na] ⁺ Experimental	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z)	Possíveis compostos
D-hex	4.34	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	439.1000	439.1000	0.000	255.0653	Daidzina
D-mal-hex	6.84	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂	525.1003	525.1006	-0.571	255.0645	Malonil daidzina
F-hex-1	8.16	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	453.1156	453.1159	-0.662	269.0809	Ononina
F-hex-2	8.54	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	453.1156	453.1158	-0.441	269.0814	
F-mal-hex	9.16	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	539.1160	539.1172	-2.226	269.0804	Malonil ononina
G-hex	6.22	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	455.0949	455.0946	0.659	271.0602	Genistina
G-mal-hex-2	8.00	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	541.0953	541.0937	2.957	271.0599	Malonil genistina
Gl-hex	4.72	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	469.1105	469.1104	0.213	285.0752	Glicitina
A-hex-2	8.67	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	483.1262	483.1265	-0.621	299.0908	Afromosina-hexose

TABELA A.7 – Flavonóis detectados por LC-MS na cultivar IACPL - 1 (P4).

Abreviação	tr (min)	Fórmula Molecular	[M+Na] ⁺ Teórico	[M+Na] ⁺ Experimental	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z)	Possíveis compostos
K-hex-hex-hex	3.90	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	795.1954	795.1955	-0.126	287,0551 ; 449,1067 ; 611,1606	Kaempferol-hexose-hexose-hexose
K-hex-hex-ram-1	4.51	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	779.2005	779.2010	-0.642	287.0549	Kaempferol-hexose-hexose-ramnose
K-hex-hex-1	5.36	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1429	-0.474	287.0552 ; 449.1073	Kaempferol-hexose-hexose
K-hex-hex-2	5.48	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1426	0.000	287.0551 ; 449.1070	
K-hex-ram-1	6.00	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	617.1477	617.1477	0.000	287.0549 ; 449.1987	Kaempferol-hexose-ramnose
K-hex-ram-2	6.20	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	617.1477	617.1478	-0.162	287.0550 ; 455.0946	
K-hex-1	7.02	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	471.0898	471.0899	-0.212	287.0551	Kaempferol-hexose
K-hex-2	7.35	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	471.0898	471.0901	-0.637	287.0551	
Mk-hex	7.61	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	485.1054	485.1049	1.031	301.0706	Metilkaempferol-hexose
Mk-mal-hex-1	8.17	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₄	571.1058	571.1058	0.000	301.0708	Malonil metilkaempferol-hexose
Q-hex-ram-ram	4.50	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	779.2005	779.2002	0.385	303,0500 ; 465,1050	Quercetina-hexose-ramnose-ramnose
Q-hex-hex-1	4.44	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	649.1375	649.1373	0.308	303.0499 ; 465.1027	Quercetina-hexose-hexose
Q-hex-hex-2	4.55	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	649.1375	649.1374	0.154	303.0501 ; 465.1021	
Q-hex-ram-1	5.16	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1422	0.632	303.0496 ; 465.1039	Quercetina-hexose-ramnose
Q-hex-ram-2	5.30	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1425	0.158	303.0497	
Q-hex-1	6.13	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	487.0847	487.0848	-0.205	303.0501	Quercetina-hexose
Q-hex-2	6.30	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	487.0847	487.0848	-0.205	303.05	
I-hex-hex	5.54	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	663.1532	663.1535	-0.452	317.0657 ; 479.1182	Isorhamnetina-hexose-hexose
I-hex-ram-1	6.30	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	647.1583	647.1591	-1.236	317.0660 ; 479.1189	Isorhamnetina-hexose-ramnose
I-hex-ram-2	6.60	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	647.1583	647.1593	-1.545	317.0648 ; 463.1220	
I-hex-1	7.31	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	501.1003	501.1001	0.399	317.0652	Isorhamnetina-hexose
I-hex-2	7.47	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	501.1003	501.1003	0.000	317.0652	

TABELA A.8 – Isoflavonas detectadas por LC-MS na soja selvagem PI 407270 (P5).

Abreviação	tr (min)	Fórmula Molecular	[M+Na] ⁺ Teórico	[M+Na] ⁺ Experimental	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z)	Possíveis compostos
D-hex	4.34	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	439.1000	439.1004	-0.911	255.0653	Daidzina
D-mal-hex	6.84	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂	525.1003	525.1002	0.190	255.0652	Malonil daidzina
F-hex-1	8.16	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	453.1156	453.1156	0.000	269.0809	Ononina
F-mal-hex	9.16	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	539.1160	539.1168	-1.484	269.0811	Malonil ononina
G-hex	6.22	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	455.0949	455.0949	0.000	271.0603	Genistina
G-mal-hex-1	7.71	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	541.0953	541.0941	2.218	271.0605	Malonil genistina
G-mal-hex-2	8.00	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	541.0953	541.0951	0.370	271.0604	
Gl-hex	4.72	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	469.1105	469.1106	-0.213	285.0754	Glicitina
A-hex-1	8.27	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	483.1262	483.1263	-0.207	299.092	Afrormosina-hexose
A-hex-2	8.67	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	483.1262	483.1256	1.242	299.0915	
A-mal-hex-1	9.04	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₃	569.1266	569.1270	-0.703	299.092	Malonil afrormosina-hexose
A-mal-hex-2	9.16	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₃	569.1266	569.1266	0.000	299.0916	
A-mal-hex-3	9.57	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₃	569.1266	569.1253	2.284	299.092	

TABELA A.9 – Flavonóis detectados por LC-MS na soja selvagem PI 407270 (P5).

