

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Giselle Vaz de Sousa

**MECANISMOS DE TOLERÂNCIA E ALTERAÇÕES METABÓLICAS
EM PLANTAS DE LINHAÇA DOURADA (*LINUM USITATISSIMUM* L.)
EXPOSTAS E CO-EXPOSTAS A ARSÊNIO E SELÊNIO**

Belo Horizonte
2020

UFMG/ICEX/DQ. 1423

T. 651

Giselle Vaz de Sousa

**MECANISMOS DE TOLERÂNCIA E ALTERAÇÕES METABÓLICAS
EM PLANTAS DE LINHAÇA DOURADA (*LINUM USITATISSIMUM* L.)
EXPOSTAS E CO-EXPOSTAS A ARSÊNIO E SELÊNIO**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências - Química.

Orientador: Profa. Dra. Letícia Malta Costa

Coorientador: Profa. Dra. Luzia Valentina Modolo (ICB-Botânica)

Belo Horizonte

2020

Ficha Catalográfica

S725m Sousa, Giselle Vaz de
2020 Mecanismos de tolerância e alterações metabólicas
T em plantas de linhaça dourada (*Linum usitatissimum* L.)
expostas e co-expostas a arsênio e selênio
[manuscrito] / Giselle Vaz de Sousa. 2020.
[xviii], 108 f. : il.

Orientadora: Letícia Malta Costa.
Coorientadora: Luzia Valentina Modolo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses. 2. Toxicidade -
Testes - Teses. 3. Resíduos de arsênio - Teses. 4.
Linho (Planta) - Teses. 5. Selênio - Teses. 6.
Espectrometria de massa - Teses. 7. Plantas -
Metabolismo - Teses. I. Costa, Letícia Malta,
Orientadora. II. Modolo, Luzia Valentina,
Coorientadora. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**"Mecanismos de Tolerância e Alterações Metabólicas Em Plantas de Linhaça Dourada (Linun Usitatissimum L.)
Expostas e Co-expostas Ao Arsênio e Selênio"**

Giselle Vaz de Sousa

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Letícia Malta Costa - Orientadora
UFMG

Profa. Luzia Valentina Modolo - Coorientadora
UFMG/ICB

Prof. Bruno Lemos Batista
UFABC

Prof. Leandro José dos Santos
UFV (Campus Florestal)

Profa. Adriana Nori de Macedo
UFMG

Profa. Clésia Cristina Nascentes
UFMG

Belo Horizonte, 27 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Malta Costa, Presidente de comissão**, em 27/11/2020, às 18:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Jose dos Santos, Usuário Externo**, em 27/11/2020, às 18:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Nori de Macedo, Professora do Magistério Superior**, em 27/11/2020, às 19:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Lemos Batista, Usuário Externo**, em 27/11/2020, às 19:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luzia Valentina Modolo, Professora do Magistério Superior**, em 30/11/2020, às 19:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clesia Cristina Nascentes, Membro de comissão**, em 02/12/2020, às 12:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0430854 e o código CRC 76172701.

AGRADECIMENTOS

Não foi nada fácil chegar até aqui! Se não fosse pela ajuda de outras pessoas eu jamais teria conseguido. Tenho muito a agradecer a todos!

Primeiro Jeová que me deu forças em todos os momentos e sabedoria para tomar as melhores decisões;

Segundo a minha família que sempre me apoiou. Em especial, agora meu marido Cássio, que por muitas vezes além do apoio emocional me deu ajuda prática. E a nossa filha Alícia que sempre estará nos nossos corações.

À minha orientadora Letícia Malta Costa, que além de dividir comigo toda sua experiência como pesquisadora se tornou uma grande amiga;

À minha coorientadora Luzia Valentina, que mesmo estando longe providenciou vários recursos para essa pesquisa;

À minha grande amiga Anna Elisa que me ensinou a trabalhar com plantas;

A todos os membros do laboratório LEAQUAA, em especial minha amiga Vânia, pelo companheirismo, incentivo e trocas de experiências. Obrigada por nunca desistir!

Aos colaboradores desse trabalho Prof. Eduardo Gusmão (UFV-CAF), Prof. Rodinei Augusti e Prof. Clésia Nascentes, que sempre estiveram disponíveis para dúvidas e questionamentos;

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em especial ao Departamento de Química (DQ), pela oportunidade de realização deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química pelos recursos fornecidos;

À UFV-CAF por ter me concedido a licença no momento que mais precisei;

À Universidade Estadual de Campinas e ao Pedro Vendramini, pelo apoio nas análises com DESI-MSI.

Ao Sr. Luiz que sempre recebe a todos com um sorriso na portaria do DQ.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu **MUITO OBRIGADA!**

“Se falta sabedoria a algum de vocês, que ele persista em pedi-la a Deus – pois ele dá a todos generosamente.”

Tiago 1:5

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS	xvii
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1: REFERENCIAL TEÓRICO	3
1.1 Linhaça Dourada	3
1.2 Arsênio em Plantas	4
1.3 Selênio em plantas	6
1.4 Interações antagônicas e sinérgicas entre selênio e arsênio em plantas.....	9
1.5 Fitoquelatinas	9
1.6 Quantificação de selênio e arsênio em plantas por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente.....	12
1.7 Espectrometria de massas com ionização ambiente.....	13
1.7.1 Desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging (DESI-MSI)	15
1.7.2 Paper Spray mass spectrometry (PS-MS)	16
CAPÍTULO 2 - INTERAÇÕES ARSÊNIO E SELÊNIO E SEUS EFEITOS NA TRANSLOCAÇÃO DE NUTRIENTES EM PLANTAS DE LINHAÇA DOURADA...	19
2.1 Introdução	19
2.2 Objetivo	21
2.2.1 Objetivos específicos	21
2.3 Materiais e Métodos	21
2.3.1 Instrumentação	21
2.3.2 Reagentes.....	22
2.3.3 Germinação das sementes	23
2.3.4 Testes de toxicidade	23
2.3.5 Preparo das amostras.....	25
2.3.6 Figuras de Mérito	25
2.4 Resultados e Discussão	26
2.4.1 Teste de toxicidade e matéria seca da planta.....	27

2.4.2	Acumulação de As e Se em folhas, caule e raiz	31
2.4.3	Fator de translocação	34
2.4.4	Os testes de toxicidade revelaram toxicidade diferenciada do Se e diminuição dos efeitos tóxicos do As quando co-exposto com Se ^{IV}	35
2.4.5	Se promove maior acúmulo de As nas folhas, caules e raízes	36
2.4.6	Absorção dos micronutrientes essenciais Fe, Mn e Zn	37
2.4.7	Correlação multi-elementar	40
2.5	Conclusão	42
CAPÍTULO 3 – IDENTIFICAÇÃO DE FITOQUELATINAS E COMPOSTOS DE ARSÊNIO E SELÊNIO EM RAÍZES DE LINHAÇA DOURADA APÓS CO-EXPOSIÇÃO AO ARSENATO E SELENITO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO PAPER SPRAY		43
3.1	Introdução	43
3.2	Objetivo	46
3.2.1	Objetivos específicos	46
3.3	Materiais e Métodos	46
3.3.1	Instrumentação	46
3.3.2	Reagentes e Soluções	48
3.3.3	Cultivo das plantas	49
3.3.4	Preparo das amostras para a determinação de As e Se por ICP-MS	50
3.3.5	Preparo das amostras para a identificação dos metabólitos por PS-MS ..	51
3.4	Resultados e Discussão	52
3.4.1	Otimização para identificação dos metabólitos por PS-MS	52
3.4.2	Identificação de compostos de As e Se não complexados por PCs	53
3.4.3	Identificação da glutatona, fitoquelatinas e metabólitos por PS-MS	61
3.5	Conclusão	68
CAPÍTULO 4 – TOXICOMETABÔLÓMICA EM PLANTAS DE LINHAÇA DOURADA EXPOSTAS E CO-EXPOSTAS A ARSENATO E SELENITO POR DESI-MSI		69
4.1	Introdução	69
4.2	Objetivo	71
4.2.2	Objetivos Específicos	71
4.3	Materiais e Métodos	71
4.3.1	Materiais e Reagentes	71
4.3.2	Germinação das Sementes	72

4.3.3 Cultivo das plantas.....	72
4.3.4 Preparo da amostra para realização do <i>imprint</i>	73
4.3.5 Análises DESI-MSI.....	74
4.4 Resultados e Discussão	76
4.4.1 Metabólitos não inibidos pela exposição e co-exposição.....	77
4.4.2 Metabólitos formados pela exposição ao selenito e co-exposição ao arsenato e selenito.....	79
4.4.3 Metabólitos inibidos pela exposição ao selenito	80
4.4.4 Metabólitos formados pela exposição ao arsenato e co-exposição ao arsenato e selenito.....	82
4.4.5 Identificação.....	83
4.5 Conclusão	85
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS	88
APÊNDICE	99

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo investigar as interações antagônicas e sinérgicas entre As e Se em plantas de linhaça dourada (*Linum usitatissimum* L.), buscando entender como o Se altera os mecanismos de tolerância e o metabolismo da planta na presença do As. A absorção, toxicidade, translocação e a distribuição de nutrientes essenciais (Fe, Mn e Zn) nas plantas foram avaliados em experimentos de exposição ao As^V, Se^{IV} e Se^{VI} e co-exposição ao As^V + Se^{IV}. Para isso, as plantas foram cultivadas em solução de Hoagland 10% v v⁻¹ suplementada com As^V, Se^{IV}, Se^{VI} ou As^V + Se^{IV} em diferentes concentrações. As quantificações de As e Se foram realizadas por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). As alterações provocadas pelo Se nos mecanismos de tolerância e no metabolismo da planta quando co-exposto ao As também foram investigadas utilizando duas técnicas de espectrometria de massas com ionização ambiente PS-MS (*paper spray mass spectrometry*) e DESI-MSI (*desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging*). A identificação de compostos tiólicos (fitoquelatinas e seus metabólitos) e de compostos inorgânicos e orgânicos de As e Se em extratos de raízes de plantas co-expostas foram feitas por PS-MS. Alterações metabólicas provocadas em folhas de plantas expostas a As^V, Se^{IV} e co-expostas a As^V + Se^{IV} foram verificadas por imagens químicas obtidas por DESI-MSI. Os experimentos de exposição e co-exposição demonstraram que o Se^{VI} é a espécie mais tóxica e com maior translocação. O Se^{IV} na concentração de 5 µmol L⁻¹ foi capaz de reduzir o acúmulo de As e a co-exposição alterou a absorção de Fe, Mn e Zn. A identificação de fitoquelatinas (PCs), que são compostos tiólicos responsáveis por complexar metais e metalóides em plantas e diminuir sua toxicidade, foi realizada por PS-MS. Nos extratos de raízes de plantas co-expostas foram identificados glutathiona (GSH), reduzido-PC₂, reduzido-PC₃, Se^{II}-PC₂ e As^{III}-PC₃. Compostos inorgânicos (As^V e As^{III}) e orgânicos (ácido dimetilarsínico – DMA e ácido monometilarsônico - MMA) de As também foram identificados por PS-MS. Nas folhas foi possível verificar quatro perfis de alterações metabólicas que ocorreram em função das diferentes concentrações de exposição e co-exposição. O Se^{IV} diminuiu a toxicidade do As^V apesar da absorção e translocação de As terem aumentado. Não foi possível associar a diminuição da toxicidade do As^V na presença de Se^{IV} com a formação de

PCs. As alterações metabólicas mais evidentes observadas nas folhas das plantas indicam a formação de metabólitos relacionados ao estresse abiótico.

Palavras Chave: toxicidade, arsênio, selênio, fitoquelatinas, espectrometria de massas.

ABSTRACT

The goal of this work was to investigate the antagonistic and synergistic interactions between As and Se in golden flaxseed plants (*Linum usitatissimum* L.) in order to understand how Se changes the tolerance mechanisms and metabolism in the presence of As. Absorption, toxicity, translocation and the distribution of essential nutrients (Fe, Mn and Zn) in plants were evaluated in the experiments exposure to As^V, Se^{IV} and Se^{VI} and co-exposure to As^V + Se^{IV}. Seedlings were cultivated in a 10 % v v⁻¹ Hoagland solution supplemented with As^V, Se^{IV}, Se^{VI} or As^V + Se^{IV} at different concentrations. Elemental quantification was performed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The changes caused by Se in the tolerance mechanisms and metabolism when co-exposed to As were also investigated using two mass spectrometry with ambient ionization techniques PS-MS (paper spray mass spectrometry) and DESI-MSI (desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging). The detection and identification of thiolic compounds (phytochelatins and their metabolites) and inorganic and organic compounds of As and Se in extracts from co-exposed root plant were made by PS-MS. Metabolic changes caused in plant leaves exposed to As^V, Se^{IV} and co-exposed to As^V + Se^{IV} were verified by chemical images obtained by DESI-MSI. Exposure and co-exposure experiments demonstrated that Se^{VI} was the most toxic species with the highest translocation by the plant. Se^{IV} at a concentration of 5 µmol L⁻¹ was able to reduce the accumulation of As and the co-exposure altered the absorption of Fe, Mn and Zn. The detection and identification of phytochelatins (PCs), that are thiolic compounds responsible for complexing metals and metalloids in plants and reducing their toxicity was possible using PS-MS. Glutathione (GSH), reduced-PC₂, reduced-PC₃, Se^{II}-PC₂ and As^{III}-PC₃ were identified in the extracts of co-exposed plants. Inorganic compounds (As^V and As^{III}) and organic compounds (dimethylarsinic acid - DMA and monomethylarsonic acid - MMA) from As were also identified by PS-MS. In the leaves it was possible to verify four profiles of metabolic changes that occurred after exposure and co-exposure at different concentrations of As and Se. Se^{IV} decreases As^V toxicity although As absorption and translocation have increased. It was not possible to associate the decrease in As^V toxicity in the presence of Se^{IV} with the PCs

formation. The most evident metabolic changes observed in the leaves indicated the formation of metabolites related to abiotic stress.

Keywords: toxicity, arsenic, selenium, phytochelatins, mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Diagrama esquemático da absorção e metabolismo do arsênio em plantas.....	6
Figura 1.2 – Diagrama esquemático absorção e das reações bioquímicas que ocorrem no metabolismo do selênio em plantas. Os principais compostos são indicados em negrito	8
Figura 1.3 - Estrutura da fitoquelatina PC2(Glu= ácido glutâmico, Cys= cisteína e Gly= Glicina).....	10
Figura 1.4 - Mecanismos de biossíntese, ligação de metais e armazenamento de fitoquelatinas no interior de células vegetais	11
Figura 1.5 – Componentes de um espectrômetro de massas (autoria própria).....	13
Figura 1.6 - Diagrama esquemático da técnica DESI-MS (adaptada [66]).	16
Figura 1.7 - Representação esquemática da fonte PS-MS (adaptada [70]).	17
Figura 2.1 – Plantas de linhaça dourada expostas a As^V no 3º e 18º dias após a germinação (DAG). Os números nos círculos correspondem as concentrações de exposição a As^V em $\mu\text{mol L}^{-1}$ nos três vasos destacados. A letra c corresponde os vasos de plantas controle.....	24
Figura 2.2 – Crescimento das raízes em função das diferentes concentrações de exposição a As^V	28
Figura 2.3 - Índice de tolerância da raiz (ITR) para plantas de linhaça dourada expostas (Se^{IV} , Se^{VI} e As^V) e co-expostas ($Se^{IV} + As^V$), em função da concentração dos íons com 15 dias de exposição. Os valores são a média \pm desvio padrão de experimentos conduzidos com três réplicas biológicas (as equações são descritas no apêndice A).	29
Figura 2.4 - Porcentagem de massa seca total para plantas de linhaça dourada expostas (Se^{IV} , Se^{VI} e As^V) e co-expostas ($Se^{IV} + As^V$) a concentrações variadas de íons por 15 dias.....	30
Figura 2.5 - Concentração de selênio nas folhas (A), caule (B) e raízes (C) em plantas de linhaça dourada exposta a concentrações variáveis de Se^{IV} (símbolos fechados) e Se^{VI} (símbolos abertos) por 15 dias.....	32
Figura 2.6 - Concentração de arsênio (A, C, E) e selênio (B, D, F) nas folhas (A, B), caule (C, D) e raízes (E, F) das plantas de linhaça dourada exposta a concentrações variáveis de As^V (símbolos fechados) e co-exposto com Se^{IV} na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (símbolos abertos) por 15 dias.	33
Figura 2.7 - Concentração de Mn, Fe e Zn nas folhas, caule e raízes de plantas de linhaça dourada expostas a concentrações variadas de As^V ou concentrações variadas de $As^V + Se^{IV}$ ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$)	39

Figura 2.8 - Correlogramas para o conteúdo dos elementos (As, Mn, Fe, Zn e Se) em plantas de linhaça dourada exposta a As ^V (A, B e C) e co-exposta a As ^V + Se ^{IV} (5 μmol L ⁻¹) (D, E e F) em folhas, caule e raízes	40
Figura 3.1 - Espectrômetro de massas LCQ Fleet (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) equipado com fonte de ionização por <i>paper spray</i> utilizado nesse trabalho...	48
Figura 3.2 – Estufa de crescimento com parâmetros controlados (temperatura, luminosidade e umidade) utilizada no cultivo das plantas.	50
Figura 3.3 – Esquema do preparo de amostra e condições instrumentais para identificação dos metabólitos por PS-MS.	51
Figura 3.4 – Superfície de reposta para otimização multivariada do preparo de amostra para identificação de metabólitos por PS-MS. Planejamento fatorial 23 com ponto central.	53
Figura 3.5 – PS(+)-MS/MS para os íons As ^{III} a) <i>m/z</i> 127 e b) <i>m/z</i> 145; As ^V c) <i>m/z</i> 143 e d) <i>m/z</i> 161.....	55
Figura 3.6 – PS(+)-MS/MS para os íons DMA a) <i>m/z</i> 139 e b) <i>m/z</i> 157; MMA c) <i>m/z</i> 141 e d) <i>m/z</i> 159.....	56
Figura 3.7 – PS(+)-MS/MS para os íons Se ^{IV} a) <i>m/z</i> 129; Se ^{IV} b) <i>m/z</i> 145; SeMet c) <i>m/z</i> 198 e Se(Cys) ₂ d) <i>m/z</i> 334.....	57
Figura 3.8 – Espectro PS-MS(+) do extrato das raízes co-expostas a As ^V 50 μM + Se ^{IV} 5 μM.....	58
Figura 3.9 – Espectro PS-MS(+) do extrato das raízes co-expostas a As ^V 50 μM + Se ^{IV} 25 μM.....	58
Figura 3.10 – Espectro PS-MS/MS(+) do extrato das raízes co-expostas a As ^V 50 μM + Se ^{IV} 5 μM.....	59
Figura 3.11 – Espectro PS-MS/MS(+) do extrato das raízes co-expostas a As ^V 50 μM + Se ^{IV} 25 μM.....	60
Figura 3.12 – PS(+)-MS/MS espectros a) GSH [γ -Glu-Cys-Gly] ⁺ <i>m/z</i> 308; b) red-PC ₂ [γ -(GluCys) ₂ Gly] ⁺ <i>m/z</i> 540; c) red-PC ₃ [γ -(GluCys) ₃ Gly] ⁺ <i>m/z</i> 772.....	63
Figura 3.13 – PS(+)-MS/MS espectros a) SePC ₂ [γ -(GluCys) ₂ SeGly] ⁺ <i>m/z</i> 618; b) - AsPC ₃ [γ -(GluCys) ₃ AsGly] ⁺ <i>m/z</i> 844.....	64
Figura 4.1 – Esquema do preparo de amostra das folhas de linhaça dourada para análise por DESI-MSI.	74
Figura 4.2 - Fonte de ionização DESI (Omni Spray Ion Source 2-D modelo OS-3201 da empresa Prosofia, EUA) utilizada nesse trabalho.....	75
Figura 4.3 – Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos íons referentes aos metabólitos não alterados pela exposição e co-exposição.....	78

Figura 4.4 – Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos íons referentes aos metabólitos formados pela exposição ao selenito e co-exposição ao arsenato e selenito.	79
Figura 4.5 – Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos íons referentes aos metabólitos formados pela exposição ao selenito e co-exposição ao arsenato e selenito.	81
Figura 4.6 – Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos íons referentes aos metabólitos formados pela exposição ao selenito e co-exposição ao arsenato e selenito.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Parâmetros instrumentais do ICP-MS usados na quantificação multi-elementar das amostras de raízes, caules e folhas da linhaça dourada.	22
Tabela 2.2 – Avaliação da linearidade para as curvas de Se e As (0 a 100,0 µg L ⁻¹) a 95% de confiança.	27
Tabela 2.3 - Fatores de translocação para plantas de linhaça dourada expostas a concentrações variáveis de As ^V , Se ^{IV} , Se ^{VI} e co-expostas a concentrações variáveis de As ^V + Se ^{IV} 5 µmol L ⁻¹	34
Tabela 3.1 - Parâmetros instrumentais do ICP-MS usados na quantificação de As e Se em amostras de raízes da linhaça dourada.	47
Tabela 3.2 - Espécies de As e Se analisadas por PS-MS/MS e seus respectivos íons <i>m/z</i> monitorados nas amostras de raízes de linhaça dourada.....	54
Tabela 3.3 – Fragmentos esperados para GSH, PCs e metabólitos em amostras de plantas.....	62
Tabela 3.4 – Concentração de As e Se (mg kg ⁻¹) em amostras de raízes de linhaça dourada determinada por ICP-MS.....	65
Tabela 3.5 - Compostos tiólicos identificados em amostras de raízes de linhaça dourada co-expostas a As e Se.....	66
Tabela 4.1 – Concentração de exposição e co-exposição de arsenato (As ^V) e selenito (Se ^{IV}) utilizadas	73
Tabela 4.2 - Principais metabólitos detectados no <i>imprint</i> das folhas de linhaça dourada expostas e co-expostas a arsenato e selenito a partir de uma análise por DESI-MSI no modo positivo.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

ANOVA	Análise de Variância
AsR	Enzima arsênio redutase
As^{III}	Arsenito
As^V	Arsenato
CI	Ionização química
Csy	Cisteína
DESI	<i>Desorption electrospray ionization</i>
DESI-MS	<i>Desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging</i>
DMA	Ácido dimetilarsínico
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EC₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento da raiz
EC	Eletroforese capilar
EI	Ionização por impacto de elétrons
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização eletrospray
FWHM	<i>Full width at half maximum</i>
FT	Fator de translocação
Gly	Glicina
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
GSH	Glutathiona
Glu	Ácido glutâmico
HGAAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos
HG-AFS	Espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC- ICP-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente
ITR	Índice de tolerância da raiz

LAESI	<i>Laser ablation electrospray ionization</i>
LC	Cromatografia líquida
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MMA	Ácido monometilarsônico
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
MRC	Material de referência certificado
NIST	<i>Standard Reference Material NIST</i>
PCs	Fitoquelatinas
PS	<i>Paper spray</i>
PS-MS	<i>Paper Spray mass spectrometry</i>
PTFE	Politetrafluoretileno
Se^{IV}	Selenito
Se^{VI}	Selenato
SeMet	Seleniometionina
SeCys	Selenocisteína
SeCys₂	Selenocistina
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>

INTRODUÇÃO

A contaminação por arsênio em água potável, solo, plantas e animais tem sido constantemente relatada em várias regiões do mundo [1]. Por causa dos efeitos prejudiciais e irreversíveis que esse metaloide causa a saúde dos seres vivos é fundamental investigar os mecanismos de tolerância que as plantas estabelecem para diminuir a toxicidade do As na ausência e presença de outros elementos como o selênio [2]. Apesar do Se não ser essencial para as plantas em baixas concentrações, pode reduzir os efeitos tóxicos de outros metais/metaloides como Cd, Hg, Pb e As [3].

A planta linhaça dourada ou linho (*Linum usitatissimum* L.) é conhecida por tolerar altas concentrações de cádmio (Cd) [4,5] e pelo seu potencial para ser usada na recuperação de solo degradados por esse metal. As diversas aplicações industriais de partes não comestíveis da planta, como sua fibra, em materiais de alta resistência tem sido uma alternativa para imobilizar e retirar Cd da cadeia alimentar humana [5]. Diante disso, a toxicidade, translocação bem como os mecanismos de tolerância e alterações metabólicas que outros metais e metaloides como As e Se estabelecem na linhaça dourada também devem ser avaliados.

Os principais mecanismos de tolerância que as plantas estabelecem para inibirem os efeitos tóxicos dos metais e metaloides em seus tecidos é a complexação e compartimentalização [6]. Na complexação, ligantes de alta afinidade como aminoácidos, ácidos orgânicos e peptídeos tiólicos, como as fitoquelatinas(PCs), se ligam aos metais e metaloides no citoplasma das células da planta. Após complexação os metais e metaloides são transportados e compartimentalizados no vacúolo. Como os complexos formados metal/metaloide-PCs são menos reativos, os danos causados à planta são minimizados. Esses mecanismos ocorrem nas células de todos os órgãos da planta, mas principalmente nas raízes [7].

A investigação da formação dos complexos de PCs bem como outros metabólitos é essencial para elucidação dos mecanismos de tolerância e as alterações metabólicas causadas por As e Se em plantas. Estudos das ciências “ômicas” como a toxicometabolômica exigem o uso de técnicas capazes de identificar metabólitos em baixa concentração com resultados rápido e um preparo

de amostra simples. A espectrometria de massas (MS) com ionização ambiente como a *Desorption electrospray ionization* (DESI) e *Paper spray* (PS) são técnicas que atendem esses requisitos e por isso tem sido utilizadas em metabolômica de plantas com bons resultados [8–12].

Nesse trabalho os mecanismos de tolerância e alterações metabólicas que a exposição e co-exposição ao As e Se estabelecem nas plantas de linhaça dourada são discutidos em seis capítulos. O primeiro capítulo apresentará um referencial teórico com informações sobre a linhaça dourada, toxicidade e metabolismo do arsênio e selênio em plantas, as interações antagônicas e sinérgicas desses metaloides, PCs, as principais técnicas analíticas para quantificação de As e Se em plantas e os princípios das técnicas de espectrometria de massas com ionização ambiente DESI-MS e PS-MS. As interações antagônicas e sinérgicas entre As e Se são discutidas no segundo capítulo. Para isso, a absorção, toxicidade, translocação e distribuição dos micronutrientes essenciais (Fe, Mn e Zn) foram avaliados nas plantas expostas a As^V , Se^{IV} e Se^{VI} e co-expostas a As^V e Se^{IV} . O capítulo 2 retrata o primeiro artigo publicado como produto desta tese, intitulado “ *Interactions between As and Se upon long exposure time and effects on nutrients translocation in golden flaxseed seedlings*” [13].

Para entender os mecanismos de tolerância com ênfase na formação de PCs a detecção e identificação de complexos tiólicos (PCs, glutatona e seus metabólitos) e de compostos não complexados (As^V , As^{III} , ácido monometilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA), Se^{IV} , Se^{VI} , seleniometionina (SeMet) e selenocistina ($SeCys_2$) foram feitas em extratos de raízes de plantas co-expostas a As^V e Se^{IV} utilizando a espectrometria de massas com ionização PS-MS. Os resultados são apresentados no capítulo três. A toxicometabolômica em folhas de linhaça dourada expostas e co-expostas a As^V e Se^{IV} foi avaliada pela distribuição espacial de metabólitos utilizando DESI-MS em plantas e os resultados são abordados no capítulo quatro. As considerações finais do trabalho serão apresentadas no capítulo cinco e no último, capítulo seis, as referências utilizadas na construção desta tese, seguido do apêndice.

CAPÍTULO 1: REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Linhaça Dourada

A linhaça ou linho (*Linum usitatissimum* L.) é uma planta herbácea da família Linaceae e do gênero *Linum* [14]. É uma das culturas mais antigas do mundo, sendo cultivada desde o início das civilizações para obtenção de óleo, fibra e alimentos [15]. Os primeiros relatos de cultivo da linhaça datam de 6000 a.C, na região do Mediterrâneo e do sudoeste Asiático [14].

