

SOLANGE APARECIDA DE PAULA

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE CULTIVO E DOSES DE  
FÓSFORO NO SOLO NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE  
SEMENTES DE SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção  
do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2011**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P324i  
2011

Paula, Solange Aparecida de, 1982-

Influência da temperatura de cultivo e doses de fósforo no solo na composição bioquímica de sementes de soja / Solange Aparecida de Paula. – Viçosa, MG, 2011.

x1, 87f. : il. ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Valéria Monteze Guimarães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 62-79.

1. Bioquímica. 2. Rafinose. 3. Ácido fítico. 4. Soja -  
Composição. 5. Soja - Seleção. 6. Plantas - Efeito do fósforo.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 572

SOLANGE APARECIDA DE PAULA

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE CULTIVO E DOSES DE FÓSFORO NO SOLO NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE SEMENTES DE SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**Aprovada: 28 de outubro de 2011.**

---

Sebastião Tavares de Rezende  
(Coorientador)

---

Luiz Orlando de Oliveira  
(Coorientador)

---

Newton Deniz Piovesan

---

Tais Cristina Bastos Soares

---

Valéria Monteze Guimarães  
(Orientadora)

*A Deus*

*Aos meus pais Nilson e Aparecida (in memoriun)*

*Aos meus irmãos Nízio, Vanderlúcia, Marinalva e Nivaldo,*

*Ao meu marido e amigo Aroldo,*

*Aos meus sobrinhos, Gustavo, Vanessa, Caio, Renato e Sara.*

Por tudo que significam para mim:

Dedico

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me fazer forte e me mostrar sempre o melhor caminho, a verdade e a luz.

À minha mãe (*in memoriam*) e ao meu pai (*in memoriam*) que sempre me incentivaram, por acreditar em meus sonhos, em me apoiar em todas as decisões, por me ajudar em TUDO e principalmente, por me amar incondicionalmente. Eu sei que vocês pudessem estar aqui estariam orgulhosos e felizes.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À CAPES, pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

A minha orientadora, professora Valéria Monteze Guimarães, pelo apoio, amizade, dedicação, paciência, pela confiança depositada em mim e pela excelente orientação do meu trabalho.

Ao Newton, pelo apoio na condução dos experimentos, pela amizade e pela paciência.

Aos professores Maurilio Alves Moreira, Luiz Orlando de Oliveira, Sebastião Tavares de Rezende, pelo apoio ao meu trabalho.

Ao secretário Eduardo pelo carinho, dedicação e boa vontade indispensáveis em todos os momentos.

Ao Cássio, por estar sempre disponível na concessão dos materiais utilizados nos experimentos.

Ao laboratório de Análises Bioquímicas do BIOAGRO, onde o meu trabalho foi realizado, obrigada pelo carinho com que fui recebida.

Aos meus amigos, Eleonice, Rafaela, Larissa, Gabriela, Naldo, Sandra Camila, Maíra, Daniel, Eliene, que tornaram os dias de trabalho no laboratório mais prazerosos.

Aos funcionários José Carlos, Gláucia, Eduardo pela colaboração nas análises bioquímicas e pela amizade.

Aos meus irmãos, meus sobrinhos, cunhadas, pelo carinho e apoio depositados em mim.

Ao meu esposo Aroldo, pelo carinho, amizade, dedicação, ensinamentos e principalmente pelo seu amor.

Aos meus amigos de Viçosa e a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

SOLANGE APARECIDA DE PAULA, filha de Nilson Lopes de Paula e Aparecida de Jesus Fonseca de Paula, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 14 de maio de 1982.

Em março de 2001, ingressou no curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios da Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se com o título de Bacharelado em janeiro de 2005.

Em agosto de 2005, iniciou o curso de pós-graduação em Bioquímica Agrícola, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, dissertação em 12 de julho de 2007.

Em agosto de 2007, iniciou o curso de pós-graduação em Bioquímica Agrícola, em nível de doutorado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em outubro de 2011.

## SUMÁRIO

	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Soja como Fonte de Alimento.....	4
3.2. Efeito da temperatura na cultura soja.....	6
3.3. Adubação Fosfatada.....	7
3.4. Fitase.....	11
3.5. Mio-inositol-3-fosfato sintase.....	12
3.6. Oligossacarídeos de Rafinose.....	12
3.7. Ácido Fítico.....	18
3.8. Ácidos graxos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Análises de Ácido fítico.....	23
4.2. Extração e atividade de fitase.....	24
4.3. Extração e atividade da Mio-inositol-3-fosfato sintase (MIPS).....	24
4.4. Análises de açúcares.....	25
4.5. Análise de ácidos graxos.....	26
4.6. Análise Estatística.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28

5.1. Ácido fítico.....	31
5.2. fitase.....	35
5.3 Mio-inositol-3-fosfato sintase.....	37
5.4 Açúcares.....	40
5.5 Ácidos graxos.....	50
6. CONCLUSÕES.....	61
7. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	62
ANEXO I.....	80

## RESUMO

PAULA, Solange Aparecida de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2011. **Influência da temperatura de cultivo e doses de fósforo no solo na composição bioquímica de sementes de soja.** Orientador: Valéria Monteze Guimarães. Coorientadores: Sebastião Tavares Rezende, Maurílio Alves Moreira e Luiz Orlando de Oliveira.

A soja, um grão de alto valor nutricional, é utilizada como base para vários produtos, portanto existe uma demanda crescente por cultivares de soja com características de qualidade específicas. A busca de novas alternativas para o aumento da produtividade da soja e para uma soja com alto valor nutritivo tem sido constante objetivo de pesquisadores e produtores. As respostas da cultura à aplicação do fósforo via solo são bem definidas, sendo esse nutriente de grande importância no desenvolvimento da mesma. A adubação da soja pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles as condições climáticas, o teor de nutrientes no solo e os tratamentos culturais. Com o objetivo de avaliar os efeitos da adubação fosfatada e da temperatura de crescimento das plantas de soja na qualidade de grãos de soja foi realizada essa pesquisa. Os tratamentos constaram de sete níveis de fósforo (15, 30, 60, 120, 240, 480 e 960 ppm), duas temperaturas de crescimento das plantas e duas cultivares de soja, utilizando-se delineamento em blocos casualizados com três repetições em arranjo fatorial. As características avaliadas foram: concentração de oligossacarídeos de Rafinose, de ácido fítico, de ácidos graxos e, atividade de fitase e mio-inositol 3- fosfato sintase ambas em sementes maduras e em sementes coletadas 40 dias após a floração. As variáveis ácido fítico, oligossacarídeos de rafinose, ácido palmítico, ácido oléico, ácido linoléico, ácido linolênico atividade de fitase em semente 40 dias após a floração e semente madura, atividade de mio-inositol 3-fosfato sintase, nos dois estágios tiveram efeito significativo na interação tripla entre doses de fósforo x cultivar e temperatura. Sacarose, rafinose e ácido esteárico tiveram apenas efeito significativo para a interação entre cultivares e temperatura. De posse desses resultados podemos concluir

que o uso de uma adubação adequada aliada ao conhecimento das condições de cultivo e do cultivar utilizado pode ser uma ferramenta para se obter cultivares com melhor características para o uso da soja na alimentação.

## ABSTRACT

PAULA, Solange Aparecida de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2011. **Influence of temperature and availability of soil phosphorus in biochemical composition of seeds soybean.** Adviser: Valéria Monteze Guimarães. Co-advisers: Sebastião Tavares Rezende, Maurilio Alves Moreira and Luiz Orlando de Oliveira.

Soybeans, a grain of high nutritional value is used as the basis for several products, so there is a growing demand for soybean cultivars with specific quality characteristics. The search for new alternatives to increase the productivity of soybeans and soy with a high nutritional value has been a constant goal of researchers and producers. The responses of the crop to the soil application of phosphorus are well defined, this nutrient is of great importance in the development of the same, implying their use in increasing the yield. Fertilization of soybeans can be influenced by several factors, including climatic conditions, the nutrient content in soil and crop management. In order to evaluate the effects of phosphorus and temperature on the quality of soybeans was conducted this research. Treatments consisted of seven levels of phosphorus (15, 30, 60, 120, 240, 480 and 960 ppm), using a randomized block design with three replications. These characteristics were: Raffinose content of oligosaccharides, phytic acid content, fatty acid content and phytase activity of myo-inositol 3 - phosphate synthase both in two stages of grain development. The variables phytic acid, raffinose oligosaccharides, palmitic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid phytase activity in the seed and mature seed 40 days, activity of myo-inositol 3-phosphate synthase in two stages, suffered a significant interaction between doses of phosphorus triple x cultivar and temperature. Sucrose, raffinose and stearic acid had a significant effect only for the interaction between cultivars and temperature. With these results we conclude that the use of appropriate fertilization coupled with the

knowledge of growing conditions and cultivar can be used is a tool to obtain cultivars with improved characteristics for use of soybean in the diet.

## 1-INTRODUÇÃO

A soja é uma excelente fonte de proteína, óleo e minerais para dieta humana e de animais, trazendo grandes benefícios à saúde. Em função de seu alto valor nutricional, a soja tem se tornado um produto agrícola cada vez mais importante, com um aumento constante na sua produção.

O crescimento da produção e o aumento da capacidade produtiva da soja brasileira estão aliados aos avanços científicos, a interação entre a planta, o ambiente e o manejo e à disponibilização de tecnologias no setor produtivo, estando nessa situação o uso de fertilizantes minerais como fósforo. Os solos brasileiros são carentes de fósforo, menos de 0,1% do fósforo encontra-se na solução do solo de forma disponível para a planta. Os solos em que a soja é cultivada normalmente apresentam alta capacidade de fixação de fósforo e isto, aliado à alta exigência desta cultura por esse nutriente, torna fundamental o estabelecimento de formas e fontes de adubação. No entanto, as quantidades de fósforo adicionadas devem ser econômicas e ecologicamente corretas para que, no futuro, não venham causar problemas ambientais, tal como a eutrofização dos sistemas aquáticos. Ao mesmo tempo, o mundo poderá enfrentar uma escassez futura dos recursos de fertilizantes fosfatados, uma vez que o minério de fósforo, que pode ser economicamente extraído e transformado em adubo, tem fonte limitada e eventualmente poderá ser esgotado (Kuwano et al., 2009).

O fósforo se faz importante para o crescimento e desenvolvimento das plantas, por participar de reações metabólicas fundamentais, mas principalmente pela formação de compostos energéticos como trifosfato de adenosina (ATP) e outros compostos como derivados de inositol, fosfolípidios e outros ésteres (Tran et al, 2010)

Sementes normalmente acumulam várias vezes mais fósforo do que é necessário para suas funções celulares básicas, normalmente este “excesso” de fósforo se refere à molécula de ácido fítico (mio-inositol 1,2,3,4,5,6 hexafosfato ou Ins P6). Ácido fítico e fitatos

são termos freqüentemente usados como sinônimos, embora ácido fítico seja um ácido livre e fitato seja um sal de ácido fítico. Em sementes, o ácido fítico ocorre principalmente na forma de sal, formando complexo com cálcio, magnésio ou potássio. Várias e importantes funções fisiológicas tem sido propostas para o acúmulo de fitato na semente. Durante a germinação, o fósforo armazenado é necessário para a síntese de compostos como ácidos nucleicos e fosfolipídios. O mio-inositol livre pode ser usado como uma fonte de carbono para o crescimento da planta, ou pode servir como uma molécula de partida para uma das numerosas vias metabólicas, como por exemplo para formação dos Oligossacarídeos da Família da Rafinose (RFOs) (Israel et al., 2011).

Para que ocorra a liberação do fósforo e da molécula de mio-inositol, o fitato é hidrolizado pela ação catalítica da enzima fitase. Os animais não-ruminantes e humanos não possuem em seu trato intestinal a enzima fitase, e assim, são incapazes de utilizar eficientemente o fósforo do fitato. O fitato é considerado um fator antinutricional porque quela minerais e forma complexos insolúveis com as proteínas, diminuindo a biodisponibilidade desses nutrientes essenciais. O fitato que não é digerido pelo trato gastrointestinal é excretado nas fezes dos animais, as quais podem ser usadas como adubo para pastagens e solos agrícolas.

Entre os fatores ambientais que exercem efeitos sobre o desenvolvimento da cultura de soja, um dos mais importantes é a temperatura, que varia com as épocas do ano. A temperatura influencia a composição, qualidade e produtividade da soja, pois provoca mudanças qualitativas ao longo do ciclo da cultura. Em se tratando de mecanismos fisiológicos de adaptação as condições térmicas, muitas plantas adquirem a capacidade de se adaptar à temperatura do ambiente ajustando a fluidez da membrana, o metabolismo e o perfil de expressão dos genes (Chinnusamy et al., 2004).

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o desempenho de duas cultivares de soja, Conquista e A7002, submetidas a níveis de adubação fosfatada e temperaturas de cultivo, quanto aos conteúdos

de ácido fítico, oligossacarídeos de rafinose, sacarose, ácidos graxos nas sementes maduras e atividade das enzimas fitase e mio-inositol-3-fosfato sintase (sementes madura e colhidas 40 dias após a floração).

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 - OBJETIVO GERAL**

Avaliar a influência da temperatura e de doses de fósforo do solo sobre os conteúdos de ácido fítico, fosfolipídios, oligossacarídeos de rafinose, sacarose, ácidos graxos e sobre as atividades enzimáticas da mio-inositol-1-fosfato sintase e fitase, em dois estádios do desenvolvimento das sementes dos cultivares de soja Conquista e A7002.

### **2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o desenvolvimento das variedades de soja cultivadas em diferentes temperaturas e concentrações de fósforo do solo.
- Determinar os conteúdos dos fatores antinutricionais: rafinose, estaquiose e ácido fítico em grãos de soja;
- Padronizar um protocolo para determinação da atividade de mio-inositol-1-fosfato sintase (MIPS) de grãos de soja em desenvolvimento.
- Determinar a atividade de fitase em grãos de soja em desenvolvimento.
- Avaliar a influencia da concentração de fósforo do solo e da temperatura nos conteúdos de ácido fítico, ácidos graxos, oligossacarídeos de rafinose e sacarose em grãos de soja

### **3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 - A SOJA COMO FONTE DE ALIMENTO**

A soja é uma valiosa fonte de proteína e óleo. A proteína é utilizada principalmente como alimento, enquanto o óleo é mais amplamente utilizado, tanto incorporado à alimentação humana e animal, como também em algumas aplicações industriais como por exemplo para produção de biodiesel. As concentrações de proteína e óleo nos grãos soja, são influenciadas tanto pelo genótipo como pelo ambiente e em média é de cerca de 40 e 20%, respectivamente (Clemente & Cahoon, 2009).

Os chineses já exploram o potencial da soja para uso na alimentação há milênios, mas somente nos últimos anos, os ocidentais passaram a considerar a soja como alimento funcional, ou seja, aquele que além das funções nutricionais básicas, produz efeitos benéficos à saúde (Messina et al., 1994).

A relação entre o consumo de soja e a saúde humana tem sido amplamente investigada pelas características nutricionais desse alimento, quer seja pelo elevado teor de proteína de qualidade nutricional adequada, pelo conteúdo significativo de minerais e fibras, ou ainda, devido a quantidade reduzida de gordura saturada e a ausência de colesterol (Grieshop et al., 2001).

Entre os alimentos funcionais, a soja tem se mostrado como um dos mais versáteis na atualidade (Yim, 2002). Entre os principais efeitos na saúde humana, destacam-se a prevenção e tratamento de doenças como alguns tipos de câncer (mama, próstata, gástrico e intestinal), sintomas da pré e pós-menopausa (climatério), doenças cardiovasculares, osteoporose (Trucom, 2005) e controle da diabetes (Messina et al., 1994).

Dentro do cenário agrícola brasileiro a soja é uma das culturas de grande importância econômica. O Brasil ocupa o segundo lugar na produção mundial de soja, e mantém o ritmo de crescimento das últimas safras, com produção estimada em 75,31 milhões de toneladas na safra 2010/2011. Este 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 (www.conab.gov.br). Apesar de o Brasil ser um grande produtor de soja, essa leguminosa é pouca usada como alimento pela população brasileira. Apesar de ser pouco consumida, observa-se que a produção de alimentos à base de soja no Brasil é um segmento que apresenta forte crescimento. Diversos produtos têm sido lançados no mercado em decorrência do aumento na procura de alimentos derivados de soja, principalmente devido à divulgação pela mídia, dos benefícios à saúde que o consumo desta leguminosa proporciona ao organismo. No mercado brasileiro, além do óleo de soja, encontra-se extrato (ou “leite”) de soja em pó, proteína texturizada de soja (PTS ou “carne” de soja), farinha de soja, creme de soja, condensado de soja, congelados à base de soja (hambúrguer, salsichas e *nuggets* de soja), pratos prontos congelados, sorvetes, iogurtes a base de soja, lecitina de soja, entre outros (Benassi, 2006).

O extrato (ou “leite”) de soja representa uma opção de alimento para as pessoas que são intolerantes à lactose. Conforme Carrão-Panizzi & Mandarino (1998), “o “leite” de soja é uma alternativa viável para alimentação, apesar de sua deficiência em cálcio e vitaminas A e C. O “leite” de soja apresenta alta digestibilidade (95%) comparável à do leite de vaca (91%) e do leite humano (90%).

Apesar do baixo custo e de suas propriedades nutricionais e funcionais, a soja é ainda pouco usada na dieta do brasileiro. As razões para esse baixo consumo são atribuídas provavelmente à falta de hábito e/ou de informação em relação aos benefícios que o seu consumo proporcionaria ao organismo. Soma-se a isto o seu sabor e odor desagradável, devido a presença de diversos compostos orgânicos nas sementes, à indução de flatulência gerada por oligossacarídeos do tipo estaquiiose, rafinose e verbascose, e aos seus componentes antinutricionais como ácido fítico (Morais et al.,2000; Sarwar, 1997). Todos esses fatores contribuem para que grande parte da soja seja utilizada na extração de óleos e seus resíduos sejam destinados, especialmente, à alimentação animal.

### 3.2 - EFEITO DA TEMPERATURA NA CULTURA DE SOJA

Em qualquer lugar que as plantas cresçam, elas estarão sujeitas às condições de múltiplos estresses, os quais limitarão seu desenvolvimento e suas chances de sobrevivência (Larcher, 2000). A soja, sendo uma cultura termo e fotossensível, está sujeita a uma gama de alterações fisiológicas e morfológicas, quando as suas exigências não são satisfeitas (EMBRAPA Soja, 2008).

A temperatura é um elemento meteorológico diretamente relacionado à adaptação, desenvolvimento e a produção eficiente da cultura. Para todas as plantas, observa-se uma tolerância para uma temperatura mínima e máxima, passando por um valor ótimo (Bonhomme, 2000). Os valores ideais de temperatura do ar para o crescimento e desenvolvimento da soja são em torno de 30°C, mostrando efeitos adversos quando exposta a temperaturas acima dos 40°C (Farias et al., 2007). Alguns trabalhos apresentam valores de temperatura base para soja no Brasil de 10°C (Farias et al., 2007), 11°C (Sinclair et al., 2005) e 14°C (Camargo et al., 1987). Devido às plantas se desenvolverem linearmente correlacionadas com a temperatura (Hesketh et al., 1973), sob condições climáticas adversas com ocorrência de elevadas temperaturas, por exemplo, sua taxa de desenvolvimento frequentemente encontra-se no lado decrescente da relação, acima da temperatura ótima (Ferreira et al, 1997). Pearson et al. (1994) sugerem o uso da temperatura efetiva para a obtenção do tempo térmico nestes casos uma vez que a temperatura diária (ou horária) oscila entre condições sub-ótimas e super-ótimas, sendo necessário considerar o efeito redutivo das elevadas temperaturas na taxa de desenvolvimento da cultura. A temperatura mínima para o início do estágio reprodutivo da soja é variável de acordo com a exigência de cada variedade; porém, para as cultivares brasileiras estima-se a temperatura mínima em 13 °C, pois o florescimento da soja somente é induzido em temperaturas acima desse valor. A maturação pode, também, ser acelerada

pela ocorrência de altas temperaturas (Sediyama et al., 1993; Bergamin et al., 1999; Santos, 2008).

O ambiente onde a planta de soja é cultivada exerce forte influência na produtividade, qualidade fisiológica e na composição química das sementes de soja seja ela formada por compostos do metabolismo primários ou secundário (Ávila & Albrechet, 2010).

### **3.3 - ADUBAÇÃO FOSFATADA**

O fósforo é um dos dezessete elementos essenciais para a sobrevivência das plantas, estando presente em componentes estruturais das células, como nos ácidos nucleicos e fosfolipídios das biomembranas, e também em componentes metabólicos móveis armazenadores de energia, como o ATP. O abastecimento de fósforo às plantas se dá essencialmente via sistema radicular, estando sua absorção então na dependência da capacidade de fornecimento do substrato.

O fósforo é o segundo elemento que mais limita a produtividade nos solos tropicais. Esse comportamento é consequência de sua capacidade em formar compostos de alta energia de ligação com os colóides, conferindo-lhe alta estabilidade na fase sólida. Assim, mesmo que os teores totais do elemento no solo sejam altos em relação aos necessários para as plantas, apenas uma pequena fração deste tem baixa energia de ligação que possibilita sua desorção e disponibilidade às plantas. A fração de fósforo ligada aos colóides com baixa energia é chamada fator quantidade (Q) e está em equilíbrio com o fósforo na solução do solo, fator intensidade (I), de onde as plantas o absorvem. Quando a capacidade de Q em repor o I é insuficiente para sustentar a absorção pelas plantas, a estratégia mais comum para reverter este quadro é a adição de fertilizantes fosfatados (Schulze, 1989).

A planta, como dreno, tem o solo como sua fonte principal de nutrientes minerais havendo, portanto, a necessidade de manutenção do suprimento de nutrientes em quantidades adequadas para a planta. O solo é naturalmente

fonte de nutrientes ou torna-se fonte por meio da adição de fertilizantes (Novais et.al.2007).

Os fertilizantes sofrem constantemente altas taxas de perdas no campo, devido as lixiviações e erosões do solo, que carregam para fora das áreas de plantio frações minerais e orgânicas essenciais à cultura em desenvolvimento, além dos problemas relacionados com a retenção e a disponibilidade dos nutrientes no solo (Morais, 2009). Quando fertilizantes fosfatados são aplicados ao solo, principalmente em solos altamente intemperizados, após a sua dissolução, praticamente todo o fósforo é retido na fase sólida do solo, formando compostos menos solúveis, ou seja, apenas parte do fósforo retido é aproveitada pelas plantas (Souza, 2001).

