



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA – PPGBOT**

**Análise de fluxos metabólicos em plântulas de soja (*Glycine max* (L.) Merr)**

**Aluno:** Janderson Moraes de Lima

**Orientador:** Thomas Christopher Rhys Williams

Brasília, DF

Agosto/2018

## Sumário

1.	INTRODUÇÃO .....	4
2.	REVISÃO DE LITERATURA .....	6
2.1	A Soja ( <i>Glycine max</i> (L.) Merr).....	6
2.2	Germinação e crescimento inicial .....	7
2.3	Análise de metabolismo utilizando experimentos de marcação isotópica.....	8
2.4	Medição de incorporação de isótopos estáveis.....	10
2.5	Análise de fluxos metabólicos em plantas .....	12
2.6	Experimentos de marcação isotópica e quantificação de fluxos em soja.....	14
3.	JUSTIFICATIVA .....	16
4.	OBJETIVOS.....	17
4.1	OBJETIVO GERAL .....	17
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
5.	HIPÓTESES.....	18
6.	MATERIAL E MÉTODOS .....	19
6.1	Material Vegetal.....	19
6.2	Crescimento Vegetal <i>in vitro</i> .....	19
6.3	Preparo das Amostras .....	22
6.4	Análise de Perfil Metabólico por CG-EM.....	22
6.5	Degradação de Amido em Glicose .....	24
6.6	Análise de Concentração da Solução de Cultivo .....	25
6.7	Análise de Ácidos Graxos .....	25
6.8	Análise de Nitrogênio Total e Proteínas.....	26
6.9	Análise de Açúcares Solúveis .....	26
6.10	Análise de Fluxos Metabólicos.....	27
7.	RESULTADOS .....	28
7.1	Crescimento Vegetal .....	28
7.2	Absorção de Glicose Marcada.....	30
7.3	Composição da Biomassa.....	31
7.4	Identificação de compostos por CG-EM.....	32
7.5	Verificação de estado isotópico estacionário .....	33
7.6	Análise dos isotopômeros dos fragmentos mais abundantes .....	34
7.7	Análise de fluxos metabólicos.....	38

8.	DISCUSSÃO .....	47
8.1	Crescimento de plântulas de soja <i>in vitro</i> .....	47
8.2	Composição da Biomassa .....	48
8.3	Estado estacionário de marcação isotópica .....	49
8.4	Isotopomeros dos fragmentos .....	50
8.5	Síntese de açúcares .....	52
8.6	Degradação de lipídeos .....	54
8.7	Via de pentose fosfato e ciclo do ácido tricarboxílico.....	54
8.8	Síntese de aminoácidos.....	55
9.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	57
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58
	ANEXO I – Modelo para plântula de soja .....	67
	ANEXO II – Tabela com os cinco melhores resultados de simulação.....	106

## 1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merr) é uma leguminosa vinda do oriente asiático (Hymowitz, 1970) e pertencente à família Fabaceae. Possui grande importância econômica no mercado mundial. A produção de sementes e produtos derivados de soja tem crescido muito nos últimos anos, colocando o Brasil como maior exportador mundial (Embrapa, 2014; Conab, 2017; USDA, 2017). Um dos motivos para sua produção é seu valor nutricional, pois possui reservas de carboidratos, proteínas e lipídios (Karr-Lilienthal et al., 2005).

Para a cultura de soja, assim como qualquer outro vegetal, a germinação e crescimento inicial desempenham um papel vital para o desenvolvimento da planta adulta. As reservas contidas nas sementes vão garantir uma germinação eficiente e que a plântula se desenvolva até que tenha capacidade fotoautotrófica. Em soja, as reservas encontradas nas sementes com mais abundância são as proteínas, carboidratos e lipídios (Henning et al., 2010; Han et al., 2013). Essas reservas serão utilizadas para produção de energia e biomassa dos tecidos da plântula (Brown & Huber, 1987). As maiores partes das reservas estão localizadas nos cotilédones que além de transferir reservas energéticas, previamente armazenadas para os tecidos da plântula, possuem ainda a capacidade de realizar fotossíntese, fornecendo fotoassimilados (Thomas & Costa, 1993; Henning et al., 2010).

Para entender melhor como as reservas da semente são utilizadas pela plântula é importante estudar o metabolismo do vegetal, os metabólitos produzidos e vias metabólicas ativas estão bastante relacionados com características fisiológicas e fenotípicas do organismo (Ratcliffe & Shachar-Hill, 2005; Kruger & Ratcliffe, 2012). Ao se estudar o metabolismo é importante determinar os fluxos metabólicos de uma rede, pois os fluxos representam melhor o fenótipo metabólico do organismo do que apenas os tipos e quantidades dos metabólitos em si. Fluxos podem ser determinados utilizando duas abordagens diferentes de estudo: a análise de fluxo metabólico no estado estacionário (MFA), que é quando um substrato marcado com isótopos é fornecido e absorvido pela planta, até que a presença dos isótopos e sua distribuição, seja constantemente no metabolismo vegetal (Wiechert et al., 2001; Ratcliffe & Shachar-Hill, 2006; Kono et al., 2009); e a análise de balanços de fluxo (FBA), que prediz os

fluxos que estariam ocorrendo naquela rede metabólica a partir da identificação e quantificação dos metabólitos de entrada e saída da rede (Sweetlove et al., 2013).

Em MFA geralmente são utilizados isótopos de carbono 13 (C13) -isótopos estáveis- (Ratcliffe & Shachar-Hill, 2006). O C13 é integrado ao substrato que será utilizado para nutrir o tecido vegetal. Esse substrato marcado (rotulado) é incorporado pelo vegetal e o isótopo é distribuído entre as várias moléculas intermediárias nas vias metabólicas, possibilitando sua detecção posteriormente (Wiechert et al., 2001; Sauer, 2006). A detecção de C13 pode ser feita por dois métodos principais: a espectrometria de massa ou ressonância magnética nuclear, ou a combinação dos dois métodos (Schmidt, 1997; Wiechert et al., 2001; Yang et al., 2002; Zamboni, 2011). Comparando os dados de marcação isotópica, obtidos com os métodos de detecção citados, com dados simulados por um software, através de um modelo metabólico (Weitzel et al., 2013), é possível quantificar os fluxos na rede metabólica (Ratcliffe & Shachar-Hill, 2006; O'Grady et al., 2012).

Utilizar abordagens de estudo como o MFA pode gerar conhecimento sobre os fluxos metabólicos de uma planta. Tendo em vista a importância econômica da soja, principalmente na agricultura brasileira, e a relevância que a mobilização de reservas tem para o sucesso e crescimento inicial da planta, no presente trabalho nos calculamos os fluxos metabólicos em plântulas de soja, com experimentos de marcação isotópica, a fim de entender e quantificar os fluxos metabólicos no processo de mobilização de reservas. As informações obtidas a partir desta pesquisa podem enriquecer a pesquisa botânica, a nível bioquímico em plântulas, e a agrônômica.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A Soja (*Glycine max* (L.) Merr)

A soja é uma planta pertencente à família Fabaceae (também conhecida como leguminosa), que começou a ser cultivada no nordeste do continente Asiático, inicialmente no norte da China. No século XX a Indonésia, China, Japão e Coréia eram os maiores produtores dessa espécie (Hymowitz, 1970). No Brasil, essa cultura chegou por volta de 1940, no Rio Grande do Sul (Embrapa, 2014) e rapidamente seu cultivo foi espalhando pelo território nacional

O Brasil é um dos principais produtores de soja (*Glycine max* (L.) Merr) no mundo, e a agricultura brasileira de soja se destaca no cenário comercial (Embrapa, 2014). Dados da Companhia Nacional de Abastecimento (2019) mostram que o país é o segundo maior produtor de soja no mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos. Porém a perspectiva para o ano de 2020 é que o Brasil supere os Estados Unidos (USDA, 2019). A safra de 2018/2019 teve uma produção superior a 100 milhões de toneladas e no mês de maio (2019) o Brasil exportou aproximadamente 11 milhões de toneladas de soja (Conab, 2019; USDA, 2019).

Um dos motivos para a produção de soja está no seu valor nutricional, pois os seus grãos contêm uma grande quantidade de proteína (que possuem todos os aminoácidos essenciais) e óleo (Assefa et al., 2018). Os farelos de soja são utilizados na alimentação animal e, além disso, vários produtos utilizados pelo homem são feitos à base de soja: óleo vegetal, grãos tostados, leite de soja, biocombustível, sobremesas e molho de soja (Missão, 2006; Assefa et al., 2018). Em soja, as principais reservas encontradas nas sementes são os carboidratos, as proteínas e os lipídios (Han et al., 2013), uma semente de soja tem aproximadamente 35% de carboidratos, desses 5% são de galactooligosacarídeos, 37% de proteína, 18% de lipídios e 6% de fibra (Karr-Lilienthal et al., 2005).

Outra vantagem de se cultivar soja, é que suas sementes possuem alto vigor. O vigor é uma propriedade da semente que determina seu potencial de emergência. Uma semente vigorosa tem longevidade (não perde sua capacidade de germinação facilmente em decorrência do tempo), germinação rápida, uniforme e gera plântulas que se desenvolvem sob condições ambientais diversas (Rajjou et al., 2012). Alguns cultivares

de soja têm 95% de germinação e 94 de emergência (Kolchinski et al., 2006). Sementes vigorosas têm mais chances de germinarem e gerarem plântulas.

Assim como a soja, outros membros da família Fabaceae são muito cultivados pelo mundo. O Sucesso no cultivo das Fabaceae se deve, em grande parte, a sua capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico, por simbiose com *Rhizobium*. Isso reduz os gastos com fertilizantes nitrogenados e faz com que a plantação seja mais sustentável. Cerca de 21 milhões de toneladas de nitrogênio é fixado anualmente pelas leguminosas (Foyer et al., 2016). Além disso, é uma família com diversidade de espécies, sendo a terceira maior família de angiosperma do planeta, apresentam distribuição global e contem um grande número de plantas domesticadas pelo homem, como: soja, feijão, amendoim, lentilha, grão de bico, ervilha, alfafa, dentre outras culturas (LPWG 2013). As leguminosas são responsáveis por um terço de toda a proteína utilizada na alimentação humana (Varshney et al., 2009).

## **2.2 Germinação e crescimento inicial**

A germinação é um processo fisiológico complexo e importante para o sucesso da planta, as reservas contidas nas sementes são de vital importância nessa etapa. Quanto maior o teor de reservas nas sementes, maiores são as chances das plântulas se desenvolverem com vigor (Henning et al., 2010).

As proteínas de reserva de sementes de soja são armazenadas durante a maturação e são hidrolisadas em aminoácidos livres durante a germinação e crescimento inicial (Tan-Wilson & Wilson, 2011), através da ação de proteases (Han et al., 2013). Esses aminoácidos serão utilizados, na maior parte, para biossíntese de novas proteínas e o restante para produção de energia. O carbono, para produção de biomassa e energia, também pode vir dos carboidratos presentes na semente (Brown & Huber, 1987). Os ácidos graxos contidos no óleo são mobilizados através da ação de lipoxigenases e processo de beta-oxidação, que atuam junto com o ciclo de glioxilato produzindo moléculas intermediárias para o ciclo do ácido tricarbóxico e eventualmente carboidratos via gliconeogênese (Han et al., 2013).

Durante o crescimento inicial da planta os cotilédones de soja fornecem energia para a plântula, tanto com a translocação de reservas do tecido cotiledonar para os demais órgãos (Henning et al., 2010) como na produção de compostos via fotossíntese (Thomas

& Costa, 1993). Durante a vida funcional dos cotilédones, de todos os assimilados transportados a partir desse tecido, 75% são oriundos da função fotossintética, que começa no sexto dia após o plantio (Brown & Huber, 1987). O cotilédone auxilia no crescimento da soja até o 11° dia após a germinação, a perda de um ou dos dois cotilédones influencia na produção fotossintética e na disponibilidade de reservas, essa perda faz com que as plântulas tenham uma menor disponibilidade de nutrientes (Thomas & Costa, 1993).

Nos diferentes estágios de vida de uma planta, há alterações nos fluxos das vias metabólicas e nos metabólitos produzidos (Moreira et al., 2019a). Nos diferentes estágios de desenvolvimento de uma semente também, por exemplo, em *Arabidopsis*, na fase de maturação das sementes, há uma acumulação de açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos, sugerindo a formação de reservas de armazenamento, porém na fase de germinação esses metabólitos diminuíram em quantidade e outras moléculas distintas começaram a ser produzidos (Fait et al., 2006). As principais vias do metabolismo primário, que passam por regulação e ativação durante a germinação e desenvolvimento inicial do vegetal, são: a via da glicólise, da  $\beta$ -oxidação, da pentose-fosfato, o ciclo do glioxilato e o ciclo do ácido tricarboxílico (Meyer et al., 2007; He et al., 2011; Rosental et al., 2014).

### **2.3 Análise de metabolismo utilizando experimentos de marcação isotópica**

Para estudar o funcionamento de um organismo é importante compreender a relação que ele possui com o meio em que habita. Diferentes rotas dentro da rede metabólica são utilizadas dependendo do estímulo que o ambiente exerce sobre a planta, formando diferentes metabólitos como resposta (Kruger & Ratcliffe, 2012). Por exemplo, estudos com células de *Arabidopsis* concluíram que as células apresentaram fenótipos e metabolismos diferentes, dependendo da forma em que o nitrogênio estava disponível no meio (Masakapalli et al., 2013). Uma forma de entender o fenótipo de uma planta é analisando o comportamento e regulação de sua rede metabólica. Os fluxos metabólicos, dentro da mesma rede, compõem fenótipos metabólicos que estão associados à função celular (Ratcliffe & Shachar-Hill, 2005; Kruger & Ratcliffe, 2012, Moreira et al., 2019a).

Experimentos de marcação isotópica permitem entender melhor o que está acontecendo no metabolismo da planta. Essas técnicas foram importantes para compreender, por exemplo, de forma, geral a fixação de carbono pela fotossíntese (Bender, 1971), o funcionamento do ciclo de Calvin e seus intermediários (Whelan & Sackett, 1970; Kent et al., 1974), o funcionamento do ciclo do ácido tricarbóxico em tecidos específicos da planta (Harley & Beevers, 1963) e a síntese de carboidratos (Canvin & Beevers, 1961).

Para que a marcação isotópica ocorra, substratos rotulados com isótopos (átomos do mesmo elemento químico com número de nêutrons diferentes) são fornecidos para um organismo. Esses isótopos devem ser absorvidos e distribuídos pela rede metabólica do organismo. Os compostos que receberem os isótopos poderão ser detectados, tornando possível o mapeamento da distribuição do isótopo pela rede metabólica, estando o isótopo em moléculas intermediárias ou em produtos metabólicos (Wiechert et al., 2001; Sauer, 2006). Em células de plantas, essa técnica pode ser usada, juntamente com outras técnicas como a fragmentação não aquosa e informações descritas na literatura, para distinguir entre fluxos no citosol, mitocôndria e plastídios (Wiechert et al., 2001; Ratcliffe & Shachar-Hill, 2006; Kono et al., 2009; Moreira et al., 2019a), observar o fluxo metabólicos de carbono e nitrogênio no desenvolvimento de embriões (Allen & Young, 2013) ou analisar os impactos metabólicos causados por contaminações por chumbo e cádmio no solo (Wang et al., 2015). A técnica também pode ser utilizada para compreender o funcionamento de uma rede metabólica, gerando informações que ajudam na manipulação o metabolismo (Schwender, 2008), e no entendimento de vias metabólicas no processo de fermentação (Ismond et al., 2003), na análise de moléculas produzidas em diferentes condições de seca, salinidade e temperatura (Krasensky & Jonak, 2012) e por mutantes gênicos (Lonien & Schwender, 2009).

A marcação isotópica pode ser feita com radioisótopos ou isótopos estáveis. Os radioisótopos possuem grande sensibilidade de detecção e são mais empregados quando não há necessidade de detectar a posição do átomo marcado dentro da molécula, apenas a molécula, ou classe de moléculas, em geral (Ratcliffe & Shachar-Hill, 2006). O carbono 14 ( $C^{14}$ ) é um radioisótopo utilizado em vários trabalhos de mapeamento de fluxo metabólico em plantas; por exemplo, Hill & ap Rees (1994), utilizaram marcação com  $C^{14}$  em carboidratos, em bananas, para analisar o metabolismo e catabolismo de carboidratos durante o período de maturação das bananas, observando que os maiores fluxos estão relacionados com a produção de sacarose e com a produção de hexoses

vindas da degradação de amido. Em milho, experimentos para mapear a migração de nutrientes da parte aérea da planta para a raiz, após a herbivoria, foram possíveis utilizando C14 na molécula de CO<sub>2</sub> absorvida via os estômatos, os dados mostraram que quando há o ataque de predadores o carbono da parte aérea é transferido e alocado nas raízes (Dieuaide-Noubhani et al., 1995; Holland et al., 1996).

Em soja, radioisótopos foram empregados em trabalhos de translocação e armazenamento de açúcares nos tecidos vegetais (Nelson & Goham, 1957) e na medição do tempo de translocação de CO<sub>2</sub> das folhas para as raízes (Nelson et al., 1959). O monitoramento de absorção de ferro e agentes quelantes, por plantas de soja, foi feito utilizando di etilenodiamina com Fe55 e C14 (Tiffin & Brown, 1961).

Isótopos estáveis também podem ser utilizados na rotulagem. O carbono 13 (C13) é um átomo muito empregado em experimentos de mapeamento de redes metabólicas. Diferente do C14, a utilização de C13 em conjunto com métodos de detecção específicos, permite a detecção da posição do átomo rotulado dentro da molécula (1-C13, 2-C13, etc) (Wiechert et al., 2001).

#### **2.4 Medição de incorporação de isótopos estáveis**

Para medir a incorporação de C13 em metabólitos celulares, são utilizados dois métodos principais de detecção: a espectrometria de massa (EM), a ressonância magnética nuclear (RMN), ou até mesmo a combinação desses dois métodos (Schmidt, et al., 1997; Wiechert et al., 2001; Yang et al., 2002; Sauer, 2006; Zamboni, 2011; O'Grady et al., 2012). As moléculas contendo isótopos são identificadas e é medida a quantidade de incorporação desse isótopo, bem como a sua posição dentro da molécula.

Vários isótopos estáveis possuem características magnéticas que os diferem de outros átomos, e essa característica permite que moléculas com esses rótulos sejam identificadas por RMN e diferenciadas das moléculas que não foram marcadas, além de permitir que a posição do isótopo dentro da molécula seja detectada (Ratcliffe & Shachar-Hill, 2005). Detecção de C13 por RMN é comum, sendo que cada átomo de C13 gera um sinal espectroscópico que é detectado no meio de diferentes metabólitos, permitindo que esse sinal funcione como uma “impressão digital” que distingue a molécula marcada das demais (Ratcliffe & Shachar-Hill, 2001). O C13 ligado a outros átomos, como o hidrogênio, também pode gerar um par de sinais diferentes, que são

identificados e correlacionados para permitir a quantificação da incorporação do C13 (Rontein et al., 2002). RMN é bastante utilizada em misturas de extratos complexos já que consegue distinguir as moléculas marcadas com isótopos das demais (Krishnan et al., 2005).

A EM também representa um método analítico importante para análise de metabólitos marcados isotopicamente. Essa técnica tem por princípios detectar moléculas e os seus fragmentos através da ionização, caracterizando e relacionando a razão de massa/carga dos íons das moléculas (Ratcliffe & Shachar-Hill, 2006; O'Grady et al., 2012). EM pode ser acoplada com cromatografia gasosa (CG), líquida (CL), eletroforese capilar (EC) ou RMN (Dunn & Ellis, 2005). A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) possui protocolos estabelecidos e disponibilidade de bibliotecas para análise de vários compostos (Schauer et al., 2005). Além disso, esse método de análise tem eficiência na resolução e separação de moléculas e, tipicamente, possui sensibilidade maior que a RMN, segundo alguns autores (Ratcliffe & Shachar-Hill, 2006).

A análise por CG-EM é feita passando amostras em fase gasosa por uma coluna. Cada molécula que passa pela coluna fica retida por um tempo, e esse tempo de retenção depende das características da molécula, como massa, tamanho e afinidade pela fase estacionária da coluna. Conforme as moléculas separadas vão saindo da coluna, elas passam por um EM (espectrômetro de massas) onde serão ionizadas e terão sua massa/carga caracterizada. Um computador utiliza os dados de massa/carga das moléculas caracterizadas pelo EM para comparar com moléculas com massa/carga já conhecidas, numa biblioteca desenvolvida para a identificação de moléculas biológicas (Schauer et al., 2005; Ratcliffe & Shachar-Hill, 2006; O'Grady et al., 2012). Moléculas que receberam C13 tem sua massa/carga maior do que moléculas sem C13, comparando a diferença de massa/carga é possível saber quantos átomos de C13 foram incorporados naquela molécula ou fragmento de molécula.

Os compostos analisados por CG precisam ter a capacidade de se tornarem voláteis sob altas temperaturas submetidas pelo injetor do aparelho (Roessner et al., 2000) ou por tratamento com reagentes químicos, que geralmente atuam nas moléculas de interesse, deixando-as voláteis (Kanani et al., 2008). Esse fato impede alguns metabólitos de serem analisados por CG (Villas-Bôas et al., 2005). Apesar desta limitação, a técnica por CG-EM é muito utilizada para a pesquisa de metaboloma em plantas com enfoque na identificação e quantificação dos metabolitos envolvidos nas

vias centrais do metabolismo primário como, álcoois de açúcar, ácidos orgânicos, aminoácidos e poliaminas (Schauer & Fernie, 2006).

A análise por CG-EM tem sido utilizada, por exemplo, para entender como o estresse por enxofre afeta o metabolismo de *Arabidopsis thaliana* (Dunn & Ellis, 2005) e para analisar a influência que a contaminação de metais pesados, como o chumbo e o cádmio, causa no ciclo do ácido cítrico em raízes de rabanetes (Wang et al., 2015). Também foi utilizada na identificação de compostos metabólicos produzidos em fragrância de flores, com função de defesa ou atração de polinizadores (Anderson et al., 2002; Dortterl et al., 2005; Cai et al., 2014). Num estudo de tabaco, em diferentes regiões da China, os metabólitos primários e secundários das folhas foram relacionados com a origem geográfica das populações da planta (Zang et al., 2013). Análises de comparação de metabólitos, usando CG-EM, na via do ácido tricarbóxico, foram realizadas entre duas espécies de Apocynaceae com valor medicinal (Chen et al., 2017).

## **2.5 Análise de fluxos metabólicos em plantas**

O objetivo principal ao se analisar os fluxos de uma rede metabólica é entender como esses fluxos explicam os fenótipos metabólicos observados, combinando esse conjunto de fluxos num mapa de distribuição de metabolismo (Kromer et al., 2004; Ratcliffe & Shachar-Hill, 2005). Esse mapa metabólico de fluxos permite compreender e determinar as reações bioquímicas, qualitativamente e quantitativamente, que ocorrem num organismo (O'Grady et al., 2012).

Há duas formas principais de analisar a relação entre fluxo metabólico e o fenótipo observado: rotular um composto e monitorar sua distribuição na rede (marcação isotópica), ou construir um modelo (análises computacionais e estatísticas) que prevê como seria a distribuição de fluxos. Essas duas formas de entender a distribuição das vias metabólicas, analisadas em conjunto, geram mais informações sobre os fluxos metabólicos (Kruger & Ratcliffe, 2012).

O método de predição de fluxos metabólicos mais utilizados atualmente é a análise de balanços de fluxo (FBA), um método com potencial de prever a taxa de cada reação na rede metabólica sob determinada condição (Sweetlove et al., 2013). A partir da identificação dos metabólitos de entrada e saída de uma rede, é possível prever as taxas das reações dentro da rede metabólica (Orth et al., 2010). Esse método pode considerar

informações genômicas que sugerem a atividade de enzimas que estão diretamente ligadas ao metabolismo (Dal'Molin & Nielsen, 2013).

Apesar de ser um bom método para previsão o FBA não consegue quantificar os fluxos metabólicos diretamente. A quantificação de fluxos pode ser feita através de uma análise isotópica dinâmica de fluxos metabólicos (DMFA) ou uma análise de fluxos no estado estacionário (MFA).

Na rotulagem dinâmica de fluxo, os fluxos metabólicos são medidos analisando o tempo e curso em que a molécula marcada é distribuída na rede metabólica (Ratcliffe & Shachar-Hill, 2006) e, geralmente, os fluxos são medidos através da análise de vários extratos de tecidos em tempos diferentes ou com o uso de ressonância magnética nuclear *in vivo*. Esse tipo de rotulagem é mais utilizado para quantificar fluxos em redes de pequena escala (Roscher et al., 2000; Matsuda et al., 2003) e para organismos autotróficos (Ratcliffe & Shachar-Hill, 2006), mas necessita de uma análise matemática dos dados complexa.

Outro método utilizado é a rotulagem em estado estacionário. Neste método, os fluxos são determinados quando o metabolismo atinge um estado estacionário isotópico em que o rótulo esteja presente e distribuído nas vias da rede e a sua distribuição não varie ao longo do tempo (Wiechert, 2001). Para que isso aconteça, o substrato marcado deve ser fornecido continuamente (Roscher et al., 2000), e o tempo de fornecimento do substrato rotulado pode variar de minutos a horas (para identificação em intermediários moleculares de baixo peso) até dias a semanas (em macromoléculas mais complexas) (Schwender et al., 2003; Sriram et al., 2004; Ratcliffe & Shachar-Hill, 2006).

Os dados de incorporação isotópica são aplicados em programas computacionais que fazem ajustes matemáticos e interpretações, estimando os fluxos metabólicos no organismo estudado (Ratcliffe & Shachar-Hill, 2006; Sauer, 2006). Os fluxos medidos e mapeados contribuem para conhecer melhor o estado celular, funções de genes e proteínas, toxicidade de drogas e outros processos biológicos (Sauer, 2006; Zamboni, 2011).

Para se determinar os fluxos, primeiro é preciso estabelecer um modelo no software de análise, baseado em equações matemáticas e informações de conhecimento prévio sobre o metabolismo da espécie estudada. O modelo escolhido produz dados simulados, que correspondem a uma distribuição específica de fluxos, indicando como deveriam ser as rotas e fluxos e esses dados simulados podem ser alterados quando se modifica os fluxos no modelo.

Os dados simulados pelo modelo são então comparados com os dados reais obtidos pela detecção do isótopo por RMN ou EM. Com base nessa comparação, os fluxos são ajustados por softwares até que os dados gerados pelo modelo sejam o mais semelhante possível com os dados reais observados. Os fluxos mais prováveis para aquela rede serão aqueles que mais aproximaram os dados simulados pelo modelo com os dados reais (Ratcliffe & Shachar-Hill, 2006; O'Grady et al., 2012; Antoniewicz 2015). A determinação dos fluxos exige uma combinação de modelagem matemática, processamento de dados e estatística (Quek et al., 2009; Weitzel et al., 2013).