A semente de linhaça contém compostos biologicamente ativos como o ácido α -linoléico, lignanas, peptídeos cíclicos, polissacarídeos, alcaloides e glicosídeos cianogênicos [16]. O alto porcentual de ácidos graxos ômega 3 na semente de linhaça a caracteriza como um alimento funcional. Os alimentos funcionais têm propriedades capazes de beneficiar nossa saúde e de prevenir doenças [14]. O consumo regular de semente de linhaça ou do óleo comestível pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares, auto-imunes e neurológicas. Além de combater a arteriosclerose, diabetes, câncer, artrite, osteoporose e outras doenças [17].

Por ser rico em ácido α -linolênico o óleo de linhaça promove uma rápida polimerização em tintas, vernizes e couro sintético e por isso é utilizado largamente na fabricação desses produtos [16]. A linhaça contém fibras solúveis e insolúveis que são utilizadas industrialmente. A fibra solúvel, conhecida como mucilagem, está presente na semente e possui propriedades emulsificantes. Já a fibra insolúvel presente no caule da planta é rica em celulose e lignina. Além da aplicação na indústria têxtil, a fibra insolúvel se apresenta como uma alternativa renovável às fibras sintéticas e de vidro. As fibras reforçadas de linhaça estão presentes em materiais compósitos de polímeros, especialmente em construção e indústria automotiva [18].

As diversas aplicações industriais que as partes não comestíveis da planta de linhaça apresentam contribuem para o seu uso na fitoextração de metais e metaloides tóxicos do solo. Por exemplo, o uso da fibra insolúvel em materiais de alta resistência pode imobilizar metais e metaloides tóxicos e excluí-los da cadeia alimentar humana [19].

A fitoextração ou fitorremediação é uma técnica de descontaminação de baixo custo que tem sido sugerida como uma alternativa viável para recuperação de solos

contaminados com metais e metaloides. Nessa técnica seleciona-se plantas tolerantes a concentrações elevadas de metais e metaloides que seria tóxica a maioria das plantas [15]. A capacidade da linhaça em absorver cádmio do solo é bastante conhecida [20]. As sementes de linhaça dourada é uma das fontes alimentares mais rica em cádmio quando a planta é cultivada em solos contaminados por esse metal tóxico [16]. Tendo como base essas informações, vários estudos tem sido realizados para a avaliação do potencial fitoextrator da linhaça para metais e metaloides tóxicos em solo e em condições hidropônicas [4,15,19], bem como os mecanismos de tolerância estabelecidos pela planta [13,20].

1.2 Arsênio em Plantas

O elemento químico arsênio é conhecido pela sua toxicidade uma vez que esse metaloide pode causar danos irreparáveis à saúde humana [2]. Erupções vulcânicas e processos geoquímicos são fontes naturais de liberação de arsênio da crosta terrestre para o ambiente. Em Bangladesh, processos geológicos têm sido responsáveis pela lixiviação natural de arsênio para aquíferos de água potável, por décadas [21]. Em países industrializados, fontes antropogênicas de arsênio como a mineração, o uso de agrotóxicos e fertilizantes contendo o elemento, resíduos industriais não tratados e a irrigação com águas subterrâneas contendo arsênio predominam na liberação desse metaloide para o ambiente [22].

Altas concentrações de arsênio proveniente em grande parte de fontes antropogênicas tem sido encontradas na água potável, solo, vegetais e animais de diversos países [1]. Por isso, existe atualmente uma grande preocupação com a segurança alimentar mundial relacionada à contaminação de alimentos por esse elemento [22]. Dentre os alimentos de origem animal mais relatados como contaminados, destacam-se os peixes, crustáceos e outros frutos do mar. Em geral, organismos marinhos podem acumular grande quantidade de compostos de arsênio, principalmente orgânicos, presente no ambiente aquático [23]. O arroz é o alimento de origem vegetal que mais apresenta dados de contaminação por arsênio relatados na literatura [24–26]. O cultivo irrigado do arroz em solos inundados promove uma maior mobilização, principalmente das espécies inorgânicas de arsênio, e como consequência disso a planta absorve maiores quantidades no grão [25].

A toxicidade, mobilidade, distribuição e disponibilidade dos diferentes compostos de arsênio tem sido constantemente avaliados em água, plantas e solo [27]. Esse monitoramento é de grande importância uma vez que através dele é possível diminuir o seu impacto nos ecossistemas.

Nas plantas, o arsênio causa clorose e necrose foliar reduzindo assim o crescimento e produtividade [28]. Espécies inorgânicas como o arsenito (AsO_2^-) e arsenato (AsO_4^{3-}) estão mais presentes em plantas. No entanto, pequenas quantidades de espécies orgânicas, ácido monometilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA), também são encontradas [29]. Essas espécies seguem a seguinte ordem de toxicidade: arsenito (As^{III}) > arsenato (As^{V}) > MMA > DMA [2].

A absorção de arsênio pela planta ocorre principalmente na raiz. O As^{V} possui características semelhantes ao fosfato e por isso sua absorção acontece pelos transportadores de fosfato. O As^{III} possui características semelhantes ao silicato e ao ser absorvido pela planta compartilham os mesmos canais de aquaporinas [30]. O As^{V} que entra nas células da raiz é convertido a As^{III} pela enzima arsênio redutase (AsR). O As^{III} então formado pode retornar para fora das células através de canais de aquaporinas ou ser transportado para o xilema [25]. As células da planta estabelecem mecanismos de resistência ou tolerância a arsênio e um deles é a formação de fitoquelatinas (PCs) através da glutatona (GSH). As PCs são peptídeos tiólicos capazes de complexar o As^{III} e As^{V} presente no citoplasma da célula e imobilizá-lo nos vacúolos (Figura 1.1) [31].

Uma pequena fração de As^{V} e As^{III} que é absorvida pelas células da raiz é translocado para as folhas via xilema usa transportadores que ainda não são completamente conhecidos [21]. Os compostos orgânicos de arsênio quase não são absorvidos pelas células da raiz. O MMA e o DMA são lentamente absorvidos e transportado para a parte aérea da planta e os transportadores envolvidos também são desconhecidos [25].

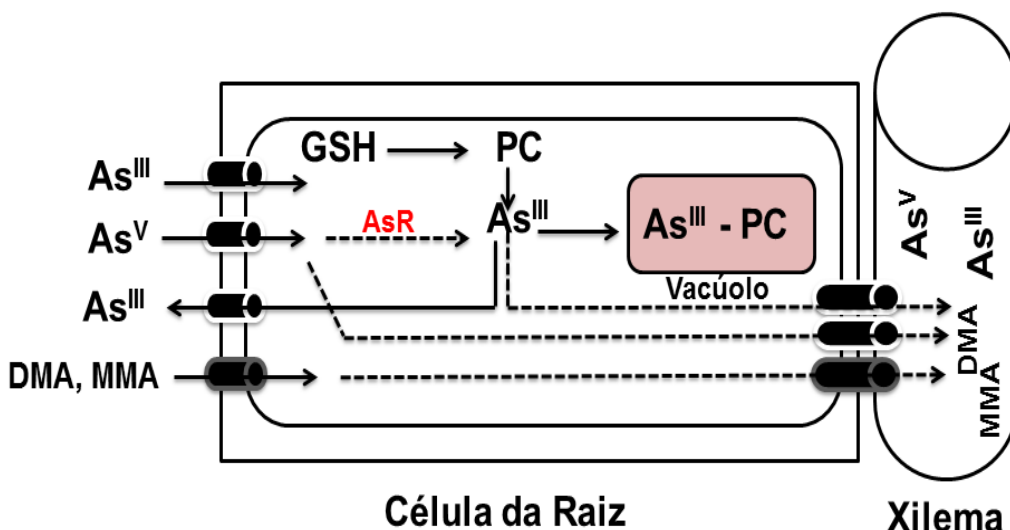


Figura 1.1 - Diagrama esquemático da absorção e metabolismo do arsênio em plantas (adaptado [25]).

1.3 Selênio em plantas

O selênio (Se) é um metaloide que ocorre naturalmente em diferentes estados de oxidação +6, +4, 0 e -2 formando selenato (SeO_4^{2-}), selenito (SeO_3^{2-}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{2-}), respectivamente [32]. Além disso, é possível encontrá-lo em ambientes aquáticos e terrestres na sua forma orgânica como compostos selenometilados, selenoaminoácidos e selenoproteínas [33].

Apesar de não ser essencial para as plantas, o selênio é absorvido e metabolizado pelas vias do enxofre. Em baixas concentrações tem efeitos benéficos para as plantas, aumentando o crescimento e produtividade [34]. Além disso, o selênio pode atuar como antioxidante e pro-oxidante, sendo capaz de aumentar a tolerância das plantas ao estresse abiótico como salinidade, seca, temperatura extrema e estresse por metais e metaloides tóxicos como cádmio, mercúrio, chumbo, antimônio e arsênio [3]. Em concentrações elevadas, o selênio tem efeitos tóxicos para as plantas como clorose, necrose, crescimento restrito e biossíntese de proteínas reduzida [34].

As plantas absorvem o selênio principalmente na forma de selenato (Se^{VI}) ou selenito (Se^{IV}). O Se^{IV} está menos disponível no solo devido sua absorção por compostos orgânicos e inorgânicos do solo e sua degradação microbiológica. Em

menor quantidade formas orgânicas do selênio como selenocisteína (SeCys) e selenometionina (SeMet) também são absorvidas pelas plantas [35].

A translocação de selênio das raízes da planta para a parte aérea depende de sua forma. O Se^{IV} é convertido em formas orgânicas como SeMet, que é menos móvel e tóxica, e por isso, sua translocação é menor. Grande parte do Se^{VI} é translocado para a parte aérea da planta via xilema [35]. Plantas capazes de absorver concentrações elevadas de metais e metalóides e estocá-los nas partes aéreas são chamadas hiperacumuladoras [21]. Em plantas hiperacumuladoras de selênio (acumulação de selênio maior que 1000 mg kg^{-1} de peso seco) [36], as formas predominantes desse metalóide são orgânicas. Já em plantas não-hiperacumuladoras, o selênio está presente principalmente nas formas inorgânicas, que são mais tóxicas [37].

Um diagrama esquemático da absorção e das reações bioquímicas que ocorrem no metabolismo do selênio em plantas é apresentado na Figura 1.2. No mecanismo proposto, o Se^{VI} intracelular é reduzido a Se^{IV} pela ativação com ATP-sulfurilase. O Se^{IV} absorvido e o formado na etapa anterior pode, posteriormente, ser reduzido enzimaticamente e não enzimaticamente a seleneto. O seleneto é incorporado à SeCys por meio do acoplamento com O-acetil-L-serina, que é catalisado pela enzima cisteína sintetase. Por sua vez, SeCys pode ser metabolizada em SeMet através do ciclo da metionina, que inclui a transformação enzimática de SeCys em Se-cistationina, Se-homocisteína e SeMet [38].

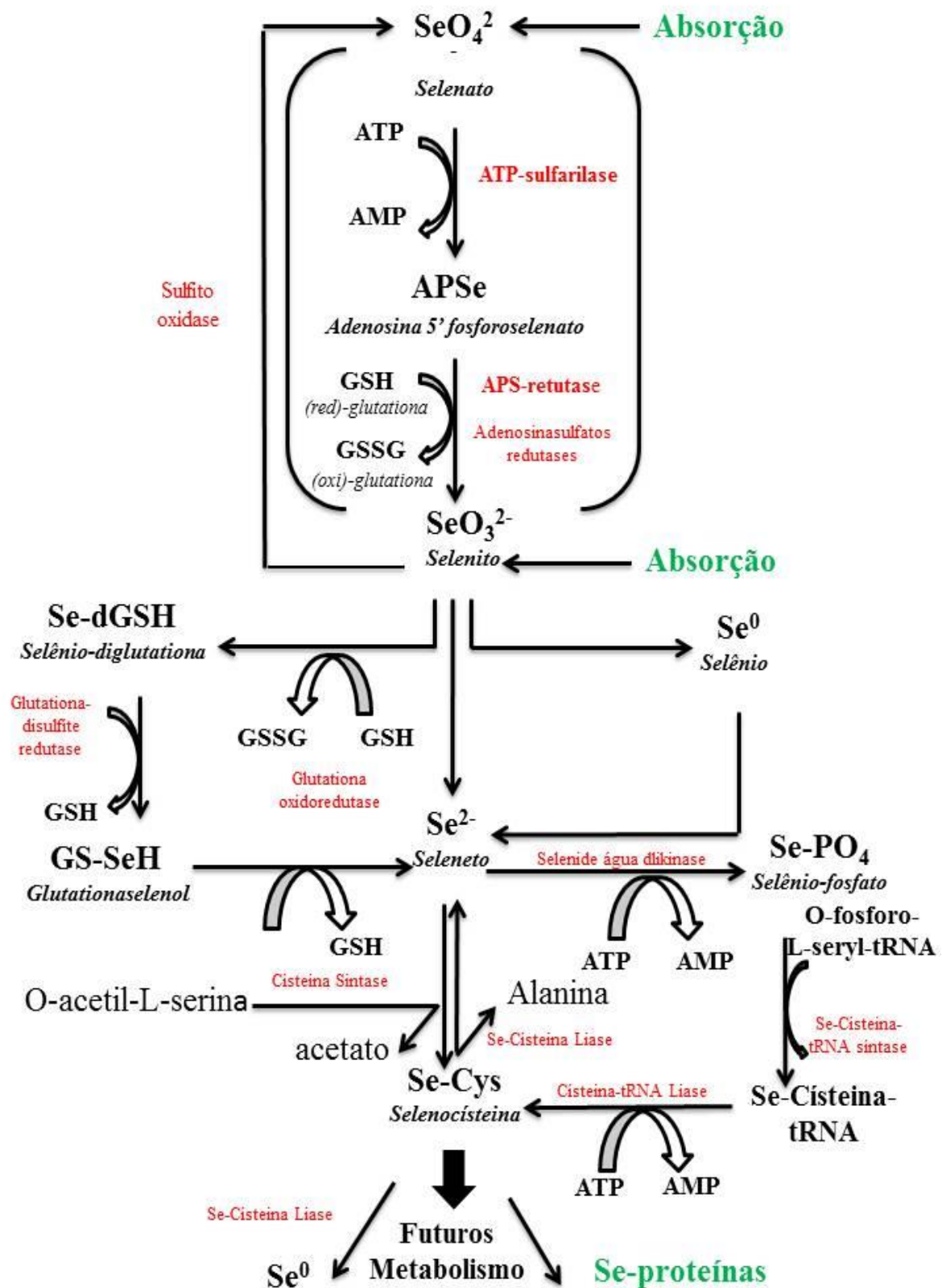


Figura 1.2 – Diagrama esquemático absorção e das reações bioquímicas que ocorrem no metabolismo do selênio em plantas. Os principais compostos são indicados em negrito (adaptado [38]).

1.4 Interações antagônicas e sinérgicas entre selênio e arsênio em plantas

Apesar dos elementos químicos selênio e arsênio serem semelhantes, esses metaloides possuem interações com efeitos antagônicos e sinérgicos em animais e plantas[39]. O selênio, por ser considerado um antioxidante e um pro-oxidante, tem sido usado para reduzir os efeitos tóxicos do arsênio e outros metais e metaloides tóxicos em animais e plantas[39].

Em plantas, vários experimentos concluíram que a co-exposição do selênio em baixas concentrações previne a toxicidade do arsênio [40]. Em *Pteris vittata* L. a absorção de As^V pelas folhas e raízes diminuiu com a co-exposição ao Se^{IV} . Em concentrações menores que $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, a translocação de selênio para as folhas aumentou e a de arsênio diminuiu [41]. A co-exposição em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) ao Se^{IV} e As^{III} diminuiu a absorção de arsênio em relação as plantas expostas somente ao As^{III} . Além disso, o selênio foi responsável por diminuir parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e por aumentar a absorção de nutrientes como Fe, Mn, Co, Cu, Zn e Mo [42].

A identificação de peptídeos tiólicos (-SH) como Se^{II} -PC e Se-cisteinilserina glutationa em *Thunbergia alata* sugere que o selênio pode competir com o arsênio por grupos -SH livres, presentes nas PCs [43]. A competição do selênio com arsênio por PCs também foi observada em plantas não alteradas geneticamente de *Arabidopsis thaliana* [3].

A diminuição da toxicidade e translocação de arsênio em plantas quando co-expostos ao selênio demonstram efeitos antagônicos entre esses metaloides. No entanto, a competição por PCs demonstrou efeitos sinérgicos em relação a toxidade do arsênio. Durante o desenvolvimento deste trabalho também constatou-se efeitos antagônicos do As^V com Se^{IV} em plantas de linhaça [13]. Esta discussão será realizada com maiores detalhes no Capítulo 2.

1.5 Fitoquelatinas

As plantas estabelecem mecanismos de tolerância a metais e metaloides tóxicos com o objetivo de diminuir os efeitos prejudiciais que esses causam nos seus tecidos. Os principais mecanismos de tolerância envolvem imobilização, exclusão,

complexação e compartimentalização dos metais e metaloides [44]. A seleção de espécies de plantas tolerantes a altas concentrações de metais e metaloides dependem de estudos que visam entender esses mecanismos de tolerância [45]. Como essas plantas são utilizadas na recuperação de solos degradados esses estudos se tornam muito importante do ponto de vista ambiental.

A complexação e compartimentalização de metais e metaloides tóxicos em plantas envolvem ligantes de alta afinidade como aminoácidos, ácidos orgânicos e peptídeos como as fitoquelatinas e metalotioneínas[6]. As fitoquelatinas (PCs) são peptídeos tiólicos capazes de complexar e imobilizar metais e metaloides tóxicos em plantas, algas e fungos[46]. Formadas pelos aminoácidos glicina (Gly), cisteína (Cys) e ácido glutâmico (Glu) são enzimaticamente produzidas utilizando a glutatona (GSH) como substrato. As estruturas das PCs possuem repetições crescentes do dipeptídeo γ -Glu-Cys seguida por uma Gly terminal γ -(Glu-Cys)_n-Gly onde n pode variar de 2 a 11, sendo as PCs mais comuns com n variando de 2 a 5 [44]. A estrutura da fitoquelatina PC₂ é representada na Figura 1.3.

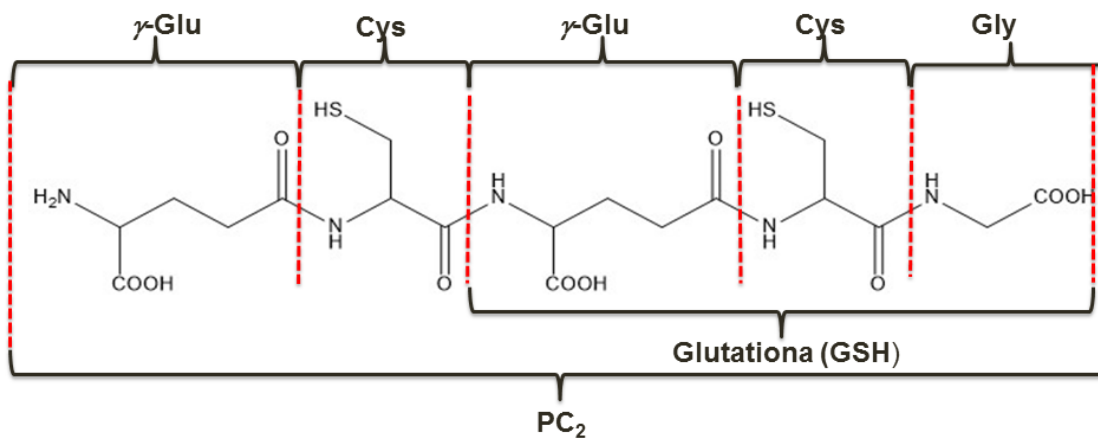


Figura 1.3 - Estrutura da fitoquelatina PC₂(Glu= ácido glutâmico, Cys= cisteína e Gly= Glicina) (adaptado [46]).

As PCs são sintetizadas principalmente no citoplasma das células da raiz da planta. Depois de complexar os metais e metaloides que entram nessas células, os complexos PC-metal/metaloide são compartimentalizados no vacúolo (Figura 1.4). Como o metal imobilizado é menos tóxico que o metal livre, as PCs desempenham um papel fundamental na desintoxicação de cádmio, arsênio, prata, bismuto, chumbo, zinco, cobre, mercúrio e ouro em plantas[44].

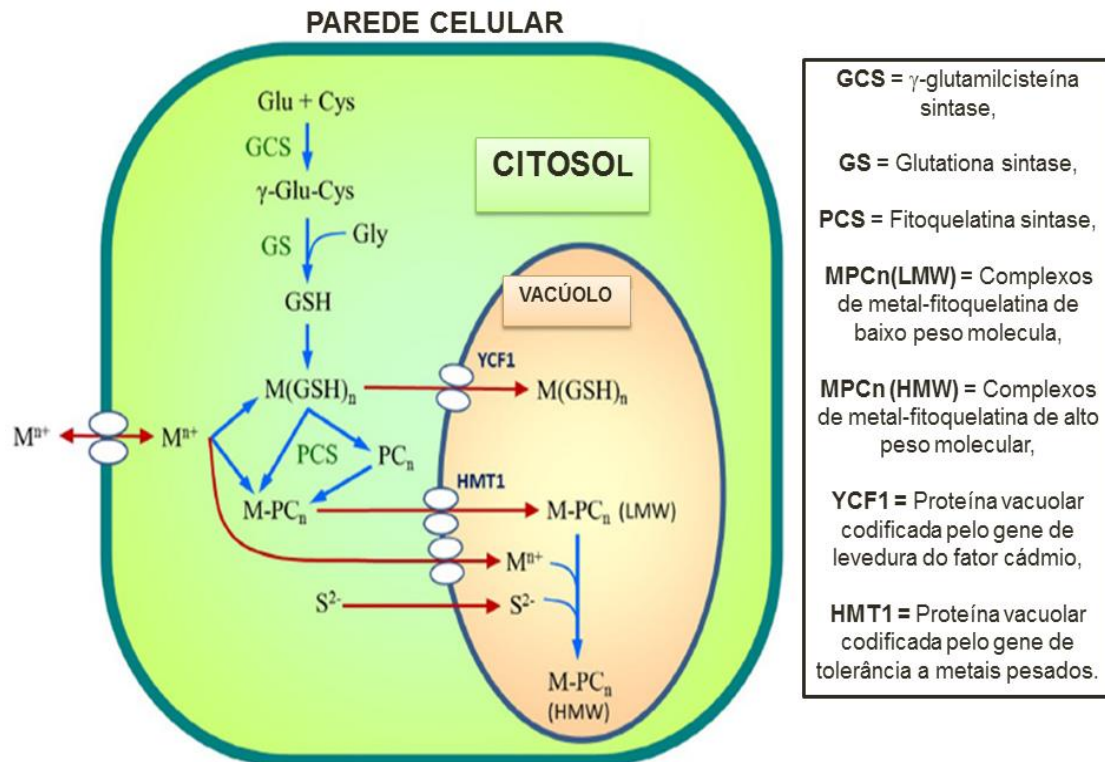


Figura 1.4 - Mecanismos de biossíntese, ligação de metais e armazenamento de fitoquelatinas no interior de células vegetais (adaptado[46]).

Vários estudos sobre PCs visam elucidar a origem, estrutura, ligações e possíveis interações PCs-metais [3,43,47,48]. Além disso, propõem métodos analíticos capazes de identificar e quantificar esses compostos [46,49,50]. Esses estudos contribuem para o uso de PCs como indicadores de poluição ambiental e na seleção de espécies fitorremediadoras [51].

Os métodos analíticos utilizados para identificação e quantificação de PCs envolvem um preparo de amostra cuidadoso, uma vez que os complexos PC-metal podem se degradar a temperatura ambiente, fazendo-se necessário o preparo da amostra sob resfriamento [3,43]. Dentre as técnicas analíticas utilizadas pode-se destacar a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e a espectrometria de massas com ionização eletrospray (ESI-MS) além da eletroforese Capilar (EC) [46]. No entanto, outras técnicas como a espectrometria de massas com ionização ambiente tem mostrado potencial na identificação e quantificação de metabólitos como as PCs em tecidos vegetais [10,11,52–55].

1.6 Quantificação de selênio e arsênio em plantas por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente

A concentração total de arsênio e selênio em tecidos vegetais pode ser determinada por várias técnicas espectroanalíticas, como a absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HGAAS), a espectroscopia de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG-AFS), espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [56]. A alta sensibilidade, boa precisão, exatidão, caráter multielementar e análise de isótopos faz com que o ICP-MS seja a técnica mais utilizada [56].

No ICP-MS os íons gerados no plasma são introduzidos no espectrômetro de massas onde são separados e analisados de acordo com sua massa/carga (m/z). O instrumento possui um sistema de introdução de amostra que converte amostras líquidas em um aerossol, uma tocha responsável por produzir o plasma que atomiza e ioniza os elementos da amostra, a interface (cone de amostragem e skimmer) que diminui a velocidade de entrada dos íons do plasma para o espectrômetro de massas, lentes que direcionam os íons para o analisador de massas removendo fótons e neutros, uma célula de colisão e reação que remove interferências espectrais e íons poliatômicos, um analisador de massas e um detector [57].

Como o ICP-MS apresenta alta sensibilidade as suas determinações podem ser prejudicadas por limitações associadas a interferências espectrais e não espectrais. No caso do selênio as interferências isobáricas são eliminadas usando um isótopo alternativo para quantificação. As medições dos isótopos $^{77}\text{Se}^+$, $^{78}\text{Se}^+$ e $^{80}\text{Se}^+$ são afetadas pelos íons poliatômicos $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$ e $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ respectivamente, já a medição do isótopo $^{82}\text{Se}^+$ não é afetada por interferências isobáricas. No entanto, devido a menor abundância natural do isótopo $^{82}\text{Se}^+$ o limite de detecção do método precisa ser melhorado. Para determinações de arsênio, que é monoisotópico, as interferências são minimizadas pelo uso da célula de colisão. Em matrizes com concentrações elevadas de cloreto, a principal interferência isobárica que as determinações de $^{75}\text{As}^+$ sofre é pela formação do íon poliatômico

$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$. Por isso, a utilização de ácido clorídrico ou perclórico para digestão da amostra não é recomendada quando se deseja quantificar arsênio [56].

O preparo de amostra para análises em ICP-MS geralmente consiste em uma digestão com ácidos minerais e aquecimento. Por ser comercializado em alta pureza e por formar produtos de reações solúveis em água como nitratos metálicos o ácido nítrico (HNO_3) é mais utilizado. Um agente oxidante usado normalmente em conjunto com HNO_3 para melhorar a eficiência da digestão é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Por ser um forte oxidante e por formar água e oxigênio como produtos de degradação, o H_2O_2 é bastante utilizado [58].

1.7 Espectrometria de massas com ionização ambiente

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica instrumental muito versátil. Ela permite a identificação de compostos desconhecidos dando informações sobre sua massa molecular, sua composição elementar e, em muitos casos, sua estrutura química. No espectrômetro de massas as moléculas são convertidas em íons que são separados pela sua razão massa e carga (m/z). A fonte de ionização é responsável por gerar íons na fase gasosa que são provenientes de moléculas neutras ou carregadas para em seguida, separá-los em um analisador de massas de acordo com a relação m/z . Os íons são encaminhados a um detector, o qual conta e transforma a corrente de íons em sinais elétricos que posteriormente vão para um sistema de computador que processa o sinal (Figura 1.5).