O fósforo participa de vários processos metabólicos nas plantas, como transferência de energia, síntese de ácidos nucleicos, respiração, síntese e estabilidade das membranas, ativação e desativação de enzimas, reações redox, etc (Vance et al, 2003). Porém, a interação do fósforo com os constituintes do solo, sua ocorrência em formas orgânicas e sua lenta taxa de difusão na solução do solo o tornam o nutriente menos disponível para a planta (Araújo & Machado, 2009).

### **3.3.1 FÓSFORO NO SOLO**

No solo, o fósforo está presente nas fases sólida e líquida, ou seja, adsorvido ou complexado com os oxi-hidróxidos de Fe, Al e Ca e com a matéria orgânica, ou livre na solução do solo. Sendo o solo uma mistura de materiais orgânicos e inorgânicos, o fósforo também se apresenta em formas orgânicas e inorgânicas, tanto na fase sólida como na solução do solo, sendo que existe um equilíbrio entre o fósforo adsorvido e o fósforo em solução. Devido à baixa quantidade total de água retida pelo solo e a baixa concentração de P na solução, a quantidade prontamente disponível de P para as plantas é muito baixa, havendo a necessidade de difusão de P da fase sólida para a solução

para suprir as necessidades das culturas. Essa difusão é dependente do pH, do teor de óxidos e de outros fatores que afetam o equilíbrio fósforo-sólido/fósforo-solução (Anghinoni & Bissani, 2004).

O fósforo orgânico está presente no ambiente como parte do tecido de plantas vivas e de resíduos em decomposição, bem como de grãos e sementes exportados nas colheitas, e também faz parte dos resíduos de origem animal e humana. Uma das formas mais comuns de adicionar fósforo ao sistema é por meio do uso de fertilizantes industriais, os quais são originados da manipulação de rochas fosfáticas, tornando o fósforo disponível para absorção pelas plantas. Entretanto, o uso de resíduos vegetais e animais também são formas importantes de adição de fósforo, e ocorrem constantemente, muitas vezes sem ser percebido.

Naturalmente em solos tropicais e subtropicais o fósforo encontra-se em concentrações muito baixas na solução, sendo limitante para o desenvolvimento de culturas comerciais. Em solos jovens, as grandes quantidades de fosfatos primários, através do intemperismo, fornecem este nutriente às plantas. A disponibilidade de P é muitas vezes descrita pelo grau de labilidade deste nutriente no solo, ou seja, pela forma e interação que o P está sofrendo dos sítios de adsorção do solo. Se o mesmo está em solução ou fracamente adsorvido, então está na forma lábil, se está adsorvido com maior força nas argilas e óxidos de Fe e Al, então o grau de interação é que regulará a labilidade do mesmo. Com o desenvolvimento do solo, as formas lábeis de fósforo diminuem e as formas não lábeis aumentam, especialmente aquelas inorgânicas inativas. A participação do P orgânico aumenta, e os processos biológicos tendem a governar sua disponibilidade para as plantas e/ou microrganismos do solo (Cross & Schlesinger, 1995).

### 3.3.3 - ABSORÇÃO E FORMAS DE FÓSFORO NA PLANTA E SUA FUNÇÃO NO METABOLISMO

As plantas absorvem o fósforo nas formas aniônicas  $H_2PO_4$  e  $HPO_4^{2-}$ , que são as formas iônicas do fósforo de maior ocorrência nas faixas de pH normalmente encontradas nos solos, de 4,0 a 8,5 (Barber, 1984). O processo de absorção pode ser definido como a entrada do elemento em uma parte qualquer da célula, no espaço intracelular da raiz ou folha (Malavolta et al.1997).

A baixa concentração de fósforo disponível nos solos exige um mecanismo de absorção bastante eficiente. As plantas adquirem o fósforo contra um gradiente de concentração através da membrana plasmática, as concentrações de Pi nas células são geralmente mais de cem vezes superiores as concentrações na solução do solo (Raghothama, 2000). O que exige que seja gerado um forte gradiente eletroquímico, para que o transporte de fósforo para dentro da célula seja possível (Smith, 1997). A fonte de energia para esse transporte provém da operação de uma bomba iônica (extrusão de prótons), a enzima ATPase, localizada no plasmalema, ativada por cátions com diferentes especificidades, bombeia  $H^+$  para fora do citoplasma (Glass, 1984).

Segundo Rauscher & Bucher (2002), após absorção radicular, o Pi encontra cinco possíveis destinos:

- 1) Ingressa no compartimento metabólico;
- 2) Uma pequena porção de Pi ingressa nas vias biossintéticas de fosfolípidios, DNA e RNA, tornando-se um componente da célula;
- 3) Uma quantidade variável de Pi é perdida pela célula via efluxo;
- 4) Ocorre o influxo e armazenamento de Pi no vacúolo para regular a homeostase de Pi no interior da célula e
- 5) O Pi é transportado para as células parênquima do xilema e posteriormente, liberado para o transporte a longa distância.

Quando absorvido, o fosfato pode permanecer como Pi, ser esterificado como ester simples de fosfato (como em um açúcar fosfato) ou ser preso a

outro fosfato por ligações pirofosfato de alta energia, como no ATP (Marschner, 1995).

Nas células vegetais, o fósforo pode estar presente nos nucleotídeos, nos fosfolipídios presentes nas membranas celulares, nos fosfatos de adenosina (ATP e ADP). Em sementes, o fósforo acumula-se preferencialmente como ácido fítico, na forma de sais de ácido fítico ou fitato (Araújo & Machado, 2006). Na forma de Pi, é substrato ou produto em muitas reações enzimáticas, incluindo as da fotossíntese e metabolismo de carboidratos.

Em plantas, a deficiência de fósforo altera o metabolismo primário para o secundário, resultando acúmulo de metabolitos secundários, como flavonóides (Vance et al., 2003). A deficiência de fósforo causa uma redução no crescimento das plantas como um todo, atraso no florescimento, número reduzido de frutos e sementes (Malavolta et al., 1997).

O baixo conteúdo de fósforo nos grãos implica em um menor teor de ácido fítico (Feet et al., 1992). O ácido fítico é localizado exclusivamente nos globóides dentro dos corpos protéicos, mas não em todos esses corpos, resultando em diferentes conteúdos relativos de N e P nos grãos, o que abre perspectivas de uma seleção independente para os teores de N e P nos grãos (Araújo & Teixeira, 2003).

### **3.4 Fitase (EC 3.1.3.8)**

A fitase ou mio-inositol hexafosfato fosfohidrolase é uma enzima pertencente ao grupo das fosfatases de histidinas ácidas, que hidrolisa o ácido fítico a mio-inositol e ácido ortofosforico, necessário para o processo metabólico na biossíntese celular. Há dois tipos de fitase, a mio-inositol 3- fosfohidrolase, denominada 3-fitase e a mio-inositol 6-fosfohidrolase, denominada 6-fitase ou fitato 6- fosfatase (Vohara & Satyanarayama, 2003).

Com base nas propriedades bioquímicas (pH, temperatura, mecanismos catalíticos e especificidade de hidrólise) e no alinhamento da sequência de aminoácidos, as fitases podem ser divididas entre fitases ácidas de histidina

(HAP) e fitases alcalinas. A maioria das fitases de vegetais, bacterianas e fúngicas pertencem à classe HAP. A IUPAC-IUB (The International Union Of Pure and the International Union of Biochemistry) classificou todas as fitases ácidas como subfamília de HAP de alto peso molecular, na qual se inclui as 3-fitases que iniciam a hidrólise da ligação ester na posição 3, e as 6-fitases que hidrolisam na posição 6 (Nagashiro, 2007).

A maioria das fitases comercializadas é derivada de diferentes espécies de fungos (Remus, 2007). Uma série de fitases com propriedades estruturais e catalíticas variadas é encontrada em plantas e microrganismos. A fitase é encontrada em cereais como arroz, trigo, milho, sorgo, soja, e outras leguminosas ou sementes oleaginosas (Vohara & Satyanarayama, 2003).

Animais monogástricos e o homem, ao consumirem cereais que contêm fosfatos na forma de fósforo fítico, não o utilizam por causa da ausência de atividade de fitase intestinal (Wodzinski & Ullah, 1996).

### **3.5 Mio-inositol-3-fosfato Sintase (5.5.1.4)**

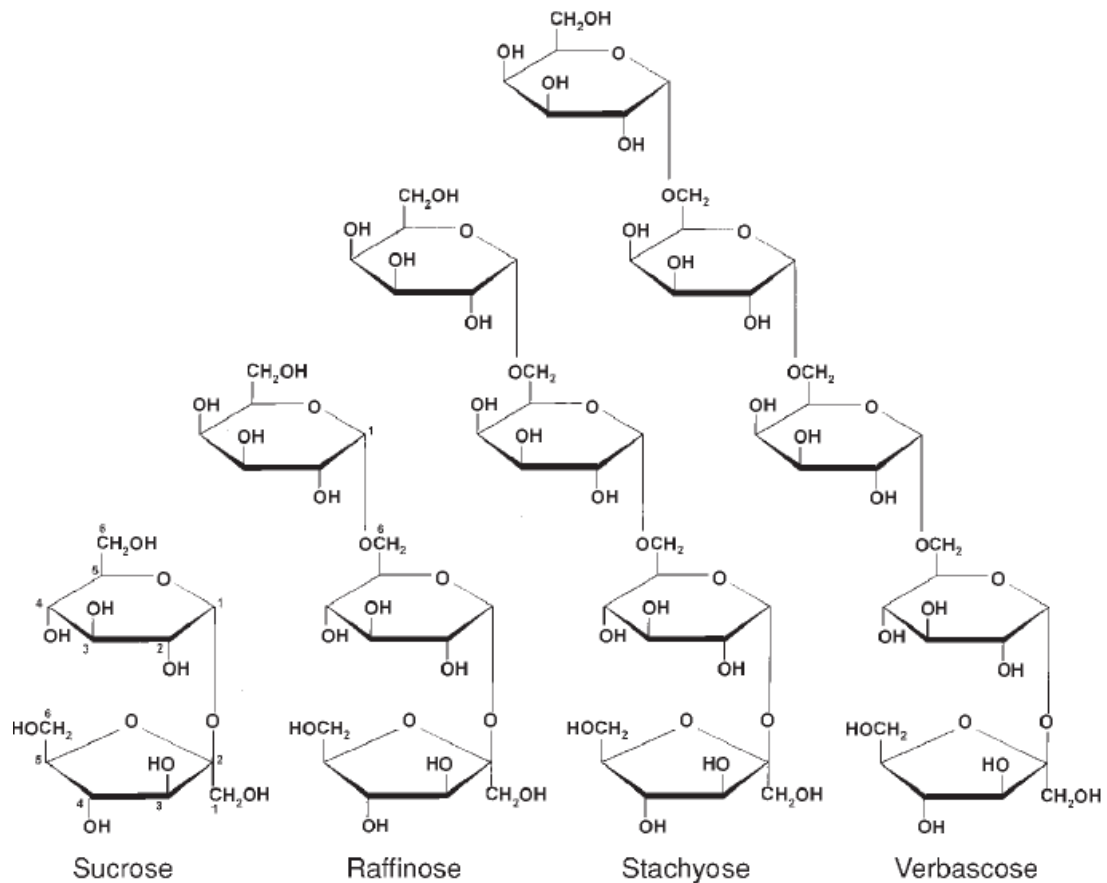
Vários estudos envolvendo as enzimas da via de síntese do mio-inositol e seus derivados tem sido realizados. Sendo a enzima mio-inositol-3-fosfato sintase (MIPS) uma das mais estudadas, por ser a enzima responsável pelo primeiro passo da via de síntese do mio-iositol.

MIPS é a enzima que converte glicose 6- fosfato em mio-inositol 3-fosfato, através de reações de oxidação, enolização, ciclização e redução (Manjumder et al 1997).

## **3.6 - OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE**

Os oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs) são oligossacarídeos derivados da sacarose, que receberam este nome devido ao primeiro produto de uma série homóloga de  $\alpha$ -galactosídeos. São açúcares não redutores, de baixo peso molecular, solúveis em água e em soluções de álcool e água (Arentoft & Sorensen, 1992; Arentoft et al., 1993). Além da rafinose, os RFOs são constituídos de estaquiose, verbascose e ajuucose (Cerning-Beroard &

Filiatre-Verel,1976). São geralmente os açúcares solúveis mais encontrados nas plantas, após a sacarose (Dey, 1990), podendo perfazer entre 2 a 13% do peso seco. Esses RFOs possuem um papel muito importante na estabilidade da semente e na proteção contra o dessecamento. Na figura 1 está a estrutura química dos oligossacarídeos:



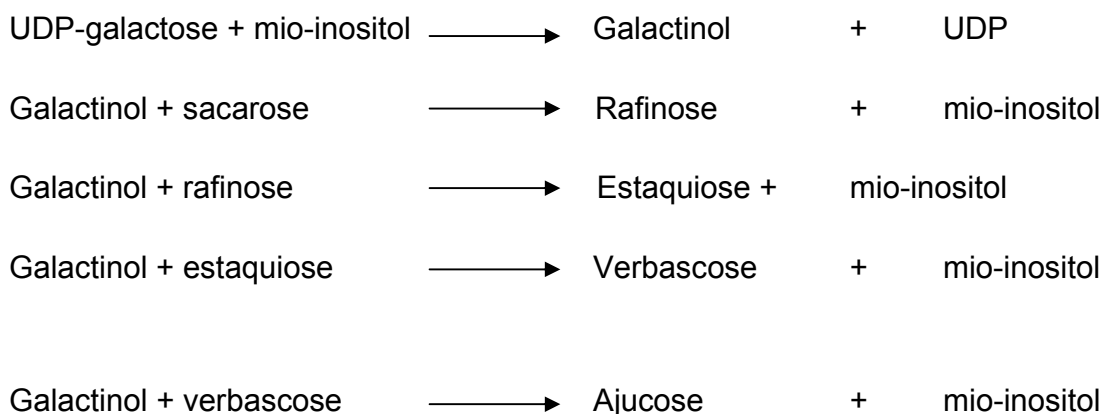
**Figura 1-** Estruturas química da sacarose e dos RFOs.

### 3.6.1 - BIOSÍNTESE E PAPEL FISIOLÓGICO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE

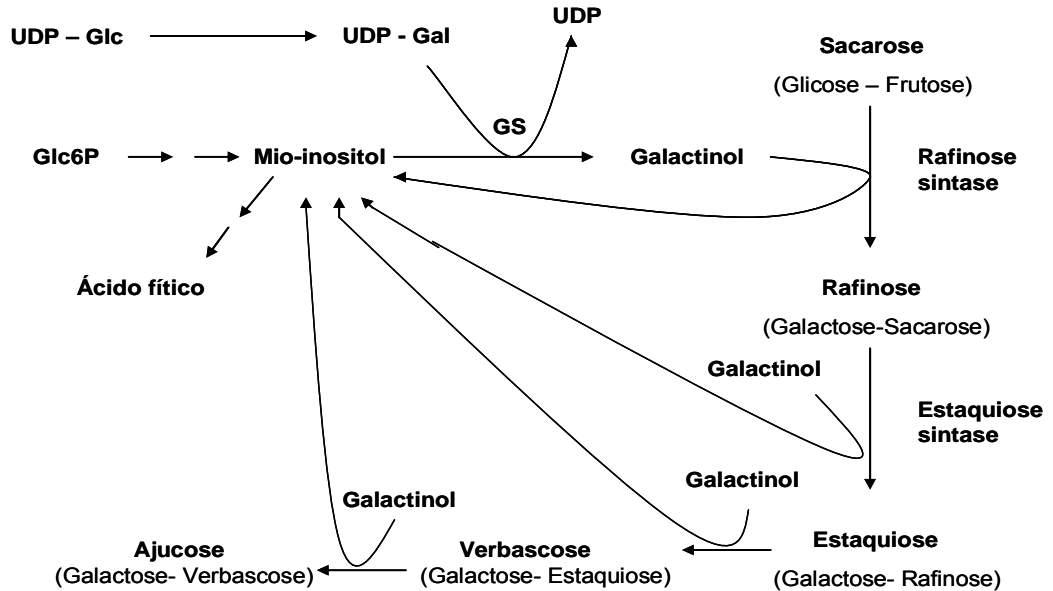
Os oligossacarídeos de rafinose são a fonte primária de energia e substrato para a síntese de vários compostos, durante a germinação das plantas que armazenam tais açúcares (Jiménez *et al.*, 1985). Segundo Dey (1981), a rafinose é armazenada nos órgãos de reserva, sendo utilizada como precursora para a síntese de outros oligossacarídeos ou podendo ser hidrolisada por alfa-galactosidases.

Além disso, os RFOs têm outras funções nas plantas, eles servem como metabólitos de transporte de esqueletos carbônicos em muitas leguminosas e existem evidências de seu papel na adaptação das plantas ao frio e em conferir tolerância à dessecação, durante o processo de maturação das sementes. Na literatura vários autores (Horbowicz & Obendorf, 1994; Koster *et al.*, 1994; Leprince & Waltres-Vertucci, 1995; Crowe *et al.*, 1996) relatam a expressão de enzimas relacionadas a biossíntese de galactinol e RFOs e sua acumulação intracelular, intimamente associada com as respostas ao estresse ambiental. Na ausência dos RFOs, a tolerância das sementes à dessecação é perdida, mesmo que a sacarose esteja presente. Acredita-se que a sacarose seja o principal agente da tolerância à dessecação (Korter & Leopold, 1988), e que os RFOs impeçam a cristalização da sacarose (Leopold & Vertucci, 1986).

Segundo Dey (1985), a via metabólica de síntese dos RFOs pode ser representada como se segue:



Na Figura 2 estão representadas a via de síntese dos oligossacarídeos :



**Figura 2** - Esquema da via metabólica de síntese dos RFOs (adaptado de Suarez *et al.*, 1999).

A síntese dos RFOs começa com a produção de galactinol a partir de UDP-galactose e mio-inositol, essa reação é catalisada pela galactinol sintase (UDP-galactose: mio-inositol galactosil transferase; GS), que requer  $Mg^{+2}$  para sua atividade (Liu et al., 1995). A UDP-Galactose é derivada da conversão de UDP-Glicose pela enzima UDP-glicose-4'-epimerase. O galactinol age como doador de galactosil e acha-se que a síntese de oligossacarídeos é o único papel do galactinol nas plantas (Saravitz et al., 1987). Subsequentemente à primeira reação, sintases específicas catalisam a síntese de cada oligossacarídeo da série (rafinose, estaquiose e verbascose, com a produção de  $\alpha$ -1,6-galactosídios, tri, tetra, penta e hexassacarídeos de rafinose) através da transferência do galactinol para a sacarose com regeneração do mio-inositol (Ribeiro, 2001). A rafinose ocorre em plantas superiores nas folhas, caules e órgãos de reserva. Ocorre um acúmulo na concentração de rafinose com a perda de água nas sementes maduras (Dey, 1985). A estaquiose é um dos mais abundantes tetrassacarídeos em plantas, reconhecida como o maior açúcar de

reserva e transporte das leguminosas. Estaquiase é sintetizada a partir de rafinose em uma reação catalisada pela estaquiase sintase (galactinol: rafinose 6- $\alpha$ -D-galactosil transferase), onde o galactinol serve como doador de galactose. Verbascose e ajuçose são penta e hexassacarídeos, respectivamente. Estes oligossacarídeos coexistem com rafinose e estaquiase na maioria das leguminosas, estando presentes em órgãos de reserva (Dey, 1985, 1990).

Geralmente as sementes acumulam sacarose durante seu desenvolvimento e RFOs são acumulados durante a maturação e dessecação, sementes de soja imaturas são capazes de germinação e não toleram dessecação rápida (Saravitz et al., 1987; Kuo et al., 1988; Lowell & Kuo, 1989; Horbowicz & Obendorf, 1994; Lahuta et al., 1995; Blackman et al. 1991, 1992).

### **3.6.2 - OCORRENCIA E DISTRIBUIÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE EM PLANTAS E SUAS IMPLICAÇÕES NUTRICIONAIS**

Os RFOs ocorrem no embrião de sementes de leguminosas e são hidrolisados durante a germinação, resultando no acúmulo temporário de galactose e sacarose nesses tecidos (Dey, 1980; Saravitz et al., 1987). Os RFOs são o segundo tipo de carboidrato solúvel mais abundante nas plantas, após a sacarose. Eles são sintetizados e depositados nos órgãos de armazenamento, como as sementes, durante o processo de maturação e são mobilizados durante os primeiros estádios da germinação (Dey, 1990).

Uma vez que existe variação entre cultivares de soja quanto ao conteúdo de RFOs, para sua redução em sementes de soja seria necessária a identificação de genótipos que apresentassem sementes com baixos teores de oligossacarídeos, seguido de hibridações entre estes e posterior seleção. Entretanto, Hymowitz et al. (1972) concluíram que devido à existência de uma correlação positiva entre concentração de proteína e de estaquiase na semente, torna-se difícil desenvolver linhagens de alta concentração de proteína e que tenha baixo teor de estaquiase.

Com o objetivo de obter sementes e de variedades de soja com baixo teor de oligossacarídeos para uso na alimentação humana, Suarez et al. (1999) analisaram um grande número de sementes quanto à atividade das enzimas rafinose sintase e estaquiose sintase, que catalisam as etapas finais da síntese de rafinose e estaquiose, respectivamente. Esses estudos resultaram na identificação de sementes e variedades com atividade muito baixa para essas enzimas, as quais apresentam também baixa concentração de rafinose e estaquiose quando comparadas com sementes convencionais.

As primeiras evidências sobre o efeito antinutricional dos RFOs foram notadas por Kuriyama & Mendel (1917). Esses autores reportaram que quando alimentavam ratos com dietas contendo de 3 a 5 g de rafinose, esses apresentavam diarreia severa e resíduos de rafinose nas fezes. A ingestão de soja e derivados resulta no aparecimento de sintomas desagradáveis, o que limita o seu consumo. Dentre os sintomas desagradáveis, destaca-se a flatulência (De Lumen, 1992), que é resultante do metabolismo anaeróbico dos RFOs, presentes nos grãos das leguminosas em geral (Price et al., 1988). A mucosa do intestino humano e de outros animais monogástricos, como aves e suínos, é desprovida das enzimas  $\alpha$ -1,6-galactosidases (EC. 3.2.1.22 a-D-galactosil galactohidrolase), que são necessárias à conversão dos RFOs em açúcares mais simples. Conseqüentemente, 100% dos RFOs não são degradados e são então conduzidos ao intestino grosso onde bactérias anaeróbicas possuem os sistemas enzimáticos necessários para fermentação desses açúcares, o que resulta em liberação de grandes quantidades de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, fenômeno este conhecido como flatulência intestinal, que está associado com cólicas, diarreia, dispepsia e constipação (Steggerda & Dimmick, 1966; Suarez et al 1999). Desta forma, os RFOs presentes na soja e outras leguminosas assumem papel restritivo quanto ao consumo destes grãos como fonte protéica.