O MFA tem gerado resultados com relevância para entender as respostas metabólicas de plantas. Experimentos de marcação, utilizando C13 em milho, foram importantes para entender os fluxos que geram a síntese de ácidos graxos (Alonso et al. 2010). Alimentando cianobactérias com substrato de C13 glicose, foi possível determinar os fluxos na via de pentose fosfato e através do ciclo de Calvin, em diferentes condições de cultivo da cultura (Yang et al., 2002). Em tabaco, um estudo de fluxo metabólico com glicose marcada (1-13C, 2-13C, 13C<sub>6</sub>) investigou a síntese de geraniol e geraniol glicosídeo (percussores para a produção de metabólitos secundários) em linhagens transgênicas (Masakapalli et al., 2014b). Suspensão de células heterotróficas de *Arabidopsis thaliana*, em diferentes concentrações de oxigênio, tiveram seus fluxos metabólicos medidos utilizando glicose marcada com C13, possibilitando observar diferenças no perfil metabólico de ácidos orgânicos, aminoácidos e carboidratos, e equilíbrio entre a biossíntese e a respiração dentro do ciclo do ácido tricarbóxico, nos diferentes tratamentos de oxigênio (Williams et al., 2008).

## **2.6 Experimentos de marcação isotópica e quantificação de fluxos em soja**

Experimentos com marcação isotópica foram realizados com soja para entender melhor a produção de metabólitos essenciais para o desenvolvimento do vegetal e o funcionamento do seu metabolismo primário, ou seja, carbono utilizado para produção de energia e biomassa. Para identificar o efeito do nível de luz sobre embriões de soja, carboidratos e aminoácidos rotulados foram disponibilizados aos embriões, e os padrões de rotulagem, fluxos de captação, fluxo de biomassa e fluxos respiratórios, foram estudados. Os resultados encontrados correlacionaram a disponibilidade de luz com a

produção de ATP, a eficiência da conversão de carbono para geração de 3-fosfoglicerato, e que a síntese de ácidos graxos é feita por uma grande contribuição de carbono vindos de aminoácidos (Allen et al., 2009).

Em outro estudo, óvulos de soja receberam  $^{13}\text{CO}_2$  durante três dias, esse C13 foi encontrado em açúcares e lipídios através do método de RMN, permitindo análises metabólicas para estimar o metabolismo de açúcares, taxa de síntese lipídios e utilização de derivados de glicose pela via de pentose fosfato (Schaefer et al., 1975).

Para estudar a síntese de grupos acilo e glicerol em culturas de oleaginosas, embriões de soja foram nutridos com acetato e glicerol com C14. Ao se analisar os fluxos desses substratos marcados, foi possível compreender a síntese de fosfolipídios e triacilglicerol (Bates et al., 2009). Ao estudar o fornecimento de carbono e nitrogênio das sementes de soja para o embrião, a fim de entender a produção de biomassa e o metabolismo do mesmo, diferentes carboidratos e aminoácidos marcados com C13 e C14 foram fornecidos aos embriões de soja. As análises revelaram que o suprimento de glutamina contribuiu com 10% a 23% do carbono utilizado na produção de biomassa e que o fluxo através da ATP-citrato-liase, combinado com a ação da enzima málica, teve representação significativa na produção de acetyl-coA (Allen & Young, 2013).

Os metabólitos solúveis, presentes nos nódulos de sojas senescentes sobre estresse induzido por escuridão, foram estudados *in vitro* por meio de RMN de C13. Observou-se uma queda na produção de açúcares e de aminoácidos (glicina, asparagina e alanina), um acúmulo de ureídes e um aumento de ácidos graxos insaturados, quando as plantas sofrem a indução de estresse por escuridão (Vauclare et al., 2010).

O efeito do aumento da temperatura na incubação *in vitro*, no metabolismo primário de soja foi avaliado utilizando-se C13. Os resultados indicaram que o acúmulo de biomassa aumenta juntamente com a temperatura e que a via oxidativa de fosfato pentose plastidial varia entre 57% a 77% no consumo de sacarose, quando há variação de temperatura (Iyer et al., 2008).

Portanto, embora existam vários estudos de marcação isotópica em soja, que têm contribuído para ampliar conhecimento sobre o metabolismo dessa espécie, a sua germinação e o seu crescimento inicial ainda não foram examinados por MFA requerendo um estudo maior com esse modo de análise. Isso permitirá que valores quantitativos sobre os fluxos sejam conhecidos, gerando mais informação e precisão na montagem de um mapa metabólico.

### **3. JUSTIFICATIVA**

Para que a planta chegue à fase adulta com vigor, ela depende imprescindivelmente de uma germinação e crescimento inicial que ofereça os compostos necessários para seu desenvolvimento. Entender quais vias metabólicas são mais utilizadas e desempenham atividades fundamentais no crescimento do organismo, pode esclarecer como as reservas são mobilizadas em plântulas de soja, uma leguminosa de importância econômica mundial e abundantemente cultivada no Brasil. A utilização do método MFA proporciona informações de quantificação dos fluxos metabólicos, permitindo conclusões mais refinadas sobre os fluxos utilizados e montagem de um mapa do metabolismo primário. Não há na literatura disponível informações sobre pesquisas utilizando MFA em plântulas de soja, visando entender a mobilização de reservas na sua fase inicial de crescimento, então a utilização dessa técnica é uma novidade para a cultura. Essas informações poderão ampliar o conhecimento sobre a cultura da soja, esclarecendo, fisiologicamente e bioquimicamente, como essas reservas estão sendo utilizadas pela planta em seu crescimento vegetal inicial, além de poder ajudar a entender o metabolismo na mobilização de reservas de outras espécies da família Fabaceae.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o metabolismo primário de plântulas de soja, no período de pós-germinação e crescimento inicial, visando compreender o processo de mobilização de reservas através de experimentos de marcação isotópica com carbono 13 (C13).

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Testar se o método de incorporação de isótopo de carbonos marcados em plântulas de soja é eficiente e proporcionar condições ideais para a germinação e crescimento inicial *in vitro*;
- Verificar o tempo necessário para que o metabolismo chegue a um estado isotópico e metabólico estacionário;
- Quantificar fluxos metabólicos, utilizando MFA, em plântulas de soja durante o crescimento inicial e comparar esses fluxos entre os tecidos do eixo hipocótilo/raiz e cotilédone;
- Propor as rotas metabólicas mais ativas durante o crescimento inicial;

## 5. HIPÓTESES

- É possível criar um sistema de germinação de sementes de soja, *in vitro*, com solução contendo carbono 13 que deverá ser incorporado nos tecidos da plântula;
- No quarto e quinto dia de crescimento as plântulas, de soja estarão num estado metabólico isotópico estacionário, baseado em experimentos prévios realizados;
- Os fluxos metabólicos em plântulas de soja podem ser quantificados, utilizando MFA, tanto no tecido do eixo hipocótilo/raiz quanto nos cotilédones;
- A rede metabólica do tecido cotiledonar é diferente da rede do tecido do eixo hipocótilo/raiz, por haver mais síntese em um tecido e mais degradação no outro, numa relação fonte e dreno.

## **6. MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.1 Material Vegetal**

As sementes de soja utilizadas são da variedade BR/MG46 (Conquista), não transgênica, e foram fornecidas pela empresa Shancap Sementes, Patos de Minas-MG, em 2018. As sementes ficaram armazenadas em câmara fria, com temperatura mantida em  $\pm 4$  °C, para assegurar a viabilidade da germinação.

### **6.2 Crescimento Vegetal *in vitro***

Foram montados dois experimentos semelhantes. No primeiro experimento (Exp. 1), a solução de cultivo em que as sementes germinaram não possuía glicose com carbono 13 (C13). No segundo experimento (Exp. 2), as sementes germinaram em solução de cultivo de glicose com C13. Para ambos os experimentos as soluções de cultivo foram formadas por água e glicose (25 mM), sendo essas soluções esterilizadas por autoclavagem.

A descontaminação das sementes de soja se deu por imersão em etanol 70% por um minuto, seguida de duas lavagens com água destilada esterilizada.

As placas de *Petri* de plástico (90x15mm) utilizadas foram forradas com papel filtro em seu interior. Três sementes de soja foram colocadas em cada placa. 20 mL de solução estéril, utilizada como fonte de carbono para as sementes, foram adicionados em cada placa, no dia da semeadura das sementes na placa. As placas foram vedadas com fita micropore, para evitar contaminação.

Nos demais dias de experimento foi reposto um volume de solução, como mostrado na Tabela 1. A reposição de solução é importante para garantir que sempre tenha glicose para a plântula, garantindo que esse composto seja incorporado no metabolismo vegetal numa taxa constante.

A solução foi reposta nas placas, em câmara de fluxo laminar, com uma seringa de 5 mL, através de um pequeno furo na tampa da placa, cada tampa de placa tinha cinco furos, eles também serviam para permitir a troca gasosa do interior da placa com o meio

externo, e foram tampados com micropore. As placas foram anexadas num agitador tipo “shaker” com agitação magnética de 65 rpm, permitindo que a solução formasse pequenas ondas que cobriam as sementes constantemente, com temperatura de 25 °C, sem a presença de luz e com fluxo de ar constante.

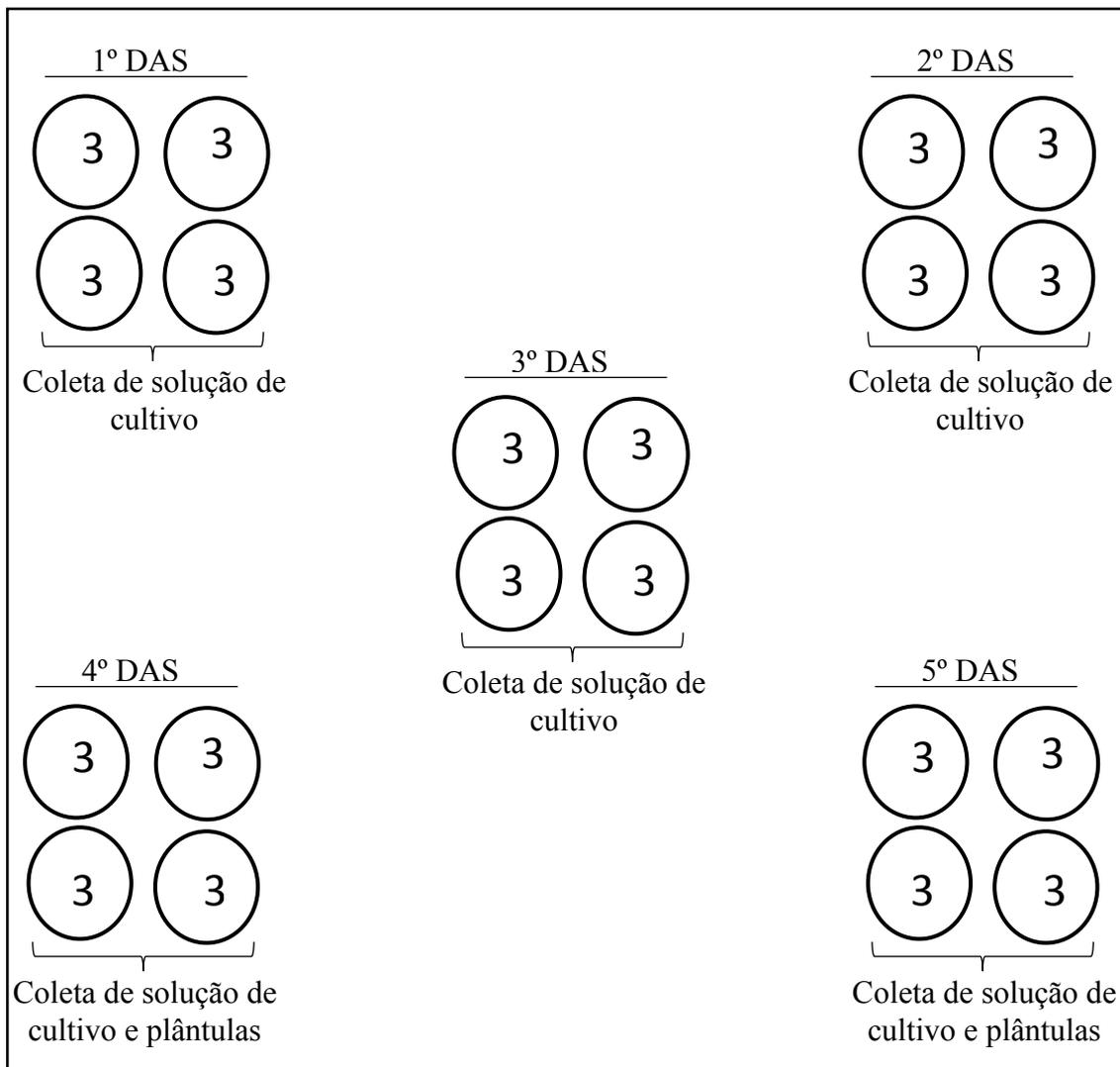
As plântulas que germinaram em solução de glicose sem C13 (Exp. 1), constituíram biomassa para as análises bioquímicas de: ácidos graxos, nitrogênio total (proteínas) e açúcares solúvel. No 4º e 5º dia após a semeadura (DAS) na solução de glicose, foram coletadas quatro placas, respectivamente, para análises bioquímicas da biomassa.

Além disso, foram coletados 2 mL da solução de cultivo, presente nas placas, para análise de concentração de glicose. Essa coleta foi feita no 1º, 2º, 3º, 4º e 5º DAS, quando a solução de quatro placas foi coletada. O delineamento experimental foi feito com 20 placas, cada uma contendo três sementes e cada placa constitui uma unidade amostral (Figura 1).

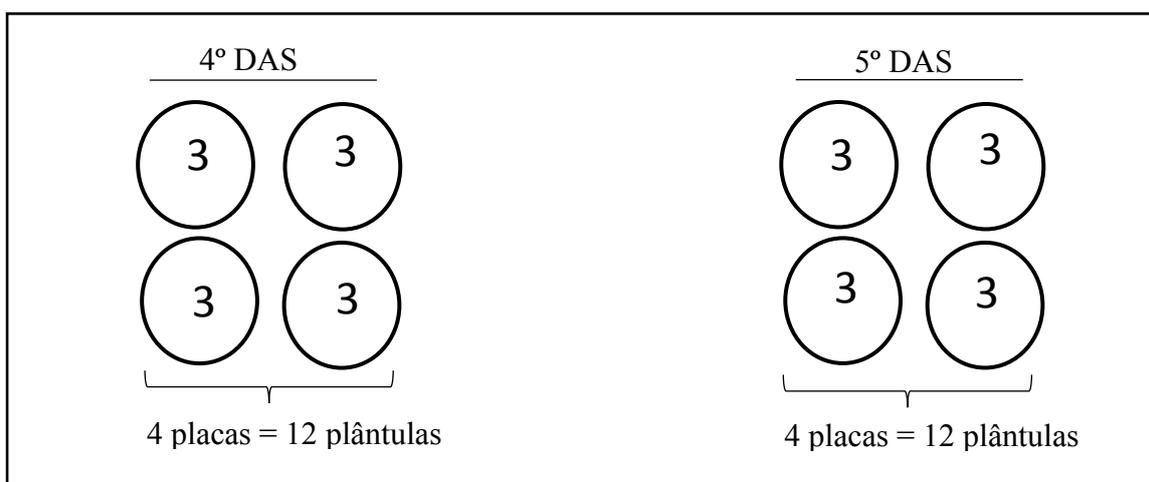
As plântulas germinadas em solução com glicose marcada com C13 (Exp. 2) proporcionaram biomassa para as análises de incorporação de C13 por CG-EM e degradação de amido em glicose. O experimento foi feito com oito placas, cada uma contendo três sementes, a placa constitui uma unidade amostral (Figura 2). Foram coletadas quatro placas, no 4º e 5º DAS, para análises bioquímicas.

**Tabela 1.** Volume repostado de solução de cultivo por placa nos diferentes dias após a semeadura (DAS)

DAS	Volume de solução adicionada (mL)
1	5
2	5
3	4
4	4
5	-----



**Figura 1.** Delineamento experimental, experimento com glicose sem C13(Exp. 1). Foram coletadas a solução de cultivo em todos os dias após a semeadura (DAS) e as plântulas do 4º e 5º DAS. Cada círculo representa uma placa contendo três plântulas de soja.



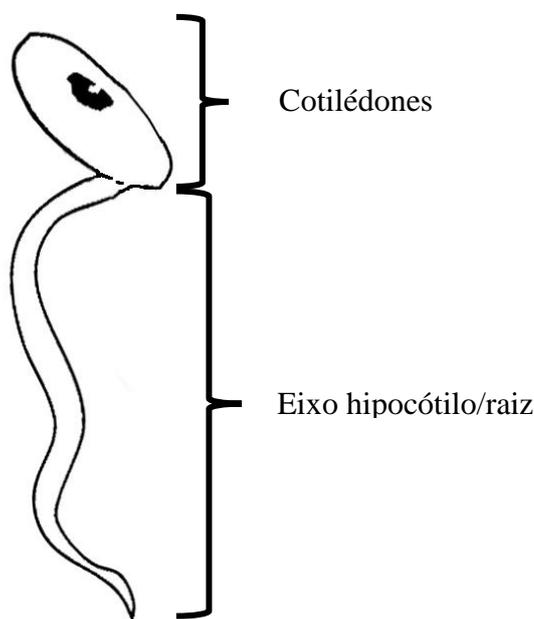
**Figura 2.** Delineamento experimental, experimento com glicose C13 (Exp. 2). Coleta apenas de plântulas, dois tempos de coleta diferentes: 4º dias após a semeadura (DAS) e 5º DAS. Cada círculo representa uma placa contendo três plântulas de soja.

### 6.3 Preparo das Amostras

As plântulas tiveram os cotilédones (o par) e o eixo hipocótilo/raiz coletados (Figura 3). As amostras de tecidos foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente, armazenadas em  $-80^{\circ}\text{C}$  para a liofilização.

Após o processo de liofilização, as amostras, dos dois tecidos, foram maceradas com pistilo, e armazenadas em tubos plástico de micro centrífuga de 2 mL, a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A solução de cultivo coletada foi armazenada em tubos plásticos (2 mL) a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 3.** Identificação dos diferentes tecidos coletados nas plântulas de soja.

### 6.4 Análise de Perfil Metabólico por CG-EM

Num tubo plástico de micro centrífuga de 2 mL, 10 mg de amostra de cada tecido liofilizado, foi adicionada juntamente com 1,4 mL de metanol PA (Sigma-Aldrich) e 60  $\mu\text{L}$  de solução de ribitol (Sigma-Aldrich) ( $0,2 \text{ mg/mL}^{-1}$  em água), essa mistura foi agitada em vortex por 10 s para que a amostra fosse ressuspensa. A mistura foi encubada num termoagitador a 1000 g e  $70^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Após o aquecimento, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 10000 g. Do material centrifugado, 750  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferido para um tubo novo, onde foram adicionados 375  $\mu\text{L}$  de

clorofórmio a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $750\text{ }\mu\text{L}$  de água ultra pura a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Essa nova mistura foi agitada em vortex por 10 s e, posteriormente, centrifugada por 10 min a  $2200\text{ g}$ . Uma alíquota de  $150\text{ }\mu\text{L}$  da fase superior de cada amostra foi transferida para um novo tubo, essa alíquota foi seca em concentrador à vácuo a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 h. As amostras foram armazenadas à temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o processo de derivatização (Lisec et al., 2006).

Antes da derivatização, as mostras foram secas novamente no concentrador à vácuo a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 min, para que toda a água nas paredes do tubo e na amostra fosse retirada. Com a remoção de água realizada, o processo de derivatização começa adicionando à amostra  $40\text{ }\mu\text{L}$  de cloridrato de metoxiamina (Sigma-Aldrich) à  $20\text{ mg/ml}$  em piridina PA, seguida de agitação em placa aquecedora com agitador, por 2 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $900\text{ G}$ . O tubo foi centrifugado por 10 s para remover a condensação das tampas, após essa centrifugação,  $70\text{ }\mu\text{L}$  de N-Methyl-N-Trimethylsilyl trifluoroacetamide (MSTFA) (Sigma-Aldrich) foi adicionado à amostra. A amostra ficou em placa aquecedora com agitador, durante 30 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com agitação constante de  $900\text{ g}$ .

Em seguida,  $100\text{ }\mu\text{L}$  de amostra foi inserida em um microtubo de vidro (inserts) para análise no aparelho de CG-EM, seguindo protocolo de Lisec et al., (2006). Dos  $100\text{ }\mu\text{L}$  de amostra presente no microtubo de vidro,  $1\text{ }\mu\text{L}$  foi injetado no cromatógrafo gasoso (CG) com modo scan e SIM a  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em duas proporções 10:1 e 30:1. A amostra foi carregada pelo gás hélio com fluxo de  $0,6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Parâmetros da cromatografia gasosa: a coluna utilizada foi do tipo capilar HP-5MS com 30 m de comprimento,  $0,25\text{ mm}$  de diâmetro e  $0,25\text{ }\mu\text{m}$  de espessura da fase estacionária. O forno do CG iniciou o aquecimento da amostra a uma temperatura de  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 min, seguido de um aumento de  $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até atingir a temperatura de  $330\text{ }^{\circ}\text{C}$ , que foi mantida por 10 minutos. Parâmetros do espectrômetro de massas: o intervalo de faixa de massa foi de  $m/z\ 70$  para  $m/z\ 600$  e a corrente de polarização do filamento foi de  $-70\text{ V}$ . O detector de voltagem foi de aproximadamente  $1700\text{-}1850\text{ V}$ .

## 6.5 Degradação de Amido em Glicose

Para extração do amido, foram utilizados os resíduos de biomassa da extração metanólica do tópico 6.4, livres de açúcares solúveis. À amostra foi adicionado 450  $\mu\text{L}$  de enzima  $\alpha$ -amilase termostável de *Bacillus licheniformis*, ( $120\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  em tampão fosfato pH 6,5), seguida de homogeneização pelo vortex por 10 s. A amostra ficou encubada por 30 min a  $75\text{ }^\circ\text{C}$ . Após a primeira incubação, foram adicionados novamente 450  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -amilase termostável e realizada uma nova incubação por igual período. Após a segunda incubação, 480  $\mu\text{L}$  de Amiloglucosidase de *Aspergillus niger* ( $30\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  em tampão acetato pH 4,5) foi adicionado à amostra, que foi novamente encubada por 30 min a  $50\text{ }^\circ\text{C}$ . Após a terceira incubação, foi acrescentado mais 480  $\mu\text{L}$  de Amiloglucosidase, a amostra foi agitada em vortex por 10 s, e encubada pelo mesmo período da última incubação. Por fim, 100  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico (Sigma-Aldrich) (0,8 M) foram adicionados ao tubo, seguido de centrifugação por 2 min a 10000 G (Amaral et al., 2007).

Para a quantificação de amido, 20  $\mu\text{L}$  de extrato, do final do processo de extração, foram pipetados em um poço de microplaca de espectrofotômetro (96 poços), seguidos de 300  $\mu\text{L}$  do reagente Glicose PAP Liquiform (CENTERLAB, Brasil) contendo as enzimas glicose-oxidase ( $\sim 11000\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e peroxidase ( $\sim 700\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),  $290\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de 4-aminoantipirina e 50 mM de fenol pH 7,5. Após 15 min da mistura do extrato com o reagente Glicose PAP, a concentração de glicose nos poços foi determinada por leitura da absorbância, através de um espectrofotômetro de microplaca com comprimento de onda de 510 nm. A curva padrão foi feita a partir de uma solução de glicose a 1 mg/mL, os pontos da curva tinham as seguintes concentrações: 50; 25; 12,5; 6,25 e 0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e foram pipetados com volume de 20  $\mu\text{L}$ , mais 300  $\mu\text{L}$  de reagente Glicose PAP, nos poços. Todas as leituras foram feitas em triplicatas.

Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  do extrato final do processo de extração, também foram secadas, derivatizadas e injetados no aparelho de CG-EM para análise e detecção de C13 na glicose liberada a partir da degradação de amido, conforme detalhado no tópico 6.4.

## 6.6 Análise de Concentração da Solução de Cultivo

Para analisar a concentração do meio de cultivo nos diferentes dias do experimento, foi utilizado o método de espectrometria, como descrito no segundo parágrafo do tópico 6.5 (Degradação de Amido em Glicose). Foram utilizados como amostra 20  $\mu\text{L}$  da solução de cultivo, coletada nos diferentes dias do experimento (1° ao 5° DAS).

Os volumes e tipos de reagentes, etapas do processo de espectrofotometria e curva de calibração, foram os mesmos descritos no segundo parágrafo do tópico 6.5. As leituras foram feitas em triplicatas.

## 6.7 Análise de Ácidos Graxos

Foram utilizados 10 mg de biomassa seca para as amostras do eixo hipocótilo/raiz e 5 mg para as amostras do tecido cotiledonar. As amostras foram depositadas num microtubo de vidro (2 mL) e, posteriormente, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de solvente pré-imersão em metanol/clorofórmio (1:2, v/v), 25  $\mu\text{L}$  de padrão interno (10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  metil tridecanoato) e 300  $\mu\text{l}$  de HCl a 5% (v/v) em metanol (Laurens et al., 2012). Terminada a adição dos reagentes, o tubo foi fechado com tampas de vedação para evitar a evaporação da mistura. As amostras ficaram encubadas em placa aquecedora por 1 h a 85 °C. Após este período, os tubos com amostras ficaram resfriando à temperatura ambiente e 1 mL de hexano foi adicionado a cada amostra. Os tubos foram encubados novamente num agitador a 65 rpm e temperatura ambiente, durante 1 h.

No final da incubação a solução dentro dos tubos formou duas fases, 100  $\mu\text{L}$  da fase superior (apolar) foi transferida, com uma pipeta de vidro, para um novo microtubo de vidro (inserts) para análise no CG-EM (Agilent, 7890-5975). Os parâmetros do equipamento são similares aos descritos no item 6.4 porem foi utilizada apenas a relação de *split* de 30:1 e uma coluna de 30 metros do tipo INNOWAX (Laurens et al., 2012). Os ácidos graxos foram identificados utilizando a biblioteca NIST e quantificados através de curva de calibração montada a partir de uma mistura de padrões (Sigma-Aldrich Grain Fame Mix) e utilizando a abundância do padrão interno.

## **6.8 Análise de Nitrogênio Total e Proteínas**

Para esse tipo de análise foram utilizadas 100 mg de biomassa seca de cotilédone e 25 mg para o eixo hipocótilo/raiz. As amostras utilizadas para essa análise foram primeiramente armazenadas em câmara contendo sílica, por 24 h, para evitar qualquer acúmulo de água. Depois disso, as amostras foram enroladas em folhas de estanho, formando um tipo de esfera, tomando o cuidado para que não ficasse ar dentro da esfera.

As esferas com amostra foram combustadas em forno, aquecido numa temperatura de 950 °C, do analisador de carbono, nitrogênio e enxofre (CN-628S, Leco, St. Joseph - Mi, EUA). Parâmetros do equipamento: combustão foi feita em excesso de oxigênio ( $H_2O < 3$  ppm,  $CnHm < 5$  ppm) (White Martins); o gás hélio (He) ( $H_2O < 3$  ppm,  $O_2 < 2$  ppm) foi utilizado como gás carreador à pressão de 669 mm.Hg.