Abreviação	tr (min)	Fórmula Molecular	[M+Na] ⁺ Teórico	[M+Na] ⁺ Experimental	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z)	Possíveis compostos
K-hex-hex-ram-2	4.79	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	779.2005	779.2001	0.513	287.0547	Kaempferol-hexose-hexose-ramnose
K-hex-ram-ram-1	5.37	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	763.2056	763.2056	0.000	287.0550 ; 449.1076	Kaempferol-hexose-ramnose-ramnose
K-hex-hex-1	5.40	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1431	-0.790	287,0556 ; 449,1084	Kaempferol-hexose-hexose
K-hex-ram-3	6.60	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	617.1477	617.1483	-0.972	287.0554 ; 449.1085	Kaempferol-hexose-ramnose
K-hex-ram-4	7.03	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	617.1477	617.1473	0.648	287.0546 ; 449.1079	
K-hex-1	7.04	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	471.0898	471.0900	-0.425	287.055	Kaempferol-hexose
K-hex-2	7.36	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	471.0898	471.0900	-0.425	287.0554	
Mk-hex	6.60	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	485.1054	485.1058	-0.825	301.0703	Metilkaempferol-hexose
Mk-mal-hex-1	8.17	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₄	571.1058	571.1057	0.175	301.0708 ; 463.1224	Malonil metilkaempferol-hexose
Mk-mal-hex-2	8.52	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₄	571.1058	571.1046	2.101	301.0709	
Q-hex-hex-ram-1	3.96	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	795.1954	795.1958	-0.503	303.0497	Quercetina-hexose-hexose-ramnose
Q-hex-ram-ram	4.63	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	779.2005	779.2012	-0.898	303.0502 ; 465.1030 ; 611.2512	Quercetina-hexose-ramnose-ramnose
Q-hex-hex-1	4.44	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	649.1375	649.1352	3.543	303.0494	Quercetina-hexose-hexose
Q-hex-ram-3	5.84	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1425	0.158	303.0500 ; 465.1007	Quercetina-hexose-ramnose
Q-hex-ram-4	5.96	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	633.1426	633.1430	-0.632	303.0500 ; 465.1022	
Q-hex-1	6.13	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	487.0847	487.0842	1.027	303.0494	Quercetina-hexose
Q-hex-2	6.30	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	487.0847	487.0835	2.464	303.0499	
I-hex-ram-ram-2	5.70	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	793.2162	793.2167	-0.630	317.0658 ; 479.1191 ; 625.1767	Isorhamnetina-hexose-ramnose-ramnose
I-hex-ram-ram-3	5.97	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	793.2162	793.2152	1.261	317,0651 ; 479.1189	
I-hex-ram-1	6.32	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	647.1583	647.1585	-0.309	3,170,655	Isorhamnetina-hexose-ramnose
I-hex-ram-3	7.04	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	647.1583	647.1583	0.000	317.0657 ; 479.1173	
I-hex-ram-4	7.20	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	647.1583	647.1578	0.773	317.0657 ; 479.1177	
I-hex-1	7.32	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	501.1003	501.1003	0.000	317.0661	
I-hex-2	7.48	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	501.1003	501.0998	0.998	317.065	Isorhamnetina-hexose

FIGURA A.17 – Abundâncias relativas de flavonoides (Área. $\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) nas folhas da cultivar BRS 257 (P1) no estágio de desenvolvimento V3. As abundancias relativas foram calculadas como a somatória dos conjugados identificados para cada tipo de flavonoide. As letras no eixo x se referem às distintos tecidos estudados: U, folha velha; T1, folha intermedia; T2, folha jovem. As diferencias significativas entre cada tecido se indicam com letras diferentes e são derivadas do teste de Tukey com 95% de confiabilidade ($P < 0.05$).

