

CARMEN E. PALACIOS JARA

Composição química dos grãos e da cera foliar
da variedade *Glycine max* (L.) Merrill cv. MG/
BR-46 Conquista cultivada sob atmosfera
enriquecida de gás carbônico e temperatura
elevada

São Paulo

2012

CARMEN E. PALACIOS JARA

Composição química dos grãos e da cera foliar de variedade *Glycine max* (L.) Merrill cv. MG/ BR-46 Conquista cultivada sob atmosfera enriquecida de gás carbônico e temperatura elevada

Chemical composition of seeds and leaf waxes of the variety *Glycine max* (L.) Merrill cv. MG/ BR-46 Conquista grown under enrichment of atmospheric carbon dioxide and elevated temperature

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Salatino

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica

Palacios Jara, Carmen Eusebia

Composição química dos grãos e da cera foliar de soja (Glycine Max (L.) Merrill cv. MG/BR-46 Conquista cultivadas sob atmosfera enriquecida de gás carbônico e temperatura elevada / Carmen Eusebia Palacios Jara ; orientador Antonio Salatino. --. São Paulo, 2012.

124 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Glycine Max (L). 2. CO₂ Elevado. 3. Temperatura Elevada. 4. Óleo de Sementes. 5. Ceras foliares. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica. II. Título.

Comissão Julgadora:

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof. Dr. Antonio Salatino

Orientador

Aos meus queridos pais
Justina e Teodocio

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Antonio Salatino pelos ensinamentos, orientação, incentivo e sobretudo por sua ética e alto grau de profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge pela confiança, co-orientação e opiniões relevantes.

À Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Salatino pelos ensinamentos e atenção dispensada.

Às Profas. Dras. Déborah Y. A. C. dos Santos, Cláudia Maria Furlan, Giuseppina Negri e Dra. Lucimar Barbosa da Motta pelos ensinamentos e opiniões importantes.

Às Profas. Dras Helenice Mercier e Eny Floh pelas opiniões importantes no meu exame de qualificação.

À Adriana Grandis, amiga e grande colaboradora durante todo período do mestrado.

Ao pessoal técnico do laboratório de Fitoquímica por sempre disponibilizar os ambientes de trabalho e auxílio no laboratório.

Ao pessoal técnico do laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas (Lafieco) pela colaboração.

A todos os amigos do laboratório de Fitoquímica e do Lafieco, pela colaboração, dicas e amizade.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pelo fornecimento das sementes de soja.

Ao Prof. Plínio Camargo do CENA-Esalq que contribuiu com as análises de carbono e nitrogênio.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação e demais colaboradores do IBUSP.

À CAPES - Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – pelo suporte financeiro.

Às pessoas que me deram sua amizade pura e desinteressada nas diferentes etapas da minha vida.

Aos meus irmãos (Mélida e Carlos), sobrinhos (Alejandro e Ricardo), tio (Rupert), Dante e especialmente aos meus queridos pais por todo carinho e compreensão.

Por último, agradeço a Deus por me dar saúde e me aproximar de pessoas de boa índole desde minha vinda ao Brasil.

Índice

Capítulo I. Composição química dos grãos e da cera foliar de variedade *Glycine max* (L.) Merrill cv. MG/ BR-46 Conquista cultivada sob atmosfera enriquecida de gás carbônico e temperatura elevada

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Soja.....	1
1.2 Composição química do grão de soja	5
1.2.1 Carboidratos	5
1.2.2 Proteínas.....	8
1.2.3 Lipídeos	9
1.3 Cera epicuticular foliar.....	11
1.4 Consequências da elevação da concentração de gás carbônico e temperatura....	12
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Obtenção das plantas	16
3.2 Delineamento experimental.....	17
3.3 Coletas.....	19
3.4 Parâmetros foliares	20
3.5 Clorofila foliar	21
3.6 Quantificação de cera foliar cuticular.....	21
3.7 Carbono e nitrogênio.....	22
3.8 Carboidratos não-estruturais	22
3.8.1 Amido.....	23
3.9 Proteínas solúveis	24
3.10 Lipídeos	24
3.10.1 Perfil de ácidos graxos	25
3.11 Análises estatísticas.....	26

4.	RESULTADOS.....	28
4.1	Fatores microclimáticos.....	28
4.2	Biomassa	29
4.2.1	Massa específica foliar (MEF)	35
4.2.2	Clorofilas <i>a</i> , <i>b</i> e totais.....	36
4.2.3	Cera foliar epicuticular.....	37
4.2.4	Carboidratos não-estruturais e amido	38
4.2.5	Proteínas solúveis	41
4.2.6	Lipídeos e composição dos principais ácidos graxos	42
4.2.7	Conteúdo de carbono e nitrogênio	46
5.	DISCUSSÃO	55
5.1	Crescimento.....	55
5.2	Efeitos do CO ₂ e da temperatura na composição química dos grãos	59
6.	CONCLUSÃO	66
7.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	68

Capítulo II. Cera foliar cuticular da cultivar ‘MG/BR–46 Conquista’ de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

1.	INTRODUÇÃO.....	83
1.1.	Biossíntese de ceras cuticulares	86
1.2.	Soja.....	89
2.	OBJETIVOS	90
3.	MATERIAL E MÉTODOS	91
3.1.	Cultivo das plantas.....	91
3.2.	Determinação do teor de cera cuticular	91
3.3.	Separação das classes químicas dos componentes da cera cuticular	92
3.4.	Análise da fração de <i>n</i> -alcanos e éster.....	93
4.	RESULTADOS	94
4.1.	Determinação quantitativa e qualitativa dos componentes da cera foliar.....	94

4.2. Análise de <i>n</i> -Alcanos.....	95
4.3. Análise de Ésteres	98
4.4. Análise das frações tratadas para obtenção de derivados trimetil-sililados (TMSi) 102	
4.4.1. Fração de <i>n</i> -álcoois graxos e triterpenos.....	102
4.4.2. Ácidos graxos.....	105
4.4.3. Hidroxiácidos graxos	106
4.4.4. Esteróis	108
5. DISCUSSÃO	110
6. CONCLUSÃO	112
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	113

Resumo

A concentração do gás carbônico (CO_2) tem aumentado nas últimas décadas, devido principalmente à queima de combustíveis fósseis. Como consequência, admite-se que haverá gradual aumento da temperatura atmosférica em nível global. A soja é importante planta agrícola em todo o mundo, consumida na alimentação humana e de animais domésticos.

O presente trabalho compõe-se de dois capítulos, o primeiro versando sobre o efeito da concentração de gás carbônico e da temperatura sobre vários parâmetros bioquímicos e o segundo, sobre a composição da cera foliar cuticular de uma variedade de soja.

O capítulo I trata da composição química dos grãos e do teor de ceras foliares de plantas da cultivar 'MG/BR-46 Conquista' crescendo em câmaras de topo aberto sob duas condições de CO_2 (380ppm ambiente e 800ppm elevado) e duas condições de temperatura (ambiente e elevada [$+5^\circ\text{C}$]). Foram coletados dados de 6 coletas ao longo de 105 dias de desenvolvimento da planta. As plantas crescidas em altas concentrações de CO_2 aumentaram a biomassa seca da folha, caule, raiz e frutos, além do número de sementes; temperaturas elevadas estimularam a senescência precoce. A floração foi antecipada sob condição de CO_2 elevado. Entre os carboidratos dos grãos, os teores de amido, frutose e mio-inositol tenderam a diminuir, enquanto os de sacarose, glicose e rafinose aumentaram. O incremento de CO_2 acelerou a translocação de açúcares, enquanto a da temperatura desacelerou. O teor de óleo e a composição dos ácidos graxos foram afetados diretamente pela elevada temperatura, com redução do teor de ácidos poliinsaturados. A associação de temperatura e CO_2 elevados reduziu ainda mais o teor de ácidos graxos poliinsaturados. Os teores de proteínas solúveis em geral não apresentaram diferenças significativas por efeito do acoplamento, embora o teor de nitrogênio total tenha aumentado por efeito do tratamento por temperatura elevada. O teor de clorofilas foliares diminuiu por efeito dos tratamentos e o teor de cera foliar foi alterado ao longo do tempo. Conclui-se que as elevações de CO_2 e temperatura, previstas para um futuro próximo, poderão ter o efeito de aumentar a produção de óleo por plantas de 'MG/BR-46 Conquista', devido ao aumento no número de sementes por planta e elevação do teor de óleo.

O capítulo II trata do teor da cera e a identificação dos componentes da cera foliar cuticular, por extração por lavagens superficiais das folhas com diclorometano, separação das classes de constituintes da cera por cromatografia em camada delgada e análise das frações por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. Os principais constituintes da cera foram os ésteres, seguidos de *n*-alcanos. O éster mais abundante foi o eicosanoato de octadecila (C₃₈). Os alcanos principais foram o hentriacontano (C₃₁) e o nonacosano (C₂₉). Outros componentes detectados foram álcoois primários, ácidos graxos, hidroxiácidos graxos, álcoois triterpênicos e esteróis. O principal *n*-álcool graxo primário foi o octacosanol. Os triterpenos alcoólicos detectados foram α - e β -amirinas, lupeol, germanicol e 12,20(29)-lupadien-3-ol. Os ácidos graxos variaram no intervalo C₁₅-C₂₈. Os esteroides detectados foram estigmasterol, campesterol, sitosterol e estigmastanol, com predominância do primeiro.

Palavras-chave: 1. *Glycine max* (L) 2. CO₂ elevado 3. Temperatura elevada 4. Óleo de sementes 5. Ceras foliares

Abstract

The concentration of carbon dioxide (CO₂) has increased in the last decades, due mainly to the combustion of fossil fuels. A gradual increase of the global temperature is expected as a consequence. Soybean is an important crop in most countries, being consumed either as human or domestic animals food.

The present work is composed of two chapters, the first dealing with the effect of the concentration of carbon dioxide and temperature on several biochemical parameters, and the second on the composition of the foliar cuticular wax of a variety of soybean plant.

Chapter one deals with the chemical composition of soybeans and the leaf wax contents of soybean variety 'MG/BR-46 Conquista', growing in open top chambers under two conditions of CO₂ (380 ppm – ambient, and 800 ppm - elevated) and two temperature conditions (ambient and elevated [+5°C]). The data were obtained from six collections along 105 days of experimentation. Elevated CO₂ increased the dry weight of leaf, stem, root and fruit, as well as the number of seeds; elevated temperature stimulated early senescence. Early flowering occurred under elevated CO₂. Among the grain carbohydrates, the contents of starch, fructose and myo-inositol decreased, whereas those of sucrose, glucose and raffinose increased. The effect of elevated CO₂ and temperature accelerated the sugar translocation while that of elevated temperature slowed it down. The oil content and fatty acid composition were affected directly by the elevated temperature, a reduction of the content of polyunsaturated fatty acids having been observed. The coupling of elevated CO₂ and temperature reduced even further the content of polyunsaturated acids. In general, the content of soluble proteins did not change significantly by the effect of treatment associating temperature and CO₂, although the total nitrogen content increased by the effect of elevated temperature. The content of leaf chlorophylls decreased and the foliar wax content changed with time. It is concluded that the increase of temperature and atmospheric CO₂, expected to take place in the near future, will possibly have the effect of increasing the production of oil by plants of 'MG/BR-46 Conquista', due to the increase of the number of seeds per individual and the increase of the seed oil content.

Chapter two deals with the concentration and identification of the components of the foliar cuticular wax of the soybean variety 'MG/BR-46 Conquista', by means of surface washings of the leaves with dichloromethane, separation of the classes of wax

constituents by thin layer chromatography and analysis of the fractions by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The main constituents of the wax were esters, followed by *n*-alkanes. The main ester constituent was eicosanoate of octadecyl (C₃₈). The main alkanes were *n*-hentriacontane (C₃₁) and *n*-nonacosane (C₂₉). Other constituents detected were primary alcohols, fatty acids, hydroxyacids, triterpene alcohols and sterols. The main *n*-primary alcohol was octacosanol. The triterpene alcohols detected were α - e β -amyriols, lupeol, germanicol and 12,20(29)-lupadien-3-ol. The steroids detected were stigmasterol, campesterol, sitosterol and stigmastanol, with predominance of stigmasterol.

Keywords: 1. *Glycine max* (L) 2. Elevated CO₂ 3. Elevated temperature 4. Oilseed 5. Leaf waxes

Capítulo I. Composição química dos grãos e da cera foliar de variedade *Glycine max* (L.) Merrill cv. MG/ BR-46 Conquista cultivada sob atmosfera enriquecida de gás carbônico e temperatura elevada

1. INTRODUÇÃO

1.1 Soja

A soja (*Glycine max* (L) Merrill) é uma leguminosa de hábito herbáceo, oriunda da costa leste da Ásia, principalmente da região da Manchúria, no Nordeste da China ao longo do Rio Amarelo. O melhoramento genético dessa espécie começou com cruzamentos naturais, de duas espécies de soja selvagens, realizados pelos povos antigos da China (2.500 a.C) (Embrapa, 2004). A China foi o maior produtor mundial de soja e o maior exportador durante a primeira metade do século 20, mas a partir da década de 1950 desenvolveu-se rapidamente nos Estados Unidos (Qiu & Chang, 2010), devido à interrupção das exportações de soja da Manchúria durante a revolução chinesa (Bertrand *et al.*, 1987). No Brasil, a cultura foi introduzida no estado da Bahia no final do século XIX, mas somente a partir da década de 1960 passou ser utilizada com maior intensidade na região Sul, devido ao clima semelhante ao dos Estados Unidos. Nas décadas seguintes, com o sucesso dos trabalhos de melhoramento genético, foi possível expandir a cultura para os Cerrados (Embrapa, 2004).

Segundo as estatísticas de 2011, os Estados Unidos (maior produtor de soja) correspondem a 33% de produção mundial de soja, seguido pelo Brasil (29%) e da Argentina (19%) (The American Soybean Association, 2012).

No Brasil, a soja é a principal cultura agrícola, com mais de 23 milhões de hectares cultivados, que representam 49,28% da área total brasileira de grãos, produzindo cerca de 75,31 milhões de toneladas e mantendo o ritmo de crescimento nas últimas safras. Esse volume é 9,6% ou 6,62 milhões de toneladas superior à produção obtida na safra 2009/10, quando foram colhidas 68,69 milhões de toneladas (dados da safra 2010/2011, levantamento do mês de Agosto/ 2011 CONAB, 2011). A indústria nacional transforma, por ano, cerca de 35 milhões de toneladas de soja, produzindo 7,1 milhões de toneladas de

óleo comestível e 28,1 milhões de toneladas de farelo protéico, contribuindo para a competitividade nacional na produção de carne, ovos e leite. Além disso, a soja e o farelo de soja brasileiro possuem alto teor de proteína e padrão de qualidade que permite sua entrada em mercados exigentes, como os da União Européia e do Japão. Esses dados indicam a importância que a cadeia produtiva da soja (farelo, óleo e grão) tem para o mercado nacional e internacional (CONAB & MAPA, 2011).

Os estados que produzem 82% da soja nacional são o Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás. Contudo, a produção de soja está evoluindo para novas áreas no Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia, que respondem por 13% da produção Brasileira. As estimativas para a soja na safra 2020/2021 indicam uma produção brasileira de 86,5 milhões de toneladas, com taxa de crescimento anual prevista para produção de 2,3% no período de projeção (2010/2011 - 2020/2021). O consumo doméstico deverá atingir 45,6 milhões de toneladas, enquanto que as exportações aumentariam em 40,7 milhões de toneladas

No Cerrado, o cultivo da soja tornou-se possível graças aos resultados obtidos pelas pesquisas desenvolvidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Soja e o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em parcerias com produtores, industriais e centros privados de pesquisa. Nos últimos anos, várias linhagens foram desenvolvidas atendendo à demanda por produtos com maior valor agregado e com características especiais para o consumo *in natura* e para a indústria de alimentos. As linhagens obedecem a diversas características, tais como: alto teor de proteína, alto teor de óleo e coloração clara do hilo, que melhorariam a qualidade organoléptica dos produtos de soja; ausência das enzimas lipoxigenases, conferindo sabor mais suaves aos produtos de soja; tamanho, coloração e texturas de sementes ideais (Embrapa, 2004).

As cultivares de soja desenvolvidas e cultivadas no Brasil são adaptadas a temperaturas entre 20°C e 30°C. A temperatura ideal para as regiões Centro Oeste e Sul do país é próxima a 30°C. Por outro lado, temperaturas acima de 40°C têm apresentado efeitos adversos nas taxas de crescimento, prejudicando a floração e diminuindo a produção. Em condições de campo, a floração é induzida acima de 13°C. Temperaturas muito elevadas podem estimular a floração precoce, podendo acarretar diminuição na altura de planta ou problemas na produção (Embrapa, 2004). Essa sensibilidade ao fotoperíodo é variável entre as cultivares, embora todas sejam plantas de dia curto. O consumo de água vai depender do estágio de desenvolvimento. As fases que envolvem

maior consumo são os períodos entre a germinação e a emergência e entre a floração e o enchimento do grão (Farias *et al.*, 2007). As altas temperaturas associadas a períodos de alta umidade podem acelerar o madurecimento e diminuição da qualidade da semente (Embrapa, 2004).

A adaptabilidade das cultivares de soja brasileira são classificadas segundo o grupo de maturidade e varia segundo a latitude do país, proposta originalmente desenvolvida nos Estados Unidos, o que permite ao agricultor a melhor escolha das cultivares a utilizar. Os grupos de maturidade aumentam do sul ao norte (30° a 0° de latitude) (Embrapa *et al.*, 2010).

A cultivar 'MG/BR-46 Conquista' é amplamente utilizada no Brasil; é recomendada para os estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Rondônia, Tocantins, Bahia e Roraima e suas principais características são apresentadas na Tabela 1. Possui um padrão de crescimento determinado e período juvenil longo e pode ser semeada em qualquer época do ano. O período mais usual de cultivo é entre Outubro e Dezembro (Embrapa *et al.*, 2010).

Em geral, a soja acumula nos tecidos embrionários (cotilédones) altos níveis de proteína (40%), óleo (20%) e carboidratos (30%). Além disso, foram reportados, fosfolipídeos (1-3%), vitaminas B₁, B₂ e B₆; minerais (5%), entre eles Fe, Cu, Mn, Ca, Mg, Zn, Co, P e K, isoflavonas (daidzeína e genisteína, em sua maioria), fitoesteróis (β -sitosterol, campesterol e estigmasterol), saponinas (~2%), tocoferóis e ferritina (Hymowitz *et al.*, 1972; Krishnan, 2005; Qiu & Chang, 2010; Dixit *et al.*, 2011). Os grãos das cultivares comerciais do Brasil apresentam de 18 a 24% de óleo e 35 a 42% de proteína bruta (Miranda *et al.*, 1982).

Tabela 1. Principais características agronômicas da cultivar MG/BR – 46 Conquista

Características	MG/BR – 46 (Conquista)
Ciclo (dias)	Médio (126 – 140)
Grupo de maturidade:	8,1
Altura média das planta (cm)	80 a 100 cm
Cor do hipocótilo	Verde arroxeadado
Cor da flor	Roxa
Cor da pubescência	Marrom
Cor do tegumento	Amarela
Cor do hilo	Preto
Altura média da inserção das vagens	15 cm
Reação ao cancro da haste	Resistente
Reação a <i>Cercospora kikuchii</i>	Susceptível
Reação a <i>Septoria glycines</i>	Susceptível
Reação a <i>Microsphaera diffusa</i>	Resistente
Reação ao <i>Meloydogine javanica</i>	Tolerante
Reação a <i>Meloydogine incogita</i>	Tolerante
Exigência em fertilidade	Média/ Alta

Fonte: Embrapa (2010)

O óleo de soja também pode ser utilizado como fonte alternativa do petróleo para fabricação de biodiesel, um combustível renovável capaz de reduzir em 78% a emissão dos gases causadores do efeito estufa na atmosfera (EPAMIG, 2005). Em 2005, o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) construiu a primeira usina de processamento de biodiesel no estado de Minas Gerais, usando o óleo de soja como matéria prima (Rathmann *et al.*, 2005).

Bilich & Da Silva (2006) compararam a soja e outras quatro espécies de oleaginosas para determinar qual poderia ter o maior potencial para produção de biodiesel no Brasil. A soja foi classificada como a primeira, seguida pelo dendê, canola (*Brassica spp.*), mamona e amendoim (*Arachis hypogaea*). Nass *et al.* (2007) também consideraram

a soja como a fonte mais conveniente como provedora de óleo para a produção de biodiesel.

1.2 Composição química do grão de soja

A semente é o produto da fecundação entre os gametófitos feminino e masculino das angiospermas (plantas com flores) (Lea *et al.*, 1999). As sementes podem acumular nos cotilédones reservas energéticas, como proteínas, carboidratos (principalmente o amido) e lipídeos (triacilglicerídeos) em diferentes proporções, que foram sintetizadas a partir da sacarose importada durante os últimos estágios de desenvolvimento da planta. Esse acúmulo favorecerá sua adaptação a diferentes meios (Weber *et al.*, 1997; Buckeridge *et al.*, 2000). Além disso, esses produtos armazenados funcionam como fonte de energia para manter processos metabólicos em funcionamento e/ou como fonte de matéria para a construção de tecidos vegetais que irão constituir a plântula (Buckeridge *et al.*, 2004).

1.2.1 Carboidratos

Os carboidratos são açúcares definidos quimicamente como compostos polihidroxilados alifáticos incolores e solúveis em água (Kaufman *et al.*, 1999). Podem ser classificados em três grupos, dependendo do número de átomos de carbono. Os *monossacarídeos* possuem 3 a 8 átomos de carbono, por exemplo gliceraldeído e di-hidroxiacetona (trioses), ribose e ribulose (pentoses), glicose, frutose, galactose e mio-inositol (hexoses). Os *oligossacarídeos* são formados por cadeias compostas de unidades de monossacarídeos, unidos por ligações glicosídicas que excluem uma molécula de água; os mais comuns são os dissacarídeos, como a sacarose. Os *polissacarídeos* são polímeros de açúcares contendo mais de 20 unidades, alguns podendo apresentar de cem até milhares de resíduos de monossacarídeos. Podem formar cadeias lineares (celulose) ou ramificadas (amido) (Robinson, 1991; Nelson *et al.*, 2004).

Os carboidratos se dividem em dois principais grupos: (1) carboidratos não-estruturais e (2) carboidratos estruturais. Os carboidratos não-estruturais compreendem açúcares de baixo peso molecular (glicose, frutose), oligossacarídeos (rafinose) e

polissacarídeos de armazenamento (sacarose, amido). Entre os polissacarídeos estruturais incluem-se os constituintes da parede celular, como a celulose, pectinas e hemiceluloses (Karr-Lilienthal *et al.*, 2005).

O floema é o responsável pelo transporte de fotoassimilados a partir dos tecidos fonte (folhas ou outros órgãos fotossintéticos) para os tecidos drenos (raízes, caule e desenvolvimento de frutos e sementes) (Wise *et al.*, 2007). Medições realizadas na seiva do floema indicam que os carboidratos translocados no tecido do floema são em sua totalidade açúcares não-redutores (principalmente a sacarose), que têm a vantagem de ser menos reativos (Taiz & Zeiger, 2002).

Os principais açúcares solúveis presentes nas sementes da soja são a sacarose, rafinose, estaquiose, glicose, frutose e galactose; foram também reportados traços de pinitol, mio-inositol, verbascose, arabinose, ramnose e manose (Eldridge *et al.*, 1979; Kuo *et al.*, 1988).

Os oligossacarídeos derivados da rafinose têm ampla distribuição nas famílias de angiospermas, muitas delas de grande importância para a horticultura tais como as Leguminosae, Cucurbitaceae e Brassicaceae. A rafinose é constituída por um resíduo de galactose e outro de sacarose. A biossíntese ocorre por uma transferência sequencial de unidades de galactinol à sacarose, pela enzima específica mio-inositol-galactosil transferase. O doador galactosil é o galactinol (*O*- α -D-galactopiranosil-mio-inositol). O galactinol é sintetizado pela enzima galactinol sintase (UDP-D-galactose: mio-inositol galactosil transferase, GS), que catalisa a reação $\text{UDP-galactose} + \text{mio-inositol} \rightarrow \text{galactinol} + \text{UDP}$. Por sua vez, a galactose é formada pela epimerização de UDP-glucose. A UDP-glucose epimerase catalisa a oxidação do grupo OH na posição 4 da glucose pelo NAD (Handley *et al.*, 1983; Peterbauer *et al.*, 2001; Heldt, 2005). A atividade da GS correlaciona-se positivamente com os níveis de oligossacarídeos da família rafinose em folhas e sementes (Dey & Harborne, 1997). Os açúcares da família da rafinose, como estaquiose e verbascose, são detectados nos últimos estádios da planta; portanto são importantes do ponto de vista nutricional, pois podem afetar diretamente a qualidade dos grãos e conseqüentemente sua digestibilidade (Yazdi-Samadi *et al.*, 1977; Schweizer *et al.*, 1978). A indústria prefere grãos com alto conteúdo de sacarose e menor conteúdo da rafinose, estaquiose e verbascose, por não serem facilmente metabolizados pelos humanos, podendo levar ao quadro de flatulência (Oliveira *et al.*, 2010).

Alimentos como leite de soja, tofu (queijo da soja), natto (alimento tradicional

japonês) e outros produtos derivados da soja são considerados como dietas saudáveis, e seu consumo é altamente recomendado por nutricionistas e médicos. A glucose, frutose e sacarose contribuem por favorecerem no gosto adocicado dos derivados de soja (Kennedy *et al.*, 1985; Hou *et al.*, 2009).

Na soja, a sacarose é o açúcar solúvel predominante, em média correspondendo a 41.3-67.5% dos açúcares. Por seu turno, a rafinose e a estaquiose representam cerca de 4 e 36%, respectivamente (Shanmugasundaram, 1991).

O amido é a principal forma de armazenamento de carbono e um dos principais componentes constituintes de culturas importantes do mundo. Por exemplo, o amido corresponde a 50-80% da massa seca nos grãos maduros de cereais, ervilhas e tubérculos de batata (Smith *et al.*, 1997). O amido é sintetizado nas folhas durante o dia a partir do carbono fixado fotossinteticamente, e é mobilizado para outros tecidos (em crescimento ou de reserva) durante a noite. Nos órgãos de armazenamento (sementes, frutos, tubérculos e raízes de armazenamento) o amido é sintetizado nos plastídios (amiloplastos) (Buchanan *et al.*, 2000; Buckeridge *et al.*, 2004).

O amido é formado por unidades de glicose arranjadas em uma estrutura tridimensional e semicristalina, conhecida como grânulo de amido, que pode variar em tamanho de menos de 1 a mais de 100 μm de diâmetro, dependendo da localização (folha ou órgãos de armazenamento) (Karr-Lilienthal *et al.*, 2005). Os grânulos de amido mostram anéis de crescimento internos semicristalinos que são diferencialmente sensíveis ao ataque químico e enzimático. A formação desses anéis pode resultar de diferenças periódicas na taxa de síntese de amido (Martin *et al.*, 1995).

O amido pode ser fracionado quimicamente em dois tipos de polímeros de glicose: amilose e amilopectina, que corresponderiam aproximadamente a 30 e 70 % do amido, respectivamente, embora essas porcentagens possam variar no órgão de armazenamento, dependendo das condições de crescimento e da idade do órgão vegetal. A amilose é composta por cadeias lineares de unidades D-anidroglicose (UAG) unidos por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$. A amilopectina é um polímero altamente ramificado, formado por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ e $\alpha(1\rightarrow4)$ (Martin *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 2004). Karr-Lilienthal *et al.* (2005) encontraram maior concentração de amilopectina no amido da folha. No cultivar de soja 'Amsoy 71' foram observados entre 15–20 % de amilose nos grãos maduros (Wilson *et al.*, 1978).

1.2.2 Proteínas

Nas plantas, as proteínas de reserva podem acumular-se em folhas, caules, raízes e sementes. As folhas e os caules são os principais órgãos de reserva de nitrogênio. Nas primeiras fases de crescimento da planta, o nitrogênio é absorvido do solo na forma de nitrato, que logo é transportado e armazenado. À medida que as folhas mais velhas senescem, o nitrogênio é mobilizado e utilizado para a síntese de proteínas em folhas mais novas (Jenner *et al.*, 1991).

As proteínas de reserva são sintetizadas pelos ribossomos do sistema de endomembranas do retículo endoplasmático rugoso e se acumulam dentro de organelas especializadas. Essas organelas recebem o nome de corpos proteicos, que serão transferidos através do complexo de Golgi ou diretamente por meio de autofagia ao vacúolo (Heldt, 2005, Bohnert *et al.*, 2008). Várias enzimas podem estar presentes dentro dos corpos proteicos e durante a mobilização das reservas outras enzimas podem ser sintetizadas (Bewley *et al.*, 1994).

Segundo Heldt (2005), em cereais como trigo, arroz, milho, sorgo, aveia e centeio, o conteúdo proteico varia entre 10% e 15%. Na soja, feijão, ervilha e grão-de-bico (leguminosas), as proteínas acumulam-se no endosperma, na proporção de 40% a 50% nos cotilédones; 85% dessas proteínas são de armazenamento (Nelson *et al.*, 2004).

Segundo dados de produção anual a soja estaria se tornando a fonte vegetal mais importante de proteínas no mundo, devido ao alto valor nutricional e a disponibilidade com baixo custo (Barac *et al.*, 2004). As sementes contêm proteínas bioativas, incluindo β -amilase, citocromo c, lectinas, lipoxigenase, urease, inibidores de tripsina e quimotripsina.

A indústria alimentícia derivada da soja, oferece produtos com alto teor de proteínas que são utilizadas na alimentação humana e animal sob forma pulverizada ou texturada. Distinguem-se três formas de produtos em pó, segundo sua taxa de proteínas: as farinhas (45 – 50% de proteínas), os concentrados (65 – 75%) e os isolados (mais de 90%) (Bertrand *et al.*, 1987). As proteínas de soja são usadas na alimentação humana de variadas formas. Porém novos alimentos derivados da soja estão sendo desenvolvidos continuamente, devido a seus efeitos benéficos na nutrição e na saúde.

1.2.3 Lipídeos

Os lipídeos (lipos, em grego, significa gordura) constituem uma classe de compostos com estrutura bastante variada, caracterizados por alta solubilidade em solventes orgânicos e por serem praticamente insolúveis em água (Marzzoco *et al.*, 2007).

Os lipídeos são usualmente armazenados na forma de triacilglicerídeos, formados por três moléculas de ácidos graxos esterificando cada um dos três grupos hidroxila do glicerol (Barnwal *et al.*, 2005). Em temperatura ambiente, podem ser sólidos (gorduras) ou líquidos (óleos). Além disso, os óleos são subdivididos em secantes e não secantes, o primeiro caracterizando-se por alta proporção de ácidos graxos poliinsaturados (como, linolênico) (Robinson, 1991).

Nas angiospermas, os ácidos graxos mais comuns são o palmítico ($C_{16:0}$), esteárico ($C_{18:0}$), oleico ($C_{18:1} \Delta^9$), linoleico ($C_{18:2} \Delta^{9,12}$) e α -linolênico ($C_{18:3} \Delta^{9,12,15}$). As propriedades dos óleos dependem em grande parte da composição de seus ácidos graxos. Por exemplo, óleos de cozinha geralmente contêm maior proporção de ácidos graxos mono-insaturados (tais como o oleico), que são mais estáveis em altas temperaturas, enquanto margarinas e manteigas são frequentemente ricos em ácidos graxos saturados (por exemplo, palmítico e esteárico). Outros óleos, tais como os óleos para saladas, contêm ácidos graxos mais insaturados (por exemplo, linoleico e linolênico) (Dyer *et al.*, 2008).

A biossíntese dos ácidos graxos ocorre nos plastídeos, iniciando-se com a formação de malonil-CoA a partir de acetyl-CoA e bicarbonato (HCO_3^-) por ação da enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase). Ácido malônico, atuando sob a forma de malonil-ACP, será o principal provedor de carbono para o alongamento das cadeias dos ácidos graxos. Nesses processos, referidos como condensação, atuam várias enzimas, agrupadas no complexo FAS (*Síntese de Ácido Graxos*), que continuam o processo de síntese até a etapa de formação de ácido graxos com 16 (palmítico) ou 18 (esteárico) átomos de carbono. A formação de duplas ligações nos ácidos graxos insaturados é catalisada por dessaturases (FAD), específicas para cada ácido graxo; por exemplo, na formação do ácido linoleico (diinsaturado) a partir do ácido oleico (monoinsaturado), atua a *oleato dessaturase* (FAD2); a desidrogenação do ácido linoleico é feita pela *linoleato dessaturase* (FAD3), formando o ácido linolênico (Buchanan *et al.*, 2000; Baud *et al.*, 2010).

A localização dos ácidos graxos em relação ao glicerol influencia nas propriedades do triglicerídeo, assim como na absorção do óleo ou gordura na dieta. Os ácidos graxos saturados são restritos principalmente às posições *sn-1* e *sn-3* (posições extremas do glicerol), enquanto os insaturados à posição *sn-2* (posição central do resíduo de glicerol) (Crupkin *et al.*, 2008; Baud *et al.*, 2010). Essa distribuição é importante na estabilidade oxidativa do óleo. Por exemplo, na manteiga de cacau observa-se a distribuição palmítico–oleico–esteárico (38%), ou seja, o ácido palmítico localiza-se na posição *sn-1*, o oleico na *sn-2* e o esteárico na *sn-3*. No óleo de soja, o ácido palmítico e esteárico são associados às posições *sn-1* e *sn-3* e o linoleico tem forte preferência pela posição *sn-2* (Gunstone, 2002). No azeite de oliva, observa-se principalmente a distribuição oleico–oleico (52.5%) e oleico-oleico-palmítico (27.3%) (Bracco, 1994).

O óleo de soja tem um favorável perfil de ácidos graxos, distribuídos principalmente em palmítico (11%), oleico (23%), linoleico (53%) e linolênico (7%) (Gunstone, 2002). O óleo extraído dos grãos é um dos mais saudáveis em comparação aos outros óleos comestíveis, por ser pobre em lipídeos saturados e rico em lipídeos monoinsaturados e poliinsaturados. É umas das poucas fontes, frequente na alimentação geral da população de muitos países, com ácidos graxos poli-insaturados, como o ômega 6 (ácido linoleico) e ômega 3 (ácido linolênico). Tais fontes são recomendadas pela Associação Americana do Coração, por corresponderem a ácidos graxos similares ao óleo de peixe, que apresenta vários benefícios fisiológicos, incluindo os efeitos cardioprotetores que reduzem os riscos de doenças cardiovasculares (Dyer *et al.*, 2008). Também o Instituto de Medicina de Referência de Ingestão Diária reconhece que os ácidos graxos insaturados reduzem o colesterol LDL (“mau colesterol”) sanguíneo e contribuem para diminuir o risco de doenças coronarianas.

No processo de refinação do óleo bruto da soja separam-se as lecitinas do restante de seus componentes. A lecitina da soja é utilizada na indústria farmacêutica e de alimentos, para a confecção de doces, molhos, etc. Os processos tecnológicos, como transesterificação, hidrogenação (parcial ou total), permitem converter o óleo de soja em margarina e gorduras emulsionadas, utilizadas na fabricação de sorvetes industriais (Bertrand *et al.*, 1987).

A plantas oleaginosas, como amendoim (*Arachis hipogea*), pinhão manso (*Jatropha curcas*), gergelim (*Sesamum indicum*), algodão de fibra colorida (*Gossypium hirsutum*), girassol (*Helianthus annuus*) e mamona (*Ricinus communis*), têm sido utilizadas

como matéria-prima na indústria de alimentos, têxtil, farmacêutica, de perfumaria, siderúrgica, automobilística, de tintas e vernizes entre outras. O interesse pelos ácidos graxos aumentou graças à sua utilização como biocombustível em substituição ao petróleo (Gunstone, 2002; Embrapa, 2007).

Mayworm & Salatino (1996a, b) determinaram o teor e distribuição dos ácidos graxos de espécies da Caatinga e do Cerrado, na busca de novas fontes de sementes oleaginosas potencialmente econômicas. Sementes de Vochysiaceae nativas do Brasil também revelaram potencial como fontes de óleo para diversas aplicações (Mayworm *et al.*, 2011).

1.3 Cera epicuticular foliar

As ceras cuticulares são misturas complexas de cadeias longas de lipídeos alifáticos muito hidrofóbicas que recobrem a superfície das folhas e outras partes cutinizadas das plantas terrestres. Atua como uma barreira protetora frente a estresses ambientais, reduzindo a perda de água por transpiração, exercendo proteção contra a radiação solar (raios u.v.), temperaturas muito frias, danos físicos e poluição. Além disso, influencia na eficácia dos herbicidas e age como barreira ao ataque de fungos patogênicos e insetos (Juniper *et al.*, 1983; Jenks *et al.*, 1995; Taiz & Zeiger, 2002). A resistência aos fungos, bactérias ou insetos representam adaptações evolutivas específicas aos processos envolvidos na biogênese da cera. Eglinton *et al.* (1967) observaram alta correlação negativa entre a cera foliar e precipitação, assim como correlação positiva entre cera foliar e temperatura.

A biossíntese dos componentes da cera acontece por alongamento sequencial por acréscimo de unidades C_2 , cedidas por malonil-CoA, de modo similar ao processo de síntese dos ácidos graxos de sementes (item 1.2.3). As cadeias de ácidos graxos C_{16} e C_{18} são alongadas pelo complexo de elongase de ácidos graxos (FAEs) a compostos com 26 átomos de carbono ou mais. Esses compostos podem se modificar e formar séries homólogas de alcanos, aldeídos, álcoois primários, ésteres, álcoois secundários, cetonas e β -dicetonas (Shepherd *et al.*, 2006). O ambiente e a microbiologia do solo podem influenciar a biossíntese dos componentes da cera (Eglinton *et al.*, 1967).

Com o desenvolvimento da microscopia eletrônica, foi possível aperfeiçoar os estudos sobre a configuração da morfologia das camadas de ceras. A morfologia dos

depósitos cerosos pode variar de diferentes formas, desde camadas finas e amorfas, até camadas de aparência granulosa ou cristalina de diferentes tamanhos e formas (Barthlott *et al.*, 1998). O predomínio de álcoois primários, cetonas ou aldeídos estão associados a cristais em forma de placas; túbulos são formados por álcoois secundários assimétricos ou β -dicetonas e depósitos amorfos são determinados por triterpenóides (Salatino *et al.*, 1986; Jeffree, 2006).

A forma cristalina depende da composição química, mas é influenciada também por fatores genéticos e por influência do ambiente e desenvolvimento ontogenético do órgão (Juniper *et al.*, 1983). A taxa de assimilação e a formação da camada cerosa, dependem das propriedades genéticas, do estágio de desenvolvimento foliar e das condições de crescimento (Baker *et al.*, 1998).

Bondada *et al.* (1996) observaram aumento do teor de cera em várias partes da planta de algodão crescida sob estresse hídrico. A proporção de alcanos apresentou maior elevação, sugerindo que seriam os compostos mais eficientes na redução da transpiração.

A cera epicuticular é facilmente extraída por solventes orgânicos não-polares, com ponto de fusão entre 40 °C a 100 °C, porém deve-se escolher cuidadosamente o solvente para dissolver todos os componentes da cera, sem extrair lipídeos internos do compartimento citoplasmático. O clorofórmio é geralmente usado como solvente, uma vez que é capaz de dissolver praticamente todos os componentes da cera foliar. Outros solventes frequentemente usados são diclorometano, tolueno, *n*-hexano e misturas de clorofórmio e metanol (Baker *et al.*, 1998).