A curva padrão foi feita com padrões certificados de folha de pomar (Leco 502-055 - 44 ou 52% de carbono e 2,0 ou 2,8 % de nitrogênio) e fenilalanina (Leco 502-42 - 65,4% de carbono e 8,5% de nitrogênio), com pontos nas concentrações de 25, 50, 100 e 150 mg, em triplicata.

Os resultados de valores de nitrogênio total foram convertidos em porcentagem de proteínas através de um fator de conversão. O fator de conversão utilizado foi de 5,71, valor utilizado para grãos de soja (Greenfield & Southgate 2003).

## **6.9 Análise de Açúcares Solúveis**

Para extração dos açúcares solúveis, 10 mg de biomassa seca de cada tecido foi utilizada. As amostras foram colocadas em microtubo de plástico (2 mL), seguidas da adição de 500  $\mu$ L de etanol 80% (v/v), essa mistura ficou encubada a temperatura 80 °C por 20 min (Praxedes et al., 2006). Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 13000 g durante 10 min e o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo. Esse procedimento foi repetido por quatro vezes, até que o volume de sobrenadante coletado, do tubo com amostra, chegasse a 2 mL.

O extrato etanólico (2 mL) ficou no concentrador à vácuo à temperatura de 30 °C, até que não houvesse mais líquido no tubo. Depois da secagem a amostra foi ressuspendida em 1 mL de água ultrapura e foi centrifugado a 13000 g por 30 min, para

que partículas fossem depositadas no fundo do tubo, impedindo que fossem injetadas no equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Para que a amostra ficasse na faixa de amplitude de detecção do CLAE, ela foi diluída 40 vezes em água e 500 µL, da amostra diluída foram transferidos para tubos com tampas, específicos para análise por CLAE.

Parâmetros do CLAE: foi usado um detector amperométrico pulsado (ICS 3000, Dionex Corporation) e uma coluna de troca aniônica (Carbopak PA-10, Dionex Corporation). Os açúcares foram eluídos com água ultrapura (74%) e hidróxido de sódio (NaOH) a 200mM (26%) no método isocrático, com fluxo de 200 µL/min por 35 min. A curva padrão foi feita utilizando glicose, frutose, sacarose, rafinose, estaquiose, verbascose e maltose, nas concentrações: 0,75; 1,25, 2,5; 5; 10; 20 e 40 µg/mL (Santos & Buckeridge 2004).

## **6.10 Análise de Fluxos Metabólicos**

Para correção dos espectros, ou seja, descontar o valor de influência na massa carga de isótopos estáveis que ocorrem naturalmente, foi utilizado o programa IsoCor (Millard et al., 2012).

Para verificação do estado estacionário metabólico e isotópico, foram analisadas amostras de plântulas do 4° e 5° DAS. Comparando os valores de incorporação de C13 nos metabólitos extraídos dos tecidos, do eixo hipocótilo/raiz e dos cotilédones, a fim de conferir se os íons desses metabólitos são diferentes em abundância entre o 4° e 5° DAS. Para tal análise, os valores de porcentagem de abundância foram analisados por teste de média (T Test), no programa estatístico R (versão 3.5.1), quando houve necessidade de diferenciar os dados.

A determinação dos fluxos metabólicos e modelagem foram realizadas pelo software 13C-FLUX (Wiechert et al., 2001). O modelo de estrutura metabólica utilizado nesse trabalho seguiu o modelo de Williams et al., (2008), com modificações.

## 7. RESULTADOS

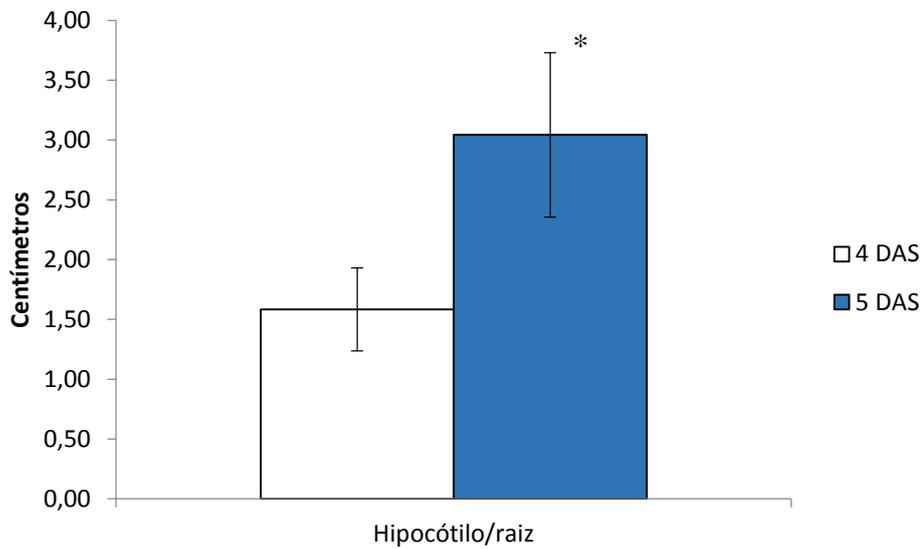
### 7.1 Crescimento Vegetal

As sementes de soja cultivadas *in vitro* germinaram em todas as placas (Figura 4), pelo menos uma semente germinou por placa. As plântulas (eixo hipocótilo/raiz) do 4° e 5° dia após a semeadura (DAS) tiveram um comprimento médio de 1,58 cm e 3,04 cm, respectivamente (Figura 5), esse aumento no comprimento entre os DAS foi significativo ( $p = 0,01596$ ).

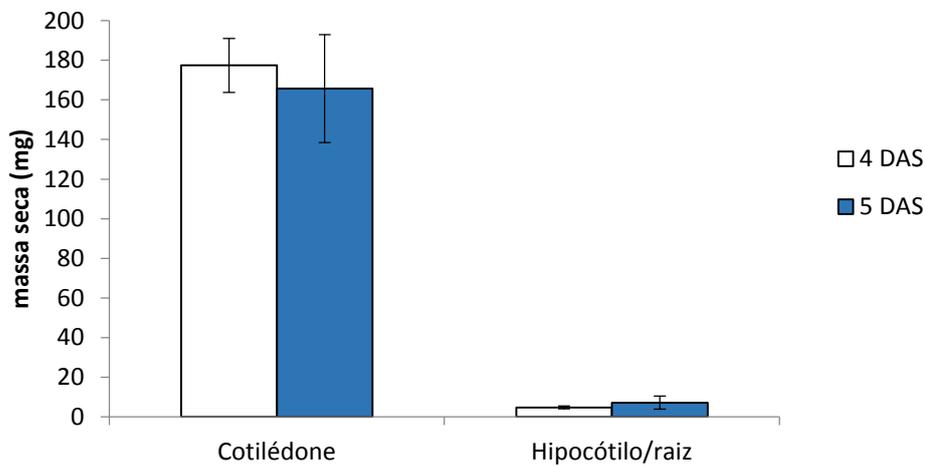


**Figura 4.** Germinação de sementes em placa com solução de cultivo. Plântulas de soja no 2° DAS.

Quando avaliado a massa seca das plântulas, no 4° DAS as plântulas obtiveram uma massa média de 177 mg nos cotilédones e 4,7 mg no hipocótilo/raiz. Enquanto no 5° DAS as massas de cotilédone e hipocótilo/raiz foram de 165 mg e 7,15 mg, respectivamente (Figura 6). Os valores de massa seca não diferiram estatisticamente entre o 4° e 5° DAS.



**Figura 5.** Comprimento do eixo hipocótilo/raiz das plântulas de soja, cultivadas *in vitro* com solução de glicose com C13. As barras de erro correspondem ao desvio padrão e o asterisco indica uma diferença significativa entre os DAS ( $p < 0,01$ ,  $n=4$ , t-teste).

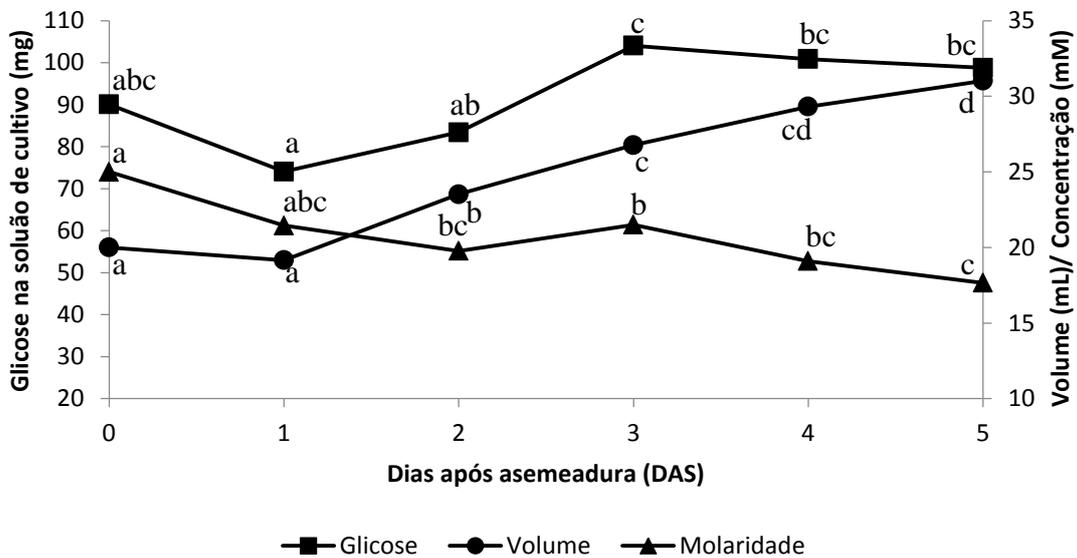


**Figura 6.** Massa seca dos tecidos das plântulas de soja, cultivadas *in vitro* com solução de glicose com C13. As barras de erro correspondem ao desvio padrão.

## 7.2 Absorção de Glicose Marcada

Perante os cinco dias de experimento, a solução contendo glicose marcada com C13 foi sendo resposto (Tabela 1) isso fez com que o volume de solução nas placas aumentasse. A fim de verificar se a concentração da solução mantinha-se próxima a 25 mM e se a massa de glicose aumentava, foi realizada a quantificação de glicose através de um método colorimétrico por espectrofotometria.

Os resultados mostraram que a reposição de solução foi efetiva e no decorrer dos dias de experimento o volume de solução de cultivo nas placas aumentou. A glicose presente em solução se manteve constante, ou seja, a quantidade de glicose nos diferentes dias de experimento não se diferenciou da quantidade de glicose inicial presente em solução. A concentração da solução de cultivo começa a decair, em relação à concentração inicial, no 2º DAS, depois dessa queda a concentração se manteve constante até o 5º DAS, Figura 7.



**Figura 7.** Massa de glicose, volume e concentração da solução de cultivo, nos diferentes DAS. Letras iguais não diferem estatisticamente os DAS do experimento (n=4, Anova, Tukey p<0,05).

### 7.3 Composição da Biomassa

Dos componentes da biomassa da soja, o mais abundante foram as proteínas, em ambos os tecidos e dias de experimento. O carboidrato mais abundante no hipocótilo/raiz foi a sacarose enquanto nos cotilédones foi maior a quantidade de frutose. Os lipídios foram mais abundantes nos cotilédones do que no restante da plântula (Tabela 2).

A porcentagem de parede celular não foi medida, o valor atribuído à parede foi o necessário para completar 100% de biomassa, ou seja, a porcentagem dos outros compostos foi medida e o valor que faltava para completar 100% de biomassa foi atribuído à parede.

As porcentagens dos componentes da biomassa e dados de crescimento foram utilizadas para determinar os fluxos de entrada e saída do modelo MFA, de acordo com um trabalho de FBA em soja (Moreira et al., 2019b).

**Tabela 2.** Porcentagem dos compostos da biomassa de plântulas de soja

	<b>Composto orgânico</b>	<b>4° DAS (%)</b>	<b>Desv. Padrão</b>	<b>5° DAS (%)</b>	<b>Desv. Padrão</b>
Hipocótilo/ Raiz	Amido	0,5	0,1	1,1	0,7
	Sacarose	4,7	2,6	7,8	0,9
	Frutose	1,1	0,5	1,7	0,1
	Glicose	3,6	2,2	5,9	1,0
	Estaquiase	0,0	0,0	0,0	0,0
	Lipídios	0,6	0,2	0,8	0,3
	Proteína	33,5	4,9	28,0	0,8
	Parede Celular	56,0	-----	54,7	-----
Cotilédones	Amido	0,6	0,1	0,6	0,1
	Sacarose	0,0	0,0	0,0	0,0
	Frutose	5,5	0,3	4,6	1,0
	Glicose	0,0	0,1	0,0	0,0
	Estaquiase	2,0	0,3	1,1	0,0
	Lipídios	21,3	6,2	21,0	3,1
	Proteína	49,8	0,3	48,4	0,1
	Parede Celular	20,8	-----	24,3	-----

## 7.4 Identificação de compostos por CG-EM

Pela análise de perfil metabólico foram identificados 21 compostos em cada tecido (cotilédones e eixo hipocótilo/raiz) das plântulas de soja, e os mesmos compostos apareciam em ambos tecidos (Tabela 3). Esses compostos foram divididos em 52 fragmentos e 447 íons. A identificação dos átomos e posição do carbono dentro de cada fragmento, foi feita utilizando os trabalhos de Leimer et al., (1977) e Huege et al., (2007). Fragmentos que receberam C13 tiveram sua massa/carga aumentada devido à presença de um nêutron a mais no núcleo do carbono, quanto maior o número de C13 no fragmento maior é sua massa/carga.

**Tabela 3.** Compostos identificados por CG-EM na biomassa de plântulas de soja

<b>Ácidos orgânicos</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>Carboidratos</b>
Ácido aminobutírico *h*c	Ácido piroglutâmico *h*c	Amido *h*c
Citrato *h*c	Alanina *h*c	Frutose *h*c
Fumarato *h*c	Aspartato *h*c	Sacarose *h*c
Malato *h*c	Fenilalanina *h*c	
	Glicina *h*c	
	Glutamato *h*c	
	Isoleucina	
	Leucina *h*c	
	Ornitina *h*c	
	Serina *h*c	
	Ornitina *h*c	
	Tirosina	
	Treonina *h	
	Valina *h*c	

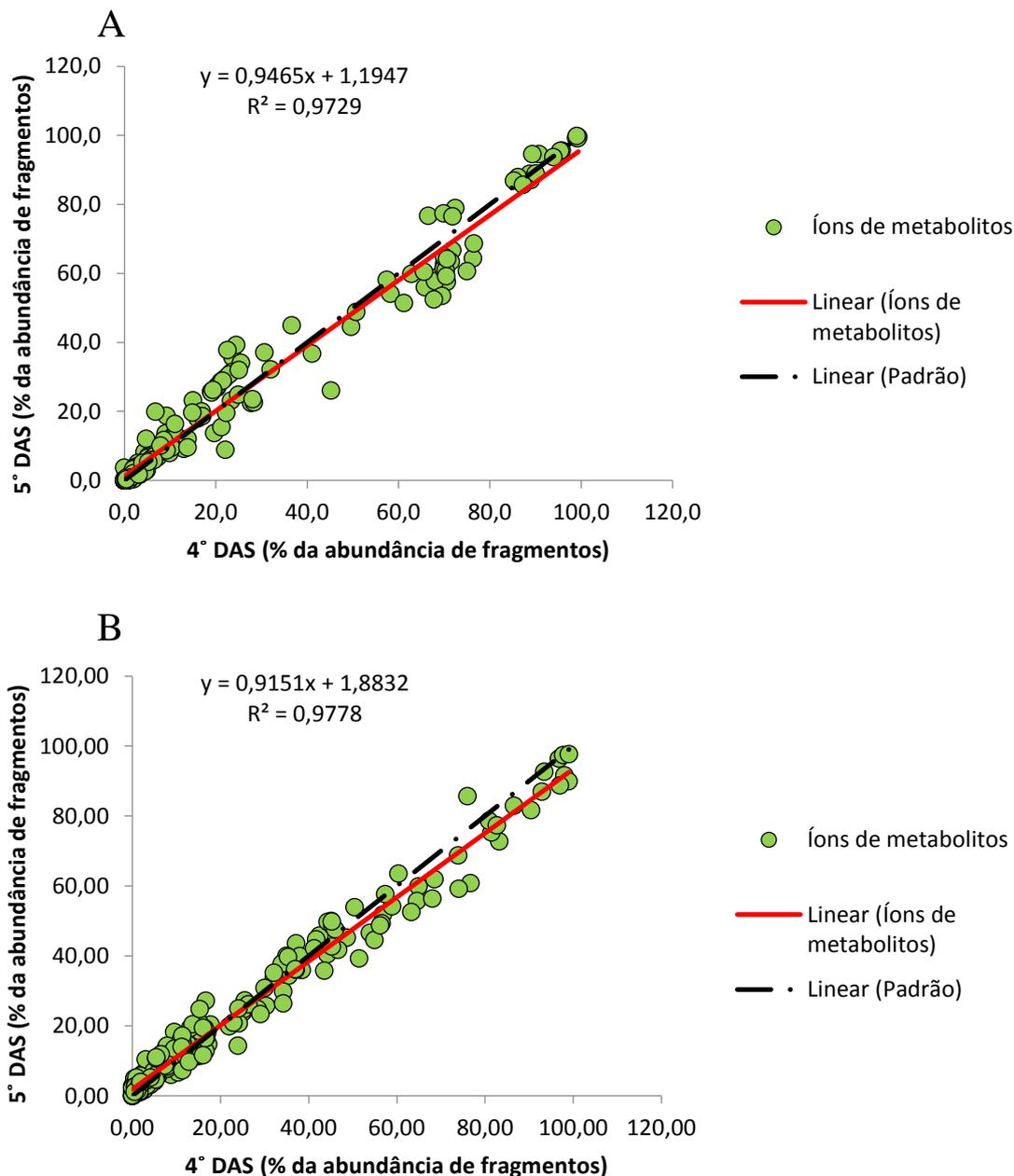
\* Compostos em que foi detectado C13. \*c: composto do cotilédone com C13. \*h: composto do eixo hipocótilo/raiz com C13

Dos compostos identificados os que tiveram maior abundância de fragmentos, tanto nos cotilédones como nos hipocótilos/raízes, foram: ácido piroglutâmico (um derivado de ácido glutâmico), sacarose, malato, citrato e frutose.

### **7.5 Verificação de estado isotópico estacionário**

Os compostos detectados em maior quantidade no 4º e 5º DAS tiveram uma porcentagem de abundância de seus isotopômeros muito similares. Os isotopômeros, que são um mesmo fragmento que difere apenas no número de C13 incorporado, que pareceram ter uma abundância diferente entre estes dias, foram analisados por teste de média (T-Test). Após a análise, os únicos isotopômeros que mostraram haver diferença estatística significativa entre o 4º e 5º DAS estavam presente no tecido dos cotilédones, foram os isotopômeros: frutose fragmento 217 (sem carbono marcado), p-value = 0,0219; isotopômero frutose 220 (três carbonos marcados), p-value = 0,0114; fragmento de frutose 307 (sem carbonos marcados), p-value = 0,0471; isotopômero frutose 310 (três carbonos marcados), p-value = 0,0248.

Apesar de quatro isotopomeros apresentarem diferença estatística entre o 4º e 5º DAS, a maior parte dos fragmentos e do metabolismo chegou a um estado isotópico estacionário. A maior parte dos isotopomeros que são detectados no 4º DAS estão com a abundância similar aos do 5º DAS, nos dois tecidos vegetais analisados, conforme indicado pela equação da linha de regressão com gradiente próximo a 1 e  $R^2 = 0,9729$  nos cotilédones e  $R^2 = 0,9778$  no eixo hipocótilo/raiz (Figura 8). Isso sugere que o C13 está sendo introduzido na rede metabólica de forma constante e conseguiu se espalhar por todas as principais vias utilizadas pela plântula.

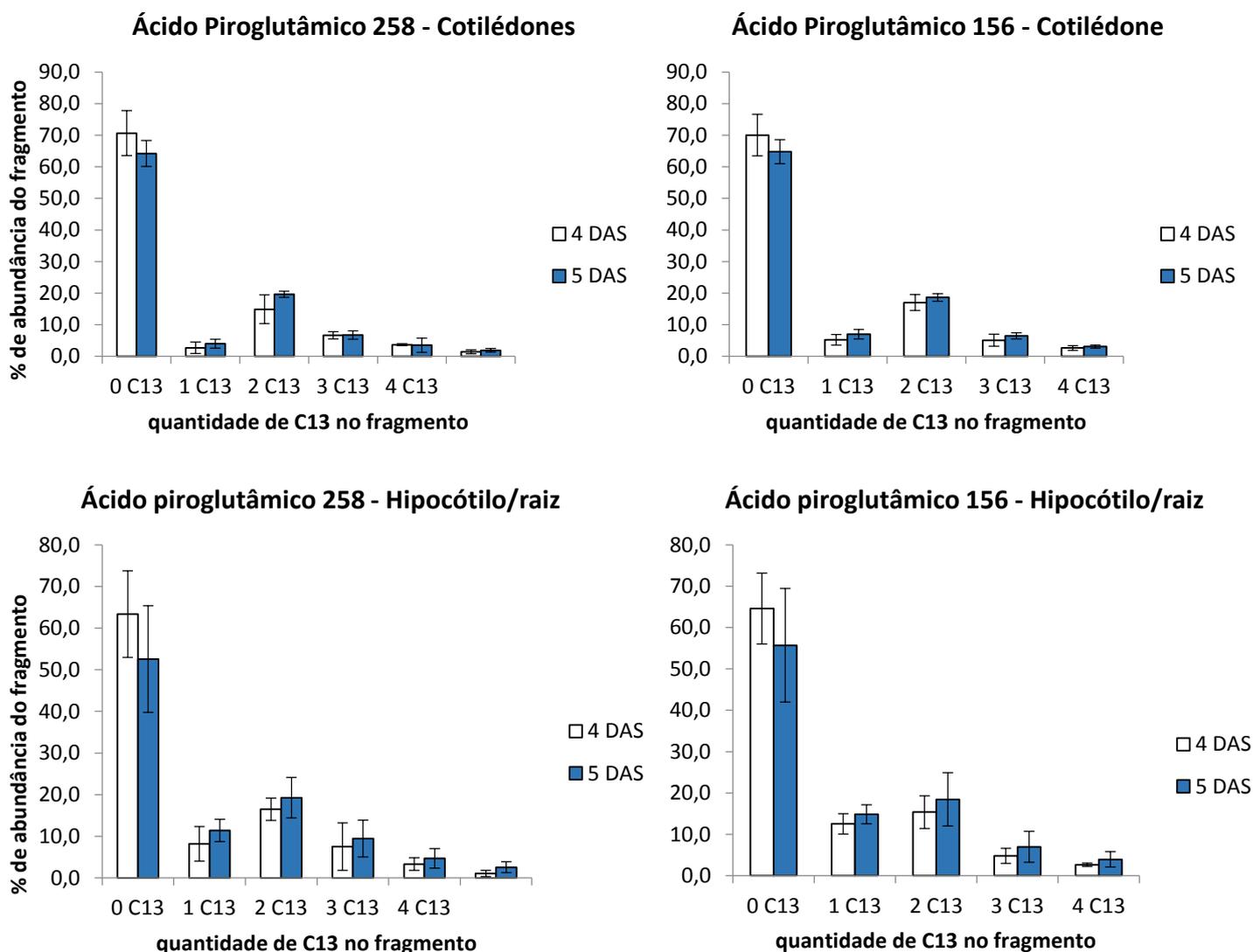


**Figura 8.** Abundância dos fragmentos (isotopômeros) de moléculas detectados no 4° (eixo X) e 5° (eixo Y) DAS. **A:** metabolitos nos cotilédones. **B:** metabolitos no hipocótilo/raiz.

## 7.6 Análise dos isotopômeros dos fragmentos mais abundantes

Os compostos com maior abundância de fragmentos, dentre os identificados (ácido piroglutâmico, sacarose, malato, citrato e frutose), tiveram seus fragmentos e isotopômeros analisados, quanto à incorporação de C13.

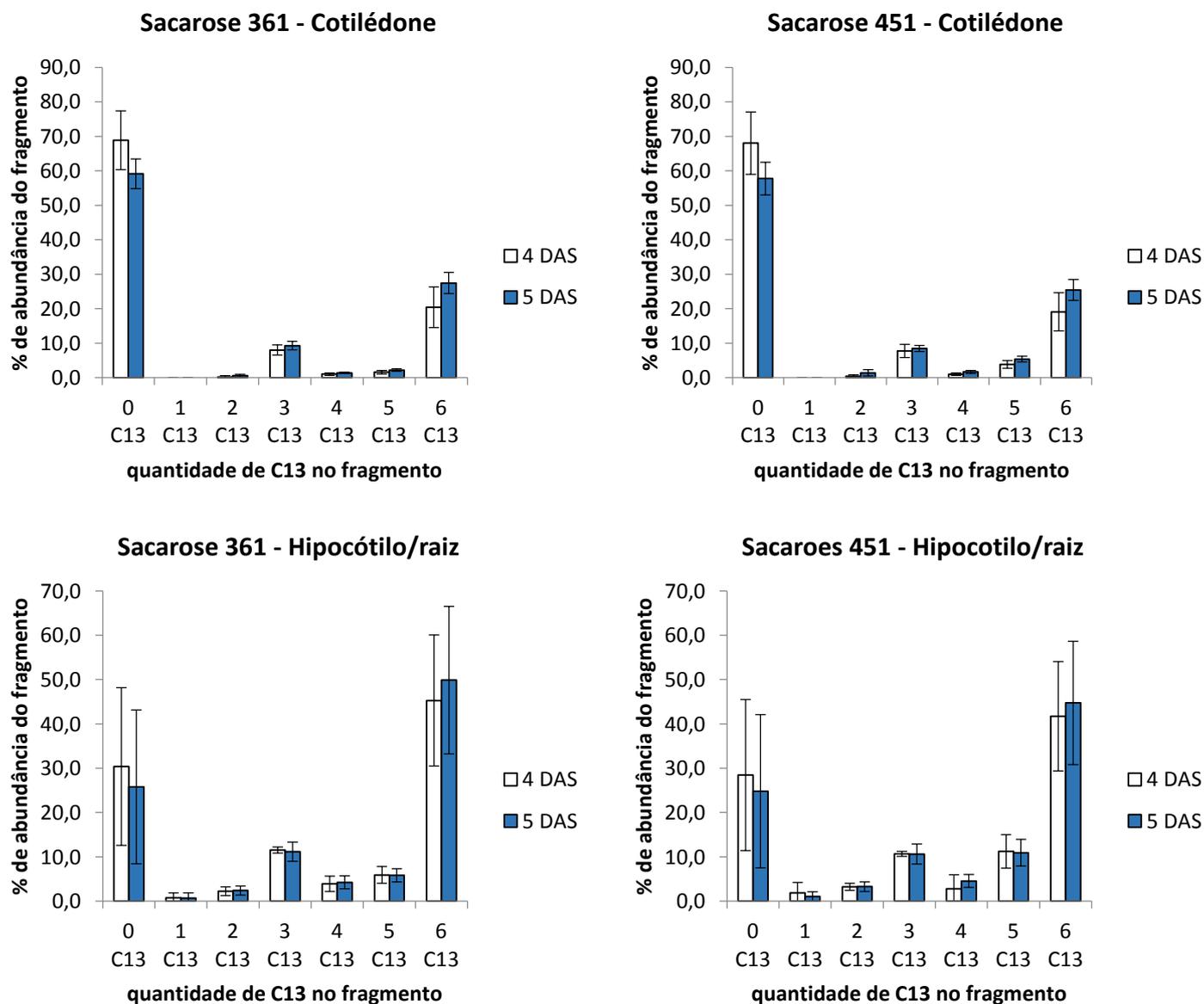
O ácido piroglutâmico teve uma incorporação de carbono baixa nos seus dois fragmentos analisados, 156 e 258, nos dois tecidos da planta (Figura 9).