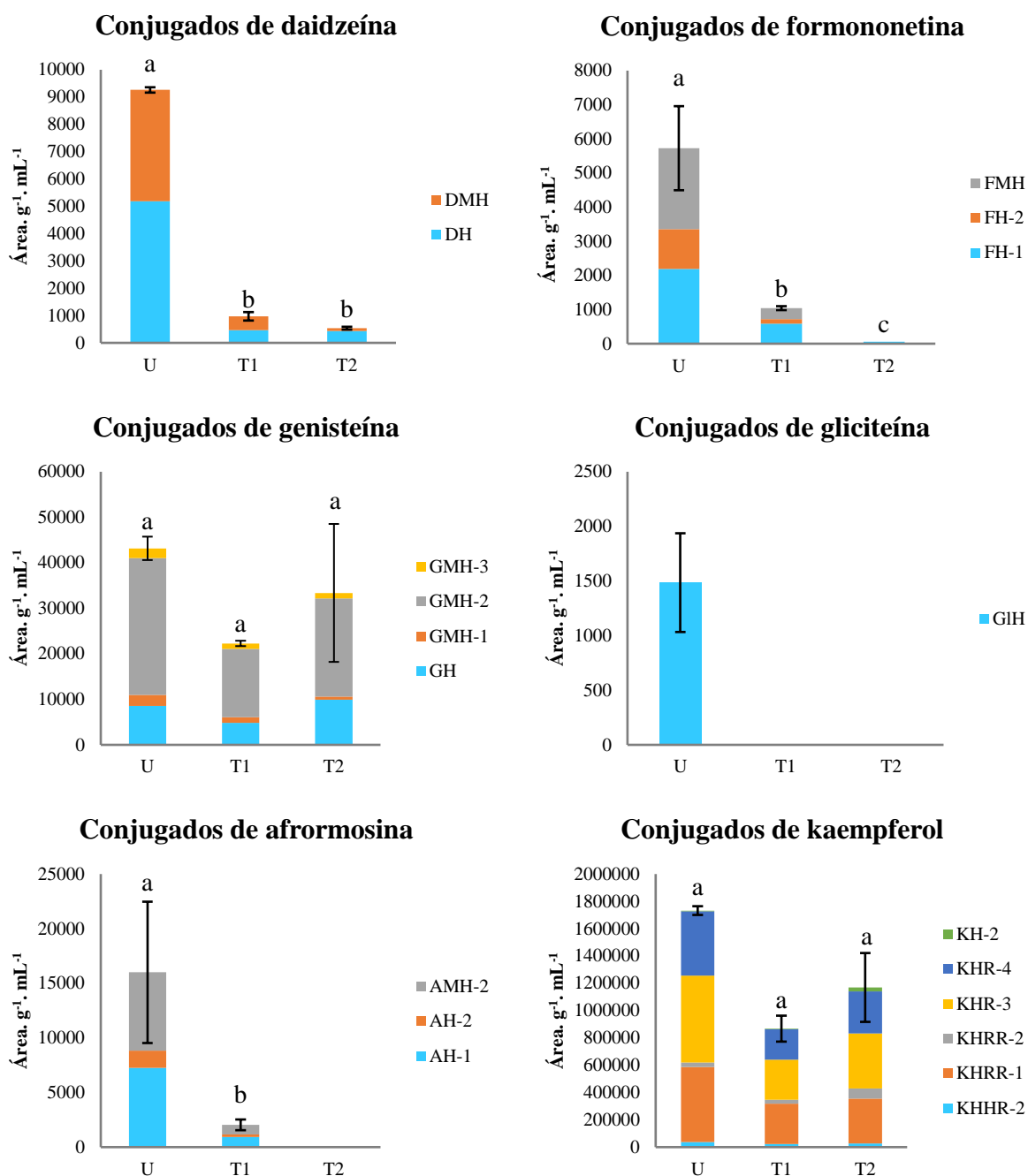


FIGURA A.18 – Abundâncias relativas de isoflavonas (Área. $\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) nas folhas da cultivar PI229358 (P2) no estágio de desenvolvimento V3. As abundancias relativas foram calculadas como a somatória dos conjugados identificados para cada tipo de flavonoide. As letras no eixo x se referem às distintos tecidos estudados: U, folha velha; T1, folha intermedia; T2, folha jovem. As diferencias significativas entre cada tecido se indicam com letras diferentes e são derivadas do teste de Tukey com 95% de confiabilidade ($P < 0.05$).