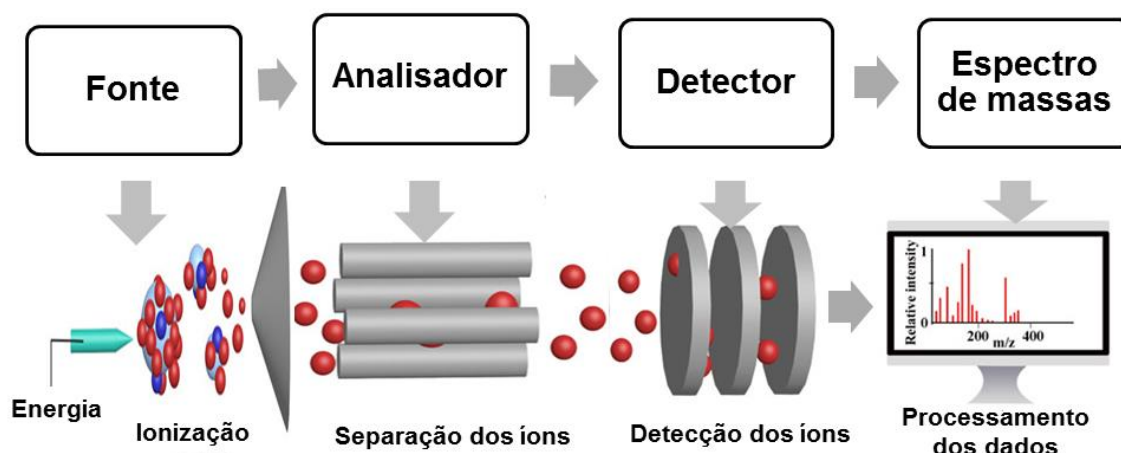


Figura 1.5 – Componentes de um espectrômetro de massas (autoria própria).

Dentre os componentes dos espectrômetros de massas as fontes de ionização foram as que mais evoluíram instrumentalmente. Há diversas fontes de ionização disponíveis atualmente, com métodos de ionização sob vácuo, à pressão e temperatura ambiente, e mais recentemente a ionização em ambiente aberto. As primeiras fontes de ionização desenvolvidas foram as de ionização por impacto de elétrons (EI) e a ionização química (CI). Elas permitem analisar moléculas orgânicas voláteis e obter informações estruturais com grande reprodutibilidade. No entanto, essas fontes não são capazes de ionizar moléculas biológicas grandes, que são difíceis de vaporizar ou ionizar. Além disso, por utilizarem uma alta energia, podem degradar moléculas que não são termicamente estáveis e dificultar sua identificação [59].

O surgimento de novas técnicas de ionização, como a ionização por electrospray (ESI), expandiu a gama de moléculas que podem ser analisadas por espectrometria de massas, incluindo moléculas de alta polaridade, alta massa molecular e grande complexidade estrutural. Esse tipo de ionização é conhecido pela habilidade em transferir espécies de solução para a fase gasosa de forma suave, permitindo que espécies supramoleculares, fracamente ligadas, permaneçam intactas [53].

A espectrometria de massas com ionização por eletrospray ESI-MS tem como principal limitação a baixa tolerância a sais e a misturas salinas, necessidade de amostras com pureza elevada e o fato de ser aplicada somente para amostras na forma de soluções. Nesse contexto, a espectrometria de massas com ionização ambiente têm surgido como uma alternativa para simplificação do preparo da amostra exigido [60]. Nas técnicas de espectrometria de massas com ionização ambiente as amostras não necessitam de pré-tratamento ou somente necessitam de um mínimo preparo. Os íons são gerados sob pressão atmosférica e temperatura ambiente antes de sua introdução no espectrômetro de massas para análise. Os analitos são diretamente dessorvidos/ionizados da superfície da amostra de tal modo que instantaneamente as medições no espectrômetro de massas se tornam possíveis [61].

Devido sua simplicidade e eficiente informação molecular, o interesse por técnicas de ionização ambiente tem crescido cada vez mais, as quais têm sido

usadas como novas ferramentas para análises de tecidos biológicos, plantas, drogas e amostras ambientais [10,12,53,62–65].

1.7.1 Desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging (DESI-MSI)

Em 2004, foi proposta por Cooks e colaboradores, a técnica denominada DESI-MS, a qual representa um dos mais bem sucedidos avanços na espectrometria de massas [60]. DESI é uma técnica empregada para análise direta em tempo real, sob pressão atmosférica, à temperatura ambiente, com baixo consumo de amostra, sendo conduzida com nenhum ou com mínimo preparo de amostra [54].

O princípio de funcionamento do DESI consiste em um solvente que entra por um tubo capilar no nebulizador; lateralmente a esse tubo, um jato de gás à alta pressão (geralmente nitrogênio) é introduzido, o qual produz pequenas gotículas do solvente. Entre o capilar e o espectrômetro de massas existe uma grande diferença de potencial que deixará as gotículas eletricamente carregadas (*electrospray*). Esse feixe de minúsculas gotas eletricamente carregadas é direcionado à amostra por um ângulo α . Os íons dessorvidos são direcionados para a entrada do espectrômetro de massas, à pressão atmosférica, que faz um ângulo β com a superfície da amostra (Figura 1.6). O suporte onde se encontra a amostra é livre para se movimentar e, desse modo, pode-se analisar várias porções de um mesmo material. Amostras sólidas podem ser analisadas como tal, amostras líquidas devem ser absorvidas em algum material e amostras gasosas devem ser adsorvidas em uma superfície sólida [66].

A primeira técnica com ionização ambiente utilizada para obtenção de imagens químicas foi DESI-MS. As imagens químicas são imagem bidimensional de moléculas e íons presentes em uma superfície. Com DESI-MSI é possível que a imagem seja obtida em ambiente aberto, tornando a análise mais simples e oferecendo a possibilidade de obter imagens *in situ* [67]. As imagens pode ser feitas em amostras de tecidos vegetais cortados em criostato e depois descongelados em lâmina de vidro [10], por análise direta de folhas e pétalas de flores [12] ou de *imprints*. Para obtenção do *imprint* analitos de interesse são transferidos para superfícies planas e duras que facilitam as análises.

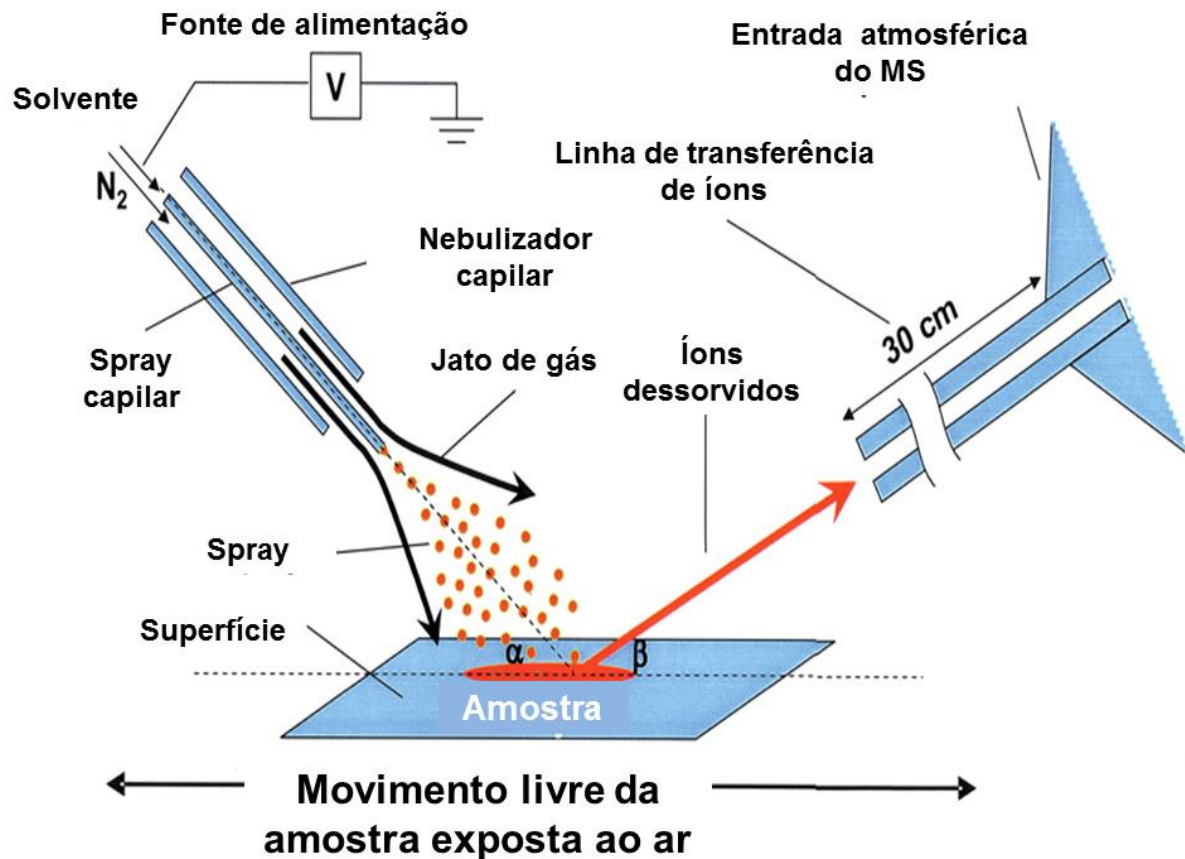


Figura 1.6 - Diagrama esquemático da técnica DESI-MS (adaptada [66]).

Muitos trabalhos utilizaram a técnica DESI-MS para investigar o perfil de metabólitos em tecidos vegetais [10–12,68,69]. Por exemplo, estudos usaram DESI-MSI no monitoramento da mudança de metabólicos da batata quando invadida por patógenos [10] e na distribuição dos metabólitos em folhas, flores e pétalas de várias espécies de plantas [12]. Além disso, a técnica DESI-MS foi utilizada para a especificação de arsênio em folhas de samambaia [54].

1.7.2 Paper Spray mass spectrometry (PS-MS)

A espectrometria de massas com ionização ambiente tem sido alvo de interesse desde a introdução do DESI em 2004. Nos anos seguintes, uma série de novas técnicas de ionização que se inserem neste subgrupo da espectrometria de massas tem sido desenvolvida. Dentre estas, destaca-se *paper spray mass spectrometry* (PS-MS). A técnica se caracteriza por ser rápida, possibilitar análises

qualitativas e quantitativas em matrizes complexas como de tecido vegetal. Pela técnica é possível analisar desde pequenas moléculas orgânicas a biopolímeros [55].

O princípio do PS-MS se baseia na conexão de um papel triangular com um clipe de metal, posicionado em frente ao orifício de entrada do espectrômetro de massas, onde será depositada a amostra. Por meio do clipe de metal é aplicada uma alta voltagem entre o papel e a entrada do espectrômetro de massas e, assim, gotículas carregadas são emitidas da ponta do papel triangular para o espectrômetro de massas, levando à formação de íons similar ao processo ESI. A Figura 1.7 ilustra uma representação esquemática da fonte PS-MS. Essa técnica serve como uma ferramenta complementar para métodos convencionais, como LC-MS [53].

A simplicidade da técnica fez com que surgissem uma variedade de aplicações, principalmente por causa da maior parte dos interferentes, comumente presentes em matrizes complexas, ficarem retidos pelo papel com notável redução da supressão iônica. Além disso, é uma técnica de baixo custo e de fácil fabricação. O PS-MS tem inúmeras outras vantagens: é necessário somente um pequeno volume de amostra (em torno de 50 μL), pouco ou nenhum preparo da amostra, é imune ao entupimento, eliminando a necessidade de filtragem da amostra contendo sólidos dispersos, dentre outras [52].

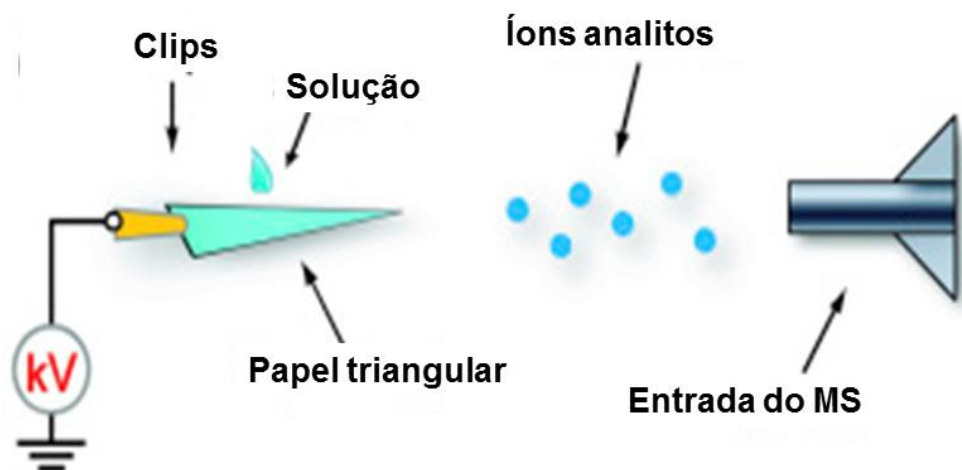


Figura 1.7 - Representação esquemática da fonte PS-MS (adaptada [70]).

A fonte de ionização PS-MS pode ser adaptada para análise direta de tecidos vegetais como folhas. Nessa técnica a folha a ser analisada é cortada de modo a se obter um triângulo com as mesmas dimensões do papel utilizado [71]. A

determinação de agroquímicos em amostras vegetais de rúcula, manjerição, repolho, alface e couve foi realizada por PS-MS por análise direta das folhas dos vegetais [53]. Os resultados desses estudos demonstraram que ambas as técnicas são adequadas, no entanto a análise direta das folhas tem como vantagem a eliminação da etapa de extração dos agroquímicos. Quando se trata de amostras de frutos e raízes, a análise direta não é viável e a extração dos compostos de interesse se faz necessária. A determinação de três pesticidas em amostras de tomate por PS-MS demonstrou ser adequada para monitorar a qualidade dos frutos [72].

CAPÍTULO 2 - INTERAÇÕES ARSÊNIO E SELÊNIO E SEUS EFEITOS NA TRANSLOCAÇÃO DE NUTRIENTES EM PLANTAS DE LINHAÇA DOURADA

2.1 Introdução

O selênio, naturalmente encontrado no solo, na água e em alguns alimentos, é considerado um nutriente essencial para o homem. É um elemento traço de grande poder antioxidante e tem sido sugerido como um suplemento alimentar para benefício da saúde[73]. O Se não é um elemento essencial para as plantas, embora algumas espécies, principalmente as pertencentes à família *Lecythidaceae*, como por exemplo, a castanha do Pará, possam acumular quantidades relativamente grandes de Se[36] e, portanto, ser a principal fonte deste elemento para humanos[33]. Na verdade, alimentos deficientes em selênio são relatados em todo o mundo [74], uma vez que a maioria das espécies de plantas não consegue lidar com sua toxicidade.

Vários autores têm discutido os efeitos benéficos de baixas concentrações de Se em plantas, seu papel na estimulação do crescimento vegetal e na defesa contra estresses abióticos como frio, seca, dessecação, além do estresse por metais e metaloides [33,75]. No entanto, em concentrações superiores a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, o Se em solução nutritiva causa diminuição na biossíntese de proteínas, crescimento atrofiado, murchamento das folhas e, em última instância, morte [75]. Esses efeitos tóxicos são semelhantes aos causados por As, Cd, Hg e Pb, sugerindo que eles compartilham as mesmas interações bioquímicas nas plantas. Na verdade, a interação de Se (em concentrações relativamente altas) com grupos sulfidríla presentes em enzimas e proteínas estruturais pode resultar em estresse oxidativo [3]. Por outro lado, $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Se diminuiu a toxicidade de altas concentrações de As ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$) em cultivo hidropônico de *Nicotiana tabacum* L [76]. Bluemlein e colaboradores [43] descobriram que o selenito na concentração de $5,0 \mu\text{M}$ aumenta a toxicidade do arsenato ($2,0 \mu\text{M}$) em *Thunbergia alata*. No entanto, o efeito antagônico do As (como arsenato) e Se (como selenito) nas plantas ainda está em debate na literatura [3,43,76]. O papel antagônico pode estar relacionado a um efeito

característico da espécie, em função das concentrações de As e Se, podendo impactar os níveis de micronutrientes importantes como Fe, Mn e Zn na dieta humana e em plantas.

Por outro lado, o arsênio é um elemento altamente tóxico para animais e plantas e é amplamente distribuído no meio ambiente [76]. O arsênio é considerado um elemento carcinógeno de classe 1 pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) [76,77]. O acúmulo de As no solo e na água pode afetar o crescimento e o desenvolvimento das plantas e representar um risco para a saúde dos humanos por meio da cadeia alimentar [76,78]. As raízes são comumente o primeiro órgão da planta a ser exposto ao As, no qual o alongamento da raiz é consideravelmente prejudicado. Destaca-se que a absorção e acumulação de As pelas plantas variam de acordo com o *habitat* e as espécies de plantas [76,77]. Considerando o fato de que os íons de As são prontamente absorvidos pelas raízes e translocados para as folhas, há uma necessidade urgente de entender os mecanismos de assimilação, absorção, acumulação e metabolismo de As nas plantas [78].

A linhaça é uma das culturas mais antigas do mundo, sendo uma importante fonte de fibras naturais, óleo industrial [79], e uma rica fonte de ácidos graxos ômega-3, ácido alfa-linolênico, fibras e proteínas [17]. O consumo da linhaça dourada como alimento funcional está aumentando e estudos visando a investigação do acúmulo de As e Se nesta espécie vegetal são necessários [17], podendo esclarecer se metais e metalóides são translocados ou imobilizados por partes comestíveis, excluindo-os da cadeia alimentar humana, como observado para Cd e Zn em algumas variedades de linhaça [5]. Nesse sentido, este estudo investigou a toxicidade, translocação e a correlação entre As e Se em plantas de linhaça dourada (*Linum usitatissimum* L.) após 15 dias de exposição à arsenato (As^{V}), selenito (Se^{IV}), selenato (Se^{VI}) e co-exposição a As^{V} + Se^{IV} . A hipótese investigada foi a de que a linhaça dourada pode apresentar sensibilidade a espécies distintas de Se (Se^{IV} e Se^{VI}) e que a forma supostamente menos tóxica (Se^{IV}) seja capaz de neutralizar o efeito deletério do As^{V} . Como resultado, o Se^{IV} evitaria a absorção excessiva e a translocação do As^{V} das raízes para as folhas e evitaria o comprometimento da absorção de micronutrientes essenciais às plantas.

2.2 Objetivo

O objetivo desse trabalho foi investigar as interações antagônicas e sinérgicas entre As e Se em plantas de linhaça dourada expostas a As^V , Se^{IV} e Se^{VI} e co-expostas ao $As^V + Se^{IV}$.

2.2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a absorção, toxicidade e translocação de As e Se nas plantas de linhaça dourada quando expostas a As^V , Se^{IV} e Se^{VI} e co-expostas a $As^V + Se^{IV}$.
- Correlacionar a exposição ao As^V e co-exposição ao $As^V + Se^{IV}$ com a distribuição dos micronutrientes essenciais (Fe, Mn e Zn) na planta;
- Verificar se o Se^{IV} altera a absorção, toxicidade e translocação do As^V .

2.3 Materiais e Métodos

2.3.1 Instrumentação

O espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) empregado foi um Agilent Technologies (7700, Tóquio, Japão). As amostras foram liofilizadas em um Modulyod-230 (Thermo Scientific, Asheville, EUA). A digestão das amostras foi realizada em forno micro-ondas com cavidade (Milestone, Sorisole, Itália) utilizando frascos reacionais de PFA® (perfluoroalcoxi). A Tabela 2.1 apresenta as condições instrumentais para as quantificações por ICP-MS.

Tabela 2.1 - Parâmetros instrumentais do ICP-MS usados na quantificação multielementar das amostras de raízes, caules e folhas da linhaça dourada.

Parâmetros Instrumentais	
Tocha	Quartzo com 2,5 mm de diâmetro interno
Cones de Interface	Ni
Diâmetro dos tubos Tygon	1,02 mm
Câmara de nebulização	Concêntrica
Potência de RF	1550 W
Velocidade da bomba peristáltica	0,5 rps
Gás de arraste	1,09 L min ⁻¹ (Modo sem gás)
	1,20 L min ⁻¹ (Modo gás He)
Fluxo do gás auxiliar	4,7 mL min ⁻¹
Medidas	
Varreduras	100
Tempo de integração	0,3 s
Replicatas	3
Resolução	< 1
<i>m/z</i> monitorados	⁵⁵ Mn, ⁵⁶ Fe, ⁶⁶ Zn, ⁷⁵ As, ⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸² Se, ⁸⁹ Y (Modo gás He)
	⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸² Se, ⁸⁹ Y (Modo sem gás)

2.3.2 Reagentes

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e deionizada (18 MΩ cm⁻¹, Milli-Q®, Millipore Direct-Q 3, Molsheim, França). Todos os materiais utilizados foram descontaminados em HNO₃ a 10% v v⁻¹ por pelo menos 24 horas. Nitrato de potássio (KNO₃), sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O), sulfato de zinco (ZnSO₄.7H₂O), fosfato de amônio dibásico [(NH₄)₂HPO₄], molibdato de sódio (Na₂MoO₄.2H₂O) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); nitrato de cálcio (Ca(NO₃)₂.4H₂O), ácido bórico (H₃BO₃), cloreto de manganês (II) (MnCl₂.4H₂O), sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O), sulfato ferroso (FeSO₄.7H₂O), sal dissódico EDTA (Dinâmica, Rio Grande do Sul, Brasil) e o tampão 2-N-Morpholino - MES (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) foram utilizados na preparação da solução nutritiva de Hoagland 10% v v⁻¹. As^V, Se^{IV} e Se^{VI} foram adicionados a solução nutritiva Hoagland como arsenato monossódico (NaH₂AsO₄, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), selenito de sódio (Na₂SeO₃) e selenato de sódio (Na₂SeO₄), (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), respectivamente.

Os sais de As^{V} , Se^{IV} e Se^{VI} foram preparados na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em meio aquoso e então adicionados na solução nutritiva Hoagland.

Peróxido de hidrogênio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e ácido nítrico concentrado (Merck, Darmstadt, Alemanha), purificado em destilador sub-boiling (DuoPUR, Milestone, Sorisole, Itália), foram usados na digestão por micro-ondas.

As soluções de referência para construção das curvas de calibração foram preparadas no dia da medida a partir de diluições adequadas de solução padrão $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de As, Fe, Mn, Se e Zn (Elemental Scientific, Omaha, EUA) e Y foi usado como padrão interno (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

2.3.3 Germinação das sementes

As sementes de linhaça dourada foram adquiridas em um mercado local de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As sementes foram germinadas em papel Germitest embebido em água à temperatura ambiente. Três dias após a germinação (DAG, do inglês, *day after germination*), radículas de tamanho semelhantes foram transferidas para sistemas hidropônicos (8 sementes germinadas por vaso) contendo 600 mL de solução nutritiva Hoagland 10% v v⁻¹ (pH 5,5), com base em um estudo anterior [3]. Cada vaso representou uma amostra biológica composta por oito plantas.

2.3.4 Testes de toxicidade

Os testes de toxicidade foram adaptados da literatura [3,43]. Resumidamente, as soluções nutritivas Hoagland foram suplementadas individualmente com As^{V} , Se^{IV} ou Se^{VI} a 0, 5, 10, 25, 50, 100 ou 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Alternativamente, as sementes germinadas foram co-expostas a As^{V} + Se^{IV} , em que a concentração do primeiro variou de 0 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto a concentração do último foi fixada em 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os sistemas hidropônicos foram montados em triplicata e mantidos por 15 dias em temperatura ambiente. As soluções nutritivas suplementadas ou não com As e Se foram trocadas a cada três dias.

O índice de tolerância da raiz (% ITR) foi calculado dividindo-se o comprimento da raiz das plantas tratadas com As^{V} , Se^{IV} ou Se^{VI} pelo comprimento da raiz das plantas controle multiplicado por 100. A toxicidade do As^{V} , Se^{IV} e Se^{VI}

para as plantas de linhaça dourada foi determinada em termos de EC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento). Os valores de EC_{50} foram calculados usando os valores de ITR correspondentes, e posteriormente comparados com as plantas controle desprovidas de qualquer tratamento com As e/ou Se. Para isso, as equações das regressões exponenciais decrescentes obtidas (apêndice A) foram utilizadas nos cálculos. O comprimento da raiz e o comprimento total foram avaliados no início da exposição (d-0; 3º DAG) e ao final do experimento (d-15; 18º DAG). O desenvolvimento das plantas de linhaça dourada expostas ao As^V pode ser observado na Figura 2.1. Nos demais experimentos de exposição e co-exposição as plantas apresentaram desenvolvimento semelhantes e por isso não são apresentadas. Nas concentrações de exposição de 50, 100 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ nota-se uma redução significativa de desenvolvimento da parte aérea.

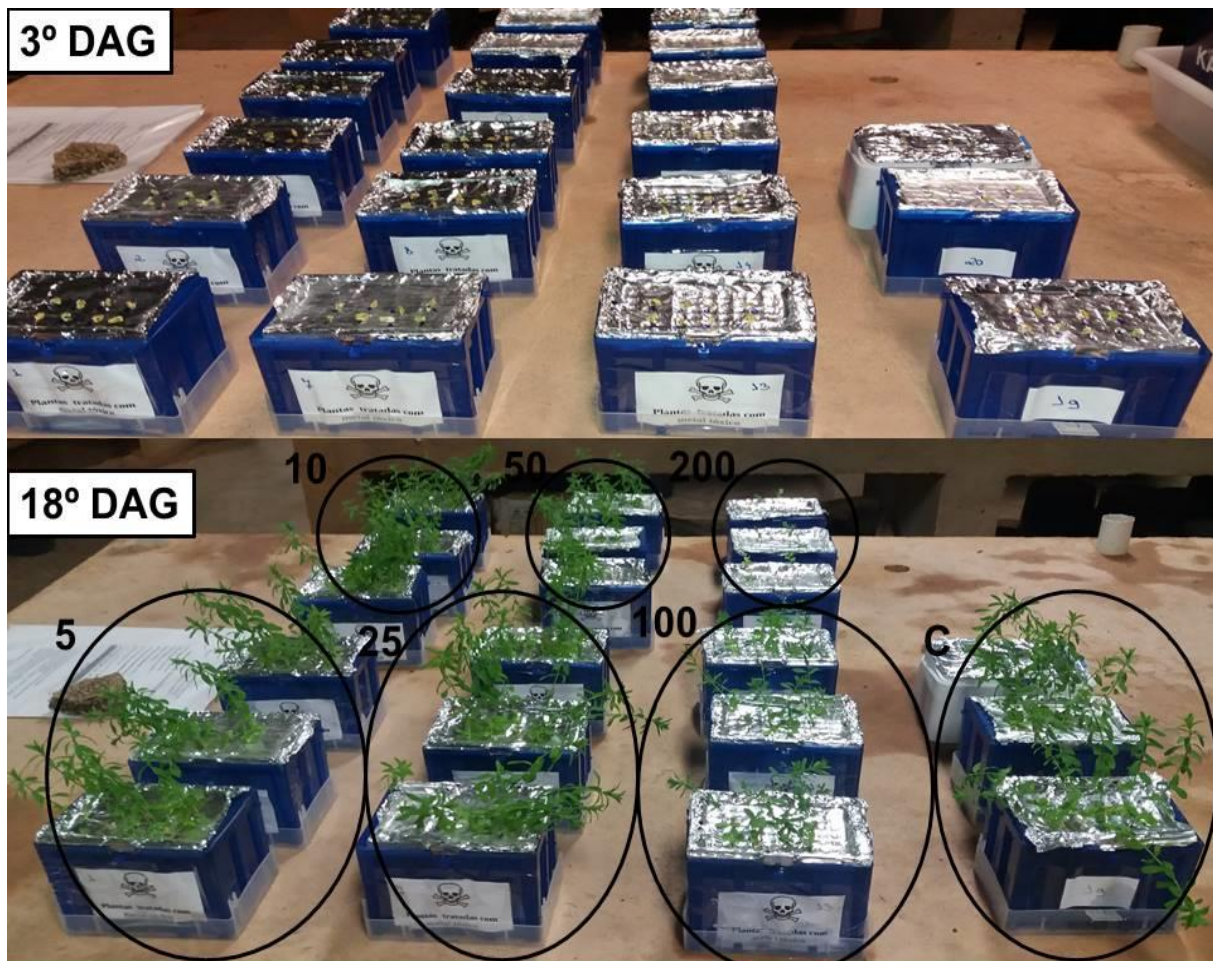


Figura 2.1 – Plantas de linhaça dourada expostas a As^V no 3º e 18º dias após a germinação (DAG). Os números nos círculos correspondem as concentrações de exposição a As^V em $\mu\text{mol L}^{-1}$ nos três vasos destacados. A letra c corresponde os vasos de plantas controle.