**Figura 9.** Fragmentos de ácido piroglutâmico nos tecidos do eixo hipocótilo/raiz e cotilédone no 4° e 5° DAS. O eixo Y representa a porcentagem de abundância dos isotopómeros do fragmento (total de 100% em cada dia), o eixo X representa o número de carbonos marcados que podem existir no fragmento. Barras de erros são do desvio padrão. Sem diferença estatística entre os dias,  $p > 0,05$ .

Os fragmentos de sacarose tiveram uma grande incorporação de C13 no eixo hipocótilo/raiz, principalmente nos fragmentos 361 e 451, conseguindo uma abundância de C13 marcado de mais de 40% nos seis carbonos que formam o fragmento. Nos cotilédones, o aparecimento de C13 nos fragmentos foi mais sutil que no

hipocótilo/raiz, porém a marcação continuou tendo mais abundância nos seis carbonos do fragmento (Figura 10).

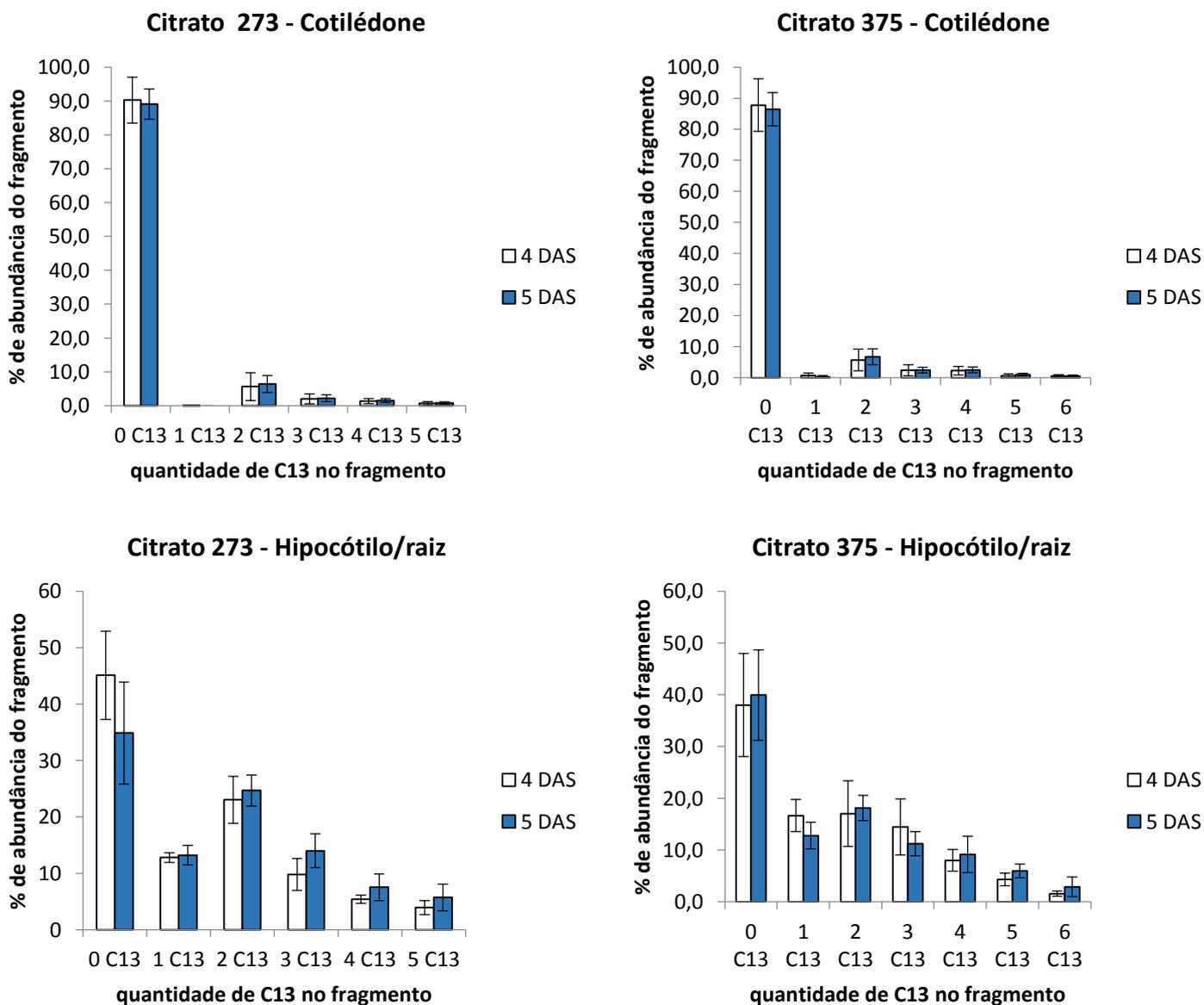


**Figura 10.** Fragmentos de sacarose nos tecidos do eixo hipocótilo/raiz e cotilédone, 4 e 5 dias após a semeadura (DAS). O eixo Y representa a porcentagem de abundância dos isotopômeros do fragmento (total de 100% em cada dia), o eixo X representa o número de carbonos marcados que podem existir no fragmento. Barras de erros são do desvio padrão. Sem diferença estatística entre os dias,  $p > 0,05$ .

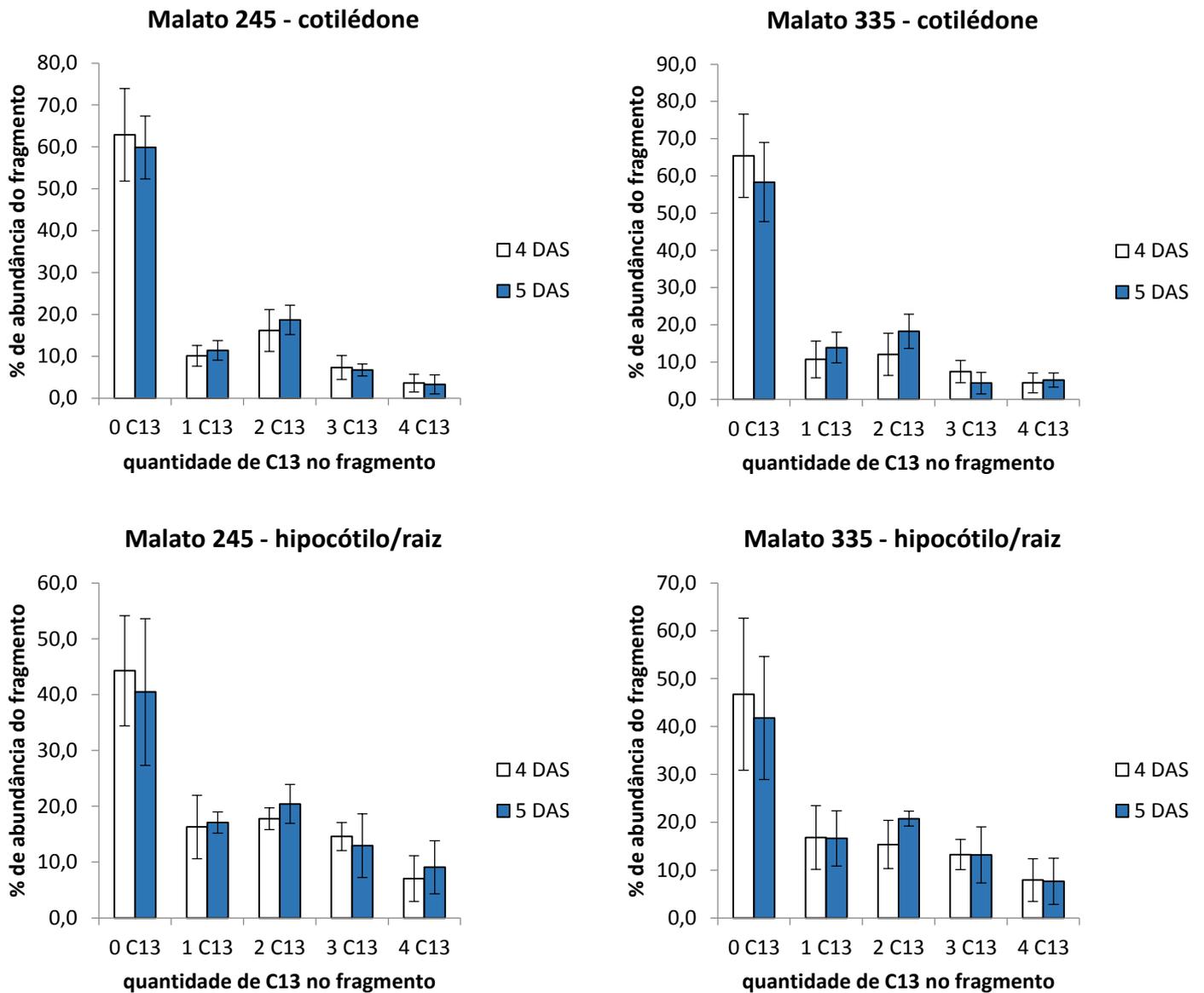
Os fragmentos de frutose apresentaram níveis de incorporação de C13 parecidos com as de sacarose, em ambos os tecidos.

Citrato apresentou uma incorporação de C13 maior no eixo hipocótilo/raiz do que nos cotilédones. Nenhum dos isotopômeros com C13, dos fragmentos de citrato analisados nos cotilédones, teve uma abundância maior que 12 % (Figura 11).

A incorporação de C13 nos fragmentos de malato foi muito similar nos diferentes tecidos (Figura 12).



**Figura 11.** Fragmentos de ácido cítrico nos tecidos do eixo hipocótilo/raiz e cotilédone, 4 e 5 dias após a semeadura (DAS). O eixo Y representa a porcentagem de abundância dos isotopômeros do fragmento (total de 100% em cada dia), o eixo X representa o número de carbonos marcados que podem existir no fragmento. Barras de erros são do desvio padrão. Sem diferença estatística entre os dias,  $p > 0,05$ .



**Figura 12.** Fragmentos de malato nos tecidos do eixo hipocótilo/raiz e cotilédone, 4 e 5 dias após a sementeira (DAS). O eixo Y representa a porcentagem de abundância dos isotopómeros do fragmento (total de 100% em cada dia), o eixo X representa o número de carbonos marcados que podem existir no fragmento. Barras de erros são do desvio padrão. Sem diferença estatística entre os dias,  $p > 0,05$ .

## 7.7 Análise de fluxos metabólicos

O modelo utilizado para a análise de fluxos metabólicos em plântulas de soja foi construído baseado num modelo usado para análise de MFA em *Arabidopsis thaliana* (Williams et al., 2008) com algumas modificações. Foi possível modelar a rede metabólica nos cotilédones, eixo hipocótilo/raiz e os transportes de metabólitos entre

esses tecidos (Anexo 1), considerando os compostos com presença ou ausência do isótopo de C13.

A rede metabólica dos cotilédones possuiu mais reações do que a rede do eixo hipocótilo/raiz. Na rede dos cotilédones, considerando os dados de marcação isotópica obtidos e informações disponíveis na literatura, foram inseridas diversas rotas de degradação de aminoácidos e ácidos graxos, o que fez com que o número de reações bioquímicas fosse maior nesse tecido (Figura 13), se comparado ao hipocótilo/raiz.

No eixo hipocótilo/raiz há reações levando a síntese de proteínas, ácidos graxos e carboidratos (inclusive parede celular) (Figura 14).





**Tabela 4.** Valores dos fluxos ( $\pm$  desvio padrão) da rede metabólica dos cotilédones e eixo hipocótilo/raiz de plântulas de soja

Nome do Fluxo*	Descrição	Valor de fluxo (mmol d <sup>-1</sup> )	Valor de reversibilidade (mmol d <sup>-1</sup> )
<b>Hipocótilo/Raiz</b>			
Aupt	entrada de glicose (C13)	0.667 $\pm$ 0.088	
ACO2	saída de CO2	3.143 $\pm$ 0.0801	
AmetTHFsink	saída de CH3	0.026 $\pm$ 0	
<b>Cotiledone</b>			
Bupt	entrada de glicose (C13)	2.385 $\pm$ 0.377	
BCO2	saída de CO2	88.056 $\pm$ 2.246	
BmetTHFsink	saída de CH3	0 $\pm$ 0	
<b>Síntese de Biomassa</b>			
<b>Hipocótilo/Raiz</b>			
Ahcellwall	síntese de parede celular (Hexp)	0.737 $\pm$ 0	
Astarch	síntese de amido	0.035 $\pm$ 0	
Alip2	síntese de lipídeos	0.094 $\pm$ 0	
Achex1	síntese de açúcares (Hexp)	0.392 $\pm$ 0	
<b>Cotilédone</b>			
Bhcellwall	síntese de parede celular (Hexp)	0.746 $\pm$ 0	
<b>Metabolismo de Hexoses</b>			
<b>Hipocótilo/Raiz</b>			
Achex2	Hexp => G3P no citosol	-0.242 $\pm$ 0.179	0.062 $\pm$ 0.062
Acphex	G3P => FEP	-1.068 $\pm$ 0.398	
Achex3	FEP => Pir no citosol	0.110 $\pm$ 2.489	
Acpx	transferência de Hexp para o plastídio	-0.218 $\pm$ 0.25	0.135 $\pm$ 0.159
Aphex1	Hexp => G3P no plastídio	-0.281 $\pm$ 0.391	
Aphex2	FEP => Pir no plastídio	0.168 $\pm$ 4.529	
Appp1	entrada de Hexp na via de pentose fosfato	0.081 $\pm$ 1.698	
<b>Cotilédone</b>			
Bchex1	degradação de açúcares em Hexp	2.893 $\pm$ 0	
Bchex2	Hexp => G3P no citosol	-0.087 $\pm$ 4.555	1.78e-11 $\pm$ 4.387
Bcphex	G3P => FEP	-8.298 $\pm$ 6.296	0.085 $\pm$ 42403.1
Bchex3	FEP => Pir no citosol	-0.367 $\pm$ 258.663	
BstarchUn	degradação de amido em Hexp	0.119 $\pm$ 0	
Bcpex	transferência de Hexp para o plastídio	4.618 $\pm$ 4.668	0.482 $\pm$ 0.154
Bphex1	Hexp => G3P no plastídio	-13.872 $\pm$ 9.381	0.0001 $\pm$ 1.963
Bphex2	FEP => Pir no plastídio	0 $\pm$ 0	
Bppp1	entrada de Hexp na via de pentose fosfato	55.829 $\pm$ 20.243	
<b>Via de Pentose Fosfato</b>			
<b>Hipocótilo/Raiz</b>			
Appp2	Penp => G3P + Enc2	0.053 $\pm$ 1.132	0.568 $\pm$ 31.191
Appp3	Penp + Enc 2 => Sed7	0.027 $\pm$ 0.566	0.712 $\pm$ 0
Appp4	Eri4 + Enc2 => Hexp	0.026 $\pm$ 0.566	0.105 $\pm$ 0.624
Appp5	G3P + Enc3 => Hexp	0.027 $\pm$ 0.566	2.89e-05 $\pm$ 0.4
Appp6	Sed7 =>Eri4 + Enc3	0.027 $\pm$ 0.566	0.073 $\pm$ 0.406
<b>Cotilédone</b>			
Bppp2	Penp => G3P + Enc2	37.219 $\pm$ 13.495	0.989 $\pm$ 0.261
Bppp3	Penp + Enc 2 => Sed7	18.609 $\pm$ 6.747	0.136 $\pm$ 3502.22
Bppp4	Eri4 + Enc2 => Hexp	18.609 $\pm$ 6.747	7.9e-12 $\pm$ 47.195
Bppp5	G3P + Enc3 => Hexp	18.609 $\pm$ 6.747	0.544 $\pm$ 23.709
Bppp6	Sed7 =>Eri4 + Enc4	18.609 $\pm$ 6.747	0.19 $\pm$ 0
<b>Síntese de Acetil CoA plastidial</b>			
<b>Hipocótilo/Raiz</b>			

Alip1	síntese de AcCoa no plastídio	0.094 ± 0.561	
	Cotilédone		
Blip1	síntese de AcCoa no plastídio	0 ± 0	
<b>Ciclo do Ácido Tricarboxílico</b>			
	Hipocótilo/Raiz		
Acmex	transferência de piruvato para mitocôndria	0.083 ± 2.489	
Atca1	Pir => AcCoA	0.083 ± 2.489	
Atca2	Oaa + AcCoA => Cit	0.083 ± 2.489	
Atca3	Cit => Cet	0.083 ± 2.489	
Atca4	Cet => Suc	1.4168 ± 2.837	
Atca5a	Suc => Fum	0.708 ± 1.418	
Atca5b	Suc => Fum	0.708 ± 1.418	
Atca6a	Fum => Oaa	0.715 ± 1.418	0.99 ± 0
Atca6b	Fum => Oaa	0.715 ± 1.418	0.99 ± 0
	Cotilédone		
Bcmex	transferência de piruvato para mitocôndria	0.148 ± 258.663	
Btca1	Pir => AcCoA	0.148 ± 258.663	
Btca2	Oaa + AcCoA => Cit	4.296 ± 258.506	
Btca3	Cit => Cet	9.503 ± 262.039	
Btca4	Cet => Suc	10.494 ± 262.014	
Btca5a	Suc => Fum	7.797 ± 3.587	
Btca5b	Suc => Fum	7.797 ± 3.587	
Btca6a	Fum => Oaa	8.108 ± 3.587	0.99 ± 0
Btca6b	Fum => Oaa	8.108 ± 3.587	0.99 ± 0
<b>Ciclo do Glioxilato</b>			
	Cotilédone		
Bgxc1	quebra de ácido graxo em AcCoA	15.406 ± 0	
Bgxc2	Oaa + AcCoA => Cit	10.306 ± 260.195	
Bgxc3	Cit => Suc + Glix	5.099 ± 260.195	
Bgxc4	Glix + AcCoA => Oaa	5.099 ± 260.195	
<b>Fluxos Anapleróticos</b>			
	Hipocótilo/Raiz		
Aana1	PEP carboxilase FEP=> Oaa	-1.348 ± 2.455	
	Cotilédone		
Bana1	PEP carboxilase FEP=> Oaa	-7.930 ± 260.287	
<b>Síntese e Degradação de Aminoácidos</b>			
	Hipocótilo/Raiz		
Aasp	síntese de aspartato Oaa => Asp	7.6e-05 ± 4.56	
AaspOUT	aspartato para síntese de proteína	0.017 ± 0	
Aala	síntese de alanina Pir => Ala	0.027 ± 0	
AalaOUT	alanina para síntese de proteína	0.027 ± 0	
Athr	síntese de treonina Asp => Ter	8e-07 ± 0.716	
AthrOUT	treonina para síntese de proteína	0.017 ± 0	
Aasn	síntese de asparagina Asp => Asn	0.017 ± 0	
AasnOUT	asparagina para síntese de proteína	0.017 ± 0	
Amet	síntese de metionina Asp => Met	0 ± 0	
AmetOUT	metionina para síntese de proteína	0 ± 0	
Aglu	síntese de glutamato Cet => Glu	-1.333 ± 4.068	
AgluOUT	glutamato para síntese de proteína	0.019 ± 0	
Agln	síntese de glutamina Glu => Gln	0.019 ± 0	
AglnOUT	glutamina para síntese de proteína	0.019 ± 0	
Acitru	síntese de citrulina Orn => Citru	0.015 ± 0	
Aorn	síntese de ornitina Glu => Orn	0.015 ± 0	

Aarg	síntese de arginina Citru + Asp => Arg + Fum	0.015 ± 0	
AargOUT	arginina para síntese de proteína	0.015 ± 0	
Aser	síntese de serina G3P => Ser	0.047 ± 0	
AserOUT	serina para síntese de proteína	0.021 ± 0	
Agly	síntese de glicina Ser => Gli	0.026 ± 0	
AglyOUT	glicina para síntese de proteína	0.026 ± 0	
Ashik	síntese de chiquimato FEP + Eri4 => Shk	0.001 ± 0.003	
Achor	síntese de corismato Shk + FEP => Chr	0.001 ± 0.003	
Aphe	síntese de fenilalanina Chr => Fen	0 ± 0.005	
ApheOUT	fenilalanina para síntese de proteína	0.015 ± 0	
Atyr	síntese de tirosina Chr => Tir	0.001 ± 0.003	
AtyrOUT	tirosina para síntese de proteína	0.01 ± 0	
Aval	síntese de valina Pir => Val	0.024 ± 1.972	
AvalOUT	valina para síntese de proteína	0.024 ± 0	
Alys1a	síntese de lisina Asp + Pir => Lis	0.013 ± 0	
Alys1b	síntese de lisina Asp + Pir => Lis	0.013 ± 0	
AlysOUT	lisina para síntese de proteína	0.026 ± 0	
Aleu1	síntese de leucina Pir => Iso	0 ± 0.561	
Aleu2	síntese de leucina Iso + AcCoA => Leu	0 ± 0.561	
AleuOUT	leucina para síntese de proteína	0.031 ± 0	
Aile	síntese de isoleucina Asp + Pir => Ile	0 ± 0.441	
AileOUT	isoleucina para síntese de proteína	0.018 ± 0	
Ahis	síntese de histidina Penp => His	0 ± 0	
AhisOUT	histidina para síntese de proteína	0 ± 0	
Cotilédone			
Bmetmix2	metionina vinda de degradação de proteína	0.097 ± 0	
Bglu	síntese de glutamato Cet => Glu	-0.991 ± 4.068	0.99 ± 0
Bglumix2	glutamato vindo de degradação de proteína	0.859 ± 0	
Bgln	síntese de glutamina Glu => Gln	0.865 ± 0	0.469 ± 0
Bglnmix2	glutamina vinda de degradação de proteína	0.865 ± 0	
Born	síntese de ornitina Glu => Orn	0 ± 0	
Bcitr	síntese de citrulina Orn => Citru	0 ± 0	
Barg	síntese de arginina Citru + Asp => Arg + Fum	0 ± 0	
Bargmix2	arginina vinda de degradação de proteína	0.514 ± 0	
Bargd	degradação de arginina Arg => Glu	0.514 ± 0	
Bser	síntese de serina G3P => Ser	-1.011 ± 0.358	9.39e-19 ± 0.087
Bsermix2	serina vinda de degradação de proteína	0.552 ± 0	
Bgly	síntese de glicina Ser => Gli	-0.459 ± 0.358	
Bglymix2	glicina vinda de degradação de proteína	0.58 ± 0	
Bglyd	degradação de glicina Gli => CO2 + CH3	0.459 ± 0.358	
Bshik	síntese de chiquimato FEP + Eri4 => Shk	0 ± 0	
Bchor	síntese de corismato Shk + FEP => Chr	0 ± 0	
Bphe	síntese de fenilalanina Chr => Fen	0 ± 0	
Bphemix2	fenilalanina vinda de degradação de proteína	0.447 ± 0	
Bphed	degradação de fenilalanina Fen => Tir	0.432 ± 0.005	
Btyr	síntese de tirosina Chr => Tir	0 ± 0	
Btyrmix2	tirosina vinda de degradação de proteína	0.2 ± 0	
Btyr1d	degradação de tirosina Tir => Hom	0.623 ± 0.003	
Btyr2d	degradação de tirosina Hom => Act + Fum	0.623 ± 0.003	
Bval	síntese de valina Pir => Val	0 ± 0	
Bvalmix2	valina vinda de degradação de proteína	0.423 ± 0	
Bval1d	degradação de valina Val => Metp	0.423 ± 1.972	
Bval2d	degradação de valina Metp => Prop	0.423 ± 1.972	

Bleu1	síntese de leucina Pir => Iso	0 ± 0
Bleu2	síntese de leucina Iso + AcCoA => Leu	0.338 ± 0.716
Bleumix2	leucina vinda de degradação de proteína	0.654 ± 0
Bleu1d	degradação de leucina Leu => Iso	0.961 ± 0.897
Bleu2d	degradação de leucina Iso => MeG	0.623 ± 0.561
Bleu3d	degradação de leucina MeG => Act + AcCoA	0.623 ± 0.561
Bleu4d	degradação de leucina Act => AcCoA	1.246 ± 0.561
Bile	síntese de isoleucina Asp + Pir => Ile	0 ± 0
Bilemix2	isoleucina vinda de degradação de proteína	0.323 ± 0
Bile1d	degradação de isoleucina Ile => MeB	0.305 ± 0.441
Bile2d	degradação de isoleucina MeB => AcCoA + Prc	0.305 ± 0.441
Bile3d	degradação de isoleucina Prc => AcCoA	0.728 ± 2.048
Bhis	síntese de histidina Penp => His	0 ± 0
Bhisd	degradação de histidina His => Glu	0.14 ± 0
<b>Transporte de compostos dos cotilédones para eixo hipocótilo/raiz</b>		
BgluA	transporte de glutamato	1.386 ± 4.068
BchexA	transporte de hexose	0.0002 ± 0.222
BileA	transporte de isoleucina	0.018 ± 0.441
BtyrA	transporte de tirosina	0.008 ± 0.003
BpheA	transporte de fenilalanina	0.015 ± 0.005
BleuA	transporte de leucina	0.031 ± 0.561
BthrA	transporte de treonina	0.016 ± 0.716
BvalA	transporte de valina	1.2e-13 ± 1.972
BaspA	transporte de aspartato	0.074 ± 4.661

\* Fluxos em que o nome começa pela letra A são do tecido do eixo hipocótilo/raiz. Fluxos que começam com a letra B são do tecido cotiledonar.

Para a determinação dos valores de fluxos no software 13CFlux (Wiechert et al., 2001), foram feitas 200 simulações com o modelo, cada uma iniciada a partir de um conjunto de estimativas para os fluxos diferentes. A simulação em que os dados de marcação obtidos por CG-MS se aproximavam mais dos dados simulados gerou um valor de residuum (erro gerado pela diferença entre os dados obtidos em experimento de marcação e os dados simulados pelo software) de 291,28. Os valores dos fluxos desta solução de menor residuum estão apresentados na Tabela 4.