1.4 Consequências da elevação da concentração de gás carbônico e temperatura

O gás carbônico (CO₂) é o componente essencial no processo de fotossíntese nas plantas e portanto de vital importância para a vida. Desde o começo da Era Industrial, vem ocorrendo um aumento em torno de 0,4-0,5% ao ano na concentração do CO₂, devido principalmente à queima de combustíveis fósseis. Hoje essa concentração chegou a 380 ppm (partes por milhão) (Beedlow *et al.*, 2004; Streck, 2005; IPCC, 2007; Hannah, 2011). Diversos cenários foram projetados para o final deste século em relação ao conteúdo de carbono na atmosfera. A concentração de CO₂ poderia dobrar ou atingir

valores mais elevados (970 pmm). Como resultado desse fato, a temperatura média do ar da Terra poderia aumentar entre 1.5 a 4.5°C (Mahlman 1997; Beedlow *et al.*, 2004).

Nesse sentido, no Brasil, foram desenvolvidos estudos baseados em modelos matemáticos, que usam dados climáticos para estimar a produção dos principais produtos agrícolas como milho, trigo e soja. Os modelos projetam encurtamento do ciclo e diminuição na produção nacional do trigo e milho, no entanto a produção de soja seria mais favorecida; embora as regiões do Centro e do Nordeste seriam as mais vulneráveis (Siqueira *et al.* 1994; Adams *et al.*, 1998). As projeções para o Rio Grande do Sul indicariam a mesma tendência, não obstante o fato de o aumento da temperatura (2–6 °C) ter a possibilidade de anular o efeito do aumento do CO₂ (Streck & Alberto , 2006).

O aumento da concentração de CO₂ eleva a taxa de fotossíntese, causando diretamente aumento no crescimento, produção e relação C:N em muitas espécies de plantas, particularmente em plantas C₃; por outro lado temperaturas elevadas afetam a taxa fotossintética, devido à ação importante na regulação das reações bioquímicas, processos morfogénéticos, intercâmbio de CO₂ e energia (Drake *et al.*, 1997; Taiz & Zeiger, 2002; Long *et al.*, 2004). Comparando o padrão de crescimento em biomassa, Poorter & Navas, (2003) verificaram aumento de 45% e 48% em espécies herbáceas e arbóreas do tipo C₃; 23% com metabolismo CAM e 12% em plantas C₄, tendo sido as plantas C₃ as mais beneficiadas quando cresceram sob altas concentrações de CO₂, pois com a elevação da relação relação CO₂/O₂ a Rubisco exerce mais a função de carboxilação, elevando a taxa de CO₂ fixado (Conroy, 1992). No entanto, se o aumento for da temperatura a relação CO₂/O₂ diminui, já que o O₂ se torna mais solúvel que o CO₂ frente à água influenciando a função oxigenase da Rubisco e favorecendo a fotorrespiração (Laing, 1974; Streck, 2005).

A temperatura é o fator ambiental com maior influencia no ciclo de crescimento, desenvolvimento, rendimento do grão e produção (Streck, 2005). Dessa forma, pode provocar diferenças na composição química e vigor dos grãos. Por exemplo, a soja produzida nas regiões mais frias dos Estados Unidos apresentam concentrações mais altas de proteínas do que nas regiões com temperaturas mais elevadas. Assim, mesmo em comparação com cultivares brasileiros, elas apresentaram maior conteúdo de proteínas (0,5%) e menor teor de óleo (-0.6%) (Breene *et al.*, 1988; Hurburgh *et al.*, 1990), visto que o Brasil é de clima tropical, com médias de temperaturas mais elevadas.

A desvantagem de as plantas crescerem em altas temperaturas é de aumentar a

permeabilidade celular, tornando a membrana celular mais fluida e resultando em maior perda de íons e outros compostos celulares. Em consequência, as plantas teriam que produzir maior quantidade de ácidos graxos saturados. Por exemplo, há mutantes de soja (Alfonso *et al.*, 2001) e *Arabidopsis* (Hugly *et al.*, 1989) deficientes em ácidos graxos insaturados e, portanto, com maior teor de ácidos graxos saturados. Eles possuem maior estabilidade da membrana e maior tolerância às altas temperaturas. A estabilidade da membrana celular está relacionada com a composição e o grau de saturação dos lipídeos. Maior grau de saturação implica em maior estabilidade em temperaturas elevadas. Por sua vez, altos níveis de insaturações propicia tolerância ao estresse por baixas temperaturas. Exposição a baixas temperaturas tenderam a formação de mais ácidos graxos poliinsaturados.

A temperatura exerce o controle do crescimento em três níveis: 1) atividade enzimática, 2) síntese de proteínas e 3) divisão celular (Hartwell-Allen & Boote, 2000; Huang, 2006). No trigo, temperaturas elevadas durante a fase de divisão celular produz menor biomassa do grão (Jenner *et al.*, 1991).

Ambientes com temperaturas elevadas e baixas provocam estímulo na síntese de proteínas que são ausentes ou em menor abundância em temperaturas medianas. Algumas proteínas podem estar envolvidas tanto na manutenção da estabilidade estrutural como no metabolismo alterado. As proteínas de choque térmico acumulam-se em altas temperaturas. Essas proteínas podem ser induzidas pela seca, o que pode ser interpretado como um efeito do déficit hídrico provocado por elevadas temperaturas (Smirnov, 1995).

Uma revisão usando técnicas de meta-análise sob os efeitos de aumento de CO₂ (entre 450 a 1250 ppm) sustentaram a hipótese de que há um estímulo na taxa de assimilação de CO₂ de 39%, apesar da diminuição de 40% na condutância estomática e diminuição de 11% na atividade da Rubisco. Entretanto, o incremento da biomassa seca da planta e do grão diminuíram em 37% e 24%, respectivamente (Ainsworth *et al.*, 2002). Hartwell-Allen & Boote (2000) relataram aumento da massa específica foliar (MEF) de 20.3 a 30.5 g.m⁻² em plantas crescendo sob concentrações de 160 a 990 ppm de CO₂. Sionit *et al.*, (1987a) observaram que a área total de folhas de soja aumenta em resposta ao enriquecimento de CO₂.

O estudo desenvolvido no Centro Experimental de Campinas-SP com cultivar 'Santa-Rosa' de soja em condições ambientais revelou maior acúmulo de matéria seca e

nitrogênio total totais no período de 37 a 65 DAF; açúcares solúveis, entre 37 e 72 DAF; polissacarídeos solúveis entre 51 e 82 DAF e material lipídico entre 51 e 65 DAF. O teor dos ácidos graxos decresceu nesse período. Cabe ressaltar que houve 79% de redução nas precipitações em relação aos anos anteriores (Silva *et al.*, 1981).

As respostas do teor de cera sob aumento do CO₂ são variáveis nas plantas sendo dependentes da tolerância do genótipo de cada espécie (Koti *et al.*, 2007). Prior *et al.* (1997) não observaram diferenças significativas por efeito do CO₂ (720 ppm), mas sim por suprimento de nitrogênio e estresse hídrico em espécies de *Pinus palustris*. No trabalho de tese de Machado (2007), foi observado que o teor de cera aumentou em *Hymenaea courbaril* (jatobá da Mata Atlântica) e reduziu em *H. stigonocarpa* (jatobá do Cerrado) sob 720 ppm de CO₂. A análise do perfil de *n*-alcanos não apresentou diferenças, o hidrocarboneto C₂₉ mantendo-se como majoritário. Porém, houve diferenças nas abundâncias relativas dos triterpenos das ceras.

Os efeitos do CO₂ acoplados com outros fatores ambientais como O₃ mostraram diversos resultados. Por exemplo, em bétula (*Betula pubescens*), os efeitos do CO₂ e do CO₂+O₃ foram diferentes para clones do litoral e do interior, tendo-se observado que o teor de ceras aumenta no clone do litoral e diminui no clone do interior (Vanhatalo *et al.*, 2001). Em plantas de choupo (*Populus tremuloides* de áreas mais frias da América do Norte), o efeito de O₃ e CO₂ separadamente estimularam o aumento do teor da cera (23 e 16%, respectivamente), mas acoplados não mostraram efeito significativo. Além disso, o O₃ provoca maior teor de *n*-alcanos e de ácidos graxos, diminuindo o teor de glicosídeos fenólicos. A associação da elevação de O₃ e CO₂ mostrou a mesma tendência (Percy *et al.*, 2002). Em canola (*Brassica napus*), a exposição de 740 ppm de CO₂ aumentou significativamente o teor de cera em relação ao nível ambiental de CO₂ (Qaderi & Reid, 2005).

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é uma das espécies de maior valor econômico no mundo. Numerosos trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de observar respostas de crescimento e composição química de plantas de soja crescidas em condições com elevado CO₂ e temperatura elevadas. No entanto, estudos sobre cera foliar de soja são escassos. Kim *et al.* (2007) determinaram aumento do teor de cera foliar de soja por efeito do estresse hídrico, principalmente da fração de alcanos. Koti *et al.* (2007) observaram que os efeitos do CO₂ e temperatura no teor de cera foliar de soja de seis genótipos de soja não foram significantes; porém, os efeitos do acoplamento do CO₂ e temperatura

elevada mostraram significância, atingindo maiores valores.

Neste trabalho, pretende-se analisar a variação de diversos parâmetros bioquímicos, crescimento e desenvolvimento de plantas de soja da cultivar 'MG/BR Conquista', crescendo em câmaras de topo aberto, sob condições distintas de temperatura, nível de CO₂ e acoplamento de temperatura e nível de CO₂ elevados.

2. OBJETIVOS

O presente projeto tem como principal objetivo analisar parâmetros de crescimento, composição química dos grãos e teor de ceras foliares de plantas da cultivar 'Conquista MB/BR-46 (Conquista)', crescidas sob atmosfera atual (380 ppm de CO₂) e atmosfera enriquecida de gás carbônico (800 ppm de CO₂).

Objetivos específicos

Pretende-se comparar em plantas da cultivar Conquista MB/BR-46 (Conquista) o efeito da concentração atmosférica de CO₂ e temperatura sobre os parâmetros de biomassa seca de folhas, caule, raiz, flores e frutos. Teor de clorofilas *a*, *b* e clorofila total, ceras cuticular em folhas. Assim como no grão; massa, conteúdo de carbono e nitrogênio, carboidratos não-estruturais e amido, proteínas solúveis, lipídeos e perfil de seus ácidos graxos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das plantas

Para obtenção das plantas, foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) da cultivar 'MG/BR-46 (Conquista)', da safra 2008/2009, certificadas e não-tratadas, cedidas gentilmente pela EMBRAPA – Soja.

As sementes foram colocadas em bandejas contendo vermiculita e mantidas por 5 dias em câmaras de germinação do tipo BOD, sob fotoperíodo de 12 horas a 30°C. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos de capacidade 4 L,

contendo apenas terra vegetal. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação por 7 dias para aclimatação, antes do início do experimento.

O experimento foi desenvolvido entre janeiro e maio de 2010, com duração de 118 dias.

3.2 Delineamento experimental

Os vasos foram transferidas para quatro câmaras de topo aberto (OTC's: *Open Top Chambers*), instaladas na casa de vegetação do Laboratório LAFIECO (Lab. de Fisiologia e Ecologia Vegetal). A Figura 1 representa o esquema de um sistema de OTC.

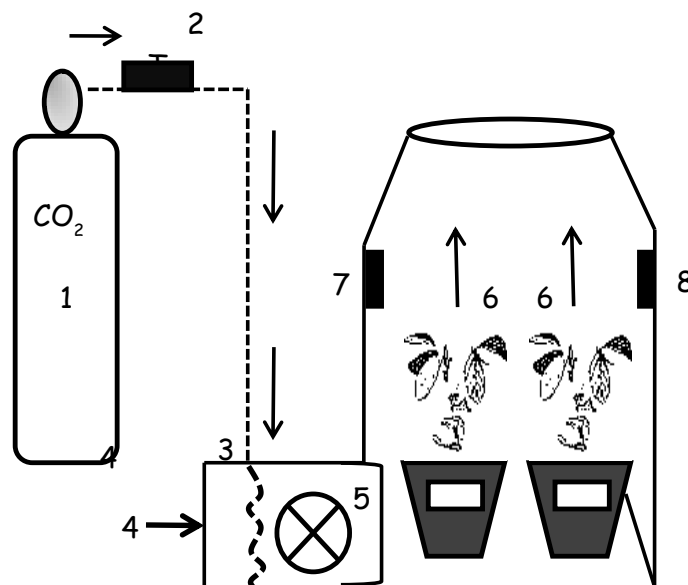


Figura 1. Esquema de um sistema de câmaras de topo aberto: 1 – Cilindro de CO_2 ; 2 – Microválvulas; 3 – Bico de injetador de CO_2 ; 4 – Entrada de ar externo; 5 – Ventilador; 6 – Plantas; 7 – Sensor de temperatura; 8 – Sensor de umidade (Arenque, 2010 & Yepes, 2010).

Nas câmaras 1 e 2, foram acoplados um cilindro contendo gás carbônico (CO_2). O gás foi injetado por meio de ventilação forçada na parte inferior das câmaras, como indicado na Figura 2, com o propósito de manter uma concentração próxima de 800 pmm. Adicionalmente, as câmaras 2 e 3 eram dotadas de um sistema de resistência que mantinha uma temperatura 5°C acima da temperatura ambiente. A câmara 4 foi usada

para cultivo das plantas-controle, ou seja, apenas com ventilação forçada. As condições de cada câmara são resumidas na Tabela 2. A Figura 2 é uma foto do conjunto de câmaras no laboratório LAFIECO (Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas).

Tabela 2. Distribuição dos tratamentos segundo as respectivas condições.

Tratamento	Condição	Abreviação
1	Controle - CO ₂ : 380ppm; temperatura: amb.	[CO ₂] _{amb} + Tem ^(amb)
2	CO ₂ : 800 ppm; temperatura: amb.	[CO ₂] _{elev}
3	CO ₂ : 380ppm; temperatura: +5°C	Tem ^(+5°C)
4	CO ₂ : 800ppm; temperatura: +5°C	[CO ₂] _{elev} + Tem ^(+5°C)

O início do experimento foi delineado para que cada câmara de topo aberto tivesse 20 vasos com uma plântula e 7 vasos com duas, totalizando 34 indivíduos por câmara. As três primeiras coletas foram feitas de vasos com duas plântulas, para minimizar o sombreamento de outros vasos. Semanalmente, os vasos foram trocados de posição de modo aleatório, a fim de evitar efeitos de posicionamento dentro das câmaras.

As concentrações internas do gás foram monitoradas diariamente às 16 h, com um medidor portátil de CO₂ (Testo®, modelo 435). Os dados microclimáticos de temperatura e umidade relativa do ar foram monitoradas por sensores a cada 10 min; os dados foram armazenados em um dispositivo RICS (Remote Integrated Control System).

As regas dos vasos nas câmaras foram feitas três vezes diariamente nas 10 primeiras semanas; nas semanas seguintes, foi feita uma rega por dia, no início da manhã. Adicionalmente, duas vezes por semana foram adicionados a cada vaso 100 mL de solução nutritiva de Hoagland modificada (Epstein, 1972), nas concentrações apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Composição da solução de Hoagland modificada.

Soluções de nutrientes	Volume por L de solução
Fosfato de Potássio (0,2 M)	5 mL
Cloreto de Potássio (1 M)	5 mL
Nitrato de Cálcio (1 M)	5 mL
Sulfato de Magnésio (0,4 M)	5 mL
Nitrato de Amônio (2 M)	5 mL
Micronutrientes	5 mL
Fe-EDTA	10 mL



Figura 2. Câmaras de topo aberto na da casa de vegetação do laboratório LAFIECO, contendo as plantas de soja da cultivar 'MG/BR-46 Conquista' após 60 dias de tratamento.

3.3 Coletas

Cada coleta compreendeu a retirada de 5 plantas representativas de cada tratamento e selecionadas aleatoriamente. O número de coletas ao longo do experimento foi planejado segundo o número de vasos de cada câmara. As datas de coleta foram

planejadas segundo os estádios fenológicos das plantas de soja, como descrito por Fehr *et al.* (1971) e apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Datas de coleta de plantas da cultivar de soja 'MG/BR-46 Conquista' e respectivos estádios fenológicos. V: vegetativo; R: florescimento (ver texto).

Coleta	Dias de tratamento	Estádios fenológicos
1	30	V6
2	45	R1
3	60	R3
4	75	R5
5	90	R6
6	105	R8

Fehr *et al.* (1971) propuseram a divisão dos estádios de desenvolvimento de soja em estádios vegetativos (Vn) e estádios reprodutivos (Rn), sendo n o número de nós acima do nó cotiledonar, com folha completamente desenvolvida. Os estádios reprodutivos abrangem as fases de florescimento (R1 e R2), desenvolvimento da vagem (R3 e R4), desenvolvimento do grão (R5 e R6) e amadurecimento do grão (R7 e R8).

As coletas foram realizadas entre 9 e 11 h da manhã. A planta (ou indivíduo) foi retirada do vaso com auxílio de tesoura de poda e estiletes. O material coletado foi dividido em folhas, caule, raiz, flores, frutos e grãos. Folhas, caules, raízes e flores foram secos em estufa a 70°C por 72 h, os frutos e grãos foram secos em liofilizador. Após esse período, as diferentes partes das plantas foram pesadas em balança analítica para obtenção da massa seca. Os grãos foram pulverizados em moinho de bolas e o pó resultante armazenado em temperatura ambiente, para posteriores análises.

3.4 Parâmetros foliares

Foram coletadas folhas do terceiro nó, completamente expandidas e sem injúrias. Logo em seguida, foi feita digitalização em impressora multifuncional HP deskjet F 4100. Imediatamente após, as folhas foram submetidas à extração e quantificação de cera (item 3.6).

A massa específica foliar (MEF) foi assumida como a relação entre a massa seca foliar (g) do 4º nó e a área (m²) do disco foliar (1,54 cm² de diâmetro). Os discos foliares foram secos em uma estufa com circulação forçada a 80°C por 72 h. A MEF pode detectar incrementos de carboidratos não estruturais nas folhas, que podem reduzir a velocidade de crescimento por unidade de carbono fixado, além de auxiliar na estimativa da espessura foliar (Hunt, 1982).

3.5 Clorofila foliar

Com auxílio de um furador de folhas de secção conhecida (1,54 cm²), foram retirados discos foliares de 5 indivíduos por tratamento (Porra *et al.*, 1989). As folhas para retirada dos discos foram coletadas aos 30, 45, 60, 75 e 90 dias de tratamento. Os discos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C. A extração e a quantificação de clorofilas foram realizadas dentro das 24 h após a coleta.

Os pigmentos fotossintéticos foram extraídos com 2 mL de acetona 80%. O extrato foi centrifugado a 13400 g a 4°C (Porra, *et al.*, 1989). Todos os procedimentos foram realizados de modo a não ultrapassar 10 min e com a mínima exposição à luz e ar. Os sobrenadantes foram analisados em espectrofotômetro, fazendo-se leituras em 663 nm e 645 nm (Lichtenthaler, 1987). As quantidades de clorofila *a*, *b* e clorofila total são expressas em mg/g, com base na massa fresca foliar, segundo as equações abaixo:

$$\text{Clorofila a} = (12,25.Abs_{663} - 2,79.Abs_{645}).V/F$$

$$\text{Clorofila b} = (21,50.Abs_{645} - 5,10.Abs_{663}).V/F$$

$$\text{Clorofila a + b} = (7,15.Abs_{663} + 18,71.Abs_{645}).V/F$$

Onde: Abs é a absorbância; V, o volume da amostra (mL) e F, massa fresca (g) do disco foliar.

3.6 Quantificação de cera foliar cuticular

A cera cuticular foi extraída da superfície foliar por três imersões sucessivas em diclorometano por 30, 20 e 10 segundos (Oliveira, *et al.*, 2003), dentro de 24 h após coleta. Os extratos de diclorometano foram reunidos, filtrados e concentrados em

evaporador rotatório, e em seguida transferidos para frascos de vidro previamente pesados. As amostras foram evaporadas até a secura em banho-maria e colocadas em dessecador até obtenção de massa constante. A área foliar foi obtida utilizando-se o programa "Image –Pro® Plus" versão 6.3 windows S/N 41N63000 – 58307© 2008 Media Cybernetics.

O teor de cera cuticular foi calculado pela relação entre a massa de cera (μg) e o dobro da área foliar obtida (cm^2), pois devem-se levar em conta as superfícies adaxial e abaxial.

3.7 Carbono e nitrogênio

A quantificação de carbono e nitrogênio nos grãos foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Ecologia Isotópica, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/ USP, São Paulo, Brasil.

Foram pesados de 1,3 a 1,5 mg de material de grãos previamente secos em liofilizador e pulverizados em moinho de bolas. As amostras foram colocadas em cápsulas de estanho e introduzidas em analisador elementar (Carlo Erba EA 1110 CHNS, Instrumentos CE, UK), que incinera e volatiliza o material. O gás resultante é arrastado por um fluxo contínuo de hélio e introduzido em um espectrômetro de massas (Delta Plus, ThermoQuest-Finnigan; Thermo Fisher Scientific, INC. MA. USA). O padrão utilizado para quantificação dos compostos foi o BBOT (2,5-Bis(5-ter-butyl-benzoxazol-2-yl)thiophene), com a composição: C = 72,703%, e N = 6,522.

3.8 Carboidratos não-estruturais

Os carboidratos não-estruturais ou açúcares solúveis totais dos grãos foram extraídos de 10 mg de amostra seca liofilizada e submetida a quatro extrações consecutivas com 1,5 mL de etanol 80% (v:v) durante 20 min a 80°C (Buckeridge & Dietrich, 1996). As amostras foram cetrifugadas a 157000 g, à temperatura ambiente, por 10 min. O sobrenadante obtido de cada extração foi recolhido e armazenado a – 20°C. O material foi centrifugado a 15700 g e uma alíquota de 100 μL foi diluída em 400 μL de água Milli-Q transferida para um frasco para separação e quantificação dos açúcares sacarose (Sac), glicose (Glc), rafinose (Raf), frutose (Fru) e mio-inositol, por cromatografia

líquida de troca aniônica de alta eficiência (HPAEC/PAD), em um equipamento Dionex-DX500. A coluna utilizada foi CARBOPAC PA1, eluída com NaOH 150 mM e água a 1 mL/min. O tempo de análise de cada amostra foi 25 min. Foram construídas curvas-padrões com soluções de amostras de Sac, Glc, Raf, Fru e mio-inositol, nas concentrações de 50, 100 e 200 μ M (Santos *et al.*, 2004).

3.8.1 Amido

Foi utilizada a metodologia proposta por Amaral *et al.* (2007). Após a extração dos açúcares solúveis totais (item 3.8), o material precipitado foi colocado em estufa a 60°C até completa evaporação do etanol. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de solução de α -amilase (cód. E-ANAAM, EC 3.2.1.1) termoestável de *Bacillus licheniformis* (MEGAZYME) a 120 U/mL, diluída em tampão MOPS 10 mM pH 6,5. A amostra foi incubada a 75°C por 30 min. O procedimento foi repetido mais uma vez com 0,5 mL totalizando, 120 unidades de enzima. Após resfriamento a 50°C, adicionou-se 0,5 mL da solução a 30 U/mL de amiloglicosidase (EC 3.2.1.3) de *Aspergillus niger* (cód. E-AMGPU, MEGAZYME) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5 e as amostras foram incubadas a 50°C por 30 min. O procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 30 unidades da enzima. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 13000 g por 5 min para dosagem de amido, por meio de quantificação da glicose liberada pela hidrólise. Foram retiradas alíquotas entre 20 μ L e 50 μ L, às quais foram adicionados 250 μ L do reagente Glicose PAP Liquiform (GODPOD - CENTERLAB, Brasil), contendo as enzimas glicose-oxidase (~11000 U/mL) e peroxidase (~700 U/mL), 290 μ mol/L de 4-aminoantipirina e 50 mM de fenol pH 7,5 (GODPOD). No processo, a glicose é oxidada e paralelamente forma-se peróxido de hidrogênio, que reação reage com 4-aminoantipirina e fenol sob ação da peroxidase. Trata-se de uma reação oxidativa de acoplamento, formando-se a antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra. Após incubação por 15 min a 30°C na placa, o teor de glicose foi determinado em espectrofotômetro acoplado a leitor de microplacas de ELISA por meio de leitura em 490 nm. Utilizou-se uma solução de glicose (SIGMA) para a elaboração da curva padrão nas concentrações de 0; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 e 12,5 mg/mL. A quantidade de glicose foi determinada e a massa de glicose no amido foi calculada reduzindo em 10% o valor obtido, referente à quantidade de glicose liberada na hidrólise.

3.9 Proteínas solúveis

A extração foi feita de acordo com Lisboa *et al.* (2006) e Tonini *et al.* (2007). Foram utilizados 500 mg de amostra seca de soja liofilizada e pulverizada. A extração foi realizada por tratamento da amostra com 3 mL de solução tampão Tris-HCl 20mM/L pH 7,8, com auxílio de um almofariz e pistilo. A mistura foi deixada em repouso por uma hora em geladeira. Em seguida, foi colocada em tubo tipo Falcon (15 mL) e adicionou-se mais 1 mL de solução tampão Tris-HCl para lavar o interior do almofariz. O extrato proteico obtido foi centrifugado durante 10 min a 12000 g e 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado em tubo Eppendorf e armazenado a – 20°C.

A concentração de proteínas solúveis totais foi determinada de acordo com o método de Bradford, (1976). Foi empregado 30 µL do extrato protéico previamente diluído em água ultrapurificada (1:20) e 170 µL do reagente de Bradford. A concentração de proteínas foi determinada em triplicata em espectrofotômetro acoplado a leitor de microplacas de ELISA, fazendo-se leitura em 595 nm. Construiu-se uma curva de calibração com soluções padrões de albumina de soro bovino concentrações 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 5; 7,5 e 10 µL/mL.

3.10 Lipídeos

A determinação do teor de lipídeos nos grãos foi realizada por extração contínua com hexano em Soxhlet (Ahmad *et al.*, 1981). As sementes foram secas em liofilizador e trituradas em moinho de bola. Cerca de 1 g do pó obtido foi utilizado para determinação do teor de umidade. Cartuchos para extração em Soxhlet foram preparados com papel de filtro previamente lavado com clorofórmio. Em seu interior, foram colocados 2 g de material pulverizado. A extração foi feita com aproximadamente 300 mL de hexano, durante 6 h. Em seguida, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório. A solução hexânica concentrada foi filtrada através de Na₂SO₄ anidro e papel de filtro para um frasco previamente pesado. O solvente foi evaporado sob corrente de N₂ e as amostras foram mantidas em dessecador até peso constante e em seguida transferidas para geladeira até a análise para determinação do perfil de ácidos graxos.

3.10.1 Perfil de ácidos graxos

As amostras de lipídeos foram submetidas a um processo de transesterificação, com o objetivo de obter os ésteres metílicos dos ácidos graxos. 30 µL de amostras de óleo correspondentes a cada tratamento foram tratados com 4 mL de solução metanólica de H₂SO₄ 5% e 2 mL de tolueno. As misturas foram mantidas por 4 h em banho seco a 80°C. As misturas foram então transferidas para tubos Falcon de 15 mL e acrescentaram-se 4 mL de NaCl 0,5 M e 1 mL de diclorometano. Os tubos foram agitados em vórtex e em seguida centrifugados a 5000 rpm por 5 min. A fase orgânica foi transferida para um tubo de 50 mL. Repetiram-se duas vezes o processo de extração com 1 mL de diclorometano e centrifugação. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica foi lavada duas vezes com 4 mL de água. Adicionou-se Na₂SO₄ anidro à solução dos ésteres metílicos e mantiveram-se os tubos em repouso por 1 hora ao abrigo da luz. As soluções foram filtradas para novos tubos e o solvente evaporado sob corrente de N₂ (Christie, 2003). As amostras de ésteres metílicos de ácidos graxos foram mantidas em freezer até análise por cromatografia a gás .

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados por meio de comparação dos tempos de retenção das bandas das amostras no cromatograma com uma mistura de amostras autênticas de ésteres metílicos (AOCS – Rapeseed mix – 007N). As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama modelo HP 5890 serie II Plus. Foi usado hélio como gás de arrastre em fluxo constante de 1 mL/min, coluna capilar de sílica fundida HP-Innowax (Cross-Linked PEG, 30 m x 320 µm x 0,50 µm) e a seguinte programação de temperaturas do forno: temperatura inicial 150°C durante 1 min, 15°C/min até 225°C, 5°C/min até 260°C, mantendo-se nessa temperatura por 7 min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220°C e 275°C, respectivamente. O volume injetado foi 1 µL diluído em solução hexânica a 1:50. A proporção relativa de ácidos graxos individuais na mistura foi estimada por normalização das áreas das respectivas bandas no cromatograma, expressando-se o resultado em percentual de cada substância em relação ao total de ácidos graxos.

3.11 Análises estatísticas

Foram feitas três modalidades de análises estatísticas: univariada, bivariada e multivariada. Usaram-se as análise bivariada e multivariada para os dados adquiridos a partir dos grãos.

Análise univariada

A comparação das médias obtidas para cada tratamento foi realizada por análises de variância (ANOVA one-way) e pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância. Utilizou-se o software estatístico JMP 5.0.1 (Copyright© 1989 – 2002 SAS Institute Inc.). A hipótese nula foi avaliada com os métodos O'Brien, Brown-Forsythe, Levene e Bartlett. A detecção de dados extremos ("outliers") foi conseguida com diagramas do tipo box-plot e substituídos pelas respectivas médias, a fim de não influenciar o quadro geral e as correlações entre dados (análise bivariada).

Nos casos em que se observaram diferenças significativas, foram calculados os efeitos dos tratamentos T_2 , T_3 e T_4 em relação ao controle, mediante a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Efeito} = \frac{(\text{média do tratamento}_{(T_2, T_3, T_4)} - \text{média do controle}) \times 100}{\text{média do controle}}$$

respeitando-se o sinal do valor encontrado, ou seja, % Efeito > 0 (maior) ou % Efeito < 0 (menor).

Análise bivariada utilizando o método de correlação de Pearson

Com os dados quantitativos dos grãos provenientes de um mesmo cultivar, foi possível estabelecer uma matriz de correlações por meio do coeficiente de correlação de Pearson entre duas variáveis associadas que possam explicar a hipótese formulada em nível de 5% de significância. A direção e magnitude da correlação linear pode ser quantificada com um coeficiente de correlação, representado por r . O valor de r varia entre -1 e 1. Nos casos em que $r = 0$, as médias de dois tratamentos não variam simultaneamente, portanto não há correlação linear. Quanto mais próximo r estiver de 1

ou -1, mais forte é a associação linear entre as duas variáveis. Se r assumir um valor positivo, há uma relação direta e as duas variáveis tendem a aumentar ou diminuir simultaneamente, na mesma direção. Se r for negativo, existe uma relação inversa e uma variável tende a aumentar enquanto a outra diminui (Harvey-Motulsky, 1995).

As hipóteses do teste de coeficiente de correlação de Pearson são

$H_0 : r = 0$, onde não existe correlação entre as variáveis

$H_1 : r \neq 0$, onde existe correlação significativa.

O tamanho amostral para cada tratamento foi 15, provenientes das 5 repetições das três coletas ao longo do desenvolvimento do grão (75, 90 e 105 dias).

Análise multivariada utilizando o método de Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componente principal ou PCA é um método estatístico multivariado que envolve redução de dados em variáveis correlacionadas, o qual complementa a análise bivariada. A redução das variáveis usando PCA começa examinando-se os autovalores. Os autovalores correspondentes para cada componente principal (PC) são apresentados de maior a menor valor. O número de PC depende dos números de variáveis independentes. Assim, o PC1 explica mais sobre o total da informação do que PC2 e este mais do que PC3, e assim por diante. A informação dos dados originais são resumidos basicamente no gráfico do tipo *biplot* de distância, no qual é possível representar as variáveis em um único gráfico bidimensional (PC1-PC2) (Gabriel, 1971; Vasić *et al.*, 2008). O *biplot* pode ser multidimensional, mas os gráficos bidimensionais são mais comuns.

No presente trabalho, as unidades das variáveis analisadas foram padronizadas a percentagens, sendo retiradas as variáveis de biomassa e número de grãos.

4. RESULTADOS

4.1 Fatores microclimáticos

Com os dados microclimáticos coletados no interior das câmaras, foram construídos os gráficos das Figuras 4 e 5, que ilustram as variações de temperatura e umidade relativa média diária para duas condições ao longo de 105 dias de tratamento. Na Figura 4, os dados apresentados correspondem a tratamentos em que não se elevou a temperatura acima da condição ambiente; na Figura 5, os dados referem-se a tratamentos em que a temperatura foi ajustada para situar-se 5°C acima da temperatura ambiente. Observa-se que a umidade relativa diminui, enquanto a temperatura aumenta.

As Figuras 4 e 5 indicam que nas primeiras semanas observaram-se altas temperaturas (características do verão) e teores de umidade relativa relativamente baixos. Nas últimas semanas, registraram-se temperaturas mais baixas e concomitante elevação da umidade relativa, coincidindo com os dias de coleta (sinalizados com setas). Nas condições de elevada temperatura, a umidade relativa foi menor. Essas condições ambientais observaram-se na primeira semana do experimento (Figura 5).

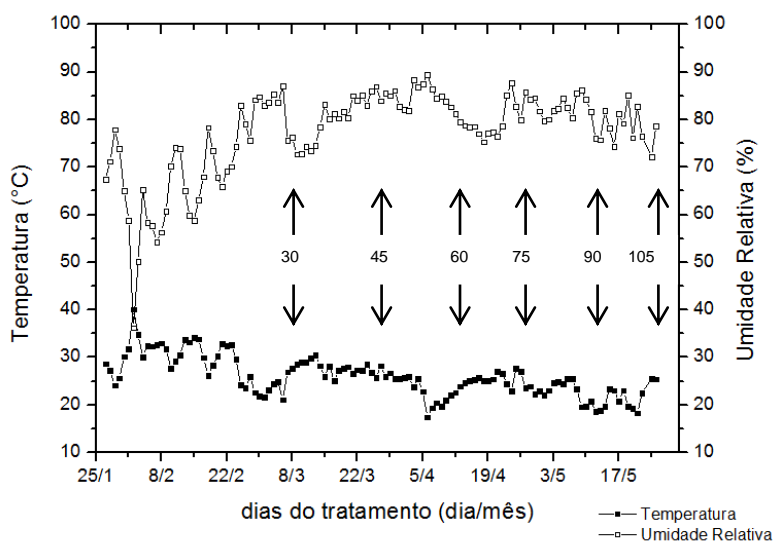


Figura 3. Dados de temperatura (°C) e umidade relativa (%) sob condições normais no interior de câmaras de topo aberto com plantas de soja da cultivar 'MG/BR-46 Conquista'. As setas indicam datas de coleta de material para análise.

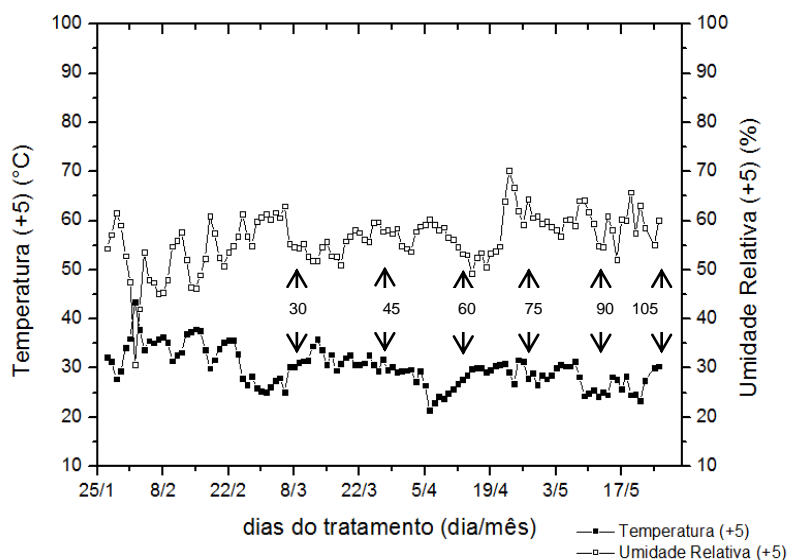


Figura 4. Dados de temperatura (°C) e umidade relativa (%) no interior de câmaras de topo aberto com plantas de soja da cultivar 'MG/BR-46 Conquista', com ajuste de temperatura 5°C acima da temperatura ambiente. As setas indicam datas de coleta de material para análise.

4.2 Biomassa

Os resultados de biomassa durante o crescimento das plantas nas câmaras referem-se aos estádios vegetativo e reprodutivo correspondentes aos 4 tratamentos durante o período 25/Jan – 25/Mai de 2010.

Dados de biomassa seca de folhas, caule, raiz, grãos, flores e a biomassa total são apresentados nas Figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10.

A biomassa seca de folhas correspondente aos vários tratamentos mostraram tendência a aumentar entre 30 e 60 dias e diminuir a partir dos 75 dias. Entre 90 e 105 dias, é notável o efeito acelerado da perda de biomassa foliar nos tratamentos com elevado gás carbônico (T_2), temperatura elevada (T_3) e a combinação dos dois parâmetros (T_4), sendo que aos 105 dias não havia folhas nas plantas do tratamento CO_{2elev} . As médias dos tratamentos apresentaram diferenças significativas entre os dias 30 ($p=0.0029$), 45 ($p=0.0196$), 90 ($p=0.0029$) e 105 ($p<.0001$), coincidindo com o estágio

de crescimento vegetativo (30 dias) e senescência foliar no estágio reprodutivo da planta (90 e 105 dias) (Figura 5).

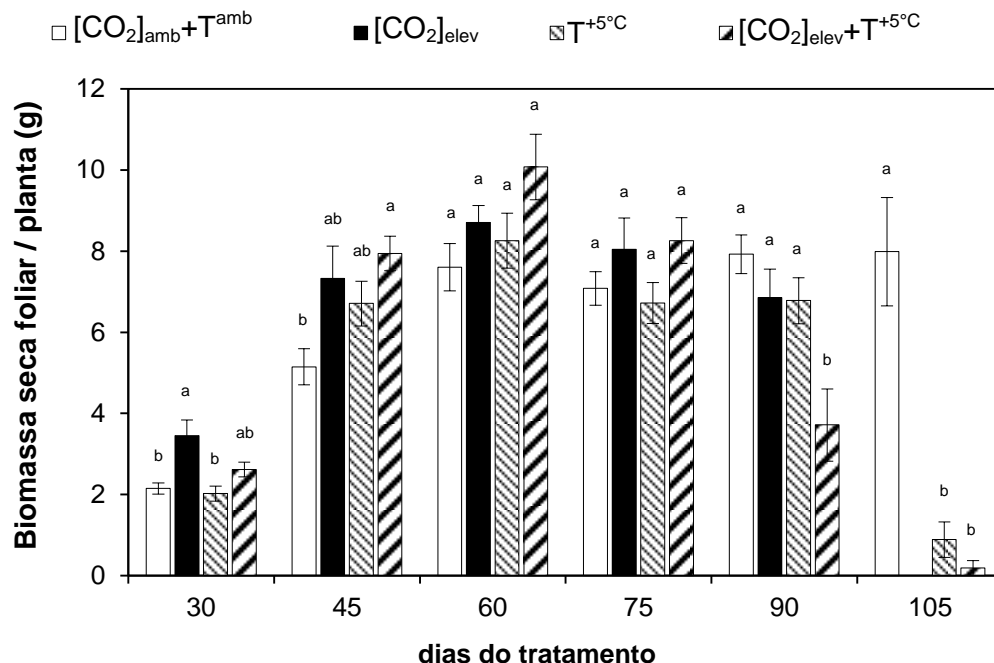


Figura 5. Biomassa seca foliar da cultivar 'MG/BR-46 Conquista' de soja sob T_1 : $[\text{CO}_2]_{\text{amb}} + T^{\text{amb}}$; T_2 : $[\text{CO}_2]_{\text{elev}}$; T_3 : $T^{+5^\circ\text{C}}$ e T_4 : $[\text{CO}_2]_{\text{elev}} + T^{+5^\circ\text{C}}$. As barras representam a média aritmética \pm erro padrão da média ($n=5$). Médias com a mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

As médias de biomassa seca do caule mostraram diferenças significativas entre todas as coletas realizadas ao longo do experimento, com tendência ao incremento da biomassa do caule em relação aos dias de tratamento. Aos 30, 90 e 105 dias o trat. T_2 superou os valores de todos os tratamentos e em relação ao controle aumentou em 55%, 52% e 56%, respectivamente; do mesmo modo, os valores do trat. T_4 mostraram-se eminentes em relação ao controle aos 45, 60 e 75 dias (Figura 6). Aos 60 dias, as médias dos tratamentos: T_3 e T_4 foram semelhantes entre si e superaram ao controle em 53% e 56%, respectivamente. Aos 75 dias, os valores do trat. T_3 diminuíram, enquanto os do trat. T_4 aumentaram. Nas coletas seguintes (90 e 105 dias) houve redução dos valores de T_3 e T_4 , observando-se médias de T_3 inferiores às do controle (Figura 6).