2.3.5 Preparo das amostras

Ao final dos experimentos, as plantas foram retiradas da solução de Hoagland, lavadas com água destilada e deionizada e separadas em folhas, caule e raiz ($n = 3$). Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 48 h, pesadas e digeridas em forno de micro-ondas com cavidade em frascos fechados utilizando 7 mL de HNO_3 50% v v⁻¹ mais 1 mL de H_2O_2 30% v v⁻¹. O programa de aquecimento por micro-ondas consistiu em uma etapa de rampa para aquecimento até 180 °C por 10 min, seguido de uma etapa de patamar, onde essa temperatura foi mantida por 20 min, seguido de resfriamento por 30 min. O volume das amostras digeridas foi ajustado para 30 mL com água ultrapura. As amostras digeridas foram analisadas por ICP-MS.

2.3.6 Figuras de Mérito

A exatidão e a precisão (repetitividade) do método analítico para As e Se foram avaliadas usando um material de referência certificado (MRC) de folhas de espinafre (*National Institute of Standard and Technology - NIST 1570a*). Seis replicatas do MRC foram digeridas conforme o preparo de amostras descrito. Para avaliação da exatidão em termos de recuperação calculou-se a (%) de recuperação e os valores obtidos foram comparados estatisticamente com os valores certificados pelo teste t a 95% de confiança. Nos experimentos conduzidos sob a forma de repetitividade, a precisão foi expressa em termos de desvio padrão relativo DPR(%) dos resultados de recuperação calculados pela razão entre o desvio padrão das concentrações e a média dessas concentrações multiplicado por cem ($\text{DPR} = 100 \times s / X$), onde s é o desvio padrão da média das concentrações e X é a média das concentrações determinadas para as replicatas de amostras do MRC.

Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados usando o desvio padrão obtido para as soluções de brancos analíticos e a inclinação da curva analítica ($\text{LD} = \text{LQ} / 3,3$ e $\text{LQ} = 10s/b$, onde s é o desvio padrão de 7 brancos independentes e b é a inclinação da curva analítica).

Os parâmetros da regressão foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), com curva de calibração em seis níveis de

concentração: 0, 10, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, em triplicata. Para todas as soluções da curva e amostras digeridas empregou-se como padrão interno ítrio (Y) na concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os *outliers* (valores dispersos) foram identificados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife. Este teste foi aplicado sucessivamente até que novos *outliers* não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2% no número original de resultados. As premissas do modelo de regressão foram avaliadas de acordo com os testes normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos da regressão. Por fim, o Teste F (ANOVA) foi utilizado para verificar o ajuste ao modelo linear[80]. Todas as soluções foram quantificadas por ICP-MS.

2.3.7 Fator de translocação do selênio e arsênio

O fator de translocação (FT) foi calculado pela razão entre a concentração dos metaloides na parte aérea da planta (caule e folhas) e a concentração na raiz (Eq. (1)) [81].

$$FT = \frac{\text{Concentração total de metaloide no caule e na folha}}{\text{Concentração total de metaloide na raiz}} \quad \text{Eq.1}$$

2.4 Resultados e Discussão

Os LD e LQ para As e Se foram 0,51 e 0,52 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,70 e 1,71 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. As recuperações no MRC NIST 1570a foram de $96 \pm 6\%$ e $97 \pm 4\%$ para As e Se, respectivamente. Pelo teste *t* a 95% de confiança as concentrações determinadas de As e Se no MRC não diferem estatisticamente dos valores certificados.

Para a precisão em termos de repetibilidade, os valores de DPR(%) foram de 6,75% para As e 8,63% para Se, sendo considerados aceitáveis, pois foram menores que 15% (critério de aceitabilidade para amostras ambientais[82]), indicando que o método apresenta uma boa precisão. Os resultados obtidos para a avaliação da linearidade das curvas Se e As estão apresentados na Tabela 2.2.

A linearidade de um método é sua habilidade em obter sinais analíticos que sejam diretamente proporcionais à concentração ou quantidade do analito na amostra. Os intervalos de confiança dos resíduos para curva do Se e As sugeriram um e quatro *outliers*, respectivamente, confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife. O teste das premissas para uso apropriado do MMQO mostrou que os resíduos seguem uma distribuição normal, são homoscedásticos e independentes e que há significância na regressão e não há desvio da linearidade.

Tabela 2.2 – Avaliação da linearidade para as curvas de Se e As (0 a 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) a 95% de confiança.

Estatística		Curva	
		Se	As
Número de observações	N	17	14
Normalidade	R/R _{crit}	0,9764/0,9461	0,9874/0,9315
Homoscedasticidade	t _L	0,281	2,20
Independência	D	1,615	1,334
Regressão	F/F _{crit}	2,29 x 10 ³ /4,49	2,44 x 10 ⁴ /4,84
Desvio da linearidade	F/F _{crit}	0,822/3,26	1,72/4,12

n = número de observações; R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner; p = significância; t_L = estatística t de Levene; d = estatística de Durbin-Watson; e F = razão entre variâncias

2.4.1 Teste de toxicidade e matéria seca da planta

Os valores de EC₅₀ para As^V + Se^{IV}, As^V, Se^{IV}, Se^{VI} foram 62,4 ± 3,8; 47,8 ± 7,9; 24,7 ± 5,9; 4,32 ± 0,67 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente (Figura 2.3). Dentre as espécies avaliadas, o Se^{VI} foi o mais tóxico para as plantas (valor EC₅₀ < 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) levando a redução da matéria seca da planta, mesmo em concentrações de exposição mais baixas (Figura 2.4). Tanto As^V quanto Se^{IV} são as espécies mais abundantes de As e Se em solos aeróbios, respectivamente [3]. O As^V foi considerado menos tóxico do que Se^{IV} para plantas de linhaça dourada (Figura 2.4). No entanto, a quantidade de As é normalmente maior (até 16 vezes) do que a de Se, mesmo em solos seleníferos [23]. Portanto, as plantas foram expostas a quantidades relativamente maiores de As em comparação ao Se. O Se^{IV} em baixas concentrações também é conhecido por aumentar em plantas a quantidade de tióis não proteicos, que incluem glutatona reduzida (GSH) e fitoquelatinas (PCs)[83]. Dessa forma, se o Se^{IV} estiver presente em baixa concentração, existe a possibilidade de o As se beneficiar do aumento da concentração de tióis para sua desintoxicação, conforme sugerido anteriormente na literatura[3]. Por isso, nesse

trabalho investigou-se como o Se^{IV} em baixas concentrações pode diminuir a toxicidade do As^{V} em plantas e não contrário, embora as plantas fossem mais sensíveis ao Se^{IV} . Na figura 2.2 é possível observar o crescimento das raízes em função das diferentes concentrações de exposição a As^{V} . Na exposição a Se^{IV} , Se^{VI} e co-exposição a $\text{As}^{\text{V}} + \text{Se}^{\text{VI}}$ o desenvolvimento das plantas foi semelhante e por isso não foram apresentados imagens referentes a esses tratamentos.

Os menores teores de massa seca foram observados para as plantas contaminadas com Se^{VI} em concentrações menores que $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ quando comparadas com aquelas expostas a As (Figura 2.4). Foi observado também diminuição do tamanho das raízes das plantas tratadas com As^{V} ou $\text{As}^{\text{V}} + \text{Se}^{\text{IV}}$ em concentrações iguais ou superiores a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em relação ao controle. A restrição no acúmulo de biomassa é um dos efeitos tóxicos típicos de um metal/metaloide sobre plantas. A diminuição do teor de massa seca das plantas de acordo com o incremento na concentração de metaloide foi mais pronunciada nas plantas expostas apenas ao As^{V} , em comparação com aquelas tratadas com $\text{As}^{\text{V}} + \text{Se}^{\text{IV}}$.

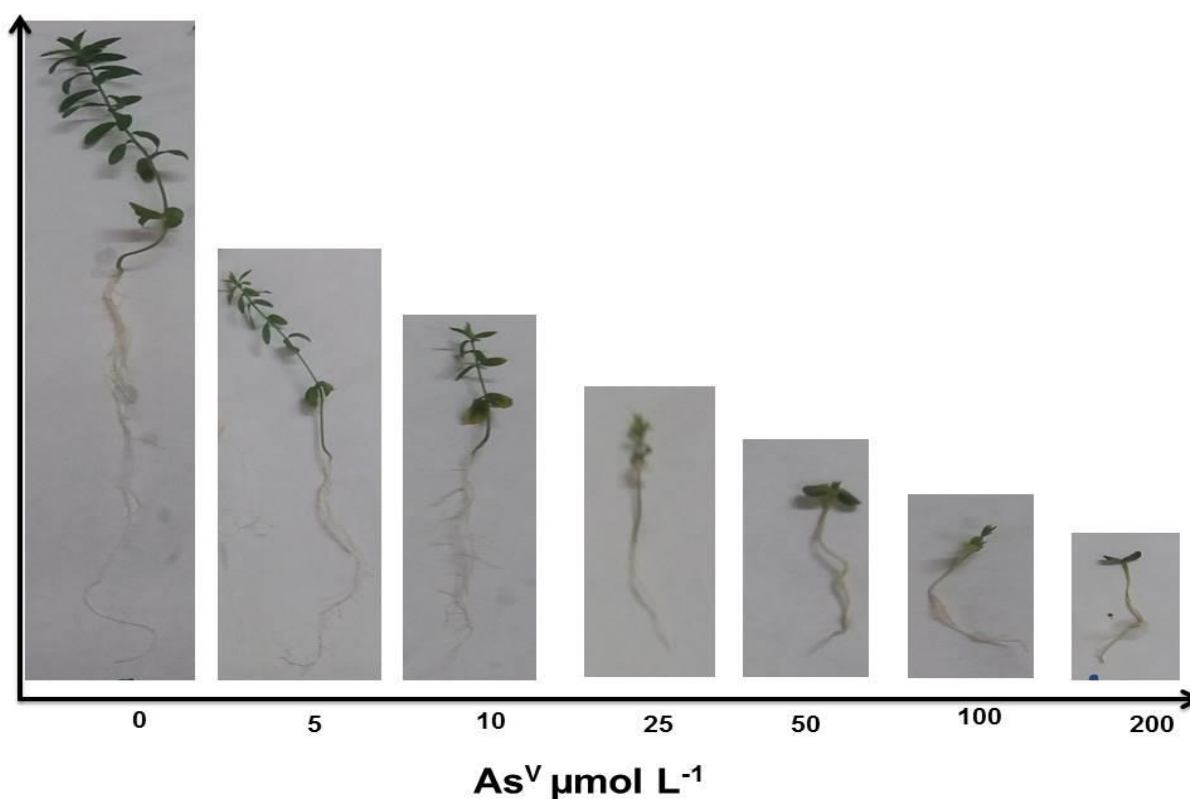


Figura 2.2 – Crescimento das raízes em função das diferentes concentrações de exposição a As^{V} .

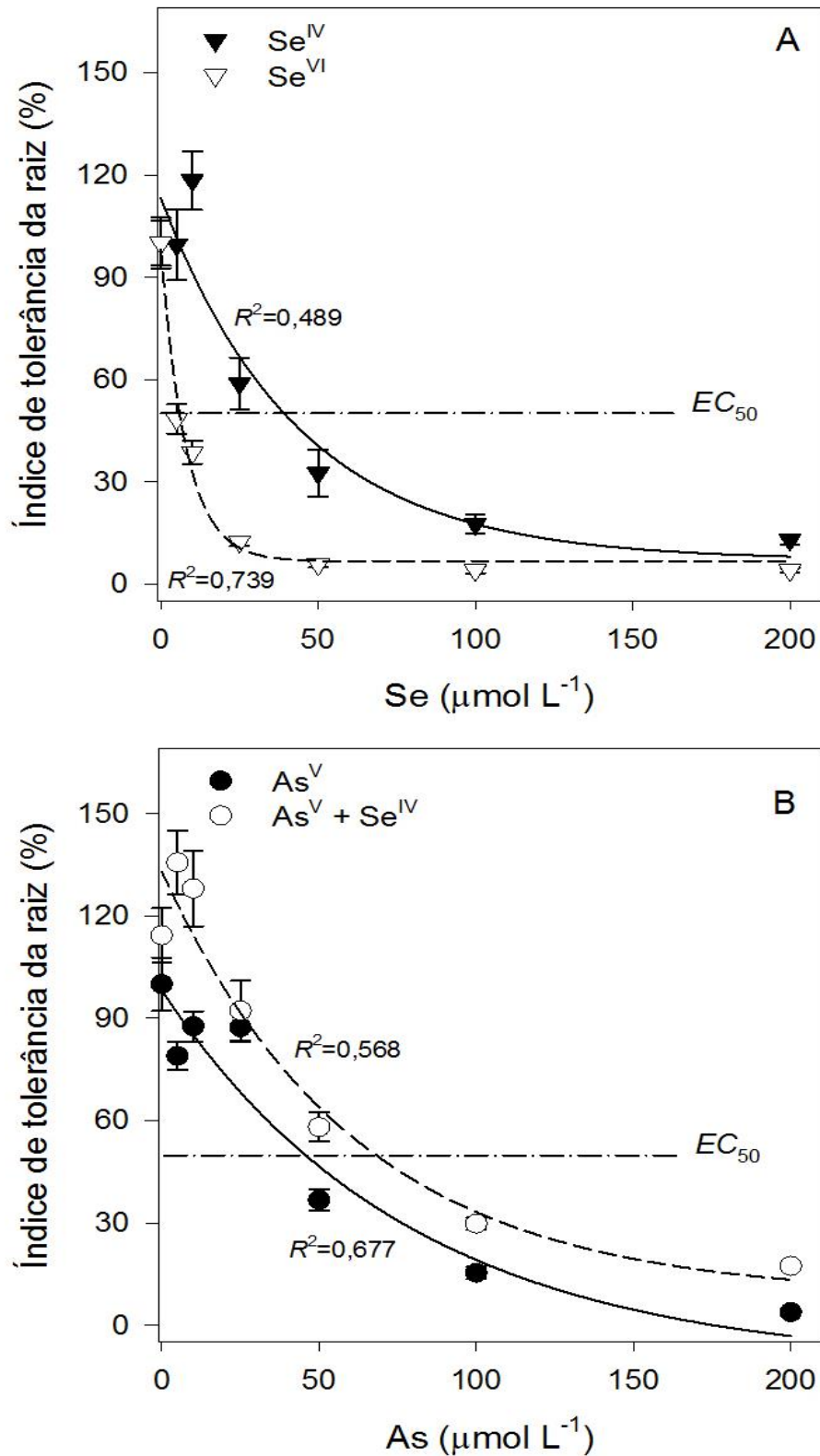


Figura 2.3 - Índice de tolerância da raiz (ITR) para plantas de linhaça dourada expostas (Se^{IV} , Se^{VI} e As^{V}) e co-expostas (Se^{IV} + As^{V}), em função da concentração dos íons com 15 dias de exposição. Os valores são a média \pm desvio padrão de experimentos conduzidos com três réplicas biológicas (as equações são descritas no apêndice A).

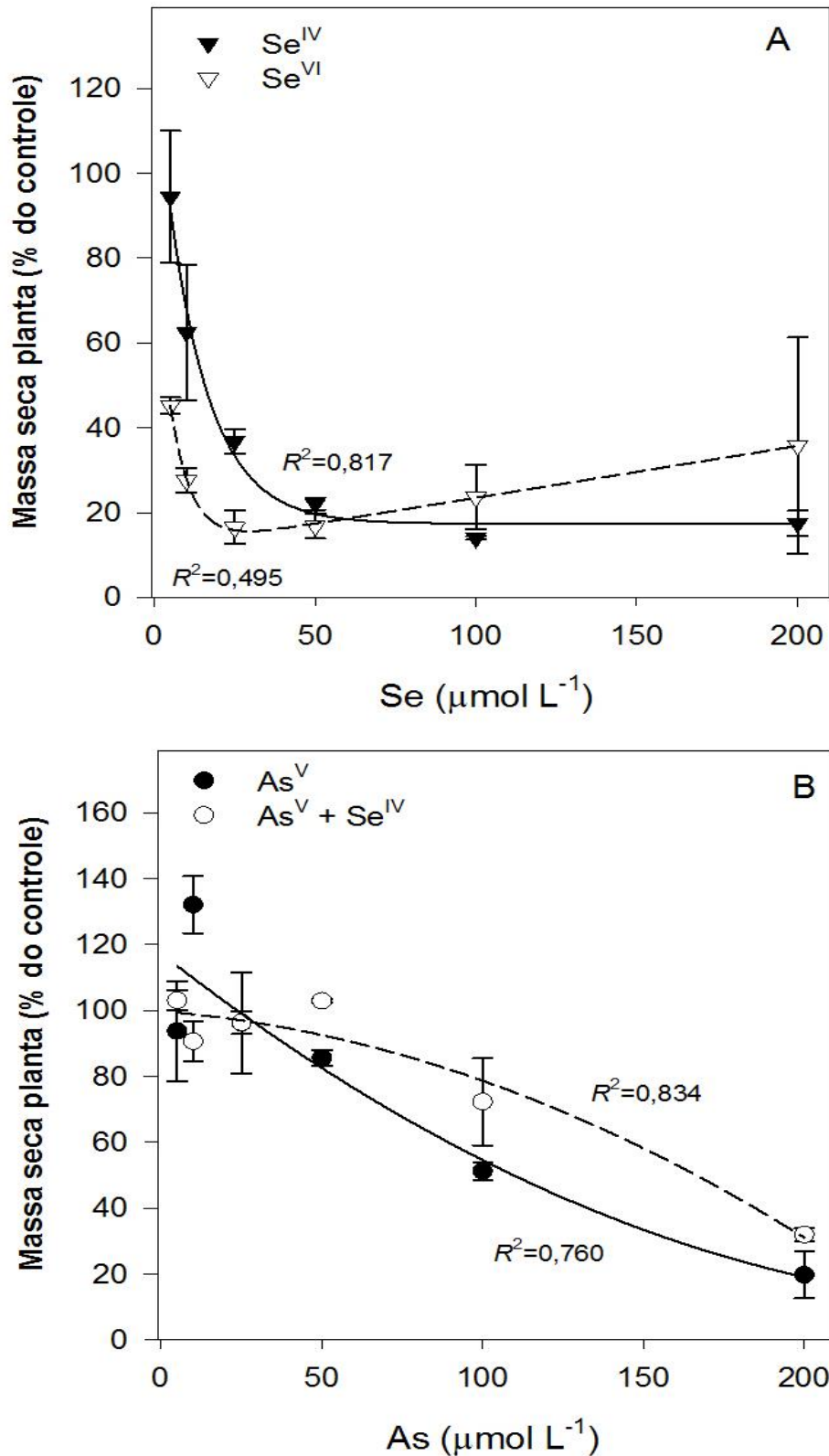


Figura 2.4 - Porcentagem de massa seca total para plantas de linhaça dourada expostas (Se^{IV} , Se^{VI} e As^{V}) e co-expostas (Se^{IV} + As^{V}) a concentrações variadas de íons por 15 dias. Os dados são a média \pm desvio padrão de experimentos conduzidos com três réplicas biológicas (as equações são descritas no apêndice A).

2.4.2 Acúmulo de As e Se em folhas, caule e raiz

O acúmulo de Se^{IV} na raiz e no caule das plantas foi acompanhado de um incremento desta espécie na solução hidropônica, porém tal efeito não foi tão expressivo nas folhas (Figura 2.6). Em contraste, o acúmulo de Se^{VI} nas raízes e caule diminuiu em duas ordens de grandeza e 2,5 vezes, respectivamente, quando comparado ao do Se^{IV} . Quantidades relativamente menores de Se^{VI} foram translocadas para as folhas (Figura 2.5).

A suplementação da solução hidropônica com quantidades crescentes de As^{V} resultou no aumento desta espécie nas raízes (Figura 2.6E). No entanto, a translocação de As^{V} para o caule e folhas foram no máximo 5 e 10 vezes menor do que a quantidade acumulada na raiz, respectivamente. A co-exposição de plantas com As^{V} + Se^{IV} aumentou a translocação de As^{V} na faixa de 3 a 5 vezes para todas as partes investigadas (Figura 2.6A, C e E). Uma diminuição na concentração de As na raiz foi observada quando a suplementação foi próxima a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 2.6E). É perceptível que a translocação de As para as partes superiores das plantas foi maior quando co-exposto com Se. Ao mesmo tempo, o acúmulo de As na raiz é consideravelmente maior na presença de Se (Figura 2.6E). Na co-exposição o acúmulo de As nas raízes aumentou com o aumento da concentração de As^{V} até $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e posteriormente diminuiu na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 2.6E). A exposição e co-exposição das plantas em concentrações de As^{V} acima de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ provocou uma redução expressiva na biomassa de raiz e isso pode ocasionar mais erros na quantificação dos elementos.

Nos experimentos de co-exposição, o acúmulo de Se^{IV} nas plantas exibiu um comportamento hiperbólico, no qual maiores concentrações de As levaram ao aumento do acúmulo de Se na raiz, caule e folhas (Figura 2.6B, D e F).

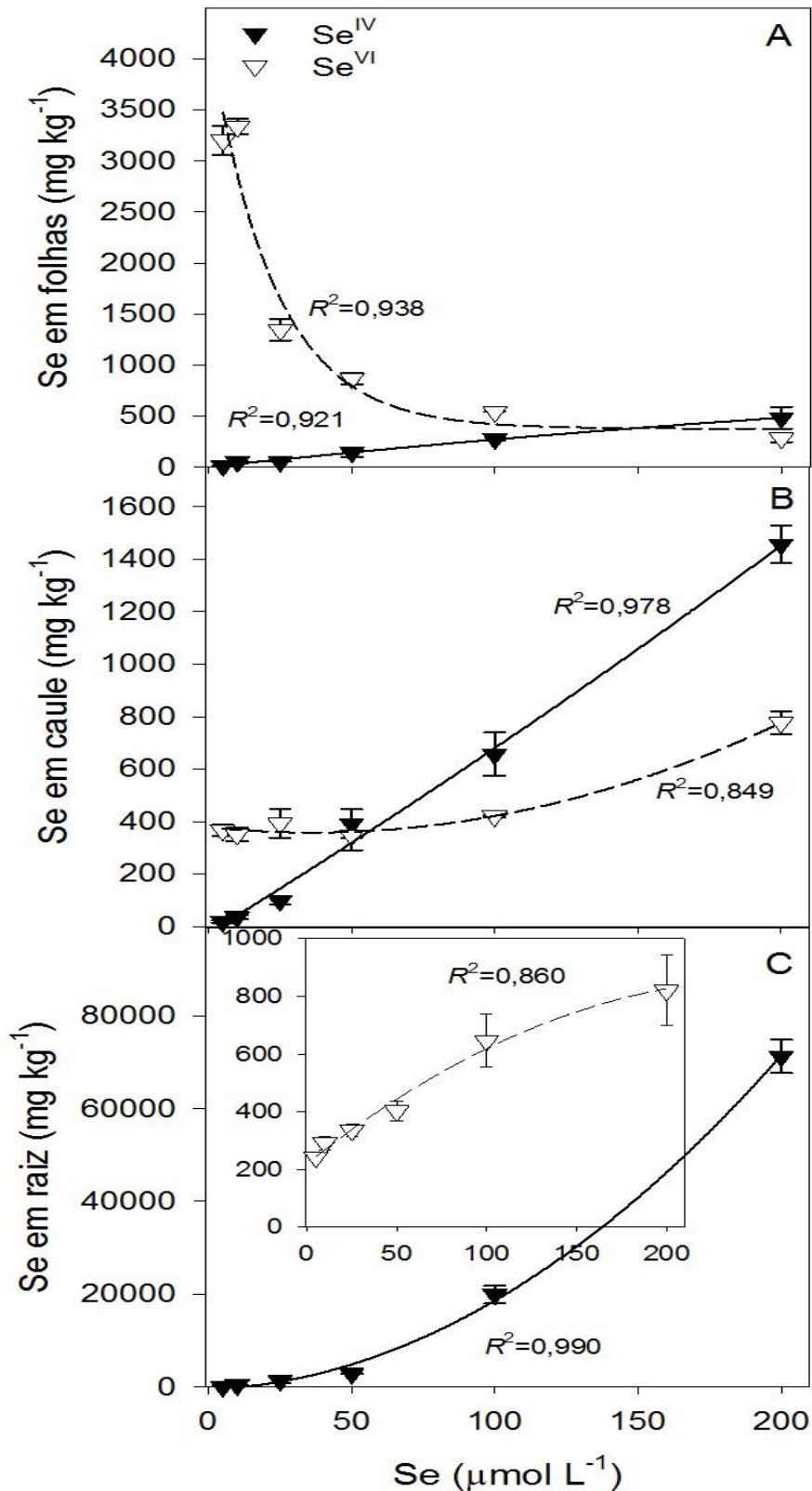


Figura 2.5 - Concentração de selênio nas folhas (A), caule (B) e raízes (C) em plantas de linhaça dourada exposta a concentrações variáveis de Se^{IV} (símbolos fechados) e Se^{VI} (símbolos abertos) por 15 dias. Os dados são a média ± desvio padrão de experimentos conduzidos com três réplicas biológicas (as equações são descritas no apêndice A).

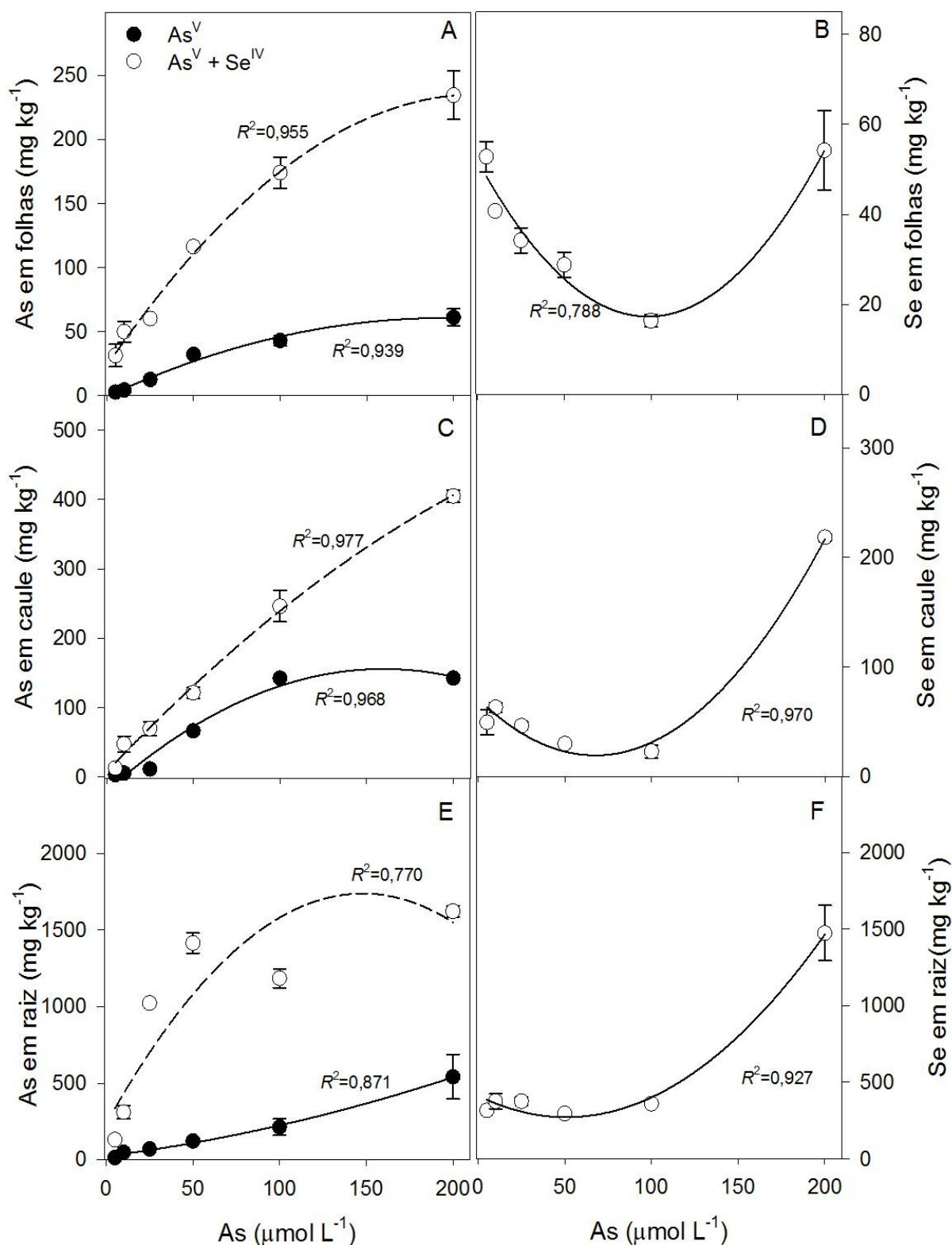


Figura 2.6 - Concentração de arsênio (A, C, E) e selênio (B, D, F) nas folhas (A, B), caule (C, D) e raízes (E, F) das plantas de linhaça dourada exposta a concentrações variáveis de As^{V} (símbolos fechados) e co-exposto com Se^{IV} na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (símbolos abertos) por 15 dias. Os dados são a média \pm desvio padrão de experimentos conduzidos com três réplicas biológicas (as equações são descritas no apêndice A).