### 3.7 - ÁCIDO FÍTICO

O fitato no grão de soja representa em torno de 50 a 70 % do fósforo total (Reddy et al., 1989). Segundo Souza (2003), as variações nos valores de ácido fítico no grão de soja, descritas na literatura, são decorrentes, além do genótipo, das variações nas condições ambientais, na dose aplicada de fertilizantes, no armazenamento e nos métodos de determinação. Nas plantas, o ácido fítico tem como funções fisiológicas, suprir o processo de germinação com o inositol, fosfatos e minerais (Lott et al., 2000; Lei et al., 2001) e controlar os níveis de fosfatos inorgânicos, tanto na fase de maturação da semente quanto na sua germinação (Strother, 1980).

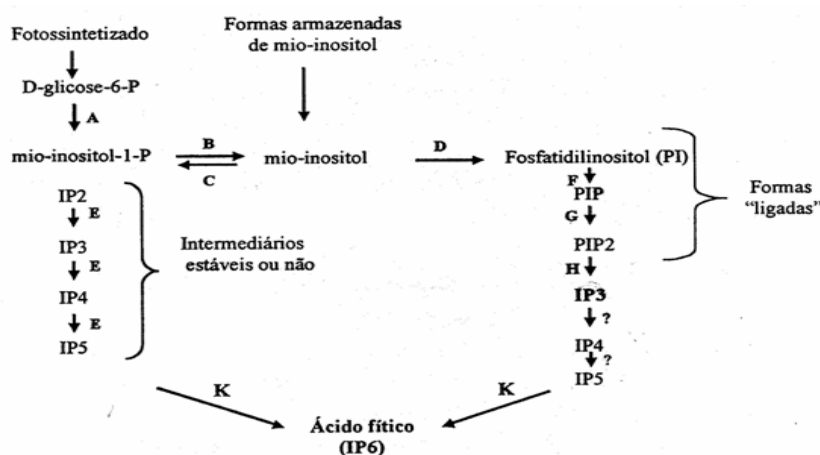
#### 3.7.1 - VIA DE BIOSÍNTESE DE ÁCIDO FÍTICO

A síntese de ácido fítico inicia após o florescimento e se dá por um processo de fosforilação da molécula de mio-inositol. A princípio, este pode ser suprido pela síntese *de novo* ou pode ser reciclado a partir de uma forma armazenada, ou ainda ser translocado. No entanto, a síntese *de novo* é reconhecida como sendo a principal fonte de inositol em grãos, o qual envolve a conversão de glicose-6P em mio-inositol-1P pela ação da enzima mio-inositol-1-P-sintase (MIPS) (Loewus & Murthy, 2000).

A partir do mio-inositol-monofosfato o processo de fosforilação é continuado sucessivamente até a formação do mio-hexaquisfosfato (IP<sub>6</sub>) ou ácido fítico. Este se acumula durante desenvolvimento até maturação de semente e dessecação. Para explicar a via biossintética do IP<sub>6</sub> existem muitas propostas na literatura: que há uma fosforilação sucessiva da molécula de mio-inositol com ausência de intermediários parcialmente fosforilados estáveis (Biswas et al., 1978), ou aquela que envolve fosforilação sucessiva, porém com a presença dos intermediários (Brearley & Hanke, 1996). Em ambas, a fosforilação ocorre pela ação de quinases.

No caso da via que se refere à presença dos polifosfoinosítídeos como intermediários, a formação de IP3 ocorre pela ação da fosfolipase C e os demais intermediários também são formados por quinases, em que duas fosforilações sucessivas levam o IP3 ao IP5, e finalmente o IP5 para o IP6, através da pentaquisfosfato quinase, esta última conversão é comum em todas as vias, o que varia é a posição do fósforo na molécula de mio-inositol (Majerus et al., 1988)..

Independente do caminho de síntese do ácido fítico, o fósforo, mio-inositol ou glicose podem ser usados como primeiros substratos a serem incorporados na via de síntese de fitato. O fósforo é incorporado na forma de ATP, a glicose e mio-inositol são fontes de carbono (Loewus & Loewus, 1983). Tanto glicose como mio-inositol podem gerar mio-inositol-1P pela ação de duas enzimas, mio-inositol-1-P-sintase e mio-inositol-quinase, respectivamente (Loewus & Murthy, 2000). As vias de biossíntese do ácido fítico estão mostradas na Figura 3.



**Figura- 3-** Possíveis vias metabólicas envolvidas na síntese de ácido fítico. À esquerda, via proposta por Biswas et al., (1978) na ausência de intermediários estáveis, ou no caso dos intermediários estáveis refere-se à via proposta por Brealy & Hanke, (1996). À direita, via proposta por Majerus et al., (1988), A= 1 L-mio-inositol-1P-sintase; B= 1L-mio-inositol-1P fosfatase; C= mio-inositol-quinase; D= fosfatidil inositol sintase; E= quinases; F= Pi quinase; G= PIP quinase; H= fosfolipase C e K= pentaquisfosfato quinase.

### **3.7.2 - OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DE ÁCIDO FÍTICO EM PLANTAS E SUAS IMPLICAÇÕES NUTRICIONAIS**

O ácido fítico é tipicamente depositado como inclusões globulares juntamente com as proteínas de reserva (Lott et al., 1995). Nos cereais, o ácido fítico concentra-se na camada do aleurona e no embrião. As dicotiledôneas podem ter o fitato depositado no endosperma, cotilédones e eixo embrionário, sendo que a menor percentagem se encontra no eixo embrionário (Lott et al., 1995).

A soja e seus derivados contêm de 1 a 1,5% de ácido fítico que podem ser quelados com metais di e trivalentes, tais como Ca, Cu, Zn, Fe, Mg, Mn e Mo (Rackis, 1974), e interagir com proteínas e vitaminas (Chang, 1977). A importância antinutricional destes sais deve-se à interação dos grupos fosfato com amido, minerais e proteínas, levando a alteração na solubilidade, funcionalidade, digestibilidade e absorção desses nutrientes (Reddy et al., 1989).

Devido a estes aspectos, o interesse em manipular o teor de fitato em grãos tem crescido em todo mundo. A fitase é a principal enzima responsável pela hidrólise do fitato durante a senescência e germinação, resultando em fósforo inorgânico e inositol com vários graus de fosforilação. Esta enzima apresenta grande distribuição na natureza tanto em microrganismos como em sementes como, soja, feijão, trigo. Porém, não está presente em humanos e animais monogástricos. Assim, a maior parte do P contido neste composto é indisponível e excretado sem ser absorvido (Raboy et al., 1991; Reddy et al., 1989).

### 3.8 ÁCIDOS GRAXOS DA SOJA

Os óleos vegetais possuem como seu principal componente lipídico os triacilgliceróis, que são compostos de três ácidos graxos, cada um ligado ao glicerol através de ligações ésteres. O óleo de soja é composto pelos seguintes ácidos graxos: Palmítico (16:0); esteárico (18:0); oléico (18:1); linoléico (18:2) e linolênico (18:3). A proporção que esses ácidos graxos são encontrados na soja é em média: 11 % de ácido palmítico; 4% de ácido esteárico; 24% de ácido oléico; 54% de ácido linoléico e 7% de ácido linolênico (Kinney,1996).

A qualidade do óleo, o valor nutricional, o sabor e as propriedades físicas, como estabilidade oxidativa, ponto de fusão, são determinadas pela composição e distribuição dos ácidos graxos na molécula de triacilglicerol. O teor de ácidos graxos poliinsaturados tem sido relacionado com a diminuição da estabilidade oxidativa e da qualidade do óleo de soja (sabor e odor), gerando compostos voláteis, rancidez (Yadav, 1996 & Murphy, 1999).

Em soja a biossíntese de ácidos graxos inicia-se com a formação dos ácidos graxos palmítico, esteárico e oléico em uma sequência de reações catalizada pela ácido graxo sintase. Este complexo enzimático tem como função adicionar unidades de dois carbonos a cada ciclo até formar o Palmitoil-ACP (Yadav, 1996). A  $\beta$ -cetoacil sintase II promove a elongação do Palmitoil-ACP a estearoil-ACP e a estearoil-ACP dessaturase promove a conversão de estearoil-ACP a oleoil-ACP (Somerville & Browse, 1991). Sintetizados nos plastídios, eles podem ser transportados para o citosol associados a proteína carreadora do grupo acil (ACP) e serem utilizados para a produção de lipídios estruturais de membranas e de reserva (Yadav,1996)

A biossíntese de ácidos graxos insaturados é catalisada por enzimas denominadas ácido-graxo dessaturases, tendo como principal substrato a fosfatidilcolina. Essas enzimas catalisam a introdução de duplas ligações na porção hidrocarbônica dos ácidos graxos (Kinney, 1996). Cada ácido graxo dessaturase introduz uma ligação em uma posição específica da cadeia

carbônica do ácido graxo. A primeira reação é catalisada pela esteroil-COA dessaturase para produzir o ácido oléico (18:1).

#### 4- MATERIAIS E MÉTODOS

Sementes de soja dos cultivares comerciais A7002 (desenvolvido pela Aventis atualmente Nidera) e MG/BR 46 Conquista (desenvolvida pela EPAMIG/EMBRAPA), foram utilizadas neste experimento. Essas cultivares foram selecionadas por possuírem distintos conteúdos de óleo nas sementes, a cultivar A7002 possui aproximadamente 26%, a cultivar MG/BR 46 Conquista possui 20% de óleo; por apresentam ciclo de maturidade semelhantes de 135 dias (semi tardio para nossa região) e mesmo tipo de crescimento. As sementes foram cedidas pelo programa de melhoramento genético da soja do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária –**BIOAGRO-UFV**.

O experimento foi montado em delineamento em blocos casualizados, seguido por um arranjo fatorial, com três repetições por tratamento, totalizando 84 parcelas, cada parcela foi constituída por um vaso contendo 4,0 kg de solo previamente corrigido e adubado. O solo foi corrigido com  $\text{CaCO}_3$  e adubado com sulfato de potássio, ácido bórico, sulfato de cobre, de zinco e de manganês e fosfato de cálcio monobásico utilizado como fonte de fósforo. A adubação utilizada foi a recomendada para soja, com exceção da adubação fosfatada, onde a dose de fósforo utilizada foi variável. Sete doses de fósforo foram utilizadas: 15, 30, 60, 120, 240, 480 e 960 ppm. Em cada vaso foram plantadas quatro plantas.

Durante o cultivo das plantas, quarenta dias após a floração, foram coletadas sementes de cada tratamento que foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$ , para posterior análise das atividades de fitase e mio-inositol-3-fosfato sintase, as demais análises foram realizadas com a semente madura. As plantas foram cultivadas no período de agosto até dezembro de 2009.

Até o início do período reprodutivo, as plantas foram mantidas em uma mesma casa de vegetação. Após esse período, foram divididas em duas casas de vegetação: uma com sistema de ventilação constante, em que a temperatura máxima média foi de 30°C e a mínima de 15°C. Na outra, as temperaturas máxima e mínima médias foram de 35°C e 21°C. As medidas de temperatura foram realizadas diariamente, às 18:00 h, utilizando termômetros de máxima e de mínima, com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura de cultivo.

#### **4.1. ANÁLISE DE ÁCIDO FÍTICO**

O ácido fítico foi extraído segundo o método descrito por Haug & Lantchz (1983). O volume de 1,5 mL de HCl 0,2 M foi adicionado a 0,015 g de farinha de soja para extração. Em seguida a mistura foi agitada durante 30 min a 25 °C e centrifugada a 17.200 x g durante 15 min. O sobrenadante (0,5 ml) foi misturado com 1 mL de solução de FeCl<sub>3</sub> em HCl 0,2 M (0,11g de cloreto férrico foram dissolvidos em 100 mL de HCl 0,2 M e o volume completado para 1000 ml), e em seguida a mistura foi aquecida por 30 min a 100 °C. Após resfriamento a temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada a 3.000 x g durante 15 min a 25 °C. O sobrenadante (0,5 mL) foi misturado com 0,75 mL de solução de bipyridina (10g de bipyridina, 10ml de ácido tioglicólico em 1000 ml de água destilada). Logo após, foi feita a leitura da absorbância em 519 nm e os valores foram transformados em concentração de ácido fítico pelo uso de uma curva padrão construída a partir de soluções de diferentes concentrações de fitato de sódio.

## **4.2. EXTRAÇÃO E ATIVIDADE DE FITASE**

Para preparação de extrato enzimático para análise de fitase, grãos de soja foram moídos e a 50mg de farinha de soja foram adicionados 1,5 mL de tampão de extração Tris-HCl 0,02 M (pH 7,6) contendo 0,1% Triton X-100. A mistura foi homogeneizada e então centrifugada às 12.000 x g por 30 min, a 4°C.

A atividade de fitase foi determinada conforme Lolas & Markakis (1977). Em tubo de ensaio contendo 0,2 mL de tampão acetato de sódio 0,6 M, pH 5,3, 0,15 mL de fitato de sódio 8 mM, pH 5,3, e 0,65 mL de água, foi adicionado 0,2 mL do extrato bruto contendo a fitase. A incubação foi realizada em banho-maria a 50°C por 30 minutos, e a reação paralisada pela adição de ácido tricloroacético até concentração final de 0,7 M. Em seguida, a solução foi centrifugada por 5min a 13000g e o fósforo inorgânico determinado no sobrenadante, de acordo Heinonen & Lahti (1981). Uma unidade internacional de atividade de fitase (1 U) foi definida como sendo a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de fósforo inorgânico por minuto, nas condições de ensaio.

## **4.3. EXTRAÇÃO E ATIVIDADE DA MIO-INOSITOL-3-FOSFATO SÍNTASE (MIPS)**

Os grãos de soja foram triturados e ao pó (200 mg) foi adicionado 1ml de Tampão Tris-HCl 30 mM (pH 7.5) contendo 1 mM de Ditríitol, 1 mM de ácido ascórbico, 1 mM de EDTA- $\text{Na}_2$ , 6 mg de Polivinilpropenol 40 insolúvel e 1 mM de metil fenil sulfonil fluoreto (PMSF). As amostras foram centrifugadas a 20.000 x g por 25 min, e o sobrenadante clarificado foi utilizado para determinação da atividade da enzima MIPS.

O ensaio para a atividade de MIPS continha extrato bruto (200  $\mu$ L), 200  $\mu$ L de D-glicose 6-fosfato 5 mM e 100  $\mu$ L de  $\text{NAD}^+$  5 mM. A mistura de reação foi incubada por 1,5 horas, a 37°C, e interrompida com adição de 200  $\mu$ L de ácido tricloroacético 20% (p/v). As proteínas precipitadas foram removidas por centrifugação. O sobrenadante (500  $\mu$ L) foi incubado por 1,5 h com 750  $\mu$ L de

$\text{NaIO}_4$  0,2 M. Para remover o excesso de  $\text{NaIO}_4$  foi adicionado ao sobrenadante 1 mL de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1 M. A quantificação de inositol monofosfato no sobrenadante foi realizada pela adição de 2 ml da mistura de reagentes [0,4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3 M, 0,4 mL de molibdato de amônio 2,5% (p/v), 0,8 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  e 0,4 mL de ácido ascórbico 10%, (p/v)] e a mistura foi incubada a 37°C por 1,5 horas. Foi realizada a medida da absorbância a 660nm e as unidades de enzima foram calculadas utilizando uma curva padrão com mio-inositol fosfato de 0,4 a 2 mM (Coelho et al., 2007).

#### **4.4 ANÁLISE DE AÇÚCARES**

As concentrações de sacarose, rafinose e estaquiose foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência. A extração dos oligossacarídeos das sementes de soja foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Guimarães et al (2001). As sementes foram moídas e pesados cerca de 30 mg de farinha, as quais foram utilizadas para o processo de extração dos oligossacarídeos. A fração óleo presente na farinha foi retirada por 3 extrações sucessivas com 1,0 mL de éter de petróleo a 42 °C por 5 min. Três etapas sucessivas de tratamento com etanol 80 % a 100 °C por 5 min foram usadas para extrair os oligossacarídeos da farinha desengordurada. Após cada extração com etanol 80 % a mistura foi centrifugada em centrífuga do tipo Eppendorff 5415C, 14.000 rpm, por 5 min. O extrato alcoólico total obtido foi evaporado em estufa a 50 °C, e os oligossacarídeos ressuspensos em 1,0 mL de etanol 80 % e congelados a -20°C. Essa solução foi submetida à centrifugação por 10 min e filtrada em filtro Milipore de 0,45 micra de diâmetro. O filtrado foi analisado em HPLC.

Para quantificação dos oligossacarídeos, inicialmente foi feita uma padronização do método. A partir de uma solução estoque contendo mistura dos açúcares (frutose, sacarose, rafinose e estaquiose) nas concentrações de 4, 4, 8 e 8 (p/v), respectivamente. Cada solução foi injetada no cromatográfico para obtenção das curvas, correlacionando a área do pico com a concentração do açúcar na solução. As equações foram obtidas por regressão linear.

Os RFOS extraídos foram analisados por HPLC em cromatógrafo Shimadzu série 10A, equipado com detector de índice de refração, uma coluna em aço inox (25 X 0,465 cm) contendo na fase estacionária o grupo aminopropil (-NH<sub>2</sub>). A mistura acetonitrila-água (80:20) em condições isocráticas foi a fase móvel. As análises foram realizadas a 35 °C sob o fluxo de 1 mL/min e todo o processo foi controlado por um computador acoplado ao sistema.

Um volume de 20 µL de cada amostra foi injetado no cromatógrafo e cada açúcar presente foi identificado e quantificado por comparação com os tempos de retenção e concentrações dos açúcares nas soluções padrão.

#### **4.5 ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS**

O conteúdo de cada ácido graxo presente no óleo das sementes de soja foi determinado por cromatografia gasosa. Aproximadamente 20 mg de semente de soja moída foram colocadas em tubos de rosca, e a cada amostra foi adicionado 1 ml de hexano, sendo a mistura mantida a 4 °C por cerca de 16 horas, sob atmosfera de N<sub>2</sub>. Após esse tempo, a solução de lipídios e hexano foi transferida para outro tubo, e o solvente evaporado por borbulhamento de N<sub>2</sub>. Para obtenção dos ésteres metílicos, foi utilizada a metodologia descrita por Jham et al. (1982).

Após a derivatização, alíquotas de 10 µl foram injetadas em cromatógrafo a gás GC-17A marca SHIMADZU. Foram utilizadas coluna Carbowax (30 m x 0,32 mm) e temperaturas de 225°C para a coluna, 245°C para o injetor e 280°C para o detector. O gás de arraste foi o nitrogênio, com o fluxo de 1,1 ml/min. Cada ácido graxo presente foi identificado e quantificado por comparação com os tempos de retenção e concentrações dos ácidos graxos nas soluções padrão.

#### **4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo sistema F, para testar as hipóteses dos efeitos principais e da interação entre os fatores. Quando o efeito da interação foi significativo, os graus de liberdade foram

desdobrados, ajustando-se curvas de regressão, através do programa SAS 9.1.3 (2007). O teste de Tukey também foi utilizado para comparação entre médias.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises dos conteúdos médios de ácido fítico, estaquiose, rafinose, oligossacarídeos de rafinose (RFOs) (rafinose + estaquiose), sacarose, ácidos graxos, e das atividades enzimáticas de fitase e mio-inositol-1-fosfato sintase (MIPS), estão dispostos no Anexo I. O resultado da análise de variância está apresentado nas tabelas 1, 2 e 3.

De acordo dos resultados obtidos, foi verificado que à medida que as doses de fósforo empregadas como nutriente na adubação do solo foram aumentadas, houve também aumento no tamanho das plantas de soja e no número de vagens (Figura 5). Quando não houve aplicação de fósforo no solo (0 ppm) as plantas não se desenvolveram e cada planta produziu apenas 1 vagem, com uma semente cada, o que inviabilizou o uso desta dose como fonte de dados no experimento. Nas doses de 15, 30 e 60 ppm de fósforo no solo as plantas produziram de 10 a 80 g de sementes, a partir da dose de 120 ppm até 960 ppm houve aumento da produção variando de 110g a 240g ,respectivamente.



**Figura 5** - Plantas de soja utilizadas no experimento, apresentadas da esquerda para direita em ordem crescente de doses de fósforo aplicadas no solo.

**Tabela 1** – Resumo da análise de variância dos dados obtidos nas determinações dos teores de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfolipídios totais, submetidos a tratamentos com doses de fósforo diferentes e temperaturas diferentes.

Quadrados médios						
Fontes de variação	Grau de liberdade	Teor de ácido fítico	atividade de fitase 40dias	atividadede fitase soja madura	Atividade MIPS 40dias	Atividade MIPS soja Madura
cultivar	1	0.02390344*	0.5018025*	1.967268n.s	0.7583244E-01*	0.9557264E-03*
temperatura	1	0.12520296*	0.4014694E-01*	0.2138546n.s	0.2029708E-01*	0.1140264E-02*
Doses de fósforo	6	2.11482887*	0.1915665E-01*	0.7384114n.s	0.2845348*	0.2046072*
C*T	1	0.00498344*	0.6133213*	0.8976252n.s	0.1520687E-01*	0.1054536E-01*
C*P	6	0.01235580*	0.3045194E-01*	0.9590249n.s	0.4291572E-01*	0.2906466E-02*
P*T	6	00.0582471*	0.4757457E-01*	0.9706277n.s	0.2671291E-01*	0.2894345E-01*
C*P*T	6	0.00652225*	0.2003262E-01*	1.261107n.s	0.6015802E-02*	0.2734327E-01*
CV(%)		5.042733	7.7439	98.6104	7.97	4.4032

**Tabela 2** – Resumo da análise de variância dos dados obtidos nas determinações dos teores de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfolipídios totais, submetidos a tratamentos com doses de fósforo diferentes e temperaturas diferentes.