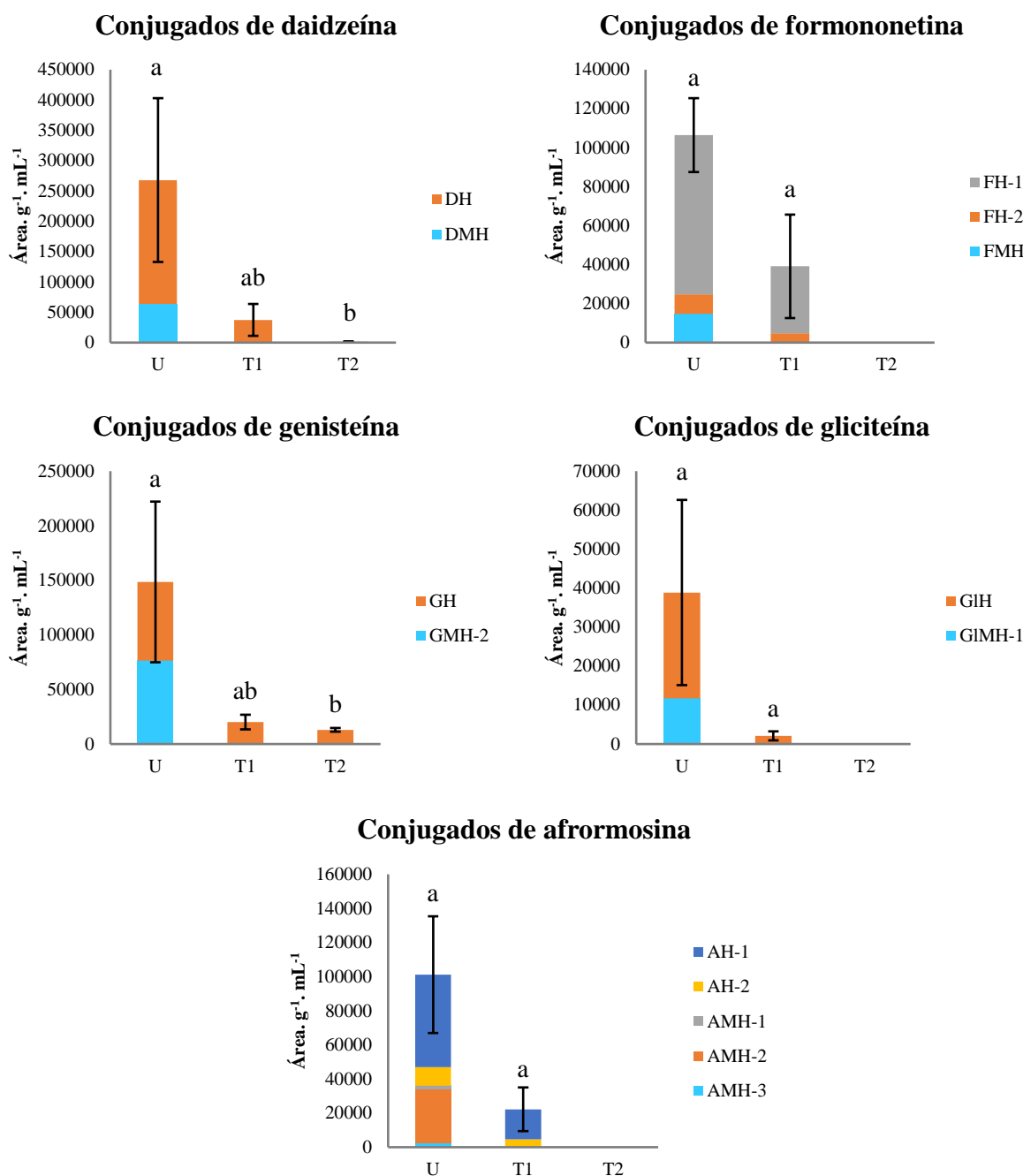


FIGURA A.19 – Abundâncias relativas de flavonóis (Área. $\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) nas folhas da cultivar PI229358 (P2) no estágio de desenvolvimento V3. As abundancias relativas foram calculadas como a somatória dos conjugados identificados para cada tipo de flavonoide. As letras no eixo x se referem ás distintos tecidos estudados: U, folha velha; T1, folha intermedia; T2, folha jovem. As diferencias significativas entre cada tecido se indicam com letras diferentes e são derivadas do teste de Tukey com 95% de confiabilidade ($P < 0.05$).

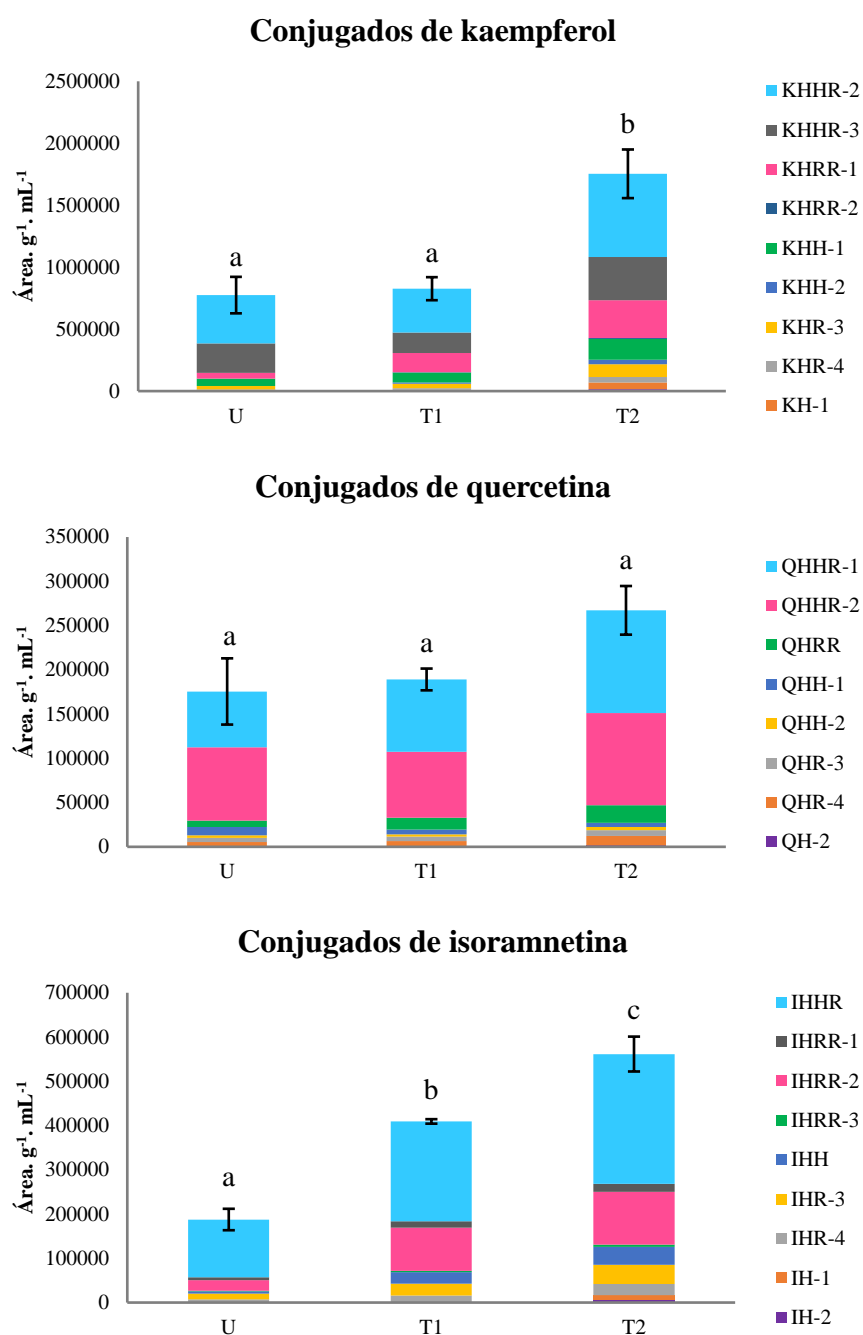


FIGURA A.20 – Abundâncias relativas de isoflavonas (Área. $\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) nas folhas da cultivar IAC100 (P3) no estágio de desenvolvimento V3. As abundancias relativas foram calculadas como a somatória dos conjugados identificados para cada tipo de flavonoide. As letras no eixo x se referem às distintos tecidos estudados: U, folha velha; T1, folha intermedia; T2, folha jovem. As diferencias significativas entre cada tecido se indicam com letras diferentes e são derivadas do teste de Tukey com 95% de confiabilidade ($P < 0.05$).