2.4.3 Fator de translocação

Os fatores de translocação (FT) calculados após a exposição e co-exposição das plantas de linhaça dourada apresentaram os maiores valores para Se^{VI} (Tabela 2.3). Em geral, as espécies de Se apresentaram os maiores fatores de translocação. A co-exposição com Se^{IV} aumentou o TF para As em 11 vezes, quando comparado ao As apenas na concentração mais alta ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Tabela 2.3 - Fatores de translocação para plantas de linhaça dourada expostas a concentrações variáveis de As^{V} , Se^{IV} , Se^{VI} e co-expostas a concentrações variáveis de $\text{As}^{\text{V}} + \text{Se}^{\text{IV}}$ $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os valores representam a média ($n = 3$) \pm desvio padrão (DP).

Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Fator de Translocação \pm DP				
	As^{V} As	Se^{IV} Se	Se^{VI} Se	$\text{As}^{\text{V}} + \text{Se}^{\text{IV}}$ As	$\text{As}^{\text{V}} + \text{Se}^{\text{IV}}$ Se
5	0,16 \pm 0,03	0,4 \pm 0,1	14,7 \pm 0,5	0,41 \pm 0,03	0,28 \pm 0,12
10	0,07 \pm 0,03	0,11 \pm 0,09	14 \pm 2	0,3 \pm 0,1	0,21 \pm 0,02
25	0,06 \pm 0,02	0,20 \pm 0,02	5 \pm 1	0,11 \pm 0,01	0,20 \pm 0,03
50	0,11 \pm 0,01	0,13 \pm 0,09	3,1 \pm 0,5	0,13 \pm 0,04	0,18 \pm 0,02
100	0,08 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	2,3 \pm 0,6	0,11 \pm 0,05	0,12 \pm 0,02
200	0,07 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,8 \pm 0,5	0,77 \pm 0,74	0,17 \pm 0,04
Resumo da Análise de Variância					
F valor	0,309 ^{n.s.}	6,266*	9,352*	8,922*	0,542 ^{n.s.}
Quadrado médio	0,00052	0,07038	180,83	1,017	0,00267

FT é definido como a razão entre a concentração nas partes aéreas (caules e folhas) e nas raízes. Os asteriscos indicam significância a 5% de probabilidade pelo teste F, n.s. = não significativo.

A análise de variância (Tabela 2.3) indica se o aumento da concentração de exposição e co-exposição aumenta a translocação dos metaloides na planta de forma significativa. O aumento da concentração de exposição a Se^{IV} e Se^{VI} aumentou a translocação de Se na planta. Já o aumento da concentração de exposição ao As^{V} não alterou significativamente a translocação de As, mas na co-exposição $\text{As}^{\text{V}} + \text{Se}^{\text{IV}}$ essa translocação aumenta.

2.4.4 Os testes de toxicidade revelaram toxicidade diferenciada de Se e diminuição dos efeitos tóxicos do As quando co-exposto com Se^{IV}

Uma vez que o Se^{VI} foi altamente tóxico para as plantas em comparação com o Se^{IV}, os testes de co-exposição subsequentes foram realizados com Se^{IV} a uma concentração fixa de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, determinada como menos prejudicial ao crescimento da raiz (Figura 2.3). Além disso, concentrações relativamente baixas de Se são conhecidas por proteger as plantas de uma variedade de estresses abióticos, incluindo estresse por metal [33]. Os testes de co-exposição foram valiosos para entender a extensão da interação entre As e Se e uma possível correlação entre a translocação de micronutrientes (como Fe, Mn e Zn) para diferentes órgãos das plantas.

Os valores de EC₅₀ determinados a partir dos experimentos de co-exposição (Figura 2.3) evidenciaram que o Se^{IV} pode diminuir a toxicidade do As^V em plantas de linhaça dourada, mesmo em concentrações tão baixas quanto 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, os resultados de EC₅₀ demonstraram que o As^V isoladamente foi menos tóxico para plantas de linhaça do que Se^{VI}. Esta melhoria no ITR resultou em maior acúmulo de biomassa após a exposição a altas concentrações de As (> 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os efeitos antagônicos entre As e Se nas plantas têm sido investigados no âmbito de possíveis interações entre espécies de ambos os metaloides [39,41]. A proteção do Se^{IV} contra a toxicidade do As^V está provavelmente relacionado a mudanças nos mecanismos de tolerância das plantas a metais tóxicos. Se^{IV} pode afetar a absorção e translocação de As^V e outros elementos nas plantas.

A desintoxicação do As^V em plantas devido à formação de peptídeos ricos em enxofre como as fitoquelatinas (PCs) é apresentada na literatura [43]. Selênio e enxofre são dois elementos intimamente relacionados e o primeiro pode substituir o último para formar, por exemplo, Se-Cys, resultando na formação de PCs contendo Se. Por esta razão, as PCs contendo Se podem reduzir a toxicidade do As formando complexos mais estáveis. Por outro lado, a competição entre As e Se por grupos tiólicos(-SH) em PCs pode ocorrer e comprometer a eficiência das PCs em desintoxicar o As e, conseqüentemente, aumentar a sua toxicidade. As PCs desempenham um papel significativo no acúmulo de arsenato e acredita-se que a desintoxicação do arsenato ocorre por meio da coordenação de tiolatos das PCs

com o arsenato após sua redução [3]. Os resultados apresentados na Figura 2.6 suportam a primeira hipótese, uma vez que o Se^{IV} não comprometeu a absorção de As^{V} pelas raízes da linhaça dourada e sua posterior translocação para a parte aérea (caule e folhas). É possível supor que os efeitos citotóxicos do As^{V} foram amenizados pelo Se^{IV} , uma vez que as plantas tratadas simultaneamente com esses metaloides acumularam mais biomassa de raiz e parte aérea em comparação com às tratadas individualmente com cada um (Figura 2.4). O incremento na biomassa após o tratamento com $\text{As} + \text{Se}$ indica que o crescimento e o desenvolvimento das plantas não foram prejudicados.

2.4.5 Selênio promove maior acúmulo de As nas folhas, caules e raízes

O maior acúmulo de Se^{IV} ocorreu nas raízes ($> 70 \text{ g kg}^{-1}$ raiz), seguido por caules e folhas, enquanto o acúmulo de Se^{VI} nesses órgãos foi relativamente baixo, exceto quando as plantas foram expostas a $6,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 2.5). A suplementação da solução hidropônica com concentrações mais baixas de Se^{VI} produziu a translocação de até $3,2 \text{ g}$ para as folhas, em oposição a $0,3 \text{ g}$ de Se^{IV} , com quantificações de Se nas folhas de plantas sob mesmas condições experimentais. Esses resultados sugerem que o excesso de Se^{VI} na solução nutritiva de alguma forma atrapalhou o acúmulo desse íon nas folhas.

Os experimentos de co-exposição revelaram que $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Se^{IV} aumentou a absorção de As^{V} pelas raízes, o que, por sua vez, levou a um maior acúmulo deste último no caule e nas folhas (Figura 2.6). Na verdade, o fator de translocação do As^{V} da raiz para a parte aérea aumentou pelo menos 10 vezes quando Se^{IV} foi adicionado à solução nutritiva contendo $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ As^{V} em comparação com aquele suplementado apenas com $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de As^{V} (Tabela 2.3). Vale ressaltar que as plantas tratadas com $\text{As}^{\text{V}} + \text{Se}^{\text{IV}}$ não apresentaram sintomas visíveis de fitotoxicidade (clorose nas folhas, atrofiamento e escurecimento das raízes), embora tenham acumulado quantidades maiores de As^{V} .

O Se pode ser acumulado nas raízes principalmente como Se-Cys para ser efetivamente incorporado as PCs e, portanto, estimular a desintoxicação do As [43]. Assim, o Se poderia facilitar a formação de complexos de As estáveis, como $(\text{GS})_2\text{AsSe}$ - [3], hipótese que deve ser testada antes de se chegar a uma conclusão. A co-exposição de *Oryza sativa* (arroz) ao As e Se melhorou o crescimento da

planta e diminuiu o estresse induzido pelo As [27]. Na concentração de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$, Se^{IV} diminuiu o acúmulo de As^{III} em plantas de arroz cultivadas em condições hidropônicas [42]. Além disso, o aumento de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica, óxido nítrico, vazamento de eletrólitos das células e atividade da NADPH oxidase estimulada por As^{III} em plantas de arroz foram minimizadas pela co-exposição com Se^{IV} [42]. No estudo, o acúmulo de Se em plantas de arroz co-expostas foi sempre maior do que em plantas tratadas com $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Se. Resultados semelhantes foram encontrados em experimentos realizados com *Pteris vittata* (uma espécie de samambaia)[41]. Com base neles, o Se a $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ provavelmente evita o aparecimento de sintomas de toxicidade (como clorose e inibição do crescimento da planta) em plantas de linhaça devido à exposição ao As.

De modo geral, as plantas expostas ao As^{V} acumularam menores quantidades em comparação com as tratadas com Se^{IV} ou Se^{VI} (Figuras 2.5 e 2.6). Isso é observado pelos maiores valores de FT encontrados para Se^{VI} nas concentrações testadas (Tabela 2.2). O As é conhecido por ser tóxico para as plantas, mesmo em concentrações muito baixas [24]. A tolerância das raízes das plantas de linhaça ao As foi comparativamente maior (Figura 2.3), sugerindo que esta espécie de planta possui um mecanismo de tolerância para As melhor do que para o Se. Parece que o Se^{IV} aumenta os mecanismos de tolerância da linhaça dourada. É possível supor que a associação de As^{V} com Se^{IV} seja menos tóxica para as plantas do que apenas As^{V} nas mesmas concentrações.

2.4.6 Absorção dos micronutrientes essenciais Fe, Mn e Zn

A concentração de Fe, Mn e Zn nas raízes, caules e folhas das plantas mudou com os tratamentos com As^{V} ou $\text{As}^{\text{V}} + \text{Se}^{\text{IV}}$ (Figura 2.7). A Figura 2.8 mostra as representações gráficas da correlação de Pearson ($p < 0,05$).

Concentrações crescentes de As^{V} aumentaram a absorção de todos os micronutrientes investigados nas raízes, um efeito mais evidente a partir de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. A translocação de Fe e Mn para a parte aérea da planta aumentou com a co-exposição $\text{As}^{\text{V}} + \text{Se}^{\text{IV}}$, exceto quando As^{V} foi usado em $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. A translocação de Zn em plantas co-expostas foi efetiva até $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de As^{V} , enquanto concentrações iguais ou superiores a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ favoreceram o acúmulo de Zn nas raízes (Figura 2.7).

Correlações positivas (cor azul) e negativas (cor vermelha) foram observadas para os tratamentos (Figura 2.8). Em geral, o As^V causou correlações mais positivas com os micronutrientes, enquanto a associação entre $As^V + Se^{IV}$ afetou principalmente folhas e raízes com correlações negativas.

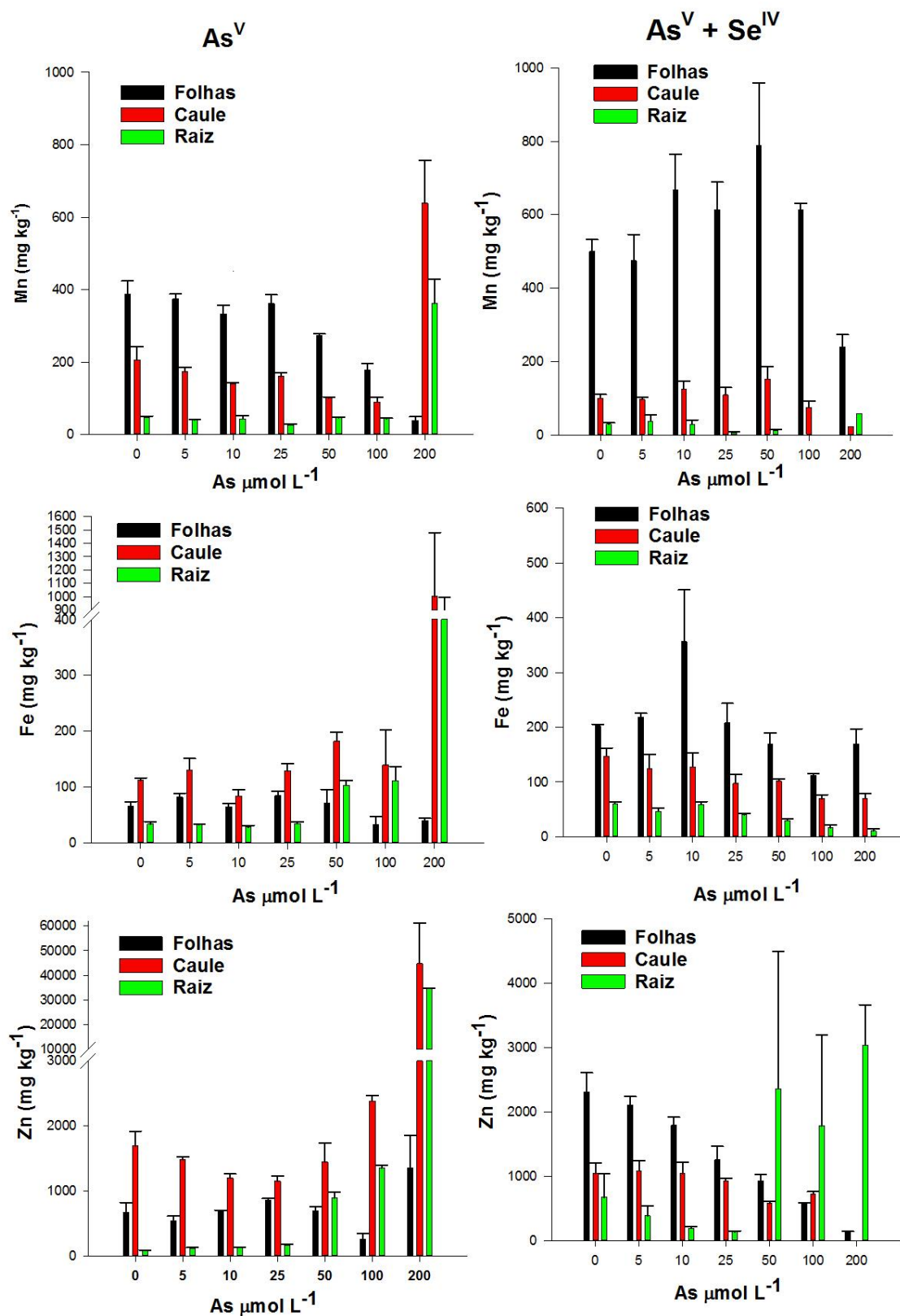


Figura 2.7 - Concentração de Mn, Fe e Zn nas folhas, caule e raízes de plantas de linhaça dourada expostas a concentrações variadas de As^V ou concentrações variadas de As^V + Se^{IV} (5 μmol L⁻¹), respectivamente.

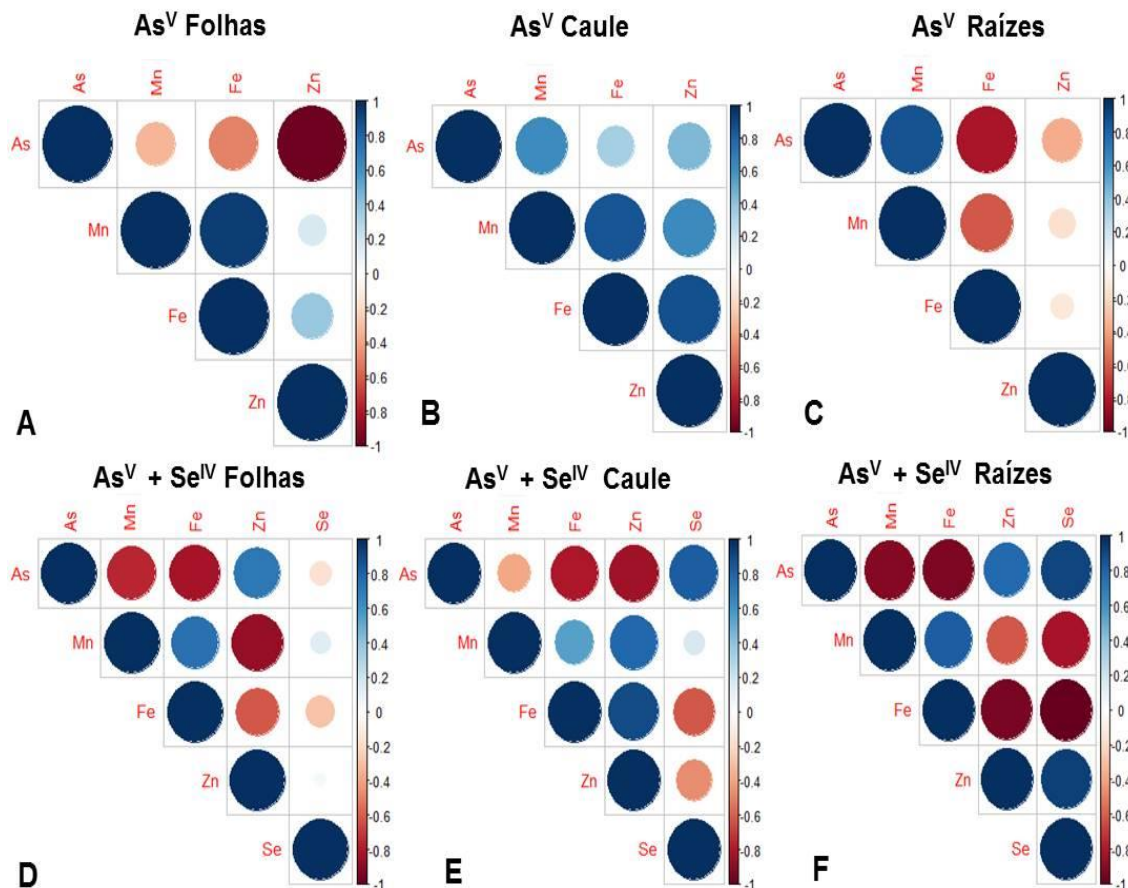


Figura 2.8 - Correlogramas para o conteúdo dos elementos (As, Mn, Fe, Zn e Se) em plantas de linhaça dourada exposta a As^V (A, B e C) e co-exposta a As^V + Se^{IV} (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (D, E e F) em folhas, caule e raízes. Análise de correlação de Pearson ($p < 0,05$). A cor azul indica correlações positivas, enquanto a cor vermelha representa correlações negativas.

2.4.7 Correlação multi-elementar

O As^V prejudicou, mas não inibiu totalmente, o acúmulo de Mn, Fe e Zn nas folhas. A translocação do Zn das raízes para as folhas melhorou consideravelmente quando as plantas foram expostas ao As^V + Se^{IV}, exceto para concentrações superiores a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 2.7). Além disso, o efeito negativo do As^V na mobilidade do Zn das raízes para as folhas (Figura 2.8) pode levar à deficiência de Zn nas plantas e diminuir seu crescimento[84]. O Zn é um cofator crucial para enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio, transferência de energia e síntese protéica, além de contribuir para a biossíntese de auxinas e giberelinas, dois importantes hormônios de crescimento [85]. Ferro e Mn são nutrientes essenciais na fotossíntese e a deficiência de ambos nas folhas é conhecida por comprometer a

biossíntese da clorofila [85,86]. A ausência de sintomas visíveis típicos de clorose em folhas de plantas co-expostas ($\text{As}^{\text{V}} < 200 \mu\text{mol L}^{-1}$) sugere que as quantidades de Fe e Mn detectadas nas folhas foram suficientes para que as plantas realizassem satisfatoriamente a fotossíntese e, portanto, crescessem e acumulassem biomassa. A absorção e translocação de Mn e Zn também foram afetadas por As^{V} em *Pisum sativum* (ervilha) [87] e os resultados sugerem que Se^{IV} superou o efeito negativo do As^{V} na translocação de Zn para as folhas. O fato do Zn poder atingir o meristema apical caulinar - principal sítio de biossíntese de auxina [88] em plantas suplementadas com $\text{As}^{\text{V}} + \text{Se}^{\text{IV}}$ também corrobora a ação benéfica do Se no crescimento das plantas tratadas com As, sob as condições experimentais testadas.

O As apresentou uma interação antagonica com o Fe em todos os órgãos das plantas (Figura 2.8). Uma forte correlação entre As e Fe foi observada em plantas co-expostas. Uma correlação negativa também foi encontrada entre As e Fe em raízes de arroz tratadas com As^{V} [24]. Du e colaboradores [24] mostraram que a presença de As^{V} restringe a absorção de P, levando a uma correlação negativa entre As e P nas raízes. Fósforo e Fe compartilham algumas funções biológicas semelhantes, sugerindo a forte conexão entre eles nas plantas. Em *Arabidopsis thaliana*, os reguladores de resposta à deficiência de P são alterados pela disponibilidade de Fe e vice-versa [24,89]. Mais uma vez, o Se^{IV} reverteu os efeitos negativos do As^{V} na absorção de Fe, pois as plantas co-expostas apresentaram maiores teores de Fe nas folhas e raízes em comparação com as plantas expostas somente ao As^{V} .

Efeitos sinérgicos ($p < 0,05$) entre As e Se foram encontrados em caules e raízes de plantas de linhaça dourada co-expostas. A absorção de Se aumentou a absorção de As e vice-versa nas plantas co-expostas. No entanto, a translocação de Se para folhas foi prejudicada na presença do As (Figura 2.6). Resultados contrastantes sobre as interações As e Se em plantas estão disponíveis [41] e isso sugere que a resposta de um organismo à co-exposição de metaloides depende da espécie da planta e também do estágio de desenvolvimento. A samambaia chinesa é um bom exemplo, uma vez que o sinergismo entre As e Se ocorreu quando os níveis de Se foram inferiores a $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, mas o antagonismo foi observado para Se em concentrações superiores a $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ [41]. A suplementação com As ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e

5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se em *Vigna radiata* (feijão-mungo) desencadeou o crescimento da planta, o que indicou uma interação sinérgica entre os elementos [83].

2.5 Conclusão

O Se^{IV} diminuiu a toxicidade do As^{V} nas plantas de linhaça dourada durante os estágios iniciais de desenvolvimento, apesar da absorção e translocação de As terem aumentado. Esses efeitos são positivos quando se trata do uso da planta de linhaça dourada para possível descontaminação de solos contendo As, mas negativos quando se trata de segurança alimentar. Um efeito antagônico entre As^{V} e Se^{IV} também foi observado nas plantas de linhaça dourada. A absorção e translocação de de As e Se aumentaram sem prejuízos no crescimento. É provável que o As^{V} e o Se^{IV} formem complexos estáveis e não tóxicos e de maior mobilidade nas raízes ou complexos estáveis e não tóxicos na parte aérea para, de alguma forma, inibir os efeitos citotóxicos dos íons livres. Estudos visando a identificação e quantificação de tais complexos em plantas co-expostas são necessários para confirmar esta hipótese. O Se^{IV} pode ajudar as plantas a minimizarem a toxicidade de As nos primeiros estágios de desenvolvimento, uma resposta que pode favorecer o sucesso do crescimento das plantas em solos contendo quantidades moderadas de As e Se. Diferentemente da complexa matriz do solo, o sistema hidropônico utilizado permitiu avaliar os efeitos diretos do As e do Se em plantas de linhaça dourada e as implicações da associação desses metaloides no desempenho da planta e na absorção e translocação de nutrientes.

CAPÍTULO 3 – IDENTIFICAÇÃO DE FITOQUELATINAS E COMPOSTOS DE ARSÊNIO E SELÊNIO EM RAÍZES DE LINHAÇA DOURADA APÓS CO-EXPOSIÇÃO AO ARSENATO E SELENITO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO PAPER SPRAY

3.1 Introdução

As fitoquelatinas (PCs) são peptídeos tiólicos capazes de complexar e imobilizar metais e metaloides tóxicos em plantas, algas e fungos[46]. Formadas pelos aminoácidos glicina (Gly), cisteína (Cys) e ácido glutâmio (Glu) são enzimaticamente produzidas utilizando a glutathione (GSH) como substrato. As estruturas das PCs possuem repetições crescentes do dipeptídeo γ -Glu-Cys seguida por uma Gly terminal γ -(Glu-Cys)_n-Gly onde n pode variar de 2 a 11, sendo as PCs mais comuns com n variando de 2 a 5 [44].

Quando as plantas são expostas a metais e metaloides tóxicos, a síntese das PCs é ativada rapidamente no citoplasma das células das raízes das plantas e seus complexos metálicos são alocados nos vacúolos conforme ilustrado na Figura 1.4, do Capítulo 1. Como o metal imobilizado é menos tóxico que o metal livre, as PCs são consideradas parte do mecanismo de tolerância das plantas e de alguns fungos [90].

As PCs são importantes indicadores da poluição ambiental por metais e metaloides tóxicos em solo e água, porque são formadas antes mesmo que seja possível mensurar um efeito fisiológico desses poluentes nas plantas [51]. Por isso, métodos analíticos capazes de identificar a formação desses compostos são de grande importância. E, uma vez que as PCs podem se degradar com facilidade, o procedimento de preparo da amostra para identificação desses compostos deve ser rápido e de preferência simples, evitando-se muitas etapas [43].

Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para estudar a distribuição e quantificação das PCs induzidas por estresse de metais e metaloides em plantas, algas e fungos. Esses métodos utilizam principalmente a cromatografia líquida de alta eficiência com a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (HPLC-MS-ICP-MS). Para identificação e quantificação de PCs, Bluemlein e colaboradores [43] usaram HPLC-MS-ICP-MS em fase reversa. Essa técnica tem

como vantagem o monitoramento simultâneo de selênio , arsênio e seus oxi-íons, confirmando a presença de Se e As livres ou ligados. No entanto, essa técnica apesar das suas vantagens possui limitações que influenciaram na identificação das PCs. A principal limitação da técnica, que cabe destacar, é a conversão devido a protonação ou desprotonação das espécies livres e complexadas de PCs durante o processo de eluição [46].

Os estudos sobre PCs exigem a utilização de um método analítico capaz de aliar um procedimento de preparo de amostra simples e uma técnica que forneça resultados rápido. Outros estudos que exigem estes mesmos tipos de métodos vêm buscando alternativas nas variações da espectrometria de massas (MS) com ionização ambiente como a *desorption electrospray ionization* (DESI), *laser ablation electrospray ionization* (LAESI) e *Paper spray* (PS) [53,54,63,91,92].