Quadrados médios						
Fontes de variação	Grau de liberdade	Teor de palmítico	Teor de esteárico	Teor de oléico	Teor de linoléico	Teor de linolenico
cultivar	1	7.004555*	3.146000*	552.3538*	466.8623*	7.7830108*
temperatura	1	2.856725*	1.349659*	258.6621*	31.65686*	58.15930*
Doses de fósforo	6	0.2507868*	0.1542808*	333.2564*	291.9223*	0.8949604*
C*T	1	0.1499960	0.9577577E-01ns	5.6392088	3.773515*	0.2826108n
C*P	6	0.5199535*	0.3546621E-01*	1.664626n	1.539951n	0.1400065n
P*T	6	0.925971*	0.9470252*	98.63042*	45.76583*	2.3926038
C*P*T	6	0.2677214*	0.9369923E-01*	24.12498*	15.15222*	0.4209266*
CV(%)		1.8044	7.6270	4.9942	1.6543	4.2377

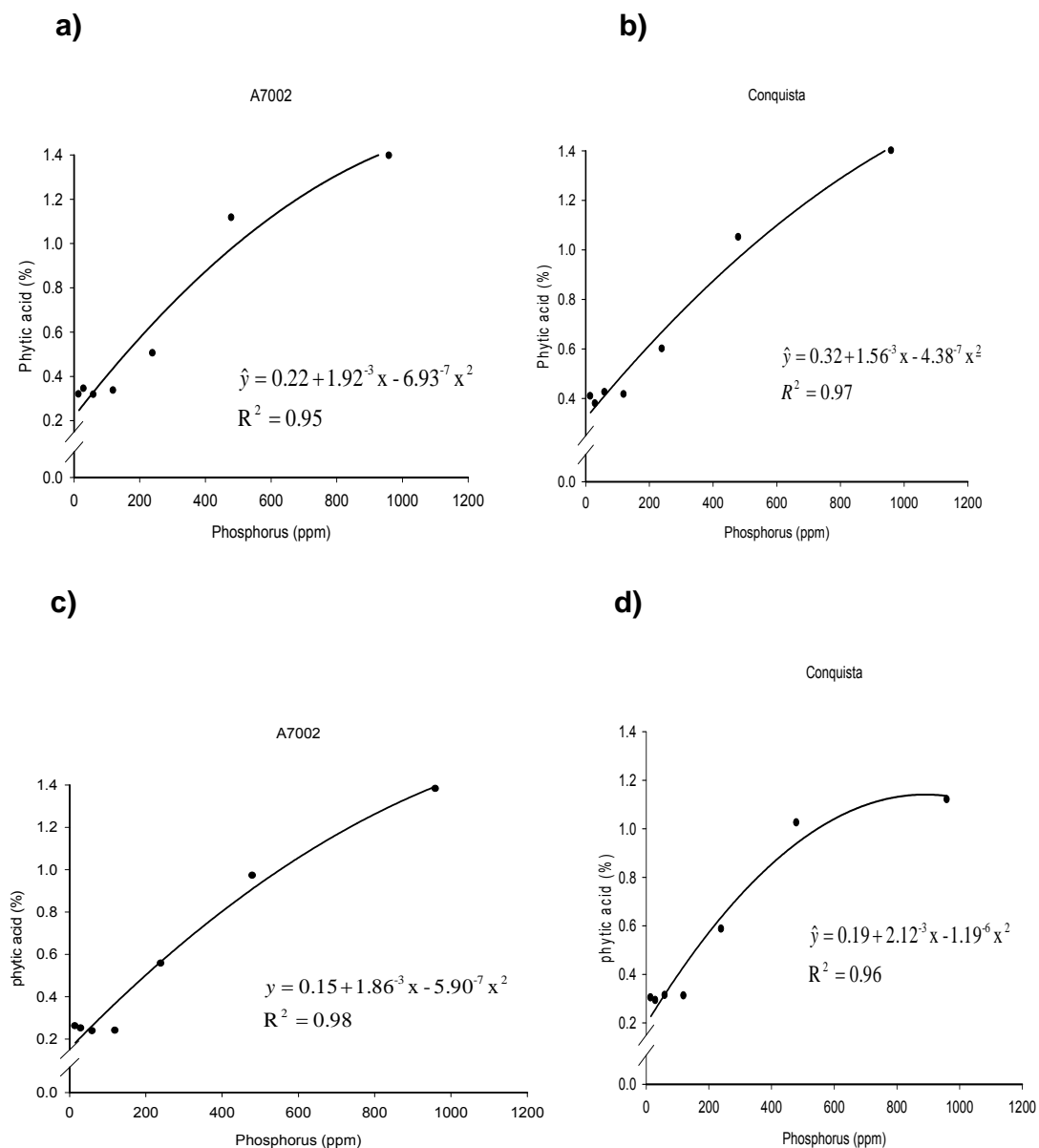
**Tabela 3** –Resumo da análise de variância dos dados obtidos nas determinações dos teores de oligossacarídeos de Rafinose, Estaquiase, rafinose, sacarose, submetidos a tratamentos com doses de fósforo diferentes e temperaturas diferentes.

Fontes de variação	Grau de liberdade	Quadrados médios			
		Teor de RFOs	Teor Estaquiase	Teor Rafinose	Teor Sacarose
cultivar	1	7.004555*	3.146000*	552.3538*	466.8623*
temperatura	1	2.856725*	1.349659*	258.6621*	31.65686*
Doses de fósforo	6	0.2507868*	0.1542808*	333.2564*	291.9223*
C*T	1	0.1499960	0.9577577E-01ns	5.6392088	3.773515*
C*P	6	0.5199535*	0.3546621E-01*	1.664626n	1.539951n
P*T	6	0.925971*	0.9470252*	98.63042*	45.76583*
C*P*T	6	0.2677214*	0.9369923E-01*	24.12498*	15.15222*
CV(%)		1.8044	7.6270	4.9942	1.6543

Os resultados de cada variável, submetido a análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade, revelou efeito significativo da interação tripla entre os fatores temperatura (T), cultivar (C) e doses de fósforo (P) (TxCxP) sobre as variáveis ácido fítico; estaquiase; RFOs; ácido palmítico; ácido oléico; ácido linoléico; ácido linolênico; atividade de mio-inositol fosfato sintase (40 dias); atividade de mio-inositol fosfato sintase em soja madura e atividade de fitase em soja madura, fosfolipídios totais, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina (Anexo I). As concentrações de sacarose e ácido esteárico sofreram influencia da interação entre temperatura e cultivar, ácido esteárico também sofreu efeito da interação entre temperatura e dose de fósforo; a concentração de rafinose sofreu efeito das variáveis estudadas (temperatura, cultivar e doses de fósforo) de forma independente a 5% de probabilidade.

## 5.1 - ÁCIDO FÍTICO

Houve interação tripla entre temperatura (35-21°C e 30-15°C), cultivar (A7002 e Conquista) e as doses de fósforo do solo (15, 30, 60, 120, 240, 480 e 960 ppm) sobre a concentração de ácido fítico nas sementes de soja. Estes resultados indicam que esses três fatores influenciaram no conteúdo de ácido fítico, como observado na Figura 6.



**Figura 6** – Concentração de ácido fítico nas sementes de duas cultivares de soja cultivadas em diferentes temperaturas e em função de doses de fósforo aplicadas no solo. **a)** A7002 (35°C-21°C); **b)** Conquista (35°C-21°C); **c)** A7002 (30°C-15°C); **d)** Conquista (30°C-15°C).

Em sementes de plantas de ambos os cultivares, A7002 e Conquista, crescidas nas duas faixas de temperatura, foi observado aumento na concentração de ácido fítico nas sementes, a partir da dose de 240 ppm de fósforo aplicada no solo. Em doses mais baixas de fósforo (15, 30, 60 e 120 ppm), os valores de ácido fítico foram semelhantes para todas as condições

analisadas e variaram entre 0,2 e 0,4 %. Na dose de fósforo de 240 ppm a concentração de ácido fítico ainda foi bastante reduzida, permanecendo entre 0,4 e 0,6%. Em doses de 480 e 960 ppm, a concentração de ácido fítico variou entre aproximadamente 1,0 e 1,4%, equivalente aquela encontrada em grãos de soja cultivados em condições normais de adubação fosfatada. A soja em condições normais de cultivo apresenta em média de 1-1,5% de ácido fítico (Rackis, 1974). Neste experimento, os conteúdos de ácido fítico variaram de 0,26%, para as doses mais baixas de fósforo, a 1,4%, determinado na soja cultivada na dose mais alta de fósforo. Ambas as cultivares apresentaram maior concentração de ácido fítico quando crescidas na temperatura de (35/21°C) em todas as doses de fósforo utilizadas, variando de 0,316 a 1,4% de ácido fítico, enquanto quando crescidas á (30/15°C) a concentração de ácido fítico variou de 0,26 a 1,38%.

Modi & Asanzi (2008), observaram que em diferentes temperaturas o teor de ácido fítico era aumentado à medida de se aumentava a dose de fósforo usada como fertilizante.

O fósforo fítico representa entre 65 a 85% do fósforo total das sementes (Raboy, 2002). Uma fração substancial de todo o fósforo absorvido pelas plantas das culturas do solo é translocado a semente e sintetizados em ácido fítico. Durante germinação, os fitatos são degradadas por fitases endógenas liberando fósforo, mio-inositol (inositol) e minerais para uso pelas mudas em crescimento. Estes compostos podem servir como doadores de fósforo para a regeneração da ATP a partir de ADP, necessária para o metabolismo básico em primeiros estágios de germinação das sementes, antes da reconstituição da integridade da membrana mitocondrial (Raboy 2001).

Israel et al., (2011), estudaram as diferentes concentrações de fitato, sacarose , inositol e oligossacarídeos de rafinose em plantas de soja que apresentavam baixo teor de ácido fítico e teor normal, quando submetidas a baixa suplementação de fósforo e a suplementação normal. Eles observaram que o teor de ácido fítico diminui em ambas as plantas com submetidos à deficiência de fósforo.

Raboy (1987), observou que sementes com um teor reduzido de ácido fítico (0.5%) germinavam bem e o crescimento das plantas era quase tão vigoroso como de plantas com teor de ácido fítico normal de cerca de 1.5%. O que mostra que essas plantas com baixos teores de ácido fítico podem ser potencialmente utilizadas, uma vez que o ácido fítico é considerado um fator antinutricional e sua redução nos grãos de soja é uma das metas de alguns programas de melhoramento de soja para uso na alimentação.

Os resultados deste estudo reforçam que o uso de uma adubação fosfatada aliada a um melhor entendimento do genótipo utilizado e condições de plantio, podem ser utilizados como um eficiente método para se produzir sementes de soja com diferentes teores de ácido fítico

## 5.2- FITASE

A atividade da enzima fitase foi observada em dois estágios de desenvolvimento do grão de soja, 40 dias após a floração e no grão maduro. A atividade de fitase nos grãos coletados 40 dias após a floração e em sementes maduras sofreu efeito da interação tripla entre as variáveis estudadas (temperatura x cultivar x doses de fósforo). O efeito da interação entre os fatores na atividade de Fitase em sementes colhidas 40 dias após o florescimento não pode ser explicado por análise de regressão.

A atividade de fitase em sementes maduras variou de 0.55 a 0.82 U/g na cultivar A7002 e de 0.84 a 1 U/g na cultivar Conquista na temperatura de 35/21°C. Na temperatura de 30/15°C na cultivar A 7002 a atividade de fitase variou entre 0.78 a 0.99 U/g e na cultivar Conquista variou de 0.85 a 1.07 U/g (figura 8).

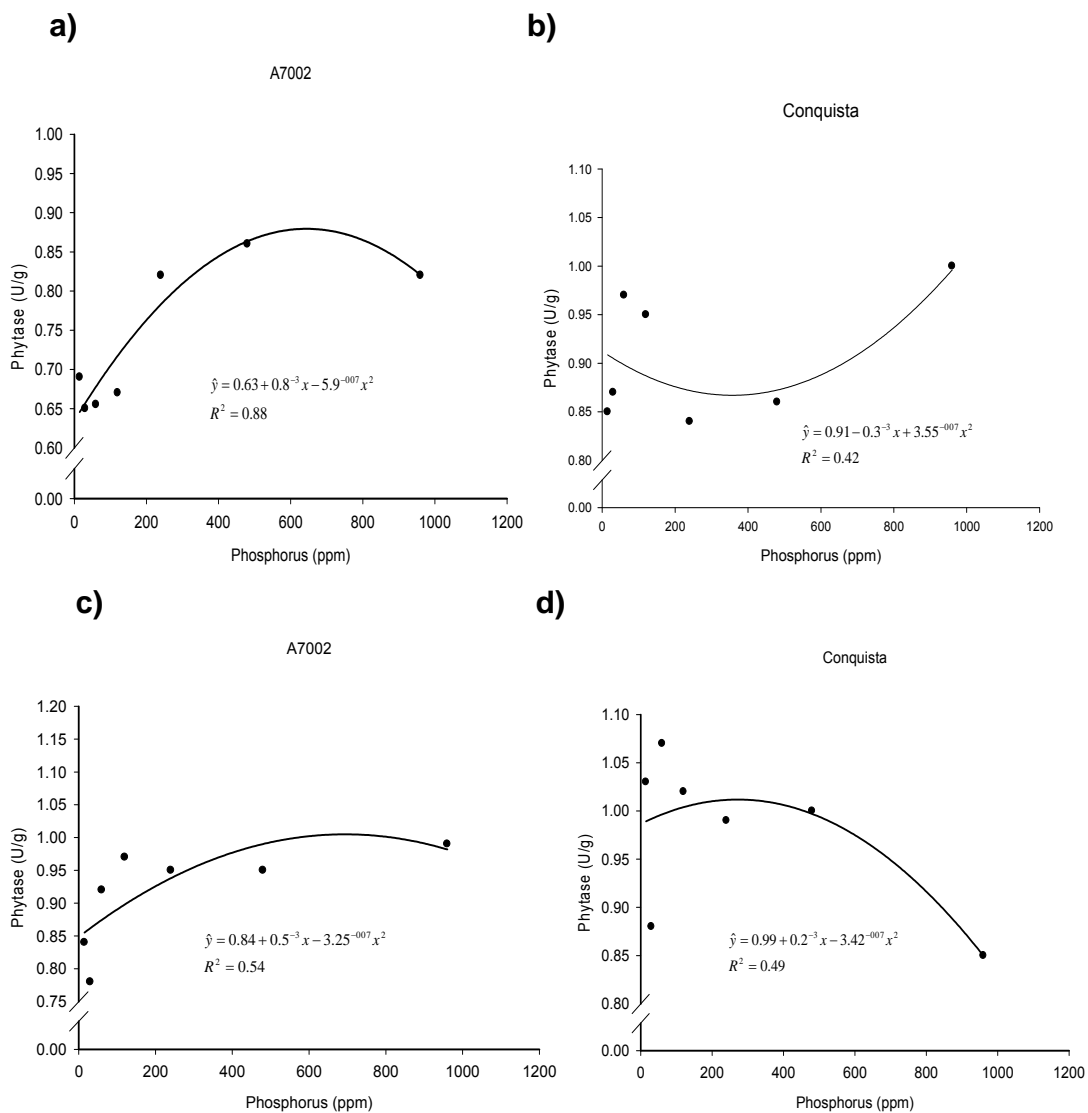
As Fitases são fosfatases ácidas envolvidas na hidrólise do fitato (mio-inositol hexafosfato). A Fitase é extensivamente estudada em sementes, onde fitato é uma principal forma de armazenamento de fósforo.

Várias espécies de plantas cultivadas em solução nutritiva ou areia com fitato como única fonte de fósforo pode extrair fósforo suficiente para o crescimento normal, devido a atividade da enzima fitase, que catalisa a reação de hidrólise do ácido fítico liberando então o fósforo (Islam, Mandal & Osman, 1979; Tarafdar & Claassen 1988).

Algumas plantas como o lírio branco aumentam a secreção dessas enzimas, quando submetidas a condições de deficiência de fósforo (Adams & Pate, 1992). Estes dados sugerem um papel importante para fitases na aquisição de fósforo.

Hayes et al., (2000) observaram a atividade de fitase em raízes de plantas que germinaram em areia com deficiência de fósforo e com adubação normal, eles concluíram que as plantas germinadas em ambientes com deficiência de fósforo a atividade de fitase era maior que as que germinaram em ambientes com adubação normal, variando de 0,13 a 1.7 U.g<sup>-1</sup>.

Esses dados da literatura nos levam a sugerir que a atividade de fitase é efetiva durante a germinação e talvez se sua atividade estivesse sido medida durante a germinação, encontraríamos resultados mais conclusivos.



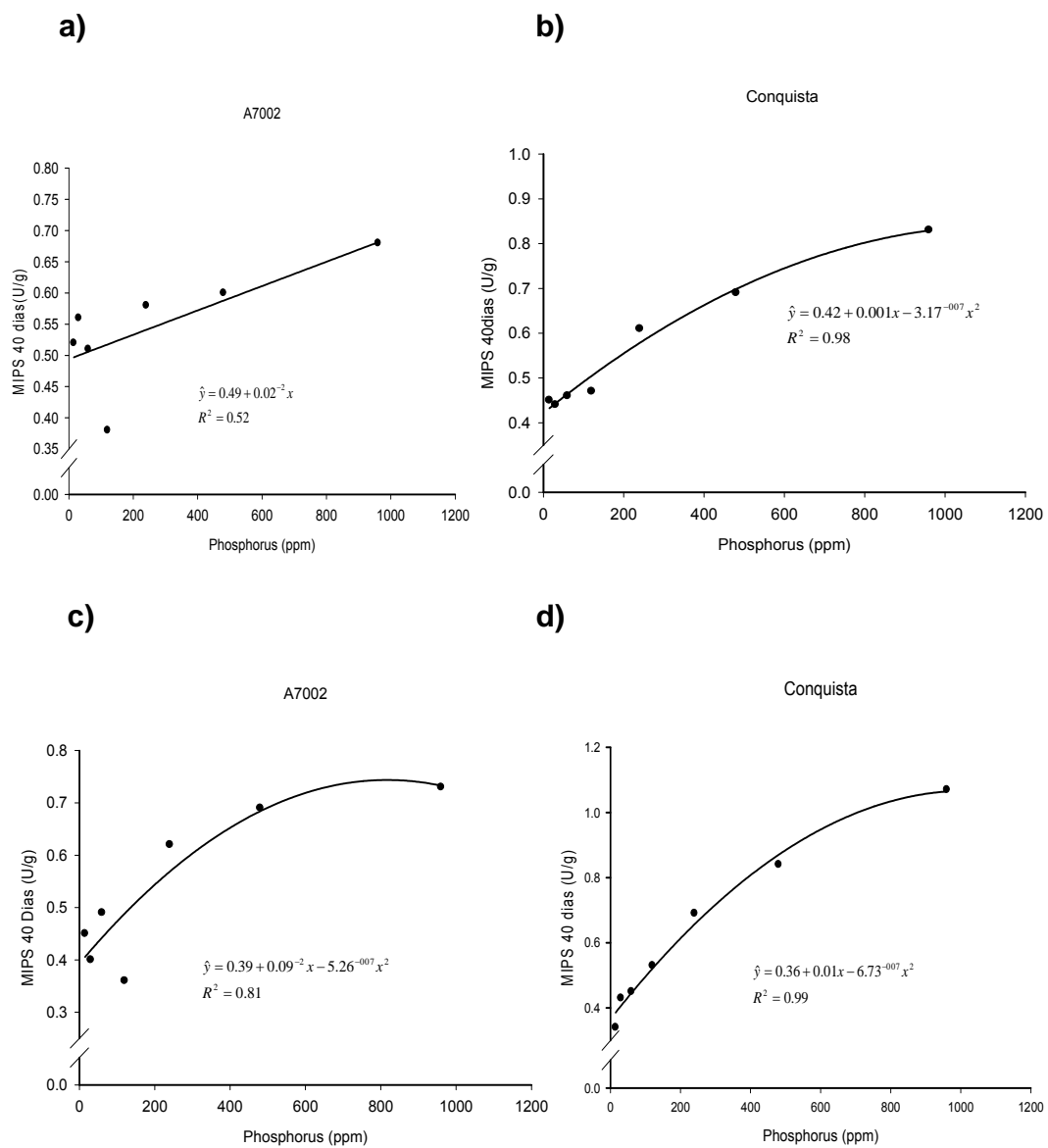
**Figura 7** – Atividade de fitase nas sementes maduras de duas cultivares de soja cultivadas em diferentes temperaturas e doses de fósforo aplicadas no solo. **a)** A7002 (35°C-21°C); **b)** Conquista (35°C-21°C); **c)** A7002 (30°C-15°C); **d)** Conquista (30°C-15°C).