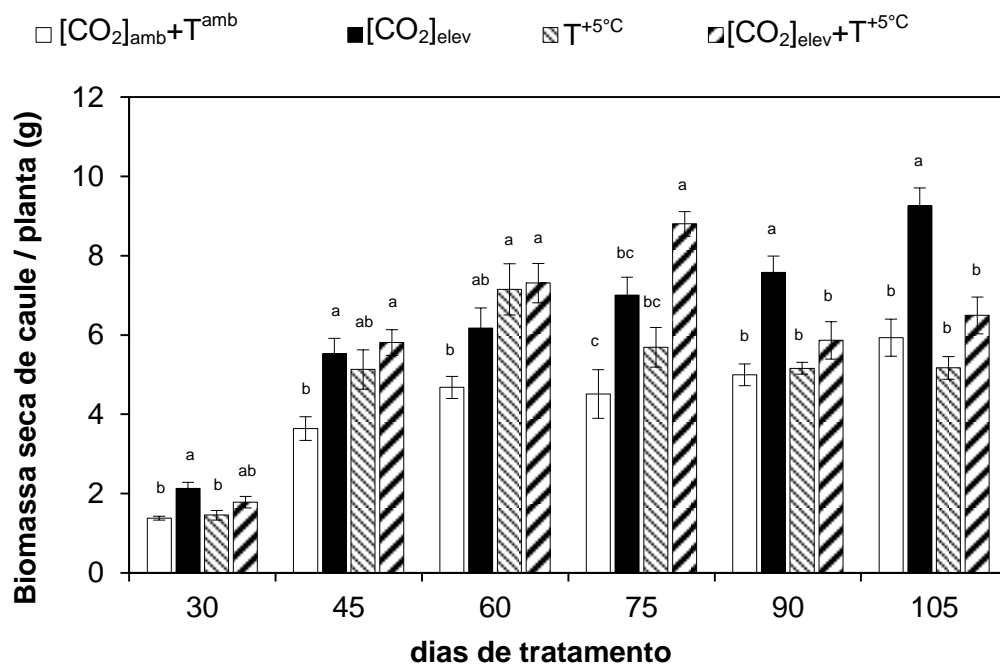


Figura 6. Biomassa seca de caules da cultivar ‘MG/BR–46 Conquista’ de soja sob T₁: [CO₂]_{amb}+T^{amb}; T₂: [CO₂]_{elev}; T₃: T^{+5°C} e T₄: [CO₂]_{elev}+T^{+5°C}. As barras representam a média aritmética ± erro padrão da média (n=5). Médias com a mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0.05).

Similarmente à biomassa seca do caule, a biomassa seca da raiz teve tendência a aumentar até 60 dias. A partir dos 75 dias, houve redução da média do trat. T₃, entanto aos 90 dias observaram-se perdas de biomassa de raiz (médias inferiores ao controle) nos tratamentos T₃ e T₄ (-21% e -7%, respectivamente), que acrescenta-se aos 105 dias (-62% e -41%, respectivamente). Os valores referentes ao tratamento T₂ elevarem-se ao longo de todo o experimento (Figura 7).

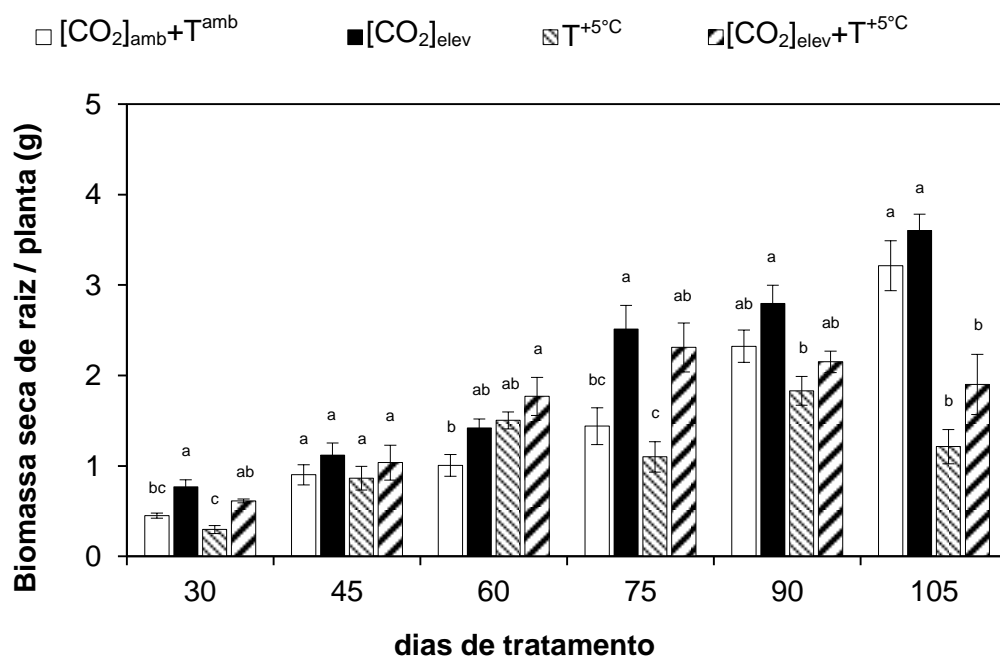


Figura 7. Biomassa seca de raiz da cultivar ‘MG/BR–46 Conquista’ de soja sob T_1 : $[\text{CO}_2]_{\text{amb}} + T^{\text{amb}}$; T_2 : $[\text{CO}_2]_{\text{elev}}$; T_3 : $T^{+5^\circ\text{C}}$ e T_4 : $[\text{CO}_2]_{\text{elev}} + T^{+5^\circ\text{C}}$. As barras representam a média aritmética \pm erro padrão da média ($n=5$). Médias com a mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

As diferenças entre as médias do número de flores por planta foram significativas aos 45 ($p=0.0093$) e 60 ($p=0.0093$) dias (Figura 8). Aos 45 dias as plantas do tratamento CO_2 elevado tiveram floração mais intensa (51 flores), correspondente a 92% acima do controle e sendo que aos 60 dias reduziria. O efeito do trat. T_3 atrasou a floração, com a formação de poucas flores aos 45 dias (Figura 8); contudo, aos 60 dias a sua média foi superior à dos demais tratamentos (50 flores), cujas plantas já estavam em estágio de frutificação mais avançado. O processo de formação de novas flores com o tratamento T_4 foi contínuo entre os 45 e 60 dias (37 e 36 flores, respectivamente), correspondendo a 40% acima e 7% abaixo, nessas duas fases, em relação ao controle (Figura 8). A floração nas plantas sob CO_2 elevado iniciou-se 3 dias antes do início da floração das plantas controle. Com os tratamentos T_3 e T_4 , a floração iniciou-se 1 e 2 dia após o tratamento T_2 , respectivamente.

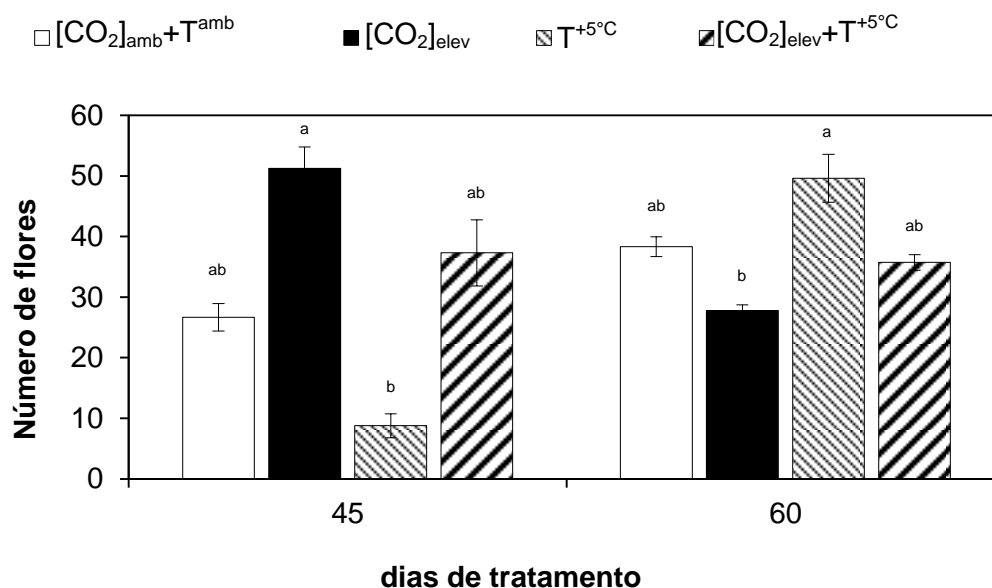


Figura 8. Número de flores de plantas da cultivar ‘MG/BR–46 Conquista’ de soja sob T₁: [CO₂]_{amb}+T^{amb}; T₂: [CO₂]_{elev}; T₃: T^{+5°C} e T₄: [CO₂]_{elev}+T^{+5°C}. As barras representam a média aritmética ± erro padrão da média (n=5). Médias com a mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0.05).

A biomassa seca de grãos por planta sob o tratamento T₂ foi significativamente maior aos 75 (p<.0001), 90 (p= 0.0004) e 105 (p=0.0010) dias (Figura 9A), correspondendo a 94%, 23% e 27%, respectivamente, acima da média das plantas-controlé. No entanto, o número de grãos sob o efeito de T₂ só foi superior ao controle aos 105 dias (33%, p=0.0019) (Figura 9B). A biomassa do grão nos tratamentos T₃ e T₄ foram menores em relação ao controle. O tratamento T₃ mostrou maiores perdas ao longo do experimento tanto na biomassa seca (-19%, -16%, -32% para os 75, 90 e 105 dias, respectivamente), quanto no número de grãos (-11% e -15% para os 75 e 105 dias, respectivamente) a exceção apresentou-se aos 90 dias no número de grãos onde o efeito do tratamento diminuiu com respecto ao controle (4%). O tratamento T₄ foi significativamente superior unicamente aos 75 dias tanto na biomassa seca (p<.0001), quanto no número de grãos (p=0.0458) por planta (Figura 9A e 9B).

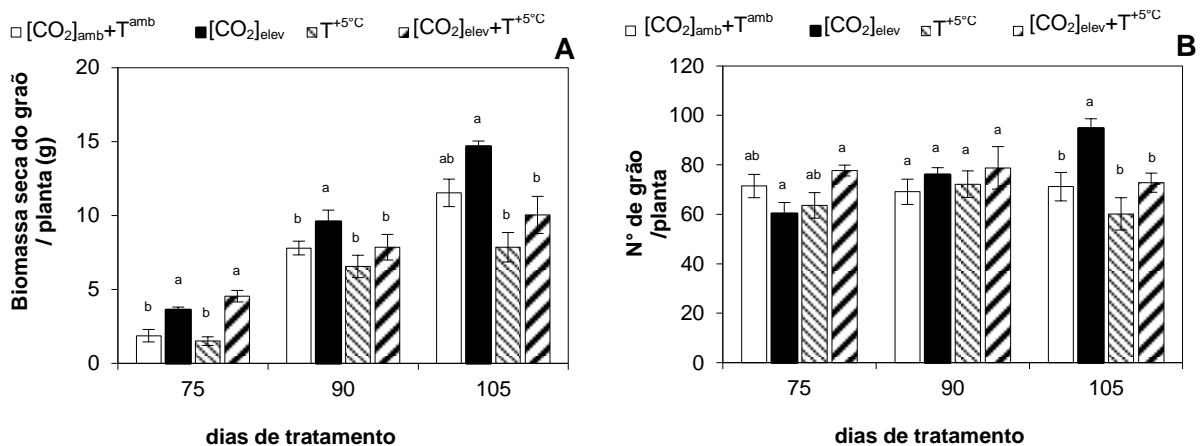


Figura 9. Biomassa grãos (A) e número de grãos (B) da cultivar 'MG/BR-46 Conquista' de soja sob T₁: [CO₂]_{amb}+Tem^{amb}; T₂: [CO₂]_{elev}; T₃: T^{+5°C} e T₄: [CO₂]_{elev}+T^{+5°C}. As barras representam a média aritmética ± erro padrão da média (n=5). Médias com a mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0.05).

A Figura 10 apresenta as somas das biomassas secas de folha, caule e raiz expressando o investimento na parte vegetativa das plantas. Há diferenças entre os tratamentos aos 30 (p=0.0024), 45 (p=0.0184), 75 (p=0.0110) e 105 (p=0.0017) dias. Nos primeiros 30 dias do experimento (estádio exclusivamente vegetativo), o tratamento T₂ evidencia biomassa superior aos demais tratamentos, sendo superado pelo tratamento T₄ nos estádios R1 (45 dias), R3 (60 dias) e R5 (75 dias). Por outro lado, o efeito da temperatura elevada (T₃) acelerou o desenvolvimento vegetativo assim como o reprodutivo em relação aos outros tratamentos, sendo que aos 60 dias o tratamento T₃ levou ao maior incremento da variável (26%), mas não significativo, em relação ao controle. Em seguida, a biomassa vegetativa sob T₃ foi diminuindo rapidamente em relação aos outros tratamentos (Figura 10). O acelerado comportamento do tratamento T₃ não foi acompanhado da maior biomassa ou número de grãos como, observado nas Figura 9A e 9B. Entre os 90 e 105 dias, é notável que plantas controle continuaram em desenvolvimento tanto vegetativo quanto reprodutivo, enquanto os tratamentos T₂, T₃ e T₄ mostram já uma clara senescência das plantas.

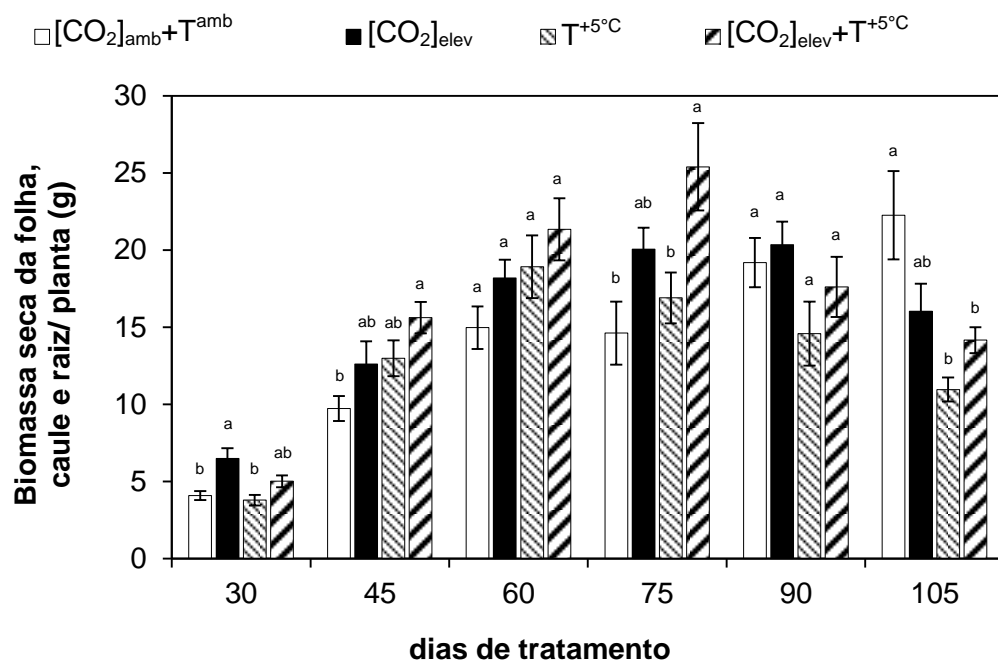


Figura 10. Biomassa seca total das partes vegetativas da cultivar ‘MG/BR–46 Conquista’ de soja sob T₁: [CO₂]_{amb}+Tem^{amb}; T₂: [CO₂]_{elev}; T₃: T^{+5°C} e T₄: [CO₂]_{elev}+T^{+5°C}. As barras representam a média aritmética ± erro padrão da média (n=5). Médias com a mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0.05).

4.2.1 Massa específica foliar (MEF)

A MEF relaciona a massa foliar com a área da folha. As diferenças entre valores de MEF foram significativos em todos os períodos de coleta. O efeito do tratamento T₄ levou a valores altos de MEF a partir de 45 dias (Figura 11). Aos 60 dias, período que corresponde ao estágio R₃ (início da formação de vagens; Figura 5), os valores correspondentes ao tratamento T₂ foram inferiores ao controle e aos dois outros tratamentos.

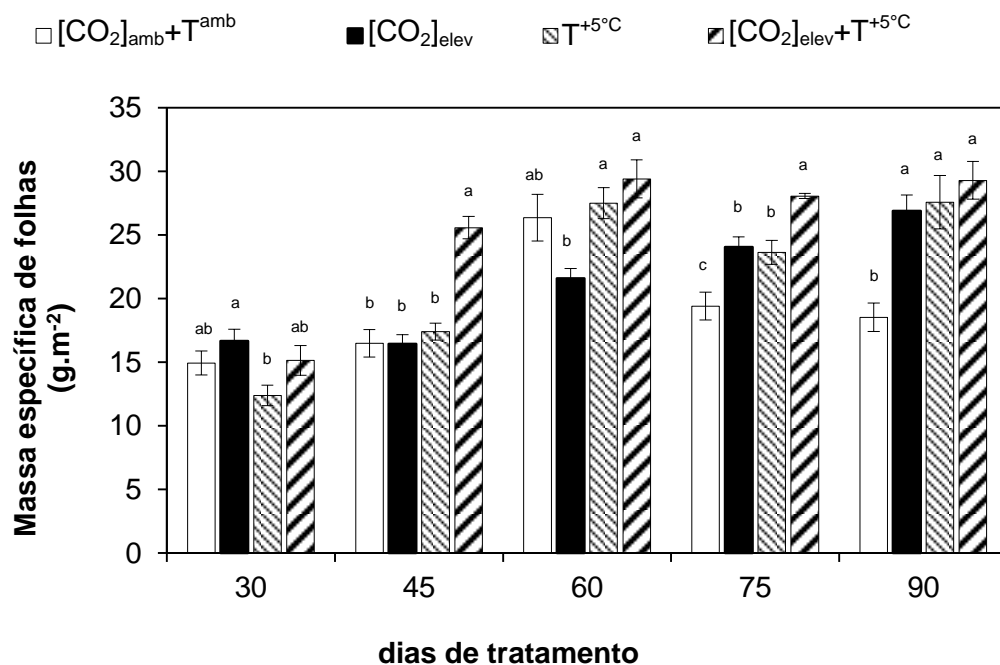


Figura 11. Massa específica das folhas (g.m⁻²) da cultivar ‘MG/BR-46 Conquista’ de soja sob T₁: [CO₂]_{amb}+T^{amb}; T₂: [CO₂]_{elev}; T₃: T^{+5°C} e T₄: [CO₂]_{elev}+T^{+5°C}. As barras representam a média aritmética ± erro padrão da média (n=5). Médias com a mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0.05).

4.2.2 Clorofilas a, b e totais

Os tratamentos T₂, T₃ e T₄ geraram diminuição na concentração de ambas clorofilas, a e b (Figura 12). Os teores de clorofila a correspondentes aos três tratamentos foram significativamente inferiores aos do controle, enquanto os de clorofila b somente aos 60 (p=0.0011) e 90 (p=0.0049) dias. Os teores de clorofila total só não foram significativamente distintos aos 45 dias. A concentração de clorofila a foi quase três vezes maior que a clorofila b, com tendência a aumentar no estágio vegetativo e começo do reprodutivo (30, 45 e 60 dias) e diminuir no amadurecimento do grão (75 e 90 dias) (Figura 12).

Por outro lado, o efeito do tratamento T₂ foi maior aos 30 dias (estádio exclusivamente vegetativo) diminuindo a concentração de clorofila a e b em 53% e 32%, respectivamente; entanto o efeito da temperatura elevada (T₃) foi maior aos 60 e 90 dias na clorofila a (-39%, -37%) e clorofila b (-32%, -50%). O efeito do acoplamento dos dois

parâmetros (T_4) foi principalmente aos 45 e 75 dias com -28% e -32% na clorofila *a* e -11% e -15% na clorofila *b*, não mostrando significância.

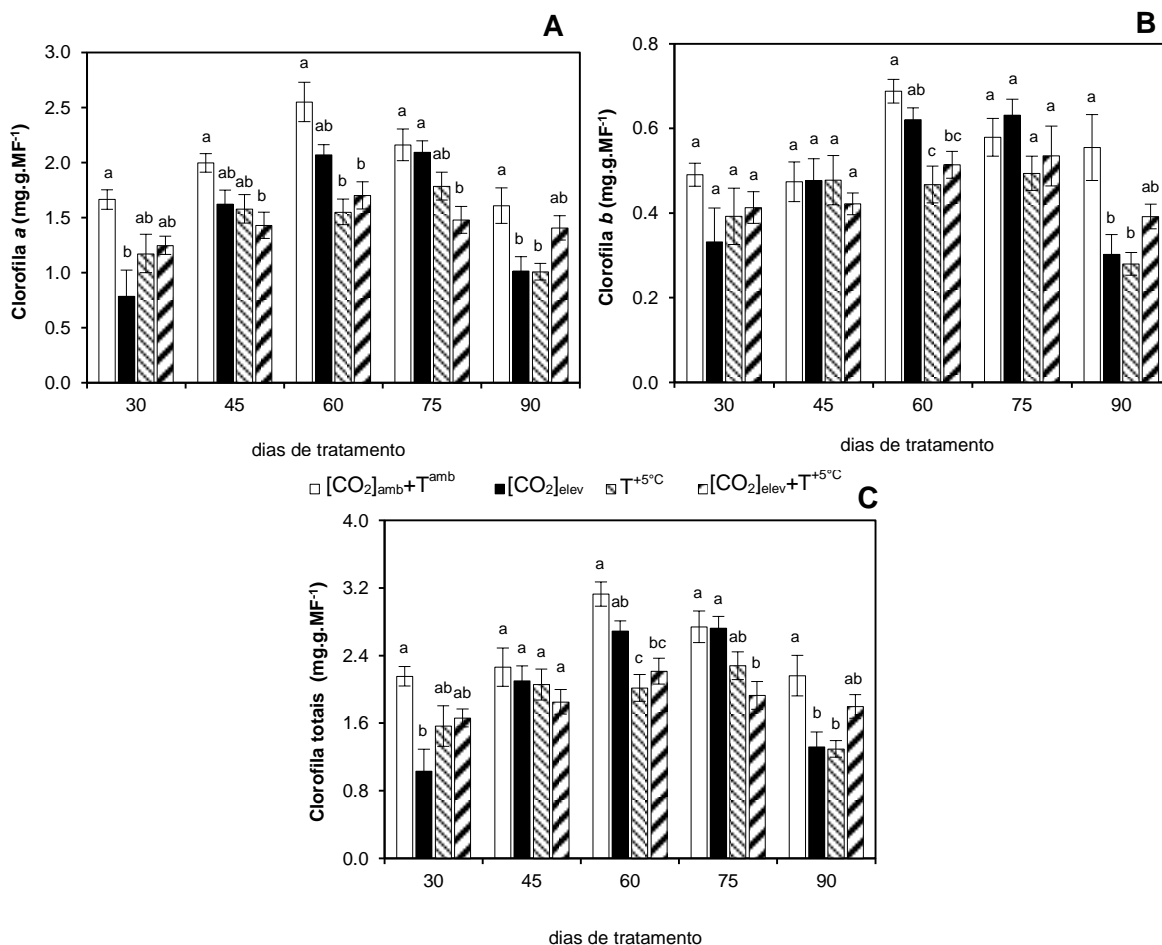


Figura 12. Teores de clorofila *a* (A), *b* (B) e total (C) da cultivar 'MG/BR-46 Conquista' de soja sob T_1 : [CO₂]_{amb}+T^{amb}, T_2 : [CO₂]_{elev}, T_3 : T^{+5°C} e T_4 : [CO₂]_{elev}+T^{+5°C}. As barras representam a média aritmética ± erro padrão da média (n=5). Médias com a mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0.05).

4.2.3 Cera foliar epicuticular

Os teores de cera foliar foram avaliados no estágio de floração (R1, 45 dias) e durante o desenvolvimento do grão (R5, 75 dias, e R6, 90 dias). Nos dois primeiros estádios avaliados, foram observados maiores teores de cera foliar que no último estágio

(90 dias), sendo que aos 45 dias o acúmulo de cera sob o tratamento T₃ foi semelhante ao controle, enquanto sob o tratamento T₂ foi semelhante a T₄. Tanto T₂ quanto T₄ produziram maiores efeitos, mas não significativos, relativamente ao controle. Aos 75 dias, o tratamento T₂ induziu maior teor de cera, equivalente a 268% (p<.0001) em relação ao controle. Aos 90 dias, o tratamento T₃ induziu maior teor (53%, p<.0001).

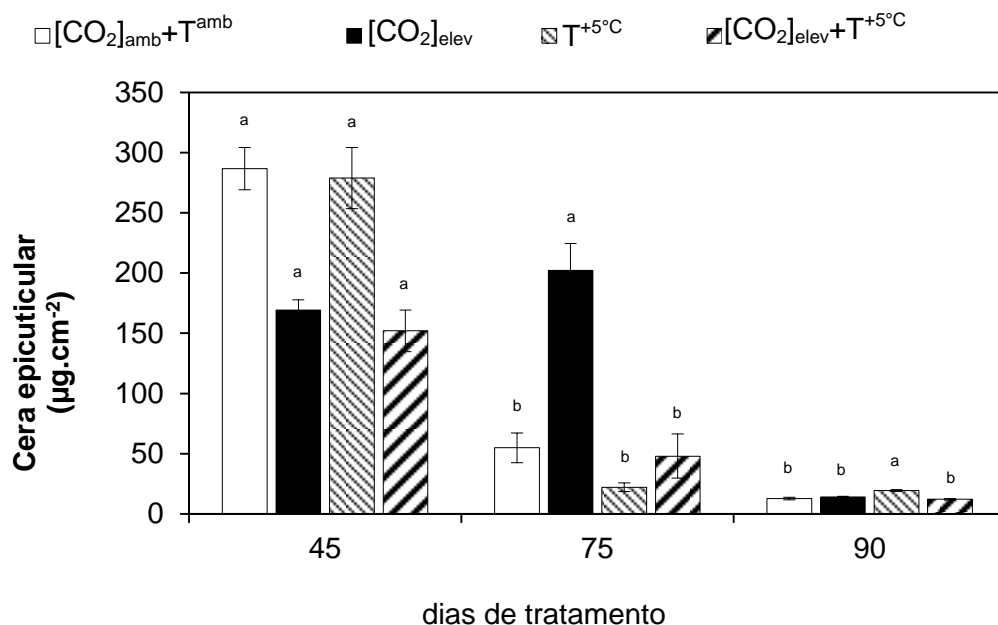


Figura 13. Ceras totais ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) da cultivar ‘MG/BR-46 Conquista’ de soja sob T₁: [CO₂]_{amb}+T^{amb}; T₂: [CO₂]_{elev}; T₃: T^{+5°C} e T₄: [CO₂]_{elev}+T^{+5°C}. As barras representam a média aritmética \pm erro padrão da média (n=5). Médias com a mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0.05).

4.2.4 Carboidratos não-estruturais e amido

O amido armazenado nos grãos tende a diminuir naturalmente ao longo do tempo (Hills, 2004). Essa diminuição foi significativamente estimulada (p=0.0007) aos 105 dias nos tratamentos de gás carbônico elevado (T₂) e gás carbônico elevado e temperatura elevada (T₄). Aos 75 dias, o valor correspondente a T₂ foi significativamente maior (77 $\mu\text{g}/\text{mgMS}^{-1}$; p=0.0207), entanto aos 90 dias o T₄ apresentou menor concentração (28.4 $\mu\text{g}/\text{mgMS}^{-1}$) o que poderia inferirse como maior consumo para formação dos açúcares,

principalmente. O efeito da temperatura elevada (T_3) estimulou a diminuição do amido em menor grau em relação aos tratamentos T_2 e T_4 (Figura 14A).

Os resultados mostram que o início da diminuição do amido nos grãos pode estar relacionado ao início do amadurecimento do grão, sendo que a degradação de amido nos últimos estádios da planta é concomitante ao aumento dos sacarídeos solúveis, sugerindo que amido é convertido em sacarídeos solúveis, principalmente dissacarídeos (sacarose) e oligossacarídeos (rafinose) (Figura 14A, 14B e 14F). A sacarose foi o açúcar não-estrutural mais abundante, principalmente aos 105 dias (Figura 14B), seguido por rafinose (Figura 14F). No início do desenvolvimento do grão (75 dias), o teor de mio-inositol foi próximo ao de sacarose, assim como de glicose ao de rafinose.

No desenvolvimento do grão de soja os teores de amido, frutose e mio-inositol diminuíram gradativamente, enquanto os de sacarose, glicose e rafinose tenderam a aumentar (Figura 14).

O tratamento T_3 levou a uma tendência não significativa de redução no teor de sacarose aos 90 e 105 dias ($31.8 \mu\text{g}/\text{mgMS}^{-1}$; $p= 0.0007$), comparado ao controle, sendo os tratamentos T_2 e T_4 os que levaram a incrementos significativos. Portanto, parece que a temperatura isoladamente diminui o acúmulo de sacarose (Figura 14B).

O teor de frutose diminui na transição 75-90 dias; no entanto, o efeito de T_3 estimulou o seu acúmulo (23%, 31% e 6% aos 75, 90 e 105 dias, respectivamente), sendo altamente significativo no início do desenvolvimento ($p<0.0001$), período que coincidiu com o maior acúmulo, comparado aos dois tratamentos e controle (Figura 14C). O efeito do tratamentos T_2 e T_4 , produziram menor concentração de frutose ao longo do desenvolvimento do grão (Figura 14C).

Ao contrário da frutose, o teor de glicose tendeu a aumentar ao longo do experimento. O tratamento T_3 estimulou o acúmulo do açúcar ao longo do experimento. A presença de CO_2 elevado (tratamento T_2) e o acoplamento dos dois parâmetros (CO_2 elevado e temperatura elevada - tratamento T_4) levaram à redução no teor de glicose, relativamente ao controle, principalmente aos 105 dias (Figura 14D).

O teor de mio-inositol diminuiu ao longo do experimento (Figura 14E), com os teores referentes a T_3 mais elevados aos 75 ($15.6 \mu\text{g}/\text{mgMS}^{-1}$, $p=<.0001$) e 90 ($7.8 \mu\text{g}/\text{mgMS}^{-1}$, $p=0.0018$) dias. O tratamento T_2 levou a valores inferiores ao controle, por exemplo $7.9 \mu\text{g}/\text{mgMS}^{-1}$ aos 75 dias. O tratamento T_4 resultou em valores intermediários entre T_2 e T_3 ao longo do experimento (Figura 14E).

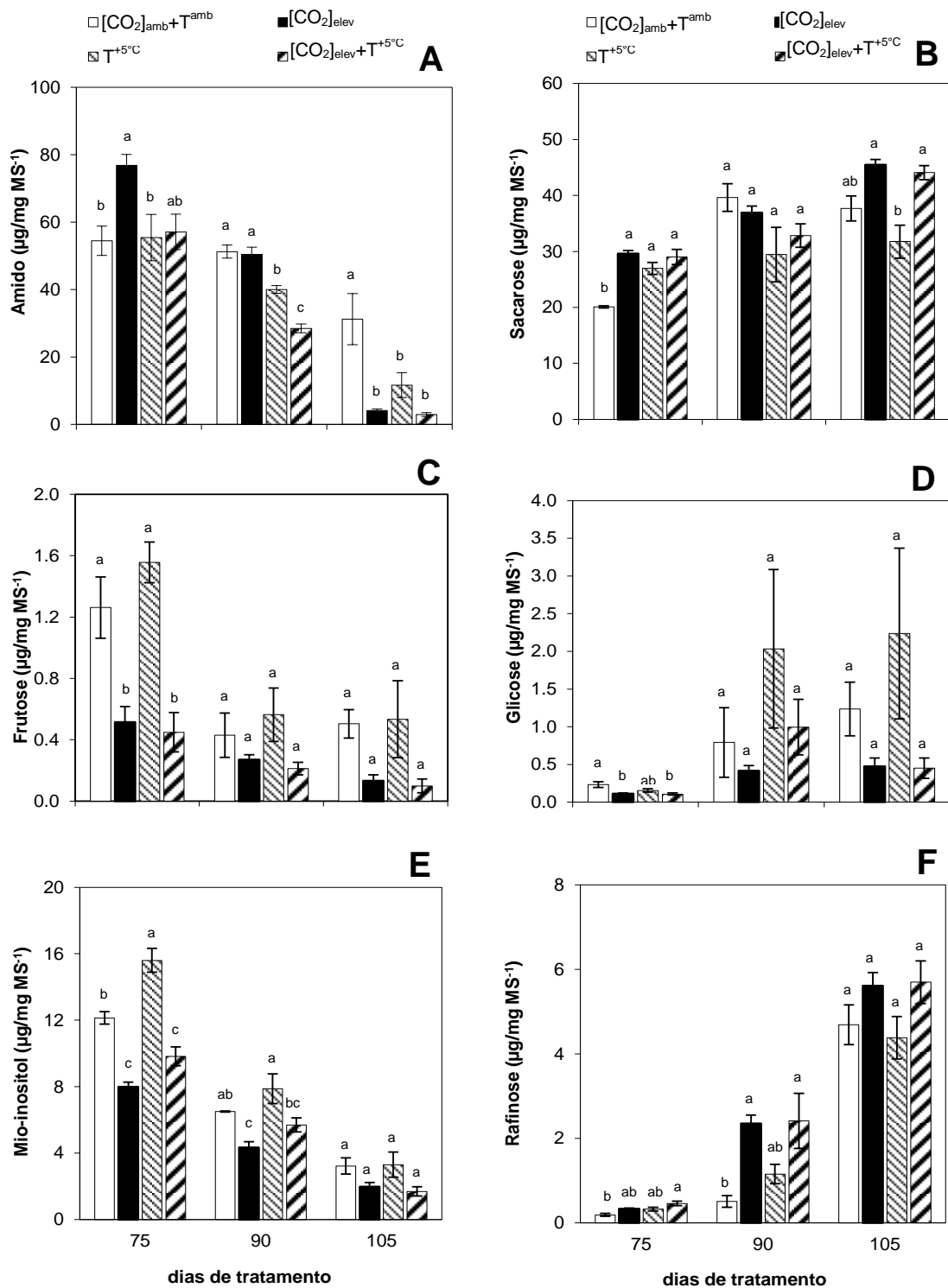


Figura 14. Conteúdo de amido e açúcares não estruturais de grãos da cultivar 'MG/BR-46 Conquista' de soja sob T_1 : $[\text{CO}_2]_{\text{amb}} + T^{\text{amb}}$; T_2 : $[\text{CO}_2]_{\text{elev}}$; T_3 : $T^{+5^\circ\text{C}}$ e T_4 : $[\text{CO}_2]_{\text{elev}} + T^{+5^\circ\text{C}}$. As barras representam a média aritmética \pm erro padrão da média ($n=5$). Médias com a mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Os teores de rafinose revelaram tendência oposta aos do mio-inositol, com elevação gradual ao longo do experimento (Figura 14F) .Os tratamentos apresentaram efeitos positivos ao longo do tempo, relativamente ao controle, com os tratamentos T₂ e T₄ mais marcantes, principalmente ao 90 (366% e 379%, respectivamente) e 105 dias (20% e 22%, respectivamente) (Figura 14F).

4.2.5 Proteínas solúveis

As proteínas solúveis armazenadas no grão de soja mostraram aumento significativo ao longo do experimento ($p=0.0200$; $p=0.0157$ e $p=0.0015$ aos 75, 90 e 105 dias, respectivamente). Aos 90 dias de experimento, o tratamento T₂ é maior em 26% em relação às plantas controle, mostrando igualdade no período seguinte (105 dias). O tratamento com temperatura elevada (T₃), mostrou menor concentração de proteínas em dois períodos (-17% e -18% aos 75 e 105 dias, respectivamente), embora tenha apresentado ganho aos 90 dias (10%). Aos 75 dias, o tratamento T₄ destaca-se significativamente (20% em relação ao controle), sendo aos 90 e 105 dias significativamente igual ao tratamento T₂ (Figura 15).

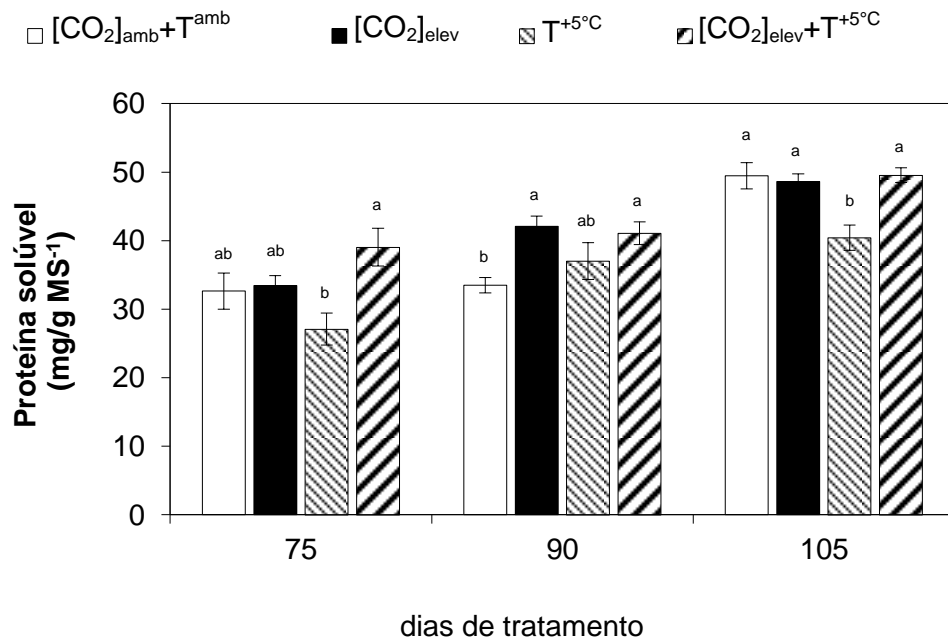


Figura 15. Teor de proteína solúvel em grão da cultivar ‘MG/BR-46 Conquista’ de soja sob T₁: [CO₂]_{amb}+T^{amb}; T₂: [CO₂]_{elev}; T₃: T^{+5°C} e T₄: [CO₂]_{elev}+T^{+5°C}. As barras representam a média aritmética ± erro padrão da média (n=5). Médias com a mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0.05).