A técnica PS-MS foi proposta por Cooks e colaboradores (2010) como uma análise rápida, com possibilidade de identificações qualitativas e determinações quantitativas para matrizes complexas. Conforme descrito no Capítulo 1 desta tese, em um clipe de metal é aplicada uma alta voltagem entre o papel e a entrada do espectrômetro de massas e, assim, gotículas carregadas são emitidas da ponta do papel triangular para o espectrômetro de massas, levando à formação de íons similar aos formados no processo *electrospray ionization* (ESI). PS-MS tem sido utilizada por exemplo, na caracterização de perfil químico em alimentos de origem vegetal[93] e em folhas de plantas medicinais [8], análise metabólica de frutas nativas[9] e na determinação de pesticidas em folhas [53] e frutos [72].

O As é um dos principais indutores das PCs [44]. Ele é bastante conhecido pela sua toxicidade e está amplamente distribuído no ambiente. A contaminação de solos e água por As tem sido constantemente relatada e por isso existe um risco eminente de se produzir alimentos contendo esse poluente. Assim, por questões de segurança alimentar é essencial que se entenda o funcionamento dos mecanismos de tolerância das plantas incluindo a formação de PCs para esse metaloide.

Os efeitos sinérgicos e antagônicos da interação do As com outros metais e metaloides em plantas pode alterar esses mecanismos de tolerância. Por isso, um estudo abrangente sobre a formação de PCs não deve levar em consideração a resposta da planta a apenas um indutor. É necessária a avaliação do indutor isolado

e em conjunto com outros. Além disso, as diferentes espécies de metais e metaloides devem ser avaliadas.

Nesse trabalho a interação do As com Se foi escolhida pela capacidade desse em reduzir efeitos tóxicos de outros metais e metaloides em plantas [3]. Essa interação já está sendo bastante estudada e vários trabalhos demonstram que o Se é capaz de reduzir os efeitos tóxicos do As em plantas [43,94]. No entanto, ainda não se tem muitas informações se essa interação pode afetar a formação de PCs pela planta. A identificação de peptídeos tiólicos (-SH) como Se^{II}-PC e Se-cisteinilserina glutaciona em *Thunbergia alata* sugere que o selênio pode competir com o arsênio por grupos -SH livres, presentes nas PCs [43]. A competição do selênio com arsênio por PCs também foi observada em plantas não alteradas geneticamente de *Arabidopsis thaliana* [3].

A formação de PCs tem sido pouco relatada em plantas de linhaça dourada[20], apesar de estudos demonstrarem a alta tolerância dessa planta ao cádmio, um metal tóxico considerado um dos melhores indutores da formação de PCs em plantas [4,19]. Por isso, novos trabalhos com essa planta são de relevância científica [13]. Além disso, a planta de linhaça dourada apresenta vantagens para esses estudos em relação às outras espécies, como o crescimento rápido, alta produtividade e fácil cultivo.

Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a formação das PCs e dos compostos de As e Se utilizando um procedimento de preparo da amostra simples, rápido e que evite ou minimize a degradação dos compostos de interesse em plantas de linhaça dourada co-expostas a arsenato e selenito por PS-MS.

3.2 Objetivo

O objetivo desse trabalho foi identificar fitoquelatinas (PCs) e compostos de As e Se utilizando a espectrometria de massas com ionização PS-MS em raízes de plantas de linhaça dourada co-expostas a arsenato e selenito.

3.2.1 Objetivos específicos

- Otimizar os parâmetros instrumentais do PS-MS para detecção e identificação de PCs;
- Otimizar o preparo de amostra para extração de PCs e compostos de As e Se em raízes de linhaça dourada;
- Identificar as espécies inorgânicas e orgânicas de As e Se não complexadas por PCs em raízes de linhaça dourada;
- Identificar GSH, PCs e complexos PCs-As e PCs-Se em raízes de linhaça dourada.
- Verificar como os efeitos sinérgicos e antagônicos da interação As e Se em linhaça dourada pode alterar os mecanismos de tolerância da planta ao As na formação de PCs.

3.3. Materiais e Métodos

3.3.1 Instrumentação

Para determinação total de As e Se foi utilizado um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (7700, Agilent Technologies, Tóquio, Japão) contendo uma célula de colisão (gás He) usada para corrigir as interferências isobáricas. Ar (alta pureza) foi usado como gás de purga. As condições instrumentais do ICP-MS são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Parâmetros instrumentais do ICP-MS usados na quantificação de As e Se em amostras de raízes da linhaça dourada.

Parâmetros Instrumentais	
Tocha	Quartzo com 2,5 mm de diâmetro interno
Cones de Interface	Ni
Diâmetro dos tubos Tygon	1,02 mm
Câmara de nebulização	Concêntrica
Potência de RF	1550 W
Velocidade da bomba peristáltica	0,5 rps
Gás de arraste	1,09 L min ⁻¹ (Modo sem gás) 1,20 L min ⁻¹ (Modo gás He)
Fluxo do gás auxiliar	4,7 mL min ⁻¹
Medidas	
Varreduras	100
Tempo de integração	0,3 s
Replicatas	3
Resolução	< 1
m/z monitorados	⁵⁵ Mn, ⁵⁶ Fe, ⁶⁶ Zn, ⁷⁵ As, ⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸² Se, ⁸⁹ Y (Modo gás He) ⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸² Se, ⁸⁹ Y (Modo sem gás)

A análise metabólica das amostras foi realizada em espectrômetro de massas LCQ Fleet (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) equipado com fonte de ionização por *paper spray* em modo positivo e negativo (Figura 3.1). As três amostras de raízes foram analisadas em papel cromatográfico cortado em forma de triângulo isósceles (1,5 cm de altura x 1,0 cm de base) posicionado a 0,5 cm da entrada frontal do espectrômetro de massas. Em seguida, 15,0 µL de extrato de raiz foram aplicados na borda dos triângulos com adição imediata de 30,0 µL de metanol. Os parâmetros instrumentais utilizados para aquisição de dados foram os seguintes: voltagem do spray 4,0 kV; voltagem do capilar de 40 V; temperatura do tubo de transferência de 275 ° C; voltagem do tubo lentes de 120 V. A faixa de massa foi de 100 a 1100 m/z dividida em intervalos de 200 m/ z. As energias de colisão utilizadas para fragmentar os compostos foram de 30 eV, exceto para as massas m/z 900 a 1100 (35 ev). Os íons e seus fragmentos obtidos nesta análise foram identificados por comparação com dados previamente descritos na literatura[3,43,94–96] para fonte de ionização por eletrospray, uma vez que não foram encontradas análises por PS-MS para os analitos foco desta pesquisa.

Outros equipamentos usados incluem um liofilizador Thermo Electron Corporation (Modelo: FR-Drying Digital Unit e MODULYOD-230, EUA), banho ultrassom modelo ESC -1400A 40kHz (Unique, São Paulo, Brasil), microcentrífuga modelo 0222E24 600 W (Quimis®, São Paulo, Brasil) e uma balança analítica Shimadzu AUW220D (São Paulo, Brasil). Para a digestão ácida das amostras de raízes de linhaça dourada foi usado um Forno micro-ondas Milestone Ethos 1 - Advanced Microwave Digestion System (Sorisole, Itália).

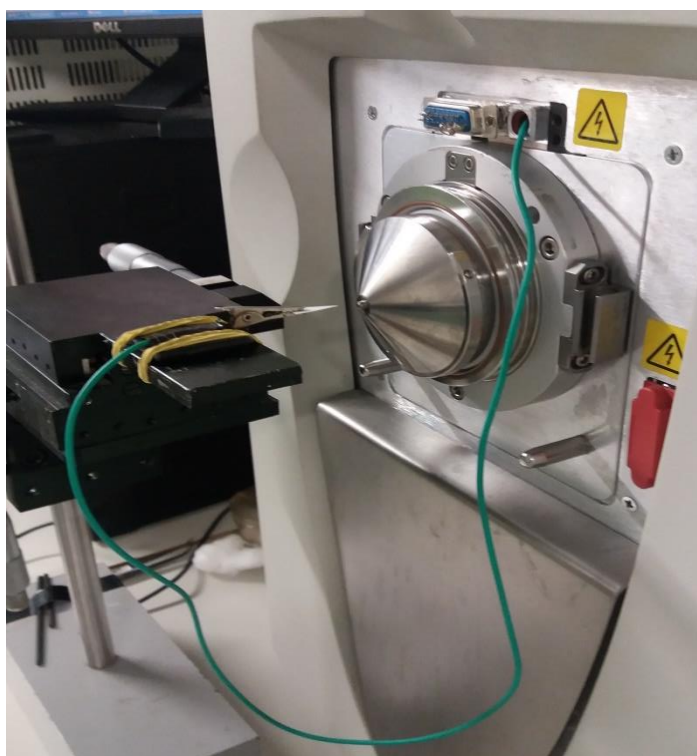


Figura 3.1 - Espectrômetro de massas LCQ Fleet (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) equipado com fonte de ionização por *paper spray* utilizado nesse trabalho.

3.3.2 Reagentes e Soluções

Todos os materiais utilizados foram descontaminados com ácido nítrico 10% v v⁻¹ por pelo menos 24h e depois lavados com água deionizada. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade > 18,2 MΩ cm⁻¹) obtida por um sistema Direct-Q (Millipore Direct-Q 3, Molsheim, França). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Nitrato de potássio (KNO₃), sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O), sulfato de zinco (ZnSO₄.7H₂O), fosfato de amônio dibásico [(NH₄)₂HPO₄], molibdato de sódio

($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), ácido bórico (H_3BO_3), cloreto de manganês (II) ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sal dissódico EDTA, (Dinâmica, Rio Grande do Sul, Brasil) foram utilizados na preparação da solução nutritiva de Hoagland 10% v v⁻¹. As^V e Se^{IV} foram adicionados na solução nutritiva Hoagland como arsenato monossódico (NaH_2AsO_4 , Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), selenito de sódio (Na_2SeO_3 , Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), respectivamente. Ácido nítrico (HNO_3) sub-destilado 65% v v⁻¹ (Merck, Alemanha) purificado pelo sistema DuoPUR (Milestone, Sorisole, Itália) e peróxido de hidrogênio H_2O_2 30% v v⁻¹ (Merck, Alemanha) foram usados na digestão ácida assistida por micro-ondas das amostras.

As soluções dos padrões analíticos foram preparadas diariamente a partir de diluições de solução padrão 10 µg mL⁻¹ de As e Se (Elemental Scientific, Omaha, EUA). Para as análises de espectrometria de massas com ionização por paper spray, K_2HPO_4 10 mM foi adquirido da Neon (São Paulo, Brasil) Metanol grau HPLC da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA), ácido fórmico da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e papel cromatográfico 1 CHR da Whatman (Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido).

Os padrões das espécies inorgânicas de arsênio, arsenito de sódio (NaAsO_2) e dihidrogenoarsenato de sódio (NaH_2AsO_4), os padrões das espécies inorgânica de selênio, selenato de sódio (Na_2SeO_4) e selenito de sódio (Na_2SeO_3) e os padrões das espécies orgânicas de selênio, cloridrato de selenometionina (SeMet) e cloridrato de selenocistina (SeCys_2) foram provenientes da Sigma-Aldrich (Alemanha). Os padrões das espécies orgânicas de As, ácido dimetilarsínico [$(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{O})\text{OH}$] e dissódio metilarsenato hexahidratado ($\text{CH}_3\text{AsO}_3 \cdot 2\text{Na} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), foram da Chem Service (Estados Unidos). A partir destes sais foram preparadas soluções estoque individuais contendo 100 mg L⁻¹ de As e Se. Essas soluções estoque foram usadas nas análises realizadas por PS-MS.

3.3.3 Cultivo das plantas

As amostras foram cultivadas em vasos de 600 mL contendo solução nutritiva Hoagland 10% v v⁻¹ em uma estufa de crescimento (Figura 3.2) com parâmetros controlados (29 ± 2 °C, 12h escuro/12h claro, 830 lux e 52% de

umidade) por 15 dias. Em triplicata, as soluções dos vasos foram suplementadas com $0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de As^{V} + $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Se^{IV} e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de As^{V} + $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Se^{IV} . Além disso, foram cultivadas plantas controle. A troca da solução nutritiva e a suplementação com As^{V} e Se^{IV} foram realizadas a cada 3 dias. Após 15 dias de cultivo, as amostras foram submetidas ao preparo de amostra para análise elementar e metabólica por digestão assistida por micro-ondas e espectrometria de massas com ionização por paper spray (PS-MS), respectivamente.



Figura 3.2 – Estufa de crescimento com parâmetros controlados (temperatura, luminosidade e umidade) utilizada no cultivo das plantas.

3.3.4 Preparo das amostras para a determinação de As e Se por ICP-MS

Para determinação da concentração total de As e Se, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizadas por pelo menos 24 horas. Em seguida, 15 mg de raízes de plantas do mesmo tratamento foram submetidas à digestão assistida por micro-ondas utilizando 3,5 mL de HNO_3 concentrado sub-destillado mais 3,5 mL de H_2O e 1,0 mL de H_2O_2 30% v v⁻¹. O programa de forno de micro-ondas aplicado para digestão de amostras a 750 W e 20 bar foi constituído por 3 etapas: 10 minutos para atingir 180 °C, permanecendo

nesta temperatura por 20 min, seguidos por 10 minutos de resfriamento. O volume final da digestão foi completado para 30 mL com água ultrapura.

3.3.5 Preparo das amostras para a identificação dos metabólitos por PS-MS

Para a preparação do extrato, as raízes foram lavadas com água destilada e depois com solução de 10 mM, ambas geladas e deixadas em banho de gelo por 10 minutos. As amostras foram lavadas novamente com água destilada gelada e o excesso de água foi removido com papel de filtro. Em seguida, 50 mg de raiz foram trituradas suavemente em um gral com pistilo na presença de nitrogênio líquido e, em seguida, foram adicionados 2 mL de ácido fórmico 1% v v⁻¹. As amostras ficaram em repouso em banho de gelo por 30 minutos, no início e no final desse tempo elas foram sonicadas por 1 min em ultrassom com água e gelo. Em seguida, as amostras foram mantidas em caixa de isopor imersas em banho de gelo até o momento da leitura no PS-MS, que foi realizada em um tempo menor do que 30 minutos (Figura 3.3).

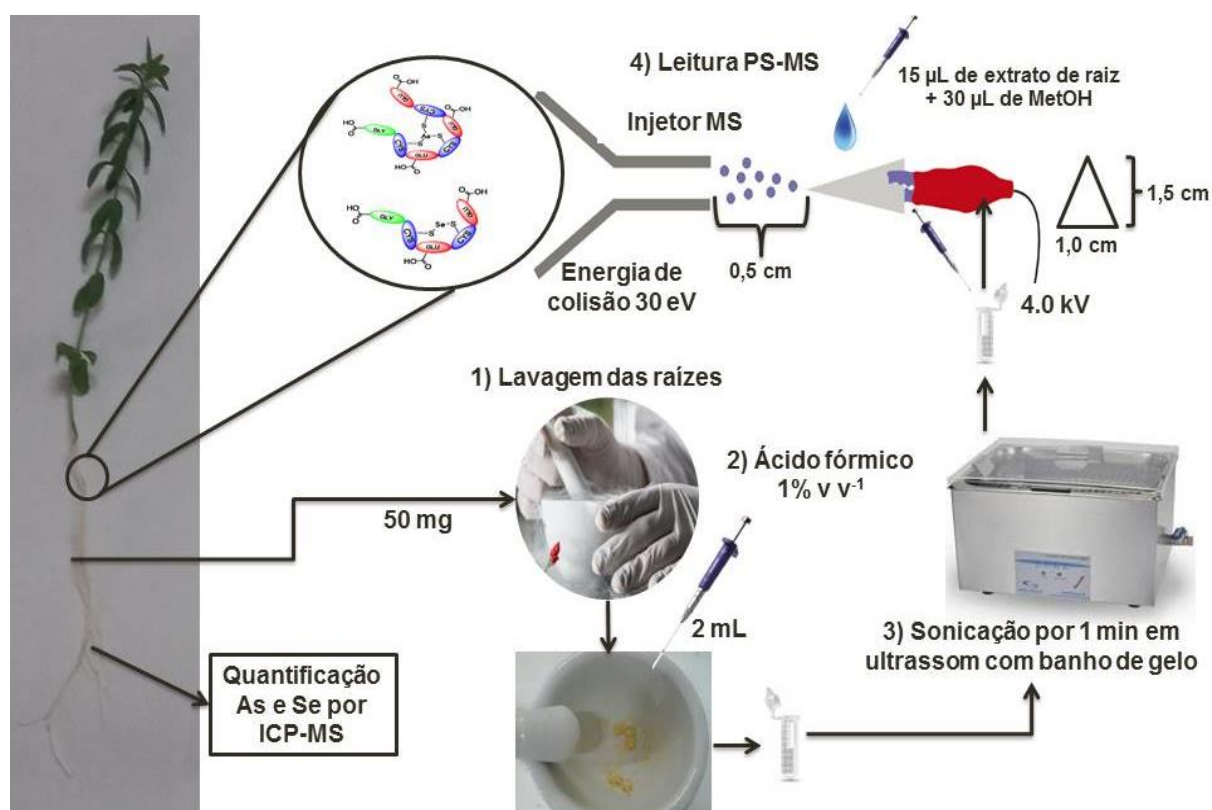


Figura 3.3 – Esquema do preparo de amostra e condições instrumentais para identificação dos metabólitos por PS-MS.

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Otimização para identificação dos metabólitos por PS-MS

O preparo de amostra para a extração dos compostos de interesse e os parâmetros instrumentais do PS-MS foram otimizados. A intensidade absoluta do íon m/z 308 [GSH]⁺ (glutathiona protonada) foi utilizado como resposta na otimização por ter sido maior entre os íons monitorados.

Na otimização do preparo da amostra foram avaliados, de forma multivariada, a massa de amostra (50, 100 e 150 mg), o volume do solvente extrator (1,0; 1,5 e 2,0 mL), % de metanol no solvente extrator (0, 25, 50%) e a utilização do vórtex ou ultrassom. As melhores respostas foram obtidas com 50 mg de amostra de raiz, 2,0 mL de solvente extrator (ácido fórmico 1%) sem metanol e sonicação em ultrassom por um minuto, conforme ilustrado na Figura 3.4. O preparo otimizado se assemelha ao utilizado por Munoz e colaboradores na determinação de complexos de As-PCs em *Chlorella vulgaris* [94].

Os parâmetros instrumentais otimizados foram energia de colisão e tamanho do triângulo. A energia de colisão que forneceu as melhores respostas foi de 30 eV para a faixa de massa de 100 a 900 m/z e de 35 eV para a faixa de 900 a 1100 m/z . Os compostos tiólicos com m/z acima de 800 necessitam de uma maior energia de colisão para fragmentação. Os complexos formados são mais estáveis nesses casos, pois ocorrem três ou mais ligações com o metal/metaloide. O tamanho do triângulo 1,5 cm de altura x 1,0 cm de base foi o mais adequado, pois possibilitou a adsorção da amostra e do solvente spray sem sair da posição ideal para análise. O ponta do papel triangular deve ficar em frente a entrada do espectrômetro de massas sem fazer curvas.

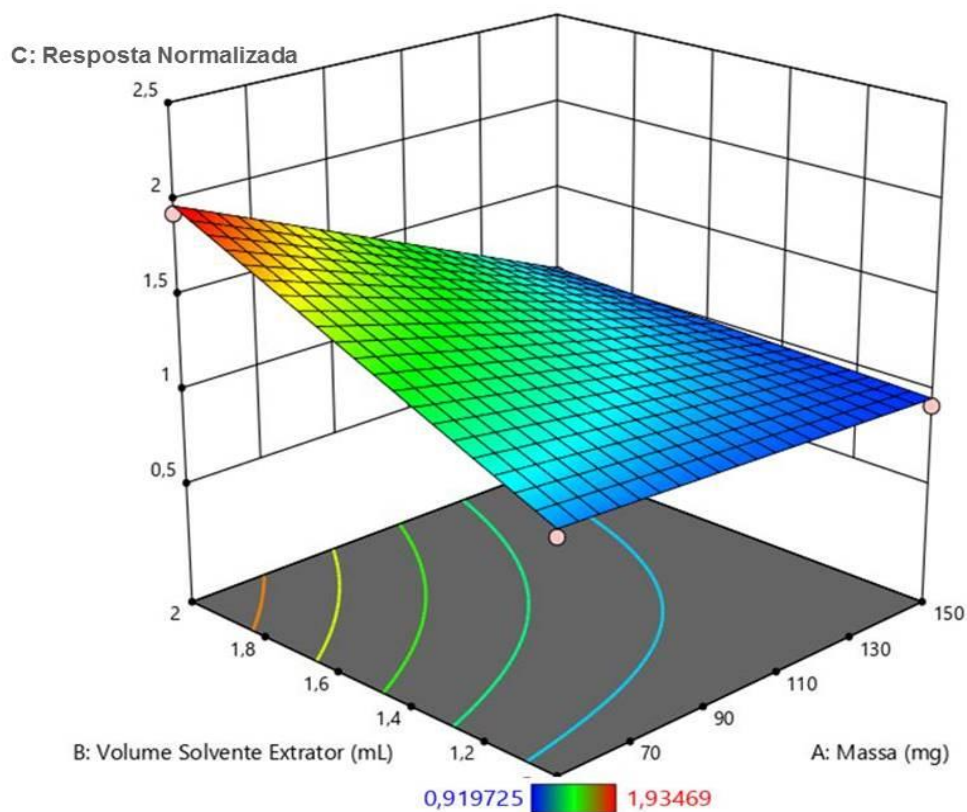


Figura 3.4 – Superfície de resposta para otimização multivariada do preparo de amostra para identificação de metabólitos por PS-MS. Planejamento fatorial 23 com ponto central.

3.4.2 Identificação de compostos de As e Se não complexados por PCs

A formação das PCs depende de qual espécie do íon metálico/metaloide está presente no meio [97]. Mesmo que a exposição das raízes seja feita com uma espécie do metal/metaloide ele pode ser convertido em outra ao ser absorvido pela planta. Assim, um estudo de especiação de As e Se se faz necessário para que se possa entender melhor os mecanismos de tolerância da planta para esses metaloides. Sabe-se que o As^{V} ao ser absorvido pelas raízes da planta é reduzido a As^{III} e uma pequena quantidade de espécies orgânicas, ácido monometilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA), também podem ser formadas [31]. No cultivo hidropônico, assim como no solo, as espécies inorgânicas de As são metiladas por bactérias e fungos e então transformadas em espécies orgânicas (MMA e DMA) [22]. Já o Se^{IV} é convertido a seleneto e forma compostos orgânicos como

selenocisteína (SeCys) e selenometionina (SeMet) de forma preferencialmente enzimática [38].

A especiação de As e Se utilizando DESI-MS foi realizada em trabalhos anteriores [54,92,98] e os resultados obtidos demonstraram que a espectrometria de massas com ionização ambiente pode ser utilizada para tal objetivo. Assim, a identificação de compostos inorgânicos e orgânicos de As e Se em raízes de plantas de linhaça dourada co-exposta a As^V e Se^{IV} foram feitas utilizando PS-MS. As espécies de As e Se analisadas, bem como os íons monitorados estão descritos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2- Espécies de As e Se analisadas por PS-MS/MS e seus respectivos íons *m/z* monitorados nas amostras de raízes de linhaça dourada.

Espécie	Fórmula Molecular	Massa Exata do íon (Da)	Massa observada <i>m/z</i> (modo)	Íon produto <i>m/z</i>	Atribuição
As ^{III}	H ₃ AsO ₃	126,93764	127(+)	109	[M+H] ⁺
As ^{III}	H ₃ AsO ₃	144,94820	145(+)	127, 109	[M+H ₃ O] ⁺
As ^V	H ₃ AsO ₄	142,93255	143(+)	125	[M+H] ⁺
As ^V	H ₃ AsO ₄	160,94312	161(+)	143	[M+H ₃ O] ⁺
DMA	(CH ₃) ₂ AsO(OH)	138,97402	139(+)	121	[M+H] ⁺
DMA	(CH ₃) ₂ AsO(OH)	156,98459	157(+)	139	[M+H ₃ O] ⁺
MMA	CH ₃ AsO(OH) ₂	140,95329	141(+)	123	[M+H] ⁺
MMA	CH ₃ AsO(OH) ₂	158,96385	159(+)	141	[M+H ₃ O] ⁺
Se ^{IV}	H ₂ SeO ₃ *	128,92550	129(+)	111	[M+H] ⁺
Se ^{VI}	H ₂ SeO ₄ *	144,92040	145(+)	127	[M+H] ⁺
SeMet	C ₅ H ₁₁ NO ₂ Se	198,00333	198(+)	180	[M+H] ⁺
SeCys ₂	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ Se ₂ *	333,90910	334(+)	316	[M+H] ⁺

* De acordo com a distribuição isotópica do selênio foram selecionados os íons contendo ⁷⁸Se que se apresentaram livre de interferências.

Para verificar o perfil de fragmentação de cada íon, soluções padrão das espécies de As e Se foram analisadas por PS- MS/MS. Para isso, 15 µL de solução padrão na concentração de 1,0 mg L⁻¹ preparada em ácido fórmico 1% v v⁻¹ foram adicionados no papel cromatográfico cortado em triângulo com adição imediata de 30,0 µL de metanol.

O espectro *ms/ms* do As^{III}, no modo positivo, demonstra a detecção dos cátions de *m/z* 127 (Figura 3.5a) [H₃AsO₃+H]⁺, que corresponde à molécula de As^{III}

protonada, e de m/z 145 (Figura 3.5b) $[\text{H}_3\text{AsO}_3 + \text{H}_3\text{O}]^+$, que corresponde ao aduto de água do As^{III} . Os íons de m/z 127 e m/z 145 possuem como fragmentos os íons de m/z 109 e m/z 127, respectivamente, os quais correspondem à perda de uma molécula de H_2O . A espécie As^{V} foi detectada como cátion $[\text{H}_3\text{AsO}_4 + \text{H}]^+$, de m/z 143, e como $[\text{H}_3\text{AsO}_4 + \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$, de m/z 161 (Figura 3.5c e d). Tais íons, de m/z 143 e m/z 161, dissociam, principalmente, pela perda de uma molécula de H_2O para produzir íons de m/z 125 e m/z 143, respectivamente.