### 5.3 MIO-INOSITOL-3- FOSFATO SINTASE (MIPS)

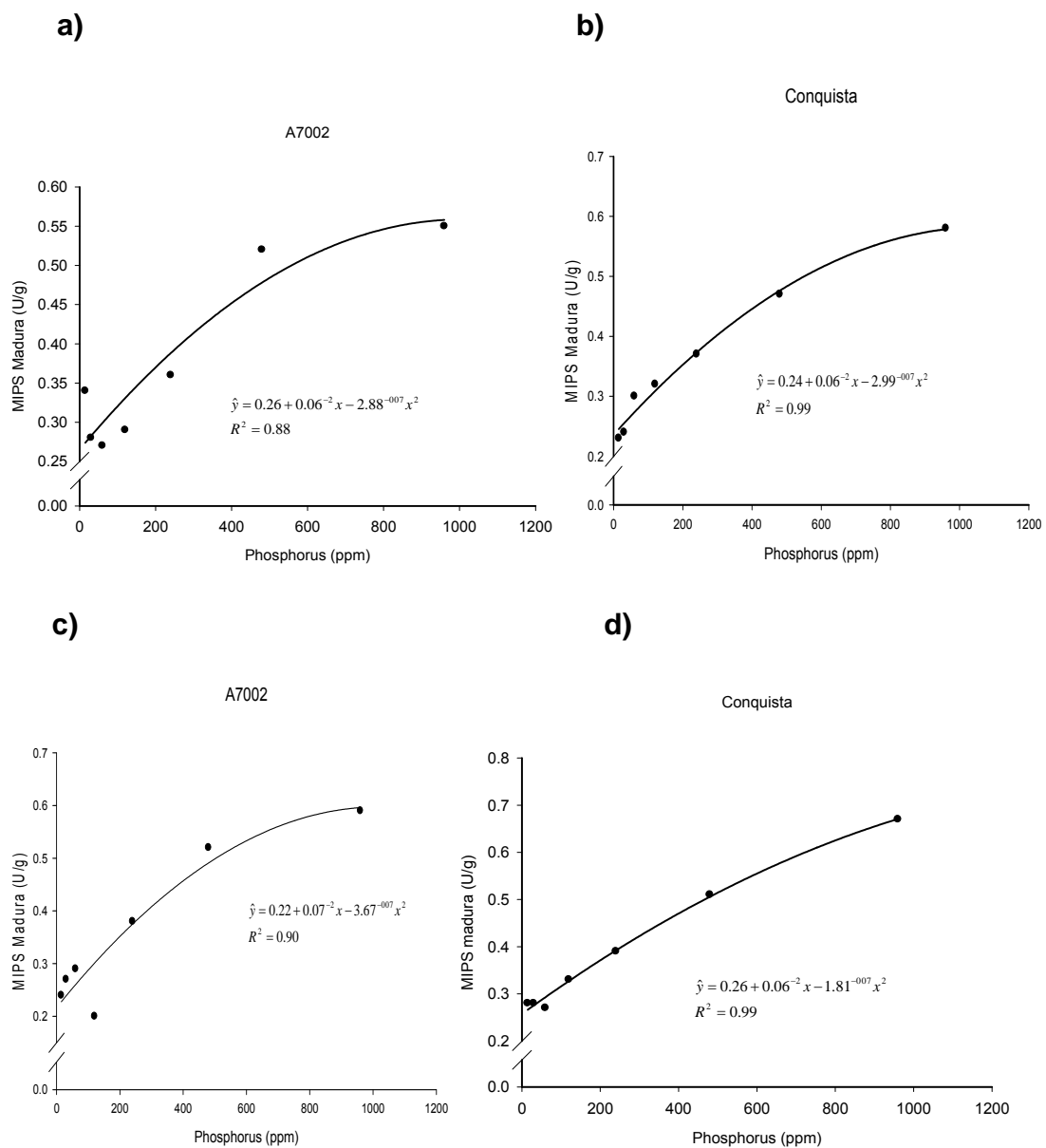
A atividade de MIPS sofreu efeito da interação tripla entre as variáveis estudadas nos dois estágios de desenvolvimento (40 dias após a floração e semente madura) estudados (tabela 1).

Em ambos os estágios de desenvolvimento, 40 dias após floração e semente madura, nas duas faixas de temperatura analisadas, foi observado aumento na atividade de MIPS nas sementes, a partir da dose de 240 ppm de fósforo aplicada no solo. A atividade da MIPS 40 dias após a floração em doses mais baixas de fósforo (15, 30, 60 e 120 ppm), variaram entre 0,34 e 0,53 U/g. Em doses de 240, 480 e 960 ppm, a atividade de MIPS variou entre aproximadamente 0,51 e 1,07 U/g (figuras 6 e 7). Como pode ser observado que a atividade da enzima MIPS foi maior no início do desenvolvimento da semente do que na semente madura. Sugerindo que a produção de mio-inositol é maior no desenvolvimento da semente do que na semente madura.

O comportamento da atividade de mio-inositol-3-fosfato sintase, perante as variáveis temperatura e doses de fósforo (figuras 6 e 7) foi semelhante ao comportamento da concentração de ácido fítico diante dessa mesmas variáveis ( figura 6), o que nos leva a sugerir que o aumento na concentração de ácido fítico está ligado ao aumento da atividade da enzima MIPS, indicando que a atividade específica de MIPS em sementes representa uma etapa limitante na síntese de ácido fítico, como um ponto de controle importante que regula a rota metabólica.



**Figura 8** – Atividade de MIPS nas sementes colhidas 40 dias após a floração de duas cultivares de soja cultivadas em diferentes temperaturas e doses de fósforo aplicadas no solo. **a)** A7002 (35°C-21°C); **b)** Conquista (35°C-21°C); **c)** A7002 (30°C-15°C); **d)** Conquista (30°C-15°C).



**Figura 9** – Atividade de MIPS nas sementes Maduras de duas cultivares de soja cultivadas em diferentes temperaturas e doses de fósforo aplicadas no solo. **a)** A7002 (35°C-21°C); **b)** Conquista (35°C-21°C); **c)** A7002 (30°C-15°C); **d)** Conquista (30°C-15°C).

## **5.4 – Açúcares**

Os açúcares solúveis da soja basicamente (99%) são constituídos de sacarose, estaquiose e rafinose. Neste trabalho identificamos o efeito da temperatura e de doses de fósforo na concentração dos açúcares de forma individual, nos grãos de soja.

### **5.4.1 Sacarose**

A concentração de sacarose nos grãos de plantas crescidos em menor concentração de fósforo foi significativamente maior do que nos de plantas crescidas em concentrações maiores.

A cultivar A7002 apresentou variação no conteúdo de sacarose de 3,00 a 3,83 % e 5,07 a 5,85% e a cultivar Conquista uma variação de 3,04 a 3,96% e 4,34 a 5,00% nas temperaturas de 35/21°C e 30/15°C, respectivamente. Esses resultados indicam que a concentração de sacarose é maior quando a soja é cultivada em temperaturas mais altas e que a cultivar A7002 apresenta maior concentração de sacarose que a cultivar conquista. Houve declínio na concentração de sacarose, variando de 3,84% a 4,65%, a medida que aumentou as doses de fósforo (tabela 4). A concentração de sacarose foi equivalente aquela encontrada em grãos de soja cultivados em condições normais de adubação fosfatada que varia de 2,5 a 8,0% de sacarose.

As plantas desenvolveram mecanismos rigidamente controlados que permite a coordenação da homeostase fósforo com a fotossíntese (Wissuwa et al., 2005). Para manter a homeostase de fósforo e suprir a demanda metabólica, a expressão de alguns transportadores de alta afinidade de fosfato (por exemplo, PHT2) parece ser regulada e induzida pela oferta de sacarose (Lejay et al., 2003). Nos últimos anos, um progresso substancial foi feito para entender a interligação entre a regulação do fósforo e os açúcares, especialmente o papel do açúcar no estabelecimento da resposta fisiológica, bioquímica e molecular a deficiência de fósforo em plantas (Hammond, 2008).

Tem sido demonstrado que plantas de tabaco cultivadas sob deficiência de fósforo possuem uma demanda de fotoassimilados reduzida, resultando na acumulação de carboidratos e diminuição na fotossíntese (Pieters et al., 2001). Segundo Morcuende et al. (2007) a repressão da fotossíntese pode ser uma resposta secundária ligada a menor demanda de fotoassimilados e a maiores níveis de açúcar durante a limitação fósforo.

Acclimação de plantas para a deficiência de fósforo é um processo altamente coordenados, com uma extensa re-programação das vias bioquímicas e metabólicas. Neste processo, a sacarose, principal fonte de carbono (C) de brotos e de raízes, também atua como um mensageiro secundário para enviar para raiz sinalização do nível de fósforo para regular a expressão gênica e absorção de fósforo inorgânico (Liu et al., 2005)

**Tabela 4-** Concentração de sacarose (%) em relação a aplicação de fósforo no solo.

Doses de fósforo (ppm)	Médias
15	4,6475 A
30	4,5267 A
60	4,3967 A
120	4,1758 AB
240	4,1492 AB
480	4,1225 AB
960	3,8392 B

MÉDIAS SEGUIDAS POR MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI A 5% DE PROBABILIDADE PELO TESTE

TUKEY

## 5.4.2 Rafinose

A concentração de rafinose foi influenciada pelas três variáveis analisadas (temperatura, cultivar, doses de fósforo), mas de forma independente, ou seja, não houve interação significativa entre as variáveis.

A concentração de rafinose variou de 0,84 a 1,34 na cultivar A7002 cultivada na temperatura de 35/21°C e entre 0,71 e 1,03% quando cultivada a temperatura de 30/15°C. Já na cultivar Conquista a concentração de rafinose variou de 0,83 a 1,18% (35/21°C) e 0,63 a 0,88% (30/15°C).

Assim podemos observar que a cultivar A7002 apresentou maior concentração de rafinose, do que a cultivar conquista. E que o conteúdo de rafinose aumenta quando a soja é cultivada em temperatura mais alta. Essa diminuição do conteúdo de rafinose em temperaturas mais baixas pode estar associada ao aumento da concentração de estaquiose em temperaturas mais baixas, uma vez que a estaquiose é sintetizada a partir da rafinose e de um resíduo de galactose doado pelo galactinol, em uma reação catalisada pela estaquiose sintase.

Em relação a doses de fósforo usadas nos tratamentos a medida que se aumenta a dose de fósforo no solo há uma diminuição na concentração de rafinose, em concentrações menores de fósforo aplicadas ao solo (15, 30, 60, 120 ppm) a concentração de rafinose varia de 0.99 a 1.08 % e em concentrações maiores (240, 480 e 960 ppm) o conteúdo de rafinose varia de 0,86 a 0,87%. (tabela 5) Os valores médios de concentração de rafinose encontrados foram equivalentes aos encontrados em sementes de soja cultivada em condições normais de adubação fosfatada, que variam de 0,1 a 1,1 % (Hymowitz et al., 1972).

**Tabela 5** - Variação da Concentração de rafinose (%) em relação a dose de fósforo aplicada ao solo.

Doses de fósforo	média
15	1,0842A
30	1,0675A
60	1,0392AB
120	0,9967AB
240	0,8708B
480	0,8667B
960	0,8608B

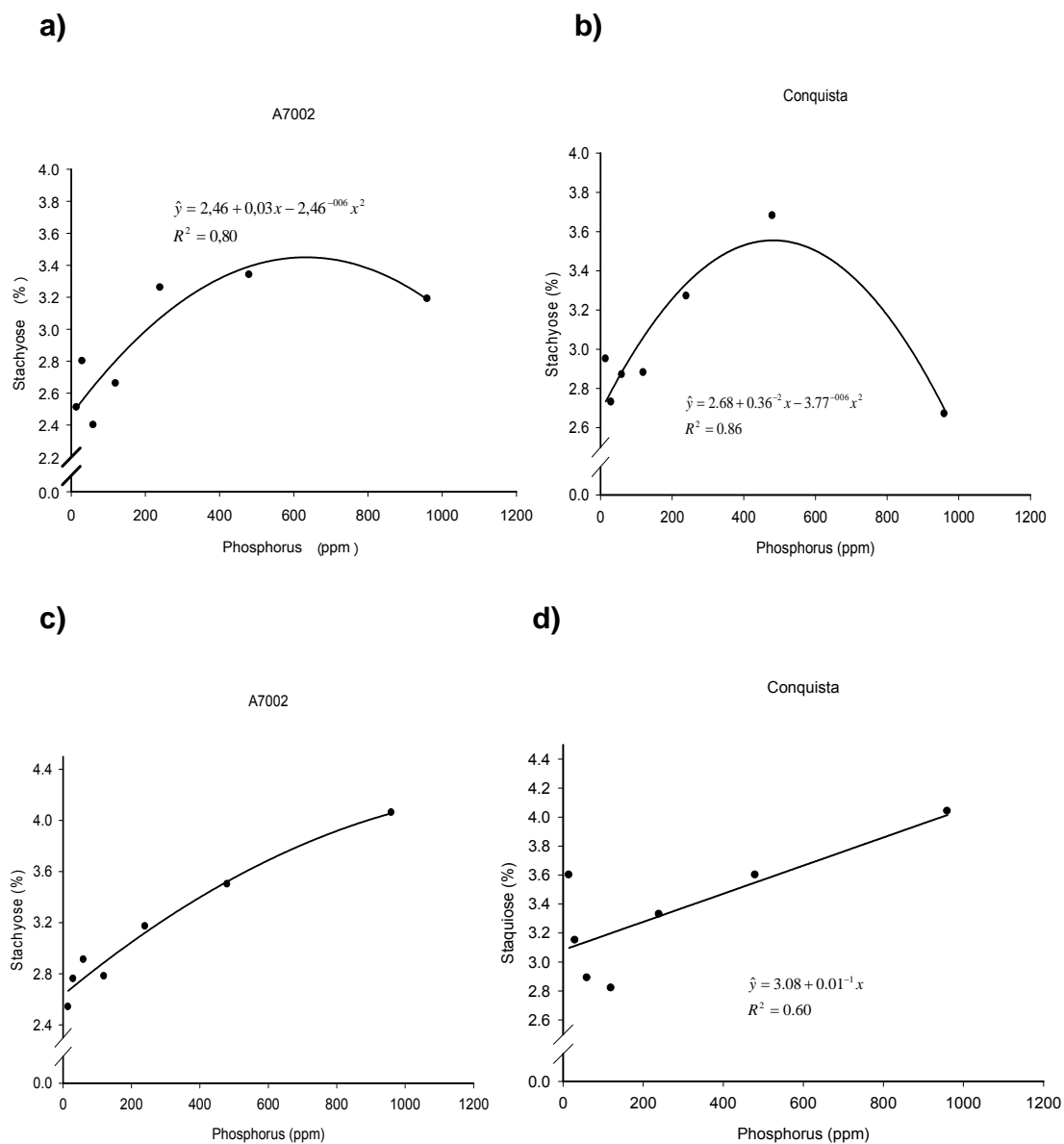
MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM ENTRE SI A 5% DE PROBALIDADE PELO TESTE TUKEY.

### 5.4.3 Estaquiose

A concentração de estaquiose sofreu efeito da interação tripla entre as variáveis estudadas (temperatura x cultivar x doses de fósforo). Essa interação é apresentada na através da diferentes equações de regressão (figura 10).

Em ambos os cultivares, A7002 e Conquista, na temperatura de (30/15°C) , foi observado aumento na concentração de estaquiose nas sementes, a partir da dose de 240 ppm de fósforo aplicada no solo. Em doses mais baixas de fósforo (15, 30, 60 e 120 ppm), os valores de estaquiose foram semelhantes para a condições analisadas e variaram entre 2,54 e 3,17 %. Na dose de fósforo de 240 ppm a concentração estaquiose ainda foi bastante reduzida, permanecendo em 2,78% (A7002) e 3,33 (Conquista). Em doses de 480 e 960 ppm, a concentração de estaquiose variou entre 3,50 a 4,06%, equivalente aquela encontrada em grãos de soja cultivados em condições normais de adubação fosfatada. A soja em condições normais de cultivo apresenta em média de 1,4 a 4,1% de estaquiose (Oliveira et al., 2010).

Na temperatura de 35/21°C, os dois cultivares também apresentaram comportamento semelhante, foi observado aumento na concentração de estaquiose nas sementes, a partir da dose de 240 ppm de fósforo aplicada no solo e uma queda na concentração na dose de 960 ppm de fósforo aplicado ao solo. Em doses mais baixas de fósforo (15, 30, 60 e 120 ppm), os valores de estaquiose foram semelhantes para as condições analisadas e variaram entre 2,51 e 2,88 %. Na dose de fósforo de 240 ppm a concentração estaquiose foi 3,26% (A7002) e 3,27 (Conquista), na dose de 480 ppm a concentração estaquiose foi 3,34% (A7002) e 3,68% (Conquista) e em 960 ppm, a concentração de estaquiose foi de 3,19% (A7002) e 2,67% (Conquista).



**Figura 10** – Concentração de estaquiase nas sementes duas cultivares de soja cultivadas em diferentes temperaturas e em função de doses de fósforo aplicadas no solo **a)** A7002 (35°C-21°C); **b)** Conquista (35°C-21°C); **c)** A7002 (30°C-15°C); **d)** Conquista (30°C-15°C).

#### 5.5.4 - OLIGOSSACARÍDIOS DE RAFINOSE (RFOS)

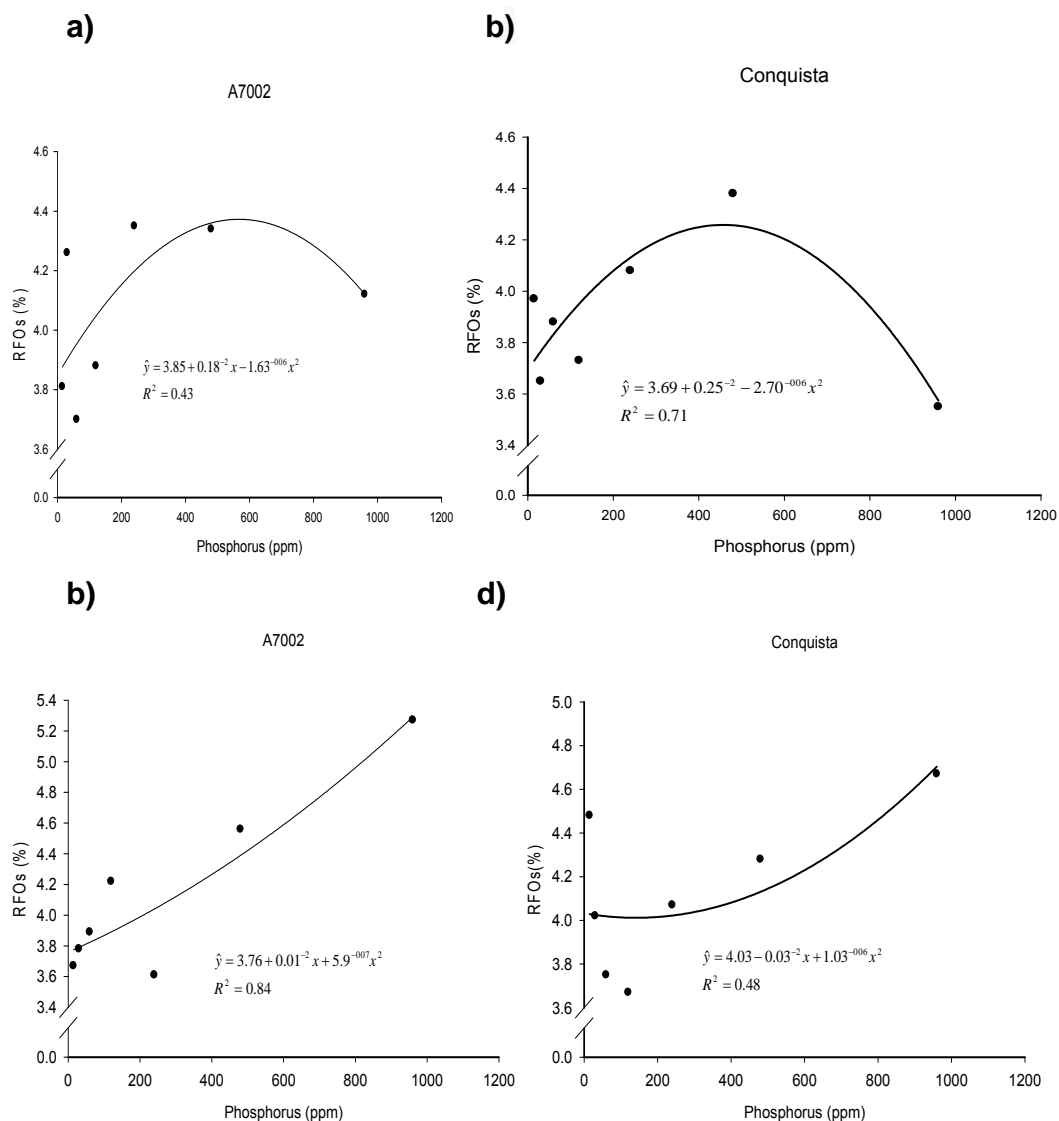
A concentração de oligossacarídeos de rafinose, somatório do conteúdo de rafinose e estaquiose, sofreu efeito da interação tripla entre as variáveis (cultivar, temperatura, doses de fósforo), ou seja, interação significativa.

A concentração de RFOs apresentou comportamento semelhante (Figura 11) ao comportamento apresentado pela concentração de estaquiose nas condições estabelecidas neste experimento. Fato este explicável por a estaquiose representar a maior fração dos RFOs. Em ambos os cultivares, A7002 e Conquista, na temperatura de (30/15°C), foi observado aumento na concentração de RFOs nas sementes, a partir da dose de 240 ppm de fósforo aplicada no solo. Em doses mais baixas de fósforo (15, 30, 60 e 120 ppm), os valores de estaquiose foram semelhantes para as condições analisadas e variaram entre 3,65 e 4,20 %. Na dose de fósforo de 240 ppm a concentração estaquiose ainda foi bastante reduzida, permanecendo em 2,78% (A7002) e 3,33 (Conquista). Em doses de 480 e 960 ppm, a concentração de estaquiose variou entre aproximadamente 3,50 a 4,06%, equivalente aquela encontrada em grãos de soja cultivados em condições normais de adubação fosfatada. A soja em condições normais de cultivo apresenta em média de 1,4 a 4,1% de estaquiose (Oliveira et al., 2010).

Na temperatura de 35/21°C, os dois cultivares também apresentaram comportamento semelhante, foi observado aumento na concentração de estaquiose nas sementes, a partir da dose de 240 ppm de fósforo aplicada no solo e uma queda na concentração na dose de 960 ppm de fósforo aplicado ao solo. Em doses mais baixas de fósforo (15, 30, 60 e 120 ppm), os valores de estaquiose foram semelhantes para as condições analisadas e variaram entre 2,51 e 2,88 %. Na dose de fósforo de 240 ppm a concentração estaquiose foi 3,26% (A7002) e 3,27 (Conquista), na dose de 480 ppm a concentração estaquiose foi 3,34% (A7002) e 3,68% (Conquista) e em 960 ppm, a concentração de estaquiose foi de 3,19% (A7002) e 2,67% (Conquista).

Na temperatura de 30/15°C ambas as cultivares (A7002 e conquista) apresentaram maior teor de RFOs na dose de fósforo de 960ppm. Já na temperatura de 35/21°C as cultivares apresentaram maior teor RFOs na dose de fósforo de 460 ppm. O que se pode observar é que em uma temperatura mais baixa com uma maior dose de fósforo o teor de RFOs aumenta (Figura 12).

Estes resultados sugerem que diferentes condições ambientais não só afetam a concentração RFOs, mas também a composição de cada RFOs em sementes. Górecki et al (1996) relataram apenas pequenas diferenças no conteúdo RFOs em sementes de lupin, crescidas em temperaturas diferentes. Mais recentemente, Hao et al (2010) relataram que a concentração de rafinose diminuiu, enquanto a concentração de sacarose aumentou em folhas de melão produzidas em temperatura mais baixa à noite 9 ° C (normal 15 °C).



**Figura 11** – Concentração de RFOs nas sementes de duas cultivares de soja cultivadas em diferentes temperaturas e em função de doses de fósforo aplicadas no solo. **a)** A7002 (35°C-21°C); **b)** Conquista (35°C-21°C); **c)** A7002 (30°C-15°C); **d)** Conquista (30°C-15°C).