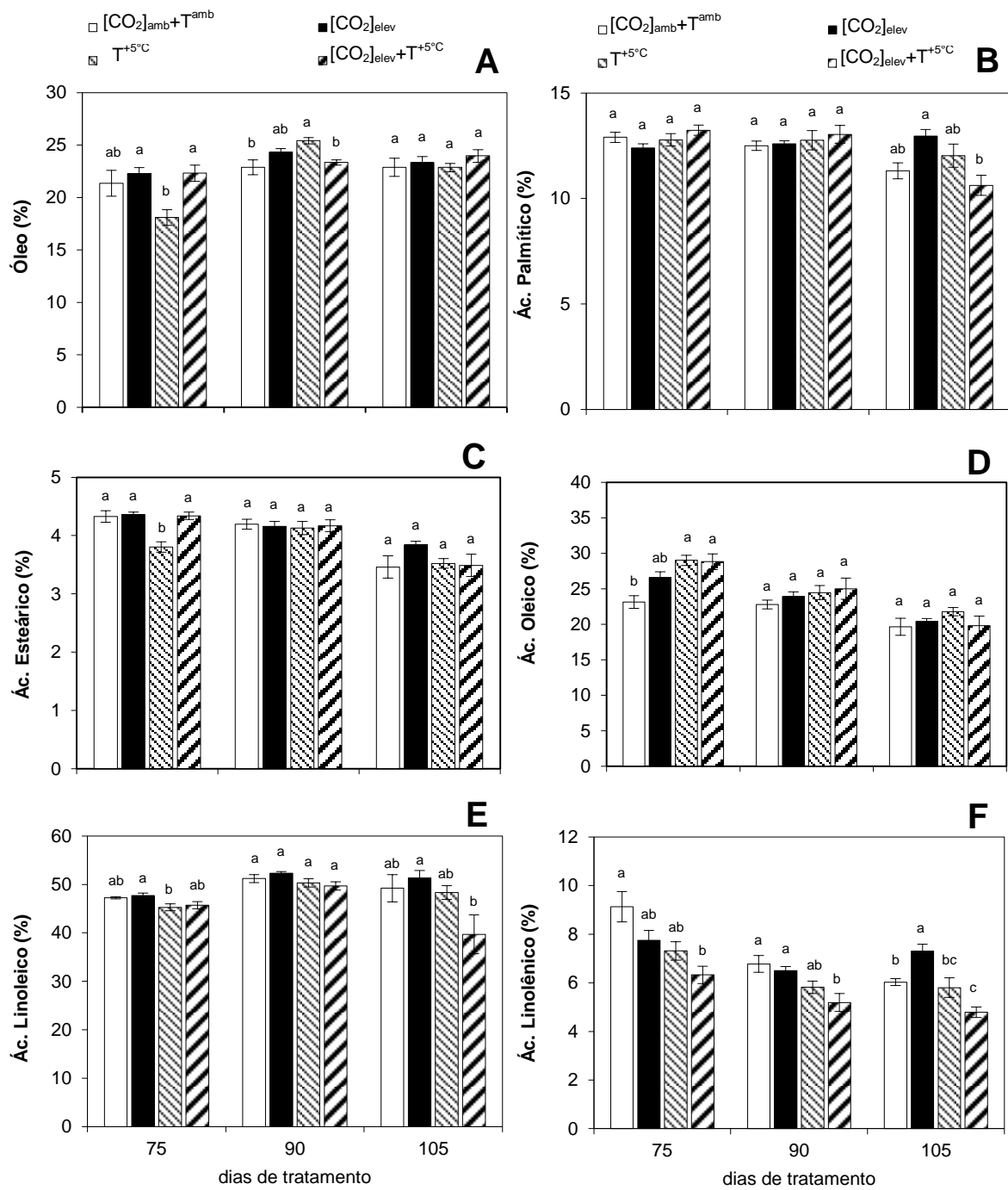
4.2.6 Lipídeos e composição dos principais ácidos graxos

As médias dos tratamentos do teor de óleo mostraram diferenças significativas aos 75 (p=0.0104) e 90 (p=0.0039) dias (Figura 16A). Aos 105 dias, os tratamentos T₂ e T₃ diminuíram em 4% e 10%, respectivamente em relação ao estágio anterior, assim como o tratamento T₄ mostrou aumento de 2%. O tratamento com temperatura elevada (T₃) resultou em menor teor de óleo aos 75 dias (-15%) e maior aos 90 dias (11%) (Figura 16A).

Em relação à distribuição dos ácidos graxos no óleo de soja, observa-se a predominância dos ácidos graxos insaturados em relação aos saturados. A Figura 16G e 16H mostram as somas dos ácidos graxos saturados e os ácidos graxos insaturados, respectivamente; dentre os insaturados, destaca-se o ácido graxo principal dos grãos de soja, o linoleico (C_{18:2}) (Figura 16E), com valores médios entre 40 e 52% de abundância relativa; o segundo ácido predominante, o ácido oleico (C_{18:1}) (Figura 16D), com valores

entre 19 e 29% de abundância relativa. Outro ácido graxo importante, mas em menor proporção, foi o ácido linolênico ($C_{18:3}$), com abundância relativa entre 4 e 9% (Figura 16F). A fração saturada dos ácidos graxos é composta por os ácidos palmítico ($C_{16:0}$) e esteárico ($C_{20:0}$), sendo o primeiro mais abundante que o segundo (Figura 16B e 16C). No presente estudo, foram identificados outros ácidos graxos: mirístico ($C_{14:0}$), palmitoleico ($C_{16:1}$), araquídico ($C_{20:0}$), gadoleico ($C_{20:1}$), beênico ($C_{22:0}$) e erúcico ($C_{22:1}$), mas foram desconsiderados por não estar presentes em todos os cromatogramas, além de mostrarem-se em alguns casos em concentrações inferiores a 1% e não terem importância comercial nos grãos de soja.

Os ácidos graxos que mostraram diferenças significativas no início do enchimento do grão (75 dias) foram o esteárico ($p=0.0002$), oleico ($p=0.0008$) e linoleico ($p=0.0275$). No amadurecimento do grão (105 dias), o ácido palmítico ($p=0.0105$) e novamente o ácido linoleico mostraram significância ($p=0.0348$). O ácido linolênico apresentou diferenças estatísticas significativas nos três estádios amostrados (90 dias, $p=0.0040$; 75 dias, $p=0.0071$ e 105 dias, $p<.0001$). Pelos gráficos, observa-se uma clara tendência decrescente dos ácidos graxos, tanto saturados quanto insaturados, sendo principalmente notórios aos 105 dias.



Continua...

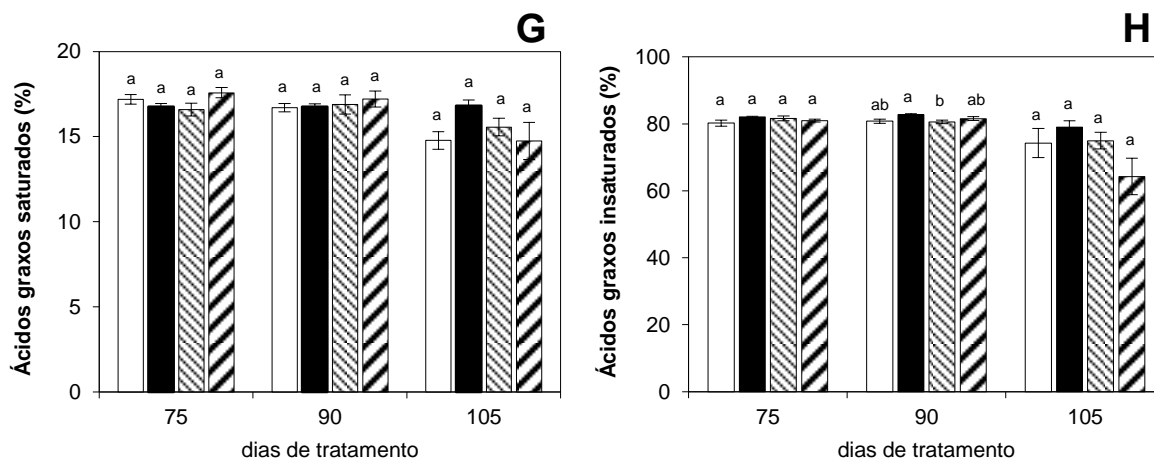


Figura 16. Teor de óleo (%) e composição dos principais ácidos graxos em grão da cultivar 'MG/BR-46 Conquista' de soja sob T₁: [CO₂]_{amb}+T^{amb}; T₂: [CO₂]_{elev}; T₃: T^{+5°C} e T₄: [CO₂]_{elev}+T^{+5°C}. As barras representam a média aritmética ± erro padrão da média (n=5). Médias com a mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0.05).

O ácido palmítico mostrou-se com abundância constante aos 75 e 90 dias, embora aos 105 dias, nos tratamentos T₂, T₃ e T₄ e mesmo plantas controle, suas abundâncias tenham diminuído (Figura 16B).

O teor de ácido esteárico foi reduzido no tratamento T₃ (12%) aos 75 dias; no entanto, aos 90 dias, os tratamentos mostraram em média um aumento percentual de 4.2%. Aos 105 dias, mesmo diminuindo a quantidade do ácido esteárico, o tratamento enriquecido com gás carbônico (T₂) aumentou 11% em relação ao controle, mas sem mostrar significância (Figura 16C).

Variações nos teores de ácido oleico mostraram significância aos 75 dias, ao aumentar em 15%, 25% e 24% nos tratamentos T₂, T₃ e T₄, respectivamente, contrastando com os aumentos não significativos nos estádios seguintes (Figura 16D).

As abundâncias relativas de ácido linoleico aumentaram do período 75–90 dias em todos os tratamentos. Aos 105 dias, os teores aumentaram significativamente nos tratamentos, mas diminuíram nos tratamentos T₃ e T₄ (2% e 19%, respectivamente) (Figura 16E).

O ácido linolênico apresentou tendência decrescente durante o desenvolvimento

do grão. Além disso, o efeito de cada tratamento reduz o teor do ácido em cada estágio amostrado, com exceção do tratamento T₂, que aos 105 dias provocou aumento em 21% em relação ao controle (Figura 16F).

4.2.7 Conteúdo de carbono e nitrogênio

Os teores de carbono nos grãos variaram significativamente nos três períodos de coleta: 75 dias, $p < 0.0001$; 90 dias, $p = 0.0348$; 105 dias, $p = 0.0003$. De fato, a presença de gás carbônico elevado em T₂ favoreceu o maior acúmulo de carbono aos 75 (3%), 90 (2%) e 105 (4%) dias; do mesmo modo, o tratamento T₄ resultou em mais 2%, 1% e 2% aos 75, 90 e 105 dias, respectivamente. Por outro lado, T₃ iniciou com -3% (75 dias) para posteriormente aumentar em 1% e 4% aos 90 e 105 dias, respectivamente, o que quer dizer que o efeito da temperatura reduziu o acúmulo de carbono nos grãos (Figura 17A).

O teor de nitrogênio foi significativamente distinto aos 75 dias ($p = 0.0100$) e observa-se que os tratamentos com gás carbônico elevado (T₂) e temperatura elevada (T₃) geraram efeitos inversos. O tratamento T₂ diminuiu e o T₃ aumentou o acúmulo de nitrogênio total nos grãos; no entanto, o acoplamento dos parâmetros (T₄) atrasou o armazenamento de nitrogênio, mas ao 105 dias atingiu nível maior que o controle, embora não supere a quantidade de nitrogênio do tratamento T₃ (Figura 17B).

A relação carbono e nitrogênio (C/N) dos tratamentos mostraram alta significância aos 75 dias ($p < 0.0001$) mostrando que os tratamentos T₂ e T₄ induziram o aumento em 13% e 10%, respectivamente; não obstante, a relação foi 4% menor com o tratamento T₃, devido à redução do nível de C carbono mostrado na Figura 18A. Nas duas coletas seguintes (90 e 105 dias), os tratamentos não mostraram significância, embora tenham permanecido com a mesma tendência dos 75 dias (Figura 17C).

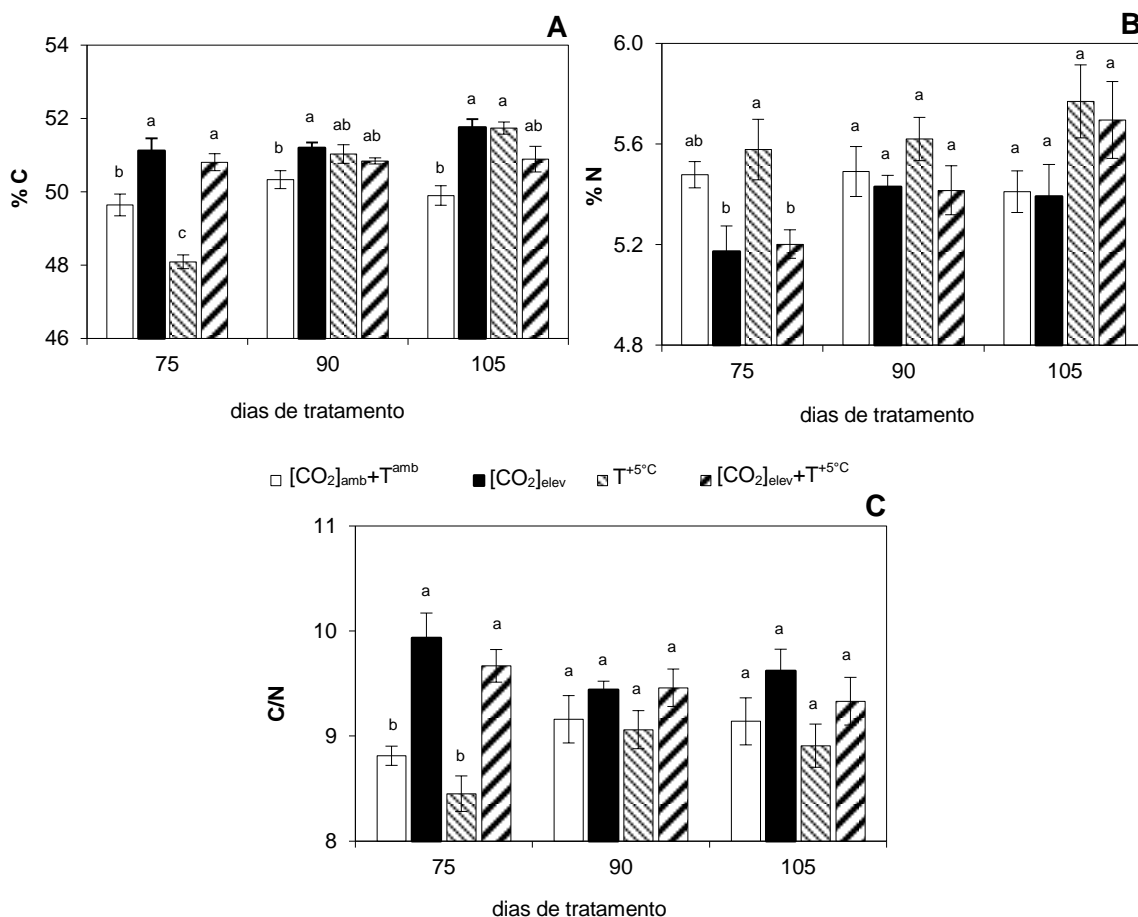


Figura 17. Acumulo de Carbono (%) (A) e Nitrogênio (%) (B); Relação C/N (C) em grão da cultivar 'MG/BR-46 Conquista' de soja sob T₁: [CO₂]_{amb}+T^{amb}; T₂: [CO₂]_{elev}; T₃: T^{+5°C} e T₄: [CO₂]_{elev}+T^{+5°C}. As barras representam a média aritmética ± erro padrão da média (n=5). Médias com a mesma letra, no mesmo período, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0.05).

Análise bivariada (correlação)

No Anexo 1 é apresentada a tabela de correlações entre as variáveis de biomassa dos grãos e sua composição química (carbono, proteínas e lipídeos) para cada tratamento experimental.

A biomassa e o teor de carbono dos grãos correlacionam-se positiva e significativamente no tratamento sob temperatura elevada (T₃) (r=0.898). Dessa forma, a relação da biomassa e o teor de carbono frente aos açúcares solúveis são semelhantes.

Cabe indicar que nas Figuras 9 (A) e 17 (A) são coerentes a menor formação de biomassa dos grãos e o demorado acúmulo de carbono para as plantas do tratamento T₃.

Para o amido, a correlação é negativa em relação aos teores de carbono e biomassa dos grãos, sendo significativa nos tratamentos T₃ ($r=-0.769$) do teor de carbono e T₂ ($r=-0.946$), T₃ ($r=-0.742$) e T₄ ($r=-0.798$) da biomassa dos grãos. A correlação negativa com o teor de amido provém da tendência a diminuir ao longo do tempo, observada na Figura 14A, acentuando-se ainda mais pela presença de altas concentrações de gás carbônico (CO₂).

A frutose correlaciona-se negativamente em relação ao teor de carbono e biomassa do grão, sendo significativa nos tratamentos T₂ ($r=-0.611$) e T₃ ($r=-0.758$) do conteúdo de carbono; também em relação à biomassa dos grãos, todos os tratamentos resultaram significativos ($r_{\text{controle}}=-0.737$, $r_{T_2}=-0.713$, $r_{T_3}=-0.776$ e $r_{T_4}=-0.633$).

O mio-inositol correlaciona-se negativamente em relação ao teor de carbono e biomassa dos grãos, a correlação sendo forte no tratamento T₃ ($r=-0.914$) com o teor de carbono. Também com a biomassa dos grãos todas as correlações são significativas, semelhantes às da frutose. A forte correlação negativa do mio-inositol no tratamento T₃ é complementada com a Figura 14E, na qual se observa que o tratamento T₃ gerou maior concentração do açúcar solúvel aos 75 dias e uma acelerada translocação para a biossíntese da rafinose, observada no período de 90-105 dias na Figura 14F.

A sacarose correlaciona-se positivamente com o aumento do teor de carbono e da biomassa dos grãos (aumento observado na Figura 14B), mostrando significância unicamente com a biomassa dos grãos no controle ($r_{\text{controle}}=0.771$), gás carbônico elevado (T₂) e gás carbônico e temperatura elevada (T₄) ($r_{T_2}=0.941$ e $r_{T_4}=0.615$, respectivamente), com o que se infere que devido ao efeito da temperatura elevada (T₃) se perde a correlação com o aumento da biomassa dos grãos. De fato, a correlação é menor em T₄ devido à temperatura elevada aplicada no tratamento.

A glicose mostra correlação positiva em relação ao teor de carbono e biomassa dos grãos, sendo significativa no tratamento T₂ ($r=0.699$) com a biomassa dos grãos. Na Figura 9A, observa-se que a biomassa dos grãos no tratamento T₂ aumenta significativamente em relação aos outros tratamentos, sendo um forte indicativo para gerar fortes correlações com os açúcares analisados.

A rafinose correlaciona-se positivamente com o teor de carbono e biomassa dos grãos, mostrando significância no tratamento T_3 ($r=0.696$) com o teor de carbono e com a biomassa dos grãos em todos os tratamentos.

De modo geral, a sacarose, glicose e rafinose, que apresentam correlações positivas para a biomassa e teor de carbono do grão, mantêm fortes correlações positivas entre si nos tratamentos com elevadas concentrações de gás carbônico (T_2 e T_4). Já o efeito da elevada temperatura (T_3) gera correlação negativa entre a glicose e a sacarose, pois promove maiores teores de glicose e menores de sacarose, como se observa nas Figuras 14D e 14B, respectivamente. O amido, frutose e mio-inositol, que mantêm correlações negativas com a biomassa e teor de carbono dos grãos, apresentam correlações mais fortes, positivas e significativas entre si em relação a todos os tratamentos.

Os tratamentos T_3 e T_4 geram correlações significativas entre o teor de óleo e o de carbono e a biomassa dos grãos. O efeito da temperatura elevada (T_3) gera correlação positiva entre os teores de óleo e carbono ($r=0.821$), assim como entre o teor de óleo e a biomassa dos grãos ($r=0.779$). Em contraste o efeito do aumento de CO_2 e temperatura elevada (T_4) inverte a correlação entre os teores de óleo e carbono, tornando-a negativa ($r=-0.604$) e diminui a correlação entre o teor de óleo e a biomassa dos grãos ($r=0.585$). Na Figura 9A, o tratamento T_3 apresenta menor biomassa dos grãos, portanto a correlação positiva entre o teor de óleo indicaria que há menor teor de óleo sob temperaturas elevadas, principalmente aos 75 dias, período em que o teor de óleo foi significativamente mais baixo (Figura 16A).

Os ácidos graxos correlacionam-se negativamente com o teor de carbono. No tratamento com temperatura elevada (T_3) observa-se correlação negativa dos ácidos oleico ($r=-0.834$), linoleico ($r=0.587$) e linolênico ($r=-0.702$), respectivamente, em relação ao teor de carbono. Porém, o ácido linoleico correlaciona-se positivamente, indicando que sob elevada temperatura a planta otimiza a formação de seu ácido graxo principal, dependendo do carbono assimilado no início da formação dos grãos (Figuras 16E e 17A). Parece haver a tendência dos teores dos ácidos oleico e linolênico de diminuir ao longo do desenvolvimento do grão (Figuras 16D e 16F).

Nas plantas controle, os ácidos palmítico, esteárico e linolênico mostraram correlação negativa e significativa com a biomassa dos grãos, independentemente dos tratamentos. No tratamento sob CO_2 elevado (T_2), o ácido esteárico ($r=-0.81$) e o oleico

($r=-0.84$) mantiveram a correlação negativa, enquanto o linoleico ($r=0.615$) mostrou correlação positiva com o aumento da biomassa dos grãos. De modo similar ao que foi visto na correlação com o conteúdo de carbono, o ácido linoleico aumenta também conforme aumenta a biomassa dos grãos, mas nesse caso por efeito do gás carbônico, principalmente por ser o ácido graxo de maior concentração em grãos de soja. Os efeitos significativos dos tratamentos T_3 e T_4 direcionam negativamente à biossíntese dos ácidos oleico e linolênico. A correlação entre o teor de óleo e o teor de ácido linolênico foi negativa nos tratamentos T_2 ($r=-0.625$), T_3 ($r=-0.727$) e T_4 ($r=-0.555$).

Entre os ácidos graxos, o linolênico mostra correlação positiva para o palmítico, esteárico e oleico no controle e no tratamento T_4 ; porém, quando se levam em consideração os teores individuais desses ácidos graxos nos tratamentos T_2 e T_3 observa-se a perda de correlação. Todavia, no tratamento T_4 foram observadas, correlações positivas de palmítico com esteárico, esteárico com oleico e oleico com linoleico. Os dados não forneceram informações suficientes para estabelecer uma correlação significativa entre os ácidos linoleico e linolênico.

O teor de óleo não mostrou correlação significativa com a rafinose e sacarose (principais açúcares cujas concentrações aumentam), embora as correlações dos ácidos graxos com esses açúcares sejam fortes e negativas, principalmente nos tratamentos T_2 e T_4 . Contudo, cabe destacar que a rafinose mostrou uma correlação forte e negativa, já desde o controle, com os ácidos palmítico, esteárico, oleico e linolênico, ao contrário da sacarose, que não apresentou correlação no controle para esses ácidos graxos.

As proteínas solúveis e a biomassa dos grãos correlacionam-se positiva e significativamente em todos os tratamentos, inclusive no controle, mostrando que com o aumento da biomassa há um aumento concomitante das proteínas ao longo do desenvolvimento (Figura 15). Portanto, as correlações entre as proteínas solúveis e os açúcares solúveis foram semelhantes às correlações entre os açúcares solúveis (Figura 14) e a biomassa dos grãos (Figura 9A). Entre os ácidos graxos e as proteínas, as correlações também foram semelhantes aos mostrado entre os ácidos graxos e a biomassa do grão (explicados em parágrafos acima). Por outro lado, a correlação positiva entre as proteínas solúveis e o teor de óleo deve-se ao potencial genético do cultivar em promover o incremento concomitante de ambas variáveis ao longo do desenvolvimento do grão.

O tratamento T₄ provocou correlação positiva entre o teor de nitrogênio total e as variáveis de biomassa do grão e proteínas solúveis, não mostradas em outros tratamentos.

Análise multivariada utilizando o método de Análise de Componentes Principais (PCA)

Na Tabela 5 são apresentados os resultados da análise de componentes principais realizadas a partir dos dados coletados ao longo do desenvolvimento do grão. Os dois componentes principais a serem explorados foram o PC1 e PC2, pois quando somados representam 57.4% da variação presente na matriz original. No anexo 2 são mostrados a matriz completa dos resultados dessa análise de componente principal (PC1-PC15).

As proporções calculadas a partir dos autovalores, mostram que 42.4% da variação original pode ser atribuída ao primeiro componente (PC1) e 15% ao segundo componente (PC2) (Tabela 5A). Na Tabela 5B são mostrados os fatores que correspondem a contribuição das variáveis independentes para formação de cada um dos eixos. Os fatores de cada componente principal considerados com maior contribuição foram as que possuíam valores acima de 0.300 (Field, 2005).

No PC1 os valores de maior contribuição foram: amido (0.322), mio-inositol (0.373), as quais se opuseram rafinose (-0.353), sacarose (-0.305) e proteínas solúveis (-0.333), sendo que o maior vetor foi mio-inositol. Para esse componente foi visto que quanto maior a concentração de mio-inositol maior a concentração de amido e menor a concentração de rafinose, proteínas solúveis e sacarose (Tabela 5B). No PC2 as maiores contribuições positivas foram dadas por os teores de carbono (0.373), óleo (0.357), esteárico (0.439), linoleico (0.344), as quais se opuseram frutose (-0.346) e nitrogênio total (-0.315). Neste componente quanto maior foi o teor de carbono maior foram as variáveis do teor de óleo, esteárico e linoleico e menor os valores de frutose e nitrogênio total.

Em relação ao primeiro e segundo eixos principais (PC1 e PC2) foi realizado o gráfico do tipo biplots de distâncias, observado na Figura 18 a distribuição dos centróides por data de coleta (75, 90 e 105 dias) e tratamentos (indicado por símbolos geométricos). A distribuição das variáveis são comprovadas nas gráficas observadas do experimento.

Tabela 5 Autovalores e proporções de variância correspondentes a PC1 e PC2 gerados pela análise de componentes principais (PCA). B. Valores dos coeficientes calculados para cada uma das variáveis analisadas ao longo do desenvolvimento do grão. A análise contempla as coletas de desenvolvimento do grão (75, 90 e 105 dias) e todos os indivíduos coletados dos quatro tratamentos (T_1 : $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}+T^{\text{amb}}$; T_2 : $[\text{CO}_2]_{\text{elev}}$; T_3 : $T^{+5^\circ\text{C}}$ e T_4 : $[\text{CO}_2]_{\text{elev}}+T^{+5^\circ\text{C}}$) (n=60). Valores em negrito são vetores considerados mais significativos.

A.	PC1	PC2
Autovalor	6.3566	2.2467
Proporção (%)	42.4	15
B.	PC1	PC2
Carbono	-0.236	0.374
Nitrogênio	-0.090	-0.314
Proteína solúvel	-0.333	0.096
Óleo	-0.228	0.359
Palmítico	0.203	0.292
Estearico	0.237	0.440
Oleico	0.257	0.144
Linoleico	0.036	0.347
Linolênico	0.252	0.023
Amido	0.322	0.194
Frutose	0.287	-0.342
Glicose	-0.048	-0.078
Mio-inositol	0.373	-0.131
Rafinose	-0.352	-0.150
Sacarose	-0.305	0.056

A compreensão da Figura biplot de distância (Fig. 18) pode ser explicada da seguinte forma:

Primeiro - A distribuição das variáveis representados por vetores foram agrupados segundo suas maiores concentrações ao longo do desenvolvimento do grão de forma que aos 75 dias: frutose, mio-inositol, linolênico, oleico e amido são os metabolitos mais representativo, seguidamente aos 90 dias: palmítico, esteárico, linoleico, óleo e conteúdo de carbono e nitrogênio total obtem valores mais elevados e por último aos 105 dias: proteínas, sacarose e rafinose. Por tanto, à direita do PC1 (eixo horizontal) encontrase os metabolitos com maior concentração aos 75 dias, assim como à esquerda os de maior concentração para os 105 dias. Do mesmo modo o PC2 (eixo vertical) os metabolitos de maior teor encontram-se acima e os de menor teor abaixo, sendo o grupo dos 90 dias os mais representativos neste componente. A glicose foi desconsiderada por não ter um fator relevante nos componentes analisados (PC1 e PC2), porém a gráfica com PC3 explique melhor sua distribuição (fator=0.712, anexo 2). Dessa forma, permite integrar a tendência de cada metabolito analisado longo do tempo.

Segundo – Dentro de cada período de coleta (75, 90 e 105 dias), os tratamentos são representados por centróides de onde podemos observar que aos 75 dias o tratamento com temperatura elevada e controle encontrase mais distante, já os efeitos dos tratamentos com gás carbônico elevado (T_2) e gás carbônico elevado e temperatura elevada (T_4) encontram-se mais próximo (como foi visto aos 75 dias na concentração de frutose Figura 14C), mostrando que seus efeitos serão similares e contrários ao tratamento T_3 e controle. Do mesmo modo, a frutose e mio-inositol foram mais favorecidas por o efeito do tratamento com temperatura elevada, assim como o amido e o ácido oleico seriam mais favorecidos por os tratamentos T_2 e T_4 e mesmo entre estes últimos tratamentos o tratamento T_2 influencia o maior acúmulo de amido que o tratamento T_4 aos 75 dias, está forma de apresentação pode ser vista na Figura 14A referente à concentração de amido.

Aos 90 dias os centróides encontram-se mais juntos, embora os tratamentos T_2 e T_4 sejam ligeiramente mais distante o qual indica maior contribuição do gás carbônico para o aumento do acúmulo de carbono e óleo nesse período.

Aos 105 dias o centróide do tratamento T_4 encontram-se mais distantes do controle, dos tratamentos T_3 e T_2 . Por outro lado, a proximidade dos centróides do tratamento T_3 e controle indicariam efeitos similares sob as variáveis aos 105 dias, assim

mesmo a distância maior do centróide no tratamento T₄ indicaria maior teor de rafinose para esse tratamento em relação ao controle e T₃ como foi visto na Figura 14F. Da mesma forma, a sacarose e as proteínas solúveis seriam mais favorecidas por T₂ e T₄ (Figuras 14B e 15, respectivamente).

Visto de forma geral, os tratamentos: T₂ (losango) e T₄ (triângulo) podem causar efeitos similares aos 75 dias, entanto que aos 90 dias já mostraram maiores diferenças e aos 105 dias mostraram-se ainda mais distantes. Contrariamente ao efeito do tratamento T₃ (quadrado) e controle (círculo) que aos 75 dias são mais distantes para ser mais próximos aos 105 dias.

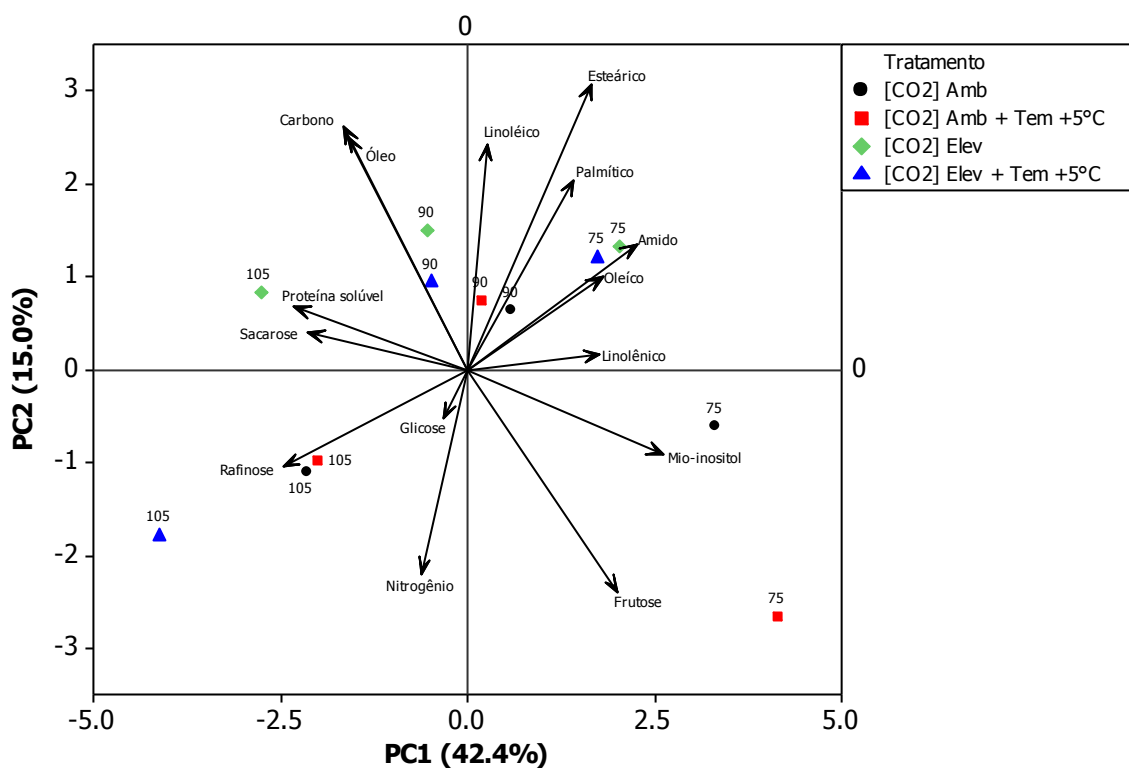


Figura 18. Biplot de distância mostrando a relação entre as variáveis analisadas ao longo do desenvolvimento do grão e os centróides para cada coleta (75, 90 e 105 dias) e cada tratamento da cultivar 'MG/BR-46 Conquista' de soja no plano definido pelos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada por cada eixo (X e Y).

O resultado da análise de variância que se encontra na Tabela 6 mostra significância para o efeito do tratamento, da data de coleta tanto no primeiro quanto no segundo componente e interação no segundo componente. O valor de R² do primeiro componente (90.79%) foi maior quando comparado ao segundo (73.29%)

Tabela 6 Resultado da análise de variância das variáveis sintéticas (PC1 e PC2) derivadas da PCA. Valores de F, significância (P) e coeficiente de determinação (R² ajustado) derivados da análise de variância dos dados (GLM-ANOVA) para dois fatores (tratamentos e data de coleta) utilizando-se modelo com interação. (Grau de Liberdade = Tratamento: 3; Dias de coleta: 2; Interação: 6) (n=60). Valores em negrito representam diferenças significativas entre fatores (P<0.05)

		Tratamentos	Data de coleta	Interação	R ² ajustado
PC1	F	17.40	264.65	1.89	90.79%
	P	0.000	0.000	0.101	
PC2	F	21.43	25.50	9.86	73.48%
	P	0.000	0.000	0.000	

5. DISCUSSÃO

5.1 Crescimento

O tratamento com elevada concentração de CO₂ estimulou o aumento de biomassa seca de folha, caule, raiz e florescimento (Figuras 5, 6, 7 e 8). Essas respostas comprovam resultados publicados por Rawson, (1992); Vu *et al.* (1997); Bernacchi *et al.* (2005) e Leakey *et al.* (2009), que indicaram que elevadas concentrações de CO₂ estimulam o crescimento assim como o florescimento antecipado (Heinemann *et al.*, 2006), devido ao estímulo da fotossíntese. Isso implicaria em atividades metabólicas mais elevadas e armazenamento de reservas nos órgãos drenos para posterior utilização (Cure, 1986). O florescimento antecipado de 3 dias que se observou (Figura 8) relaciona-se com a maturação precoce, provocando encurtamento do ciclo de crescimento (Mulchi *et al.*, 1992) e levando em consequência à perda total das folhas aos 105 dias (Figura 5).

Outras plantas de similar importância econômica, como arroz, trigo, cevada, algodão e batata, mostraram resultados semelhantes ao crescerem em ambientes com concentrações elevadas de CO₂ (Jablonski *et al.*, 2002).

O tratamento com temperatura elevada também favoreceu o aumento de biomassa seca, embora as respostas tenham sido menores devido ao gasto energético ocasionado pelo aumento da respiração. As Figuras 5-8 e 10, relacionadas ao crescimento, mostraram que aos 60 dias houve maior ganho de biomassa, superando até o tratamento com CO₂ elevado. Contudo, a partir desse período a biomassa total começa a diminuir, iniciando-se então a senescência das plantas. Cabe resaltar que aos 60 dias o investimento em biomassa seca, tanto no caule como na folha, foram próximos. Como observado em trabalhos com *Brassica napus* (Angadi *et al.*, 2000), *Lycopersicon esculentum* (Sato *et al.*, 2002) e *Phaseolus vulgaris* (Graham & Ranalli, 1997), temperaturas elevadas podem provocar perdas significativas na biomassa seca ou na produtividade do fruto, devido ao acelerado crescimento no início do tratamento, que representa uma das principais razões de perda de translocação de fotossintatos. Zizka *et al.* (1996) demonstraram maior aumento de biomassa em cultivares de arroz crescendo em altas concentrações de CO₂ (664 ppm) e 29/21°C (dia/noite) do que ao crescer sob 37/29 °C.

A formação de menos flores observada aos 45 dias no tratamento sob temperatura elevada contrastou-se com uma floração mais abundante aos 60 dias (Figura 8), superando os outros tratamentos nesse estágio. No entanto, o início da floração ocorreu um dia antes no controle, sugerindo que houve retardo na floração induzida pela temperatura elevada. Esses dados são concordantes com resultados de Sionit *et al.* (1987a) e Heinemann *et al.* (2006), que reportaram que temperaturas elevadas podem afetar mais no período de formação de flores do que na formação de vagens, repercutindo diretamente no rendimento dos grãos.

Bazzaz, (1990) e Rawson (1992) observaram que temperaturas elevadas podem acelerar o desenvolvimento, entretanto o enriquecimento com concentrações elevadas de CO₂ pode acelerá-lo ainda mais, ou pode ter efeitos neutros ou de retardo em outros casos. Nesse sentido, até os 60 dias, observamos o efeito somatório de ambos os parâmetros, revelado por altos valores de biomassa tanto de folhas como de caule e raiz.

Biomassa dos grãos

Similarmente aos estudos desenvolvidos por Sionit *et al.* (1987b), houve aumento da biomassa dos grãos por incremento do gás carbônico, assim como aumento do número de grãos (Ferris *et al.*, 1999; Heinemann *et al.*, 2006). Contudo, as Figuras 9A e 9B mostram menor biomassa dos grãos pelos efeitos de temperaturas elevadas, em conformidade ao estudo de Thorne (1982). No entanto, o acoplamento de temperatura elevada com altas concentrações de CO₂ provocaram perda de biomassa e menor número de grãos, semelhante aos resultados encontrados por Heinemann *et al.* (2006).

O estudo de outras espécies como arroz, trigo e milho revelaram essa mesma tendência (Jablonski *et al.*, 2002 e Madan *et al.*, 2012). Segundo Egli & Wardlaw (1980), a redução no tempo de crescimento de sementes sob temperaturas elevadas pode ser o mecanismo de redução na produção.

Massa específica foliar

A massa específica das folhas (MEF) de soja mudaram ao longo do crescimento e pelo efeito do aumento de gás carbônico e temperatura elevada (Figura 11). Sionit *et al.* (1987a) reportaram que temperaturas inferiores à faixa de crescimento normal (20–30 °C) poderiam incidir no aumento de MEF. Por exemplo, plantas que cresceram sob 18/12 °C acumularam maior MEF que as que cresceram sob 26/20 °C. Por outro lado, o enriquecimento de CO₂ no presente trabalho estimulou o aumento da MEF (Figura 11). Mulchi *et al.* (1992), Miller *et al.* (1998) e Allen & Boote (2000) observaram aumento da MEF em plantas de soja em ambientes enriquecidos com gás carbônico. Resultados obtidos por Vu *et al.* (1989) relacionaram um aumento de 37% de MEF com o aumento de amido (205%), sacarose (108%), açúcares redutores (33%) e proteínas solúveis (31%) em folhas de soja crescendo em 800 ppm de CO₂. Rogers *et al.* (2004) também notaram elevações nos teores de sacarose, frutose, glucose e amido em diferentes estádios de desenvolvimento foliar de soja por aumento de CO₂. Valores elevados de MEF são interpretados como resultado de alta translocação de carboidratos (fotoassimilados) para diferentes partes da planta (Bazzaz, 1990).