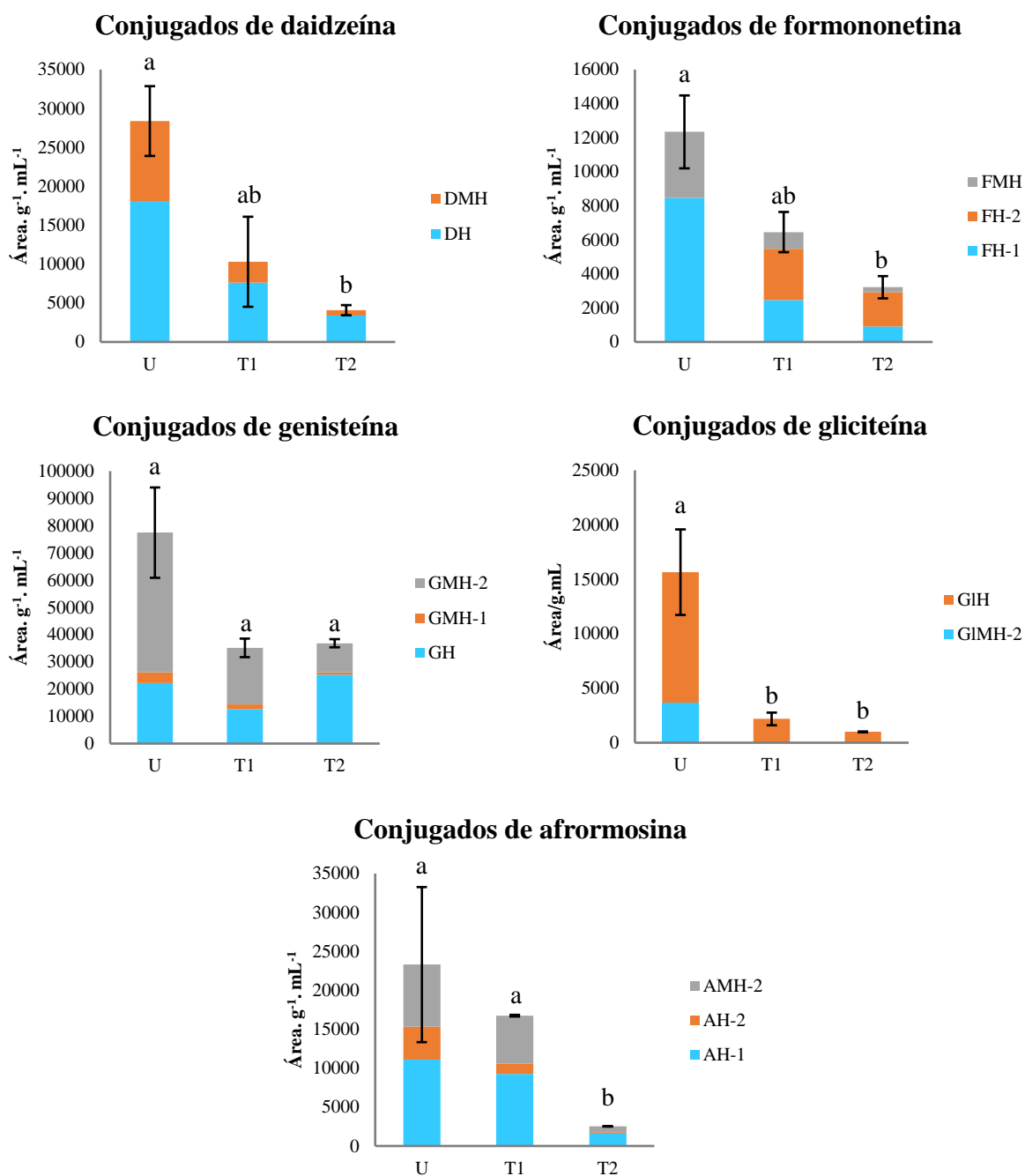


FIGURA A.21 – Abundâncias relativas de flavonóis (Área. $\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) nas folhas da cultivar IAC100 (P3) no estágio de desenvolvimento V3. As abundancias relativas foram calculadas como a somatória dos conjugados identificados para cada tipo de flavonoide. As letras no eixo x se referem às distintos tecidos estudados: U, folha velha; T1, folha intermedia; T2, folha jovem. As diferencias significativas entre cada tecido se indicam com letras diferentes e são derivadas do teste de Tukey com 95% de confiabilidade ($P < 0.05$).