Para determinar o valor de residuum máximo que seria compatível com a diferença entre os dados simulados e dados experimentais, e conferir que esse valor de residuum não foi apenas devido a variação ao acaso, foi feito um teste de  $X^2$  (qui-quadrado) com o valor dos graus de liberdade das simulações. Os graus de liberdade foram calculados subtraindo o número de medições de marcação pelo número de fragmentos e pelo

número de fluxos livres (Tabela 5). Portanto a simulação com menor residuum passa pelo teste do  $X^2$  e pode ser testado se os fluxos metabólicos, determinados pela simulação, são compatíveis com os dados de marcação medidos experimentalmente.

$$\text{Grau de liberdade} = N_{(\text{medições})} - N_{(\text{fragmentos})} - N_{(\text{fluxos livres})}$$

**Tabela 5.** Valores de medidas para cálculo do limite  $X^2$

	<b>Medições</b>	<b>Fragmentos</b>	<b>Fluxos livres</b>
	447	101	46
<b>Graus de liberdades</b>		300	
<b>Limite de residuum (<math>X^2</math>)</b>		341,39	

Com o objetivo de verificar se o processo de simulação resulta na mesma solução, independente dos valores iniciais dos fluxos, foi comparado os valores de fluxos das cinco simulações com o menor valor de residuum, obtidos entre as 200 simulações realizadas (Anexo 2). As cinco simulações utilizadas tem os valores de fluxos bastante similares com um valor de desvio padrão baixo entre as simulações.

O modulo “EstimateStat” do 13CFlux foi utilizado para determinar os desvios padrões dos fluxos associadas com a solução de menor resíduo (Tabela 4). Esta análise indica que os valores de várias reações foram determinados com precisão (desvio próximo ou abaixo do valor do fluxo), entretanto, para outros, os desvios foram altos, sendo maiores que os valores dos fluxos.

## 8. DISCUSSÃO

### 8.1 Crescimento de plântulas de soja *in vitro*

Durante esse trabalho foi possível desenvolver um método que proporcione a germinação e crescimento de plântulas de soja *in vitro* em solução contendo C13, condição necessária para experimentos de marcação isotópica. A utilização de placas de Petri na germinação de soja foi eficiente e é utilizada em outros trabalhos (Bellieny-Rabelo et al., 2016, Rechenmacher et al., 2017). A germinação *in vitro* permite que as condições em que a plântula cresce sejam controladas, além de evitar a contaminação do substrato, utilizado como fonte de nutrientes para as plântulas.

Embora a técnica de MFA em plantas, e de acordo com os trabalhos da literatura conhecida, seja mais utilizada com suspensões de células vegetais (Williams et al., 2008, Masakapalli et al., 2010, Masakapalli et al., 2014a) ou embriões (Sriram et al., 2004, Allen et al., 2009, Lonien et al., 2009, Alonso et al., 2010), nós conseguimos montar um sistema de cultivo em que a plântula incorporasse C13 em todos seus tecidos (cotilédone e eixo hipocótilo/raiz) (Tabela 3), similar ao o cultivo de plântulas de soja feito *in vitro* por Moreira et al. (2019) e de cotilédones de soja por Iyer et al., (2008).

A constância no fornecimento de substrato marcado possibilita chegar num estado estacionário isotópico, condição essencial para análise em MFA (Roscher et al., 2000), e a reposição da solução, com isótopo, diariamente, tem importância para chegar a este estado. No nosso experimento foi disponibilizada glicose marcada com C13 constantemente à plântula, permitindo que ela sempre tivesse uma fonte para absorção desse isótopo.

A reposição da solução de cultivo proporcionou à plântula ter uma fonte de água e glicose constante, apesar da planta absorver glicose da solução diariamente foi possível manter a quantidade de glicose em solução igual nos diferentes DAS do experimento (Figura 7). A concentração da solução de cultivo foi menor a partir do 2º DAS pois, provavelmente, após o 2º DAS às plântulas absorveram mais glicose da solução, fazendo com que a concentração de glicose em solução caísse. Foi observado que no 4º e 5º DAS o volume de solução em placa, massa de glicose e concentração da solução não se diferenciou, indicando que a absorção de solução nesses dois DAS foi similar. Pode-se perceber a importância na reposição do meio diariamente, se essa reposição não

tivesse sido realizada, provavelmente, não haveria C13 disponível para que o metabolismo chegasse num estado estacionário isotópico.

Apesar de não apresentar diferença estatística significativa na massa seca entre os órgãos coletados no 4º e 5º DAS, nota-se que o comprimento das plântulas é maior no 5º DAS em comparação ao 4º DAS, sugerindo que as plântulas não pararam de crescer entre esses dias e que o sistema de cultivo ainda fornecia as condições necessárias para que a plântula continuasse se desenvolvendo. A média da massa seca cotiledonar do 4º DAS (177 mg) é similar a massa seca de cotilédones em plântulas de soja após 96 h da germinação *in vitro* (cerca de 155 mg) (Moreira et al., 2019b).

## 8.2 Composição da Biomassa

Dos compostos medidos, os mais abundantes na biomassa das plântulas de soja germinadas em placas foram as proteínas, os lipídios e os carboidratos, esses compostos também são encontrados em grandes porcentagens em sementes de soja (Han et al., 2013). A maior porcentagem de proteínas está presente nos cotilédones, que é o local de reserva de nutrientes para a plântula. A quantidade de proteína presente nos cotilédones de soja do nosso experimento (48% - 49%) é similar com a quantidade presente nas sementes de soja, 37% (Karr-Lilienthal et al., 2005) e 40% - 45% (Nielsen, 1996), indicando que o nosso sistema experimental não alterou a porcentagem das reservas de proteínas nos cotilédones.

A massa seca de lipídios nos cotilédones foi de 20% - 21%. Esse valor de porcentagem é relatado em outros trabalhos com a cultura (Karr-Lilienthal et al., 2005; Clemente & Cahoon, 2009; Moreira et al., 2019b), pois há uma reserva de óleo nas sementes de soja contendo, em sua maioria, triacilglicerol (Morais e Silva, 1996).

A porcentagem de alguns açúcares solúveis nos cotilédones diminuiu do 4º para o 5º DAS, isso pode indicar um transporte de açúcar dos cotilédones para o eixo hipocótilo/raiz (Moreira et al., 2019b), porem, provavelmente, a maior fonte de açúcar do eixo hipocótilo/raiz vem da glicose presente na solução de cultivo. Durante a germinação e crescimento inicial de soja alguns açúcares podem ser transformados em outros, alterando os níveis de determinados açúcares (East et al., 1972; Hsu et al., 1973)

e/ou fazendo com que outros açúcares desapareçam, como a rafinose e estaquiose, após 96 h da germinação (East et al., 1972).

A análise de metabolitos por CG-EM indicou uma alta abundância de malato e ácido cítrico, que pode indicar uma utilização constante da via do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) e glioxilato, conforme sugerido por um estudo recente de FBA (Moreira et al., 2019b).

O alto número de compostos e fragmentos detectados (21 e 52 respectivamente) permite que sejam obtidas várias medições de incorporação de C13 (Leimer et al., 1977; Huege et al., 2007), que por sua vez aumenta a precisão da estimativa de fluxos que serão determinados por MFA.

### **8.3 Estado estacionário de marcação isotópica**

A constância no fornecimento de substrato marcado possibilita chegar num estado estacionário isotópico, condição essencial para análise em MFA (Roscher et al., 2000), e a reposição da solução, com isótopo, diariamente é importante para chegar a este estado. No nosso experimento foi disponibilizada glicose marcada com C13 constantemente a plântula, permitindo que ela sempre tivesse uma fonte para absorção desse isótopo.

O tempo necessário para atingir um estado estacionário varia conforme a complexibilidade da rede metabólica, dos compostos alvos e da fisiologia do tecido estudado, sendo necessário o fornecimento do isótopo por horas, dias ou até semanas (Sriram et al., 2004; Ratcliffe & Shachar-Hill, 2006). No nosso sistema experimental, após quatro e cinco dias de marcação, foi atingido esse estado (Figura 8) em que os compostos são encontrados em mesma porcentagem de abundância, incorporação e distribuição de C13.

Conseguimos obter uma correlação positiva entre a abundância dos isotopômeros do 4° e 5° DAS em ambos os tecidos. A correlação da abundância dos isotopômeros nos cotilédones gerou um  $R^2 = 0,9729$  e no eixo hipocótilo/raiz de  $R^2 = 0,9778$ , confirmando que o metabolismo atingiu um estado estacionário isotópico. Não atingimos uma correlação perfeita ( $R^2=1$ ), provavelmente porque foi possível quantificar a incorporação de C13 em uma grande quantidade de isotopômeros derivados dos compostos de soja, e levando em consideração esse número alto de isotopômeros, é

aceitável que alguns não estivessem com a abundância igual entre os dois DAS analisados. Baseado na literatura conhecida, esse trabalho é o primeiro relato de marcação em plântula de soja até se atingir um estado estacionário isotópico.

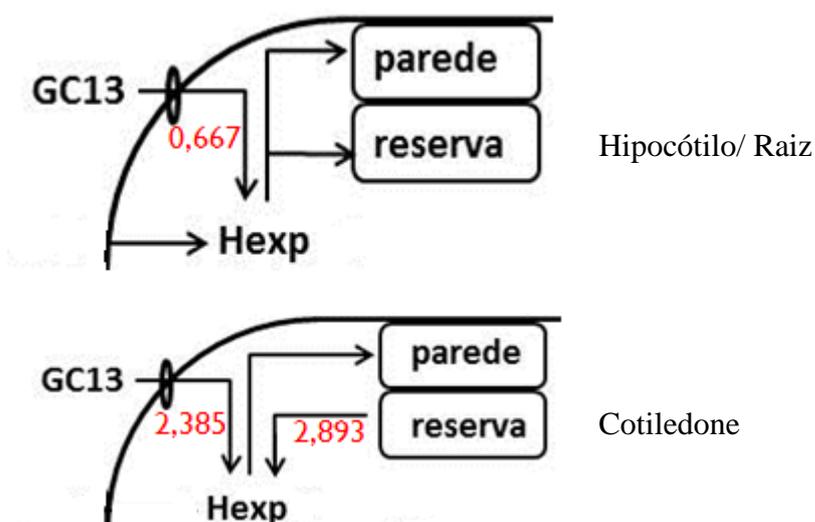
#### **8.4 Isotopomeros dos fragmentos**

Dentre os fragmentos detectados, os carboidratos que tiveram maior incorporação de C13 foram: sacarose m/z 361 e m/z 451, tanto no hipocótilo/raiz como nos cotilédones (Figura 10). Como os valores de incorporação foram muito similares em frutose, essa sacarose pode estar sendo convertida diretamente em frutose que entra na via da glicólise (Rosental et al., 2014; Bellieny-Rabelo et al., 2016). O isotopomero com seis carbonos marcados (6 C13) foi abundante nos fragmentos de sacarose. Como na formação da sacarose há um recebimento de seis carbonos da molécula de glicose, é bem provável que esse fragmento de seis C13 tenha vindo diretamente da glicose marcada disponibilizada no meio líquido. O isotopomero de sacarose com três carbonos marcados (3 C13) teve uma abundância aproximada de 10%, em ambos tecidos, e nos dois fragmentos (m/z 361 e m/z 451). Esse padrão de três C13 pode ser explicado pela ação da enzima aldolase que, por catalisar uma reação reversível, pode juntar duas trioses (molécula com três carbonos): uma com três carbonos marcado e outra com três carbonos não marcados, formando uma hexose,  $^{12}\text{C}_3$ - $^{13}\text{C}_3$ , essa hexose pode formar a molécula de sacarose, justificando a incorporação de três C 13 nesse carboidrato (Ratcliffe & Shachar-Hill, 2006).

O malato também teve uma incorporação eficiente de C13 nos dois tecidos, indicando que o carbono incorporado foi utilizado para biossíntese desse composto. O malato pode ser derivado da glicólise (Sweetman et al., 2009) via PEP carboxilase, nesse caso o C13 poderia vir da sacarose, glicose ou frutose que foram marcadas. Outra possibilidade bastante provável é a formação de malato através do ciclo do ácido tricarboxílico, com a conversão de fumarato em malato. Os níveis de incorporação de C13 no malato, e especialmente ácido cítrico, foram menores nos cotilédones do que no hipocótilo/raiz. Esse carbono não marcado deve ter vindo da degradação de lipídios vindos da via da beta-oxidação, indicando que a degradação de reservas não marcadas está realizando uma contribuição significativa para os fluxos metabólicos.

A marcação foi diferente em hipocótilo/raiz e cotilédones, com valores tipicamente menores de enriquecimento nos cotilédones (Figura 15). Apesar do fluxo de entrada de C13 ser alto no cotilédone, o fluxo de entrada de carbono não marcado (C12) vindo da degradação de reservas de açúcares e maior ainda, o que, provavelmente, influencia no enriquecimento dos dados de marcação e deixa a marcação no tecido cotiledonar menos acentuada que no tecido do hipocótilo/raiz.

A plântula precisa das reservas para se desenvolver no período inicial pós-germinação (Bewley & Black, 1994), e durante o período do experimento, ela deve ter utilizado a glicose C13 vinda da solução para sintetizar novas moléculas que são essenciais para o seu crescimento enquanto os cotilédones sintetizaram compostos em menor quantidade, dependendo mais das reservas não marcadas e previamente estocadas.



**Figura 15.** Valores de fluxos de entrada de C13 vindo da solução de cultivo e de C12 vindo da degradação de reservas de açúcar, nos tecidos do cotilédone e eixo hipocótilo/raiz. CG13: glicose U-C13.

Nossos dados de marcação foram qualificados para determinar os fluxos metabólicos, através do modelo desenvolvido para plântulas de soja. Os valores dos dados obtidos foram compatíveis com os dados de marcação isotópica, conforme mostrado pelo teste de  $X^2$  (Tabela 5), onde o valor máximo de residuum que poderíamos

obter para que os fluxos fossem qualificados era de 341,39 e nossa simulação conseguiu se manter dentro do valor, com um residuum de 291,28 .

### **8.5 Síntese de açúcares**

A mobilização das reservas permite que a plântula utilize as proteínas e carboidratos reservas para síntese e produção de novos compostos, que serão utilizados no crescimento e produção de biomassa nos tecidos da plântula (Buckeridge et al., 2004).

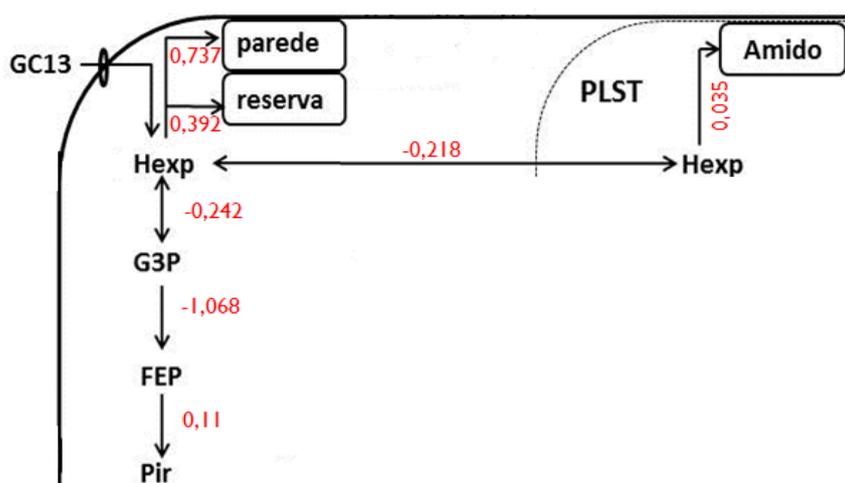
Analisando os valores de fluxos (Tabela 4), nota-se que os maiores fluxos para síntese de biomassa no eixo hipocótilo/raiz, estão relacionados com a produção de parede celular e açúcares (Figura 16). Os açúcares como a glicose e sacarose são importantes açúcares relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plântulas de soja (Gronwald et al., 2009), e esse produção de açúcares pode ser uma forma de armazenar carboidratos na célula para que possa ser utilizado quando não houver uma fonte externa de carboidratos. No nosso experimento a glicose foi fornecida constantemente as plântulas, isso permite que elas usem essa glicose para produção de energia e não consuma, necessariamente, suas reservas de carboidratos. Alguns trabalhos sugerem que os açúcares solúveis são uma das primeiras fontes de carbono a serem consumidas no desenvolvimento de plântulas (Buckeridge & Dietrich, 1996; Gronwald et al., 2009; Moreira et al., 20019) e alguns tipos de açúcares podem desaparecer depois de alguns dias de crescimento da plântulas (Brown & Huber, 1987). Além disso, os açúcares são utilizados para auxiliar na turgidez celular, pois são osmoticamente ativos, e esse uso dos açúcares é necessário para a expansão da célula.

A produção de parede celular no eixo hipocótilo/raiz deve estar relacionada ao crescimento das plântulas. Outros estudos de MFA, com cultura de células em rápido crescimento, também tem mostrado um alto investimento de carbono na produção de parede celular (Williams et al., 2008, Masakapalli et al., 2010, Masakapalli et al., 2014a).

Algo parecido é observado nos cotilédones, aonde há um fluxo positivo para a síntese de parede celular, quando o esperado seria a quebra da parede celular para a liberação de açúcares que poderiam ser catabolizados (Buckeridge et al., 2001), considerando que a degradação de parede celular nos cotilédones está tipicamente ligada ao crescimento de plântulas de soja (Gronwald et al., 2009). O valor de fluxo

atribuído à síntese de parede celular nos cotilédones pode estar relacionado com a forma de cálculo de porcentagem desse composto (valor atribuído para completar os 100% de biomassa), como a porcentagem de parede celular não foi medida diretamente, esse composto pode ter o seu valor de fluxo variável. Além disso, observando o valor de fluxo de taxa de entrada de glicose e consumo de reservas, a quantidade de carbono direcionada para a síntese de parede celular é proporcionalmente menor no cotilédone.

Outro fator que indica a síntese de reservas de açúcares no eixo hipocótilo/raiz e o valor negativo dos fluxos da glicólise (Figura 16). Os fluxos indicam a utilização da via de gliconeogênese, onde parte do fosfoenolpiruvato (FEP) está sendo convertido em triose, e essas trioses são convertidas em hexoses, que podem ser utilizadas para síntese de açúcares.



**Figura 16.** Valores de fluxos relacionados ao metabolismo e catabolismo de hexoses no eixo hipocótilo/raiz. GC13: glicose U-C13; Hexp: hexose; G3P: gliceraldeído 3 fosfato; FEP: fosfoenolpiruvato; Pir: piruvato; PLST: plastídio.

Comparando os fluxos de síntese de açúcar e síntese de amido no eixo hipocótilo/raiz, vemos que a síntese de açúcar é maior que a de amido (Figura 16). Isso pode acontecer porque parte das hexoses plastidiais saem do plastídio para o citosol, podendo ser utilizadas para a produção de açúcares solúvel no citosol, ao invés de serem utilizadas no próprio plastídio para síntese de amido. A soja é conhecida por acumular pequenas quantidades de amido ao longo do processo de crescimento inicial (Moreira et al., 2019b).

## 8.6 Degradação de lipídeos

Há um grande fluxo na produção de acetil-CoA no glioxissomo devido a degradação de lipídios via  $\beta$ -oxidação. Essa acetil-CoA pode ser usada para produzir ácidos orgânicos que serão usados no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) através da ação de citrato sintase ou, via o ciclo de glioxilato, através da gliconeogênese pela produção de fosfoenolpiruvato (Eastmond et al., 2015).

A utilização de acetil CoA, vinda da degradação de ácidos graxos, para o processo de respiração durante o crescimento inicial é proposto para várias espécies oleaginosas (Salon et al., 1988; Raymond et al., 1992), principalmente nos tecidos cotiledonares. Um modelo de metabolismo para plântulas de soja, usando FBA, propõem que parte dos intermediários do TCA são produzidos nas vias de  $\beta$ -oxidação e são transportados para a mitocôndria (Moreira et al., 2019b).

No nosso trabalho, os dados de marcação sugerem um pool elevado de citrato não marcado, enquanto os outros ácidos orgânicos como malato e fumarato, tiveram mais marcação por C13 (Conferir figura 11 e 12). Esse pool de citrato não marcado pode vir do glioxissomo via  $\beta$ -oxidação pela ação de citrato sintase localizado neste compartimento, isso explicaria a marcação mais acentuada nos demais ácidos orgânicos do TCA enquanto citrato tem menos marcação. Situação similar a descrita por Moreira et al., (2019), em que seus dados sugerem um pool de citrato não marcado vindo da  $\beta$ -oxidação. Os altos desvios nos valores de fluxos envolvidos nessas reações não permitem dizer o quanto de carbono vai para a respiração e quanto vai para a gliconeogênese, a coleta de dados adicionais de marcação possivelmente permitiria a quantificação destes fluxos com maior precisão.

## 8.7 Via de pentose fosfato e ciclo do ácido tricarboxílico

No tecido cotiledonar, grande parte das hexoses estão sendo utilizadas na via de pentose fosfato (PPP) nos plastídios, essas hexoses são produzidas principalmente pela degradação de açúcar e amido. A via de pentose fosfato está relacionada com a produção de intermediários que são utilizados em vias biossintéticas (como produção de aminoácidos) e com a produção de NADPH (utilizado como redutor), sendo uma via

essencial para a manutenção do pool de NADPH no plastídio (Sriram et al., 2004). No tecido cotiledonar a PPP pode estar sendo muito utilizada para gerar NADPH como combate ao estresse oxidativo gerado pela degradação de amido, proteínas, aminoácidos e controle do estresse gerado na reativação do metabolismo durante o processo de germinação (Hauschild & Von Schaewen, 2003).

Os fluxos do TCA ficaram com desvios maiores que o valor dos fluxos, isso pode ter ocorrido pelo fato de que muitos compostos não marcados terem produzidos ácidos orgânicos intermediários do ciclo, como o pool de citrato vindo das reservas de ácidos graxos e o pool de acetil CoA vindo da degradação das reservas de proteínas (Araújo et al., 2011), ambos compostos não marcados.

Apesar dos desvios altos, parece haver um fluxo maior nas vias do TCA no cotilédone do que no hipocótilo/raiz. Isso pode estar relacionado com o grande pool de citrato e acetil CoA citado no parágrafo anterior, que faz com que aumente a entrada de carbono no TCA do cotilédone, além disso, os fluxos de degradação das reservas nos cotilédones são maiores que os fluxos de síntese de biomassa no hipocótilo/raiz, essa alta taxa de degradação e mobilização de reservas nos cotilédones requer um alto gasto energético, fazendo com que o tecido consuma muito ATP para tais reações, justificando os valores altos de fluxos para o TCA se comparado com o hipocótilo/raiz. Os cotilédones tem uma massa absoluta maior comparada a massa do hipocótilo/raiz, a manutenção celular dos cotilédones deve contribuir para um alto gasto energético (Cheung et al., 2013), maior do que no hipocótilo/raiz, já que os cotilédones tem mais massa. Essa diferença de massa tecidual também poderia explicar o porquê tem um fluxo maior de entrada de C13 nos cotilédones se comparado ao hipocótilo/raiz.

## **8.8 Síntese de aminoácidos**

Com a modelagem podemos observar que no tecido cotiledonar a maior fonte de aminoácido vem da degradação de proteínas, enquanto no hipocótilo/raiz há a produção de aminoácidos via síntese no plastídio e citosol, além do modelo simular transporte de aminoácidos dos cotilédones para o hipocótilo/raiz, como a tirosina e fenilalanina.

A degradação de aminoácidos é uma importante fonte para a produção de acetil CoA que pode ser usada para a produção de energia no TCA (Araújo et al., 2011). Um aminoácido que tem importância para geração de energia via TCA em plantas de soja é

o glutamato, sendo convertido em  $\alpha$ -cetoglutarato (Moreira et al., 2019b). Apesar dos desvios de fluxos serem altos, nosso modelo sugeriu a transformação de glutamato em  $\alpha$ -cetoglutarato no TCA, além de apresentar um fluxo de transporte de glutamato do cotilédone para o hipocótilo/raiz, esse transporte de glutamato via floema é descrito em outros trabalhos (Housley et al., 1979; Lima e Sodek, 2003; Vitor et al., 2018; Moreira et al., 2019b).

Os fluxos, determinados durante o processo de modelagem, ainda mostram a ocorrência de transporte de outros aminoácidos via floema dos cotilédones para o hipocótilo/raiz, como: isoleucina, leucina e valina, que são aminoácidos esperados no transporte via floema para o hipocótilo/raiz (Moreira et al., 2019b) e já foram detectados no floema de soja (Lima e Sodek, 2003; Vitor et al., 2018).

## 9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O estudo traz um avanço no conhecimento sobre os fluxos metabólicos em plântulas de soja durante o crescimento inicial. Adicionalmente possibilitou o estabelecimento de uma metodologia de cultivo de soja *in vitro* em solução com C13. A reposição de meio de cultivo é uma importante etapa para que seja garantida a disponibilidade de C13 para as plântulas, a reposição feita diariamente permitiu alcançar um estado estacionário metabólico no 4° e 5° DAS. Apesar da eficiência na absorção de C13 na solução de glicose, ajustes podem ser feitos na parte experimental do cultivo *in vitro*, visando maximizar a absorção de C13 para que o isótopo chegue até compostos de difícil marcação, como alguns aminoácidos. Uma solução possível seria a tentativa de marcação das reservas das sementes, enquanto os grãos ainda estão na planta mãe.

A entrada de compostos não marcados nas vias metabólicas, vindos da degradação de reservas, principalmente no tecido cotiledonar, dificulta a interpretação dos dados de marcação e a simulações feitas pelo software para determinar os valores de fluxos. Uma alternativa para amenizar esses problemas seria uma marcação na semente de soja antes do processo de germinação, o que poderia trazer uma informação maior a respeito das rotas metabólicas em que as reservas, presentes nos cotilédones, participam.

A utilização de outras técnicas de detecção dos isótopos, como a RMN, pode ajudar a esclarecer alguns dados de CG-EM e aumentar as informações a respeito de dados de marcação que serão usados no modelo.

Esse trabalho resultou no primeiro modelo de rede metabólica para o cotilédone e eixo hipocótilo/raiz em plântulas de soja, na mobilização de reservas durante o crescimento inicial. O modelo pode ser usado para trabalhos futuros com MFA, e os dados aqui gerados podem ajudar em pesquisas com metabolismo vegetal e mobilização de reservas durante o crescimento inicial.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, D.K.; YOUNG, D. **Carbon and Nitrogen Provisions Alter the Metabolic Flux in Developing Soybean Embryos**. *Plant Physiology* 161: 1458-1475, 2013.

ALLEN D.K.; OHLROGGE J.B.; SHACHAR-HILL, Y. **The role of light in soybean seed filling metabolism**. *The Plant Journal* 58: 220–234, 2009.

ALONSO, A.P.; DALE,V; SHACHAR-HILL, Y. **Understanding fatty acid synthesis in developing maize embryos using metabolic flux analysis**. *Metabolic Engineering* 13: 454, 2010, 2010.

AMARAL, L.I.V.; GASPAR, M.; COSTA, P.M.F.; ADAIR, M.P.M., BUCKERIDGE, M.S. **Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais**. *Hoehnea* 34: 425–431, 2007.

ANDERSON, S.; NILSSON, L.A.; GROTH, I. **Floral scents in butterfly-pollinated plants: possible convergence in chemical composition**. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140: 129–153, 2002.

ANTONIEWICZ, M.R. **Methods and advances in metabolic flux analysis: a mini-review**. *J Ind Microbiol Biotechnol*: 23, 2015.

ARAÚJO, W.L.; TOHGE, T.; ISHIZAKI, K.; LEAVER, C.J.; FERNIE, A.R. **Protein degradation: An alternative respiratory substrate for stressed plants**. *Trends Plant Sci* 16: 489–498, 2011.