No presente estudo observou-se que aos 60 dias acontece diminuição da MEF no tratamento com gás carbônico elevado, o que poderia estar associado principalmente à

translocação de fotoassimilados para a formação das vagens, pois numa coleta anterior (45 dias) no mesmo tratamento apresentou maior número de flores (Figura 8), embora aos 60 dias o número de flores tenha sido menor, devido ao acelerado crescimento. Valores mais elevados de MEF foram observados nos últimos estádios (75 e 90 dias), podendo estar relacionados ao aumento das variáveis quantificadas por Vu *et al.* (1989) e Rogers *et al.* (2004).

Clorofilas

Em relação aos pigmentos fotossintéticos, Schneider *et al.* (2009) reportaram teores de clorofila *a* e *b* aos 36 (1.8 mg/gMF e 5.8 mg/gMF), 47 (2.6 mg/gMF e 1.8 mg/gMF) e 74 (2.5 mg/gMF e 1.3 mg/gMF) dias, respectivamente, em plantas de soja. Esses dados são próximos aos encontrados no presente estudo, que constatou teores mais elevados de clorofila *a* do que de clorofila *b*, como também observado por Cayon *et al.* (1990) e Amarante *et al.* (2007). Os teores de clorofilas elevam-se gradualmente até os 60 dias (Figura 12).

Contudo, os tratamentos T₂, T₃ e T₄ diminuíram os teores de clorofila, sendo o efeito mais expressivo sobre a clorofila *a*, contrariamente aos dados de Rascher *et al.* (2010), que notaram que o aumento do CO₂ levou ao aumento das clorofilas *a* e *b* em 0.8% e 10%, respectivamente. Vu *et al.* (1989) observaram aumento entre 11–22% em clorofilas totais ao ir aumentando a concentração de CO₂ de 450 a 800 ppm. Entretanto, no estudo de Koti *et al.* (2007) observou-se que o teor de clorofilas em soja responde de forma distinta, segundo o genótipo e os parâmetros ambientais.

Ceras foliares

O teor de cera foliar cuticular variou ao longo do crescimento da planta e em resposta aos tratamentos aplicados. Os efeitos do aumento de gás carbônico (T₂) e da temperatura (T₃) elevaram o teor. O tratamento T₄ diminuiu só nos primeiros estádios conseguindo, observando-se em seguida uma recuperação nos estádios seguintes (Figura 13). A avaliação do teor de cera foliar em seis genótipos da soja, 42 dias após emergência da radícula, indicaram que o aumento do CO₂ reduz o teor de quatro

genótipos, mas a elevação combinada de CO₂ e temperatura levaram à redução dos teores em todos os genótipos (Koti *et al.*, 2007).

5.2 Efeitos do CO₂ e da temperatura na composição química dos grãos

O valor nutricional da cultivar 'MG/BR-46 Conquista' da Embrapa é evidente pelos teores de proteínas (36,6 %), óleo (20,9 %) e carboidratos (30,6%), além de outros componentes, como sacarose (64,1 µg/mg), rafinose (8,6 µg/mg), estaquiase (76.0 µg/mg) e isoflavonas (0.4 µg/g) (Laboratório de Análises Físico-Químicas e Cromatográficas - Embrapa, 2010).

Açúcares não-redutores

Morais & Silva (1996) relataram que o amido é encontrado apenas em sementes verdes de soja, e mesmo assim em pequenas quantidades. Saldivar *et al.* (2011) afirmam que o amido armazenado é consumido para a produção de sacarídeos, principalmente dissarídeos e oligossarídeos. Vinte dias antes da colheita, o teor de amido pode chegar a 10–15% da massa seca do grão (Yazdi-Samadi *et al.*, 1977). Masuda (2004) também observou maior conteúdo de amido aos 90 (83.2 µg/mg) que aos 105 dias (0.7 µg/mg). Em geral, as leguminosas oleaginosas tendem a perder níveis consideráveis de amido na maturidade (Baud *et al.*, 2002; Hills, 2004), como foi observado nos resultados da Figura 14A. Os teores de amido reportados por Oliveira *et al.*, (2010) para 8 cultivares de consumo humano no mercado brasileiro variaram entre 3–8 µg/mg no último estágio. No entanto, no presente estudo os valores para cada tratamento foram 31.2 µg/mg no controle, 4.1 µg/mg com CO₂ elevado (T₂), 11.6 µg/mg com temperatura elevada (T₃) e 2.9 µg/mg com CO₂ elevado e temperatura elevada (T₄), evidenciando que os tratamentos que incorporam mais gás carbônico aceleram o catabolismo do amido (Figura 14A). Thorne (1982) indica que em altas temperatura a transferência ou a disponibilidade para transportar amido fica limitada. De fato, o tratamento T₄ influenciou para que o amido seja consumido mais rapidamente para a formação de açúcares não-estruturais; similarmente, no tratamento T₂, o amido formado foi traslocado rapidamente; no entanto essa translocação foi atenuada devido ao maior acúmulo de carbono no início da formação de grãos (75 dias) (Figura 14A). Por outro lado, a perda de amido em T₃ seria ainda mais

atenuada, sugerindo que o efeito unicamente da temperatura não provocaria uma rápida maturação tanto quanto os tratamentos T₂ e T₄, aos 105 dias. Também observamos pela análise de PCA (Figura 18), que os tratamentos com gás carbônico elevado refletiram fortemente no teor de amido, tanto na síntese como na catabolização, corroborando assim as fortes correlações observadas dos tratamentos T₂ e T₄ durante o desenvolvimento do grão. Similares efeitos foram observados por Thomas *et al.* (2009) em feijão crescendo sob CO₂ elevado (700ppm) e 34 °C .

A sacarose é o dissacarídeo mais abundante que influencia no sabor adocicado da soja. No entanto, sua concentração pode mudar entre os genótipos (Hou *et al.*, 2009). Masuda (1991) observou que a sacarose e o ácido glutâmico presentes nos grãos de soja apresentavam maior correlação entre doçura e sabor do que a glicose ou alanina ao serem cozidos a 26 °C. Por outro lado, coletas desenvolvidas ao longo do dia mostraram maior teor de sacarose entre as 11–18 horas, assim como uma tendência a diminuir a partir das 18–6 horas (Masuda, 1991), embora Santana *et al.* (2012) reportaram diminuição entre 12–18 horas.

Numerosos trabalhos reportaram o aumento do teor de sacarose ao final do desenvolvimento na soja (Dornbos & McDonald, 1986; Saravitz *et al.*, 1987; Lowell & Kuo, 1989; Kumar *et al.*, 2007; Santana *et al.*, 2012), assim como em *Brassica campestris* (Leprince *et al.*, 1990), trigo (Black *et al.*, 1996) e *Arabidopsis thaliana* (Baud *et al.*, 2002). O estudo de Saldivar *et al.* (2011) relatou diminuição de monossacarídeos e dissacarídeos, mas em compensação os teores de oligossacarídeos aumentaram.

Kumar *et al.* (2007) reportaram 20.2 µg/mg de sacarose no estágio R6 (~ 90 dias). A cultivar BRS 247, analisada por Santana *et al.* (2012), apresentou 45 µg/mg e 65 µg/mg de sacarose nos estádios R6 e R8 (~ 150 dias), respectivamente. Contudo, as concentrações de sacarose na Figura 14B são inferiores aos dados reportados na literatura. É evidente o aumento da concentração de sacarose ao longo do desenvolvimento dos grãos e também os efeitos significativos de cada tratamento. Os efeitos dos tratamentos com gás carbônico (T₂ e T₄) mantiveram correlação positiva que se observa já nas plantas-controle. Em temperaturas elevadas, nota-se tendência em se perder a correlação (Figura 14). Também na análise de PCA o vetor da sacarose mostra maior aproximação dos centroides dos tratamentos T₂ e T₄ aos 105 dias (Figura 14B).

A sacarose é peça central no metabolismo de carboidratos, sendo a principal forma do transporte de carbono pelo floema para as sementes em desenvolvimento. Na

mobilização da sacarose, as enzimas invertase e a sacarose sintase são responsáveis pela conversão da sacarose em monossacarídeos para os tecidos drenos, embora a atividade da sacarose sintase seja maior nesses tecidos por ser específica para os processos de síntese e catabolização (Dey & Harborne, 1997; Buchanan *et al.*, 2000). Fatores ambientais, como altas temperaturas, podem afetar diretamente a atividade dessas enzimas, que atuam na faixa ótima entre 20–30 °C, havendo descréscimo abaixo de 10 °C e acima de 40 °C (Coll *et al.*, 1992). Wolf *et al.* (1982) e Ren *et al.* (2009) reportaram diminuição do teor de sacarose na soja por elevadas temperaturas, embora Thomas *et al.* (2009) tenham reportado incremento do teor de sacarose por aumento da temperatura (de 28/18 a 34/24 °C) e do gás carbônico (700ppm) no feijão.

Elevadas temperaturas diminuem a solubilidade do gás carbônico em água, estimulando a função oxigenase da rubisco, estimulando a fotorrespiração e promovendo maior liberação do fosfoglicolato (2PG) ao invés de 3-fosfoglicerato (Bauwe, 2010). Na rota de fotorrespiração, o fosfoglicolato é convertido em glicerato 3-P para seu ingresso no Ciclo de Calvin, liberando CO₂ e NH₃, entre outros compostos. A taxa de liberação do CO₂ diminui a eficiência da fotossíntese; a taxa de liberação NH₃ também aumenta, embora ela venha a ser refixada pela glutamina-sintase (GS) por aumento da temperatura (Dey & Harborne, 1997).

Em conformidade, os resultados do tratamento em temperatura elevada produziram menores teores de sacarose e de rafinose, embora o acoplamento dos parâmetros de gás carbônico e temperatura elevada não tenham mostrado diferenças significativas em relação às plantas controle. Wolf *et al.* (1982) e Ren *et al.* (2009) observaram diminuição de oligossacarídeos por efeito da temperatura elevada. Thomas *et al.* (2003) observaram que o aumento da temperatura afetaram mais os teores de açúcares solúveis que o de amido. Porém, o acoplamento de elevadas concentrações de gás carbônico (700 ppm) podem anular o efeito das elevadas temperaturas, como foi visto na análise de Streck & Alberto (2006).

Dentre os carboidratos, os oligossacarídeos de soja têm sido geralmente considerados indesejáveis, por ser responsáveis por flatulências e desconforto abdominal, não obstante promoverem o crescimento de bactérias benéficas (bifidobactérias) para o organismo humano (Masuda *et al.*, 1991), além de serem fonte de energia na germinação de sementes (Kuo *et al.*, 1988; Buckeridge & Dietrich, 1996). A síntese de rafinose precisa de sacarose e galactinol, que aumentam concomitantemente com a atividade da enzima

galactinol sintase, que usa o mio-inositol como substrato (Karner *et al.*, 2004; Handley *et al.*, 1983). Em soja, Santana *et al.* (2012) quantificaram entre 10,3 µg/mg e 16,1 µg/mg de rafinose em R6 e R8, respectivamente; em cultivares dos E.U.A, foram reportados em média 6,9 µg/mg (Saldivar *et al.*, 2011) e em cultivares brasileiros, 7,2 µg/mg (Oliveira *et al.*, 2010). Embora nossos dados sejam menores que os obtidos em cultivo de plantas em campo, podemos inferir que há incremento de rafinose durante o desenvolvimento dos grãos e principalmente um efeito estimulador dos tratamento T₂ e T₄ no teor de rafinose.

Em relação ao teor de mio-inositol, observa-se uma acelerada mobilização por efeito do aumento do gás carbônico, assim como uma demorada mobilização por efeito das temperaturas elevadas, tornando forte a correlação com o teor de carbono total ($r = -0.912$) (Figura 17A). Dessa forma, encontraram-se maiores teores sob os tratamentos que incorporam altas concentrações de CO₂ (T₂ e T₄), o que sugere que outros oligossarídeos da família rafinose, como estaquiose e verbascose poderiam estar presentes em maiores concentrações por causa do CO₂ elevado (Castillo *et al.*, 1990).

Em relação às hexoses da soja quantificadas (frutose e glicose), Santana *et al.* (2012) demonstraram que as concentrações mantiveram-se constantes ao longo do dia. Os resultados sobre frutose mostrados na Figura 14C são coerentes com os dados da literatura (Konno, 1979; Saravitz *et al.*, 1987; Hou *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2010; Saldivar *et al.*, 2011; Santana *et al.*, 2012) que mostram a tendência de redução de seu teor durante o desenvolvimento dos grãos. Similarmente, em *Arabidopsis thaliana* (Baud *et al.*, 2002) os teores de frutose e glicose diminuíram durante o amadurecimento, embora no presente estudo se tenha observado que o teor de glicose aumentou. Assim mesmo, podemos destacar que os ambientes com altas concentrações de gás carbônico (T₂ e T₄) não acumulam esses metabólitos, embora as temperaturas elevadas gerem maior acúmulo, devendo-se isso talvez à redução na atividade da enzima sacarose sintase que atua tanto na síntese como na degradação da sacarose, através da reação $\text{sacarose} + \text{UDP} \leftrightarrow \text{UDP-glicose} + \text{frutose}$, como observado no grão de arroz (Tian *et al.*, 2006). Wolf *et al.* (1982) reportaram concentrações constantes de frutose e glicose quando as temperaturas estiveram entre 18/13 e 33/28 °C (dia/noite), contrariamente ao que se observou no tratamento sob temperatura elevada (T₃), em que se nota maior teor da frutose e glicose (Figuras 14C e 14D).

Observou-se correlação negativa entre glicose e sacarose no tratamento sob temperatura elevada (T₃) ($r = -0.53$, Figuras 14B e 14D), coerentemente ao encontrado por

Hou *et al.*, (2009) em cultivares para diversos fins. Em relação a glicose e frutose, não foi possível estabelecer correlação em nenhum dos tratamentos, embora Hou *et al.*, (2009) tenham indicado forte correlação positiva.

Proteínas solúveis

Como foi observado na Figura 15, as proteínas solúveis acumulam-se mais no período 90–105 do que em 75–90 dias. Nesse sentido, Bills & Howell (1963) assinalaram que no período 15–22 DAF (dias após floração), as proteínas sintetizadas são produtos metabólicos que decrescem após os 22 DAF, havendo, a partir daí, um aumento das proteínas de reserva. Durante o desenvolvimento e crescimento dos grãos, Ogren & Rinee (1973) observaram concomitantemente redução do nitrogênio não protéico e aumento das proteínas na ordem de 28 a 38%.

Por outro lado, o efeito da temperatura elevada diminui o teor de proteínas aos 75 e 105 dias, com elevação aos 90 dias. Wolf *et al.* (1982) notaram que o conteúdo de proteínas é estável quando as plantas crescem entre 18 e 30°C, aumentando significativamente com aumento da temperatura até 33°C. Gonçalves *et al.* (2007) reportaram aumento do teor de proteínas por aquecimento artificial. Ren *et al.* (2009) observaram que temperaturas de 37/30°C podem diminuir o teor de proteínas, coerentemente aos dados da Figura 15, que revela que o tratamento de temperatura elevada afetou à síntese de proteínas. Também Khan *et al.* (2011) reportaram que entre 30–37 °C durante os estádios R4–R5 e R5–R6 houve efeitos negativos, afetando o conteúdo de óleo e proteínas. Já temperaturas acima dos 40 °C podem se refletir em baixos teores. Além disso, o acoplamento de gás carbônico elevado pode induzir menores teores de nitrogênio total (Thomas *et al.* 2003), repercutindo diretamente na taxa C:N.

No estudo de meta-análise desenvolvido por Taub *et al.* (2008), em 228 experimentos observou-se que o aumento de CO₂ entre 540–958 ppm diminui entre 10% e 15% o teor de proteínas em cevada, batata e arroz; em soja, a diminuição foi de 1.4%. Entretanto, a adição de fertilização por nitrogênio pode minimizar os efeitos do aumento do CO₂.

Em resumo, baixos teores de sacarídeos solúveis e proteínas no início do desenvolvimento dos grãos pode ser atribuída ao rápido aumento do teor de óleo e amido nesse período (Saldivar *et al.*, 2011).

Óleo e ácidos graxos

Durante o desenvolvimento dos grãos, há uma acelerada síntese de triglicerídeos, acompanhada por uma queda na porcentagem dos ácidos palmítico, esteárico e linolênico e aumento do conteúdo dos ácidos oleico e linoleico (Wolf, 1976) (Figura 16). Estudos de análise da distribuição dos ácidos graxos mostram que os ácidos palmítico, esteárico e linolênico representaram 68% dos ácidos graxos totais no estágio R4 e 21% em R6. Os ácidos insaturados oleico e linolênico correspondem a 79% em R6 (Dornbos & McDonald, 1986).

Estudos detalhados de Roehm *et al.* (1970) e Rubel *et al.* (1972) indicaram que entre 24–40 DAF, a porcentagem de óleo aumentou rapidamente a 20%, representando 30% nas sementes maduras. Na revisão realizada por Masuda (1991), constata-se que o balanço dos ácidos graxos aos 25, 40, 45, 50 e 75 DAF é concorde com as observações de Wolf (1976; ver parágrafo anterior), com a ressalva de que aos 45 DAF os grãos de soja tenham apresentado 57.2 % de ácido oleico e 27.6 % de linoleico.

De forma geral, observou-se no presente trabalho que a maior parte do acúmulo de ácidos graxos ocorreu entre os 75 e 90 dias, com a tendência a diminuir aos 105 dias, de modo semelhante ao acúmulo dos ácidos graxos de cártamo (*Carthamus tinctorius*, Asteraceae) - os ácidos linolênico, palmítico e oleico, que apresentam tendência a diminuir, enquanto o ácido graxo principal, (linoleico) aumenta (Ichihara & Noda, 1980).

As alterações no perfil dos ácidos graxos não só é reflexo do que foi armazenado nas sementes, mas também nos fosfolípidios de membrana dos tecidos e organelas. Dornbos, *et al.* (1989) reportaram que a composição de cada classe fosfolípídica foi alterada pelo estresse provocado por seca e altas temperaturas.

No estudo de Bachlava *et al.* (2009), observou-se que o aumento da temperatura tem influência no armazenamento do teor de óleo e na abundância dos ácidos graxos nas cultivares de soja do tipo tardío e precoce. Demonstrou-se que o aumento no teor de óleo em ambos os tipos de cultivares foi associado ao aumento da temperatura. Nas cultivares tardias, os ácidos poliinsaturados ($C_{18:2}$ e $C_{18:3}$) diminuíram por aumento da temperatura, contrariamente observado nas cultivares precoces, que aumentaram com o aumento da temperatura. O ácido monoinsaturado aumentou na cultivar tardia e diminuiu na cultivar precoce. No presente estudo, foi possível observar que o aumento da temperatura mostrou retardo no acúmulo de óleo, mas que no final (105 dias) igualou-se ao controle.

Quanto à abundância dos ácidos graxos, os efeitos refletiram-se na diminuição dos teores de ácidos poliinsaturados (Figura 16H). Comparando-se com os resultados do estudo de Bachlava *et al.*, (2009), a cultivar MG/BR-46 Conquista revelou-se semelhante às cultivares de crescimento tardio.

Em resposta a altas temperaturas (37/30°C), o acúmulo de ácidos graxos saturados e monoinsaturados podem ser favorecidos, enquanto as concentrações dos ácidos poliinsaturados diminuem (Ren *et al.*, 2009). A relação entre a temperatura e as alterações nos ácidos graxos poliinsaturados pode ser explicada pela sensibilidade da ω -6 desaturase, enzima que converte o ácido oleico em linoleico (Buchanan *et al.*, 2000; Baud & Lepiniec, 2010). O efeito de temperaturas elevadas no perfil dos ácidos graxos insaturados pode variar nas sementes oleaginosas. Por exemplo, o efeito da temperatura elevada é fraca em sementes de cártamo, de modo que a enzima FAD2, responsável pela dessaturação tem alta estabilidade térmica e baixa dependência de disponibilidade de oxigênio, o que propicia melhor controle na concentração de oxigênio que é um fator limitante na dessaturação (Ichihara & Noda, 1980). O efeito é moderado na soja (Wolf *et al.*, 1982) e colza (Deng & Scarth, 1998) e alto no girasol (Fernández-Moya *et al.*, 2003). Thorne (1982) sugeriu que a disponibilidade de oxigênio pode se tornar limitada em temperaturas elevadas, devido à diminuição da sua solubilidade e à maior demanda respiratória das plantas. Tem-se notado que os efeitos do aumento do gás carbônico sobre o acúmulo dos ácidos graxos não são significantes.

Thomas *et al.* (2003) observaram que em altas temperaturas a concentração total de óleo aumentou até 32/22 °C para logo diminuir. Observaram também que o ácido oleico é mais estável, pois com apenas uma dupla ligação ele é menos suscetível à oxidação que o ácido linolênico, que contém três duplas ligações. Os resultados de Thomas *et al.* (2003) coincidiram os de Thorne (1982), ao não observarem efeitos do incremento do gás carbônico a 700 ppm sobre as concentrações dos ácidos graxos.

Dornbos *et al.* (1992) observaram aumento na concentração de proteínas e diminuição no teor de óleo por efeito da seca e aumento na temperatura. Nesse mesmo estudo, observando os ácidos graxos, houve diminuição nas porcentagens dos ácidos linoleico e linolênico e aumento de oleico, esteárico e palmítico.

Em relação às correlações, numerosos trabalhos indicam correlação negativa entre teor de óleo e proteínas, pelo fato de competirem pelos mesmo esqueletos carbônicos da fotossíntese. Por exemplo, Hymowitz *et al.* (1972) e Hartwig *et al.* (1997),

avaliaram 100 genótipos, alguns com altos níveis de óleo ou proteínas, outros sem características específicas. Esses autores observaram que o teor de proteínas correlaciona-se negativamente com o teor de óleo e de açúcares; conseqüentemente, o teor de óleo e os de rafinose e sacarose correlacionam-se positivamente.

Recentemente, a publicação de Carrera *et al.* (2011) sobre cultivares não transgênicas de soja que cresceram em diferentes ambientes na Argentina indicaram que o aumento da relação oleico/linolênico e o teor de óleo esteve correlacionada positivamente a ambientes quentes, enquanto altas teores de ácido linolênico estiveram associados a temperaturas frias, de modo que baixas temperaturas favoreceram o acúmulo de proteínas e ácidos poliinsaturados.

6. CONCLUSÃO

Dúvidas afligem autoridades e a população mundial quanto as mudanças climáticas previstas para futuro relativamente próximo, que poderão alterar a produtividade e qualidade de safras de culturas importantes, entre elas a soja, cultivada em amplas e diversas regiões do país e responsável atualmente por aproximadamente 90% da produção de óleo no Brasil (EPAMIG, 2005, Pinto *et al.*, 2005).

O presente trabalho possibilitou o entendimento do fluxo de carbono em ambientes com temperatura e concentrações de gás carbônico elevadas, assim como sob condições de associação das duas variáveis. Os resultados do trabalho permitem vislumbrar cenários para uma das variedades ora em cultivo no país, a MG/BR-46 Conquista, numa hipotética condição de crescimento em ambiente com elevada concentração de gás carbônico e elevada temperatura. As plantas ficariam sujeitas a um encurtamento do ciclo de cultivo, com antecipação da floração e promoção da frutificação, o que significaria uma elevação no número de grãos por planta. Não haveria elevação da massa dos grãos, porém, o maior número de sementes por indivíduo poderia significar um aumento na produtividade das plantas. Se vier a ocorrer aumento da concentração de CO₂ e não sobrevir aumento da temperatura, então haveria um ganho adicional em produtividade, proveniente do aumento da massa seca dos grãos.

A elevação do teor de gás carbônico, associada ou não a altas temperaturas, causaria elevação de aproximadamente 1% no teor de óleo dos grãos de MG/BR-46 Conquista, o que significaria um outro ganho na produtividade da soja como oleaginosa.

No entanto, haveria alteração na qualidade do óleo, uma vez que a temperatura elevada causaria diminuição no teor de ácido linolênico, virtualmente o único ácido poliinsaturado do óleo de soja. Isso não representaria grande alteração na qualidade do óleo para consumo humano. Por outro lado, o óleo se tornaria mais estável frente a reações de oxidação, o que poderia ser vantajoso com vistas à produção de biodiesel.

As mudanças previstas de elevação de temperatura e do teor de gás carbônico atmosférico teriam reflexo também no aumento da espessura dos depósitos de cera foilar cuticular, favorecendo as plantas de soja no que se refere à diminuição de disponibilidade de água para cultivo.

É importante que se leve em consideração que esses cenários são baseados exclusivamente no contexto a que se refere o presente trabalho, tendo em mente exclusivamente os efeitos da variação dos teores de gás carbônico e da temperatura sobre plantas da variedade MG/BR-46 Conquista, desconsiderando-se outras consequências que poderiam advir de alterações climáticas oriundas da elevação do gás carbônico atmosférico.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Adams, R. M.; Hurd, B. H., Lenhart, S. & Leary, N. (1998). Effects of global climate change on agriculture: an interpretative review. *Climate Research*, 77, 19-30.
- Ahmad, M. U., Husain, S. K. & Osman, S. M. (1981). Ricinoleic acid in *Phyllanthus niruri* seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58, 673-674.
- Ainsworth, E. A., Davey, P. A., Bernacchi, C. J., Dermody, O. C., Heaton, E. A., Moore, D. J., Morgan, P. B., Naidu, S. L., Ra, H. S. Y., Zhu, X. G., Curtis, P. S. & Long, S. P. (2002). A meta-analysis of elevated CO₂ effects on soybean (*Glycine max*) physiology, growth and yield. *Global Change Biology*, 8, 695-709.
- Alfonso, M., Yruela, I., Almárcegui, S. T., Pérez, M. A. & Picorel, R. (2001). Unusual tolerance to high temperatures in a new herbicide-resistant D1 mutant from *Glycine max* (L.) Merr. cell culture deficient in fatty acid desaturation. *Planta*, 212, 573-582.
- Amaral, L. I., Gaspa, M., Costa, P. M., Aidar, M. P. & Buckeridge, M. (2007). Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea*, 34, 425-431.
- Amarante, L., Colares, D. S., Oliveira, M. L., Zenzen, I. L., Badinelli, P. B. & Bernardi, E. (2007). Teores de clorofilas em soja associada simbioticamente com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* sob alagamento. *Revista Brasileira de Biociências*, 5, 906-908.
- Angadi, S. V., Cutforth, H., Miller, P. R., McConkey, B. G., Entz, M. H., Brandt, S. A. & Volkmar, K. M. (2000). Response of three Brassica species to high temperature stress during reproductive growth. *Canadian Journal of Plant Science*, 80, 693-701.
- Bachlava, E. & Cardinal, A. (2009). Correlation between temperature and oleic acid seed content in three segregating soybean populations. *Crop Science*, 49, 1328-1335.
- Bakker, M. I., Baas, W. J., Sijm, D. T. & Kollöffel, C. (1998). Leaf wax of *Lactuca sativa* and *Plantago major*. *Phytochemistry*, 47, 1489-1493.
- Barać, M. B., Stanojević, S. P., Jovanović, S. & Pešić, M. B. (2004). Soy protein modification - a review. *Acta periodica technologica*, 35, 3-16.
- Barnwal, B. K. & Sharma, M. P. (2005). Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable and Sustainable Energy*, 9, 363-378.

- Barthlott, W., Neinhuis, C., Cutler, D., Ditsch, F., Meusel, I., Theisen, I., & Wilhelm, H. (1998). Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 126, 237-260.
- Baud, S. & Lepiniec, L. (2010). Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Progress in Lipid Research*, 49, 235-249.
- Baud, S., Boutin, J. P., Miquel, M., Lepiniec, L. & Rochat, C. (2002). An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 151-160.
- Bauwe, H. (2010). Photorespiration. In J. W. Ltd, *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1-8). UK: Chichester.
- Bazzaz, F. A. (1990). The response of natural ecosystems to the rising global CO₂ levels. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21, 167-196.
- Beedlow, P. A., Tingey, D. T., Phillips, D. L., Hogsett, W. E. & Olszyk, D. M. (2004). Rising atmospheric CO₂ and carbon sequestration in forests. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2, 315-322.
- Bernacchi, C. J., Morgan, P. B., Ort, D. R. & Long, S. P. (2005). The growth of soybean under free air [CO₂] enrichment (FACE) stimulates photosynthesis while decreasing in vivo Rubisco capacity. *Plant*, 220, 434-446.
- Bertrand, J. P., Laurent, C. & Leclercq, V. (1987). *O Mundo da Soja*. (L. L. De Oliveira, Trans.) São Paulo: Hucitec: Editora da Universidade de São Paulo.
- Bewley, J. D. & Black, M. (1994). *Seeds: Physiology of Development and Germination* (2nd ed.). New York: Plenum Press.
- Bilich, F. & Da Silva, R. (2006). Análise do potencial Brasileiro na produção de biodiesel. *Biodiesel: O novo combustível do Brasil. 1 Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel*, 1, 24-29.
- Bills, R. F. & Howell, R. W. (1963). Biochemical and cytological changes in developing soybean cotyledons. *Crop Science*, 3, 304-308.
- Black, M., Corbineau, F., Grzesik, M., Guy, P. & Côme, D. (1996). Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 47, 161-169.
- Bohnert, H. J., Nguyen, H. & Lewis, N. G. (2008). *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 1. Bioengineering and Molecular Biology of Plant Pathways*. UK: Elsevier Ltd.

- Bondada, B. R., Oosterhuis, D. M., Murphy, J. B. & Kim, K. S. (1996). Effect of water stress on the epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract, and boll. *Environmental and Experimental Botany*, 36, 61-69.
- Bracco, U. (1994). Effect of triglyceride structure on fat absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 60, 1002-1009.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254 .
- Breene, W. M., Lin, S., Hardman, L. & Orf, J. (1988). Protein and oil content of soybean from different geographic locations. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65, 1927-1931.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L. (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. USA: John Wiley & Sons.
- Buckeridge, M. S. & Dietrich, S. M. (1996). Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). *Plant Science*, 117, 33-43.
- Buckeridge, M. S., Santos, H. P. & Tiné, M. A. (2000). Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38, 141-156.
- Buckeridge, M. S., Santos, H. P., Tiné, M. A. & Aidar, M. P. (2004). Mobilização de reservas. In Ferreira, A. G. & Borghetti, F. (Ed.) *Germinação: do Básico ao Aplicado*. Artmed, Porto Alegre, 163-185.
- Carrera, C., Martínez, M. J., Dardanelli, J. & Balzarini, M. (2011). Environmental variation and correlation of seed components in nontransgenic soybean: protein, oil, unsaturated fatty acids, tocopherols, and isoflavones. *Crop Science*, 51, 800-809.
- Castillo, E. M., Lumen, B. O., Reyes, P. S. & Lumen, H. Z. (1990). Raffinose synthase and galactinol synthase in developing seeds and leaves of legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 351-355.
- Cayon, D. G., Lopes, N. F., Oliva, M. A. & Silva, J. F. (1990). Teores de clorofilas e de proteína bruta em soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tratada com imazaquin. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 2, 33-40.
- Christie, W. W. (2003). *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*. England: The Oily Press.

- Coll, J. B., Rodrigo, G. N., Garcia, B. S. & Tamés, R. S. (1992). *Fisiologia Vegetal*. Madrid: Pirâmide.
- CONAB & MAPA (2011). Acompanhamento da safra brasileira: grãos, nono levantamento, Agosto 2011.
- Conroy, J. P. (1992). Influence of elevated atmospheric CO₂ concentrations on plant nutrition. *Australian Journal of Botany*, 40, 445-456.
- Crupkin, M. & Zambelli, A. (2008). Detrimental impact of trans fats on human health: stearic acid-rich fats as possible substitutes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 271-279.
- Cure, J. D. (1986). Crop responses to carbon dioxide doubling: a literature survey. *Agricultural and Forest Meteorology*, 38, 127-145.
- Deng, X. & Scarth, R. (1998). Temperature effects on fatty acid composition during development of low-linolenic oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 759-766.
- Dey, P. M. & Harborne, J. B. (1997). *Plant Biochemistry*. California: Academic Press.
- Dixit, A. K., Antony, J. I., Sharma, N. K. & Tiwari, R. K. (2011). Soybean constituents and their functional benefits. In Tiwari, V. K. & Mishra, B. B. (Eds.) *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*. Research Signpost, India, 367-383.
- Dornbos, D. L. & McDonald, M. B. (1986). Mass and composition of developing soybean seeds at five reproductive growth stages. *Crop Science*, 26, 624-630.
- Dornbos, D. L. & Mullen, R. E. (1992). Soybean seed protein and oil contents and fatty acid composition adjustments by drought and temperature. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69, 228-231.
- Dornbos, D. L., Mullen, R. E. & Hammond, E. G. (1989). Phospholipids of environmentally stressed soybean seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66, 1371-1373.
- Drake, B. G., Gonzales-Meler, M. A. & Long, S. P. (1997). More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO₂? *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 48, 609-639.
- Dyer, J. M., Sten, S., Green, A. G. & Carlsson, A. S. (2008). High-value oils from plants. *The Plant Journal*, 54, 640-655.

- Egli, D. B. & Wardlaw, I. F. (1980). Temperature response of seed growth characteristics of soybeans. *Agronomy Journal*, 72, 560-564.
- Eglinton, G. & Hamilton, R. J. (1967). Leaf epicuticular waxes. The waxy outer surfaces of most plants display a wide diversity of fine structure and chemical constituents. *Science*, 156, 1322-1335.
- Eldridge, A. C., Black, L. T. & Wolf, W. J. (1979). Carbohydrate composition of soybean flours, protein concentrates, and isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 799-802.
- EMBRAPA. (2004). *Tecnologias de produção de soja região central do Brasil 2004*. Acesso em Abril 29, 2012, disponível em <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/index.htm>
- EMBRAPA, APROSOJA & ABRANGE. (2010). *Cultivares de soja convencionais Mato Grosso Safra 2010/2011*. Acesso em abril de 29 de 2012, disponível em <http://www.cnpso.embrapa.br/download/cultivares/LivretoSojaLivre.pdf>
- EMBRAPA & MAPA. (2007). *Biossíntese e Degradação de Lipídios, Carboidratos e Proteínas em Oleaginosas Documentos 178*.
- EPAMIG. (2005). Agronegócio das oleaginosas no Brasil. *Informe Agropecuario*, 26, 14-17.
- Epstein, E. (1972). *Mineral Nutrition of Plants: Principles and perspectives*. John Wiley & Sons, New York.
- Farias, J. R., Nepomuceno, A. L. & Neumaier, N. (2007). Ecofisiologia da Soja. *Circular Técnica* 48, p. 10.
- Fehr, W. R., Caviness, C. E., Burmood, D. T. & Pennington, J. S. (1971). Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science*, 11, 929.
- Fernández-Moya, V., Martínez-Force, E. & Garces, R. (2003). Temperature-related non-homogeneous fatty acid desaturation in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Plant*, 216, 834-840.
- Ferris, R., Wheeler, T. R., Ellis, R. H. & Hadley, P. (1999). Seed yield after environmental stress in soybean grown under elevated CO₂. *Crop Science*, 39, 710-718.
- Field, A. (2005). *Discovering Statistics Using SPSS*. (2nd ed.). SAGE, London.
- Gabriel, K. R. (1971). Bi-plot display of multivariate matrices with application to principal component analysis. *Biometrika*, 58, 453-467.

- Gonçalves, C. A., Soares, N. S., Bolina, C. O. & Barros, E. G. (2007). Influência da temperatura no acúmulo de proteínas em sementes de soja. *Revista Brasileira de Biociências*, 1038-1040.
- Graham, P. H. & Ranalli, P. (1997). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, 53, 131-146.
- Gunstone, F. D. (2002). *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses* (2nd ed.). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Handley, L. W., Pharr, D. M. & McFeeters, R. F. (1983). Relationship between galactinol synthase activity and sugar composition of leaves and seeds of several crop species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 108, 600-605.
- Hannah, L. (2011). *Climate Change Biology*. USA: Elsevier.
- Hartwell-Allen, L. & Boote, K. J. (2000). Crop ecosystem responses to climatic change: soybean. In Reddy, K. R. & Hodges, H. F. (Eds.) *Climate Change and Global Crop Productivity*. CABI, London, 133-160.
- Harvey-Motulsky, M. D. (1995). *Intuitive Biostatistics*. Oxford University Press, New York.
- Heinemann, A. B., Maia, A. H., Dourado-Neto, D., Ingram, K. T. & Hoogenboom, G. (2006). Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) growth and development response to CO₂ enrichment under different temperature regimes. *European Journal of Agronomy*, 24, 52-61.
- Heldt, H. W. (2005). *Plant Biochemistry* (3rd ed.). Elsevier Academic Press, London.
- Hills, M. J. (2004). Control of storage-product synthesis in seeds. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 302-308.
- Hou, A., Chen, P., Shi, A., Zhang, B. & Wang, Y. (2009). Sugar variation in soybean seed assessed with a rapid extraction and quantification method. *International Journal of Agronomy*, 2009, 1-8.
- Huang, B. (2006). Cellular membranes in stress sensing and regulation of plant adaptation to abiotic stresses. In Huang, B. (Ed.) *Plant-Environment Interactions* (3rd ed.) Taylor & Francis, New York, pp. 1-25.
- Hugly, S., Kunst, L., Browse, J. & Somerville, C. (1989). Enhanced thermal tolerance of photosynthesis and altered chloroplast ultrastructure in a mutant of *Arabidopsis* deficient in lipid desaturation. *Plant Physiology*, 90, 1134-1142.
- Hunt, R. (1982). *Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis*. London: Edward Arnold Ltd.

- Hurburgh, C. R., Brumm, T. J., Guinn, J. M. & Hartwig, R. A. (1990). Protein and oil patterns in US and world soybean markets. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67, 966-973.
- Hymowitz, T., Collins, F. I., Panczner, J. & Walker, W. M. (1972). Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. *Agronomy Journal*, 64, 613-616.
- Ichihara, K. & Noda, M. (1980). Fatty acid composition and lipid synthesis in developing safflower seeds. *Phytochemistry*, 19, 49-54.
- IPCC. (2007). Acesso em Junho 18, 2012, disponível em www.ipcc.ch
- Jablonski, L. M., Wang, X. & Curtis, P. S. (2002). Plant reproduction under elevated CO₂ conditions: a meta-analysis of reports on 79 crop and wild species. *New Phytologist*, 156, 9-26.
- Jeffree, C. E. (2006). The Fine Structure of the Plant Cuticle. In Riederer, M. & Müller, C. (Eds.), *Annual Plant Reviews Volume 23: Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell, Oxford, 11-125.
- Jenks, M. A., Tuttle, H. A., Eigenbrode, S. D. & Feldmann, K. A. (1995). Leaf epicuticular waxes of the Eceriferum mutants in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 108, 369-377.
- Jenner, C. F., Ugalde, T. D. & Aspinall, D. (1991). The physiology of starch and protein deposition in the endosperm of wheat. *Australian Journal of Plant Physiology*, 18, 211-226.
- Juniper, B. E. & Jeffree, C. E. (1983). *Plant Surfaces*. Edward Arnold, London.
- Karner, U., Peterbauer, T., Raboy, V., Jones, D. A. & Richter, A. (2004). myo-Inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. *Journal of Experimental Botany*, 55, 1981-1987.
- Kennedy, I. R., Mwandemele, O. D. & McWhirter, K. S. (1985). Estimation of sucrose, raffinose and stachyose in soybean seeds. *Food Chemistry*, 17, 85-93.
- Khan, A. Z., Shah, P., Khan, H., Nigar, S., Perveen, S., Shah, M. K., Amanullah, Khalil, S. K., Munir, S. & Zubair, M. (2011). Seed quality and vigor of soybean cultivars as influenced by canopy temperature. *Pakistan Journal of Botany*, 43, 643-648.
- Kim, K. S., Park, S. H., Kim, D. K. & Jenks, M. A. (2007). Influence of water deficit on leaf cuticular waxes of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *International Journal of Plant Sciences*, 168, 307-316.