Wolf et al. (1982) relataram que a temperatura tem um efeito maior sobre a concentração de sacarose do que a de oligossacarídeos de rafinose. Foi observado decréscimo de 56% na concentração de sacarose quando a temperatura foi aumentada de 18-33°C durante o dia e de 13-28 ° C durante a

noite. Estaquiose mostrou uma ligeira redução com aumento da temperatura, enquanto rafinose permaneceu inalterada.

Siebeneicher et al., (2000), observaram uma aumento significativo no teor de açúcares solúveis, principalmente sacarose, em plantas de feijão crescidas sob baixas temperatura (5°C).

Segundo Siebeneicher et al., (2000), a piruvato quinase, a fosfrutocinase e a fosfotransferase, enzimas da glicólise que são termossensíveis, podem reduzir sua atividade durante o processo de aclimatização a temperaturas mais baixas, para posterior ajuste do metabolismo. Os açúcares crioprotetores mais encontrados em plantas são sacarose, rafinose e sorbitol, sendo a sacarose o mais encontrado (Guy,2000)

## **5.5 Ácidos graxos**

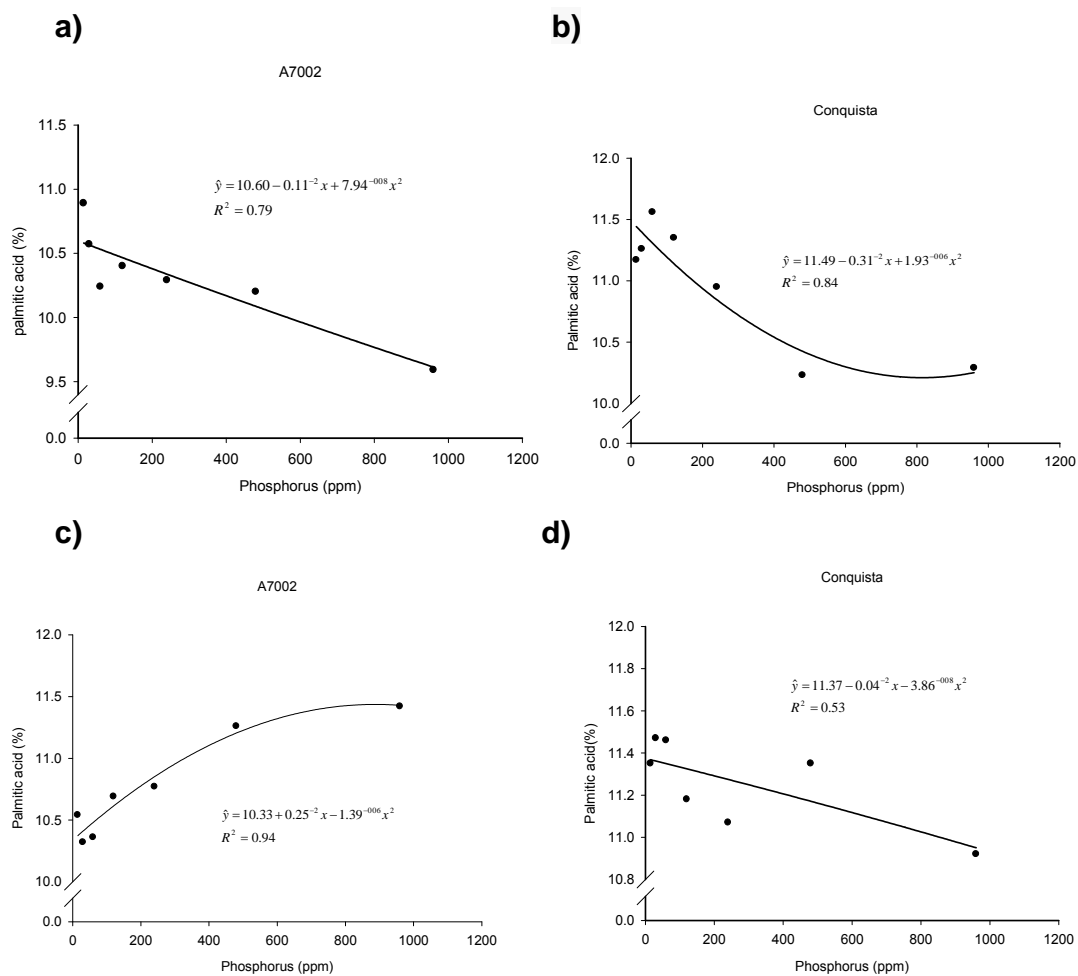
As figuras (12,13,14,15) e tabelas (6,7,8) indicam a composição dos ácidos graxos presentes no óleo das cultivares de soja A7002 e Conquista cultivadas em condições diferentes de temperatura e doses de fósforo. A composição dos ácidos graxos foi evidentemente afetada pelas variáveis (temperatura, cultivar e doses de fósforo) estudadas neste trabalho, como pode ser observado na tabela 3. A seguir será mostrado o efeito dessas variáveis em cada ácido graxo analisado.

Segundo Gibson e Mullen, (1996), a temperatura de crescimento e desenvolvimento das plantas é um fator importante na composição de ácidos graxos constituintes dos lipídios estruturais, de membrana e de reserva.

### **5.5.1 Ácido Palmítico**

A concentração de ácido palmítico foi afetada pela interação tripla entre as variáveis temperatura x cultivar x doses de fósforo

Na temperatura de 35/21°C, a cultivar A7002 apresentou declínio na concentração de ácido palmítico à medida que se aumentou as doses de fósforo aplicadas ao solo, variando de 9,59% a 10,89%, a cultivar Conquista também apresentou um declínio na concentração de ácido palmítico até a dose de 480ppm de fósforo no solo, tendo a concentração de ácido palmítico variado de 10,23 a 11,17%, Já na dose de 960 ppm de fósforo no solo foi observado pequeno aumento na concentração de ácido palmítico para 10,29 %. Já a temperatura de 30/15°C esse comportamento foi diferente para as cultivares. A cultivar A7002 apresentou aumento no conteúdo de ácido palmítico de 10,32 para 11,77% à medida que se aumentou as doses de fósforo e a cultivar Conquista apresentou uma concentração semelhante nas menores doses (15,30,60, 120 ppm) de fósforo aplicadas no solo, variando de 11,18 a 11.35% de ácido palmítico, seguida de um aumento na concentração de ácido palmítico nas doses mais altas (240, 480 e 960 ppm) de fósforo aplicadas ao solo Esses resultados podem ser observados na figura 12.



**Figura 12** – Concentração de ácido palmítico nas sementes de duas cultivares de soja cultivadas em diferentes temperaturas e em função de doses de fósforo aplicadas no solo. **a)** A7002 (35°C-21°C); **b)** Conquista (35°C-21°C); **c)** A7002 (30°C-15°C); **d)** Conquista (30°C-15°C).

### 5.5.2 Ácido esteárico

O conteúdo de ácido esteárico sofreu interação entre as variáveis temperatura e doses de fósforo. Esses resultados podem ser observados nas tabelas 3,4,e 5. A cultivar A7002 apresentou maior teor de ácido esteárico (3,79%) na temperatura de 35/21°C. Na temperatura de 30/15°C houve diferença estatística quando se variou as doses de fósforo, variando a concentração de ácido esteárico de 2,44 a 3,49%, já na temperatura de 35/21°C a medida que se aumentou a dose de fósforo (15, 30, 60, 120, 240, 480 e 960 ppm) houve um aumento na concentração de ácido esteárico de 2,37 a 3,43% (Anexo I)

**Tabela 6-** Efeito da aplicação de diferentes doses de fósforo na concentração de ácido esteárico (%).

Doses de fósforo (ppm)	Média do teor de ácido esteárico
15	3,1824 A
30	3,1252 AB
60	3,0777 AB
120	2,9591 AB
240	2,9442 AB
480	2,9250 AB
960	2,8853 B

Valores seguidos por mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey

**Tabela 7** - Efeito interação da interação entre temperatura x doses na concentração de ácido esteárico (%).

Doses (ppm)	temperatura	
	35/21°C	30/15°C
15	3,43A	2,44B
30	3,15A	3,10A
60	3,04A	2,85A
120	2,90A	2,95A
240	2,56B	3,21A
480	2,47B	3,45A
960	2,66B	3,49A

Valores seguidos por mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste tukey

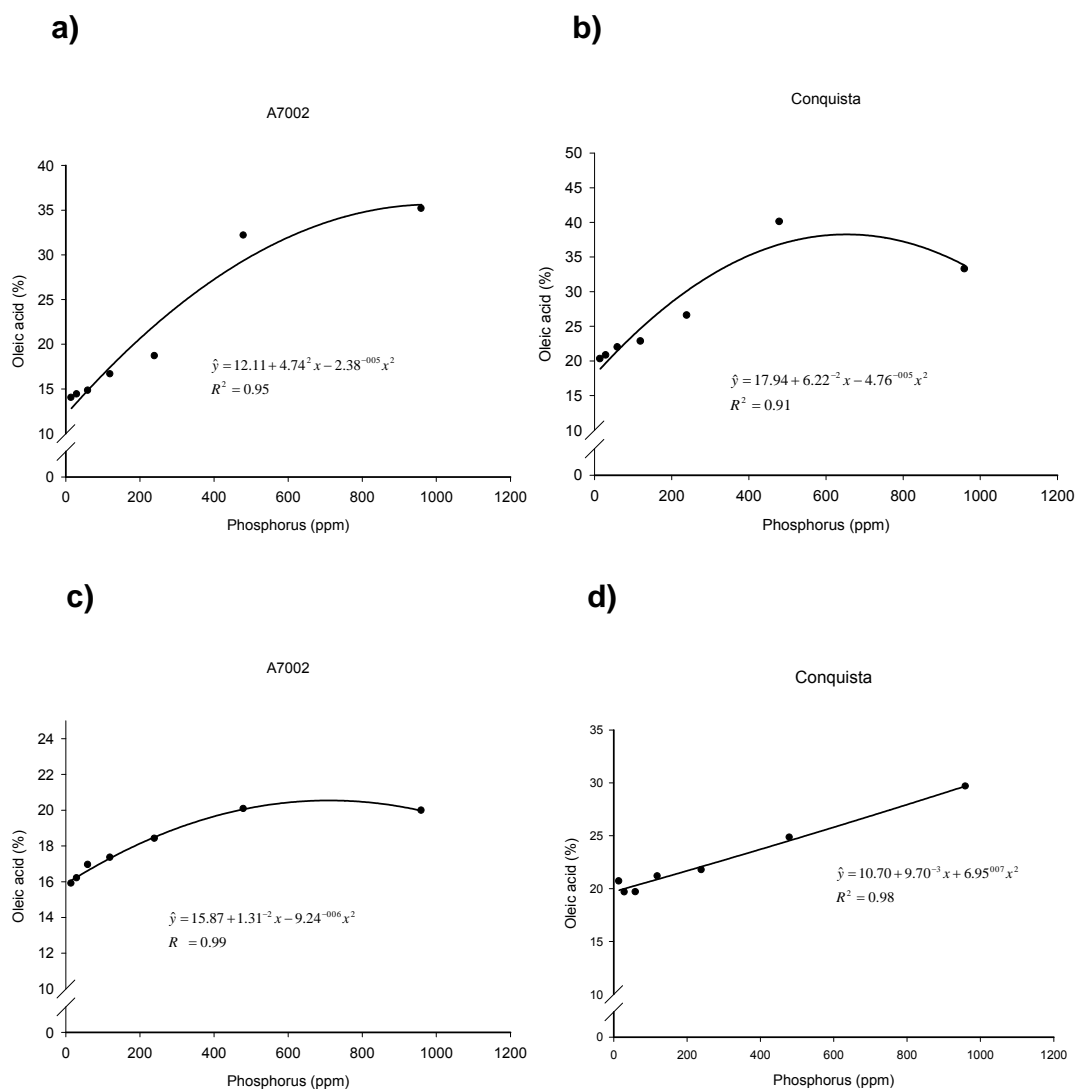
**Tabela 8-** Efeito da interação entre doses de fósforo x temperatura na concentração de ácido esteárico (%).

temperatura	Doses de fósforo						
	15	30	60	120	240	480	960
35/21°C	3,43ABC	3,15ABCD	3,04ABCDE	2,90BCDE	2,56DE	2,47E	2,66CDE
30/15°C	2,94B	3,10AB	2,85B	2,95B	3,21AB	3,45AB	3,49AB

Valores seguidos por mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste tukey

### 5.6.3 Ácido Oléico

Na temperatura de 35/21°C, as cultivares A7002 e Conquistas apresentaram comportamento semelhante nas doses mais baixas de fósforo aplicadas ao solo, Em ambos os cultivares, foi observado aumento na concentração de ácido oléico nas sementes, a partir da dose de 240 ppm de fósforo aplicada no solo. Em doses mais baixas de fósforo (15, 30, 60 e 120 ppm), os valores de ácido oléico foram semelhantes para as condições analisadas e variaram entre 13.99 e 16.63 % (A7002) e 20,26 e 22,79% (Conquista). Na dose de fósforo de 240 ppm a concentração de ácido oléico ainda foi bastante reduzida, 18.69% (A7002) e 26,54% (Conquista). Nas doses de 480 e 960 ppm, a concentração de ácido oléico foram respectivamente 32,14% e 35,14% (A7002) e 40.05% e 33,23 % (conquista). Já na temperatura de 30/15°C a cultivar A7002 apresentou um aumento na concentração de ácido oléico até a dose de fósforo de 480 ppm, sendo que a concentração de ácido oléico variou de 15,89 a 20,05% e na dose de 960 ppm o conteúdo de ácido oléico sofreu uma pequena queda para 19.97%. A cultivar conquista teve seu conteúdo de ácido oléico aumentado a medida que se aumentou a dose de fósforo aplicada ao solo, a concentração de ácido oléico neste cultivar variou de 19,64 a 29, 65% (Figura 13).

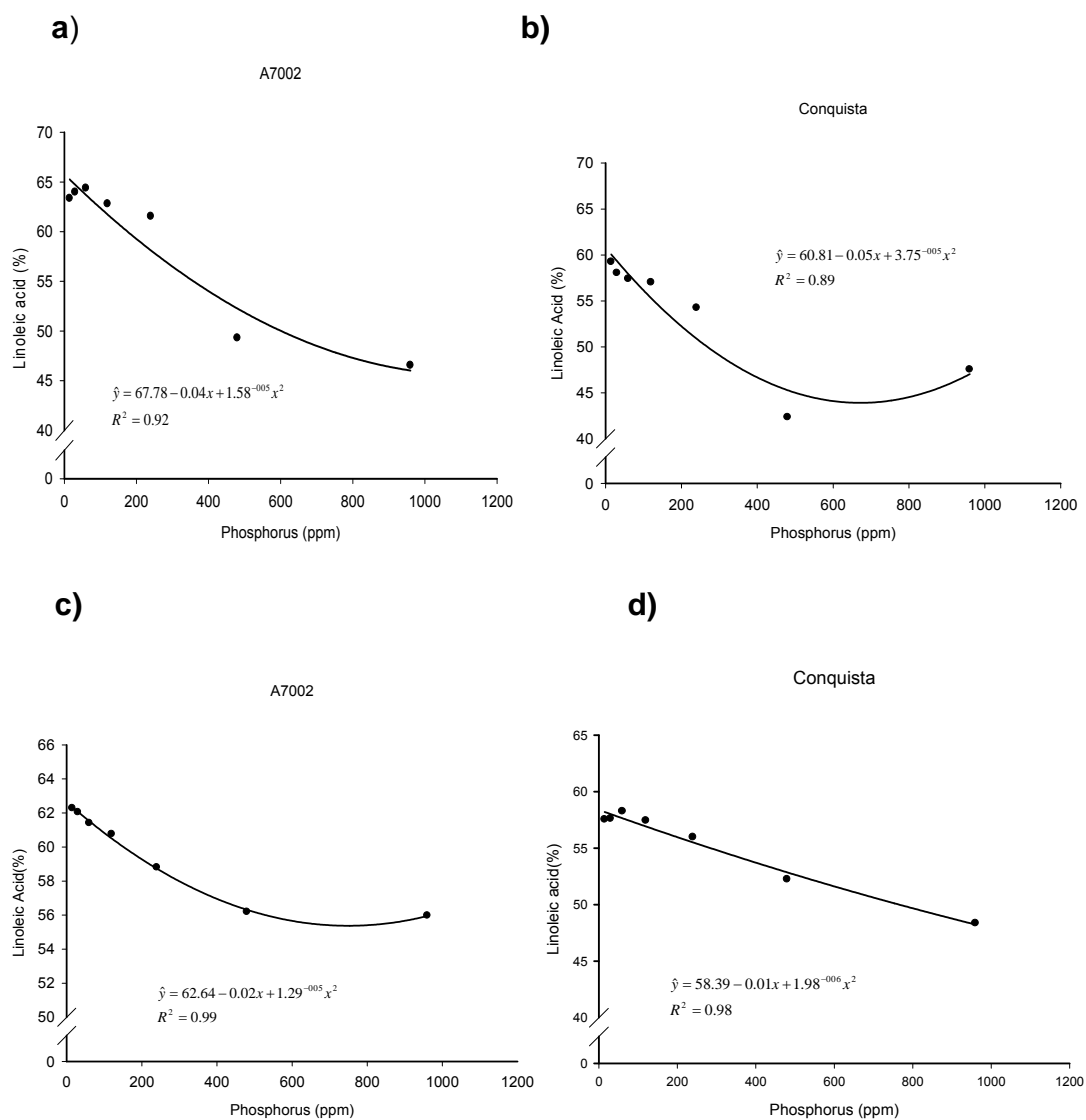


**Figura 13** – Concentração de ácido oléico nas sementes de duas cultivares de soja cultivadas em diferentes temperaturas e em função de doses de fósforo aplicadas no solo. **a)** A7002 (35°C-21°C); **b)** Conquista (35°C-21°C); **c)** A7002 (30°C-15°C); **d)** Conquista (30°C-15°C).

#### 5.5.4 – Ácido Linoleico

Em ambos os cultivares, A7002 e Conquista, nas duas faixas de temperatura analisadas, foi observado diminuição na concentração de ácido linoleico nas sementes, a partir da dose de 240 ppm de fósforo aplicada no solo. Em doses mais baixas de fósforo (15, 30, 60 e 120 ppm), os valores de ácido linoléico foram semelhantes para todas as condições analisadas e variaram entre 57.39 e 64.37 %. Na dose de fósforo de 240 ppm a concentração de ácido oléico variou entre 54,24 e 61,52%. Na dose de 480 ppm a concentração de ácido linoléico variou de 42,34% a 56,18%.

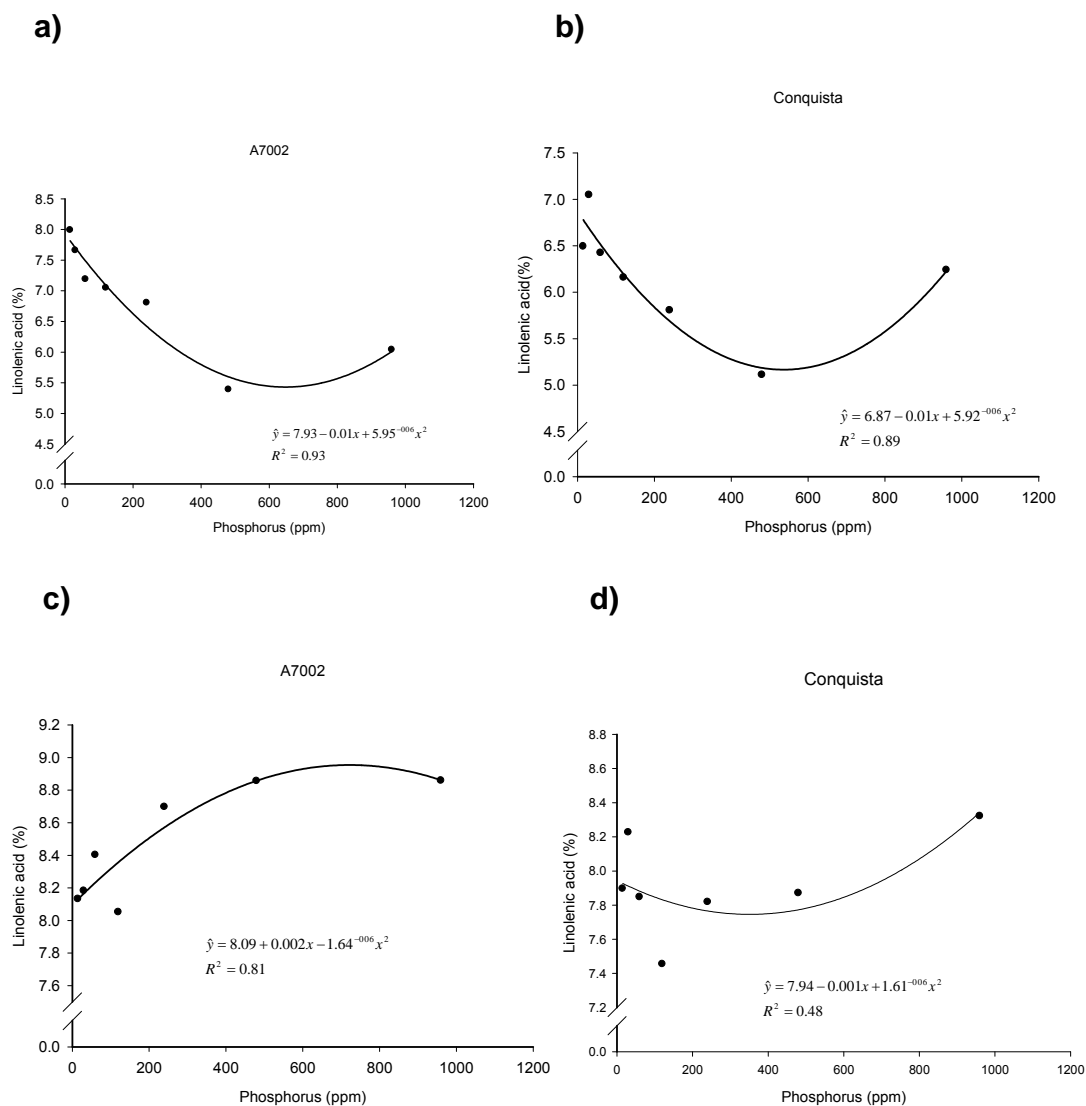
Já na dose 960 ppm, as duas cultivares apresentaram comportamento distintos em concentração de ácido linoléico em relação a temperatura. Na temperatura de 35/21°C a cultivar A7002 apresentou uma pequena queda na concentração de ácido linoléico (46,53%) e a cultivar conquista sofreu um aumento na concentração de ácido linoléico (47,53%) e na temperatura de 30/15°C, a cultivar A7002 teve um aumento na concentração de ácido linoléico (55,97%) e a cultivar conquista uma diminuição (48,35%) (Figura 14).