ASSEFA, Y.; BAJJALIEH, N.; ARCHONTOULIS, S.; CASTEEL, S.; DAVIDSON, D., KOVÁCS, P., NAEVE, S.; CIAMPITTI, I.A. **Spatial Characterization of Soybean Yield and Quality (Amino Acids, Oil, and Protein) for United States**. *Scientific Reports* 8: 14653, 2018.

BATES, P.D.; DURRETT, T.P.; OHLROGGE, J.B.; POLLARD, M. **Analysis of Acyl Fluxes through Multiple Pathways of Triacylglycerol Synthesis in Developing Soybean Embryos**. *Plant Physiology* 150: 55–72, 2009.

BELLIENY-RABELO, D.; OLIVEIRA, E.A.G.; RIBEIRO, E.S.; COSTA, E.P.; OLIVEIRA, A.E.A.; VENANCIO, T.M. **Transcriptome analysis uncovers key regulatory and metabolic aspects of soybean embryonic axes during germination**. *Scientific Reports* 6: 36009, 2016.

BENDER, M.M. **Variations in the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratios of plants in relation to the pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation**. *Phytochemistry* 10: 1239-1244. 1971.

BEWLEY, J.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Delevopment and Germination** .2º edição *Journal Bewley, ed., New York: Plenum Press, 1994.*

BROWN, C.S.; HUBER, S.C. **Photosynthesis, Reserve Mobilization and enzymes of sucrose metabolism in soybean (*Glycine max*) cotyledons.** *Physiol. Plantarum*, 70: 537-543, 1987.

BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C. **Mobilization of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth.** (Leguminosae-Faboideae). *Plant Sci* 117: 33–43, 1996.

BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S. **Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds.** *Plant Physiol Biochem* 38: 141–156, 2001.

BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S. **Acúmulo de reservas.** In AG Ferreira and F Borghetti, eds, *Germinação do Básico ao Aplicado*. Artmed, Porto Alegre, Brasil, pp 31–50, 2004.

CAI, X.; MAI, R.; ZOU, J.; ZHANG, H.; ZENG, X.; ZHENG, R.; WAN, C. **Analysis of aroma-active compounds in three sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans*) cultivars by GC-olfactometry and GC-MS.** *Biomed & Biotechnol* 7:638-648, 2014.

CANVIN, D.T.; BEEVERS, H. **Sucrose Synthesis from Acetate in the Germinating Castor Bean: Kinetics and Pathway.** *The journal of biological chemistry* 236: 988-995, 1961.

CHEN, Q.; LU, X.; GUO, X.; GUO, Q.; LI, D. **Metabolomics Characterization of Two Apocynaceae Plants, *Catharanthus roseus* and *Vinca minor*, Using GC-MS and LC-MS Methods in Combination.** *Molecules* 22: 997, 2017.

CHEUNG, C.Y.M.; WILLIAMS, T.C.R.; POOLMAN, M.G.; FELL, D.A.; RATCLIFFE, R.G.; SWEETLOVE, L.J. **A method for accounting for maintenance costs in flux balance analysis improves the prediction of plant cell metabolic phenotypes under stress conditions.** *Plant J* 75: 1050–1061, 2013.

CLEMENTE, T.E.; CAHOON, E.B. **Soybean oil: Genetic approaches for modification of functionality and total content.** *Plant Physiology* 151: 1030–1040, 2009.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira grãos. Safra 2018/19 Décimo levantamento.** Brasília. 113p, 2017.

DAL'MOLIN, C.G.O.; NIELSEN, L.K. **Plant genome-scale metabolic reconstruction and modelling.** *Current Opinion in Biotechnology* 24: 271-277, 2013.

DIEUAIDE-NOUBHANI, M.; RAFFARD, G.; CANIONI, P.; PRADET, A.; RAYMOND, P. **Quantification of Compartmented Metabolic Fluxes in Maize Root Tips Using Isotope Distribution from <sup>13</sup>C- or <sup>14</sup>C-Labeled Glucose.** *The Journal of Biological Chemistry* 270: 13147- 13159, 1995.

DOTTERL, S.; WOLF, L.M.; JURGENS, A. **Qualitative and quantitative analyses of flower scent in *Silene latifolia*.** *Phytochemistry* 66: 203–213, 2005.

DUNN, W.B.; ELLIS, D.I. **Metabolomics: current analytical platforms and methodologies.** TrAC-Trends Analyt. Chem. 24: 285–294, 2005.

EAST, J.W.; NAKAYAMA, T.O.M; PARKMAN, S. **Changes in stachyose, raffinose, sucrose, and monosaccharides during germination of soybean.** Crop Sci 12: 7–9 1972.

EASTMOND, P.J.; ASTLEY, H.M.; PARSLEY, K.; AUBRY, S.; WILLIAMS, B.P.; MENARD, G.N.; CRADDOCK, C.P.; NUNES-NESE, A.; FERNIE, A.R.; HIBBERD, J.M. **Arabidopsis uses two gluconeogenic gateways for organic acids to fuel seedling establishment.** Nat Commun 6: 6659, 2015.

EMBRAPA. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro.** Londrina: Embrapa Soja. 70p, 2014.

ETIENNE, A.; GENARD, M.; LOBIT, P.; MBEGUIÉ-A-MBÉGUIÉ, D.; BUGAUD, C. **What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells.** Journal of Experimental Botany 64: 1451–1469, 2013.

FAIT, A.; ANGELOVICI, R.; LESS, H.; OHAD, I.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; FERNIE, A.R.; GALILI, G. **Arabidopsis Seed Development and Germination is Associated with Temporally Distinct metabolic Switches.** Plant Physiology 142: 839–854, 2006.

FOYER, C.H.; LAM, H.; NGUYEN, H.T.; SIDDIQUE, K.H.M.; VARSHEY, R.K.; COLMER, T.D.; COWLING, W.; BRAMLEY, H.; MORI, T.A.; HODGSON, J.M.; COOPER, J.W.; MILLER, A.J.; KUNERT, K.; VORSTER, J.; CULLIS, C.; OZGA, J.A.; WAHLQVIST, M.L.; LIANG, Y.; SHOU, H.; SHI, K.; YU, J.; FODOR, N.; KAISER, B.N.; WONG, F.; VALLIYODAN, B.; CONSIDINE, M.J. **Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production.** Nature Plants: Doi: 10.1038/NPLANTS.2016.112, 2016.

GREENFIELD, H.; SOUTHGATE, D. **Food composition data: Production, Management and use.** B. Nurlingame & U. Charrondiere, eds., Rome: FAO, 2003.

GRONWALD, J.W.; JUNG, H.G.; LITTERER, L.A.; SOMERS D.A. **Comparison of post-germination mobilization of cell wall polysaccharides and non-cell wall carbohydrates in soybean (*Glycine max* L.) cotyledons.** J Sci Food Agric 89: 1981–1986, 2009.

HAN, C.; YIN, X.; HE, D.; YANG, P. **Analysis of Proteome Profile in Germinating Soybean Seed, and Its Comparison with Rice Showing the Styles of Reserves Mobilization in Different Crops.** Plos One 8: e56947, 2013.

HARLEY, J.L.; BEEVERS, H. **Acetate Utilization by Maize Roots.** Plant Physiol. 38: 117–123, 1963.

HAUSCHILD, R.; VON SCHAEWEN, A. **Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme activities in potato.** Plant Physiol 133: 47–62, 2003.

HE, D.; HAN, C.; YAO, J.; SHEN, S.; YANG, P. **Constructing the metabolic and regulatory pathways in germinating rice seeds through proteomic approach.** *Proteomics* 11: 2693–2713 2011.

HENNING, A.F.; MERTZ, L.M.; JUNIOR, E.A.J.; MACHADO, R.D.; FISS, G.; ZIMMER, P.D. **Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor.** *Bragantia* 69: 727-734, 2010.

Hill, S.A.; Rees, T.A. **Fluxes of carbohydrate metabolism in ripening bananas.** *Planta* 192: 52-60, 1994.

HOLLAND, N.; CHENG, W.; CROSSLEY, D.A. **Herbivore-induced changes in plant carbon allocation: assessment of below-ground C fluxes using carbon-14.** *Oecologia* 107: 87-94, 1996.

HOUSLEY, T.L.; SCHRADER, L.E.; MILLER, M.; SETTER, T.L. **Partitioning of <sup>14</sup>C-photosynthate, and long distance translocation of amino acids in preflowering and flowering, nodulated and nonnodulated soybeans.** *Plant Physiol* 64: 94–98, 1979.

HSU, S.H., HADLEY, H.H., HYMOWITZ, T. **Changes in carbohydrate contents of germinating soybean seeds.** *Crop Sci* 13: 407–410, 1973.

HSU, F.C., BENNETT, A.B., SPANSWICK, R.M. **Concentrations of sucrose and nitrogenous compounds in the apoplast of developing soybean seed coats and embryos.** *Plant Physiol* 75: 181–186, 1984.

HUEGE, J.; SULPICE, R.; GIBON, Y.; LISEC, J.; KOEHL, K.; KOPKA, J. **GC-EI-TOF-MS analysis of in vivo carbon-partitioning into soluble metabolite pools of higher plants by monitoring isotope dilution after <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> labelling.** *Phytochemistry* 68: 2258-2272, 2007.

HYMOWITZ, T. **On the domestication of the soybean.** *Econ Bot* 23: 408–421, 1970.

ISMOND, K.P.; DOLFERUS, R.; PAUW, M.; DENNIS, E.S.; GOOD, A.G. **Enhanced Low Oxygen Survival in Arabidopsis through Increased Metabolic Flux in the Fermentative Pathway.** *Plant Physiol.* 132, 2003.

IYER, V.V.; SRIRAM, G.; FULTON, D.B.; ZHOU, R.; WESTGATE, M.E.; SHANKS, J.V. **Metabolic flux maps comparing the effect of temperature on protein and oil biosynthesis in developing soybean cotyledons.** *Plant, Cell and Environment* 31: 506–517, 2008.

KANANI, H.; CHRYSANTHOPOULOS, P.K.; KLAPA M.I. **Standardizing GC-MS metabolomics.** *Journal of Chromatography B* 871: 191–201, 2008.

KARR-LILIENTHAL, L.K.; KADZERE, C.T.; GRIESHOP, C.M.; FAHEY, G.C. **Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review.** *Livestock Production Science* 91: 1-12 2005.

KENT, S.S.; PINKERTON, F.D.; STROBEL, G.A. **Photosynthesis in the Higher Plant, *Vicia faba* III. Serine, a Precursor of the Tricarboxylic Acid Cycle.** *Plant physiology* 53: 491-495, 1974.

KRASENSKY, J.; JONAK, C. **Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks.** *Journal of Experimental Botany* 63: 1593–1608, 2012.

KRISHNAN, P.; KRUGER, N.J.; RATCLIFFE, R.G. (2005). **Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR.** *Journal Exp. Bot.* 56: 255–265, 2005.

KROMER, J.O.; SORGENFREI, O.; KLOPPROGGE, K.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C. **In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome and fluxome.** *Journal Bacteriol.* 186: 1769–1784, 2004.

KRUGER, N.J.; RATCLIFFE, R.G. **Pathways and fluxes: exploring the plant metabolic network.** *Journal of experimental Botany* 63: 2243-2246, 2012.

KOLCHINSKI, E.M.; SCHUCH, L.O.B.; PESKE, S.T. **Crescimento inicial de soja em função do vigor das sementes.** *Revista Brasileira Agrociência* 12: 163-166, 2006.

KONO, N.; ARAKAWA, K.; OGAWA, R.; KIDO, N.; OSHITA, K.; IKEGAMI, K.; TAMAKI, S.; TOMITA, M. **Pathway projector: web-based zoomable pathway browser using KEGG atlas and Google Maps API.** *PLoS ONE* 4, e7710, 2009.

LAURENS, L.M.L.; QUINN, M.; WYCHEN, S.V.; TEMPLETON, D.W.; WOLFRUM, E.J. **Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by in situ transesterification.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403: 167-178, 2012.

LIMA, J.D.; SODEK, L. **N-stress alters aspartate and asparagine levels of xylem sap in soybean.** *Plant Sci* 165: 649–656, 2003.

LIMER, K.R.; RICE, R.H.; GEHRKE, C.W. **Complete mass spectra of the per-trimethylsilylated amino acids.** *Journal of Chromatography* 141: 355-375, 1977.

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. **Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants.** *Nature Protocols* 1: 387–396, 2006.

LONIEN, J.; SCHWENDER, J. **Analysis of Metabolic Flux Phenotypes for Two *Arabidopsis* Mutants with Severe Impairment in Seed Storage Lipid Synthesis.** *Plant Physiology* 151: 1617–1634, 2009.

LPWG. **Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades.** *Taxon* 62: 217-248, 2013.

MASAKAPALLI, S.K.; LAY, P.; HUDDLESTON, J.E.; POLLOCK, N.L.; KRUGER,

N.J.; RATCLIFFE, R.G. **Subcellular Flux Analysis of Central Metabolism in a Heterotrophic Arabidopsis Cell Suspension Using Steady-State Stable Isotope Labeling.** Plant Physiology 152: 602-619, 2010.

MASAKAPALLI, S.K.; KRUGER, N.J.; RATCLIFFE, R.G. **The metabolic flux phenotype of heterotrophic Arabidopsis cells reveals a complex response to changes in nitrogen supply.** The Plant Journal 74: 569-582, 2013.

MASAKAPALLI, S.K.; BRYANT, F.M.; KRUGER, N.J.; RATCLIFFE, R.G. **The metabolic flux phenotype of heterotrophic Arabidopsis cells reveals a flexible balance between the cytosolic and plastidic contributions to carbohydrate oxidation in response to phosphate limitation.** The Plant Journal 74: 964-977, 2014a.

MASAKAPALLI, S.K.; RITALA, A.; DONG, L.; KROL, A.R.V.; OKSMAN-CALDENTEY, K.M.; RATCLIFFE, R.G.; SWEETLOVE, L.J. **Metabolic flux phenotype of tobacco hairy roots engineered for increased geraniol production.** Phytochemistry 99: 73-85, 2014b.

MATSUDA, F.; MORINO, K.; MIYASHITA, M.; MIYAGAWA, H. **Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in wound-healing potato tuber tissue using stable isotope-labeled tracer and LC-MS spectroscopy.** Plant Cell Physiol. 44: 510-517, 2003.

MEYER, R.C.; STEINFATH, M.; LISEC, J.; BECHER, M.; WITUCKA-WALL, H.; TORJÉK, O.; FIEHN, O.; ECKARDT, A.; WILLMITZER, L.; SELBIG, J.; ALTMANN, T. **The metabolic signature related to high plant growth rate in Arabidopsis thaliana.** PNAS 104: 4759-4764, 2007.

MILLARD, P.; LETISSE, F.; SOKOL, S.; PORTAIS, J.C. **IsoCor: correcting MS data in isotope labeling experiments.** Bioinformatics 9:1294-1296, 2012.

MISSÃO, M.R. **Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado.** Maringá Management: Revista de ciências Empresariais, 3: 7-15, 2006.

MOREIRA, T.B.; LIMA, J.M.; COCA G.C.; WILLIAMS, T.C.R. **Insights into the spatial and temporal organisation of plant metabolism from network flux analysis.** Theoretical and Experimental Plant Physiology 31: 215-226, 2019a.

MOREIRA T.B.; SHAW, R.; LUO, X.; GANGULY, O.; KIM, H.; COELHO, L.G.F.; CHEUNG, C.Y.M.; WILLIAMS, T.C.R. **A Genome-Scale Metabolic Model of Soybean (*Glycine max*) Highlights Metabolic Fluxes in Seedlings.** Plant Physiology 180: 1912-1929, 2019b.

MORAIS Á.A.; SILVA, A.L. **Composição.** In ÁA Moraes and AL Silva., eds, Soja: Suas Aplicações. MDSI Editora Médica e Científica, Rio de Janeiro, Brazil, 67-77, 1996.

NELSON, C.D.; GORHAM, P.R. **Uptake and translocation of c14-labelled sugars applied to primary leaves of soybean seedlings.** Canadian Journal of Botany 35: 339-347, 1957.

NELSON, C.D.; PERKINS, H.J.; GORHAM, P.R. **Evidence for different kinds of concurrent translocation of photosynthetically assimilated c14 in the soybean.** Canadian Journal of Botany 37: 1181-1189, 1959.

NIELSEN, N. **Soybean seed composition.** Soybean Genetics, Molecular Biology and Biotechnology. CAB international, United Kingdom: 127-163, 1996.

O'GRADY, J.; SCHWENDER, J.; SHACHAR-HILL, Y.; MORGAN, J.A. **Metabolic cartography: experimental quantification of metabolic fluxes from isotopic labelling studies.** Journal of Experimental Botany 63: 2293-2308, 2012.

ORTH, J.D.; THIELE, I.; PALSSON, B.O. **What is flux balance analysis?** Nature Biotechnology 28: 245-248, 2010.

PRAXEDES, S.C.; MATTA, F.M.; LOUREIRO, M.E.; FERRÃO, M.A.G.; CORDEIRO, A.T. **Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. kouillou) leaves.** Environmental and Experimental Botany 56: 263-273, 2006.

PETERBAUER, T.; RICHTER, A. **Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds.** Seed Science Research 11: 185-197, 2001.

QUEK, L.; WITTMANN, C.; NIELSEN, L.; KRÖMER, J. **OpenFLUX: efficient modelling software for 13C-based metabolic flux analysis.** Microbial Cell Factories 8: 25, 2009.

RAJJOU, L.; DUVAL, M.; GALLARDO, K.; CATUSSE, J.; BALLY, J.; JOB, C.; JOB, D. **Seed Germination and Vigor.** Annual Review of Plant Biology 63: 507-533, 2012.

RATCLIFFE, R.G.; SHACHAR-HILL, Y. **Probing plant metabolism with NMR.** Plant Mol. Biol. 52: 499-526, 2001.

RATCLIFFE, R.G.; SHACHAR-HILL, Y. **Revealing metabolic phenotypes in plants: inputs from NMR analysis.** Biological Reviews 80: 27-43, 2005.

RATCLIFFE, R.G.; SHACHAR-HILL, Y. **Measuring multiple fluxes through plant metabolic networks.** Plant Journal 45: 490-551, 2006.

RAYMOND, P.; SPITERI, A.; DIEUAIDE, M.; GERHARDT, B.; PRADET, A. **Peroxisomal b-oxidation of fatty acids and citrate formation by a particulate fraction from early germinating sunflower seeds.** Plant Physiol Biochem 30: 153-161, 1992.

RECHENMACHER, C.; WIEBKE-STROHM, B.; OLIVEIRA-BUSATTO, L.A.; POLACCO, J.C.; CARLINI, C.R.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. **Effect of soybean ureases on seed germination and plant development.** *Genetics and Molecular Biology* 40: 209-216, 2017.

ROESSNER, U.; WAGNER, C.; KOPKA, J.; TRETHERWEY, R.N.; WILLMITZER, L. **Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry.** *Plant Journal* 23: 131–142, 2000.

ROSENTAL, L.; NONOGAKI, H.; FAIT, A. **Activation and regulation of primary metabolism during seed germination.** *Seed Science Research* 24: 1–15, 2014.

ROSCHE, A.; KRUGER, N.J.; RATCLIFFE, R.G. **Strategies for metabolic flux analysis in plants using isotope labelling.** *Journal Biotechnol.* 77: 81–102, 2000.

RONTEIN, D.; DIEUAIDE-NOUBHANI, M.; DUFOURC, E.J.; RAYMOND, P.; ROLIN, D. **The metabolic architecture of plant cells. Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells.** *Journal Biol. Chem.* 277: 43948–43960, 2002.

ROSENTAL, L.; NONOGAKI, H.; FAIT, A. **Activation and regulation of primary metabolism during seed germination.** *Seed Science Research* 24: 1–15, 2014.

SALON, C.; RAYMOND, P.; PRADET, A. **Quantification of carbon fluxes through the tricarboxylic acid cycle in early germinating lettuce embryos.** *J Biol Chem* 263: 12278–12287, 1998.

SANTOS, H.; BUCKERIDGE, M.S. **The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions.** *Annals of botany* 94: 819–830, 2004.

SAUER, U. **Metabolic networks in motion: <sup>13</sup>C-based flux analysis.** *Molecular Systems Biology* 2: 62, 2006.

SCHAEFER, J.; STEJSKAL, E.O.; BEARD, C.F. **Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Metabolism in Soybean Labeled by <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>.** *Plant Physiology* 55 1975.

SCHAUER, N.; STEINHAUSER, D.; STRELKOV, S.; SCHOMBURG, D.; ALLISON, G.; MORITZ, T.; LUNDGREN, K.; ROESSNER-TUNALI, U.; FORBES, M.G.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R.; KOPKA, J. **GC–MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples.** *FEBS* 579: 1331–1337, 2005.

SCHAUER, N.; FERNIE, A.R. **Plant metabolomics: towards biological function and mechanism.** *Trends Plant Sci.* 11: 508–516, 2006.

SCHMIDT, K.; MARX, A.; GRAAF, A.A.; WIECHERT, W.; SAHM, H.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. **<sup>13</sup>C Tracer Experiments and Metabolite Balancing for**

**Metabolic Flux Analysis: Comparing Two Approaches.** *Biotechnology and Bioengineering* 58: 254-257, 1997.

SCHWENDER, J.; OHLROGGE, J.B.; SHACHAR-HILL, Y. **A flux model of glycolysis and the oxidative pentosephosphate pathway in developing *Brassica napus* embryos.** *Journal Biol. Chem.* 278: 29442–29453, 2003.

SCHWENDER, J. **Metabolic flux analysis as a tool in metabolic engineering of Plants.** *Current Opinion in Biotechnology* 19:131–137, 2008.

SRIRAM, G; FULTON, D.B.; IYER, V.V.; PETERSON, J.M.; ZHOU, R.; WESTGATE, M.E.; SPALDING, M.H.; SHANKS, J.V. **Quantification of compartmented metabolic fluxes in developing soybean embryos by employing biosynthetically directed fractional <sup>13</sup>C labeling, two dimensional (<sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H) nuclear magnetic resonance, and comprehensive isotopomer balancing.** *Plant Physiol.* 136: 3043–3057, 2004.

SZECOWKA, M.; HEISE, R.; TOHGE, T.; NUNES-NESE, A.; VOSLOH, D.; HUEGE, J.; FEIL, R.; LUNN, J.; NIKOLOSKI, Z.; STITT, M.; FERNIE, A.R.; ARRIVAUULT, S. **Metabolic Fluxes in an Illuminated Arabidopsis Rosette.** *The Plant Cell*, 2013.

SWEETLOVE, L.J.; WILLIAMS, T.C.R.; CHEUNG, C.Y.M.; RATCLIFFE, R.G. **Modelling metabolic CO<sub>2</sub> evolution – a fresh perspective on respiration.** *Plant, Cell and Environment* 36: 1631–1640, 2013.

SWEETMAN, C.; DELUC, L.G.; GRANT, R.C.; FORD, C.M.; SOOLE, K.L. **Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits.** *Phytochemistry* 70: 1329–1344, 2009.

TAN-WILSON, A.L; WILSON, KA. **Mobilization of seed protein reserves.** *Physiologia Plantarum* 145: 140-153, 2011.

THOMAS, A.L.; COSTA, J.A. **Crescimento de plântulas de soja afetado pelo sombreamento dos cotilédones e suas reservas.** *Pesquisa Agropecuária brasileira*, 28: 925-929, 1993.

TIFFIN, L.O.; BROWN, J.C. **Selective absorption of iron from iron chelates by soybean plants.** *Plant Physiology* 36: 710–714, 1961.

USDA. **United States Department of Agriculture.** *World Agricultural Production.* 30p, 2019.

VARSHNEY, R.K.; CLOSE, T.J.; SINGH, N.K.; HOISINGTON, D.A.; COOK, D.R. **Orphan legume crops enter the genomics era!** *Current Opinion in Plant Biology* 12: 202-210, 2009.

VAUCLAR, P.; BLIGNY, R.; GOUT, E.; MEURON, V.; WIDMER, F. **Metabolic and structural rearrangement during dark-induced autophagy in soybean (*Glycine max* L.) nodules: an electron microscopy and <sup>31</sup>P and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study.** *Planta* 231: 1495–1504, 2010.

VILLAS-BÔAS, S.G.; MAS, S.; AKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. **Mass spectrometry in metabolome analysis**. *Mass Spectrometry Reviews* 24: 613–646, 2005.

VITOR, S.C.; AMARANTE, L.; SODEK, L. **Are phloem-derived amino acids the origin of the elevated malate concentration in the xylem sap following mineral N starvation in soybean?** *Planta* 248: 437–449, 2018.

ZAMBONI, N. **<sup>13</sup>C metabolic flux analysis in complex systems**. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 103-108, 2011.

ZHANG, L.; WANG, X.; GUO, J.; XIA, Q.; ZHAO, G.; ZHOU, H.; XIE, F. **Metabolic Profiling of Chinese Tobacco Leaf of Different Geographical Origins by GC-MS**. *J. Agric. Food Chem.* 61: 2597–2605, 2013.

WANG, Y.; XU, L.; SHEN, H.; WANG, J.; LIU, W.; ZHU, X.; WANG, R.; SUN, X.; LIU, L. **Metabolomic analysis with GC-MS to reveal potential metabolites and biological pathways involved in Pb & Cd stress response of radish roots**. *Scientific Reports* 5:18296, 2015.

WEITZEL, M.; NOH, K.; DALMAN, T.; NIEDENFUHR, S.; STUTE, B.; WIECHERT, W. **<sup>13</sup>CFLUX2—high-performance software suite for <sup>13</sup>C-metabolic flux analysis**. *Bioinformatics* 29: 143–145, 2013.

WHELAN, T.; SACKETT, W.M. **Carbon isotope discrimination in a plant possessing the c4 dicarboxylic acid pathway**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 41: 1205-1210, 1970.

WIECHERT, W. **<sup>13</sup>C metabolic flux analysis**. *Metab. Eng.* 3: 195–206, 2001.

WIECHERT, W.; MOLLNEY, M.; PETERSEN, S.; GRAAF, A.A. **A Universal Framework for <sup>13</sup>C Metabolic Flux Analysis**. *Metabolic Engineering* 3: 265-283, 2001.

WILLIAMS, T.C.R.; MIGUET, L.; MASAKAPALLI, S.K.; KRUGER, N.J.; SWEETLOVE, L.J.; RATCLIFFE, R.G. **Metabolic Network Fluxes in Heterotrophic Arabidopsis Cells: Stability of the Flux Distribution under Different Oxygenation Conditions**. *Plant Physiology* 148: 704–718, 2008.

YANG, C.; HUAW, Q.; SHIMIZU, K. **Metabolic Flux Analysis in Synechocystis Using Isotope Distribution from <sup>13</sup>C-Labeled Glucose**. *Metabolic Engineering* 4: 202-216, 2002.

