

Quantificação de Rutina e Genistina e Identificação de Metabólitos Secundários em Raízes e Folhas de Soja

KAWASSAKI N.F.C.^{1,2}, SALVADOR M.C.², SILVA S.H.², KUNZ E.T.², FILHO J.A.², HOFFMANN-CAMPO C.B.² ¹Universidade Norte do Paraná- UNOPAR, nat@cnpso.embrapa.br ²Embrapa Soja, Caixa Postal 231, 86001-970, Londrina-PR.

Os metabólitos derivados de fenilpropanóides são extensamente distribuídos no reino vegetal. Estão relacionados à proteção de plantas contra insetos, patógenos e raios ultravioletas, bem como na determinação das cores de flores e atração de insetos polinizadores. Devido à sua estrutura diversificada e distribuição complexa, diversos papéis lhes têm sido atribuído, incluindo a possível atuação na regulação do crescimento e desenvolvimento dos vegetais (Graham, 1991). Em soja, flavonóides foram identificados em diversas partes de genótipos da planta (Hoffmann-Campo, 1995).

O objetivo deste trabalho foi identificar flavonóides em diferentes fases do desenvolvimento da soja e quantificar a rutina e a genistina nas cultivares escolhidas.

Os genótipos com característica de resistência a insetos (PI 227687, PI 274454 e Dowling) e 'BR-16' (suscetível) foram semeados com três repetições cada um, em casa-de-vegetação, na Embrapa Soja, Londrina - PR, em vasos de cinco litros, na quantidade de 12 sementes por vaso. Após o desbaste, deixaram-se apenas cinco plantas por vaso. No estágio V5 foram retiradas três plantas por genótipo, sendo uma planta por vaso, escolhida aleatoriamente. No laboratório, as folhas frescas, separadas por estádios de desenvolvimento (V1, V2, V3, V4 e V5), e mais a raiz foram pesadas em balança analítica, com auxílio de um vidro de

relógio. Após a pesagem, foram maceradas com nitrogênio líquido, em cadinho de porcelana; o macerado foi transferido para tubos de vidro onde se adicionou metanol-80 %, na proporção de cinco vezes o volume do solvente para a massa da amostra. Os extratos foram deixados no ultrassom por 20 minutos e, em seguida, secos em nitrogênio gasoso. As amostras foram ressolubilizadas em 1 mL de MeOH-80 % e retornadas ao ultrassom para completar a dissolução. A seguir, foram filtradas com membrana de nylon, com poros de 0,45 μm e diâmetro de 13 mm, e logo transferidas para frascos de amostrador automático para HPLC. Uma alíquota de 10 μL foi injetada em cromatógrafo líquido, equipado com coluna C18 de fase reversa, de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, com tamanho de partícula de 5 micra. O método utilizado foi com a fase móvel constituída de ácido acético (HOAc) a 2 % (C) e metanol, ácido acético e água, na proporção de 18:1:1 (MeOH:HOAc:H₂O) (A). O sistema inicial do gradiente foi composto de 75 % de C e 25 % de A. Aos 40 minutos, o sistema inverteu-se e, com 45 minutos, voltou à situação inicial, aí permanecendo até completar 50 minutos de corrida. O fluxo do solvente foi de 1 mL/min. e a absorção de UV foi medida a 260 nm. Os padrões de flavonóides utilizados foram rutina (quercetina 3-O-raminoglicosideo) e genistina (genisteína, 7-O- β -D-glicosideo). Para obtenção das áreas das substâncias padrões, três concentrações de rutina (0,01, 0,02 e 0,04) e cinco de genistina (0,01, 0,02, 0,04, 0,08 e 0,16), todas em mg/mL, foram injetadas no equipamento, conforme descrito acima. Com as áreas das substâncias-padrão, em suas respectivas concentrações, foi construído um gráfico de dispersão e obtida a equação de regressão linear correspondente. Injetadas as amostras e determinadas as áreas, as concentrações das substâncias (mg/g), em cada genótipo, foram determinadas por meio da referida curva de calibração. Nas folhas dos genótipos estudados, pôde-se observar a presença das seguintes substâncias (Tabela 1).