**Figura 14** – Concentração de ácido linoleico nas sementes de duas cultivares de soja cultivadas em diferentes temperaturas e em função de doses de fósforo aplicadas no solo. **a)** A7002 (35°C-21°C); **b)** Conquista (35°C-21°C); **c)** A7002 (30°C-15°C); **d)** Conquista (30°C-15°C).

### 5.5.5 Ácido Linolênico

A concentração de ácido linolênico apresentou perfil variado à medida que se alterou a temperatura e as doses de fósforo. Na temperatura de 35/21°C as duas cultivares apresentaram perfil semelhante a medida que se aumentava as doses de fósforo, o teor de ácido linoleico caiu até a dose de 480 ppm e depois apresentou um aumento na dose de 960ppm, a concentração de ácido linoleico variou de 5,11 a 7,99% nesta temperatura. Já na temperatura de 30/15°C a concentração de ácido linoleico na cultivar A7002 apresentou aumento até a dose de 960 ppm, variando de 8,05 a 8,86%, já a cultivar Conquista apresentou aumento na concentração de ácido linoleico até a dose de 480ppm de fósforo aplicado ao solo, a concentração variou de 7,45 a 8,32% seguida de uma queda na concentração quando se aplicou a dose de 960 ppm, onde a concentração de ácido linoleico foi de 7,87%.. (Figura 15)



**Figura 15** – Concentração de ácido linolênico nas sementes de duas cultivares de soja cultivadas em diferentes temperaturas e em função de doses de fósforo aplicadas no solo. **a)** A7002 (35°C-21°C); **b)** Conquista (35°C-21°C); **c)** A7002 (30°C-15°C); **d)** Conquista (30°C-15°C).

Lanna et al., 2002, observaram que os teores de ácido palmítico e esteárico não sofreram alteração na concentração quando plantas de soja forma cultivadas em temperaturas diferentes, o teor de ácido oléico foi

aumentado em temperaturas mais altas e o de ácidos graxos insaturados foi diminuído.

Rennie e Tanner (1989), concluíram que o teor de ácidos graxos era influenciado por mudança de temperatura. Eles estudaram a composição de ácidos graxos numa faixa de temperatura de 15/12C e 40/30C. Neste trabalho foi verificado que o teor de ácido palmítico e esteárico se mantinha basicamente estável nesta faixa de temperatura, o teor de ácido oléico foi aumentado e o de ácido linoléico diminuiu entre as linhagens estudadas.

Em uma grande variedade de organismos, o grau de insaturação dos ácidos graxos aumenta quando o organismo é exposto a temperaturas mais baixas (Somerville & Browse, 1991). O aumento dos teores de ácidos graxos insaturados pode nos lipídios em temperaturas mais baixas pode ser explicado pela regulação traducional ou pós-traducional, como alteração da atividade de dessaturases (Cheesbrough, 1989). Segundo Wolf et al.,(1982) em temperaturas mais altas a reação de desidrogenação é limitada, pois oxigênio torna-se menos solúvel no citoplasma e a quantidade de oxigênio seria um fator limitante na velocidade de reação da desidrogenação.

A variação na composição dos ácidos graxos presentes no óleo de soja está intimamente ligada a qualidade do óleo de soja. Pois quanto maior a concentração de ácidos graxos poliinsaturados no óleo de soja, menor será sua estabilidade oxidativa. Óleos vegetais que possuem uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados estão mais sujeitos à oxidação do que óleos que possuem maior quantidade de ácidos graxos saturados (Corsini e Jorge, 2006).

Esses resultados vem confirmar que eficiente seleção de genótipos de soja, com melhorar qualidade, requer um melhor entendimento da natureza genética dessa característica e da influencia de fatores fisiológicos e ambientais sobre esta característica, além da interação entre esses diversos fatores.

## 6- CONCLUSÕES

- O uso adequado da adubação fosfatada é uma importante ferramenta para se alterar o teor de ácido fítico em grãos de soja.
- Os resultados obtidos neste estudo reforçam a importância de se conhecer bem a natureza genética da característica analisada, bem como os fatores ambientais que a influenciam, assim como a interação entre esses fatores.
- A enzima mio-inositol 1 fosfato sintase pode ser um potencial alvo para a regulação da síntese de ácido fítico e de outros compostos como os oligossacarídeos de rafinose ( rafinose e estaquiose).
- Através do uso de temperaturas de crescimento das plantas mais altas aliada a uma adubação fosfatada adequada, podemos obter grãos de soja com menores teores de Oligossacarídeos de rafinose.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.A., PATE, J.S. **Plant and Soil**. v. 145, p.107-113, 1992

ARENTOFT, A.M. and SORENSEN, H. (1992) Alpha galactosides and dietary fibres in relation to pea quality: methods of oligosaccharide analyses. In: AEP (ed.) **Proceedings of the 1st Conference on Grain Legumes**, Angers, France. AEP, Paris,France, pp. 457.

ANGHINONI, I.; BISSANI, C.A. Fósforo e adubos fosfatados. In: BISSANI, C.A.; GIANELLO, C.; TEDESCO, M.J.; CAMARGO, F.A.O. (Org.). **Fertilidade do solo e Manejo da Adubação de Culturas**. 1 ed. Porto Alegre, Genesis, v.1, 2004. p.117-138.

ARAÚJO, A.P. & TEIXEIRA, M.G. Nitrogen and phosphorus harvest indices of common bean cultivars: Implications for yield quantity and quality. **Plant Soil**, 257:425-433,2003.

ARAÚJO, A.P.; MACHADO, C.T.T. Fósforo: **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa, p. 253-280, 2006.

ARENTOFT, A.M., MICHAELSEN, S. and SORENSEN, H. (1993) Determination of oligosaccharides by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A** 652, 517–524.

BARBER, S.A. **Soil Nutrient Bioavailability**. Nova York: John Willey & Sons, 398p. 1984.

BENASSI, Vera de Toledo. O Programa “Soja na Mesa”. Embrapa Soja, Londrina.

Disponível em:<[http://www.acsoja.org.ar/mercosoja2006/Contenidos/Foros/sojay\\_salud\\_01.pdf](http://www.acsoja.org.ar/mercosoja2006/Contenidos/Foros/sojay_salud_01.pdf)>.

BERGAMIN, M.; CANCIAN, M.A.E.; CASTRO, P.R.C. **Ecofisiologia da soja**. In: CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A. (Org.). *Ecofisiologia de cultivos anuais: trigo, milho, soja, arroz e mandioca*. São Paulo: Nobel, 1999. p.73-90.

BISWAS, S.; MARTI, S.B.; CHARKRABARTI, S.; BISWAS, B.B. Purification and characterization of myoinositol hexaphosphate adenosine diphosphate phosphotransferase from *Phaseolus aureus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.185, p.557-566, 1978.

BLACKMAN, S.A., WETTLAUFER, S.H., OBENDORF, R.L. and LEOPOLD, A.C. (1991) Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology** 96, 868–874.

BLACKMAN, S.A., OBENDORF, R.L. and LEOPOLD, A.C. (1992) Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. **Plant Physiology** 100, 225–230.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J.; **J. Biochem. Physiol.** 1959, v.37, 911, 1959.

BONHOMME, R. Bases and limits to using “degree.day” units. **European Journal of Agronomy**, v.13, p.1-10, 2000.

BREARLEY, C.A.; HANKE, D.E. Metabolic evidence for the order of addition of individual phosphate esters to the myo-inositol moiety of inositol hexakisphosphate in the duckweed *Spirodela polyhira* L. **Biochemical Journal**, v.314, p.227-233, 1996.

BUERKERT, A.; HAAKE, C.; RUCKWIED M.; MARSCHENER, H. Phosphorus application affects the nutritional quality of millet grain in the sahel. **Field Crops Res.**, v.57, p.223-235, 2001.

BUITINK, J., WALTERS-VERTUCCI, C., HOEKSTRA, F.A. and LEPRINCE, O. (1996). Calorimetric properties of dehydrating pollen: analysis of a desiccation-tolerant and an intolerant species. **Plant Physiology** 111, 235–242.

CAMARGO, M.B.P.; BRUNINI, O.; MIRANDA, M.A.C. Temperatura-base para cálculo dos graus-dia para cultivares de soja em São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, p.115-121, 1987.

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; KITAMURA, K.; BELÉIA, A.D.P.; OLIVEIRA, M.C.N. Influence of growth locations on isoflavona contents in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Science**, v.48, p.409-413, 1998

CERNING-BEROARD, J. and FILIATRE-VEREL, A. (1976) A comparison of the carbohydrate composition of legume seeds: horsebeans, peas and lupines. **Cereal Chemistry** 53, 968–978.

CHANG, R. Phytate: removal from whole dry beans by enzymatic hydrolysis and diffusion. **Journal of Food Science**, v.42, n.4, p.1098-1101, 1977.

CHARTTERTON, N.J.; HARISOM, P.A.; THORNLEY, W.R.; BENNETT, J. H. Sucrosyloligosaccharides and cool temperature growth in 14 forb species. **Plant Physiological Biochemistry**, v.28, p.167-172, 1990.

CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.13, n.4, p.297-335, 1980.

CHINNUASAMY, V. SCHUMAKER, K.; ZHUJ.K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. **J. Exp. Bot.**,v.55, p225-236, 2004.

CLEMENTE, T. E.; CAHOON, E. B. Soybean oil: genetic approaches for modification of functionality and total content. **Plant physiology**, v. 151, n. 03, p. 1030-1040, 2009.

COELHO, C.M.M.; BENEDITO, A.F.; VITORELLO, V.A; AZEVEDO, R.A. Variation in the Enzyme Activity and gene expression of myo-inositol-3-phosphate synthase and phytate accumulation during seed development in common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) **Acta Physiolo. Plant.**, v.29, p.265-271, 2007

[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br) (acesso 16 de setembro 2011, 10h10min).

CROSS, A. F.; SCHLESINGER, W. H. A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: Applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. **Geoderma**, Amsterdam, v.64, p.197-214, 1995.

CROWE, J.H., HOEKSTRA, F.A., NGUYEN, K.H.N. and CROWE, L.M. (1996) Is vitrification involved in depression of the phase transition temperature in dry phospholipids? **Biochemica et Biophysica Acta** 1280, 187–196.

DALAL, R.C. Soil organic phosphorus. **Advances in agronomy**. San Diego, v.29, p. 83-117, 1977.

de LUMEN, B.O. Molecular strategies to improve protein quality and reduced flatulence in legumes: A review. **Food Structure**, v.11, p.33-46, 1992.

DELHAIZE E., HEBB D.M., RICHARDS K.D., LIN J.M, RYAN P.R., GARDNER R.C. Cloning and expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphatidylserine synthase cDNA. **J Biol Chem**. v.274, p.7082-7088, 1999.

DEY, P.M. Biochemistry of  $\alpha$ -galactosidase linkages in the Plant Kingdom. **Advanced Carbohydrates Biochemistry**, v.37, p.237-283, 1980.

DEY, P. M.  $\alpha$ -galactosidase from sweet chestnut seeds. **Phytochemistry**, v.20, p.1493-1496, 1981.

DEY, P.M. In: DEY, P.M.; DIXON, R.A. Biochemistry of storage carbohydrates in Green plants. Academic Press, p.53-129. 1985.

DEY, P.M. In: Methods in plant biochemistry. London. Academic Press, p.189-218,1990.

DINNI, A.; SIMONE, F.; RAIMUNDO, R.; SENATORE, F. Oligosaccharides in five different Vici faba cultivars. **Biochemistry System Ecology**, v.17, p.559 - 561, 1989.

DORNBOS, D.L. Jr. and MCDONALD, M.B. Jr (1986) Mass and composition of developing soybean seeds at five reproductive growth stages. **Crop Science** 26, 624–630.

EMBRAPA SOJA. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil – 2008. Londrina: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 280p. (Sistemas de Produção, 12).

FARIAS, J.R.B.; NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 9p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 48).

FINNEY, P.L. Potential for the use of germinated wheat and soybeans to enhance human nutrition. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.105, p.681-701, 1978.

FRIAS, J., VIDAL-VALVERDE, C., KOZLOWSKA, H., GÓRECKI, R., HONKE, J. and HEDLEY, C.L. (1996b) Evolution of soluble carbohydrates during the development of pea, faba bean and lupin seeds. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung** 203, 27–32.

GATIBONI, L. C. Disponibilidade de Formas de Fósforo do Solo às Plantas. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, 247p., 2003.

GILTZELMANN, R; AURICCHIO S. The handling of soy  $\alpha$ - galactosidase by a normal and galactosemic child. *Pediatrics*, v.36, p. 231-232, 1965.

GLASS, A.D.M.; SIDDIQI, M.Y. The control of uptake rates in relation to the inorganic composition of plants. In: TINKER, P.B.; LAÜCHLI, A. (Eds.). **Advances in Plant Nutrition**. New York: Praeger Pub, v.1, p.103-147, 1984.

GÓRECKI, R.J., BRENAC, P., CLAPHAM, W.M., WILLCOTT, J.B. and OBENDORF, R.L. (1996) Soluble carbohydrates in white lupin seeds matured at 13 and 28°C. **Crop Science** 36, 1277–1282.

GRAF, E. Applications of phytic acid. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.60, n.11, p.1861-1867, 1983.

GRAF, E.; ENPSOM, K.L.; EATON, J.W. Phytic acid. A natural antioxidant. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, p. 11647-11650, 1987.

GRANT, G. Anti-nutritional effects of soybean: a review. **Progress in Food and Nut. Sci.**,v.13,p.317-348. 1989.

GRIESHOP, C. M.; FAHEY JR., G. C. Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China, and the United States. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 5, p. 2669-2673, 2001.

GRIFFITHS, D. W., & THOMAS, T. A. Phytate and total phosphorus content of field beans (*Vicia faba L.*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.32, p.187–192, 1981.

GRYNSPAN, F., CHERYAN, M. Phytate-calcium interactions with soy protein. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.66,n.1, p.93-97, 1989.

GUIMARÃES, V.M ; DE REZENDE, S.T ; MOREIRA, M.A ; de Barros, E.G ;FELIX, C.R . Characterization of -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, Estados Unidos, v. 58, n. 1, p. 67-73, 2001.

GURR, M. I., BLADES, 1., APPLEBY, R. S.,SMITH, C. G., ROBINSON, M. P., NICHOLS,B. W. Studies on seed-oil triglycerides.Triglyceride biosynthesis and

storage in whole seeds and oil bodies of *Crambe abyssinico*. **Eur. J. Biochem.** 43:281-90, 1974

GUSTAFSSON, E.L; SANDERBERG, A.S. Phytate reduction in brown bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, v.60, p.149-152, 1995.

HAMMOND, J. P.; WHITE, P. J. Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 59, p. 93-109, 2008.

HARTWING, E.E.; KUO, T.M.; KENTY, M.M. Seed protein and its relationship to soluble sugars in soybean. **Crop Sci.** v.37, p.770-773, 1997.

HAUG, W.; LANTZSCH, H.J. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. **J. Sci. Food Agric.**, v.34, p.1423-1426, 1983.

HAYES, J.E., SIMPSON, R.J., RICHARDSON, A.E. **Plant and Soil.** v.220, p.165-174, 2000.

HEINONEN, J.K.; LAHTI, R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Analytical Biochemistry**, v.113, p.313-317, 1981.

HORBOWICZ, M. and OBENDORF, R.L. (1994) Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols—review and survey. **Seed Science Research** 4, 385–405.

HYMOWITZ, T.; COLLINS, F. I.; PANCZNER, J.; WALKER, W.M. Relationship in between the content of oil, protein and sugars in soybeans seed. **Agronomy Journal**, Madison, v. 64, n. 2,p. 613-616, 1972.

ISLAM, A.; MANDAL, R.; OSMAN K.T. Direct absorption of phosphate by rice and jute plants. **Plant and Soil**, v.53, p. 49-54, 1979.

JIMENEZ, M.J.M.; ÉLIAS, L.G.; BRESSANI, R.; NAVARRETE, D.A.; GÓMEZ-BRENES, R.; MOLINA, M.R. Estudos bioquímicos y nutricionales de la semilla Germinada de soya. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.35, n.3, p.480-490.1985.

KLEIN, C. H.; LIMA, G.M.M.; LEDUR, M.C.; SUZIN, L. Espectroscopia Infravermelho Próxima Para Predição da Composição de Carcaça de Frangos de Corte. **Embrapa – Suínos e Aves**, 2000.

KOSTER, K.L.; LEOPOLD, A.C. Sugar and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, v.88, p.829-832, 1988.

KOSTER, K.L., WEBB, M.S., BRYANT, G. and LYNCH, D.V. (1994) Interactions between soluble sugars and POPC (1 palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) during dehydration: vitrification of sugars alters the phase behavior of the phospholipid. **Biochimica et Biophysica Acta** 1193, 143–159.

KUO TM, VANMIDDLESWORTH JF, WOLF WJ Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. **J Agric Food Chem** 36: 32–36, 1988.

KURIYAMA, S. and MENDEL, L.B. The physiological behaviour of raffinose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 31, p.125–147,1971.

KUWANO, M; MIMURA, T.; TAKAIWA, F.; YOSHIDA, K.T. Generation of stable low phytic acid transgenic Rice through antisense repression of the 1-D myo-inositol 3- phosphate synthase gene (RN1NO1) using the 18 KDa Olesin promoter. **Plant Biotechnology Journal** , v.7, p. 96-105, 2009.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. Tradução PRADO, C. H. D. A. São Carlos: RiMa Artes e Textos, 2000. p.341-418.

LAHUTA, L.B., GÓRECKI, R.J. and REJOWSKI, A. (1995) Accumulation of sugars in maturing field bean (*Vicia faba minor* L.) and pea seeds (*Pisum sativum* L.) in relation to seed viability. In: AEP (ed.) **Improving Production and**

**Utilisation of Grain Legumes. Proceedings 2nd European Conference on Grain Legumes.** AEP, Paris, p. 44.

LEJAY L, GANSEL X, CERESO M, TILLARD P, MÜLLER C, KRAPP A, VON WIRÉN N, DANIEL-VEDELE F, GOJON A. Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. **The Plant Cell** 2003;15:2218-2232.

LEOPOLD, A.C.; VERTUCCI, C. W. Physical attributes of desiccated seeds. In: LEOPOLD, A.C. **Membranes, metabolism, and dry organisms.** Comstock Press, p.22-24, 1986.

LEPRINCE, O. and WALTERS-VERTUCCI, C. (1995) A calorimetric study of the glass transition behaviors in axes of bean seeds with relevance to storage stability. **Plant Physiology** 109, 1471–1481.

LIU, J.J.; ODEGARD, W.; de LUMEN, B.O. Galactinol synthase from kidney bean cotyledon and zucchini leaf. Purification and N-terminal sequences. **Plant Physiology**, v.109, p.505-511, 1995.

LIU JQ, SAMAC DA, BUCCIARELLI B, ALLAN DL, VANCE CP. Signaling of phosphorus efficiency-induced gene expression in white lupin requires sugar and phloem transport. **The Plant Journal**. V.41, p.257-268, 2005.

LOEWUS, F. A.; LOEWUS, M. W. Myo-inositol: its biosynthesis and metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, v.34, p.137-161, 1983.

LOEWUS, F.A; MURTHY, P.P. Myo-inositol metabolism in plants. **Plant Science**, v.150, p.1-19, 2000.

LOLAS G.M, MARKAKIS P (1977). The phytase of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). **J Food Sci** 42: 1094-1106.

LOTT, J.N.A., J.S. GREENWOOD AND G.D. BATTEN. Mechanisms and regulation of mineral nutrient storage during seed development. In **Seed Development and Germination**, pp. 215-235, Marcel Dekker, Inc. (1995).

LOWELL, C.A. and KUO, T.M. (1989) Oligosaccharide metabolism and accumulation in developing soybean seeds. *Crop Science* 29, 459–465.

MAJERUS, P.W; CONNOLY, T.M.; BANSAL, V.S.; INORN, R.C.; ROSS, T.S.; LIPS, P. Inositol phosphate: synthesis and degradation (MINIREVIEW). **Journal of Biological Chemistry**, v.263, p.3051-3054, 1988.

MAJUMDER, A. L., JOHNSON, M. D., and HENRY, S. A.: 1L-myoinositol-1-phosphate synthase. **Biochim. Biophys. Acta.** 1348 245—256, 1997.

MARSCHNER H. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, **Harcourt Brace & Company Publishers**, London, pp 483–507, 1995.

MARSHALL, M. O., KATES, M. Biosynthesis of nitrogenous phospholipids in spinach leaves. **Can. J. Biochem.**, v.52, p.469-82, 1974.

MCNEIL S.D, NUCCIO M.L, ZIEMAK M.J, HANSON A.D. Enhanced synthesis of choline and glycine betaine in transgenic tobacco plants that overexpress phosphoethanolamine N-methyltransferase. **Proc Natl Acad Sci. USA** v. 98, p.10001-10005, 2001.

MENDES, A.C. **Lecitina de Soja: processo de obtenção e refino**. Porto Alegre: UFRGS, 2000. Monografia (Curso de Engenharia de Alimentos), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

MESSINA, M.; MESSINA, V. Increasing use of soyfoods and their potential role in cancer prevention. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 91, n. 7, p. 836-840, 1994.

MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. Valor nutritivo e funcional da soja. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v. 15, n. 2, p. 306-315, 2000.

MORAIS, R. M. A.; JOSÉ, I. C.; RAMOS, F.G.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.41, n.5, p.725-729, maio 2006.

MORCUENDE R, BARI R, GIBON Y, et al. Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. **Plant, Cell and Environment** ;v.30, p85-112,2007

MOORE, T. S. Phosphatidylserine synthesis in castor bean endosperm. **Plant Physiol.** v 56, p. 177-80, 1975

MORGANO, A. M.; FARIA, C.G.; FERRÃO, M.F.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M.M.C. Determinação de Proteína em Café Cru Por Espectroscopia Nir e Regressão PLS. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 25(1): 25-31, jan.-mar. 2005.

MUDD, J. B. Phospholipid biosynthesis. **See Ref.** v.38, p. 249-82, 1980.