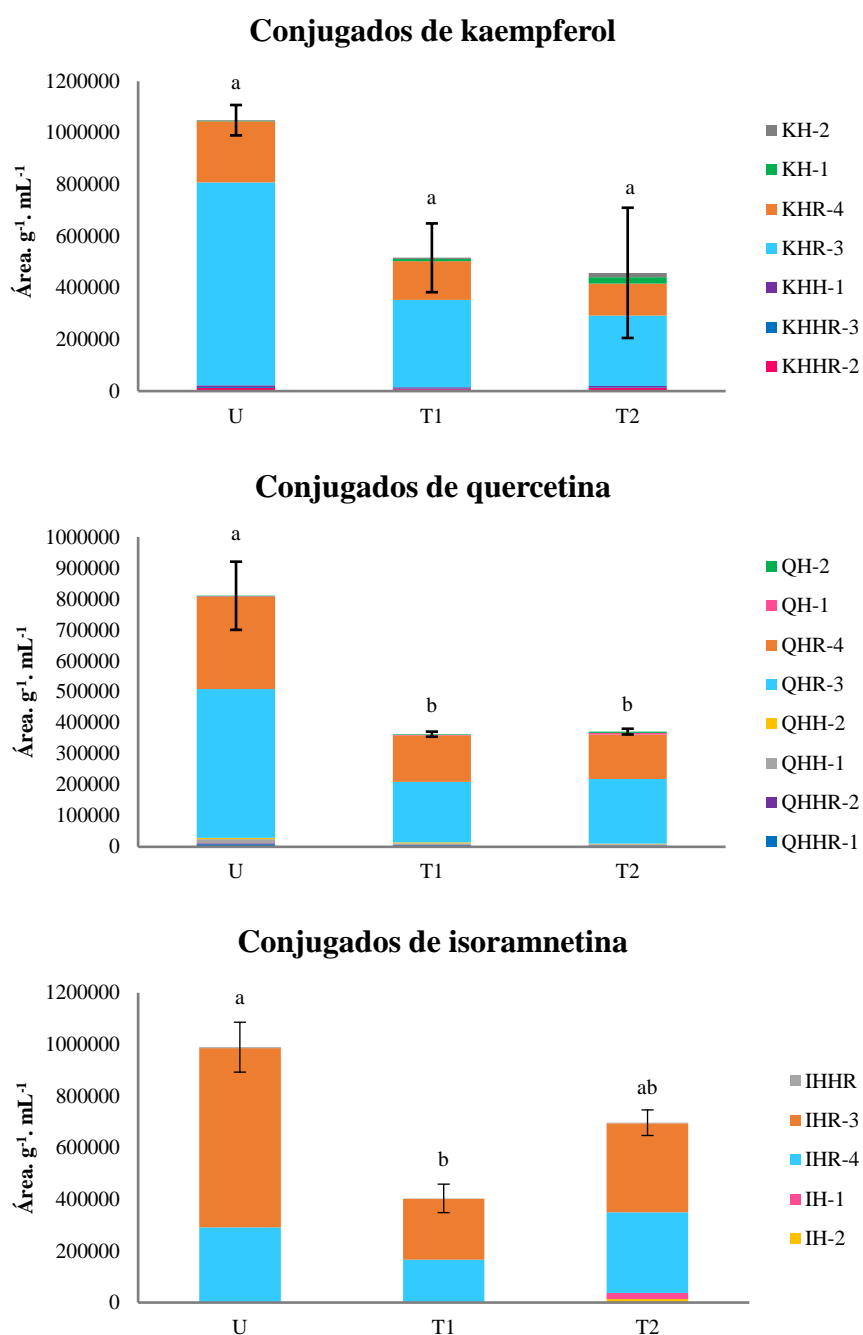


FIGURA A.22 – Abundâncias relativas de isoflavonas (Área. $\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) nas folhas da cultivar IACPL-1 (P4) no estágio de desenvolvimento V3. As abundancias relativas foram calculadas como a somatória dos conjugados identificados para cada tipo de flavonoide. As letras no eixo x se referem às distintos tecidos estudados: U, folha velha; T1, folha intermedia; T2, folha jovem. As diferencias significativas entre cada tecido se indicam com letras diferentes e são derivadas do teste de Tukey com 95% de confiabilidade ($P < 0.05$).