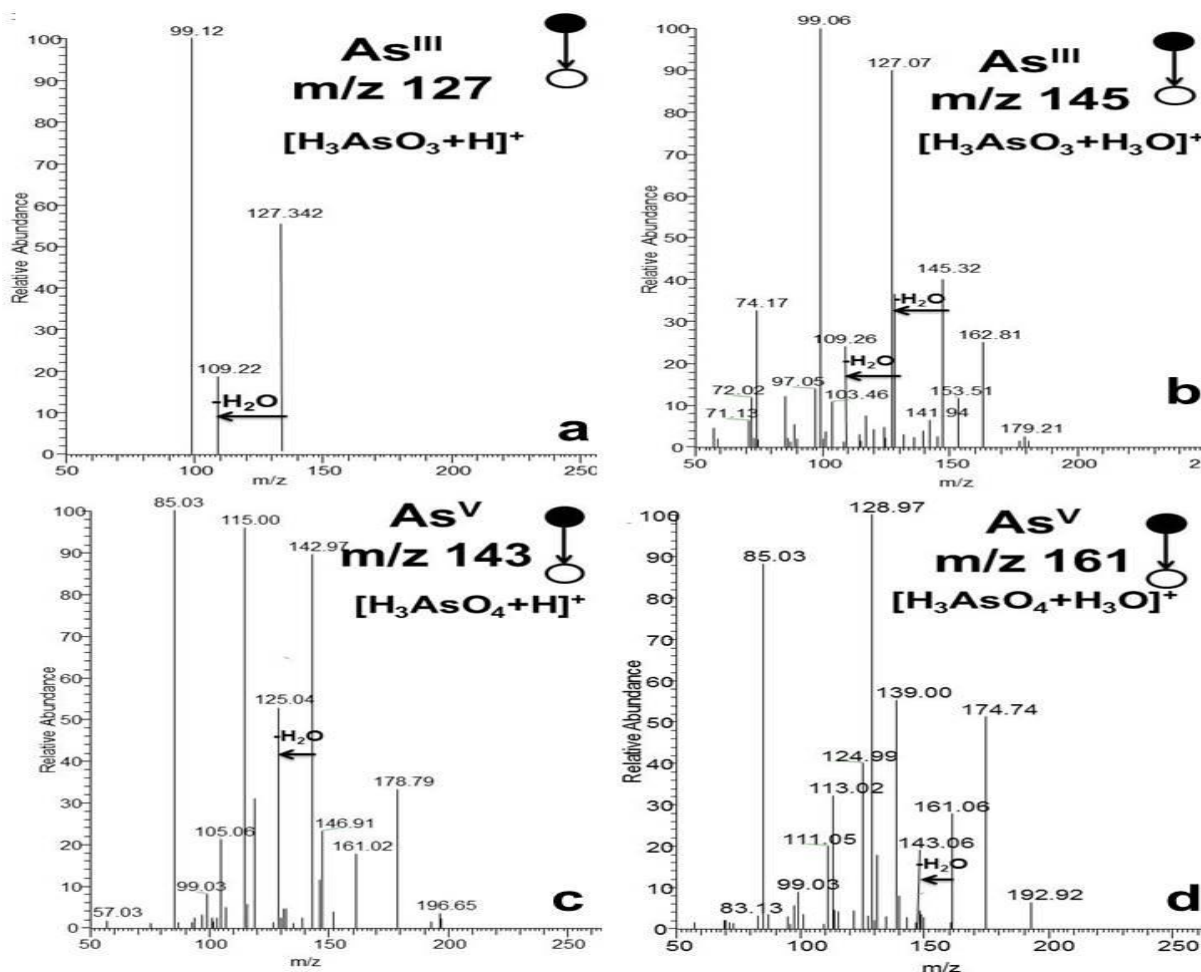


Figura 3.5 – PS(+)/MS/MS para os íons As^{III} a) m/z 127 e b) m/z 145; As^{V} c) m/z 143 e d) m/z 161. Os espectros de massas foram gerados a partir de solução padrão de NaAsO_2 e NaH_2AsO_4 (1 mg L^{-1}) depositada em papel cromatográfico.

A fragmentação do íon m/z 139 que corresponde ao DMA $[(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH}) + \text{H}]^+$ produz o íon de m/z 121 pela perda de uma molécula de H_2O para (Figura 3.6a). O aduto com a H_2O do DMA $[(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH}) + \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ o íon m/z 157 também perde uma molécula de H_2O e produz o íon m/z 139 (Figura 3.6b). O MMA $[\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2 + \text{H}]^+$ é identificado pelo íon m/z 141 (Figura 3.6c), e pelo seu

aduto com a água, m/z 159, $[\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2+\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (Figura 3.6d). Na fragmentação, ambos íons perdem uma molécula de H_2O e produzem os íons, m/z 123 e m/z 141, respectivamente. Esses resultados também foram encontrados por Abreu e colaboradores[99].

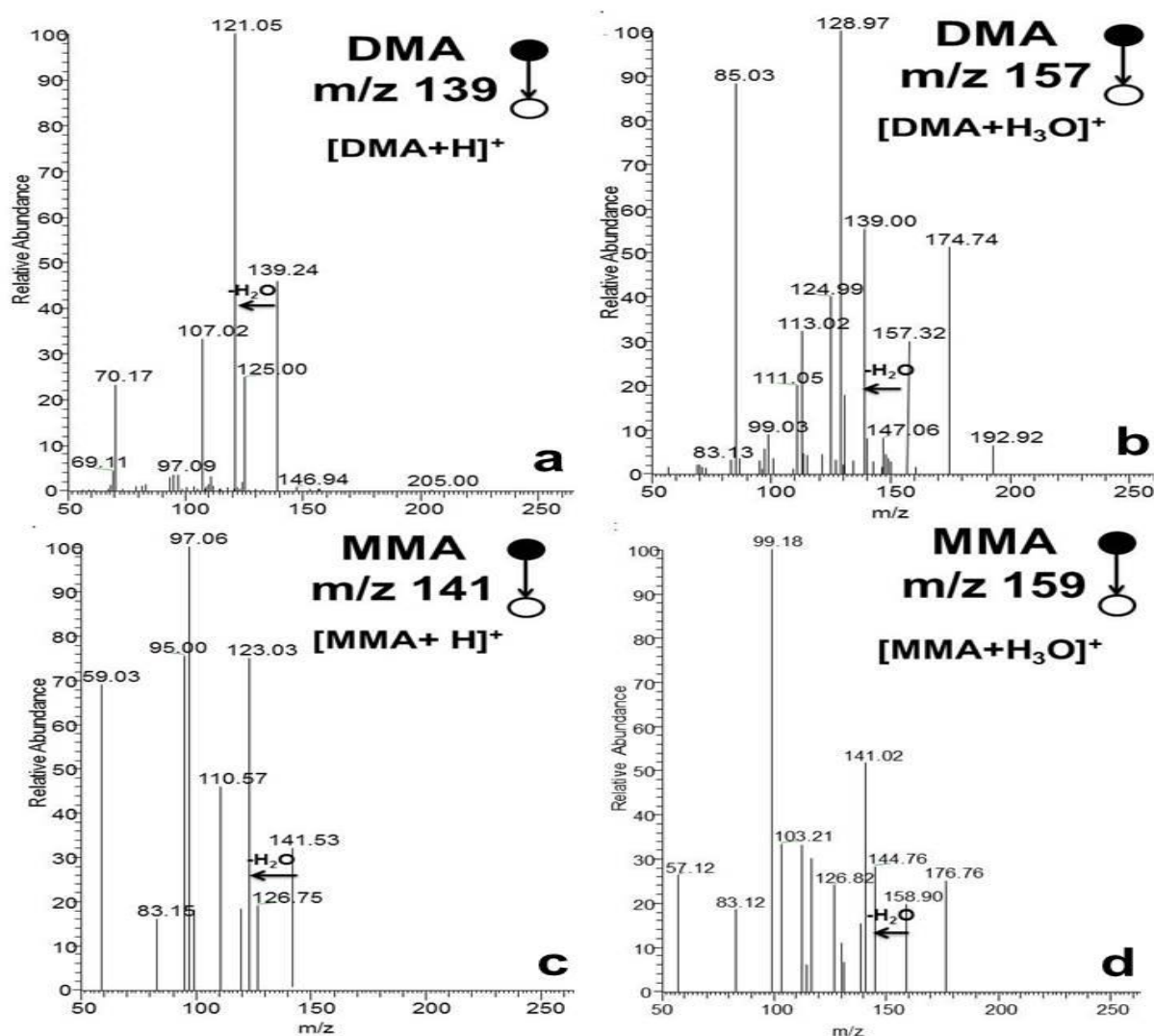


Figura 3.6 – PS(+)MS/MS para os íons DMA a) m/z 139 e b) m/z 157; MMA c) m/z 141 e d) m/z 159. Os espectros de massas foram gerados a partir de solução padrão ácido dimetilarsínico (DMA) e ácido monometilarsônico (MMA) (1 mg L^{-1}) depositada em papel cromatográfico.

O espectro *ms/ms* do Se^{IV} , no modo positivo, é caracterizado pelo íon m/z 129 $[\text{HSeO}_3+\text{H}]^+$ (Figura 3.7a) que corresponde a molécula de Se^{IV} protonada. Já o espectro *ms/ms* para o Se^{VI} é caracterizado pelo íon m/z 145 $[\text{HSeO}_4+\text{H}]^+$ (Figura 3.7b) que corresponde a molécula de Se^{VI} protonada. Os íons m/z 129 e m/z 145, possuem como fragmentos os íons m/z 111 e m/z 127, respectivamente, os quais correspondem à perda de uma molécula de H_2O . Os compostos orgânicos de Se,

selenometionina (SeMet) e selenocistina (SeCys₂) são detectados pelas formas protonadas m/z 198 [SeMet+H]⁺ (Figura 3.7c) e m/z 334 [SeCys₂+H]⁺ (Figura 3.7d). Os íons produto produzidos m/z 180 e m/z 316 são provenientes da perda de uma molécula de água.

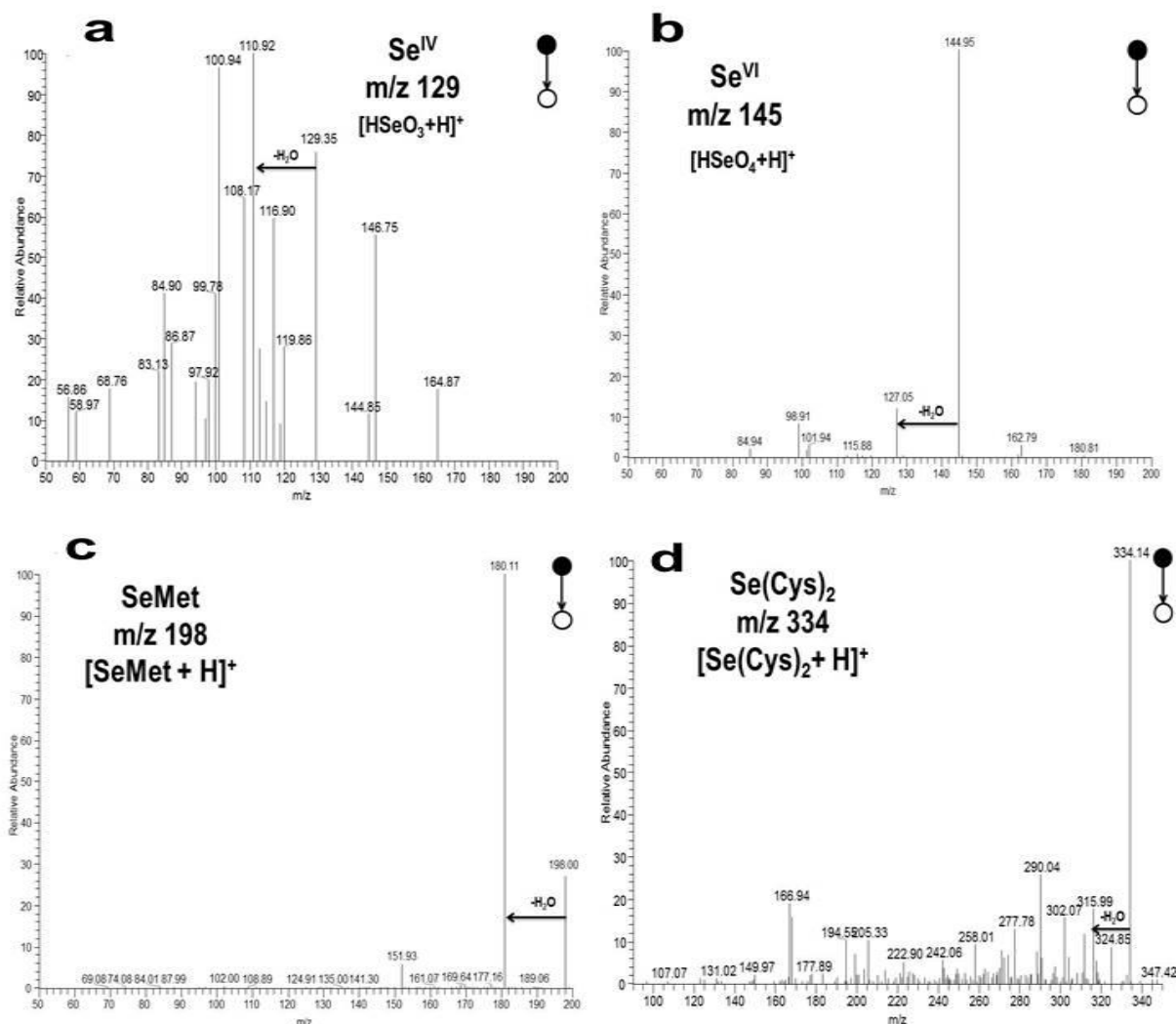


Figura 3.7 – PS(+)/MS/MS para os íons Se^{IV} a) m/z 129; Se^{IV} b) m/z 145; SeMet c) m/z 198 e Se(Cys)₂ d) m/z 334. Os espectros de massas foram gerados a partir de solução padrão de Na₂SeO₃, Na₂SeO₄, selenometionina (SeMet) e Selenocistina SeCys₂ (1 mg L⁻¹) depositada em papel cromatográfico.

Todos os padrões de As e Se analisados por PS-MS/MS apresentaram perfil de fragmentação que estão de acordo com outros estudos que utilizaram técnicas de ionização ambiente [54,98]. Nesse trabalho, priorizou-se a identificação e não a quantificação das espécies. No entanto, é possível desenvolver métodos para quantificação com limites de detecção e quantificação que se comparam a outros métodos de referência[99].

Com base no perfil de fragmentação dos padrões de As e Se é possível detectar e identificar as espécies não complexadas por PCs em extratos de raízes co-expostas a $\text{As}^{\text{V}} + \text{Se}^{\text{IV}}$. Os espectros PS-MS (modo *full scan*) obtidos no modo positivo para as amostras podem ser visualizados nas Figuras 3.7 e 3.8. A presença de íons diagnósticos (marcados em vermelho) para As^{III} (m/z 127 e m/z 145), As^{V} (m/z 143 e m/z 161), DMA (m/z 139 e m/z 157), MMA (m/z 141 e m/z 159), Se^{IV} (m/z 129), Se^{VI} (m/z 145) e SeMet (m/z 198) podem ser observados. O íon referente a espécie SeCys₂ (m/z 334) não foi detectada nas amostras e por isso a faixa de massa dos espectros foram reduzidas de 100 a 200 m/z para melhor visualização.

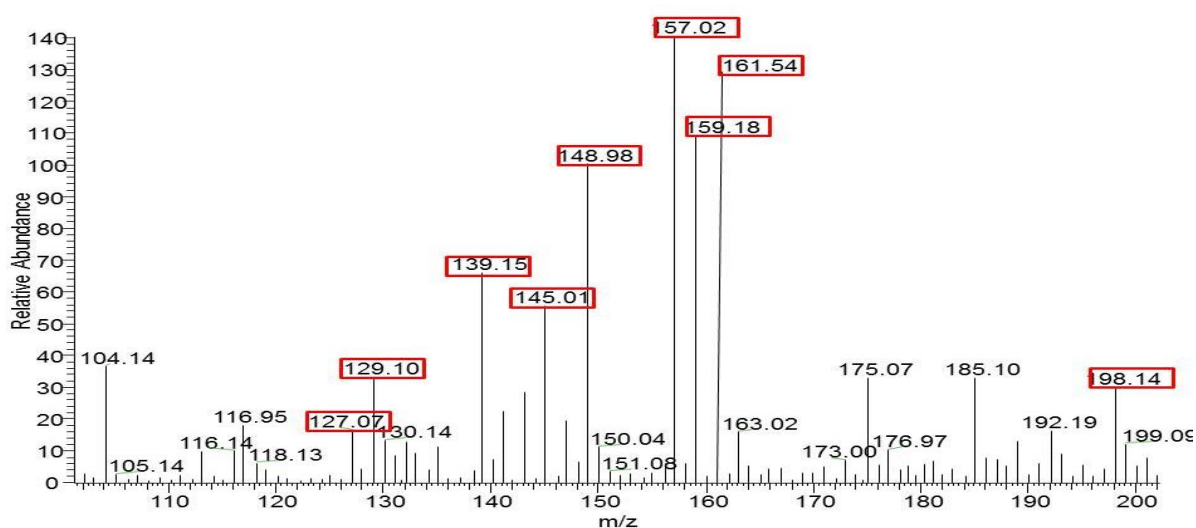


Figura 3.8 – Espectro PS-MS(+) do extrato das raízes co-expostas a As^{V} 50 μM + Se^{IV} 5 μM . As intensidades dos íons marcados foram ampliadas em 10 vezes para melhor visualização.

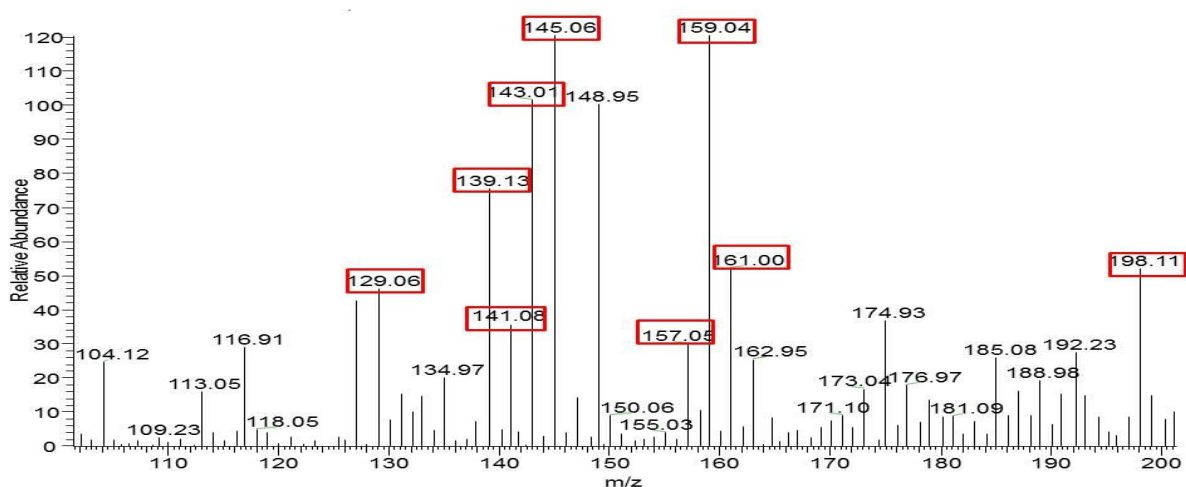


Figura 3.9 – Espectro PS-MS(+) do extrato das raízes co-expostas a As^{V} 50 μM + Se^{IV} 25 μM . As intensidades dos íons marcados foram ampliadas em 10 vezes para melhor visualização.

Em ambas as amostras co-expostas, foi possível identificar as espécies As^{III} (m/z 145), As^{V} (m/z 161), DMA (m/z 139) e MMA (m/z 159), uma vez que o perfil de fragmentação desses íons (Figura 3.9 e 3.10) foram iguais aos dos padrões analisados. O íon m/z 145 identificado nas amostras pode corresponder ao As^{III} ($[\text{H}_3\text{AsO}_3+\text{H}_3\text{O}]^+$) e ao Se^{VI} ($[\text{HSeO}_4+\text{H}]^+$), no entanto pelo perfil de fragmentação (perda de duas moléculas de água) é possível confirmar que o íon corresponde ao As^{III} . Os íons correspondentes as espécies de Se não apresentaram perfil de fragmentação correspondentes aos padrões com a perda de uma molécula de água e por isso os espectros não foram apresentados.

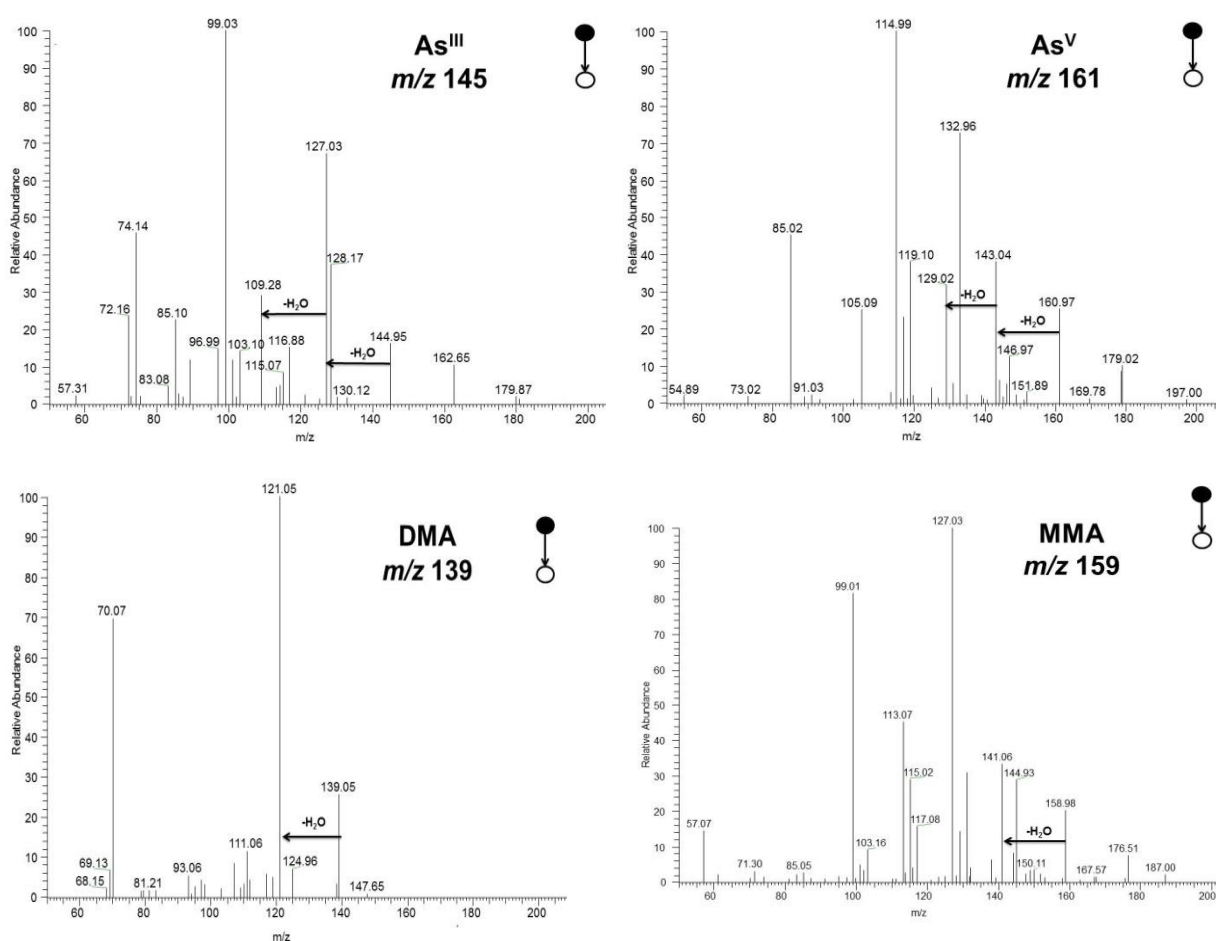


Figura 3.10 – Espectro PS-MS/MS(+) do extrato das raízes co-expostas a As^{V} 50 μM + Se^{IV} 5 μM .

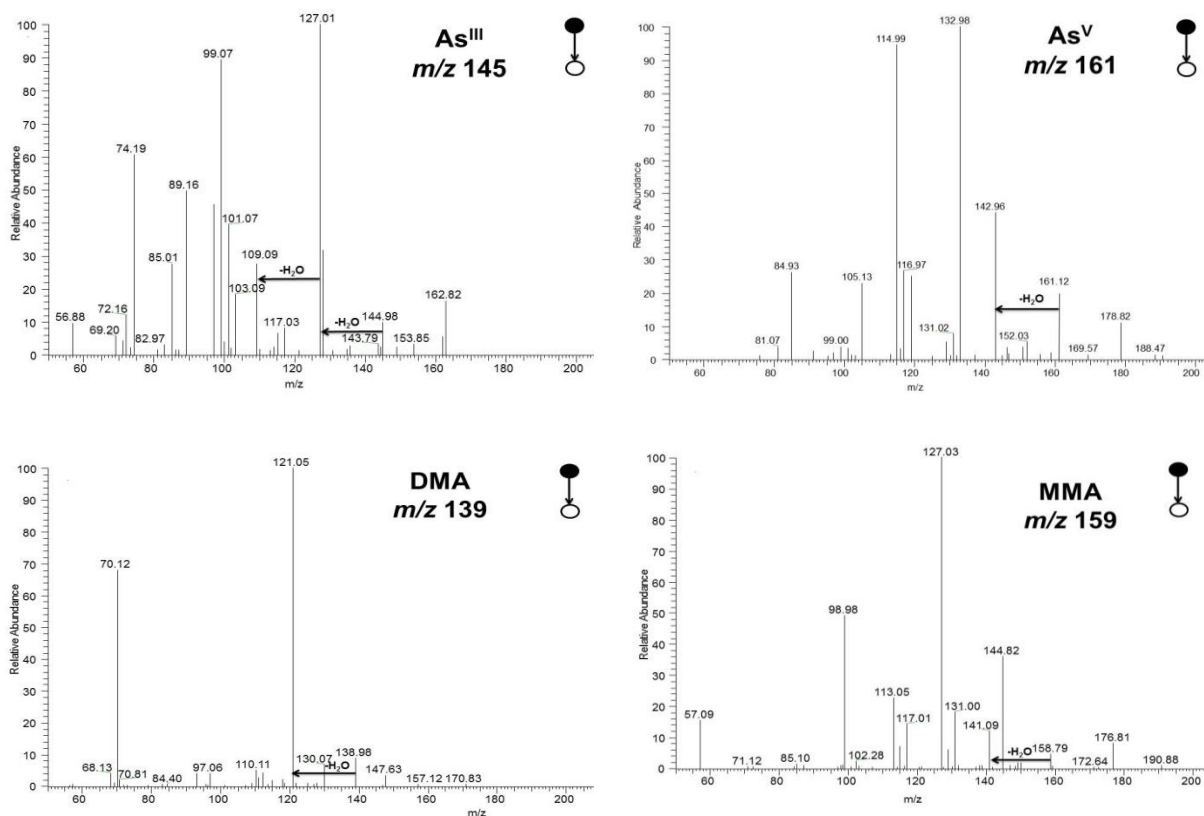


Figura 3.11 – Espectro PS-MS/MS(+) do extrato das raízes co-expostas a As^V 50 μ M + Se^{IV} 25 μ M.

A identificação das espécies inorgânicas (As^{III} e As^V) e orgânicas (DMA e MMA) nos extratos de raízes comprovam o metabolismo proposto para As em plantas[100]. Ao ser absorvido, o As inorgânico é transformado nas espécies orgânicas em pequenas quantidades[25]. E mesmo em baixas concentração essas espécies foram identificadas por PS-MS/MS. Diferentemente do As, grande parte do Se inorgânico absorvido pelas raízes da planta é transformado em espécies orgânicas pela sua incorporação em aminoácidos e proteínas contendo enxofre[36]. E esse pode ser um dos motivos pelo qual não foi possível identificar espécies de Se inorgânico e nem as espécies orgânicas consideradas de baixo peso molecular (SeMet e SeCys₂). Além disso, a concentração de Se na co-exposição foi menor em relação a concentração de As.

Dentre as espécies inorgânicas de As a formação das PCs ocorre preferencialmente com As^{III}, no entanto essa é a espécie mais tóxica para planta e menos encontrada no solo. Assim, optou-se pela co-exposição das plantas com As^V. Porém, neste estudo na forma hidropônica, pode-se observar a redução das

espécies de As^V a As^{III}. Nesse sentido a especiação de As e Se foi importante para a confirmação de quais espécies estão disponíveis para a formação de PCs.

3.4.3 Identificação da glutatona, fitoquelatinas e metabólitos por PS-MS

Inicialmente, as análises foram feitas no modo varredura completa em uma faixa de massa de 100 a 1100 *m/z*. Foi possível realizar a identificação somente no modo positivo, pois no modo negativo formou-se uma corrente que não é recomendada, podendo causar danos ao equipamento. Para aumentar a quantidade de íons a serem fragmentados, as análises de identificação foram divididas em intervalos de 200 *m/z*.

A identificação de compostos tiólicos como as fitoquelatinas tem sido feita por técnicas analíticas de alto custo, de difícil operação e com grande consumo de solventes [3,43,94]. A identificação de PCs por PS-MS apresenta diversas vantagens como: baixo custo, fácil operação e menor tempo de análise. A utilização de um papel cromatográfico permite a retenção de diversos interferentes substituindo em partes uma coluna cromatográfica. As identificações foram feitas pela comparação dos espectros de fragmentação *ms/ms* obtidos com os espectros ESI-MS da literatura. Além disso, os mecanismos de fragmentação auxiliaram na identificação dos íons (Tabela 3.3).