- Konno, S. (1979). Changes in chemical composition of soybean seeds during ripening. *Japan Agricultural Research*, 13, 186-194.
- Koti, S., Reddy, K. R., Kakani, V. G., Zhao, D. & Gao, W. (2007). Effects of carbon dioxide, temperature and ultraviolet-B radiation and their interactions on soybean (*Glycine max* L.) growth and development. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 1-10.
- Krishnan, H. B. (2005). Engineering soybean for enhanced sulfur amino acid content. *Crop Science*, 45, 454-461.
- Kumar, V., Rani, A. & Chauran, G. S. (2007). A comparative study of oligosaccharides in immature and mature seeds of soybean genotypes. *Journal Food Science and Technology*, 44, 49-51.
- Kuo, T. M., VanMiddlesworth, J. F. & Wolf, W. (1988). Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 32-36.
- Laing, W. A. (1974). Regulation of soybean net photosynthetic CO₂ fixation by the interaction of CO₂, O₂ and ribulose 1, 5-diphosphate carboxylase. *Plant Physiology*, 54, 678-685.
- Lea, P. J. & Leegood, R. C. (1999). *Plant Biochemistry and Molecular Biology* (2nd ed.). John Wiley, New York.
- Leakey, A. D., Ainsworth, E. A., Bernacchi, C. J., Rogers, A., Long, S. P. & Ort, D. R. (2009). Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany*, 60, 2859-2876.
- Leprince, O., Brochart, R. & Deltour, R. (1990). Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. *Plant, Cell & Environment*, 13, 539-546.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
- Lisboa, C. G., Tonini, P. P., Tiné, M. A. & Buckeridge, M. S. (2006). Endo-beta-mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.(Leguminosae): purification, characterisation and its dual role in germination and early seedling growth. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 269-280.
- Long, S. P., Ainsworth, E. A., Rogers, A. & Ort, D. R. (2004). Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 591-628.

- Lowell, C. A. & Kuo, T. M. (1989). Oligosaccharide metabolism and accumulation in developing soybean seeds. *Crop Science*, 29, 459-465.
- Machado, M. R. (2007). Estudo bioquímico e da estrutura foliar de plântulas do jatobá da mata (*Hymenaea courbaril L.*) e do cerrado (*Hymenaea stigonocarpa M.*) expostas à concentração elevada de CO₂. São Paulo-Brasil: Universidade de São Paulo.
- Madan, P., Jagadish, S. V., Craufurd, P. Q., Fitzgerald, M., Lafarge, T. & Wheeler, T. R. (2012). Effect of elevated CO₂ and high temperature on seed-set and grain quality of rice. *Journal of Experimental Botany*, 63, 3843-3852.
- Maffei, M. (1996). Chemotaxonomic significance of leaf wax alkanes in the Gramineae. *Biochemical Systems and Ecology*, 24, 53-64.
- Mahlman, J. D. (1997). Uncertainties in projections of human induced climate warming. *Science*, 278, 1416-1417.
- Martin, C. & Smith, A. M. (1995). Starch biosynthesis. *The Plant Cell*, 7, 971-985.
- Marzzoco, A. & Torres, B. B. (2007). *Bioquímica Básica* (3rd ed.). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Masuda, R. (1991). Quality requirement and improvement of vegetable soybean. In Shanmugasundaram, S. (Ed.) *Workshop [on] vegetable soybean*. Asian Vegetable Research and Development Center, Taiwan, 92-102.
- Masuda, R. (2004). The strategy for sweetness increase of vegetable soybeans: maltose, another sugar in boiled seeds. In World soybean research conference, 7; International soybean processing and utilization conference, 4. (pp.839-844) Congresso Brasileiro de Soja, 3, 2004, Embrapa Soja. Documentos, n. 228, Londrina.
- Mayworm, M. A. & Salatino, A. (1996a). Teores de óleo e composição de ácidos graxos de sementes de *Cereus jamacaru* DC. (Cactaceae), *Zizyphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae) e *Anadenanthera colubrina* (Benth) Brenan var. cebil (Griseb.) Von Altschusl. (Mimosaceae). *Sitientibus*, Feira de Santana, 15, 201-209.
- Mayworm, M. A., Buckeridge, M. S., & Salatino, A. (2011). Nutritional reserves of Vochysiaceae seeds: chemical diversity and potential economic uses. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 83, 523-531.
- Mayworm, M. S. & Salatino, A. (1996b). Fatty acid composition of 'Cerrado' seed oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72, 226-230.

- Miller, J. E., Heagle, A. S. & Pursley, W. A. (1998). Influence of ozone stress on soybean response to carbon dioxide enrichment: II. Biomass and development. *Crop Science*, 38, 122-128.
- Miranda, M. A., Miyasaka, S. & Mascarenhas, H. A. (1982). *A soja no Brasil Central* (2nd ed.). Fundação Cargill.
- Morais, A. A. & Silva, A. L. (1996). *Soja: suas aplicações*. Rio de Janeiro: Ltda, Editora Médica e Científica.
- Mulchi, C. L., Slaughter, L., Saleem, M., Lee, E., Pausch, R. & Rowland, R. (1992). Growth and physiological characteristics of soybean in open-top chambers in response to ozone and increased atmospheric CO₂. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 38, 107-118.
- Nass, L. L., Pereira, P. A. & Ellis, D. (2007). Biofuels in Brazil: an overview. *Crop science*, 47, 2228-2237.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th ed.). New York, W. H. Freeman.
- Ogren, W. L. & Rinee, R. W. (1973). Photosynthesis and seed metabolism. In Caldwell, B. E., Howell, R. W. & Johnson, H. W. (Eds) *Soybeans: improvement, production and uses*. American Society of Agronomy, Madison, 391-416.
- Oliveira, A. F., Meirelles, S. T. & Salatino, A. (2003). Epicuticular waxes from caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 75, 431-439.
- Oliveira, M. A., Carrão-Panizzi, M. C., Mandarino, J. M., Leite, R. S., Campos Filho, P. J. & Vicentini, M. B. (2010). Quantificação dos teores de açúcares, oligossacarídeos e amido em genótipos/cultivares de soja (*Glycine Max* (L) Merrill) especiais utilizados para alimentação humana. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, 13, 23-29.
- Percy, K. E., Awmack, C., Lindroth, R. L., Kubiske, M. E., Kopper, B. J., Isebrands, J. G., Pregitzer, K. S., Hendrey, G. R., Dickson, R. E., Zak, D. R., Oksanen, E., Sober, J., Harrington, R. & Karnosky, D. F. (2002). Altered performance of forest pests under atmospheres enriched by CO₂ and O₃. *Nature*, 420, 403-407.
- Peterbauer, T. & Richter, A. (2001). Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research*, 11, 185-198.

- Pinto, A. C., Guarieiro, L. L., Rezende, M. J., Ribeiro, N. M., Torres, E. A., Lopes, W. A., Pereira, P. A. P. & Andrade, J. B. (2005). Biodiesel: an overview. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 16, 1313-1330.
- Poorter, H. & Navas, M. L. (2003). Plant growth and competition at elevated CO₂: on winners, losers and functional groups. *New Phytologist*, 157, 175-198.
- Porra, R. J., Thompson, W. A. & Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 975, 384-394.
- Prior, S. A., Pritchard, S. G., B., R. G., Rogers, H. H. & Mitchell, R. J. (1997). Influence of atmospheric CO₂ enrichment, soil N, and water stress on Needle surface wax formation in *Pinus palustris*. *American Journal of Botany*, 84, 1070-1077.
- Qaderi, M. M. & Reid, D. M. (2005). Growth and physiological responses of canola (*Brassica napus*) to UV-B and CO₂ under controlled environment conditions. *Physiologia Plantarum*, 125, 247-259.
- Qiu, L. J. & Chang, R. Z. (2010). The origin and history of soybean. In Singh, G. (Ed.) *The Soybean. Botany, Production and Uses*. Guriqbal Singh, India, 1-23.
- Rascher, U., Biskup, B., Leakey, A. D., MacGrath, J. M. & Ainsworth, E. A. (2010). Altered physiological function, not structure, drives increased radiation-use efficiency of soybean grown at elevated CO₂. *Photosynthesis Research*, 105, 15-25.
- Rathmann, R., Benedetti, O., Plá, J. A. & Padula, A. D. (2009). *Biodiesel: uma alternativa estratégica na matriz energética brasileira?* Acesso em Julho 24, 2012, disponível em : http://www.fae.edu/publicacoes/pdf/iiseminario/sistemas/sistemas_03.pdf
- Rawson, H. M. (1992). Plant responses to temperature under conditions of elevated CO₂. *Australian Journal of Botany*, 40, 473-490.
- Ren, C., Bilyeu, K. D. & Beuselinck, P. R. (2009). Composition, vigor, and proteome of mature soybean seeds developed under high temperature. *Crop Science*, 49, 1010-1022.
- Robinson, T. (1991). *The Organic Constituents of Higher Plants*. Cordus Press, North Amherst, MA.
- Roehm, J. N. & Privett, O. S. (1970). Changes in the structure of soybean triglycerides during maturation. *Lipids*, 5, 353-358.

- Rogers, A., Allen, D. J., Davey, P. A., Morgan, P. B., Ainsworth, E. A., Bernacchi, C. J., Cornic, G., Dermody, O., Dohleman, F. G. & Heaton, E. A. (2004). Leaf photosynthesis and carbohydrate dynamics of soybeans grown throughout their life cycle under Free Air Carbon dioxide Enrichment. *Plant, Cell & Environment*, 27, 449-458.
- Rubel, A., Rinne, R. W. & Canvin, D. T. (1972). Protein, oil, and fatty acid in developing soybean seeds. *Crop Science*, 12, 739-741.
- Salatino, A., Montenegro, G. & Salatino, M. L. F. (1986). Microscopia eletrônica de varredura de superfícies foliares de espécies lenhosas do cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, 9, 117-124.
- Saldívar, X., Wang, Y., Chen, P. & Hou, A. (2011). Changes in chemical composition during soybean seed development. *124*, 1369-1375.
- Santana, A. C., Carrão-Panizzi, M. C., Mandarino, J. M., Leite, R. S., Silva, J. B. & Ida, E. I. (2012). Effect of harvest at different times of day on the physical and chemical characteristics of vegetable-type soybean. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 32, 351-356.
- Santos, H. P., Purgatto, E., Mercier, H. & Buckeridge, M. S. (2004). The control of storage xyloglucan mobilisation in cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. *Plant Physiology*, 135, 287-299.
- Saravitz, D. M., Pharr, D. M. & Carter Jr, T. E. (1987). Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. *Plant Physiology*, 83, 185-189.
- Sato, S., Peet, M. M. & Thomas, J. F. (2002). Determining critical pre and post anthesis periods and physiological processes in *Lycopersicon esculentum* Mill., exposed to moderately elevated temperatures. *Journal Experimental Botany*, 53, 1187-1195.
- Schneider, L., Amarante, L., Agostinetto, D. & Bohm, G. B. (2009). Análise pigmentar e nitrogênio em soja transgênica cultivada com o uso de glifosato. Livro de Resumos da 2ª Mostra de Trabalhos de Tecnologia Ambiental, 44-47.
- Schweizer, T. F., Horman, I. & Wursch, P. (1978). Low molecular weight carbohydrates from Leguminous. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 148-154.
- Shanmugasundaram, S. (1991). Vegetable Soybean: Research Needs for Production and Quality Improvement. Proceeding of workshop held at Kenting, Taiwan 29 April-2 May 1991. Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center.

- Shepherd, T. & Griffiths, D. W. (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, 171, 469-499.
- Silva, M. T., Moraes, R. M. & Teixeira, J. P. (1981). Variação da composição química de grãos de soja "Santa-Rosa" durante o seu desenvolvimento. *Bragantia-Revista Científica do Instituto Agronômico, Campinas*, 40, 11-19.
- Sionit, N., Strain, B. R. & Flint, E. P. (1987a). Interaction of temperature and CO₂ enrichment on soybean: growth and dry matter partitioning. *Canadian journal of plant science*, 67, 59-67.
- Sionit, N., Strain, B. R. & Flint, P. (1987b). Interaction of temperature and CO₂ enrichment on soybean: photosynthesis and seed yield. *Canadian Journal of Plant Science*, 67, 629-636.
- Siqueira, O. J., Farias, J. R. & Sans, L. M. (1994). Potential effects of global climate changes for Brazilian agriculture and adaptative strategies for wheat, maize and soybean. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, 2, 115-129.
- Smirnoff, N. (1995). Metabolic flexibility in relation to the environment. In Smirnoff, N. (Ed.) *Environment and plant metabolism flexibility and acclimation*. Bios scientific publishers, UK, 1-16.
- Smith, A. M., Denyer, K. & Martin, C. (1997). The synthesis of the starch granule. *Annual Review of Plant Biology*, 48, 67-87.
- Streck, N. A. (2005). Climate change and agroecosystems: the effect of elevated atmospheric CO₂ and temperature on crop growth, development, and yield. *Ciência Rural*, 35, 734-744.
- Streck, N. A. & Alberto, C. M. (2006). Estudo numérico do impacto da mudança climática sobre o rendimento de trigo, soja e milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41, 1351-1359.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Taub, D. R., Miller, B. & Allen, H. (2008). Effects of elevated CO₂ on the protein concentration of food crops: a meta-analysis. *Global Change Biology*, 14, 565-575.
- The American Soybean Association. (2012). *World Soybean Production*. Acesso em Junho 18, 2012, disponível em <http://www.soystats.com/2012/Default-frames.htm>
- Thomas, J. M., Boote, K. J., Allen, J. L., Gallo-Meagher, M. & Davis, J. M. (2003). Elevated temperature and carbon dioxide effects on soybean seed composition and transcript abundance. *Crop Science*, 43, 1548-1557.

- Thomas, J. M., Prasad, P. V., Boote, K. J. & Allen Jr, L. H. (2009). Seed composition, seedling emergence and early seedling vigour of red kidney bean seed produced at elevated temperature and carbon dioxide. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195, 148-156.
- Thorne, J. H. (1982). Temperature and oxygen effects on ¹⁴C-photosynthate unloading and accumulation in developing soybean seeds. *Plant Physiology*, 69, 48-53.
- Tian, L., Qi-hua, L., Ohsugi, R., Yamagishi, T. & Sasaki, H. (2006). Effect of high temperature on sucrose content and sucrose cleaving enzyme activity in rice grain during the filling stage. *Rice Science*, 13, 205-210.
- Tonini, P. P., Lisboa, C. G., Silva, C. O., Mazzoni-Viveiros, S. C. & Buckeridge, M. S. (2007). Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a tropical legume tree from of the Atlantic forest. *Trees-Structure and Function*, 21, 13-21.
- Vanhatalo, M., Huttunen, S. & Bäck, J. (2001). Effects of elevated [CO₂] and O₃ on stomatal and surface wax characteristics in leaves of pubescent birch grown under field conditions. *Trees*, 15, 304-313.
- Vasić, M., Gvozdanović-Varga, J. & Červenski, J. (2008). Divergence in the dry bean collection by principal component analysis (PCA). *Genetika*, 40, 23-30.
- Vu, J. C., Allen, J. L., Boote, K. J. & Bowes, G. (1997). Effects of elevated CO₂ and temperature on photosynthesis and Rubisco in rice and soybean. *Plant, Cell and Environment*, 20, 68-76.
- Vu, J. C., Allen, L. H. & Bowes, G. (1989). Leaf ultrastructure, carbohydrates and protein of soybean grown under CO₂ enrichment. *Environmental and Experimental Botany*, 29, 141-147.
- Weber, H., Borisjuk, L. & Wobus, U. (1997). Sugar import and metabolism during seed development. *Trends in Plant Science*, 2, 169-174.
- Wilson, L. A., Birmingham, V. A., Moon, D. P. & Snyder, H. E. (1978). Isolation and characterization of starch from mature soybeans. *Cereal Chemists*, 55, 661-670.
- Wise, R. R. & Hooper, K. (2007). *The Structure and Function of Plastids: Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 23*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Wolf, R. B., Cavins, J. F., Kleiman, R. & Black, L. T. (1982). Effect of temperature on soybean seed constituents: oil, protein, moisture, fatty acids, amino acids and sugars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 59, 230-232.

- Wolf, W. J. (1976). Chemistry and technology of soybean. *Advances in Cereal Science and Technology*, 1, 325-377.
- Yazdi-Samadi, B., Rinne, R. W. & Seif, R. D. (1977). Components of developing soybean seeds: oil, protein, sugars, starch, organic acids, and amino acids. *Agronomy Journal*, 66, 481-486.
- Yepes, A. M. (2010). Desenvolvimento e efeito da concentração atmosférica de CO₂ e da temperatura em plântulas juvenis de *Hymenaea corbaril* L, jatobá. São Paulo: Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo.
- Zizka, L. H., Manalo, P. A. & Ordonez, R. A. (1996). Intraspecific variation in the response of rice (*Oryza sativa* L.) to increased CO₂ and temperature: growth and yield response of 17 cultivars. *Journal of Experimental Botany*, 47, 1353-1359.

Capítulo II. Cera foliar cuticular da cultivar ‘MG/BR-46 Conquista’ de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

1. INTRODUÇÃO

Os seres vivos que evoluíram da água para o meio terrestres são protegidos externamente por uma camada polimérica impregnada com substâncias lipídicas solúveis. Nas plantas, essa camada é denominada *cutina*. Impregnando essa matriz, há uma complexa mistura de substâncias lipófilas conhecida como ceras (Riederer *et al.*, 2006; Schreiber *et al.*, 2009). O conjunto de cutina mais as ceras que a impregnam constitui a cutícula das plantas. A cutina se distingue das ceras pela solubilidade em solventes orgânicos; os compostos solúveis constituem a cera cuticular, enquanto a cutina é o componente lipofílico que não se consegue extrair, devido à sua natureza polimérica (Buschhaus *et al.*, 2011). Na cutícula, distinguem-se dois tipos de ceras: a) cera intracuticular – é a que embebe a matriz de cutina; b) cera epicuticular – cera que se deposita sobre a cutina. Nos casos em que não se pretende referir a um tipo ou outro de cera, costuma-se usar o termo “cera cuticular”. A cutícula está presente nas superfícies abaxial e adaxial das folhas, caules jovens e muitos frutos (Jeffree, 2006). Em outras partes das plantas, por exemplo, no súber do caule e da raiz, podem ocorrer outras substâncias poliméricas lipófilas, como a suberina.

As ceras cuticulares desempenham numerosas funções de importância vital para os vegetais. Elas atuam como uma barreira de proteção contra o estresse ambiental, incluindo déficit hídrico, radiação UV, extremos de temperatura, patógenos e insetos herbívoros. As folhas são os principais tecidos fotossintetizantes nas plantas, sendo frequentemente o primeiro a sofrer danos por estresse ambiental. O revestimento de cera cuticular na folha está ligado à proteção frente ao dano mecânico e estresse antropogênico, tais como chuva ácida e aplicações de agroquímicos (Shepherd *et al.*, 2006). Kosch *et al.* (2006) observaram em couve (*Brassica oleracea*) uma elevação na concentração e espessura da camada de cera com a redução da umidade relativa. Observaram também uma redução da superfície foliar. No entanto, em outras plantas, como eucalipto (*Eucalyptus gunnii*) e capuchinha (*Tropaeolum majus*) não se detectaram alterações.

Normalmente, se a disponibilidade de água for muito reduzida, ocorre o fechamento dos estômatos; a transpiração passa a ser exclusivamente cuticular (Bengtson *et al.*, 1978). A taxa de transpiração cuticular varia muito de espécie para espécie. Por exemplo, em xerófitas extremas, ela pode ser de 0,05%, enquanto em *Impatiens noli-tangere* a transpiração cuticular pode chegar a 32% (Larcher, 1975). Vários fatores podem ser responsáveis pela maior ou menor eficiência da cutícula contra a perda d'água. O'Toole *et al.* (1979) constataram para duas cultivares de arroz (IR20 e 63-83) que a eficiência à resistência cuticular estava directamente relacionada à quantidade de cera depositada e ao maior teor de *n*-alcanos. Também em variedades de aveia (Bengtson *et al.*, 1978) e de soja (Clark & Levitt., 1956) o aumento no teor de cera foliar provoca redução na taxa de transpiração cuticular.

Além dos alcanos, outras classes de constituintes da cera, como os ésteres, cetonas e álcoois secundários, são eficientes barreiras à transpiração cuticular, enquanto os esteroides e os triterpenos são menos eficientes (Holloway, 1969). Oliveira *et al.* (2003) constataram em ceras de espécies da Caatinga e do Cerrado que os *n*-alcanos são mais eficientes frente à perda d'água que os triterpenos (epifriedelinol, lupeol e lupeol + β -amirina), enquanto as cetonas (hentriacontan-16-ona) e o ácido ursólico são os constituintes menos eficientes.

De acordo com Schönherr (1976), o grupo carboxila (-COOH) tem alta afinidade para moléculas de água. A oxidação e a condensação dos ácidos graxos podem afetar a espessura e a consistência da cutícula (Goodwin & Jenks, 2005). O balanço da composição química determina o grau de hidrofobicidade da superfície cuticular (Holloway, 1969).

As ceras de algumas plantas, como carnaúba, dendê e linho, foram estudadas por seu valor econômico na indústria de cosméticos, lubrificantes e polidores. Silva Fernandes *et al.* (1964 e 1965) estão entre os primeiros pesquisadores a determinar o teor e a composição química da cera de frutos e folhas de plantas de interesse econômico, como maçã, repolho, café e eucalipto. Recentemente, estudos vêm sendo feitos com o objetivo de alterar a composição da cera epicuticular em plantas transgênicas, com vistas ao incremento da resistência a pressões ambientais extremas (Kosma *et al.*, 2009; Lü *et al.*, 2009; Reina-Pinto *et al.*, 2009).

Os componentes mais comuns da cera cuticular são os *n*-alcanos e seus derivados oxigenados, como álcoois primários e secundários, aldeídos, cetonas, ácidos

graxos e ésteres (Kolattukudy, 1969). Os compostos apresentam longas cadeias carbônicas (C_{16} - C_{34}). O segundo grupo de constituintes da cera cuticular são os triterpenos pentacíclicos, procedentes do metabolismo dos terpenóides. Os triterpenos mais comuns são álcoois triterpênicos pentacíclicos (como α -amirina e β -amirina) e ácidos (como o oleanólico e o ursólico). Compostos aromáticos, como os flavonoides, além de esteróis, podem também ser encontrados em ceras cuticulares de algumas espécies (Kunst *et al.*, 2003; Schreiber *et al.*, 2009). As β -dicetonas e triterpenos pentacíclicos são os principais componentes da cera de caules e frutos de algumas plantas (Kolattukudy, 1996).

Os *n*-alcanos, álcoois secundários, cetonas e aldeídos possuem predominantemente números ímpares de átomos de carbono, em geral na faixa C_{19} - C_{33} ; os álcoois primários, aldeídos, ácidos graxos e ésteres apresentam predominantemente números pares de átomos de carbono. As cadeias carbônicas de ésteres podem chegar até C_{64} (Kolattukudy, 1996; Kunst *et al.*, 2003).

A composição das ceras cuticulares pode variar entre os grupos taxonômicos, podendo ser característico de espécies ou grupos de espécies (Mimura *et al.*, 1998). Por outro lado, a distribuição de constituintes nas ceras cuticulares pode variar em função de estádios de crescimento e condições ambientais (Bondada *et al.*, 1996; Furlan *et al.*, 2006; Buschhaus *et al.*, 2011).

Os depósitos cerosos sobre a superfície da folha podem assumir variados padrões de morfologia ultraestrutural. Barthlott *et al.* (1998) estudaram cerca de 13000 espécies de plantas com sementes, reconhecendo 23 tipos de ceras. Os padrões estruturais mais frequentes são de natureza cristalina, sendo denominados cristalóides. Ceras com predominância de *n*-alcanos e álcoois primários cristalizam-se geralmente sob a forma de placas; os álcoois secundários e as cetonas, como túbulos e bastonetes; os aldeídos, na forma de grânulos; os diois, como fitas estreitas. Ceras com predomínio de triterpenóides e ésteres de acila não formam cristais; os depósitos cerosos correspondentes são amorfos (Jeffree, 2006).

A variação na permeabilidade da cutícula pode estar associada à espessura dos depósitos de cera e padrões de morfologia dos depósitos (Oliveira *et al.*, 2000; Goodwin & Jenks, 2005). A permeabilidade pode ser medida pelo ângulo de contacto, ou seja, o ângulo formado entre a superfície foliar e o plano da tangente à superfície de uma gota de água. Os ângulos de contacto são indicativos da capacidade de retenção da água, sendo

aplicados em trabalhos sobre o ataque de agentes fitopatogênicos, assimilação de nutrientes, danos por poluentes e agroquímicos (Shepherd & Griffiths, 2006). O aumento do ângulo de contacto está relacionado positivamente à impermeabilidade foliar e pode variar com as fases de desenvolvimento da planta. Geralmente as maiores taxas de absorção de nutrientes é feita por folhas jovens, em vez de folhas completamente expandidas (Baker & Hunt, 1981; Moran-Puente & Baur, 2011). A aplicação de defensivos em folhas de plantas cultivadas pode promover alterações nos teores de cera e na morfologia dos depósitos cerosos, como ocorre em plantas de café (Lichston & Godoy, 2006.).

As ceras epicuticular e intracuticular podem apresentar teores e composições distintas (Shepherd *et al.*, 2006). Buschhaus *et al.* (2011) observaram que a cera intracuticular possui menos ésteres e mais ácidos graxos do que a epicuticular, enquanto ácidos triterpênicos são exclusivos desta última.

Comumente, a extração da cera é realizada por imersão das folhas em solvente orgânico, como clorofórmio ou hexano; os órgãos vegetais devem ser intactos e o contato com o solvente varia entre 2 seg até 1 min (Silva Fernandes *et al.*, 1964; Silva Fernandes 1965; Salatino *et al.*, 1989; Cordeiro *et al.*, 2011).

O estudo da distribuição dos *n*-alcanos da cera epicuticular tem sido usado como critério taxonômico, principalmente para comparação em níveis hierárquicos inferiores (gênero, espécie e categorias inferiores). Embora se tenha comentado que os padrões de alcanos podem ser afetados por fatores como o estado de desenvolvimento do órgão vegetal e condições ambientais, como temperatura, umidade relativa e intensidade de luz, estudos têm demonstrado que a distribuição de alcanos adquire estabilidade após certo estágio de desenvolvimento da folha (Kolattukudy, 1970 b). Estudos têm demonstrado a utilidade taxonômica da distribuição de alcanos em diversos grupos de angiospermas (Mimura *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2006; Motta *et al.*, 2009; Salatino *et al.*, 1989; Salatino *et al.*, 1991; Chadwick *et al.*, 2000).

1.1. Biossíntese de ceras cuticulares

Samuels *et al.* (2008) dividem em três fases a biossíntese dos componentes mais comuns da cera cuticular. A primeira fase corresponde à síntese dos ácidos graxos C₁₆ e C₁₈ no estroma dos plastídeos (leucoplastos). Os ácidos graxos são esterificados por

malonil-CoA e translocados para o retículo endoplasmático, onde começa o alongamento das cadeias carbônicas dos ácidos graxos. Na segunda fase, intervém o complexo multienzimático de elongases dos ácidos graxos, análogo à síntese de ácidos graxos dos lípidios de sementes. Na fase final, ocorre a formação dos componentes comuns da cera cuticular, como álcoois, ésteres, aldeídos, alcanos e cetonas (Buchanan *et al.*, 2000). Reconhecem-se duas vias biossintéticas para a formação dos componentes das ceras derivados de ácidos graxos: via de redução do grupamento acila, que dá origem aos constituintes com números pares de átomos de carbono, como aldeídos, álcoois primários e ésteres; via de descarbonilação, que leva à formação de alcanos, álcoois secundários e cetonas; são constituintes que apresentam predominância de homólogos com números ímpares de átomos de carbono (Kunst *et al.*, 2003).

Na via de redução da acila, as enzimas redutases de ácidos graxos formam primeiramente aldeídos, que são reduzidos, transformando-se em álcoois primários. Estes podem ser combinados com ácidos graxos de cadeia longa pela enzima cera sintase, levando à formação de ésteres. Na via da descarbonilação, os aldeídos perdem o grupo funcional (perda de um grupo CO), dando origem aos alcanos. A oxidação dos alcanos leva à formação dos álcoois secundários; uma oxidação posterior dará origem a cetonas.

Outros componentes importantes da cera cuticular são os triterpenoides biossintetizados a partir da via acetato-mevalonato. Os triterpenoides podem ser divididos em dois principais grupos: os compostos tetracíclicos de quatro anéis (os esteroides) e os pentacíclicos de cinco anéis (os triterpenos) (Vickery & Vickery, 1981).

A biossíntese da via começa com a redução da hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) proveniente de 3 moléculas de acetil-CoA e dois de NADPH, formando-se o ácido mevalônico (AMV-C₆). Por fosforilação, obtém-se o pirofosfato de isopentenila (IPP); este se isomeriza e forma o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP). Uma unidade de IPP e outra de DMAPP combinam-se, formando o pirofosfato de geranila (GPP). Pela adição de uma unidade de IPP, obtém-se o pirofosfato de farnesila (FPP), um composto com 15 átomos de carbono (C₁₅). Duas unidades de FPP darão origem ao *esqualeno* (um composto C₃₀), o precursor de todos os triterpenoides cíclicos e esteroides. O esqualeno é ciclizado por ação da enzima esqualeno epoxidase-ciclase, formando o 2,3-epóxi-esqualeno. A reação requer oxigênio e NADPH. O 2,3-epóxi-esqualeno é o precursor imediato de triterpenos tetracíclicos ou triterpenos pentacíclicos. Na formação dos triterpenos tetracíclicos a enzima cicloartenol-ciclase formará o cicloartenol, principal precursor dos fitosteróis mais

comuns nas plantas. No caso dos triterpenos pentacíclicos, a nova conformação do composto 2,3-epóxi esqualeno, por ação da ciclase, formará o cátion damarenil, precursor do cátion lupanil (precursor do lupeol) e oleanil (precursor da α -amirina e β -amirina) (Brooks, 1979, Dey & Harborne, 1997; Piironen *et al.*, 2000; Moreau *et al.*, 2002; Dewick, 2009). As principais estruturas derivadas do ácido mevalónico são apresentados na Figura 1.

Os fitosteróis diferem entre si por detalhes estruturais, como a alquilação em C-24 por substituintes C₁ ou C₂. O sitosterol e o estigmasterol apresentados na Figura 1D e 1E têm um grupo etila em C-24, mas diferem entre si pela dupla ligação entre C-22 e C-23 apenas no estigmasterol. O campesterol tem um grupo metila em C-24 (Piironen *et al.*, 2000). Os esteróis ou fitoesteróides são relativamente apolares e mostram estabilidade térmica e química consideráveis (Brooks, 1979).

Posteriormente, os componentes das ceras são transportados para a membrana plasmática. Há duas hipóteses relacionadas a esse transporte: a primeira admite que o transporte se faz por meio de vesículas secretadas pelo complexo golgiense; a outra hipótese propõe a transferência direta nos locais de contato do retículo endoplasmático com a membrana plasmática (Samuels *et al.*, 2008).

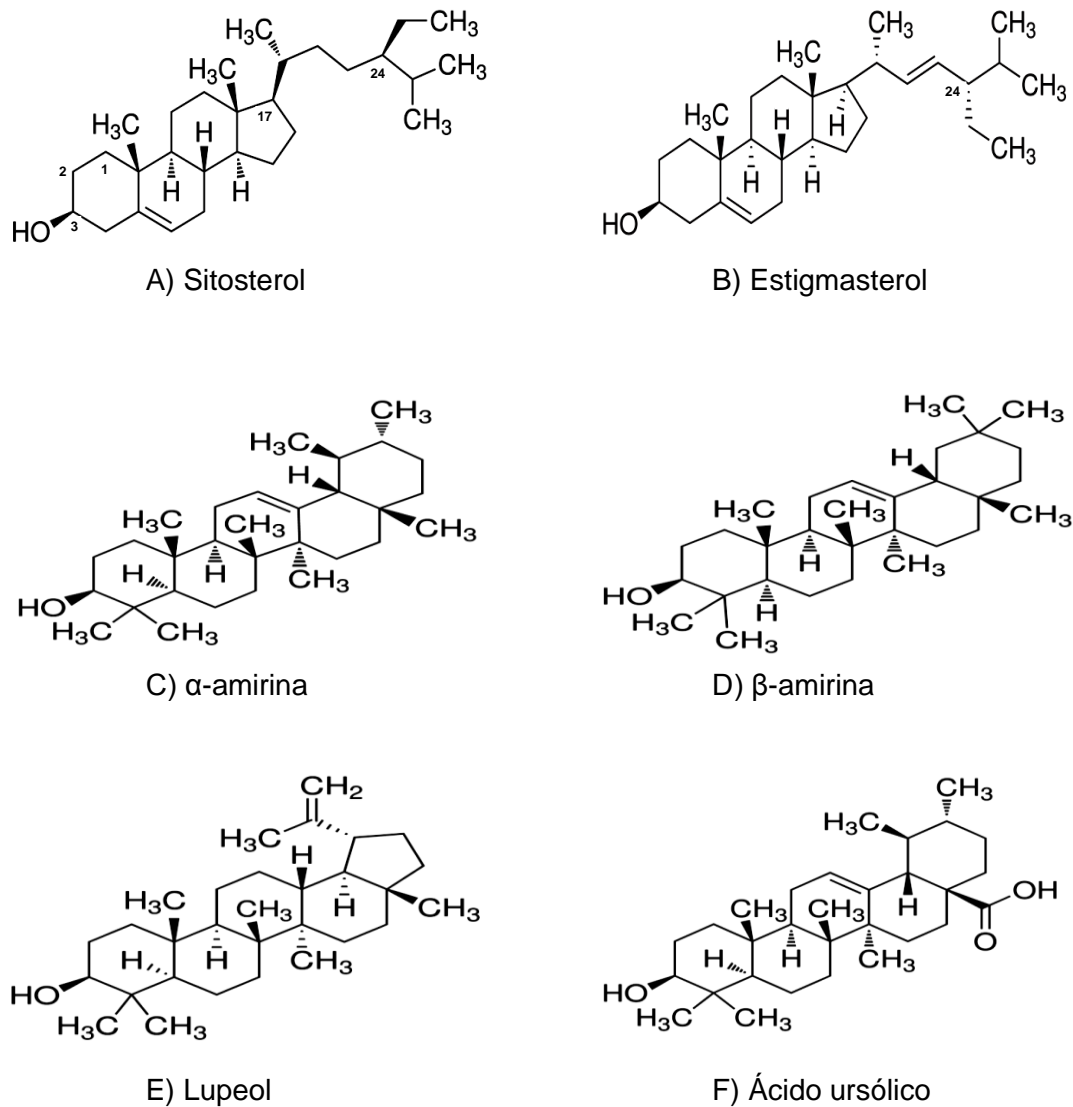


Figura 1. Substâncias tetracíclicas e pentacíclicas derivadas da via acetato-mevalonato.

1.2. Soja

A soja (*Glycine max* [L.] Merrill) é uma das mais importantes culturas na economia mundial. Seus grãos são amplamente usados pela agroindústria na produção de óleo vegetal e rações para alimentação animal, pela indústria química e de alimentos. Recentemente, vem crescendo o uso do óleo de soja como fonte de biodiesel. No Brasil, a soja é a fonte preferencial para produção desse combustível.

Admite-se que o centro de origem e domesticação da soja tenha sido o nordeste da Ásia, principalmente ao longo do Rio Amarelo, na China. A cultura foi introduzida no Brasil no final do século XIX, vinda dos Estados Unidos. Porém, foi somente a partir da década de 1960 que o cultivo da soja no Brasil foi fortemente estimulada, passando a estabelecer-se como cultura economicamente importante no Brasil (EMBRAPA, 2004).

Segundo dados registrados em 2010, os Estados Unidos produzem 35% de toda a soja consumida mundialmente, o Brasil, 27% e a Argentina, 19%. O conhecimento sobre a composição da cera cuticular é importante para avaliar as condições de resistência a estresses ambientais e para a caracterização química de variedades da espécie cultivada. Kim *et al.* (2007) determinaram a variação na quantidade e composição de cera de 18 cultivares de soja submetidas a um regime de seca por 10 dias após a floração. Observou-se substancial aumento na quantidade de cera produzida, mas pequenas diferenças na composição química. Os constituintes identificados foram *n*-alcanos, álcoois primários e os triterpenoides 3-ceto-olean-12-eno, lupenona, lupeol e amirinas.

Entre as cultivares de soja que vêm recentemente sendo utilizadas no Brasil, a variedade 'MG/BR-46 Conquista' se destaca pela boa produtividade e resistência a doenças, como o cancro da haste. As plantas têm 75-85 cm de altura, vivem 48-54 dias para a floração e 109-140 dias para maturação; as sementes contêm aproximadamente 20% de óleo e 43% de proteínas (dados disponíveis em http://www.apassul.com.br/index.php?menu=cultivares_mostra&acao=mostrar&chave=305).

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi o de determinar o teor de cera cuticular de folhas da cultivar 'MG/BR – 46 Conquista' de soja e sua composição química.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo das plantas

Sementes classificadas e não tratadas da safra 2010/2011 foram fornecidas pela EMBRAPA – Soja. O cultivo das plantas foi realizado no fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica. As sementes foram postas para germinar em bandejas contendo vermiculita, permanecendo 4 dias em câmaras de germinação do tipo BOD sob fotoperíodo de 12 horas a 30°C. Posteriormente as bandejas foram mantidas em casa de vegetação por 10 dias para aclimação. As plântulas foram transferidas para solo fertilizado com cinza vegetal. O crescimento das plantas ocorreu entre junho e agosto de 2011. Folhas totalmente expandidas, foram coletadas antes do período de floração, 60 dias após o plantio no solo.

3.2. Determinação do teor de cera cuticular

Empregaram-se folhas plenamente expandidas e sem lesões, do terceiro e quarto nó. Foram utilizadas 10 folhas para obtenção de cera cuticular. Antes da extração da cera, a imagem dos folíolos foram digitalizadas com impressora multifuncional HP deskjet F 4100 antes da extração da cera. A área foliar foi obtida utilizando-se o programa ImageJ 1.44p [64-bit]. A extração da cera foi feita antes de 24 h após coleta, por imersão dos folíolos em diclorometano por três vezes consecutivas, a primeira por 30 seg, a segunda durante 20 seg e a última durante 10 seg (Oliveira *et al.*, 2003). Os extratos foram reunidos, filtrados e concentrados em rotaevaporador até a secura. O resíduo foi dissolvido em pequeno volume de diclorometano. A solução foi transferida para frascos de vidro previamente pesados. O solvente foi evaporado até a secura em banho-maria e os frascos foram mantidos em dessecador até massa constante. O teor de cera foi obtido pelo quociente entre a massa de cera obtida (μg) e o dobro da área total dos folíolos determinada com a imagem digitalizada.

3.3. Separação das classes químicas dos componentes da cera cuticular

Foram coletadas folhas plenamente expandidas e sem lesões aparentes, provenientes do terceiro e quarto nós. A cera cuticular foi extraída com diclorometano, segundo os procedimentos descritos acima.