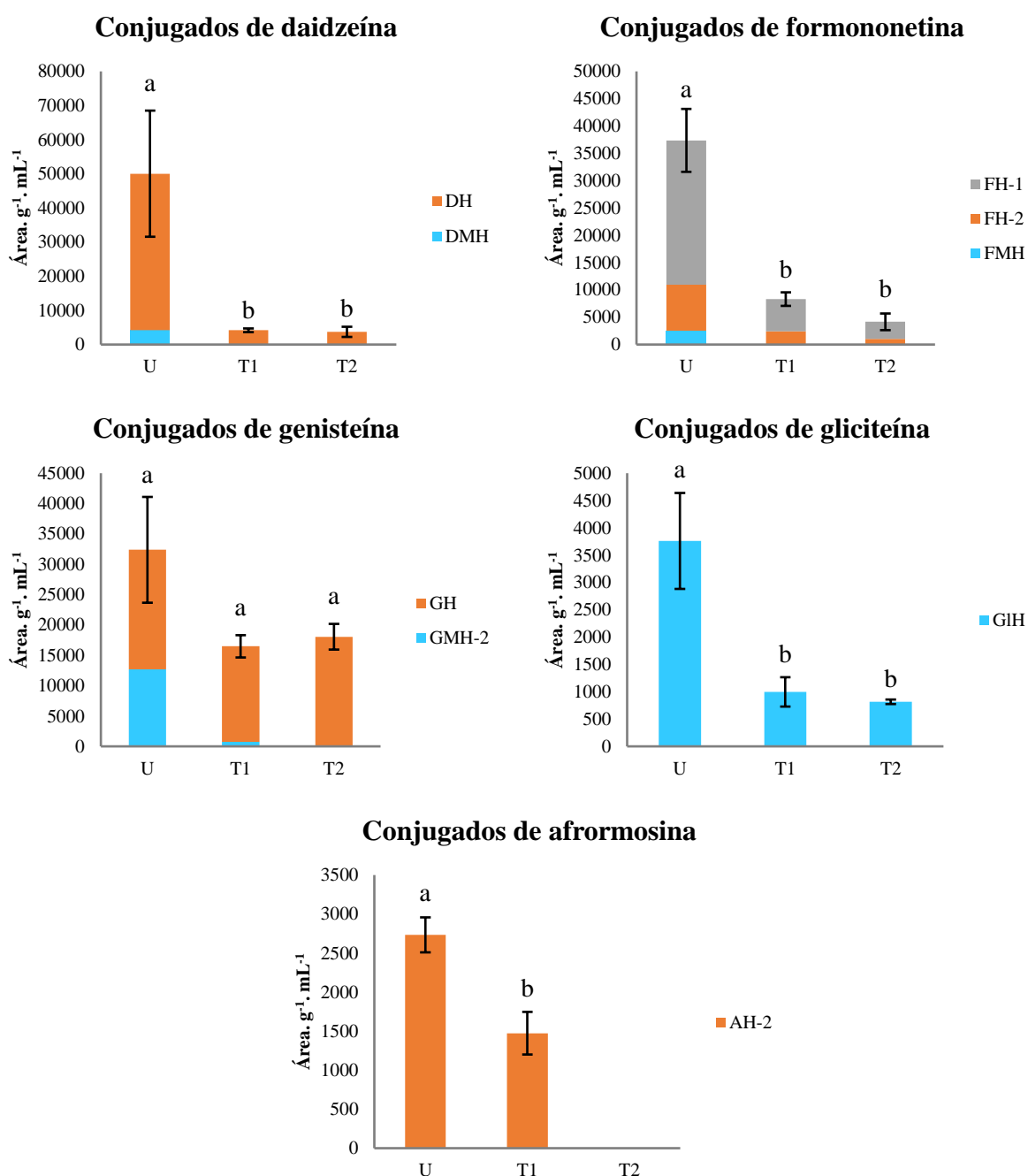


FIGURA A.23 – Abundâncias relativas de flavonóis (Área. $\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) nas folhas da cultivar IACPL-1 (P4) no estágio de desenvolvimento V3. As abundancias relativas foram calculadas como a somatória dos conjugados identificados para cada tipo de flavonoide. As letras no eixo x se referem às distintos tecidos estudados: U, folha velha; T1, folha intermedia; T2, folha jovem. As diferencias significativas entre cada tecido se indicam com letras diferentes e são derivadas do teste de Tukey com 95% de confiabilidade ($P < 0.05$).