Na raiz de todos os genótipos foram encontradas daidzina, coumestrol, genistina, malonil-daidzina, malonil-genistina, daidzeína e genisteína.

Tabela 1. Identificação das substâncias encontradas nas folhas das cultivares.

Substâncias	Genótipos			
	BR-16	PI227687	PI274454	Dowling
Canferol	+	+	+	+
Daidzina	+	+	+	+
Daidzeína	+			
Genistina		+	+	+
Gliciteína	+	+	+	+
Malonil daidzina	+	+	+	+
Malonil genistina	+	+	+	+
Rutina		+	+	

(+) presença da substância

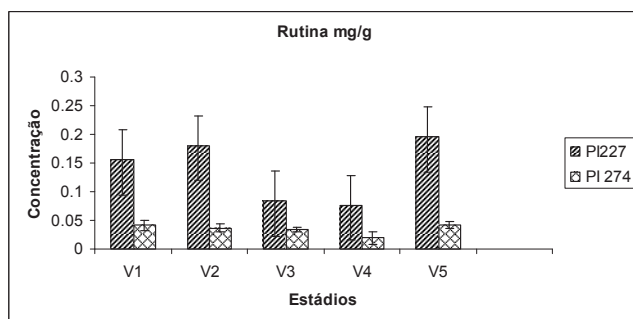


Fig. 1. Concentração comparada de rutina (mg/g) entre PI 227687 e PI 274454 em diferentes estádios de desenvolvimento.

Comparando-se os genótipos, observou-se que a PI227687 apresentou a maior concentração de rutina em mg/g (Fig.1). Houve, também, diferença na concentração dessa substância quanto aos estádios de desenvolvimento: o estágio V5 apresentou maior concentração ($0,1957 \pm 0,05$) em relação aos estádios V3 e V4 ($0,0837 \pm 0,06$; $0,0769 \pm 0,01$) respectivamente. O genótipo PI274454 apresentou baixa concentração nos diferentes estádios de desenvolvimento, e esse resultado confirma os obtidos por Piubelli (2004).

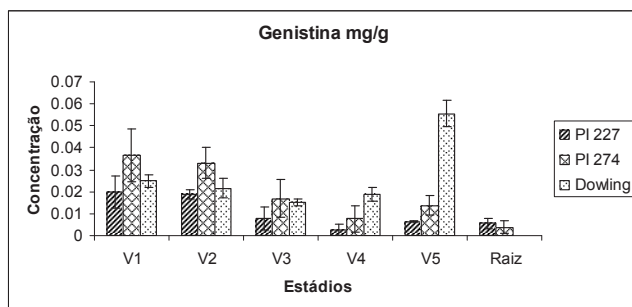


Fig. 2. Concentração comparada de genistina (mg/g) entre Dowling, PI 227687 e PI 274454 em diferentes estádios de desenvolvimento.

Em relação à genistina, foram observadas diferentes concentrações, nos genótipos analisados (Fig. 2). A Dowling apresentou no estágio V5 a maior concentração ($0,0554 \pm 0,006$) dessa substância. Na BR-16 não foram encontradas rutina e genistina nas folhas.

A cultivar BR-16 (suscetível) apresentou o menor número de substâncias, comparativamente aos genótipos considerados resistentes. Genistina e rutina não foram observadas nessa cultivar sugerindo a possibilidade de que a característica de resistência observada nos outros genótipos possa ser decorrente de efeito acumulativo de dois ou mais compostos. Essa hipótese reforça igualmente a possibilidade de que o melhoramento da soja, realizado na maioria das vezes visando à obtenção de características agrônômicas, tais como o aumento de produtividade, não priorize a resistência aos insetos e, com isso, praticamente elimine substâncias secundárias de defesa da planta.

Referências

- GRAHAM, T.L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiology*. v. 95, p. 594-603, 1991.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B. Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hübner). 1995. 165 f. Dissertation (Ph.D) – The University of Reading, Reading.

PIUBELLI, G. C. Bioatividade de genótipos da soja resistentes a *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e interações de suas substâncias químicas com inimigos naturais. 2004. 126 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.