A separação das frações de constituintes da cera foi feita por meio de cromatografia em camada delgada (TLC) de gel de sílica G Typ 60 (Merck), impregnada com fluoresceína sódica a 0,02%. Foram usadas placas com gel de sílica de 0,75 mm de espessura. Utilizou-se como fase móvel a mistura de solventes hexano:clorofórmio (70:30) ou diclorometano. As faixas dos componentes foram visualizadas com luz ultravioleta de ondas longas (Salatino *et al.*, 1988) (Figura 2A). Os componentes da cera distribuíram-se em 5 frações (Figura 2B). As faixas ou zonas de sílica impregnada com os componentes da cera foram removidas com espátula e transferidas para frascos de vidro (Figura 2B). As substâncias foram eluídas da sílica três vezes sobre banho-maria por 20, 15 e 10 min. As faixas correspondentes às frações 1-5 foram retiradas da placa e transferidas para frascos previamente pesados. A fração 1 foi recromatografada com hexano:clorofórmio (70:30), obtendo-se as subfrações de *n*-alcanos e ésteres (Figura 2C). Após evaporação total do solvente, os frascos foram mantidos em dessecador até massa constante.

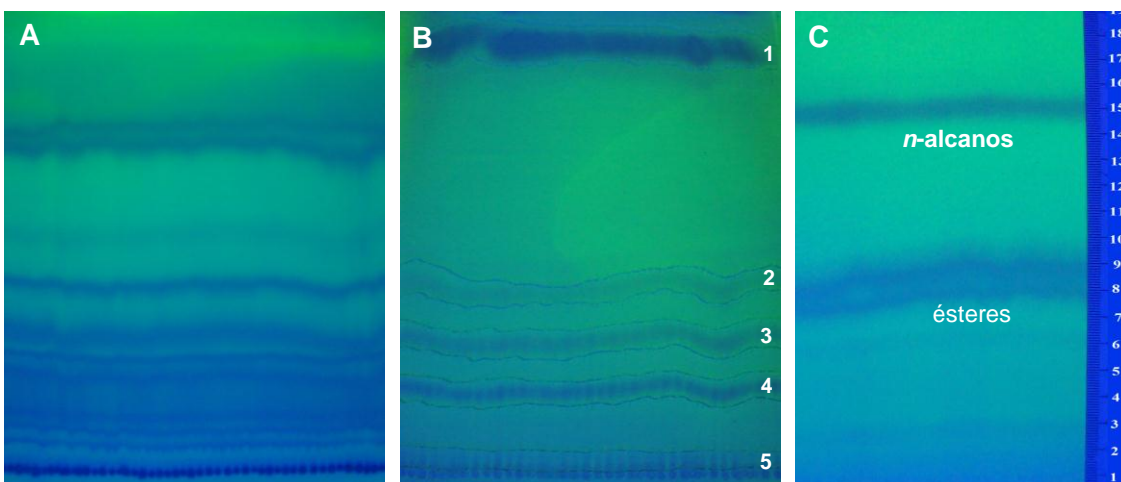


Figura 2. Cromatogramas em camada delgada de placas de gel de sílica G Typ 60, impregnada com fluoresceína sódica a 0,02%, visualizados sob luz ultravioleta. **A:** cera foliar cuticular de soja, após análise com hexano:clorofórmio (70:30). **B:** cera foliar cuticular da soja, após análise com diclorometano. **C:** Análise da fração 1 recromatografada com fase móvel hexano:clorofórmio (70:30), são visualizados as subfrações de *n*-alcanos e ésteres.

3.4. Análise da fração de *n*-alcanos e éster

As frações de *n*-alcanos e ésteres foram obtidas da fração 1 da análise por cromatografia em camada delgada, usando-se diclorometano como fase móvel (Figura 2B). A fração 1 desdobrou-se em duas frações por análise com hexano:clorofórmio (70:30) (Figura 2C), uma de *n*-alcanos e outra de ésteres. A fração de *n*-alcanos foi retomada com 200 μ L de hexano e analisada por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Foi utilizado um aparelho Agilent 6850/Agilent 5975C, coluna capilar DB-5HT - Sílica - (30 m x 0.32 mm x 0.10 μ m), volume de injeção de 1 μ L, gás de arraste hélio com fluxo de 1 mL min⁻¹ e método de impacto eletrônico em 70 eV. As temperaturas do injetor e do detector foram 300 °C. Foi utilizada a seguinte programação de temperaturas da coluna: temperatura inicial 100 °C por 3 min e rampa de 5 °C por min até 320 °C (temperatura final), mantida por 5 min. O tempo total de análise foi 52 min (Mimura *et al.*, 1998).

A fração de ésteres foi retomada em 200 μ L de hexano e submetida às mesmas condições de análise que os *n*-alcanos, com algumas modificações na programação de temperaturas: temperatura inicial 250 °C por 3 min e rampa de 5 °C por min até 320 °C (temperatura final), mantida por 23 min; tempo total de análise 40 min.

A identificação dos homólogos de *n*-alcanos e ésteres foi feita por análise dos respectivos espectros de massas e comparação com a biblioteca NIST e dados de literatura. A identificação dos *n*-alcanos baseou-se também na comparação com um conjunto de amostras padrões.

A quantidade relativa dos homólogos de *n*-alcanos e ésteres foi determinada por análise em cromatógrafo a gás HP 5890 series II Plus, provido de detector de ionização de chamas, usando-se a mesma coluna e condições descritas acima.

Os eluatos das faixas 2-5 foram tratados com N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BFSTA, 100 μ L) em solução de piridina (100 μ L) por 20 min a 100°C em banho seco, para obtenção de derivados trimetil-sililados, de acordo com Jetter *et al.* (2000). Após o tratamento, as amostras foram mantidas sob corrente de nitrogênio para eliminação do solvente. As amostras foram retomadas em hexano (300 μ L) para análise por cromatografia a gás e espectroscopia de massas, utilizando-se as mesmas condições para análise de *n*-alcanos. A identificação dos constituintes foi realizada por análise dos respectivos espectros de massas e comparação com a biblioteca NIST e literatura.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação quantitativa e qualitativa dos componentes da cera foliar

O total de cera cuticular obtido das folhas analisadas foi 234,7 mg. Levando-se em conta a área total dos folíolos de soja, o teor de cera foliar cuticular corresponde a $15,2 \pm 1,1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. É um teor relativamente baixo, embora não incomum em folhas de plantas cultivadas (Baker, 1982). Plantas nativas, como várias espécies típicas do cerrado, normalmente possuem folhas com depósitos cerosos bem mais espessos, acima de $60 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Oliveira *et al.*, 2000). Espessas camadas de cera foliar incluem-se entre as características de rusticidade, que tendem a ser atenuadas nos processos de melhoramento genético. Folhas de 18 cultivares de soja apresentaram teores de $8,26 \pm 1,67 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de cera foliar; tais teores tiveram incremento de 30% após 10 dias de sujeição das plantas a um regime de déficit hídrico (Kim *et al.*, 2007).

Os teores das frações da cera cuticular das folhas analisadas, apresentados na Tabela 1, foram calculados com base nas respectivas massas, obtidas por eluição das placas de gel de sílica (Figuras 2B e 2C).

Tabela 1. Massa e teor (%) das frações recuperadas da análise por cromatografia em camada delgada de cera cuticular da cultivar de soja 'MG/BR - 46 Conquista' (ver Figuras 2B e 2C).

Fração	Teor (%)
1 <i>n</i> -alcanos	10,8
ésteres	25,7
2 álcoois graxos, triterpenoides	16,2
3 ácidos graxos, hidroácidos graxos	9,8
4 ácidos graxos, esteroides	11,6
5 ácidos graxos, esteroides	25,9

4.2. Análise de *n*-Alcanos

No perfil dos *n*-alcanos, observa-se predominância dos homólogos de cadeia longa e números ímpares de átomos de carbono (Figura 3). A série homóloga estende-se no intervalo C₁₉ – C₃₃ para as cadeias com números ímpares de átomos de carbono. A série com números pares de átomos de carbono estende-se no intervalo C₂₂ – C₃₂.

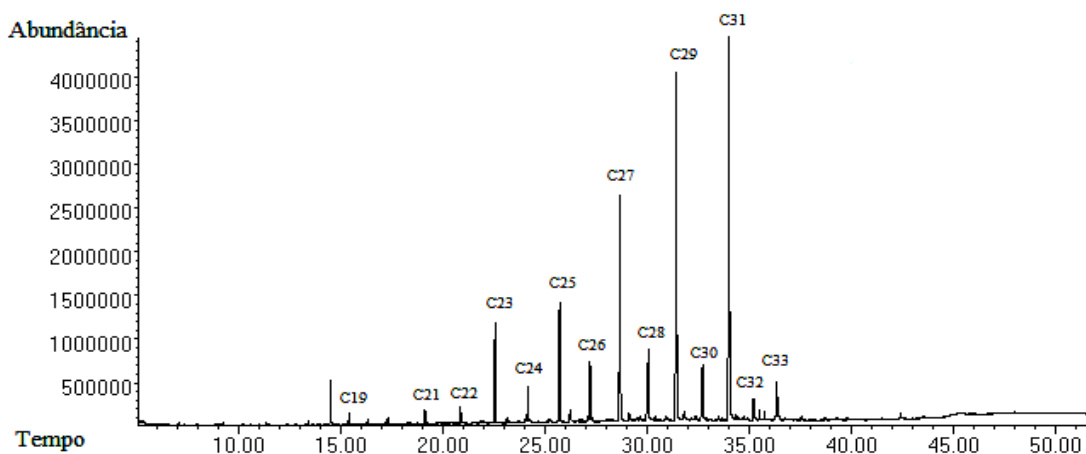


Figura 3. Cromatograma da fração de *n*-alcanos da cera foliar cuticular da cultivar 'MG/BR – 46 Conquista' de soja.

Os *n*-alcanos foram identificados pelos característicos espectros de massas, picos moleculares bem detectáveis (em alguns casos em pequena abundância), pico base em m/z 57 $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3]^+$ e fragmentos m/z 71 e m/z 85 abundantes (Buckley *et al.*, 1999). Na Figura 4, apresenta-se o espectro de massas do nonacosano.

A distribuição dos homólogos de *n*-alcanos, determinada por cromatografia a gás e detecção por ionização de chamas, é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Tempos de retenção e distribuição de *n*-alcanos da cera foliar cuticular da cultivar 'MG/BR – 46 Conquista' de soja.

TR (min)	<i>n</i> -alcanos	Proporção relativa (%)	m/z (intensidade)	M ⁺ (m/z)
15,49	<i>n</i> -nonadecano (C ₁₉ H ₄₀)	< 1,0	57(100); 71(80); 85 (70)	282
19,2	<i>n</i> -heneicosano (C ₂₁ H ₄₄)	< 1,0	57(100); 71(80); 85 (70)	296
20,9	<i>n</i> -docosano (C ₂₂ H ₄₆)	< 1,0	57(100); 71(80); 85 (70)	310
22,6	<i>n</i> -tricosano (C ₂₃ H ₄₈)	5,7	57(100); 71(80); 85 (70)	324
24,2	<i>n</i> -tetracosano (C ₂₄ H ₅₀)	2,0	57(100); 71(80); 85 (70)	338
25,8	<i>n</i> -pentacosano (C ₂₅ H ₅₂)	6,8	57(100); 71(80); 85 (70)	352
27,2	<i>n</i> -hexacosano (C ₂₆ H ₅₄)	3,6	57(100); 71(80); 85 (70)	366
28,7	<i>n</i> -heptacosano (C ₂₇ H ₅₆)	13,4	57(100); 71(80); 85 (70)	380
30,1	<i>n</i> -octacosano (C ₂₈ H ₅₈)	5,1	57(100); 71(80); 85 (70)	394
31,5	<i>n</i> -nonacosano (C ₂₉ H ₆₀)	22,8	57(100); 71(80); 85 (70)	408
32,7	<i>n</i> -triacontano (C ₃₀ H ₆₂)	4,2	57(100); 71(80); 85 (70)	422
34,0	<i>n</i> -hentriacontano (C ₃₁ H ₆₄)	27,5	57(100); 71(80); 85 (70)	436
35,2	<i>n</i> -dotriacontano (C ₃₂ H ₆₆)	1,9	57(100); 71(80); 85 (70)	450
36,3	<i>n</i> -tritriacontano (C ₃₃ H ₆₈)	< 1,0	57(100); 71(80); 85 (70)	464

TR = Tempo de retenção; M⁺ = íon molecular

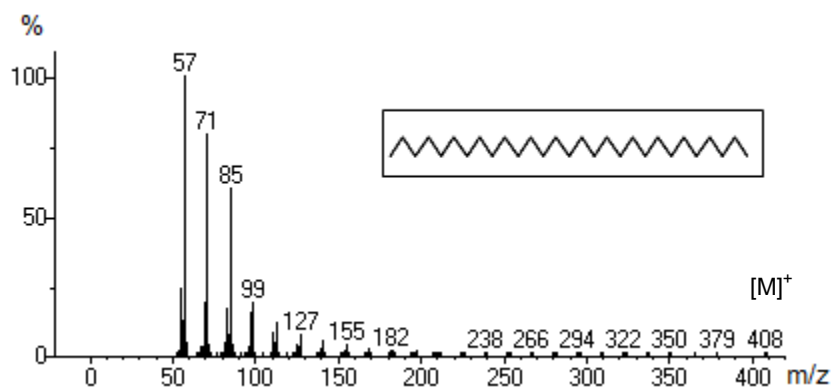


Figura 4. Espectro de massas do *n*-nonacosano, componente da fração de *n*-alcanos da cera foliar cuticular da cultivar 'MG/BR – 46 Conquista' de soja.

4.3. Análise de Ésteres

Os ésteres estão entre os componentes mais abundantes da cera foliar cuticular analisada (Tabela 1). São constituídos por ácidos graxos de cadeia normal, esterificados com álcoois alifáticos, também de cadeias normais, normalmente os dois resíduos sendo dotados de longas cadeias carbônicas. A distribuição dos ésteres e parâmetros da análise de sua fração por cromatografia a gás e espectroscopia de massas são apresentados na Figura 5 e Tabela 3. A fração de ésteres analisada contém uma série homologa com componentes na faixa C₃₄ – C₅₀, sendo o eicosanoato de octadecila (C₃₈) o homólogo principal, seguido por octadecanoato de octadecila (C₃₆) e eicosanoato de eicosanila (C₄₀) (Figura 5 e Tabela 3). Os principais ácidos graxos componentes dos ésteres (ácidos octadecanóico – esteárico –, e hexadecanóico – palmítico) são principalmente compostos com cadeias carbônicas bem mais curtas que os resíduos de álcoois graxos de baixa massa molecular. Essa característica da distribuição de ésteres de cera cuticular é compartilhada pela cera das folhas da batata (*Solanum tuberosum*) (Szafranek *et al.*, 2006). Os resíduos dos álcoois componentes dos ésteres correspondem preponderantemente ao octadecanol (C₁₈), eicosanol (C₂₀), hexacosanol (C₂₆) e octacosanol (C₂₈).

Os espectros de massas dos ésteres de cadeia longa caracterizam-se por um pico base produzido por um processo de transferência de dois átomos de hidrogênio da cadeia de álcool à cadeia do ácido graxo, dando origem ao íon ácido protonado (Sharkey *et al.*, 1959). Os fragmentos de massas em *m/z* 257, 285, 313 e 341 correspondem

respectivamente aos fragmentos dos ácidos protonados hexadecanoico, octadecanoico, eicosanoico e docosanoico. Portanto, o pico base fornece a informação sobre o número de átomos de carbono do resíduo do ácido graxo, enquanto o íon molecular informa o número total de átomos de carbono do éster (Moldovan *et al.*, 2002). Com isso, torna-se possível identificar com segurança os ésteres correspondentes a cada banda do cromatograma.

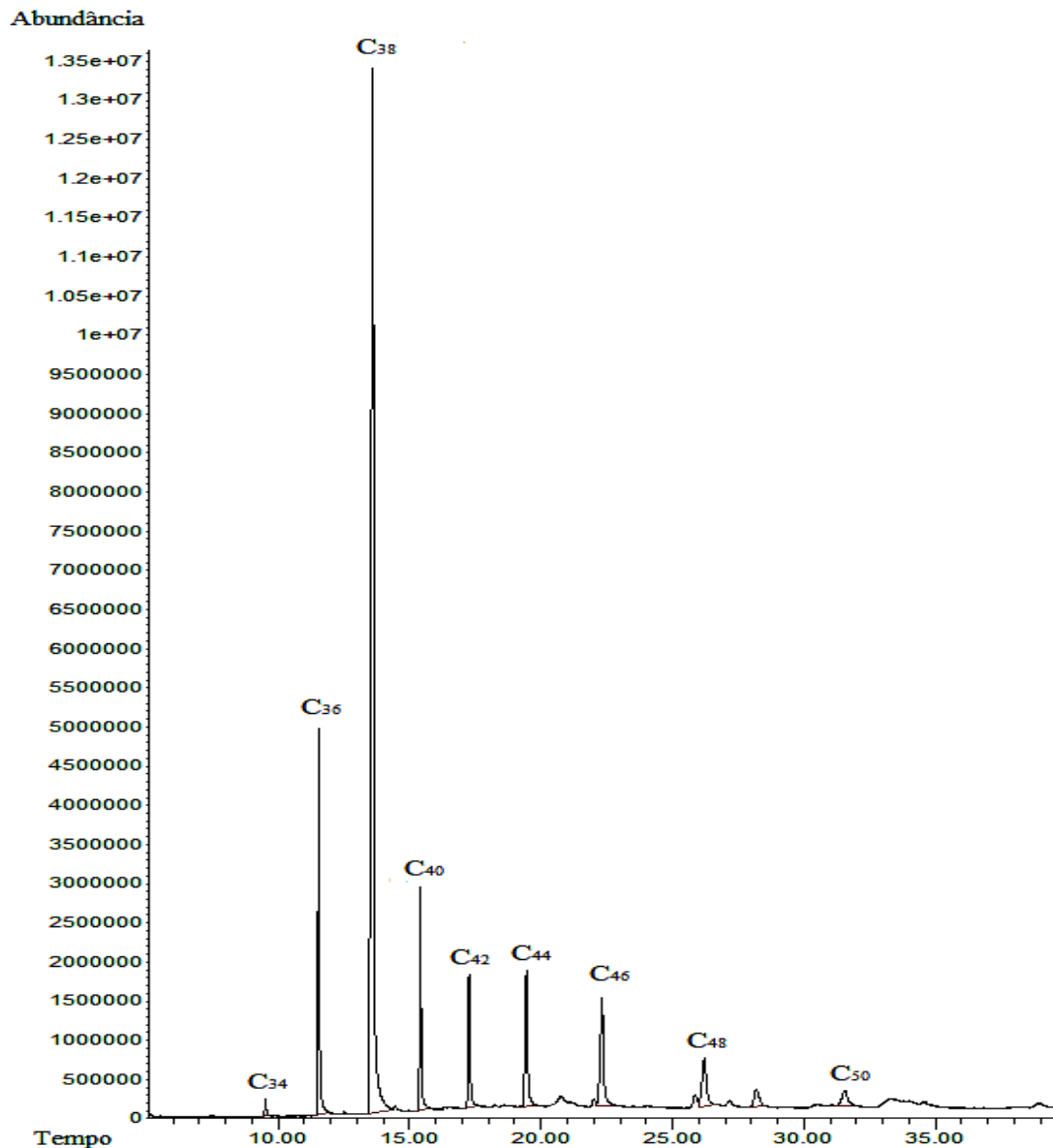


Figura 5. Cromatograma da fração de ésteres ésteres da cera foliar cuticular da cultivar 'MG/BR -46 Conquista' de soja, obtido por cromatografia a gás.

Tabela 3. Distribuição de ésteres da cera foliar cuticular da cultivar 'MG/BR -46 Conquista' de soja.

TR (min)	Ésteres propuestos	Ácido graxo: álcool	Proporção relativa (%)	<i>m/z</i> (intensidade)	M ⁺ (<i>m/z</i>)
9,5	Hexadecanoato de octadecila	16:18 (C ₃₄ O ₂ H ₆₈)	1,3	257(100); 97(60); 285(50); 83(50)	508.6
11,5	Octadecanoato de octadecila	18:18 (C ₃₆ O ₂ H ₇₂)	12,6	285(100); 97(60); 83(50)	536.6
13,6	Eicosanoato de octadecila	20:18 (C ₃₈ O ₂ H ₇₆)	47,6	313(100); 97(60); 83(50)	564.6
15,4	Eicosanoato de eicosanila	20:20 (C ₄₀ O ₂ H ₈₀)	7,1	313(100); 97(60); 207(50); 83(50); 257(40);	592.7
17,2	Hexadecanoato de hexacosanila	16:26 (C ₄₂ O ₂ H ₈₄)	5,5	257(100); 207(60) 313(40),	620.7
19,4	Hexadecanoato de octacosila	16:28 (C ₄₄ O ₂ H ₈₈)	7,5	257(100); 207(60)	648.7
22,3	Octadecanoato de octacosila	18:28 (C ₄₆ O ₂ H ₉₂)	6,5	285(100); 369[CH ₃ -(CH ₂) ₂₂ -C(=OH) ⁺ OH]; 9760; 83(50)	676.8
26,2	Eicosanoato de octacosila	20:28 (C ₄₈ O ₂ H ₉₆)	2,6	313(100); 207(60); 257(40)	704.6
31,5	Tetracosanoato de hexacosila	24:26 (C ₅₀ O ₂ H ₁₀₀)	4,6	369[CH ₃ -(CH ₂) ₂₂ -C(=OH) ⁺ OH] (50); 341[CH ₃ -(CH ₂) ₂₀ -C(=OH) ⁺ OH](50); 281(50)	732.9

TR = Tempo de retenção; *m/z* = relação massa/carga; M⁺ = íon molecular.

Nas Figuras 6, 7 e 8 são apresentados os espectros de massas correspondentes a algumas bandas do cromatograma da Figura 5. Os picos bases são, respectivamente, *m/z* 285, *m/z* 313 e *m/z* 257. Eles correspondem aos fragmentos [CH₃-(CH₂)₁₆-C(=OH)⁺OH], [CH₃-(CH₂)₁₈-C(=OH)⁺OH] e [CH₃-(CH₂)₁₄-C(=OH)⁺OH], respectivamente, e foram gerados

pela fragmentação dos ésteres C₃₆, C₃₈ e C₄₄, cujas bandas cromatográficas foram apresentadas na Figura 5.

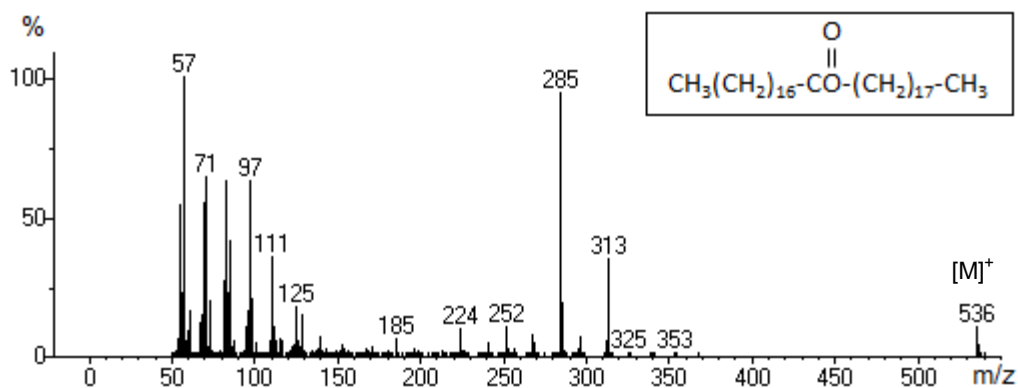


Figura 6. Espectro de massas do octadecanoato de octadecila (C₃₆), éster detectado na cera foliar cuticular da cultivar 'MG/BR -46 Conquista' de soja.

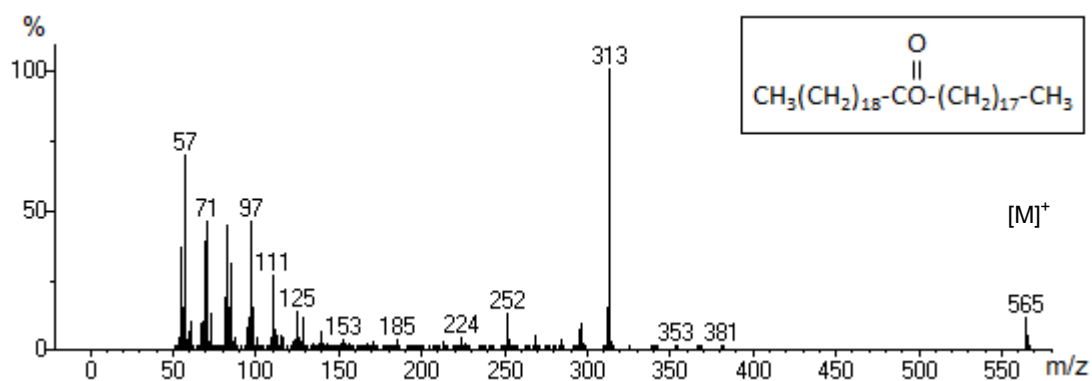


Figura 7. Espectro de massas do eicosanoato de octadecila (C₃₈), éster detectado na cera foliar cuticular da cultivar 'MG/BR -46 Conquista' de soja.

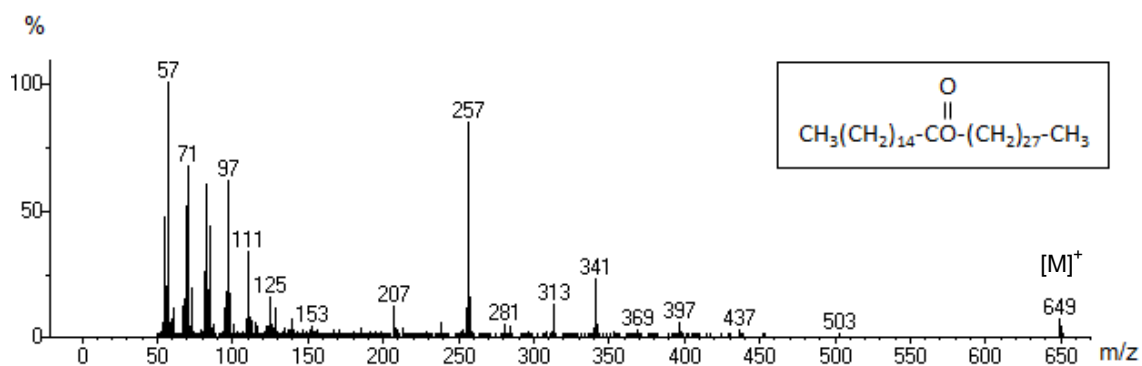


Figura 8. Espectro de massas do hexadecanoato de octacosila (C₄₄), éster detectado na cera foliar cuticular da cultivar 'MG/BR -46 Conquista' de soja.

4.4. Análise das frações tratadas para obtenção de derivados trimetil-sililados (TMSi)

4.4.1. Fração de *n*-álcoois graxos e triterpenos

Os *n*-álcoois graxos contêm principalmente cadeias com números pares de átomos de carbonos, na faixa C₁₆ – C₂₈ (Tabela 4), sendo o octacosanol (C₂₈) o mais abundante. Foram detectados quatro triterpenos pentacíclicos, correspondentes às α - e β -amirinas, germanicol e lupeol.

Os *n*-álcoois graxos foram analisados como éteres TMSi. Seus espectros de massas são caracterizados por um pico base muito intenso [M-15]⁺, um pico abundante em *m/z* 75, correspondente ao fragmento [HO⁺=Si(CH₃)₂], além de um pico menos abundante [CH₂=O⁺-Si(CH₃)₃] em *m/z* 103 (Walton & Kolattukudy, 1972). O íon molecular frequentemente é inaparente. Na Figura 9, observa-se o espectro de massas do octacosanil-TMSi, caracterizado por um pico base muito intenso em *m/z* 467, correspondente a [M-15]⁺, e um pico abundante em *m/z* 75. Não é visível o íon molecular.

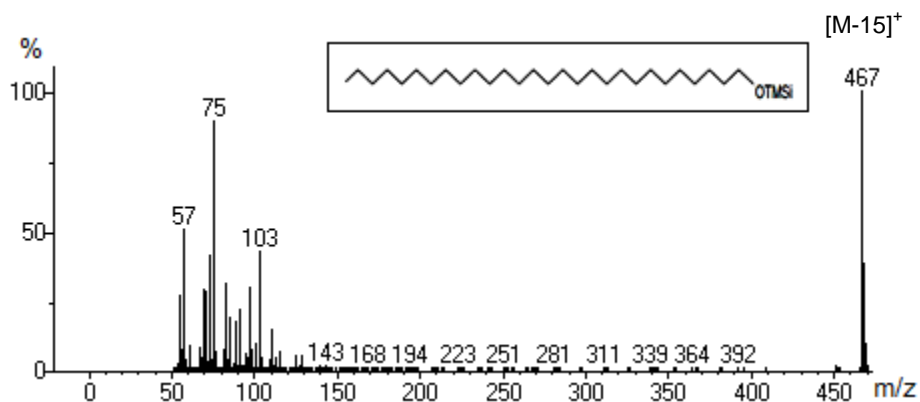


Figura 9. Espectro de massas do derivado trimetil-sililado do *n*-octacosanol, detectado na cera foliar cuticular da cultivar 'MG/BR -46 Conquista' de soja.

Tabela 4. Distribuição de *n*-álcoois graxos e triterpenóides, analisados como éteres trimetil-silílicos (TMSi), na cera foliar cuticular da cultivar 'MG/BR -46 Conquista' de soja.

TR (min)	<i>n</i> -álcoois alifáticos e triterpenóides TMSi	<i>m/z</i> (intensidade)	M ⁺ (<i>m/z</i>)
16,69	Hexadecanol (C ₁₉ OSiH ₄₂)	75(60); 103(30)	299
20,24	Octadecanol (C ₂₁ OSiH ₄₆)	75(60); 103(30)	327
23,53	Eicosanol (C ₂₃ OSiH ₅₀)	75(60); 103(30)	355
26,57	Docosanol (C ₂₅ OSiH ₅₄)	75(60); 103(30)	383
29,42	Tetradocosanol (C ₂₇ OSiH ₅₈)	75(60); 103(30)	411
32,08	Hexacosanol (C ₂₉ OSiH ₆₂)	75(60); 103(30)	439
34,60	Octacosanol (C ₃₁ OSiH ₆₆)	75(60); 103(30)	467
35,99	β-Amirina (C ₃₀ OH ₅₀)	218(100); 203(50); 189(20)	426
36,10	Germanicolil-TMSi (C ₃₃ OSiH ₅₈)	204(100); 121(70); 73(60); 269(30); 218(40)	498
36,38	β-Amirinil-TMSi (C ₃₃ OSiH ₅₈)	218(100); 203(50); 189(20)	498
36,49	α-Amirina (C ₃₀ OH ₅₀)	218(100); 203(30); 189(45)	426
36,57	Lupeol (C ₃₀ OH ₅₀)	189(100); 95(100); 135(85); 218(70); 203(70)	426
36,7	α-Amirinil-TMSi (C ₃₃ OSiH ₅₈)	218(100); 189(35); 203(20)	498
36,96	12,20(29)-lupadien-3-olol-TMSi (C ₃₃ OSiH ₅₈)	75(100); 189(90); 109(80)	495

TR = Tempo de retenção; TMSi = Trimitilsilil; *m/z* = massa molecular; M⁺ = íon molecular.

Os espectros de massas da α - e β -amirinas, assim como de seus derivados TMSi, diferem apenas na intensidade de alguns dos fragmentos, principalmente do fragmento m/z 203. Ambos triterpenos caracterizam-se pelo pico base m/z 218, proveniente da reação Retro-Diels-Alder (RDA) no anel C, portador da dupla ligação entre C_{12} e C_{13} nos triterpenos pentacíclicos. Os fragmentos m/z 203 e m/z 189 correspondem às perdas dos grupos metila ($^{\circ}\text{CH}_3$) e etila ($^{\circ}\text{CH}_2\text{CH}_2$), relativos ao pico base (m/z 218). No espectro da β -amirina, o fragmento m/z 203 é mais intenso que m/z 189, enquanto no espectro da α -amirina não há grande diferença na intensidade dos dois picos (Ogunkoya 1981; Zanon *et al.*, 2008) (Tabela 4).

O espectro de massas do lupeol é apresentado na Figura 10. Os íons m/z 218, m/z 207 e m/z 189 são característicos da fragmentação de triterpenos com esqueleto lupano dotado de grupo hidroxila na posição 3. Esses fragmentos originam-se da clivagem entre C-14 e C-27, que resulta na eliminação de um radical metila ($^{\circ}\text{CH}_3$), gerando o fragmento m/z 411; em seguida, há a perda do radical $-\text{C}_2\text{H}_4$, produzindo o fragmento m/z 383. Os fragmentos m/z 411 e m/z 383 podem não ser visíveis no espectro, mas esses fragmentos continuam fragmentando-se até a formação dos fragmentos menores m/z 207 e m/z 189. Os fragmentos m/z 207 e m/z 189 têm sido propostos como resultados de duas vias competitivas, que podem ser usadas para diagnosticar a presença de substituintes nos anéis A, B, C, D ou E (Carvalho *et al.*, 2010; Cordeiro *et al.*, 2011). O íon molecular é observado em m/z 426.

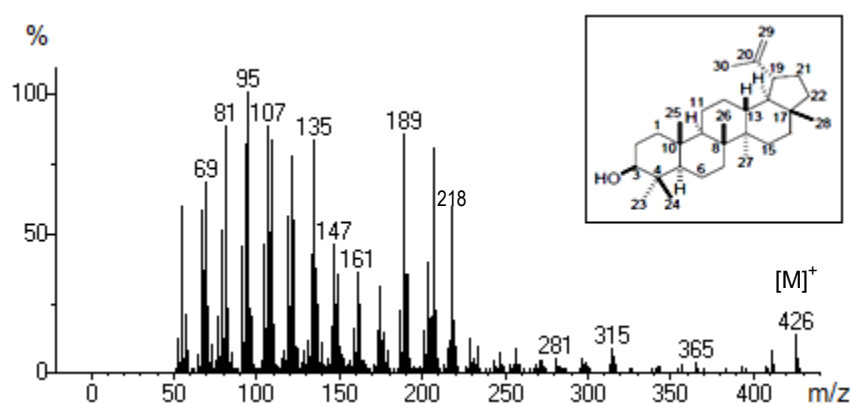


Figura 10. Espectro de massas do lupeol, detectado na cera foliar cuticular da cultivar 'MG/BR -46 Conquista' de soja.

4.4.2. Ácidos graxos

Os *n*-ácidos graxos representam uma porção considerável nas faixas mais polares da cera cuticular, mas dificilmente puderam ser purificadas para uma melhor quantificação (Tabela 1). Na Tabela 5 são apresentados os *n*-ácidos graxos identificados como derivados TMSi. A maior parte são ácidos monocarboxílicos saturados que também constituem os resíduos de ácidos nos ésteres previamente descritos (item 4.3), ou seja, são os ácidos hexadecanoico (palmítico, C₁₆), octadecanoico (esteárico, C₁₈) e eicosanoico (araquídico, C₂₀), com íons [M⁺-15] em *m/z* 313, 341 e 369, respectivamente. Os espectros de massas desses ácidos graxos apresentam o fragmento *m/z* 117 [(CH₃)SiOC(OH)=CH₂, pico base], além de outros fragmentos característicos, como *m/z* 73 [(CH₃)₃Si⁺], *m/z* 75 [(CH₃)₂Si=OH⁺], *m/z* 129 [(CH₃)₃SiO=CHCH=CH₂] e *m/z* 145 [(CH₃)₃SiO=CHCH₂CH=CH₂] (Kuksis *et al.*, 1976; Buckley *et al.*, 1999). O espectro de massas do ácido octadecanoico (Figura 11) mostra o íon molecular *m/z* 356 e os fragmentos mencionados anteriormente. Também foram detectados ácidos graxos monoinsaturados (ácido 22-tricosenóico) e poliinsaturados (ácido pentadecatrienóico) (Tabela 5).

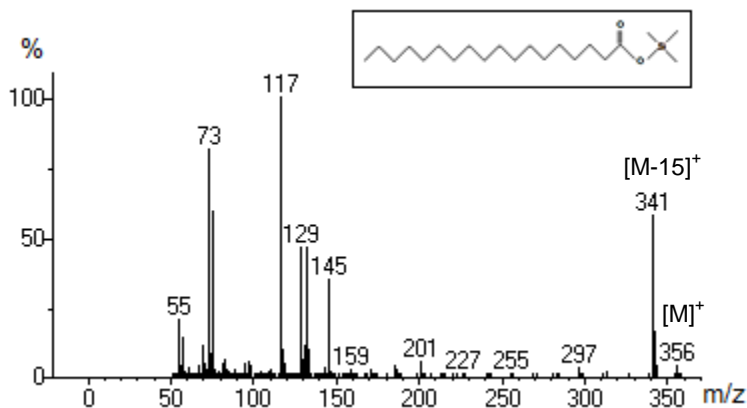


Figura 11. Espectro de massas do ácido octadecanoico (esteárico), detectado na cera foliar cuticular da cultivar 'MG/BR -46 Conquista' de soja.

Tabela 5. Distribuição de ácidos graxos, analisados como éteres trimetilsilílicos (TMSi), na cera foliar cuticular da cultivar 'MG/BR -46 Conquista' de soja.

TR (min)	Ácidos graxos	F.M.	<i>m/z</i> (intensidade)	M ⁺ (<i>m/z</i>)
13,28	Ácido pentadecatrienóico	C ₁₅ O ₂ H ₂₄	219(100); 73(80); 293(70); 249(60)	308(60)
16,16	Ácido pentadecatrienóico	C ₁₅ O ₂ H ₂₄ (isomero)	219(100); 73(80); 293(70); 249(60)	308(60)
18,24	Ácido hexadecanóico	C ₁₆ O ₂ H ₃₂	117(100), 73(80); 313(70); 145(40)	328
21,68	Ácido octadecanóico	C ₁₈ O ₂ H ₃₆	117(100); 73(80); 341(70); 145(40)	356
24,88	Ácido eicosanóico	C ₂₀ O ₂ H ₄₀	117(100); 73(80); 369(70); 145(40)	384
31,05	Ácido 22-tricosenóico	C ₂₃ O ₂ H ₄₄	73(100); 301(50); 333(40); 409(30)	424
33,49	Ácido tricosanedióico	C ₂₃ O ₄ H ₄₈	344(100); 373(40); 300(30)	388(40)
36,94	Ácido octacosanóico	C ₂₈ O ₂ H ₅₆	75(100); 174(90); 192(70); 109(70); 410(50); 218(30)	424

TR = Tempo de retenção; TMSi = Trimitilsilil; F.M. = fórmula molecular; *m/z* = massa molecular; M⁺ = íon molecular.

4.4.3. Hidroxiácidos graxos

Os hidroxiácidos graxos puderam ser analisados por CG/EM sem derivação. Nos correspondentes espectros de massas, não se observa o fragmento *m/z* 73, correspondente a TMSi (Figura 12). Os espectros de massas são característicos pelos fragmentos [M-15]⁺, correspondentes à perda de um grupo metila (-CH₃) e *m/z* 145

[H₂COH(CH₂)₅-C=O-O], sendo o íon molecular às vezes evidente, às vezes pouco intenso. O fragmento *m/z* 81 é característico dos hidroxi-ácidos graxos (Ryhage & Stenhagen, 1960; Hansen & Morrison, 1964). A Figura 12 apresenta o espectro de massas do ácido 8-hidroxipentacosanoico com os fragmentos mencionados. A Tabela 6 contém a lista dos hidroxiácidos detectados na cera analisada e os correspondentes dados de espectrometria de massas. Foram detectados cinco derivados do ácido pentacosanoico (C₂₅), diferindo entre si pela posição da hidroxila na cadeia carbônica e pelo fato de alguns serem saturados e outros monoinsaturados. Foi detectado também um hidroxiácido monoinsaturado C₂₆.