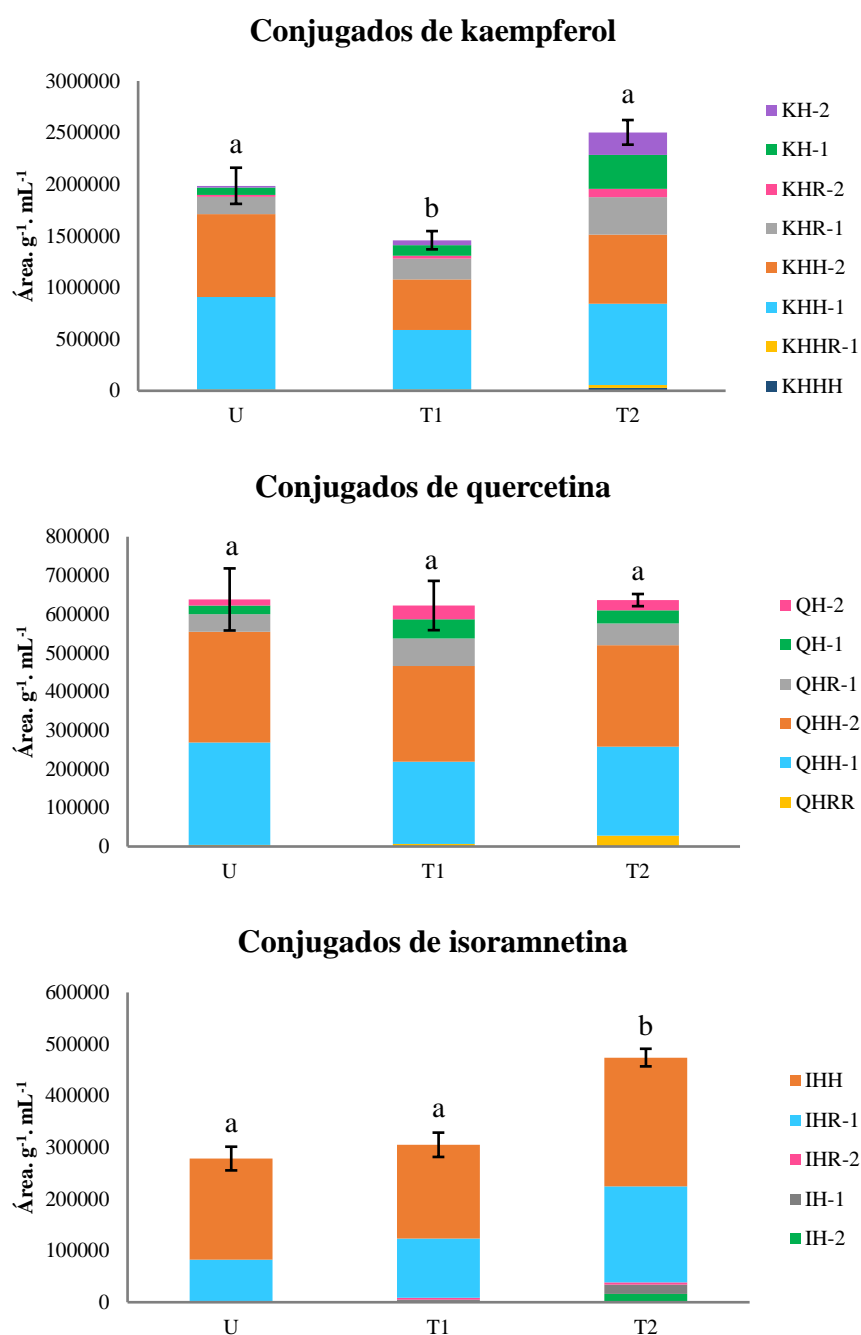


FIGURA A.24 – Abundâncias relativas de isoflavonas (Área. $\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) nas folhas de soja selvagem PI407270 (P5) no estágio de desenvolvimento V3. As abundancias relativas foram calculadas como a somatória dos conjugados identificados para cada tipo de flavonoide. As letras no eixo x se referem às distintos tecidos estudados: U, folha velha; T1, folha intermedia; T2, folha jovem. As diferencias significativas entre cada tecido se indicam com letras diferentes e são derivadas do teste de Tukey com 95% de confiabilidade ($P < 0.05$).

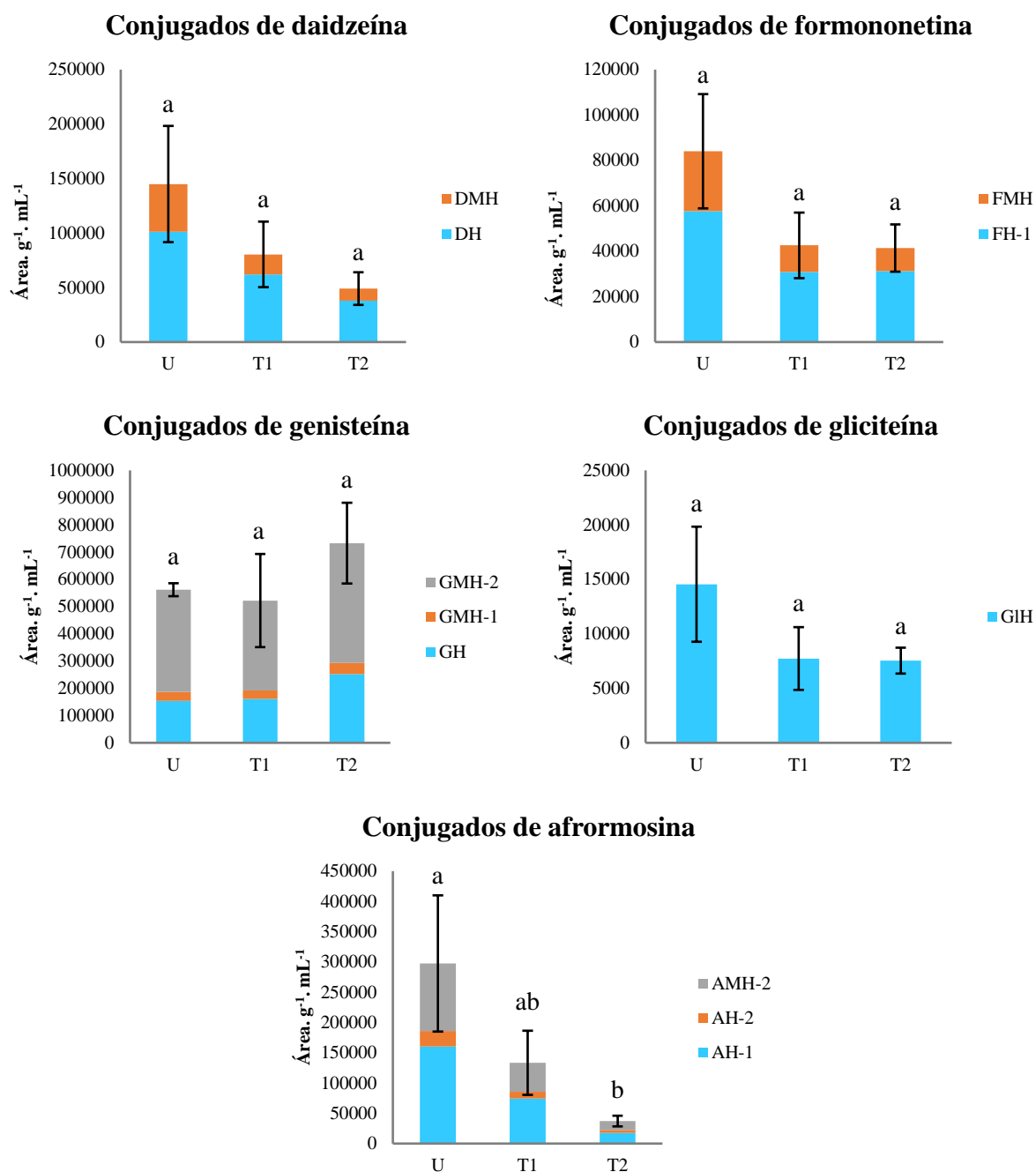


FIGURA A.25 – Abundâncias relativas de flavonóis (Área. $\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) nas folhas de soja selvagem PI407270 (P5) no estágio de desenvolvimento V3. As abundancias relativas foram calculadas como a somatória dos conjugados identificados para cada tipo de flavonoide. As letras no eixo x se referem ás distintos tecidos estudados: U, folha velha; T1, folha intermedia; T2, folha jovem. As diferencias significativas entre cada tecido se indicam com letras diferentes e são derivadas do teste de Tukey com 95% de confiabilidade ($P < 0.05$).