NAGASHIRO, C. 2007. Enzimas en la nutrición de aves in **Conferência Apinco 2007 de Ciência e Tecnologia avícolas**, . 2007. Pages 309-328.

O'BRIEN IEW, BAGULEY BC, MURRAY BG, MORRIS BAM, FERGUSON IB. Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible. **Plant J**, v.13, p.803-814,1998.

OLIVEIRA, M.A., CONCORDIA, M., CARRÃO-PANIZZI, GONTIJO,J.M., MANDARINO,LEITE, R.S.,FILHO, P.J.C.,VICENTINI,M.B. Quantification of the sugars, oligosaccharides and starch in special soybean enotypes/cultivars (*Glycine Max (L) Merrill*) for human consumption. **Braz. J. Food Technol.**, v. 13, n. 1, p. 23-29, jan./mar. 2010.

PEARSON, S.; HADLEY, P.; WHELDON, A.E. A model of the effects of temperature on the and development of cauliflower (*Brassica oleracea L. botrytis*). **Scientia Horticulturae**, v.59, p.91-106, 1994.

PRINCE, K.R.; LEWIS, J.; WYATT, G.M.; FENWICK, G.R. Flatulence-causes, Relation to diet and remedies. **Nahrung**, v.32, p. 609-626, 1988.

RABOY, V.; DICKINSON, D.B.; BELOW, F.E. Variation in seed total phosphorus, phytic acid, zinc, calcium, magnesium and protein among lines of *Glycine max.* and *G.soja*. **Crop Science**, v.24, p.431-434, 1984.

RABOY, V.; NOAMAN, M.M.; TAUHOR, G.A.; PICKETT, S.G. Grain phytic acid and protein are highly correlated in winter wheat. **Crop Science**, v.31, p.631-635, 1991

RABOY, V.; DICKINSON, D.B. Phytic acid levels in seeds of *Glycine max.* And *G. soja* as influenced by phosphorus status. **Crop Science**, v.33, p.1300-1305, 1993.

RACKIS, J.J. Biological and physiological factors in soybeans. **Journal of the American Oil Chemists. Society**, v.51, n.1, p.161A-174A, 1974.

RAGHOTHAMA, G.K. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Stanford, v. 50, p. 665-693, 2000.

REDDY, N.R.; PIERSON, M.D; SATHE, S.K.; SALUNKLE, D.K.Phytates in cereals and legumes. **C R C Press.**, 159p, 1989.

REMUS, J.A. Avicultura e o Meio Ambiente Colhem os Benefícios da Nova Geração Fitase. **AveWorld**, n. 29, p. 56-62, 2007.

RIBEIRO, M. Estabelecimento de um método colorimétrico para determinação da atividade da galactinol sintase, purificação parcial e caracterização da enzima de sementes de soja. **Tese (D.S)**. Universidade de Brasília, Brasília, p.125.2001.

RONTEIN D, WU W.I, VOELKER D.R, HANSON A.D. Mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase from higher plants. Functional complementation in yeast, localization in

plants, and overexpression in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, v.132, p.1678-1687, 2003.

SANDEBERG, A.S.; BRUNE, M.; CAILSSON, N.G.; HALLBERG, L.; SKOGLUND, E.; ROSSANDER; HULTHEN, L. Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p.240-246, 1999.

SANNI, A.I.; ONILUDE, A.A.; OGUNDOYE, O.R. Effect of bacterial galactosidase treatment on the nutritional status of soybean seeds and its milk derivate. **Nahrung**, v.41, p.18-21, 1997.

SANTOS, T.L. Soja. In: CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; SESTARI, I. **Manual de fisiologia vegetal: fisiologia dos cultivos**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2008. p. 157-175.

SARAVITZ, D.M.; PHARR, D.M.; CARTER, T.E. Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. **Plant Physiology** v.83, p.185-189, 1987.

SARWAR, G. The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. **J. Nutr.**, v. 127, n.10, p. 758-764, 1997.

SATHE, S.K., SALUNKHE, D.K. Technology of removal of unwanted components of dry beans. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.21, n.3, p.263-287, 1984.

SCHULZE, D. G. An introduction to soil mineralogy. In: DIXON, J. B.; WEED, S. B. (Eds.) **Minerals in soil environments**. SSSA, Madison, 1989, p. 1-34.

SCOTT, J. J. Alkaline Phytase Activity in Nonionic Detergent Extracts of Legume Seeds. **Plant Physiol**. (1991) 95, 1298-1301

SCHOLFIELD, C.R. Occurrence, structure, composition and nomenclature. In: SZUHAJ, B.F.; LIST, G.R. **Lecithins**. Washington: AOCS, 1985. Cap. 1, p. 01-20.

SCHULZE, D. G. An introduction to soil mineralogy. In: DIXON, J. B.; WEED, S.B. (Eds.) **Minerals in soil environments**. SSSA, Madison, 1989, p.1-34.

SEDIYAMA, T.; PEREIRA, M.G.; SEDIYAMA, C.S.; GOMES, J.L.L. **Cultura da Soja, Parte I**. Viçosa: UFV, 1993. 97p.

SINCLAIR, T R ; NEUMAIER, N. ; FARIAS, J. R. B. ; NEPOMUCENO, A L. Comparison of vegetative development in soybean cultivars for low-latitude environments. **Field Crops Research**, v. 92, p. 53-59, 2005.

SMITH, A.K.; CIRCLE, S.J. Soybeans: chemistry and technology. v. 1. **Westport**: The AVI, 1972.

SMITH, F. W.; EALING, P. M.; DONG, B. & DELHAIZE, E. The cloning of two rootspecific *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate transporter family. **Plant Journal**, v.11, p. 83-92, 1997.

SOMERVILLE C., BROWSE J. Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes. **Science**, v.252, p.80-87, 1991

SOUZA, G.; VALLE, J. L. E; MORENO, I. Efeitos dos compostos da soja e seus derivados na alimentação humana. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.34, n.02, p. 61-69, jul./ dez 2000.

SOUZA, A. E. Fosfato, DNPM, **Balanco Mineral Brasileiro**, 37p. , 2001.

SOUZA, C. M. M. C. A.; Mecanismos fisiológicos e bioquímicos de regulação da biossíntese de ácido fítico em grãos de dois genótipos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), **Tese de Doutorado**, Piracicaba, S.P. Brasil, 142p., Abril 2003.

STEGGERDA, F.R; DIMMICK, J.F.Effect of bean diet on concentration of carbon Dioxide in flatus. **Am. J. Clin. Nutr.**, V.19, p.120-124, 1966.

STROTHER, S. Homeostasis in germinating seeds. **Annals of Botany**, v.45, p.217-218, 1980.

SUAREZ, F.L; SPRINGFIELD, J.; FURN,J.K; LOHRMANN, T.T; KERR, P.S. LEVETT, M. D. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from Beans naturally low in oligosaccharides. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, n.1, p.135-139, 1999.

SUMIDA S, JB MUDD.The structure and biosynthesis of phosphatidyl inositol in cauliflower inflorescence. **Plant Physiol** 45: 712-718, 1970

TARAFDAR, J.C AND CLAASSEN, N. Organic Phosphorus Compounds as Phosphorus Source For Plants Through the Activity of Phosphatase Produced by Plant roots and Microorganism. **Bio. Fertil. Soils**, V.5, p. 308-312, 1988.

TAVARES, G. M.; PITANGA, K. C.; SILVA, M. A. T.; MORAIS, A. A. C. A soja como alimento funcional na prevenção do câncer. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v. 15, n. 2, p. 321-325, 2000.

TEBERIKLER, L.; KOSEOGLU, S.; AKGERMAN, A. Selective extraction of phosphatidylcholine from lecithin by supercritical carbon dioxide/ethanol mixture. **Journal of American Oil Chemists' Society**. Champaign, v.78 (2), 2001b.

TIESSEN, H.; STEWART, J. W .B.; COLE, C. V ., Pathways of phosphorus transformations in soils of differing pedogenesis. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v.48, p.853-858, 1984.

THOMPSON, L.U; ZHANG, L. Phytic acid in minerals: effect on early markers of risk for mammary and colon carcinogenesis. **Carcinogene**, v.12, p. 2041-2945, 1991.

TRAN, H.T; HAEULEY. B.A; PLAYTON, W.C. Feeding hungry plants: the role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. *Plant science*.v. 179, p 14-27, 2010.

TRUCOM, Conceição. Soja: nutrição e saúde: com receitas práticas e saborosas. São Paulo: Alaúde Editorial, 2005.

VANCE C.P.; UHDE-STONE C.; ALLAN D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytol**, v. 157: p.423–447, 2003.

VASCONCELOS, I. M.; MAIA, A. A. B.; SIEBRA, E. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. F. U.; MELO, V. M. M.; CARLINI, C. R.; CASTELAR, L. I. M. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **J. Nutr. Biochem.**, v. 12, n.1, p. 55-62, 2001.

VERTUCCI, D.J. and FARRANT, J.M. (1995) Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: Kigel, J. and Galili, G. (eds.) **Seed Development and Germination**. Marcel Dekker, New York, pp. 237–271.

VINCENT P, MANETA-PEYRET L, STURBOIS-BALCERZAK B, DUVERT M, CASSAGNE C, MOREAU P. One of the origins of plasma membrane phosphatidylserine in plant cells is a local synthesis by a serine exchange activity. **FEBS Lett**, v.464, p. 80-84, 1999.

VINCENT P, MANETA-PEYRET L, CASSAGNE C, MOREAU P. Phosphatidylserine delivery to endoplasmic reticulum derived vesicles of plant cells depends on two biosynthetic pathways. **FEBS Lett**, v. 498, p.32-36, 2001.

VOHRA, A. SATYANARAYANA, T. Phytases: Microbial Sources, Production, Purification, and Biotechnological applications. **Crit Rev.Biotechnol**, v.23, p 29-60, 2006

WAGNER, J.R.; BECKER, R.; GUNBMANN, R.; OLSON, A.C. Hydrogen production in the rat following ingestion of raffinose, stachyose and oligosaccharide-free bean residue. **Journal Nutrition**, v.106, p.466-470,1976.

WALKER, T.W.; SYERS, J.K. The fate of phosphorus during pedogenesis. **Geoderma**, Netherlands, v.15, p. 01-19, 1976.

WILLIAMS, P.; NORRIS, K. Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. **American Association of Cereal Chemists**, Inc. Minnesota USA., 1990.

WISSUWA, M.; GAMAT, G.; ISMAIL, A. M. Is root growth under phosphorus deficiency affected by source or sink limitations? **Journal of Experimental Botany, London**, v. 56, p. 1943-1950, 2005.

WU, Y.; WANG, T. Soybean Lecithin Fractionation and Functionality. **Journal of American Oil Chemists' Society**. Champaign, v.80, n.4, p.319-326, 2003.

YANG, S.; LOGAN, J.; COFFEY, D.L. Mathematical formulae for calculating the base

temperature for growing degree-days. **Agricultural and Forest Meteorology**, v.74, p.61-74, 1995.

YADAV, W.S. Genetic modification of soybean oil quality. In: VERMA.D.P.S; SHOEMAKER, R.C. SOYBEAN genetics, molecular, biology and biotechnology. USA, **CAB INTERNATIONAL**, P.127-188, 1996.

YIM, D.K.. Soja: Um Arsenal Milenar Aliado à Saúde – Encontro Franco Brasileiro de Biociência e Biotecnologia – **Alimentos Funcionais e Nutracêuticos**, Brasília, 2002, p.12. (Embrapa. Documentos, 85) Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/doc085.pdf>.

YOUNG, V. R. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 91, n. 7, p. 828-835, 1991.

WODZINSKI, R.J; ULLAH, A.H.J. Phytase. **Advances in Applied Microbiology**, v.42, p 263 -302, 1996.

ZAGO, A.; KAMINSKI, J. Eficiência De Fertilizantes Fosfatados No Suprimento De Fósforo Numa Sucessão De Cultivos Em Solos De Diferentes Características. **Rev. Centro de Ciências Rurais**, 9 (3): 229-313,1979.

# Anexo I

**Tabela 9** -Conteúdo de Rafinose (%) nas cultivares a A7002 e conquista em diferentes temperaturas e doses de fósforo.

Doses de fósforo (ppm)	35/21°C		30/15°C	
	A7002	Conquista	A7002	Conquista
15	1,32±0.29	1,03±0.15	1,18±0.340	0,88±0.13
30	1,30±0.14	1,01±0.07	1,04±0.050	0,87±0.09
60	1,34±0.31	0,90±0.13	0,98±0.155	0,86±0.11
120	1,16±0.11	0,90±0.09	1,06±0.168	0,85±0.17
240	1,14±0.27	0,71±0.19	0,83±0.164	0,74±0.14
480	1,02±0.12	0,77±0.03	1,06±0.155	0,67±0.09
960	0,84±0.31	0,87±0.01	1,04±0.069	0,63±0.13

**Tabela 10-** Conteúdo de Estaquiose (%) nas cultivares a A7002 e conquista em diferentes temperaturas e doses de fósforo.

Doses de fósforo (ppm)	35/21°C		30/15°C	
	A7002	Conquista	A7002	Conquista
15	2.51±0.25	2.95±0.42	2.54±0.52	3.6±0.55
30	2.80±0.15	2.73±0.29	2.76±0.19	3.15±0.13
60	2.40±0.29	2.87±0.2	2.91±0,20	2.89±0.87
120	2.66±0.10	2.88±0.18	2.78±0.03	2.82±0.15
240	3.26±0.08	3.27±0.30	3.17±0.10	3.33±0.30
480	3.34±0.09	3.68±0.54	3.50±0.08	3.60±0.07
960	3.19±0.22	2.67±0.15	4.06±0.22	4.04±0.17

**Tabela 11** – Conteúdo de Sacarose (%) nas cultivares a A7002 e conquista em diferentes temperaturas e doses de fósforo.

Doses de fósforo (ppm)	35/21°C		30/15°C	
	A7002	Conquista	A7002	Conquista
15	3,83±0.28	3,96±0.18	5,52±0.54	4,91±0.18
30	3,70±0.42	3,94±0.71	5,85±0.39	5,00±0.35
60	3,75±0.35	3,53±0.19	5,65±0.56	4,69±0.36
120	3,84±0.25	3,69±0.17	5,37±0.24	4,52±0.83
240	3,65±0.21	3,36±0.19	5,07±0.44	4,87±0.54
480	3,00±0.67	3,04±0.16	5,63±0.31	4,44±0.82
960	3,07±0.24	3,82±0.65	5,27±0.49	4,34±0.29

**Tabela 12-** Conteúdo de Ácido fítico (%) nas cultivares a A7002 e conquista em diferentes temperaturas e doses de fósforo.

Doses de fósforo (ppm)	35/21°C		30/15°C	
	A7002	Conquista	A7002	Conquista
15	0.318±0.003	0.408±0.010	0.260±0.015	0.303±0.007
30	0.343±0.023	0.378±0.015	0.250±0.011	0.292±0.012
60	0.316±0.009	0.424±0.005	0.237±0.009	0.313±0.009
120	0.335±0.008	0.415±0.005	0.239±0.012	0.311±0.003
240	0.503±0.004	0.599±0.008	0.556±0.028	0.586±0.006
480	1.116±0.041	1.05±0.075	0.971±0.053	1.024±0.025
960	1.396±0.059	1.40±0.058	1.381±0.043	1.193±0.065

**Tabela 13-** Conteúdo de Ácido Palmítico nas cultivares a A7002 e conquista em diferentes temperaturas e doses de fósforo.

Doses de fósforo (ppm)	35/21°C		30/15°C	
	A7002	Conquista	A7002	Conquista
15	10.89±0.23	11.17±0.02	10.54±0.05	11.35±0.03
30	10.57±0.02	11.26±0.15	10.32±0.02	11.47±0.20
60	10.24±0.12	11.56±0.06	10.36±0.25	11.46±0.28
120	10.40±0.28	11.35±0.06	10.69±0.09	11.18±0.12
240	10.29±0.18	10.95±0.16	10.77±0.12	11.07±0.19
480	10.20±0.18	10.23±0.13	11.26±0.42	11.35±0.34
960	9.59±0.23	10.29±0.06	11.42±0.10	10.92±0.45

**Tabela 14 -** Conteúdo de Esteárico (%) nas cultivares a A7002 e Conquista em diferentes temperaturas e doses de fósforo.

Doses de fósforo (ppm)	35/21°C		30/15°C	
	A7002	Conquista	A7002	Conquista
15	3.792±0,24	3.065±0.48	3.157±0.13	2.717±0.19
30	3.426±0.33	2.878±0.13	3.153±0.10	3.044±0.32
60	3.399±0.24	2.680±0.06	2.926±0.24	2.772±0.19
120	3.119±0.04	2.673±0.23	3.124±0.16	2.784±0.59
240	2.682±0.21	2.440±0.26	3.327±0.22	3.092±0.17
480	2.684±0.16	2.253±0.05	3.637±0.05	3.260±0.27
960	2.712±0.11	2.632±0.02	3.782±0.04	3.199±0.71

**Tabela 15-** Conteúdo de ácido oléico (%) nas cultivares a A7002 e conquista em diferentes temperaturas e doses de fósforo.

Doses de fósforo (ppm)	35/21°C		30/15°C	
	A7002	Conquista	A7002	Conquista
15	13.996±0.52	20.260±0.36	15.890±0.33	20.679±0.59
30	14.385±0.14	20.777±0.27	16.194±0.46	19.643±0.28
60	14.798±0.19	21.931±0.23	16.944±0.10	19.666±0.10
120	16.633±1.55	22.799±0.69	17.372±0.33	21.147±0.43
240	18.688±0.31	26.541±1.2	18.404±0.98	21.739±0.23
480	32.146±1.03	40.056±1.6	20.057±0.86	24.824±2.9
960	35.143±0.07	33.235±0.05	19.967±0.28	29.647±1.6

**Tabela 16-** Conteúdo de Ácido Linoléico (%) nas cultivares a A7002 e conquista em diferentes temperaturas e doses de fósforo.

Doses de fosforos(ppm)	35/21°C		30/15°C	
	A7002	Conquista	A7002	Conquista
15	63.327±1.40	59.246±0.24	62.278±0.13	57.532±0.68
30	63.959±0.54	58.036±0.33	62.042±0.55	57.607±0.19
60	64.370±0.33	57.395±0.39	61.402±0.21	58.253±0.23
120	62.795±0.67	57.017±0.38	60.753±0.12	57.436±0.28
240	61.525±0.34	54.248±0.79	58.799±0.35	55.965±0.39
480	49.291±0.99	42.344±1.30	56.187±0.12	52.237±2.06
960	46.536±0.07	47.530±0.05	55.970±0.15	48.356±3.49

**Tabela 17-** Conteúdo de Ácido linolenico (%) nas cultivares A7002 e conquista em diferentes temperaturas e doses de fósforo.

Doses de phosphorus	35/21°C		30/15°C	
	A7002	Conquista	A7002	Conquista
15	7.991±0.47	6.493±0.35	8.132±0.32	7.896±0.58
30	7.659±0.10	7.046±0.48	8.182±0.34	8.226±0.33
60	7.189±0.11	6.423±0.19	8.402±0.09	7.847±0.24
120	7.049±0.68	6.158±0.34	8.051±0.42	7.454±0.32
240	6.805±0.46	5.804±0.31	8.697±0.86	8.118±0.19
480	5.392±0.17	5.110±0.28	8.856±0.36	8.321±0.46
960	6.040±0.03	6.239±0.01	8.858±0.07	7.870±0,28

**Tabela 18-** Atividade de MIPS 40 dias (U/g)

Doses de fósforo (ppm)	Low temperature		Hight temperature	
	A7002	Conquista	A7002	Conquista
15	0.52±0.02	0.45±0.04	0.45±0.07	0.34±0.02
30	0.56±0.05	0.44±0.05	0.40±0.04	0.43±0.03
60	0.48±0.02	0.46±0.04	0.49±0.06	0.45±0.01
120	0.38±0.05	0.47±0.04	0.36±0.03	0.53±0.03
240	0.51±0.06	0.61±0.02	0.62±0.04	0.69±0.04
480	0.60±0.07	0.69±0.01	0.69±0.01	0.84±0.09
960	0.68±0.06	0.83±0.04	0.73±0.06	1.07±0.03

**Tabela 19-** Atividade de MIPS em soja madura (U/g)

Doses de fósforo (ppm)	Low temperature		Hight temperature	
	A7002	Conquista	A7002	Conquista
15	0.34±0.02	0.23±0.01	0.24±0.02	0.28±0.01
30	0.28±0.02	0.24±0.01	0.27±0.02	0.28±0.02
60	0.27±0.02	0.30±0.01	0.29±0.01	0.27±0.02
120	0.29±0.01	0.32±0.01	0.20±0.01	0.33±0.03
240	0.36±0.01	0.37±0.01	0.38±0.01	0.39±0.01
480	0.52±0.01	0.47±0.01	0.52±0.02	0.51±0.03
960	0.55±0.01	0.58±0.01	0.59±0.02	0.67±0.02

**Tabela 20 -** Atividade de fitase em soja 40 dias após a floração (U/g)

Doses de fósforo (ppm)	Low temperature		Hight temperature	
	A7002	Conquista	A7002	Conquista
15	0.65±0.04	0.42±0.04	0.26±0.04	0.33±0.06
30	0.71±0.03	0.43±0.04	0.23±0.03	0.29±0.03
60	0.52±0.06	0.23±0.03	0.38±0.02	0.35±0.04
120	0.72±0.02	0.30±0.01	0.14±0.00	0.46±0.05
240	0.38±0.01	0.46±0.04	0.19±0.02	0.52±0.00
480	0.55±0.03	0.42±0.03	0.37±0.02	0.41±0.03
960	0.69±0.01	0.44±0.03	0.36±0.03	0.47±0.01

**Tabela 21** - Atividade de fitase em soja madura (U/g)

Doses de fósforo (ppm)	Low temperature		High temperature	
	A7002	Conquista	A7002	Conquista
15	0.69±0.01	0.85±0.01	0.84±0.06	1.03±0.00
30	0.65±0.02	0.87±0.04	0.78±0.03	0.88±0.02
60	0.55±0.04	0.97±0.01	0.92±0.05	1.07±0.02
120	0.67±0.02	0.95±0.01	0.97±0.02	1.02±0.04
240	0.82±0.01	0.84±0.10	0.95±0.06	0.99±0.08
480	0.86±0.03	0.86±0.13	0.95±0.02	1.00±0.06
960	0.82±0.02	1.00±0.11	0.99±0.02	0.85±0.06