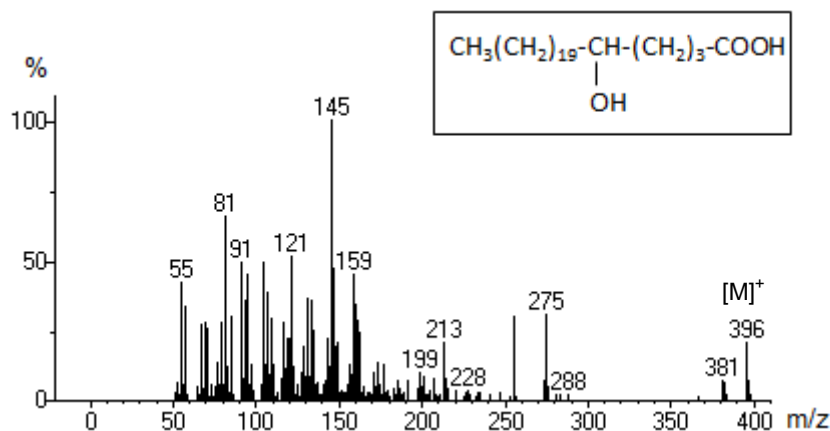


Figura 12. Espectro de massas do ácido 5-hidroxipentacosanoico, detectado na cera foliar cuticular da cultivar 'MG/BR -46 Conquista' de soja.

Tabela 6 Distribuição dos hidroxiácidos detectados na cera foliar cuticular da cultivar 'MG/BR – 46 Conquista' de soja.

TR (min)	Hidroácidos	F.M.	<i>m/z</i> (intensidade)	M ⁺ (<i>m/z</i>)
31,51	Ácido 5-hidroxi pentacosanoico	C ₂₅ O ₃ H ₄₈	145(100); 81(70); 275(40); 381(20)	396
32,41	Ácido 5-hidroxi pentacosenoico	C ₂₅ O ₃ H ₄₆	81(100); 145(70); 255(60)	394
32,73	Ácido 4-hidroxi pentacosanoico	C ₂₅ O ₃ H ₄₈	105(100); 145(70); 255(60); 213(50); 381(20)	396
32,87	Ácido 4-hidroxi pentacosenoico	C ₂₅ O ₃ H ₄₆	135(100), 81(70)	394
33,14	Ácido 8-hidroxi pentacosanoico	C ₂₅ O ₃ H ₄₈	147(100); 81(80); 213(55); 255(50); 381(40)	396
33,62	Ácido 7-hidroxi hexacosenoico	C ₂₆ O ₃ H ₅₀	91(100); 119(80); 145(70); 207(50); 173(40); 379(20)	410(50)

TR = Tempo de retenção; TMSi = Trimitilsilil; F.M. = Fórmula molecular; *m/z* = massa molecular; M⁺ = íon molecular.

4.4.4. Esteróis

Os esteróis, ou fitoesteróis, caracterizam-se por ter um grupo hidroxila na posição C-3 e uma cadeia lateral com estrutura variável em C-17. A distribuições dos fitoesteroides, que foram encontrados nas faixas mais polares dos cromatogramas em camada delgada, são mostrados na Tabela 7.

O campesterol e o estigmasteril-TMSi foram identificados pelos pico base *m/z* 129.1 e *m/z* 83.1, respectivamente. Dumazer *et al.*, (1986) interpretam os fragmentos *m/z* 129 [(CH₃)₃SiOC₃H₄] e 357 [M-129]⁺ como provenientes da quebra das ligações C1-C10 e C3-C4, com a transferência de um átomo de H. Outro fragmento frequente nos espectros de massas dos fitoesteroides é *m/z* 343, originado da perda de um grupo TMSiOH

(Dumazer *et al.*, 1986). Os fragmentos $[M^+ - H_2O]^+$ 383 e 395 foram reportados para campesterol e estigmasterol, respectivamente (Segura *et al.*, 2008).

O espectro de massas do TMSi-sitosterol tem íon molecular m/z 486. Em alguns espectros, é possível observar o íon molecular m/z 414, correspondente a massa molecular do sitosterol. Os fragmentos m/z 471 $[M-15]^+$, 396 $[M-90]^+$ e 381 $[M-105]^+$ correspondem às perdas de um grupo metila, um grupo $HOSi(CH_3)_3$ e novamente um grupo metila, respectivamente. Alguns fragmentos comuns, como m/z 255, m/z 303 e m/z 329, têm sido reportados (Moreau *et al.*, (2002), assim como o fragmento m/z 257 (Willie & Djerassi, 1968).

O TMSi-estigmastanol foi identificado pelo fragmento principal m/z 215, o pico base. Outros fragmentos úteis como diagnósticos são m/z 383 e 147 (Xu *et al.*, 1986; Buckley *et al.*, 1999).

Tabela 7. Distribuição de esteroides, analisados como éteres trimetilsilílicos (TMSi), na cera foliar cuticular da cultivar ' MG/BR - 46 Conquista de soja.

TR (min)	Esteroides TMSi	F.M.	m/z (intensidade)	M^+ (m/z)
35,45	Campesterol TMSi ($C_{31}OSiH_{56}$)	$C_{28}OH_{48}$	129(100); 73(60); 343(50); 382(40)	472(20)
35,85	Estigmasterol TMSi ($C_{32}OSiH_{56}$)	$C_{29}OH_{48}$	83(100); 129(70); 255(60); 213(45); 394(40); 355(20); 303(20);	484(30)
35,97	Sitosterol TMSi ($C_{32}OSiH_{58}$)	$C_{29}OH_{50}$	145(100); 95(98); 381(60); 207(60); 257(40); 414(30); 396(30); 329(30)	486(20)
36,63	Estigmastanol TMSi ($C_{32}OSiH_{60}$)	$C_{29}OH_{52}$	215(100); 107(60); 147(50); 383(30); 305(30); 473(20)	488(20)

T.R. = Tempo de retenção; TMSi = Trimitilsilil; F.M. = formula molecular; m/z = massa molecular; M^+ = íon molecular.

5. DISCUSSÃO

O teor da cera epicuticular da soja cultivar 'MG/ BR-46 Conquista', $15,2 \pm 1,1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, situa-se dentro dos valores relatados por Koti *et al.* (2007). Nesse trabalho, foi avaliado o incremento do teor da cera sob efeito de CO_2 , radiação-UV e temperatura. O valor reportado por Kim *et al.* (2007) para a folha de soja foi $8,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ para as folhas cultivadas em condições normais de campo e 30% a mais em folhas de plantas sob déficit hídrico.

As análises revelaram que a cera foliar cuticular da cultivar de soja 'MG/BR - 46 Conquista' contém principalmente ésteres, além de alcanos, álcoois primários, ácidos graxos, hidroxiácidos graxos, álcoois triterpênicos e esteróis. Esses dados contrastam com a composição da cera foliar cuticular de 18 cultivares de soja descrita por Kim *et al.* (2007), na qual não há a menção de ésteres, ácidos graxos livres e esteróis. A fração de *n*-alcanos da cera analisada no presente estudo compreende homólogos na faixa C_{19} – C_{33} , uma distribuição bem mais ampla do que a descrita por Kim *et al.* (2007), restrita a C_{27} , C_{29} , C_{31} e C_{33} . A distribuição observada no presente trabalho é similar ao relatado para de folhas goiaba (*Psidium guajava*). Furlan *et al.* (2006) notaram alongamento de cadeias carbônicas de *n*-alcanos por exposição de plantas de goiaba a agentes poluentes do ar em Cubatão (estado de São Paulo).

O presente estudo representa a segunda análise de cera foliar de soja e a primeira a relatar a presença na cera de soja de ésteres, hidroácidos graxos e esteróis. A presença de ésteres graxos em cera foliar foi mencionada em referência a outras plantas cultivadas, como batata (*Solanum tuberosum*) (Szafranek *et al.*, 2006), cevada (*Hordeum vulgare* L.) (Wettstein-Knowles *et al.*, 1976), amora (*Rubus fruticosus* L.) (Haas *et al.*, 1984) e flores de fava (*Vicia faba*) (Griffiths *et al.*, 1999). Huynh *et al.*, (2011) detectaram ésteres de alto peso molecular na cera da casca de arroz (C_{44} - C_{64}) e carnaúba (C_{46} - C_{54}). Ésteres de baixa massa molecular são voláteis e podem fazer parte das fragrâncias de frutas e flores. Os de alta massa molecular, juntamente com outras classes de substâncias graxas, representam fatores de proteção da superfície foliar, atuando inclusive como impermeabilizante, desse modo dificultando a colonização por fungos e outros microrganismos, além de limitar a perda de água por transpiração cuticular (Guardado *et al.*, 2006).

Os álcoois primários reportados para 18 cultivares de soja possuem cadeias longas (C₃₀ e C₃₂) (Kim *et al.*, 2007), enquanto na presente pesquisa destacamos a presença de álcoois de cadeias mais curtas, como C₁₆, mas também álcoois com cadeias longas C₂₆ e C₂₈. Triterpenos alcoólicos são frequentemente encontrados em plantas. Exemplos comuns são α -amirina, β -amirina e lupeol. Análises de álcoois graxos na forma de derivados TMSi é um procedimento frequente na análise de ceras foliares (Kim *et al.*, 2007). Triterpenos como lupeol, α -amirina e β -amirina também foram encontrados nas ceras foliares de mamona (*Ricinus communis*) constituindo 9,5% do teor da cera foliar (Vermeer *et al.*, 2003), enquanto em espécies de *Solanum melongena* e *S. macrocarpon* foram relatados 1,2% e 1,3% de triterpenos nas ceras foliares, respectivamente (Halin'ski *et al.*, 2009; Halin'ski *et al.*, 2012).

A distribuição dos ácidos graxos nas folhas de cera de soja é semelhante às encontradas em outras plantas. Na faixa mais polar, foram encontrados os ácidos graxos hexadecanoico (C₁₆, palmítico), octadecanoico (C₁₈, esteárico) e eicosanoico (C₂₀, araquídico). Comumente, os ácidos graxos alifáticos livres se apresentam em baixas concentrações (Szafranek *et al.*, 2006), como observado no presente estudo. Do mesmo modo, os hidroxiácidos graxos foram detectados em baixas concentrações e como parte constitutiva da cutina nas ceras foliares de *Vicia faba* (Kolattukudy, 1970b; Kolattukudy & Walton, 1972), assim como na cutina da casca de maçã (Kolattukudy, 1970a) e de tomate (Hauff *et al.*, 2010).

Shao *et al.* (2007) avaliaram o teor e a composição da cera de semente de soja, composta principalmente por ácidos graxos saturados e insaturados de C₁₆ e C₁₈, seguido por álcoois e *n*-alcanos. A análise da cera intracuticular das sementes também é constituída por ácidos graxos de cadeia par e ímpar (C₁₉, C₂₀, C₂₂, C₂₃, C₂₄, C₂₅, C₂₆). O teor de cera total foi 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ nas sementes de soja.

O colesterol é um esteroide que ocorre em quantidades muito pequenas na maioria das plantas. Mas em diversas Solanaceae, como na batata (*Solanum tuberosum*) e no tabaco (*Nicotiana tabacum*), o colesterol ocorre em níveis elevados, representando 15% a 20% do total dos esteroides (Arnqvist *et al.* 2003). Há evidências de que o colesterol vegetal atua como precursor na síntese de saponinas e alcalóides esteroidais, metabólitos que têm sido estudados por sua atividade farmacológica e toxicidade em animais (Moreau *et al.*, 2002). Um dos esteroides mais frequentes em frutos e hortaliças é o β -sitosterol (Han *et al.*, 2008). No óleo bruto e refinado do grão de soja foram reportados β -sitosterol,

campesterol, campestanol, estigmasterol e sitostanol (Piironen *et al.*, 2000; Segura *et al.*, 2008). Os esteroides regulam a fluidez das membranas celulares e provavelmente atuam na adaptação à elevação da temperatura, além de serem precursores de substâncias envolvidas no controle do crescimento vegetal (Piironen *et al.*, 2000). Os fitoesteróis podem reduzir o nível de colesterol sanguíneo, o risco de desenvolvimento de certos tipos de câncer, além de melhorar a função imunológica (Azadmard-Damirchi *et al.*, 2011).

Halin'ski *et al.* (2012) relataram altos teores de fitoesteróis em duas cultivares de *Solanum macrocarpon*: 19% e 32% da cera total nas cultivares Urafiki e UVPP, respectivamente. Em estudo sobre *S. melongena*, Halin'ski *et al.* (2009) observaram 11% de esteróis na cera cuticular.

6. CONCLUSÃO

Na cera epicuticular da cultivar 'MG/BR-46 Conquista' da soja os ésteres são os componentes majoritários. Ao lado dos alcanos, que são em seguida os componentes em maior concentração nas ceras, os ésteres possuem propriedades hidrofóbicas que podem prover maior proteção contra a perda de água por transpiração. Constituintes mais polares das ceras são minoritários, como ácidos graxos e fitoesteróis, que são componentes encontrados em altos teores nas sementes.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Arnqvist, L., Dutta, P. C., Jonsson, L. & Sitbon, F. (2003). Reduction of cholesterol and glycoalkaloid levels in transgenic potato plants by overexpression of a type 1 sterol methyltransferase cDNA. *Plant Physiology*, 131, 1792-1799.
- Azadmard-Damirchi, S., Emami, S., Hesari, J., Peighambardoust, S. & Nemati, M. (2011). Nuts composition and their health benefits. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 81, 508-512.
- Baker, E. A. (1982). Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. *In*: Cutler, A. D., Alvin, K. L. & Price, C. E. (Eds.) *The Plant Cuticle*. Academic Press, London, 139-165.
- Baker, E. A. & Hunt, G. M. (1981). Developmental changes in leaf epicuticular waxes in relation to foliar penetration. *New Phytologist*, 88, 731-747.
- Barthlott, W., Neinhuis, C., Cutler, D., Ditsch, F., Meusel, I. & Theisen, I. (1998). Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 126, 237-260.
- Bengtson, C., Larsson, S. & Liljenberg, C. (1978). Effects of water stress on cuticular transpiration rate and amount and composition of epicuticular wax in seedlings of six oat varieties. *Physiologia Plantarum*, 44, 319-324.
- Bondada, B. R., Oosterhuis, D. M., Murphy, J. B. & Kim, K. S. (1996). Effect of water stress on the epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract, and boll. *Environmental and Experimental Botany*, 36, 61-69.
- Brooks, C. J. (1979). Some aspects of mass spectrometry in research on steroids. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London A*, 293, 53-67.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. John Wiley & Sons, USA.
- Buckley, S. A., Stott, A. W. & Evershed, R. P. (1999). Studies of organic residues from ancient Egyptian mummies using high temperature-gas from ancient Egyptian mummies using high temperature-gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst*, 124, 443-452.

- Buschhaus, C. & Jetter, R. (2011). Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: how do plants seal their epidermal surfaces?. *Journal of Experimental Botany*, 62, 841-853.
- Carvalho, T. C., Polizeli, A. M., Turatti, I. C., Severiano, M. E., Carvalho, C. E., Ambrósio, S. R., Crotti, A. E. M., Figueiredo, U. S., Vieira, P. C. & Furtado, N. A. J. C. (2010). Screening of filamentous fungi to identify biocatalysts for lupeol biotransformation. *Molecules*, 15, 6140-6151.
- Chadwick, M. E. D.; Chamberlain, D. F.; Knights, B. A.; Mcaleese, A. J.; Peters, S. H., Rankin D. W. & Saderson, F. (2000). Analysis of leaf waxes as a taxonomic guide to *Rhododendron* subsection Taliensia. *Annals of Botany*, 86, 371-384.
- Clark, J. A. & Levitt, J. (1956). The basis of drought resistance in the soybean plant. *Physiologia Plantarum*, 9, 598-606.
- Cordeiro, Z. S., Simas, K. N., Arruda, C. O. & Sato, A. (2011). Composition of epicuticular wax layer of two species of *Mandevilla* (Apocynoideae, Apocynaceae) from Rio de Janeiro, Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39, 198-202.
- Dewick, P. (2009). *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons Ltda, London.
- Dey, P. M. & Harborne, J. B. (1997). *Plant Biochemistry*. Academic Press, London.
- Dumazer, M., Farines, M. & Soulier, J. (1986). Identification de stérols par spectrométrie de masse. *Revue Francaise des Crops Gras*, 4, 151-156.
- EMBRAPA. (2004). *Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil*.
- Furlan, C. M., Santos, D. Y. C, Salatino, A. & Domingos, M. (2006). n-Alkane distribution of leaves of *Psidium guajava* exposed to industrial air pollutants. *Environmental and Experimental Botany*, 58, 100-105.
- Goodwin, S. M. & Jenks, M. A. (2005). Plant cuticle function as a barrier to water loss. In: Jenks, M. & Hasegawa, P. M. (Ed.) *Plant Abiotic Stress*. Indiana: Blackwell, 14-36.
- Griffiths, D. W., Robertson, G. W., Shepard, T. & Ramsay, G. (1999). Epicuticular waxes and volatiles from faba bean (*Vicia faba*) flowers. *Phytochemistry*, 52, 607-612.
- Guardado, J. C., Osuna, M. E., Ávila, G. G. & Cabrera, H. A. (2006). *Química Orgánica. Nomenclatura, reacciones y aplicaciones*. Culiacán, Sinaloa, México.: Universidad Autónoma de Sinaloa - DGEP.

- Haas, K. & Rentschler, I. (1984). Discrimination between epicuticular and intracuticular wax in Blackberry leaves: ultrastructural and chemical evidence. *Plant Science Letters*, 36, 143-147.
- Halin´ski, Ł., Paszkiewicz, M., Gołębiowski, M. & Stepnowski, P. (2012). The chemical composition of cuticular waxes from leaves of the gboma eggplant (*Solanum macrocarpon* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 25, 74-78.
- Halin´ski, Ł., Szafranek, J., Szafranek, B. M., Gołębiowski, M. & Stepnowski, P. (2009). Chromatographic fractionation and analysis of the main components of Eggplant (*Solanum melongena* L.) leaf cuticular waxes. *Acta Chromatographica*, 21, 127-137.
- Han, J. H., Yang, Y. X. & Feng, M. Y. (2008). Contents of phytosterols in vegetables and fruits commonly consumed in China. *Biomedical and Environmental Sciences*, 21, 449-453.
- Hansen, R. P. & Morrison, J. D. (1964). The isolation and identification of 2,6,10,14-tetramethylpentadecanoic acid from butterfat. *Biochemical Journal*, 93, 225-228.
- Hauff, S., Chefetz, B., Shechter, M. & Vetter, W. (2010). Determination of hydroxylated fatty acids from the biopolymer of tomato cutin and their fate during incubation in soil. *Phytochemical Analysis*, 21, 582-589.
- Holloway, P. J. (1969). Chemistry of leaf waxes in relation to wetting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 20, 124-128.
- Huynh, L. H., Do, Q. D., Kasim, N. S. & Ju, Y. H. (2011). Isolation and analysis of wax esters from activated sludge. *Bioresource Technology*, 102, 9518-9523.
- Jeffree, C. E. (2006). The Fine Structure of the Plant Cuticle. In: Riederer, M. & Müller C. (Ed.) *Annual Plant Reviews Volume 23: Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. 11-125.
- Jetter, R., Schäffer, S. & Riederer, M. (2000). Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant, Cell and Environment*, 23, 619-628.
- Kim, K. S., Park, S. H., Kim, D. K. & Jenks, M. A. (2007). Influence of water deficit on leaf cuticular waxes of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *International Journal of Plant Sciences*, 168, 307-316.

- Koch, K., Hartmann, K., Schreiber, L., Barthlott, W. & Neinhuis, C. (2006). Influences of air humidity during the cultivation of plants on wax chemical composition, morphology and leaf surface wettability. *Environmental and Experimental Botany*, 56, 1-9.
- Kolattukudy, P. E. (1969). Plant waxes. *Lipids*, 5, 259-275.
- Kolattukudy, P. E. (1970a). Biosynthesis of cuticular lipids. *Annual Review of Plant Physiology*, 21, 163-192.
- Kolattukudy, P. E. (1970b). Cutin biosynthesis in *Vicia faba* leaves. *Plant Physiology*, 46, 759-760.
- Kolattukudy, P. E. (1996). Biosynthetic pathways of cutin and waxes, and their sensitivity to environmental stresses. In: Kerstiens, G. (Ed.) *Plant Cuticles: an integrated functional approach*. BIOS Scientific publishers Ltd, Oxford, UK, 83-108.
- Kolattukudy, P. E., & Walton, T. J. (1972). Structure and biosynthesis of the hydroxy fatty acids of cutin in *Vicia faba* leaves. *Biochemistry*, 11, 1897-1907.
- Kosma, D. K., Bourdenx, B., Bernard, A., Parsons, E. P., & Lu, S. (2009). The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids. *Plant Physiology*, 151, 1918-1929.
- Koti, S., Reddy, K. R., Kakani, V. G., Zhao, D. & Gao, W. (2007). Effects of carbon dioxide, temperature and ultraviolet-B radiation and their interactions on soybean (*Glycine max* L.) growth and development. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 1-10.
- Kuksis, A., Myher, J. J., Marai, L. & Geher, K. (1976). Estimation of plasma free fatty acids as the trimethylsilyl (TMS) esters. *Analytical Biochemistry*, 70, 302-312.
- Kunst, L. & Samuels, A. L. (2003). Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research*, 42, 51-80.
- Larcher, W. (1975). *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Lichston, J. E. & Goody, S. A. (2006). Morfologia e teor de cera de folhas de café após aplicação de fungicida. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41, 919-926.
- Lü, S., Song, T., Kosma, D. K., Rowland, O. & Jenks, M. A. (2009). Arabidopsis CER8 encodes long-chain acyl-coA synthetase 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *The Plant Journal*, 59, 553-564.
- Mimura, M. R., Salatino, M. L., Salatino, A. & Baumgratz, J. F. (1998). Alkanes from foliar epicuticular waxes of *Huberia* species: taxonomic implications. *Biochemical Systematics and Ecology*, 26, 581-588.

- Moldovan, Z., Jover, E. & Bayona, J. M. (2002). Systematic characterisation of long-chain aliphatic esters of wool wax by gas chromatography-electron impact ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 952, 193-204.
- Moran Puente, D. W. & Baur, P. (2011). Wettability of soybean (*Glycine max* L.) leaves by foliar sprays with respect to developmental changes. *Pest Management Science*, 67, 798-806.
- Moreau, R. A., Whitaker, B. D. & Hicks, K. B. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 41, 457-500.
- Motta, L. B., Salatino, A. & Salatino, M. L. (2009). Foliar cuticular alkanes of *Camarea* (Malpighiaceae) and their taxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 35-39.
- Ogunkoya, L. (1981). Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. *Phytochemistry*, 20, 121-126.
- Oliveira, A. F., Meirelles, S. T. & Salatino, A. (2000). Major constituents of foliar epicuticular waxes of species from caatinga and cerrado. *Z. Naturforsch.*, 55, 688-692.
- Oliveira, A. F., Meirelles, S. T. & Salatino, A. (2003). Epicuticular waxes from caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, 75, 431-439.
- O'Toole, J. C., Cruz, R. T. & Seiber, J. N. (1979). Epicuticular wax and cuticular resistance in rice. *Physiology Plant*, 47, 239-244.
- Piironen, V., Lindsay, D. G., Miettinen, T. A., Toivo, J. & Lampi, A. M. (2000). Review plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 939-966.
- Reina-Pinto, J. J. & Yephremov, A. (2009). Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 540-549.
- Riederer, M. & Müller, C. (2006). Biology of the Plant Cuticle. *Annual Plant Reviews*, 23, 438.
- Rodrigues, C. D. & Salatino, A. (2006). Hydrocarbons from epicuticular waxes of *Allagoptera* (Arecaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, 265-266.
- Ryhage, R. & Stenhagen, E. (1960). Mass spectrometry in lipid research. *Journal of Lipid Research*, 1, 361-390.

- Salatino, A. & Silva, J. B. (1988). Método para separação de constituintes comuns de ceras vegetais por cromatografia em camada delgada. *Bolm Botânica*, 10, 1-6.
- Salatino, A., Salatino, M. L. F., Mello-Silva, R. & Duerholt-Oliveira, I. (1991). An appraisal of the plasticity of alkane profiles of some species of Velloziaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 19, 241-248.
- Salatino, M. L. F., Salatino, A., Menezes, N. L. & Mello-Silva, R. (1989). Alkanes of foliar epicuticular waxes of velloziaceae. *Phytochemistry*, 28, 1105-1114.
- Samuels, L., Kunst, L. & Jetter, R. (2008). Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 683-707.
- Schreiber, L. & Schönherr, J. (2009). *Water and Solute Permeability of Plant Cuticles. Measurement and Data Analysis*. Germany: Springer.
- Segura, C. A., Carrasco-Pancorbo, A., Cortacero, S., Gori, A., Cerretani, L. & Fernández-Gutiérrez, A. (2008). A simplified method for HPLC-MS analysis of sterols in vegetable oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 1142-1149.
- Shao, S., Meyer, C. J., Ma, F., Peterson, C. A. & Bernards, M. A. (2007). The outermost cuticle of soybean seeds: chemical composition and function during imbibition. *Journal of Experimental Botany*, 58, 1071-1082.
- Sharkey, A. G., Shultz, J. L. & Friedel, R. A. (1959). Mass spectra of esters. Formation of rearrangement ions. *Analytical Chemistry*, 31, 87-94.
- Shepherd, T. & Griffiths, D. W. (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, 171, 469-499.
- Silva Fernades, A. M. (1965). Studies on plant cuticles. VIII. Surface waxes in relation to water-repellency. *Annals of Applied Biology*, 56, 297-304.
- Silva Fernades, A. M., Baker, E. A. & Martin, J. T. (1964). Studies on plant cuticles. VI. The isolation and fractionation of cuticular waxes. *Annals of Applied Biology*, 53, 43-58.
- Szafranek, B. M. & Synak, E. E. (2006). Cuticular waxes from potato (*Solanum tuberosum*) leaves. *Phytochemistry*, 67, 80-90.
- Vermeer, C. P., Nastold, P. & Jetter, R. (2003). Homologous very-long-chain 1,3-alkanedioles and 3-hydroxyaldehydes in leaf cuticular waxes of *Ricinus communis* L. *Phytochemistry*, 62, 433-438.
- Vickery, M. L. & Vickery, B. (1981). *Secondary Plant Metabolism*. Warwick Univ. UK.

- Walton, T. J. & Kolattukudy, P. E. (1972). Determination of the structures of cutin monomers by a novel depolymerization procedure and combined gas chromatography and mass spectrometry. *Biochemistry*, 11, 1885-1897.
- Wettstein-Knowles, P. & Netting, A. G. (1976). Composition of epicuticular waxes on Barley spikes. *Carlsberg Research Communications*, 41, 225-235.
- Willie, S. G. & Djerassi, C. (1968). Mass spectrometric fragmentations typical of sterols with unsaturated side chains. *Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems*, 33, 305-313.
- Xu, S., Patterson, G. W. & Schmid, K. (1986). Sterols of Amaranthaceae. *Phytochemistry*, 25, 1883-1886.
- Zanon, R. B., Pereira, D. F., Boschetti, T. K., Santos, M. & Athayde, M. L. (2008). Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, 226-229.

ANEXOS

Anexo 1. Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis analisadas da cultivar ‘MG/BR–46 Conquista’ para os tratamentos: T₁: [CO₂]_{amb}+T^{amb}; T₂: [CO₂]_{elev}; T₃: T^{+5°C} e T₄: [CO₂]_{elev}+T^{+5°C}. (n=15 para cada tratamento). Valores em negrito representam correlações significativas (P<0.05).

		Biomassa do grão	Carbono	Nitrogênio	Proteínas	Óleo	Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolênico	Amido	Frutose	Glicose	Mio-inositol	Rafinose
Carbono	T ₁	0.212														
Carbono	T ₂	0.387														
Carbono	T ₃	0.898 *														
Carbono	T ₄	-0.059														
Nitrogênio	T ₁	0.015	-0.471													
Nitrogênio	T ₂	0.409	-0.006													
Nitrogênio	T ₃	0.289	0.082													
Nitrogênio	T ₄	0.717 *	0.052													
Proteínas	T ₁	0.712 *	0.117	-0.250												
Proteínas	T ₂	0.913 *	0.416	0.505												
Proteínas	T ₃	0.785 *	0.828 *	0.019												
Proteínas	T ₄	0.661 *	-0.089	0.596 *												
Óleo	T ₁	0.320	0.568 *	-0.617 *	0.464											
Óleo	T ₂	0.359	0.481	0.230	0.284											
Óleo	T ₃	0.779 *	0.821 *	-0.041	0.642 *											
Óleo	T ₄	0.585 *	-0.604 *	0.343	0.522 *											
Palmítico	T ₁	-0.633 *	-0.058	0.254	-0.603 *	-0.270										
Palmítico	T ₂	0.362	0.008	0.208	0.320	0.026										
Palmítico	T ₃	-0.175	-0.212	0.271	-0.331	-0.132										
Palmítico	T ₄	-0.444	-0.258	-0.595 *	-0.54 *	-0.309										
Estearico	T ₁	-0.565 *	-0.049	0.363	-0.689 *	-0.272	0.829 *									
Estearico	T ₂	-0.801 *	-0.431	-0.281	-0.803 *	-0.004	-0.414									
Estearico	T ₃	-0.220	-0.043	-0.242	-0.108	0.219	0.463									
Estearico	T ₄	-0.417	-0.145	-0.594 *	-0.629 *	-0.303	0.872 *									
Oleico	T ₁	-0.359	-0.023	0.331	-0.426	0.099	0.454	0.674 *								
Oleico	T ₂	-0.84 *	-0.331	-0.522 *	-0.795 *	-0.188	-0.61 *	0.763 *								
Oleico	T ₃	-0.632 *	-0.834 *	-0.212	-0.587 *	-0.571 *	0.133	0.035								
Oleico	T ₄	-0.62 *	-0.372	-0.621 *	-0.414	-0.129	0.757 *	0.568 *								

Anexo 1. Continuação

		Biomassa do grão	Carbono	Nitrogênio	Proteínas	Óleo	Palmitico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolênico	Amido	Frutose	Glicose	Mio-inositol	Rafinose	
Linoleico	T ₁	0.418	-0.025	0.261	-0.074	0.181	-0.094	0.211	0.371								
Linoleico	T ₂	0.615 *	0.174	0.699 *	0.642 *	0.365	-0.160	-0.364	-0.505								
Linoleico	T ₃	0.431	0.587 *	0.130	0.601 *	0.596 *	0.035	0.51	-0.533 *								
Linoleico	T ₄	-0.194	-0.239	-0.203	-0.419	-0.078	0.636 *	0.402	0.569 *								
Linolênico	T ₁	-0.853 *	-0.399	0.104	-0.683 *	-0.506	0.650 *	0.641 *	0.205	-0.154							
Linolênico	T ₂	-0.308	-0.192	0.050	-0.243	-0.625 *	-0.038	0.057	-0.062	-0.125							
Linolênico	T ₃	-0.766 *	-0.702 *	-0.074	-0.551 *	-0.727 *	0.206	0.137	0.386	-0.155							
Linolênico	T ₄	-0.531 *	-0.006	-0.427	-0.509	-0.555 *	0.705 *	0.644 *	0.581 *	0.442							
Amido	T ₁	-0.486	-0.177	0.304	-0.556 *	-0.056	0.638 *	0.787 *	0.663	0.302	0.554 *						
Amido	T ₂	-0.946 *	-0.437	-0.395	-0.897 *	-0.171	-0.477	0.876 *	0.889	-0.465	0.107						
Amido	T ₃	-0.742 *	-0.769 *	-0.306	-0.71 *	-0.461	0.233	0.466	0.75	-0.276	0.409						
Amido	T ₄	-0.798 *	-0.05	-0.761 *	-0.637 *	-0.55 *	0.747 *	0.748 *	0.755	0.377	0.738 *						
Frutose	T ₁	-0.737 *	-0.320	0.000	-0.482	-0.422	0.421	0.254	0.204	-0.249	0.72 *	0.291					
Frutose	T ₂	-0.713 *	-0.611 *	-0.105	-0.732 *	-0.479	-0.315	0.555 *	0.587 *	-0.335	0.518 *	0.654 *					
Frutose	T ₃	-0.776 *	-0.758 *	-0.311	-0.754 *	-0.700 *	0.142	-0.037	0.495	-0.493	0.73 *	0.63 *					
Frutose	T ₄	-0.633 *	0.020	-0.339	-0.541 *	-0.345	0.397	0.445	0.422	0.247	0.381	0.571 *					
Glicose	T ₁	0.463	0.116	-0.281	0.32	0.332	-0.432	-0.413	-0.128	0.439	-0.297	-0.085	-0.045				
Glicose	T ₂	0.699 *	0.139	0.501	0.755 *	0.177	0.054	-0.544 *	-0.496	0.745 *	-0.151	-0.603 *	-0.339				
Glicose	T ₃	0.266	0.451	-0.135	0.095	0.398	0.033	0.036	-0.636 *	0.217	-0.063	-0.286	0.124				
Glicose	T ₄	0.167	-0.122	0.287	0.209	0.158	0.100	-0.128	0.037	0.070	-0.329	-0.282	-0.242				
Mio-inositol	T ₁	-0.931 *	-0.294	0.188	-0.742 *	-0.348	0.670 *	0.710 *	0.578 *	-0.139	0.851 *	0.656 *	0.746 *	-0.445			
Mio-inositol	T ₂	-0.95 *	-0.417	-0.358	-0.916 *	-0.360	-0.522 *	0.855 *	0.848 *	-0.514	0.329	0.925 *	0.764 *	-0.620 *			
Mio-inositol	T ₃	-0.909 *	-0.914 *	-0.306	-0.854 *	-0.722 *	0.319	0.294	0.753 *	-0.493	0.736 *	0.839 *	0.815 *	-0.244			
Mio-inositol	T ₄	-0.835 *	-0.091 *	-0.73 *	-0.76 *	-0.468	0.731 *	0.796 *	0.772 *	0.357	0.678 *	0.921 *	0.716 *	-0.226			
Rafinose	T ₁	0.696 *	0.086	-0.319	0.862 *	0.237	-0.730 *	-0.854 *	-0.747 *	-0.122	-0.593 *	-0.812 *	-0.378	0.374	-0.802 *		
Rafinose	T ₂	0.944 *	0.448	0.355	0.91 *	0.208	0.458	-0.847 *	-0.866 *	0.482	-0.136	-0.976 *	-0.636 *	0.689 *	-0.923 *		
Rafinose	T ₃	0.741 *	0.696 *	0.527 *	0.685 *	0.320	-0.233	-0.587 *	-0.678 *	0.233	-0.471	-0.869 *	-0.588 *	0.201	-0.864 *		
Rafinose	T ₄	0.633 *	0.013	0.616 *	0.695 *	0.467	-0.727 *	-0.804 *	-0.698 *	-0.532 *	-0.637 *	-0.883 *	-0.571 *	0.249	-0.889 *		
Sacarose	T ₁	0.771 *	0.501	-0.148	0.390	0.357	-0.489	-0.414	-0.400	0.275	-0.733 *	-0.495	-0.777 *	0.237	-0.828 *	0.494	
Sacarose	T ₂	0.941 *	0.448	0.319	0.820 *	0.371	0.521 *	-0.779 *	-0.839 *	0.381	-0.292	-0.941 *	-0.680 *	0.499	-0.920 *	0.934 *	
Sacarose	T ₃	0.501	0.243	0.327	0.505	0.191	-0.242	-0.254	0.040	0.139	-0.395	-0.327	-0.578 *	-0.529 *	-0.485	0.429	
Sacarose	T ₄	0.615 *	0.239	0.611 *	0.650 *	0.436	-0.901 *	-0.779 *	-0.813 *	-0.543 *	-0.664 *	-0.811 *	-0.478	-0.158	-0.829 *	0.782 *	

* Números em negrito são significativos a P<0.05

Anexo 2 **A.** Autovalores e proporções de variância correspondentes a cada um dos eixos (PC1 a PC15), gerados pela análise de componentes principais (PCA). **B.** Valores dos coeficientes calculados para cada uma das variáveis analisadas ao longo do desenvolvimento do grão. A análise contempla as coletas de desenvolvimento do grão (75, 90 e 105 dias) e todos os indivíduos coletados dos quatro tratamentos (T_1 : $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}+T^{\text{amb}}$; T_2 : $[\text{CO}_2]_{\text{elev}}$; T_3 : $T^{+5^\circ\text{C}}$ e T_4 : $[\text{CO}_2]_{\text{elev}}+T^{+5^\circ\text{C}}$) ($n=60$). Valores em negrito são vetores considerados significativos.

A.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
Auto valor	6.3484	2.2557	1.4622	1.1588	0.9313	0.6924	0.5885	0.3794
Proporção	0.423	0.1500	0.097	0.077	0.062	0.046	0.039	0.025
B.	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
Carbono	-0.237	0.373	0.144	0.119	0.146	0.248	0.205	0.472
Nitrogênio	-0.089	-0.315	0.222	-0.264	-0.666	0.026	0.473	-0.108
Proteína solúvel	-0.333	0.095	-0.059	-0.051	0.032	0.000	-0.312	-0.614
Óleo	-0.229	0.357	0.159	0.32	-0.086	-0.144	0.195	-0.39
Palmítico	0.203	0.293	0.18	-0.253	-0.27	0.578	-0.359	0.015
Esteárico	0.237	0.439	-0.012	-0.084	-0.021	0.23	0.318	-0.204
Oleico	0.258	0.142	-0.217	0.277	-0.436	-0.12	-0.418	0.111
Linoleico	0.036	0.344	0.367	-0.401	-0.157	-0.622	-0.215	0.135
Linolênico	0.252	0.024	0.131	-0.508	0.431	0.016	0.079	-0.159
Amido	0.322	0.194	-0.142	0.137	0.109	-0.286	0.175	-0.101
Frutose	0.286	-0.346	0.229	0.031	0.15	-0.056	-0.119	-0.018
Glicose	-0.048	-0.077	0.712	0.357	0.092	0.004	-0.101	0.088
Mio-inositol	0.373	-0.132	-0.033	0.099	-0.057	0.049	-0.014	-0.052
Rafinose	-0.353	-0.151	0.046	-0.154	0.073	0.141	-0.293	-0.068
Sacarose	-0.305	0.055	-0.296	-0.252	-0.028	-0.15	0.003	0.336

Anexo 2 Continuação

A.	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14	PC15
Auto valor	0.3231	0.2666	0.1787	0.1681	0.1315	0.0758	0.0406
Proporção	0.022	0.018	0.012	0.011	0.009	0.005	0.003
B.	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14	PC15
Carbono	0.534	0.122	0.107	-0.063	0.300	0.011	-0.129
Nitrogênio	0.198	-0.022	0.214	0.068	0.050	0.008	-0.027
Proteína solúvel	0.230	-0.201	0.215	-0.218	0.348	0.296	-0.053
Óleo	-0.164	0.631	-0.037	0.187	-0.103	-0.043	-0.012
Palmítico	-0.256	0.070	-0.011	0.355	0.181	0.107	-0.015
Estearico	-0.185	-0.204	0.129	-0.549	-0.073	-0.36	0.135
Oleico	0.354	0.134	0.337	-0.109	-0.301	-0.035	0.193
Linoleico	0.030	-0.048	-0.253	-0.114	0.103	-0.092	-0.100
Linolênico	0.286	0.254	0.285	0.100	-0.397	0.215	0.050
Amido	-0.004	-0.304	0.394	0.535	0.267	-0.188	-0.209
Frutose	-0.029	0.393	0.182	-0.172	0.558	-0.261	0.328
Glicose	-0.213	-0.273	0.352	-0.080	-0.227	0.162	-0.055
Mio-inositol	-0.015	0.230	-0.046	-0.307	0.046	0.131	-0.810
Rafinose	0.081	0.032	0.151	0.089	-0.194	-0.734	-0.311
Sacarose	-0.486	0.199	0.531	-0.149	0.066	0.166	-0.074