## ANEXO I

Modelo utilizado para análise dos fluxos metabólicos em plântulas de soja

### PROJECT

NAME	VERSION	FORMAT	DATE	COMMENT
AtMFA	1		12/01/2018	//Template file

### NETWORK

FLUX_NAME	EDUCT_1	EDUCT_2	PRODUCT_1	PRODUCT_2
-----------	---------	---------	-----------	-----------

// network A (hipocotilo/raiz) and B (cotiledone)

//glucose uptake

Aupt	AGlcu	AcHexP		//glucose uptake
	#ABCDEF	#ABCDEF		

Bupt	AGlcu	BcHexP		
	#ABCDEF	#ABCDEF		

AuptUn	AGlcUn	AcHexP		//glucose uptake
	#ABCDEF	#ABCDEF		

BuptUn	BGlcUn	BcHexP		
	#ABCDEF	#ABCDEF		

//Degradação de açúcar

Achex1	AcHexP	Acucar		//síntese de acucar
	#ABCDEF	#ABCDEF		

Bchex1	Bcucar	BcHexP		//degradacao de acucar
	#ABCDEF	#ABCDEF		

//CO2 output

ACO2	AintCO2	AextCO2		//CO2 output
	#A	#A		

BCO2	BintCO2	BextCO2		
	#A	#A		

//methyl THF output

```

AmetTHFsink AMetTHF      AsinkMetTHF      //methyl THF output
      #A              #A

BmetTHFsink BMetTHF      BsinkMetTHF
      #A              #A

// cytosolic hexose catabolism

Ahex2    AcHexP      AGA3P    AGA3P
          #ABCDEF    #CBA     #DEF

Bhex2    BcHexP      BGA3P    BGA3P
          #ABCDEF    #CBA     #DEF

Ahex3    APEP        AcPYR     //cytosolic pyruvate kinase
          #ABC        #ABC

Bhex3    BPEP        BcPYR
          #ABC        #ABC

//cytosolic plastid exchange

Acpex AcHexP      ApHexP
      #ABCDEF    #ABCDEF

Bcpex BcHexP      BpHexP
      #ABCDEF    #ABCDEF

//plastidic hexose catabolism

Aphex1    ApHexP      AGA3P    AGA3P
          #ABCDEF    #CBA     #DEF

Aphex2    APEP        ApPYR
          #ABC        #ABC

Bphex1    BpHexP      BGA3P    BGA3P
          #ABCDEF    #CBA #DEF

Bphex2    BPEP        BpPYR
          #ABC        #ABC

//cytosolic & plastidic hexose catabolism

```

AcpHex      AGA3P      APEP  
              #ABC      #ABC

BcpHex      BGA3P      BPEP  
              #ABC      #ABC

//cell wall biosynthesis

Ahcellwall    AcHexP      Ahcellwall  
                  #ABCDEF      #ABCDEF

AhcellwallOUT    Ahcellwall      AhcellwallOUT  
                          #ABCDEF      #ABCDEF

Bhcellwall    BcHexP      Bhcellwall  
                  #ABCDEF      #ABCDEF

BhcellwallOUT    Bhcellwall      BhcellwallOUT  
                          #ABCDEF      #ABCDEF

//starch biosynthesis

Astarch      ApHexP      AStarch      //starch synthesis  
                  #ABCDEF      #ABCDEF

AstarchOUT    AStarch      AStarchOUT      //starch output  
                  #ABCDEF      #ABCDEF

BstarchUn    BStarchUn      BpHexP  
                  #ABCDEF      #ABCDEF

//pentose phosphate pathway

Appp1 ApHexP      AintCO2      APenP  
                  #ABCDEF      #A      #BCDEF

Appp2 APenP      AGA3P      AEnC2  
                  #ABCDE      #CDE      #AB

Appp3 APenP AEnC2      ASed7P  
                  #ABCDE      #ab      #abABCDE

Appp4 AEry4P      AEnC2      ApHexP  
                  #ABCD      #ab      #abABCD

Appp5 AGA3P      AEnC3      ApHexP  
                  #ABC #abc      #abcABC

```

Appp6 ASed7P      AEry4P      AEnC3
      #ABCDEFGH    #DEFG      #ABC

Bppp1 BpHexP      BintCO2     BPenP
#ABCDEF          #A          #BCDEF

Bppp2 BPenP        BGA3P       BEnC2
      #ABCDE          #CDE #AB

Bppp3 BPenP BEnC2BSed7P
      #ABCDE      #ab  #abABCDE

Bppp4 BEry4P      BEnC2BpHexP
      #ABCD        #ab  #abABCD

Bppp5 BGA3P       BEnC3BpHexP
      #ABC #abc    #abcABC

Bppp6 BSed7P      BEry4P      BEnC3
      #ABCDEFGH    #DEFG      #ABC

```

// TCA cycle

```

AcmexAcPYR      AmPYR
      #ABC          #ABC

Atca1 AmPYR      AmAcCoA     AintCO2
      #ABC          #BC  #A

Atca2 AOAAAmAcCoA ACit         //citrate synthase
      #ABCD        #ab  #DCBbaA

Atca3 ACit       AAKGAintCO2
      #ABCDEF      #ABCDE    #F

Atca4 AAKG       ASucc AintCO2
      #ABCDE        #BCDE    #A

Atca5a ASucc     AFum        //succinate dehydrogenase
      #ABCD        #ABCD

Atca5b ASucc     AFum        //succinate dehydrogenase
      #ABCD        #DCBA

Atca6a AFum      AOAA        //fumarase & malate dehydrogenase
      #ABCD        #ABCD

Atca6b AFum      AOAA        //fumarase & malate dehydrogenase
      #ABCD        #DCBA

```



Bana1 BPEP BintCO2 BOAA // phosphoenolpyruvate carboxylase  
 and phosphoenolpyruvate carboxykinase  
 #ABC #a #ABCa

//amino acid biosynthesis

Aasp AOAA AAsp //aspartate synthesis  
 #ABCD #ABCD

AaspOUT AAsp AextpAsp //aspartate for protein  
 synthesis #ABCD #ABCD

Aala AcPYR AAla //alanine synthesis  
 #ABC #ABC

AalaOUT AAla AextpAla  
 #ABC #ABC

Athr AAsp AThr //threonine synthesis  
 #ABCD #ABCD

AthrOUT AThr AextpThr //threonine for protein  
 synthesis #ABCD #ABCD

Aasn AAsp AAsn //asparagine synthesis  
 #ABCD #ABCD

AasnOUT AAsn AextpAsn  
 #ABCD #ABCD

Amet AAsp AMet //methionine synthesis  
 #ABCD #ABCD

AmetOUT AMet AextpMet  
 #ABCD #ABCD

Aglu AAKG AGlu //glutamate synthesis  
 #ABCDE #ABCDE

AgluOUT AGlu AextpGlu  
 #ABCDE #ABCDE

Aglu AGlu AGlu //glutamine synthesis

	#ABCDE		#ABCDE	
Agl <sub>OUT</sub>	AGln #ABCDE		AextpGln #ABCDE	
Aorn	AGlu #ABCDE	AOrn		// ornithine synthesis
			#ABCDE	
Acitru	AOrn	AintCO <sub>2</sub>	ACitrulline	//citrulline synthesis
	#ABCDE	#a	#ABCDEa	
Aarg	ACitrulline #ABCDEF	AAsp #abcd	AArg #ABCDEF	AFum #abcd //arginine synthesis
Aarg <sub>OUT</sub>	AArg #ABCDEF		AextpArg #ABCDEF	
Aser	AGA3P #ABC		ASer #ABC	//serine synthesis
Aser <sub>OUT</sub>	ASer #ABC		AextpSer #ABC	
Agly	ASer #ABC	AGly #AB	AMetTHF #C	//glycine synthesis
Agly <sub>OUT</sub>	AGly #AB		AextpGly #AB	
Ashik	APEP #ABC	Aery4P #abcd	AShikim #ABCabcd	//shikimate synthesis
Achor	AShikim #ABCDEFGH	APEP #abc	AChoris #ABCDEFGHabc	//chorismate synthesis
Aphe	AChoris #ABCDEFGHIJ		APhe #HIJBCDEFG#A	AintCO <sub>2</sub> //phenylalanine synthesis
Aphe <sub>OUT</sub>	APhe #ABCDEFGHI		AextpPhe #ABCDEFGHI	//phenylalanine for protein



Baspmix2	BAspUn		BAsp	//aspartate from protein
	#ABCD		#ABCD	
Bala	BAla	BcPYR		//alanine synthesis
	#ABC	#ABC		
Balamix2	BAlaUn		BAla	//alanine from protein
	#ABC		#ABC	
Bthr	BAsp	BThr		//threonine synthesis
	#ABCD	#ABCD		
Bthrmix2	BThrUn		BThr	//threonine from potein
	#ABCD		#ABCD	
Bthrd	BThr	BGly	BpAcCoA	//threonine degradation
	#ABCD		#AB #CD	
Basn	BAsn	BAsp		//asparagine synthesis
	#ABCD	#ABCD		
Basnmix2	BAsnUn		BAsn	//asparagine from protein
	#ABCD		#ABCD	
Bmet	BMet	BAsp		//methionine synthesis
	#ABCD	#ABCD		
Bmetmix2	BMetUn		BMet	//methionine from protein
	#ABCD		#ABCD	
Bglu	BAKG	BGlu		//glutamate synthesis
	#ABCDE	#ABCDE		
Bglumix2	BGluUn		BGlu	//glutamate from protein
	#ABCDE		#ABCDE	
Bgln	BGln	BGlu		//glutamine synthesis
	#ABCDE	#ABCDE		

Bglnmix2	BGlnUn		BGln	//glutamine from protein	
	#ABCDE		#ABCDE		
Born	BGlu	BOrn		// ornithine synthesis	
	#ABCDE		#ABCDE		
Bcitru	BOrn	BintCO2	BCitrulline	//citrulline synthesis	
	#ABCDE	#a	#ABCDEa		
Barg	BCitrulline	BAsp	BArg	BFum	//arginine synthesis
	#ABCDEF	#abcd	#ABCDEF	#abcd	
Bargmix2	BArgUn		BArg	//arginine from protein	
	#ABCDEF		#ABCDEF		
Bargd	BArg	BGlu	BintCO2	//arginine degradation	
	#ABCDEF		#ABCDE	#F	
Bser	BGA3P		BSer	//serine synthesis	
	#ABC	#ABC			
Bsermix2	BSerUn		BSer	//serine from protein	
	#ABC		#ABC		
Bgly	BSer	BGly	BMetTHF	//glycine synthesis	
	#ABC	#AB	#C		
Bglymix2	BGlyUn		BGly	//glycine from protein	
	#AB		#AB		
Bglyd	BGly	BintCO2	BMetTHF	//glycine synthesis	
	#AB	#A	#B		
Bshik	BPEP	BEry4P	BShikim	//shikimate synthesis	
	#ABC	#abcd	#ABCabcd		
Bchor	BShikim	BPEP	BChoris	//chorismate synthesis	
	#ABCDEFGFG	#abc	#ABCDEFGFGabc		
Bphe	BChoris		BPhe	BintCO2	//phenylalanine synthesis
	#ABCDEFGHJI			#HIJBCDEFG#A	
Bphemix2	BPheUn		BPhe	///phenylalanine from protein	
	#ABCDEFGHJI		#ABCDEFGHJI		
Bphed	BPhe	BTyr		///phenylalanine degradation	

	#ABCDEFGHI		#ABCDEFGHI		
Btyr	BChoris #ABCDEFGHJI		BTyr	BintCO2 #HIJBCDEFG#A	//tyrosine synthesis
Btyr1d	BTyr #ABCDEFGHI	Bhomog	BintCO2 #BCDEFGHI	#A	//tyrosine degradation
Btyr2d	Bhomog #BCDEFGHI	BAcetato	BFum	#HICB#DEFG	//tyrosine degradation
Btyrmix2	BTyrUn #ABCDEFGHI		BTyr	#ABCDEFGHI	
Bval	BpPYR #ABC #abc	BpPYR #ABbcC	BVal	BintCO2 #a	//valine synthesis
Bvalmix2	BValUn #ABCDE		BVal	#ABCDE	//valine from protein
Bval1dBVal	#ABCDE	BMetPro #BCDE	BintCO2 #A		//valine degradation
Bval2dBMetPro	#BCDE	BPropCoA #CDE #B	BintCO2		//valine degradation
Bleu1	BpPYR #ABC #abc	BpPYR #ABbcC	BIsoval #a	BintCO2	
Bleu2	BIsoval #ABCDE	BpAcCoA #ab #abBCDE	BLeu #A	BintCO2	//leucine synthesis
Bleumix2	BLeuUn #ABCDEF		BLeu	#ABCDEF	//leucine from protein
Bleu1dBLeu	#ABCDEF	BIsoval #BCDEF	BintCO2 #A		//leucine degradation
Bleu2dBIsoval	#BCDEF	BintCO2 #g #BCDEFg	BMetGlut		//leucine degradation
Bleu3dBMetGlut		BmAcCoA	BAcetato		//leucine degradation

```

#BCDEFG          #BC  #DEFG

Bleu4dBAcetato  BmAcCoA  BmAcCoA  //leucine degradation

#DEFG          #DE  #GF

Bile  BAsp  BpPYR      Bile  BintCO2  //isoleucine synthesis
      #ABCD      #abc  #ABbCDc  #a

Bilemix2  BileUn      Bile          //isoleucine from protein
#ABCDEF      #ABCDEF

Bile1d Bile          BMetBut  BintCO2  //isoleucine degradation
#ABCDEF      #BCDEF  #A

Bile2d BMetBut      BmAcCoA  BPropCoA
#BCDEF      #EF  #BCD

Bile3d BPropCoA      BmAcCoA  BintCO2
#BCD      #CD  #B

Bhis  BPenP      BHis          //histidine synthesis
#ABCDE      #EDCBA

Bhismix2  BHisUn      BHis          //histidine from protein
#ABCDE      #ABCDE

Bhisd BHis          BGlU          //histidine degradation
#ABCDE      #ABCDE

// lipid biosynthesis

Alip1 ApPYR          ApAcCoA  AintCO2  //plastidic  pyruvate
dehydrogenase      #ABC  #BC  #A

Alip2 ApAcCoA      AfattyA          //plastidic  fatty  acid
synthesis          #AB  #AB

AlipidOUT  AfattyA      AextlfattyA      //fatty  acid
accumulation in phospholipid
#AB  #AB

AglycerolOUT  AGA3P      Aextlglycerol      //glycerol
accumulation in phospholipid
#ABC  #ABC

```

```

    Blip1 BpPYR          BpAcCoA  BintCO2  //plastidic  pyruvate
dehydrogenase
          #ABC          #BC  #A

```

// tranferencia entre os tecidos

```

    BgluA BGlu          AGlu          //glutamate transfer
          #ABCDE          #ABCDE

```

```

    BchexA BcHexP          AcHexP          //glutamate transfer
          #ABCDEF          #ABCDEF

```

```

    BileA BIlle          AIlle          //Isoleucine transfer
          #ABCDEF          #ABCDEF

```

```

    BtyrA BTyr          ATyr          //Tyrosine transfer
          #ABCDEFGHI          #ABCDEFGHI

```

```

    BpheA BPhe          APhe          //phefilalanine transfer
          #ABCDEFGHI          #ABCDEFGHI

```

```

    BleuA BLeu          ALeu          //leucine transfer
          #ABCDEF          #ABCDEF

```

```

    BthrA BThr          AThr          //threonine transfer
          #ABCD          #ABCD

```

```

    BvalA BVal          AVal          //threonine transfer
          #ABCDE          #ABCDE

```

```

    BaspA BAsp          AAsp          //aspartato transfer
          #ABCD          #ABCD

```

## FLUXES

NET

NAME	FCD	VALUE(F/C)	ED_WEIGHT	LOW(F)	INC(F)	UP(F)
------	-----	------------	-----------	--------	--------	-------

BleuA	F	0.031				
BthrA	F	0.00097371				
BpheA	F	0.015				
BtyrA	F	0.01				

BileA	F	1.09764e-10
BvalA	F	3.03139e-20
BaspA	F	0.109026
Aupt	F	0.730333
AuptUn	C	0
BgluA	F	1.30309
BhexA	F	2.79012e-18
Bupt	D	
BuptUn	C	0
//starch		
AstarchOUT	C	0.035
BstarchUn	C	0.119
//cell wall		
AhcellwallOUT	C	0.7371
BhcellwallOUT	C	0.7469
//amino acids for protein synthese		
AaspOUT	C	0.017
AgluOUT	C	0.019
AserOUT	C	0.021
AglyOUT	C	0.026
AhisOUT	C	0
AargOUT	C	0.015
AalaOUT	C	0.027
AtyrOUT	C	0.010
AmetOUT	C	0
AvalOUT	C	0.024
ApheOUT	C	0.015
AileOUT	C	0.018
AleuOUT	C	0.031
AlysOUT	C	0.026
AasnOUT	C	0.017
AglnOUT	C	0.019
AthrOUT	C	0.017
//lipids		
AlipidOUT	C	0.094
AglycerolOUT	C	0

ACO2 D		
AmetTHFsink D		
BCO2 D		
BmetTHFsink C		0
Achex1	C	0.3922
Achex2	F	-0.410859
Achex3	F	0.13428
Acpex D		
Bchex1	C	2.8935
Bchex2	F	0.557851
Bchex3	F	0.187937
Bcpex D		
Aphex1	D	
Aphex2	D	
Bphex1	D	
Bphex2	D	
Acphex	D	
Bcphex	D	
Ahcellwall	D	
Bhcellwall	D	
Astarch	D	
Appp1 D		
Appp2 D		
Appp3 D		
Appp4 D		
Appp5 D		
Appp6 D		
Bppp1 D		
Bppp2 D		
Bppp3 D		
Bppp4 D		
Bppp5 D		
Bppp6 D		
AcmedD		

Atca1 D  
Atca2 D  
Atca3 D  
Atca4 D  
Atca5aD  
Atca5bD  
Atca6aD  
Atca6bD

BcmexD  
Btca1 D  
Btca2 D  
Btca3 D  
Btca4 D  
Btca5a D  
Btca5bD  
Btca6a D  
Btca6bD

Bgxc1 C 15.40606456

Bgxc2 D

Bgxc3 F 1.62285

Bgxc4 D

Aana1 D

Bana1 D

Aala D

Aasp D

Athr D

Aasn D

Amet D

Aglu D

Agln D

Aorn D

Acitru D

Aarg D

Aser D

Agly D

Ashik D

Achor D

Aphe D

Atyr D

Aval D

Alys1aD

Alys1bD

Aleu1 D

Aleu2	D	
Aile	D	
Ahis	D	
Bala	D	
Basp	D	
Bthr	C	0
Bthrd	D	
Basn	D	
Bglu	D	
Bglu	D	
Born	D	
Bcitru	D	
Barg	C	0
Bser	D	
Bgly	D	
Bglyd	D	
Bshik	D	
Bchor	D	
Bphe	C	0
Bphed	D	
Btyr	C	0
Btyr1d	D	
Btyr2d	D	
Bval	C	0
Bval1d	D	
Bval2d	D	
Bleu1	C	0
Bleu2	D	
Bleu1d	D	
Bleu2d	D	
Bleu3d	D	
Bleu4d	D	
Bile	C	0
Bile1d	D	
Bile2d	D	
Bile3d	D	
Bhis	C	0
Bargd	D	
Bhisd	D	

Alip1	D	
Alip2	D	

Blip1	C	0
-------	---	---

//amino acids from protein

Btyrmix2	C	0.2
----------	---	-----

Bilemix2	C	0.323
Bmetmix2	C	0.097
Bleumix2	C	0.654
Bvalmix2	C	0.423
Bglymix2	C	0.58
Bglumix2	C	0.859
Baspmix2	C	0.595
Balamix2	C	0.516
Bthrmix2	C	0.355
Bsermix2	C	0.552
Basnmix2	C	0.599
Bglnmix2	C	0.865
Bargmix2	C	0.514
Bhismix2	C	0.14
Bphemix2	C	0.447

XCH

NAMEFCD	VALUE(F/C)	ED_WEIGHT	LOW(F)	INC(F)	UP(F)
BleuA	C	0			
BthrA	C	0			
BileA	C	0			
BtyrA	C	0			
BpheAC	C	0			
BvalA	C	0			
BaspA	C	0			
BgluA	C	0			
BchexA	C	0			
Achex2	F	0.0746651			
Achex3	C	0			
Bchex2	F	0.315718			
Bchex3	C	0			
Acpex	F	0.000959865			
Bcpex	F	0.129375			
Aphex1	C	0			
Aphex2	C	0			
Bphex1	F	0.181069			
Bphex2	C	0			

AcpheX	C	0
BcpheX	F	0.989735
Ahcellwall	C	0
Bhcellwall	C	0
Astarch	C	0
Appp1	C	0
Appp2	F	0.98999
Appp3	C	0.712224
Appp4	F	3.88448e-19
Appp5	F	4.9452e-19
Appp6	F	0.0207391
Bppp1	C	0
Bppp2	F	1.22467e-06
Bppp3	F	0.156667
Bppp4	F	0.922354
Bppp5	F	0.30127
Bppp6	C	0.190486
AcmeXC		0
Atca1	C	0
Atca2	C	0
Atca3	C	0
Atca4	C	0
Atca5aD		
Atca5bC		0
Atca6aD		
Atca6bC		0.99
BcmexC		0
Btca1	C	0
Btca2	C	0
Btca3	C	0
Btca4	C	0
Btca5aD		
Btca5bC		0
Btca6aD		
Btca6bC		0.99
Bgxc2	C	0
Bgxc3	C	0
Bgxc4	C	0
Aana1	C	0

Bana1	C	0
Aala	C	0
Aasp	C	0
Athr	C	0
Aasn	C	0
Amet	C	0
Aglu	C	0
Agln	C	0
Acitru	C	0
Aorn	C	0
Aarg	C	0
Aser	C	0
Agly	C	0
Ashik	C	0
Achor	C	0
Aphe	C	0
Atyr	C	0
Aval	C	0
Alys1a	C	0
Alys1b	C	0
Aleu1	C	0
Aleu2	C	0
Aile	C	0
Ahis	C	0
Bala	F	4.62475e-12
Basp	F	1.20157e-06
Bthr	C	0
Basn	F	0.610078
Bmet	C	0
Bglu	F	0.99
Bgln	F	0.0500476
Bcitru	C	0
Born	C	0
Barg	C	0
Bser	F	1.28951e-19
Bgly	C	0
Bglyd	C	0
Bshik	C	0
Bchor	C	0
Bphe	C	0
Btyr	C	0
Bval	C	0
Bleu1	C	0
Bleu2	C	0
Bile	C	0
Bhis	C	0

Bthrd C	0
Bphed C	0
Btyr1d C	0
Btyr2d C	0
Bval1dC	0
Bval2dC	0
Bleu1dC	0
Bleu2dC	0
Bleu3dC	0
Bleu4dC	0
Bile1d C	0
Bile2d C	0
Bile3d C	0
Bargd C	0
Bhisd C	0
Alip1 C	0
Alip2 C	0
Blip1 C	0

#### EQUALITIES

##### NET

VALUE	FORMULA
0	Atca5b-Atca5a //standard net equalities
0	Atca6b-Atca6a //standard net equalities
0	Alys1a-Alys1b //standard net equalities
0	Btca5b-Btca5a //standard net equalities
0	Btca6b-Btca6a //standard net equalities
0	ACO2-0.0357*BCO2//CO2 ratio

##### XCH

VALUE	FORMULA
0	Atca5b-Atca5a //standard exchange equalities
0	Atca6b-Atca6a //standard exchange equalities
0	Btca5b-Btca5a //standard exchange equalities

0 Btca6b-Btca6a //standard exchange equalities

## INEQUALITIES

NET  
VALUE COMPFORMULA

// Inequalities for Input and Output Fluxes are generated automatically

0 <= Bval  
0 <= Bleu1  
0 <= Bleu2  
  
0 <= Aval  
0 <= Aphe  
0 <= Atyr  
0 <= Aile  
0 <= Aleu1  
0 <= Aleu2  
0 <= Aasp  
0 <= Athr  
0 <= Aphex2  
  
0 <= Blip1  
0 <= Bppp1  
0 <= Appp1  
0 <= Atca1  
0 <= Btca1  
0 <= Bphex2  
0 <= BvalA  
0 <= BleuA  
0 <= BthrA  
0 <= BpheA  
0 <= BchexA  
0 <= BtyrA  
0 <= BileA  
0 <= BaspA

XCH  
VALUE COMPFORMULA

// Inequalities for Input and Output Fluxes are generated automatically

FLUX\_MEASUREMENTS

FLUX_NAME	VALUE	DEVIATION
Aupt 1	0.1	

LABEL\_INPUT

META_NAME	ISOTOPOMER	VALUE
BfattydegA	#00	0.978
	#01	0.011
	#10	0.011
AGlcu	#000000	0.01
	#111111	0.99
AGlcUn	#100000	0.011
	#010000	0.011
	#001000	0.011
	#000100	0.011
	#000010	0.011
	#000001	0.011
	#000000	0.934
Bcucar	#100000	0.011
	#010000	0.011
	#001000	0.011
	#000100	0.011
	#000010	0.011
	#000001	0.011
	#000000	0.934
BGlcUn	#100000	0.011
	#010000	0.011
	#001000	0.011
	#000100	0.011
	#000010	0.011
	#000001	0.011
	#000000	0.934
BStarchUn	#100000	0.011
	#010000	0.011
	#001000	0.011
	#000100	0.011
	#000010	0.011

#000001	0.011
#000000	0.934

BValUn	#10000	0.011
#01000	0.011	
#00100	0.011	
#00010	0.011	
#00001	0.011	
#00000	0.945	

BLeuUn	#100000	0.011
#010000	0.011	
#001000	0.011	
#000100	0.011	
#000010	0.011	
#000001	0.011	
#000000	0.934	

B IleUn#100000	0.011
#010000	0.011
#001000	0.011
#000100	0.011
#000010	0.011
#000001	0.011
#000000	0.934

BTyrUn	#100000000	0.011
#010000000	0.011	
#001000000	0.011	
#000100000	0.011	
#000010000	0.011	
#000001000	0.011	
#000000100	0.011	
#000000010	0.011	
#000000001	0.011	
#000000000	0.901	

BPheUn	#100000000	0.011
#010000000	0.011	
#001000000	0.011	
#000100000	0.011	

#000010000 0.011  
#000001000 0.011  
#000000100 0.011  
#000000010 0.011  
#000000001 0.011  
#000000000 0.901

BGluUn #10000 0.011  
#01000 0.011  
#00100 0.011  
#00010 0.011  
#00001 0.011  
#00000 0.945

BAspUn #1000 0.011  
#0100 0.011  
#0010 0.011  
#0001 0.011  
#0000 0.956

BAlaUn #100 0.011  
#010 0.011  
#001 0.011  
#000 0.967

BSerUn #100 0.011  
#010 0.011  
#001 0.011  
#000 0.967

BGlyUn #10 0.011  
#01 0.011  
#00 0.978

BThrUn #1000 0.011  
#0100 0.011  
#0010 0.011

#0001 0.011  
#0000 0.956

BArgUn #100000 0.011  
#010000 0.011  
#001000 0.011  
#000100 0.011  
#000010 0.011  
#000001 0.011  
#000000 0.934

BMetUn #1000 0.011  
#0100 0.011  
#0010 0.011  
#0001 0.011  
#0000 0.956

BGlnUn #10000 0.011  
#01000 0.011  
#00100 0.011  
#00010 0.011  
#00001 0.011  
#00000 0.945

BHisUn #10000 0.011  
#01000 0.011  
#00100 0.011  
#00010 0.011  
#00001 0.011  
#00000 0.945

BAsnUn #1000 0.011  
#0100 0.011  
#0010 0.011  
#0001 0.011  
#0000 0.956

#### PEAK\_MEASUREMENTS

META_NAME	PEAK_NO	VALUE_S	VALUE_D-	VALUE_D+
VALUE_DD	VALUE_T	DEVIATION_S	DEVIATION_D-	DEVIATION_D+
DEVIATION_D+	DEVIATION_DD/T			

//no peak measurements

#### LABEL\_MEASUREMENTS

META_NAME	CUM_GROUP	VALUE	DEVIATION
-----------	-----------	-------	-----------

CUM\_CONSTRAINTS

PEAK\_MEASUREMENTS

META_NAME	PEAK_NO	VALUE_S	VALUE_D-	VALUE_D+
VALUE_DD	VALUE_T	DEVIATION_S	DEVIATION_D-	DEVIATION_D+
DEVIATION_D+	DEVIATION_DD/T			

MASS\_SPECTROMETRY

META_NAME	FRAGMENT	WEIGHT	VALUE	DEVIATION
-----------	----------	--------	-------	-----------

AcHexP	6	0	0.5189	0.10	//replicate 2 - Fructose 103
		1	0.4811	0.10	

AcHexP	5,6	0	0.4416	0.08	//replicate 2 - Fructose 205
		1	0.2094	0.04	
		2	0.3490	0.04	

AcHexP	4,5,6	0	0.4757	0.11	//replicate 2 - Fructose 217
		1	0.0201	0.02	
		2	0.0463	0.01	
		3	0.4579	0.10	

AcHexP	1,2,3	0	0.2642	0.04	//replicate 2 - Fructose 262
		1	0.3309	0.06	
		2	0.1599	0.04	
		3	0.2450	0.05	

AcHexP	4,5,6	0	0.4707	0.11	//replicate 2 - Fructose 307
		1	0.0220	0.01	
		2	0.0374	0.01	
		3	0.4699	0.10	

AcHexP	1,2,3,4	0	0.4039	0.11	//replicate 2 - Fructose 364
		1	0.0741	0.03	
		2	0.0396	0.02	
		3	0.1101	0.02	
		4	0.3724	0.09	

AcHexP	4,5,6	0	0.3208	0.16	//replicate 1 - Sacarose 217
		1	0.0695	0.02	
		2	0.0878	0.02	
		3	0.5219	0.15	

AcHexP 1,2,3,4,5,6	0	0.2711	0.15	//replicate 1 - Sacarose 271
	1	0.0088	0.02	
	2	0.0284	0.02	
	3	0.1200	0.02	
	4	0.0400	0.02	
	5	0.0614	0.02	
	6	0.4704	0.15	
AcHexP 3,4,5,6	0	0.2503	0.16	//replicate 1 - Sacarose 319
	1	0.0977	0.03	
	2	0.0385	0.02	
	3	0.1453	0.03	
	4	0.4682	0.15	
AcHexP 1,2,3,4,5,6	0	0.2807	0.16	//replicate 1 - Sacarose 361
	1	0.0074	0.02	
	2	0.0231	0.02	
	3	0.1136	0.02	
	4	0.0407	0.02	
	5	0.0588	0.02	
	6	0.4758	0.15	
AcHexP 1,2,3,4,5,6	0	0.2663	0.16	//replicate 1 - Sacarose 451
	1	0.0148	0.02	
	2	0.0326	0.02	
	3	0.1064	0.02	
	4	0.0368	0.02	
	5	0.1108	0.03	
	6	0.4323	0.12	
AFum 1,2,3,4	0	0.5030	0.09	//replica 1-245
	1	0.1449	0.03	
	2	0.1635	0.04	
	3	0.1028	0.03	
	4	0.0857	0.03	
ACit 1,2,3,4,5,6	0	0.3898	0.08	//replica 2 - 375
	1	0.1471	0.03	
	2	0.1757	0.04	
	3	0.1283	0.04	
	4	0.0857	0.03	
	5	0.0513	0.02	
	6	0.0222	0.02	

ACit	1,2,3,4,5,6		0 0.3036 0.08	//replica 2 - 465
			1 0.1692 0.03	
			2 0.2246 0.03	
			3 0.1100 0.05	
			4 0.1080 0.06	
			5 0.0495 0.03	
			6 0.0351 0.02	
AOAA	1,2,3,4		0 0.4237 0.11	//replica 1 - 245
			1 0.1669 0.04	
			2 0.1910 0.03	
			3 0.1377 0.04	
			4 0.0807 0.04	
AOAA	1,2,3,4		0 0.4425 0.13	//replica 2 - 335
			1 0.1670 0.06	
			2 0.1805 0.04	
			3 0.1321 0.05	
			4 0.0779 0.04	
AGlu		2	0 0.8476 0.03	//replica 1 - 174
			1 0.1524 0.03	
AGlu	2,3,4,5		0 0.6526 0.07	//replica 1 - 304
			1 0.1024 0.03	
			2 0.1689 0.02	
			3 0.0496 0.02	
			4 0.0265 0.02	
ApHexP		6	0 0.62447 0.10	//replicate 1 - Glucose - AMIDO 103
			1 0.37552 0.10	
ApHexP		1,2	0 0.54357 0.11	//replicate 1 - Glucose 160
			1 0.09822 0.02	
			2 0.35819 0.09	
ApHexP		5,6	0 0.56606 0.11	//replicate 1 - Glucose 205
			1 0.05854 0.02	
			2 0.37593 0.09	
ApHexP	4,5,6		0 0.52952 0.11	//replicate 1 - Glucose 217
			1 0.04920 0.02	
			2 0.08426 0.02	
			3 0.33701 0.10	

ApHexP 1,2,3	0	0.43964	0.10	//replicate 1 - Glucose 262
	1	0.08427	0.02	
	2	0.11024	0.03	
	3	0.36584	0.07	
ApHexP 3,4,5,6	0	0.49733	0.13	//replicate 1 - Glucose 319
	1	0.07516	0.04	
	2	0.02192	0.02	
	3	0.10127	0.03	
	4	0.30430	0.11	
ApHexP 1,2,3,4	0	0.45389	0.13	//replicate 1 - Glucose 364
	1	0.12937	0.04	
	2	0.04444	0.03	
	3	0.10963	0.04	
	4	0.26265	0.09	
ApHexP 1,2,3,4,5	0	0.39715	0.10	//replicate 1 - Glucose 466
	1	0.0807	0.05	
	2	0.06743	0.06	
	3	0.06984	0.04	
	4	0.21956	0.06	
	5	0.1653	0.05	
AGlu 2,3,4,5	0	0.60159	0.12	//replica 2 - 156 - pyro
	1	0.13697	0.02	
	2	0.16922	0.05	
	3	0.05919	0.03	
	4	0.03301	0.02	
AGlu 1,2,3,4,5	0	0.57962	0.12	//replica 2 - 258
	1	0.09811	0.04	
	2	0.17885	0.04	
	3	0.08485	0.05	
	4	0.04025	0.02	
	5	0.01829	0.02	
ATyr 2,3,4,5,6,7,8,9	0	0.93692	0.2	//replica 1 - 280
	1	0.02001	0.02	
	2	0.01001	0.02	
	3	0.00146	0.02	
	4	0.00712	0.02	
	5	0.00687	0.02	
	6	0.00581	0.02	
	7	0.00548	0.02	

			8	0.00632	0.02	
ATyr		1,2	0	0.95667	0.02	//replica 1 - 218
			1	0.02001	0.02	
			2	0.02334	0.02	
AAsp		2,3,4	0	0.59346	0.09	//replica 1 - 232
			1	0.17157	0.04	
			2	0.14004	0.04	
			3	0.09492	0.02	
AAla		2,3	0	0.57564	0.05	//replica 1 - 116
			1	0.05806	0.02	
			2	0.36629	0.06	
AAla		1,2	0	0.71341	0.11	//replica 1 - 218
			1	0.17076	0.09	
			2	0.11582	0.05	
AGly		2	0	0.86091	0.07	//replica 1 - 174
			1	0.13908	0.07	
AGly		2	0	0.78026	0.09	//replica 1 - 248
			1	0.21973	0.09	
AGly		1,2	0	0.78416	0.05	//replica 1 - 276
			1	0.08007	0.02	
			2	0.13576	0.04	
AVal		1,2	0	0.93088	0.11	//replica 1 - 218
			1	0.03159	0.09	
			2	0.03752	0.05	
ASer		2,3	0	0.66279	0.10	//replica 1 - 204
			1	0.22329	0.06	
			2	0.11391	0.04	
ASer		1,2	0	0.84973	0.07	//replica 1 - 218
			1	0.04219	0.02	
			2	0.10808	0.06	
ASer		1,2,3	0	0.66657	0.10	//replica 1 - 306
			1	0.14322	0.03	
			2	0.09085	0.03	
			3	0.09937	0.03	
ALeu		2,3,4,5,6	0	0.79785	0.07	//replica 1 - 158
			1	0.00948	0.02	
			2	0.01331	0.02	

			3	0.04974	0.02	
			4	0.01433	0.02	
			5	0.11526	0.05	
ALeu	1,2		0	0.61999	0.07	//replica 1 - 218
			1	0.24538	0.05	
			2	0.13462	0.03	
AIlle	2,3,4,5,6		0	0.95378	0.02	//replica 1 - 158
			1	0.02001	0.02	
			2	0.01720	0.02	
			3	0.00213	0.02	
			4	0.00302	0.02	
			5	0.00385	0.02	
AThr	3,4		0	0.94857	0.05	//replica 1 - 117
			1	0.01329	0.02	
			2	0.03814	0.03	
AThr	1,2,3,4		0	0.92453	0.07	//replica 1 - 248
			1	0.02364	0.02	
			2	0.02716	0.03	
			3	0.01387	0.02	
			4	0.01080	0.02	
AThr	1,2,3,4		0	0.90896	0.07	//replica 1 - 320
			1	0.02789	0.02	
			2	0.03112	0.03	
			3	0.02084	0.02	
			4	0.01119	0.02	
APhe	2,3,4,5,6,7,8,9		0	0.76647	0.13	//replica 1 - 192
			1	0.02065	0.02	
			2	0.01130	0.03	
			3	0.01816	0.02	
			4	0.01866	0.02	
			5	0.02355	0.02	
			6	0.02549	0.02	
			7	0.01337	0.02	
			8	0.09065	0.03	
APhe	1,2		0	0.87523	0.08	//replica 1 - 218
			1	0.02898	0.02	
			2	0.09579	0.06	
AGlu	2,3,4,5		0	0.41986	0.10	//replica 1 - 156
			1	0.13438	0.04	
			2	0.24541	0.04	

			3	0.09636	0.05	
			4	0.10400	0.03	
AGlu	1,2,3,4,5		0	0.50241	0.13	//replica 1 - 348
			1	0.12500	0.03	
			2	0.18794	0.04	
			3	0.09904	0.05	
			4	0.05020	0.02	
			5	0.03541	0.02	
AOrn		5	0	0.80849	0.07	//replica 1 - 174
			1	0.19151	0.07	
BcHexP		6	0	0.70344	0.10	//replicate 1 - Fructose 103
			1	0.29655	0.10	
BcHexP		5,6	0	0.38946	0.08	//replicate 1 - Fructose 205
			1	0.13957	0.10	
			2	0.47096	0.07	
BcHexP	4,5,6		0	0.64091	0.09	//replicate 1 - Fructose 217
			1	0.00493	0.02	
			2	0.03564	0.02	
			3	0.3185	0.10	
BcHexP	1,2,3		0	0.35658	0.16	//replicate 2 - Fructose 262
			1	0.33866	0.14	
			2	0.11335	0.13	
			3	0.19138	0.07	
BcHexP	4,5,6		0	0.67854	0.10	//replicate 1 - Fructose 307
			1	0.00791	0.02	
			2	0.01170	0.02	
			3	0.30184	0.10	
BcHexP	4,5,6		0	0.65529	0.08	//replicate 1 - Sacarose 217
			1	0.03848	0.02	
			2	0.04877	0.02	
			3	0.25745	0.06	
BcHexP	1,2,3,4,5,6		0	0.61829	0.08	//replicate 1 - Sacarose 271
			1	0.01	0.02	
			2	0.01835	0.02	
			3	0.08174	0.02	
			4	0.01608	0.02	
			5	0.01994	0.02	

		6	0.23559	0.05	
BcHexP	3,4,5,6	0	0.60897	0.22	//replicate 1 - Sacarose 319
		1	0.06516	0.02	
		2	0.02235	0.02	
		3	0.07941	0.03	
		4	0.22409	0.09	
BcHexP	1,2,3,4,5,6	0	0.62987	0.08	//replicate 1 - Sacarose 361
		1	0.01	0.02	
		2	0.00374	0.02	
		3	0.08642	0.02	
		4	0.01200	0.02	
		5	0.01879	0.02	
		6	0.23915	0.06	
BcHexP	1,2,3,4,5,6	0	0.61881	0.09	//replicate 1 - Sacarose 451
		1	0.01	0.02	
		2	0.00879	0.02	
		3	0.08107	0.02	
		4	0.01306	0.02	
		5	0.04586	0.02	
		6	0.22239	0.05	
BFum	1,2,3,4	0	0.66368	0.10	//replica 1-245
		1	0.09237	0.03	
		2	0.11582	0.04	
		3	0.06636	0.02	
		4	0.06175	0.02	
BCit	1,2,3,4,5,6	0	0.87122	0.07	//replica 1 - 375
		1	0.00484	0.02	
		2	0.06222	0.03	
		3	0.02427	0.02	
		4	0.02402	0.02	
		5	0.00799	0.02	
		6	0.00540	0.02	
BCit	1,2,3,4,5,6	0	0.88820	0.06	//replica 1 - 465
		1	0.00430	0.02	
		2	0.05119	0.03	
		3	0.02207	0.02	
		4	0.02106	0.02	
		5	0.00823	0.02	

			6	0.00492	0.02	
BOAA	1,2,3,4		0	0.61376	0.09	//replica 1 - 245
			1	0.10758	0.02	
			2	0.17414	0.04	
			3	0.07016	0.02	
			4	0.0434	0.02	
BOAA	1,2,3,4		0	0.61479	0.11	//replica 1 - 335
			1	0.12926	0.05	
			2	0.14892	0.06	
			3	0.06041	0.03	
			4	0.04660	0.02	
BGlu		2	0	0.87997	0.02	//replica 1 - 174
			1	0.12002	0.02	
BGlu	2,3,4,5		0	0.69245	0.04	//replica 1 - 304
			1	0.04831	0.02	
			2	0.17022	0.02	
			3	0.05680	0.02	
			4	0.03220	0.02	
BpHexP			6	0.72573	0.11	//replicate 1 - Glucose 103
			1	0.27426	0.11	
BpHexP		1,2	0	0.65548	0.13	//replicate 1 - Glucose 160
			1	0.07621	0.02	
			2	0.26830	0.11	
BpHexP			5,6	0.67425	0.13	//replicate 1 - Glucose 205
			1	0.04021	0.02	
			2	0.28553	0.11	
BpHexP	4,5,6		0	0.65604	0.15	//replicate 1 - Glucose 217
			1	0.02938	0.02	
			2	0.06228	0.02	
			3	0.25228	0.11	
BpHexP	1,2,3		0	0.56170	0.15	//replicate 1 - Glucose 262
			1	0.05375	0.04	
			2	0.06346	0.04	
			3	0.32107	0.09	
BpHexP	3,4,5,6		0	0.64826	0.17	//replicate 1 - Glucose 319
			1	0.03989	0.03	

		2	0.01172	0.02	
		3	0.07214	0.03	
		4	0.22798	0.10	
BpHexP	1,2,3,4	0	0.61512	0.14	//replicate 1 - Glucose 364
		1	0.12134	0.07	
		2	0.03387	0.02	
		3	0.09633	0.07	
		4	0.13331	0.09	
BpHexP	1,2,3,4,5	0	0.60140	0.19	//replicate 2 - Glucose 466
		1	0.0407	0.05	
		2	0.01832	0.03	
		3	0.07085	0.05	
		4	0.18445	0.10	
		5	0.08425	0.06	
BGlu	2,3,4,5	0	0.67401	0.06	//replica 1 - 156 - pyro
		1	0.06121	0.02	
		2	0.17892	0.02	
		3	0.05787	0.02	
		4	0.02860	0.02	
BGlu	1,2,3,4,5	0	0.67420	0.06	//replica 1 - 258
		1	0.03372	0.02	
		2	0.17262	0.04	
		3	0.06695	0.02	
		4	0.03592	0.02	
		5	0.01657	0.02	
BTyr	1,2	0	0.95681	0.01	//replica 1 - 218
		1	0.01414	0.02	
		2	0.02906	0.02	
BTyr	2,3,4,5,6,7,8,9	0	0.89822	0.02	//replica 1 - 280
		1	0.02001	0.02	
		2	0.01001	0.02	
		3	0.00364	0.02	
		4	0.01630	0.02	
		5	0.01794	0.02	
		6	0.01160	0.02	
		7	0.01101	0.02	
		8	0.01127	0.02	
BAsp	2,3,4	0	0.65362	0.11	//replica 1 - 232
		1	0.13747	0.04	
		2	0.11563	0.03	
		3	0.09327	0.04	

BAla	2,3	0 0.56312 0.09	//replica 1 - 116
		1 0.02904 0.02	
		2 0.40782 0.08	
BAla	1,2	0 0.63032 0.08	//replica 1 - 218
		1 0.13734 0.06	
		2 0.23233 0.07	
BGly	2	0 0.95469 0.02	//replica 1 - 174
		1 0.0453 0.02	
BGly	2	0 0.87046 0.03	//replica 1 - 248
		1 0.12953 0.03	
BGly	1,2	0 0.89520 0.01	//replica 1 - 276
		1 0.04428 0.02	
		2 0.06051 0.02	
BVal	1,2	0 0.92651 0.03	//replica 1 - 218
		1 0.03897 0.02	
		2 0.03451 0.02	
BSer	2,3	0 0.84755 0.05	//replica 1 - 204
		1 0.11417 0.04	
		2 0.03829 0.02	
BSer	1,2	0 0.92870 0.02	//replica 1 - 218
		1 0.01464 0.02	
		2 0.05666 0.02	
BSer	1,2,3	0 0.86358 0.05	//replica 1 - 306
		1 0.06762 0.03	
		2 0.04180 0.02	
		3 0.02700 0.02	
BLeu	2,3,4,5,6	0 0.88933 0.04	//replica 1 - 158
		1 0.02160 0.02	
		2 0.01832 0.02	
		3 0.02505 0.02	
		4 0.00948 0.02	
		5 0.03619 0.02	
BLeu	1,2	0 0.71593 0.07	//replica 1 - 218
		1 0.16700 0.04	
		2 0.11706 0.03	
B Ile	2,3,4,5,6	0 0.96096 0.01	//replica 1 - 158
		1 0.02001 0.02	
		2 0.01001 0.02	

			3	0.00076	0.02	
			4	0.00365	0.02	
			5	0.00461	0.02	
BThr	3,4		0	0.96431	0.03	//replica 1 - 117
			1	0.02001	0.02	
			2	0.01568	0.02	
BThr	1,2,3,4		0	0.95181	0.02	//replica 1 - 248
			1	0.02001	0.02	
			2	0.01117	0.02	
			3	0.01001	0.02	
			4	0.00700	0.02	
BThr	1,2,3,4		0	0.96670	0.02	//replica 1 - 320
			1	0.02001	0.02	
			2	0.01001	0.02	
			3	0.00140	0.02	
			4	0.00188	0.02	
BPhe	2,3,4,5,6,7,8,9		0	0.71137	0.07	//replica 1 - 192
			1	0.02001	0.02	
			2	0.01142	0.02	
			3	0.01544	0.02	
			4	0.00731	0.02	
			5	0.02451	0.02	
			6	0.02010	0.02	
			7	0.01077	0.02	
			8	0.17907	0.06	
BPhe	1,2		0	0.91810	0.01	//replica 1 - 218
			1	0.02351	0.02	
			2	0.05840	0.02	
BGlu	2,3,4,5		0	0.49315	0.06	//replica 1 - 156
			1	0.10961	0.04	
			2	0.24882	0.02	
			3	0.08844	0.02	
			4	0.05998	0.02	
BGlu	1,2,3,4,5		0	0.57996	0.04	//replica 1 - 348
			1	0.04792	0.03	
			2	0.20234	0.03	
			3	0.09567	0.04	
			4	0.05321	0.02	
			5	0.02091	0.02	

BOrn	5	0 0.74181 0.03	//replica 1 - 174
		1 0.25818 0.03	

OPTIONS

OPT\_NAME OPT\_VALUE

## ANEXO II

Tabela com a média das cinco simulações com menor valor de residuum

Valores de residuum: melhor simulação 291,28; 2ª melhor 291,281; 3ª melhor 291,282; 4ª melhor 291,285; 5ª melhor 291,294.

Nome da reação	Mehor Simulação	2a Melhor Simulação	3a Melhor Simulação	4a Melhor Simulação	5a Melhor Simulação	Média	Desvio
Aupt	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,00
Bupt	2,39	2,38	2,38	2,38	2,39	2,38	0,00
AuptUn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
BuptUn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Achex1	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,00
Bchex1	2,89	2,89	2,89	2,89	2,89	2,89	0,00
ACO2	3,14	3,14	3,14	3,14	3,14	3,14	0,00
BCO2	88,06	88,05	88,05	88,05	88,05	88,05	0,00
AmetTHFsink	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,00
BmetTHFsink	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Achex2	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	-0,24	0,00
Bchex2	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	-0,09	0,00
Achex3	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,00
Bchex3	-0,37	-0,36	-0,36	-0,36	-0,37	-0,36	0,01
Acpex	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	-0,22	0,00
Bcpex	4,62	4,62	4,62	4,62	4,62	4,62	0,00
Aphex1	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	-0,28	0,00
Aphex2	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,00
Bphex1	-13,87	-13,86	-13,85	-13,85	-13,90	-13,87	0,02
Bphex2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acphex	-1,07	-1,07	-1,07	-1,07	-1,07	-1,07	0,00
Bcphex	-8,30	-8,29	-8,28	-8,28	-8,34	-8,30	0,02
Ahcellwall	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74	0,00
AhcellwallOUT	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74	0,00
Bhcellwall	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,00
BhcellwallOUT	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,00
Astarch	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,00
AstarchOUT	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,00
BstarchUn	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,00
Appp1	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,08	0,00
Appp2	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,00
Appp3	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,00
Appp4	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03	0,00
Appp5	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,00
Appp6	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,00
Bppp1	55,83	55,79	55,75	55,77	55,94	55,82	0,08
Bppp2	37,22	37,19	37,17	37,18	37,30	37,21	0,05
Bppp3	18,61	18,60	18,58	18,59	18,65	18,61	0,03
Bppp4	18,61	18,60	18,58	18,59	18,65	18,61	0,03
Bppp5	18,61	18,60	18,58	18,59	18,65	18,61	0,03
Bppp6	18,61	18,60	18,58	18,59	18,65	18,61	0,03
Acmex	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,00
Atca1	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,00
Atca2	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,00

Atca3	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,00
Atca4	1,42	1,42	1,42	1,42	1,42	1,42	0,00
Atca5a	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,00
Atca5b	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,00
Atca6a	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,00
Atca6b	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,00
Bcmex	0,15	0,15	0,16	0,16	0,14	0,15	0,01
Btca1	0,15	0,15	0,16	0,16	0,14	0,15	0,01
Btca2	4,30	4,30	4,31	4,31	4,29	4,30	0,01
Btca3	9,50	9,52	9,54	9,53	9,43	9,50	0,04
Btca4	10,49	10,51	10,53	10,52	10,42	10,49	0,04
Btca5a	7,80	7,80	7,81	7,80	7,78	7,80	0,01
Btca5b	7,80	7,80	7,81	7,80	7,78	7,80	0,01
Btca6a	8,11	8,11	8,12	8,12	8,09	8,11	0,01
Btca6b	8,11	8,11	8,12	8,12	8,09	8,11	0,01
Bgxc1	15,41	15,41	15,41	15,41	15,41	15,41	0,00
Bgxc2	10,31	10,31	10,32	10,31	10,27	10,30	0,02
Bgxc3	5,10	5,09	5,09	5,09	5,13	5,10	0,02
Bgxc4	5,10	5,09	5,09	5,09	5,13	5,10	0,02
Aana1	-1,35	-1,35	-1,35	-1,35	-1,35	-1,35	0,00
Bana1	-7,93	-7,92	-7,92	-7,92	-7,96	-7,93	0,02
Aasp	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AaspOUT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
Aala	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,00
AalaOUT	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,00
Athr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AthrOUT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
Aasn	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
AasnOUT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
Amet	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AmetOUT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Aglu	-1,33	-1,33	-1,33	-1,33	-1,34	-1,33	0,00
AgluOUT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
Agln	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
AglnOUT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
Aorn	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
Acitru	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
Aarg	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
AargOUT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
Aser	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,00
AserOUT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
Agly	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,00
AglyOUT	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,00
Ashik	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Achor	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Aphe	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ApheOUT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
Atyr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AtyrOUT	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
Aval	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
AvalOUT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
Alys1a	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
Alys1b	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
AlysOUT	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,00

Aleu1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Aleu2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AleuOUT	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,00
Aile	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AileOUT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
Ahis	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AhisOUT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Basp	-1,22	-1,22	-1,22	-1,22	-1,22	-1,22	0,00
Baspmix2	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,00
Bala	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,00
Balamix2	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,00
Bthr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bthrmix2	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,00
Bthrd	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,00
Basn	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,00
Basnmix2	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,00
Bmet	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,00
Bmetmix2	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,00
Bglu	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	0,00
Bglumix2	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,00
Bgln	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,00
Bglnmix2	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,00
Born	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bcitru	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Barg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bargmix2	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,00
Bargd	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,00
Bser	-1,01	-1,01	-1,01	-1,01	-1,01	-1,01	0,00
Bsermix2	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,00
Bgly	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	-0,46	0,00
Bglymix2	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,00
Bglyd	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,00
Bshik	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bchor	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bphe	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bphemix2	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,00
Bphed	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,00
Btyr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Btyr1d	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,00
Btyr2d	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,00
Btyrmix2	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,00
Bval	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bvalmix2	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,00
Bval1d	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,00
Bval2d	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,00
Bleu1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bleu2	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,00
Bleumix2	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,00
Bleu1d	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,00
Bleu2d	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,00
Bleu3d	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,00
Bleu4d	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	0,00
Bile	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bilemix2	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,00

Bile1d	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,00
Bile2d	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,00
Bile3d	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,00
Bhis	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bhismix2	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,00
Bhisd	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,00
Alip1	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,00
Alip2	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,00
AlipidOUT	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,00
AglycerolOUT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Blip1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
BgluA	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	0,00
BchexA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
BileA	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
BtyrA	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
BpheA	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
BleuA	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,00
BthrA	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
BvalA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
BaspA	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,00