Foram monitorados 27 compostos tiólicos de As, Se, GSH e PCs. Dentre esses íons foi possível a identificação dos compostos GSH, PC₂-reduzido, PC₃-reduzido, Se^{II}PC₂ e As^{III}PC₃. A GSH foi distinguida das outras espécies pelo seu *m/z* 308. Ao fragmentar esse íon tem-se a formação dos íons produtos *m/z* 233, que corresponde a perda de uma Gly (-75), e *m/z* 179, que corresponde a perda de um Glu(-129). Além disso, o íon produto *m/z* 179 perde uma molécula de água e produz o íon *m/z* 162 (Fig. 3.9a). A PC₂ na sua forma reduzida possui *m/z* 540 e o espectro de fragmentação (Fig. 3.9b) produz o íon *m/z* 411 pela perda de um Glu(-129). O íon *m/z* 411 perde uma Cys(-103) e forma o íon *m/z* 308, que é a GSH e que segue a mesma fragmentação da Fig. 3.9a. A PC₃ na sua forma reduzida possui *m/z* 772 e a sua fragmentação (Fig. 3.9c) forma os íons produtos *m/z* 643 pela perda de um Glu(-129). O íon *m/z* 643 perde uma Cys(-103) e forma o íon *m/z* 540 que corresponde a PC₂. O íon *m/z* 540 perde um Glu(-129) e forma o íon *m/z* 411 que também se fragmenta perdendo uma Cys(-103) e uma Gly(-75), formando o íon *m/z* 233.

Tabela 3.3 – Fragmentos esperados para GSH, PCs e metabólitos em amostras de plantas[95].

PC	<i>m/z</i>	Fórmula	Fragmentos Esperados	<i>m/z</i>	Perda	Diferença <i>m/z</i>
GSH	308	γ -Glu-Cys-Gly	GluCys-H ⁺	233	-Gly	75
			CysGly-H ⁺	179	-Glu	129
			CysGly(-H ₂ O) ⁺	162	-Glu-H ₂ O	146
			Glu-H ⁺	130	-CysGly	178
red-PC₂	540	γ -(GluCys) ₂ Gly	(GluCys)(GluCys)-H ⁺	465	-Gly	75
			Cys(GluCys)Gly-H ⁺	411	-Glu	129
			(GluCys)Gly-H ⁺	308	-GluCys	232
			GluCys-H ⁺	233	-(GluCys)Gly	307
			CysGly-H ⁺	179	-(GluCys)Glu	361
SePC₂	618	γ -(GluCys) ₂ SeGly	(GluCys) ₂ SeGly(-H ₂ O) ⁺	600	-H ₂ O	18
			Cys(GluCys)SeGly	489	-Glu	129
			Cys(GluCys)Se	414	-GluGly	204
red-PC₃	772	γ -(GluCys) ₃ Gly	Cys(GluCys) ₂ Gly-H ⁺	643	-Glu	129
			(GluCys) ₂ Gly-H ⁺	540	-GluCys	232
			Cys(GluCys)Gly-H ⁺	411	-(GluCys)Glu	361
			GluCys-H ⁺	233	-(GluCys) ₂ Gly	539
As-PC₃	844	γ -(GluCys) ₃ AsGly	(GluCys) ₃ AsGly(-H ₂ O) ⁺	826	-H ₂ O	18
			Cys(GluCys) ₂ AsGly	715	-Glu	129
			(GluCys) ₂ AsGly-H ⁺	612	-GluCys	232
			Cys(GluCys)AsGly-H ⁺	483	-(GluCys)Glu	361

Na Figura 3.11 podemos notar que nas fragmentações *ms/ms* da GSH; PC₂; e PC₃ ocorreu a formação do íon produto característico de identificação desses compostos (*m/z* 233) [96]. Para os complexos Se^{II}PC₂ e As^{III}PC₃ fragmentações *ms/ms* não produziu esse íon de identificação (Figura 3.12), para isso a energia de colisão usada teria que ser maior. No entanto, o aumento da energia de colisão ocasionou a fragmentação completa da molécula protonada ([M+H]⁺) em fragmentos de menor *m/z* e isso dificultou a identificação dos compostos.

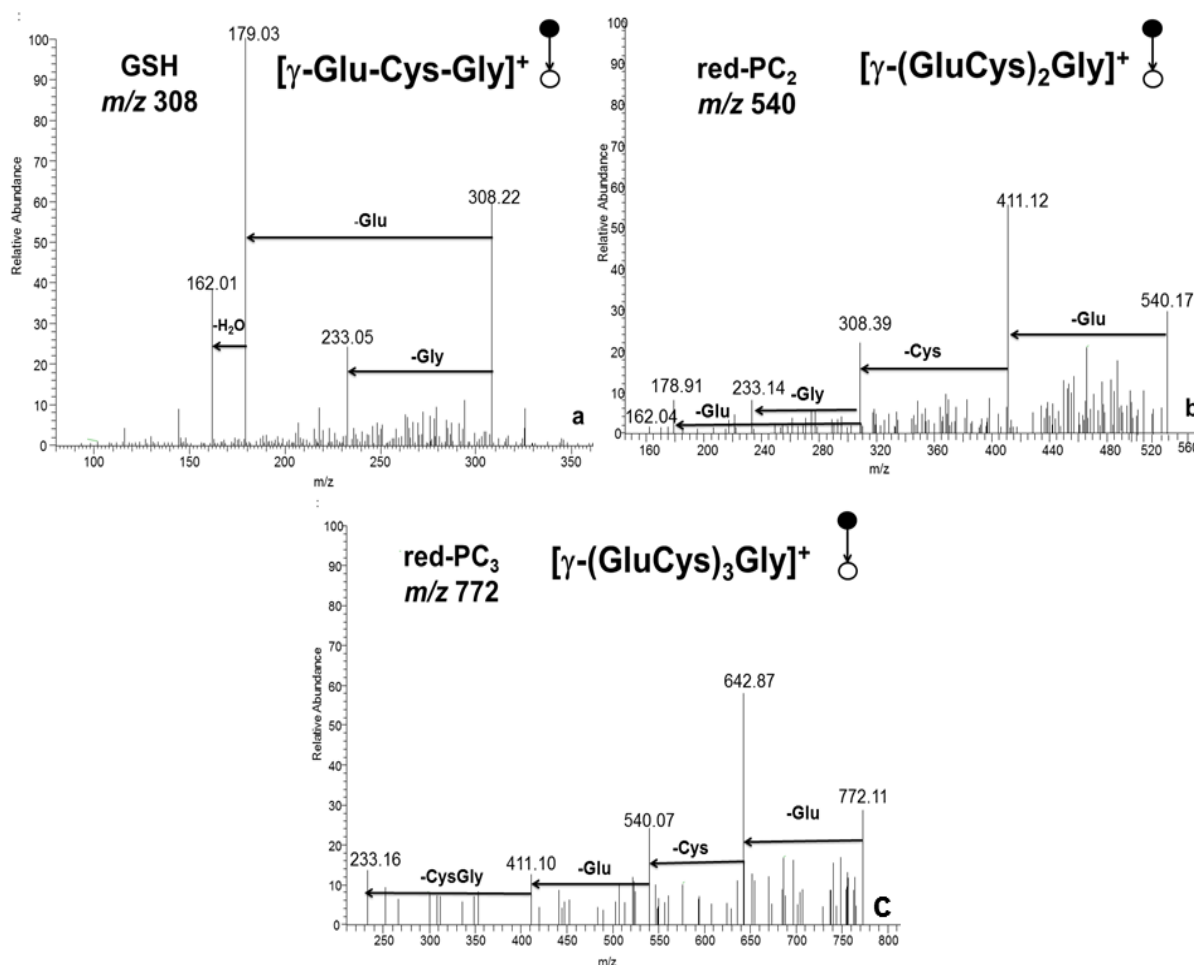


Figura 3.12 – PS(+)-MS/MS espectros a) GSH [γ-Glu-Cys-Gly]⁺ *m/z* 308; b) red-PC₂ [γ-(GluCys)₂Gly]⁺ *m/z* 540; c) red-PC₃ [γ-(GluCys)₃Gly]⁺ *m/z* 772.

Os complexos formados de PCs com As e Se também foram identificados pelos espectros de fragmentação característicos. O complexo Se^{II}PC₂ é distinguido das outras espécies pelo seu *m/z* 618. O espectro de fragmentação do Se^{II}PC₂ (Figura 3.12a) apresenta a formação do íon produto *m/z* 600 após a perda de uma molécula de água (-18) e do íon produto *m/z* 413

formado pela perda de uma Gly(-75) e um Glu(-129). O espectro de fragmentação do complexo $\text{As}^{\text{III}}\text{PC}_3$ de m/z 844 (Figura 3.12b) demonstra a formação dos íons produtos m/z 715 pela perda de um Glu(-129), m/z 612 pela perda de um Glu(-129) e uma Cys(-103) e o íon m/z 483 pela perda de um Glu(-129) adicional.

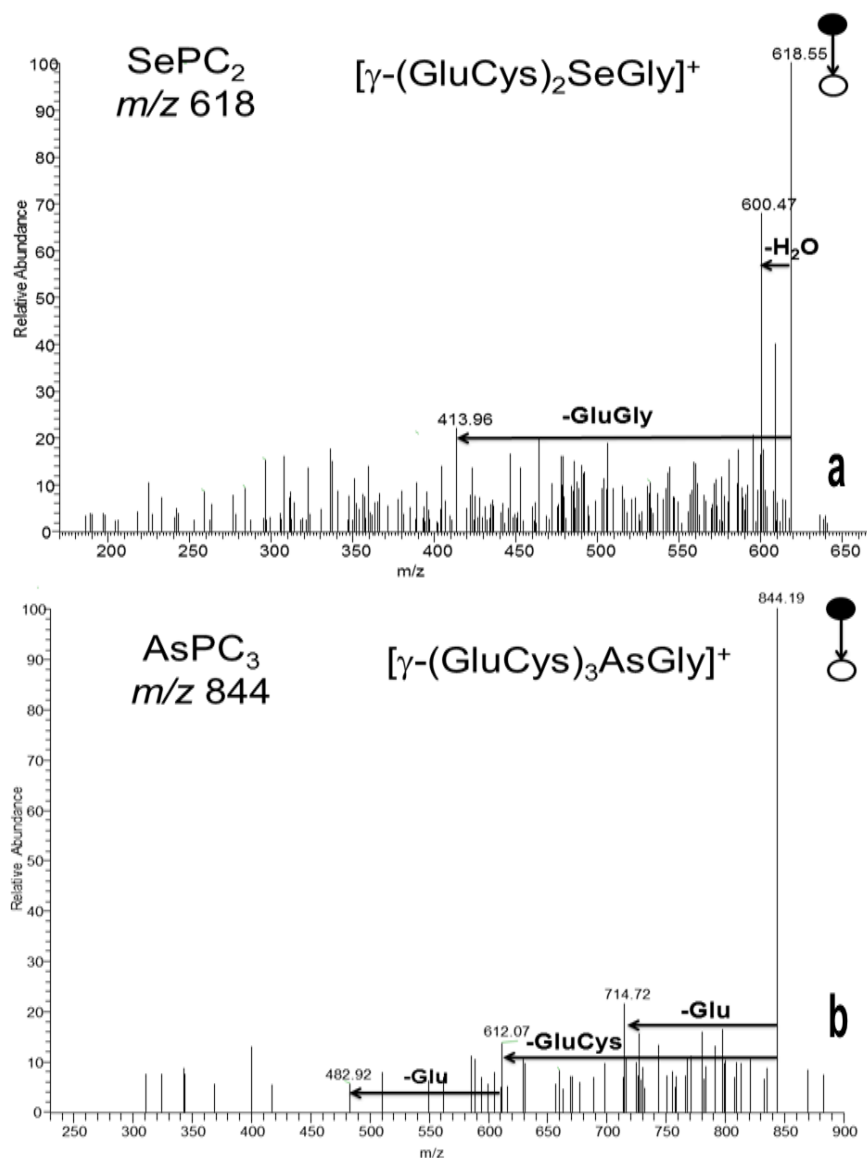


Figura 3.13 – PS(+)-MS/MS espectros a) SePC_2 $[\gamma-(\text{GluCys})_2\text{SeGly}]^+$ m/z 618; b) $-\text{AsPC}_3$ $[\gamma-(\text{GluCys})_3\text{AsGly}]^+$ m/z 844.

Em função dos cálculos realizados no capítulo 2 para o índice de tolerância da raiz (IRT%), definiu-se para as plantas de linhaça dourada a concentração que inibiu 50% do crescimento das raízes (EC_{50}) quando expostas isoladamente ao As^{V} e ao Se^{IV} ou quando co-expostas aos dois. Assim, as

concentrações de co-exposição para esse estudo foram definidas de acordo com o EC₅₀ determinado. Para o As^V, o EC₅₀ foi de aproximadamente 50 µM e para o Se^{IV} 25 µM. Foi observado também que a concentração de 5 µM de Se^{IV} reduziu a toxicidade do As^V (capítulo 2). Supõem-se, com base nos resultados obtidos, que a formação das PCs pode explicar este comportamento uma vez que o As pode competir por grupos tiólicos com Se. Assim, as plantas também foram co-expostas às concentrações de 50 µM de As^V e 5 µM de Se^{IV}.

A Tabela 3.4 apresenta as concentrações totais de As e Se nas raízes das plantas obtidas por ICP-MS. Observa-se uma diminuição da absorção de As nas raízes com o aumento da concentração de co-exposição ao Se^{IV}. Essa diminuição pode ser explicada por uma possível competição do Se com o As pelos sítios de ligação (-SH) das PCs [43]. Além disso, o Se pode se beneficiar do aumento da síntese de GSH ativada pelo As para produzir outros compostos tiólicos[3].

Tabela 3.4 – Concentração de As e Se (mg kg⁻¹) em amostras de raízes de linhaça dourada determinada por ICP-MS (n=3)

Amostra	Concentração (mg kg ⁻¹)	
	As	Se
Controle	< LQ*	< LQ*
As ^V 50 µM + Se ^{IV} 5 µM	1146 ± 92	302 ± 20
As ^V 50 µM + Se ^{IV} 25 µM	881 ± 46	665 ± 30

*Menor que limite de quantificação (LQ) do método apresentado no capítulo 2.

Os compostos identificados nos extratos das raízes das plantas controle e nas co-expostas são apresentados na Tabela 3.5. As referências da literatura citadas na Tabela 3.5 foram empregadas para auxiliar na confirmação dos compostos elucidados neste trabalho. Os espectros das amostras com mais íons identificados podem ser observados nas Figuras 3.11 e 3.12 e os demais no apêndice B. Nas amostras de planta controle, o único íon encontrado foi de GSH (Figura 3.11a). Nas amostras onde foram realizadas as co-exposições, além da GSH foram identificados a red-PC₂, red-PC₃, Se^{II}PC₂ e As^{III}PC₃. A

síntese de PCs é ativada se a planta passa por um estresse [101] e as plantas controle foram privadas dessa situação. Nas plantas co-expostas, a formação de PCs e de compostos de As e Se demonstram que a planta ativou a síntese de PCs como um mecanismo de tolerância. Este fato é um indício que as concentrações avaliadas dos metaloides causaram danos as plantas. O método proposto para identificação de PCs e seus derivados por PS-MS foi empregado com sucesso para as plantas da linhaça dourada contaminadas por As e Se. Cabe ressaltar que não foi encontrado na literatura nenhum trabalho descrevendo a utilização do PS-MS para identificação de fitoquelatinas.

Tabela 3.5 - Compostos tiólicos identificados em amostras de raízes de linhaça dourada co-expostas a As e Se.

Identificação	m/z	Fragmentos Confirmados			Referências
		Controle	As ^V 50 µM + Se ^{IV} 5 µM	As ^V 50 µM + Se ^{IV} 25 µM	
GSH	308	162, 179, 233	162, 179, 233	162, 179, 233	[96][95]
red-PC ₂	540	-	179, 411, 465	233, 308	[96][95]
SePC ₂	618	-	489, 600	414, 600	[3,43,94]
red-PC ₃	772	-	233, 540, 643	233, 411, 540, 643	[96][95]
AsPC ₃	844	-	483, 612, 715	612, 715	[3,43,94]

As alterações nos mecanismos de formação de PCs não foram totalmente elucidadas nesse estudo. A diminuição de absorção de As quando se aumenta a concentração de Se^{IV} na co-exposição não apresentou uma variação significativa e em ambos os tratamentos foi possível identificar Se^{II}PC₂ e As^{III}PC₃. Fatai e colaboradores[3] investigaram a competição de As e Se pelas PCs em *Arabidopsis thaliana* e verificaram que o complexo Se^{II}PC₂ se forma apenas na presença do As. No estudo citado foi proposto que o Se aumenta a síntese de GSH e a planta se beneficia disso para aumentar a síntese de PCs, que são utilizadas para a desintoxicação do As. Isso explica o fato do Se, em baixas concentrações, diminuir a toxicidade do As em plantas.

Bluemlein e colaboradores[43] sugeriram que o complexo Se^{II}PC₂ se forma *in situ* durante o procedimento de extração, uma vez que a moagem das raízes com nitrogênio líquido deixa os compartimentos celulares expostos. No

entanto, a formação de outros complexos de Se (SeCysSerGSH) explica a redução de grupos -SH livres disponíveis para complexar o As.

A exposição de plantas ao As para investigação da formação de PCs tem sido bastante relatada[48,94,102–104]. Os trabalhos que utilizaram a técnica HPLC-ICP-MS/ESI-MS conseguiram a identificação de diversos complexos de As com GSH e PCs. Os complexos identificados nesses estudos contribuem para o entendimento dos mecanismos de tolerância das plantas ao As. No entanto, a técnica possui alto custo e por isso a identificação apenas do complexo $As^{III}PC_3$ por PS-MS pode ser utilizada para monitorar a contaminação por As em plantas e preceder estudos mais elaborados.

A identificação de compostos inorgânicos (As^{III} e As^V) e orgânicos (MMA e DMA) de As nos extratos das raízes de plantas co-expostas possibilitou uma melhor compreensão do mecanismo de absorção do As pela planta de linhaça dourada. Além disso, o estudo de especiação mostrou quais espécies de As inorgânico estão disponíveis para formação de PCs. Na co-exposição, a espécie utilizada foi o As^V , mas parte dele foi reduzido e a formação das PCs ocorreu com o As^{III} . Não foi identificado nenhum complexo de PCs com As^V , o que já era esperado uma vez que esses compostos não são estáveis[97]. Nos extratos de raízes de plantas controle foi identificado apenas GSH e isso mostra que essas plantas não sofreram nenhum tipo de estresse agressivo, pois não ativou a síntese de PCs. Foram identificados GSH, red- PC_2 , red- PC_3 , $Se^{II}PC_2$ e $As^{III}PC_3$ nas raízes das plantas co-expostas. Com base nisso pode-se dizer que em ambas as concentrações de co-exposição, o As^V e o Se^{IV} estão causando danos na plantas e uma forma de compensar isso é a ativação da síntese de PCs como mecanismo de tolerância.

3.5 Conclusão

A técnica PS-MS foi empregada com sucesso para identificação de As^{III} , As^{V} , DMA, MMA GSH, red-PC₂, red-PC₃, $\text{Se}^{\text{II}}\text{PC}_2$ e $\text{As}^{\text{III}}\text{PC}_3$ em amostras de raízes de linhaça dourada, uma vez que espectros (*ms/ms*) característicos destes compostos foram obtidos. Por ser uma técnica simples e de baixo custo, PS-MS pode ser utilizada no monitoramento de contaminação de plantas por As e Se e em análises preliminares de estudos sobre o mecanismo de tolerância de plantas a metais e metaloides tóxicos.

A relação da menor toxicidade do As^{V} na presença de Se^{IV} em baixas concentrações ainda precisa ser melhor estudada, não podendo ser diretamente associada à competição entre As e Se pelas PCs, uma vez que, neste trabalho foi verificado que em ambas concentrações de co-exposição, ocorreu a formação de $\text{Se}^{\text{II}}\text{PC}_2$ e $\text{As}^{\text{III}}\text{PC}_3$. Dessa forma, acredita-se que seja necessário a investigação da formação de outros complexos tiólicos de Se, que não foram identificados neste estudo por PS-MS, para uma afirmação conclusiva.

CAPÍTULO 4 – TOXICOMETABÔLÔMICA EM PLANTAS DE LINHAÇA DOURADA EXPOSTAS E CO-EXPOSTAS A ARSENATO E SELENITO POR DESI-MSI

4.1 Introdução

Quando as plantas são expostas a metais e metaloides tóxicos como arsênio, estabelecem-se diversos mecanismos de tolerância afim de minimizar os danos causados[105,106]. Esses mecanismos podem alterar o metabolismo convencional e formar novos metabólitos, além de aumentar ou diminuir metabólitos já existentes. Os novos metabólitos formados podem conter o metal/metalóide ou podem simplesmente formar novos produtos, devido as reações ativadas pelo estresse gerado. Esses metabólitos são de grande interesse, uma vez que eles podem funcionar como indicadores de contaminação.

A toxicometabolômica é a ciência “ômica” que usa a metabômica em toxicologia[107]. Trata dos fatores que afetam o metabolismo de um organismo quando esse é exposto a um ou vários xenobióticos [108]. Dentre os xenobióticos investigados, os metais/metaloides tóxicos são de grande importância uma vez que eles podem ocasionar danos irreparáveis a saúde dos seres vivos. O As é um elemento tóxico que causa grandes impactos na saúde humana, sendo associado a contaminação da água e do solo em diversas regiões do mundo[100]. O selênio é um elemento essencial para humanos e animais, mas não para as plantas [6], porém quando absorvido em quantidades acima do recomendado, torna-se tóxico.

Em estudos de toxicometabolômica são necessárias técnicas analíticas capazes de identificar metabólitos em baixas concentrações, como a HPLC [107], que demanda um elaborado preparo de amostra para extração prévia dos compostos de interesse e o uso de grande quantidade de solventes, não permitindo a obtenção da distribuição espacial dos metabólitos nas plantas. Já a técnica DESI-MSI permite gerar uma imagem por espectrometria de massas com mínimo preparo de amostra, alta sensibilidade e especificidade molecular[10].

DESI-MSI foi desenvolvida por Cooks e colaboradores[61]. Essa técnica permite a obtenção de imagens químicas da amostra em seu estado natural ou pela transferência dos analitos para uma superfície plana (*imprint*). A amostra ou o *imprint* são ajustados em uma plataforma móvel automatizada que se movimenta nas direções cartesianas X e Y. Um spray de gotículas carregadas atinge a amostra em movimento e promove a dessorção e ionização dos analitos na superfície da amostra. Esses analitos são direcionados para a entrada do espectrômetro de massas pelo fluxo do spray [60]. Uma das poucas desvantagens da técnica DESI-MSI para análises de tecidos vegetais é que ela permite apenas a identificação de metabólitos em células epidérmicas [109], por ter um modo de ionização considerado brando.

Muitos trabalhos já utilizaram a técnica DESI-MSI para investigar o perfil de metabólitos em tecidos vegetais [11,68,69,91]. A imagem gerada por espectrometria de massas pode ser utilizada como ferramenta para auxiliar o entendimento do papel fisiológico e o destino de metabólitos durante o crescimento e desenvolvimento das plantas e nas reações de defesa ao estresse externo, sofrido por metais/metaloides. Por exemplo, estudos usaram DESI-MSI no monitoramento das alterações causadas por metabólitos da batata quando invadida por patógenos [10] e na distribuição dos metabólitos em folhas, flores e pétalas de várias espécies de plantas [12]. No entanto, não foi encontrado nenhum estudo que fizesse a avaliação do perfil metabolômico de plantas submetidas à exposição e co-exposição a metais/metaloides tóxicos.

As plantas expostas ao As, mesmo em baixa concentração, sofrem alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. As espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas durante a exposição ao As são perigosas para o metabolismo da planta, pois são capazes de danificar macromoléculas como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos [100]. Já o Se pode atuar como um antioxidante, diminuindo os danos causados pelos metais/metaloides tóxicos, quando presente em baixas concentrações[3].

Esse trabalho teve como objetivo a identificação das alterações no metabolismo da planta de linhaça dourada após exposição e co-exposição a arsenato e selenito. Buscou-se também como objetivo a elucidação e entendimento das alterações fisiológicas causadas pelos metaloides à planta.

4.2 Objetivo

O estudo desenvolvido neste capítulo buscou a identificar da distribuição espacial dos metabólitos formados após exposição e co-exposição das plantas de linhaça dourada ao arsenato e selenito.

4.2.2 Objetivos Específicos

- Obter imagens químicas de folhas da planta utilizando a técnica DESI-MSI;
- Identificar os metabólitos formados nas folhas das plantas;
- Explicar as alterações metabólicas que os metaloides As e Se causam na planta.

4.3 Materiais e Métodos

O trabalho experimental foi inicialmente realizado na casa de vegetação do Instituto de Ciências Biológicas e, posteriormente, em uma estufa montada nas proximidades do Departamento de Química. A mudança foi necessária em função da total destruição da casa de vegetação durante uma forte tempestade em Belo Horizonte.

As análises por DESI-MSI foram realizadas no Laboratório Thomson da Universidade de Campinas (UNICAMP).

4.3.1 Materiais e Reagentes

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e deionizada (18 M Ω cm, Milli-Q[®], Millipore Direct-Q 3, Molsheim, França). Todos os materiais usados foram descontaminados com solução de ácido nítrico 10% v v⁻¹ por 24 h. Nitrato de Potássio (KNO₃), Sulfato de Magnésio (MgSO₄.7H₂O), Sulfato de Zinco (ZnSO₄.7H₂O), Fosfato de amônio dibásico [(NH₄)₂HPO₄], Molibdato de Sódio (Na₂MoO₄.2H₂O) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); Nitrato de Cálcio (Ca(NO₃)₂.4H₂O), Ácido Bórico (H₃BO₃), Cloreto de Manganês (II) (MnCl₂.4H₂O), Sulfato de Cobre (CuSO₄.5H₂O), Sulfato de Ferro (II) (FeSO₄.7H₂O), EDTA sal dissódico, (Dinâmica, Rio Grande do Sul, Brasil)

foram utilizados para preparar a solução nutritiva de Hoagland 10 % v v⁻¹. As^V e Se^{IV} foram adicionados na solução nutritiva de Hoagland como arsenato monossódico (NaH₂AsO₄, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e selenito de Sódio (Na₂SeO₃, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), respectivamente. Os sais de As^V e Se^{IV} foram preparados na concentração 0,1 mol L⁻¹ em meio aquoso e então adicionados na solução nutritiva Hoagland.

Para as análises por DESI-MSI foram utilizados os solventes metanol grau HPLC e hexano (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). No preparo de amostra da folha utilizou-se uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE) com tamanho de poro de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (Allcrom, São Paulo, Brasil) e placa de sílica TLC sílica gel 60W (*Analytical Chromatography*, Sigma Aldrich).

4.3.2 Germinação das Sementes

As sementes de linhaça dourada utilizadas neste estudo foram compradas em um mercado local de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As sementes foram germinadas em dessecador sobre papel Germitest. Durante um período de três dias, as sementes foram mantidas à temperatura ambiente e umedecidas com água deionizada diariamente.

4.3.3 Cultivo das plantas

Após a germinação, as radículas emitidas a partir das sementes foram acomodadas em pequenos orifícios em um recipiente de plástico contendo aproximadamente 600 mL de solução nutritiva de Hoagland 10% v v⁻¹. Oito radículas foram colocadas em cada recipiente plástico. Três recipientes contendo solução nutritiva de Hoagland foram suplementadas com diferentes concentrações de As^V e Se^{IV} conforme apresentado na Tabela 4.1. As concentrações de exposição e co-exposição das plantas foram escolhidas com base nos resultados dos testes de toxicidade para As e Se nas plantas de linhaça dourada (capítulo 2). As concentrações que inibiram 50% do crescimento foram utilizadas.

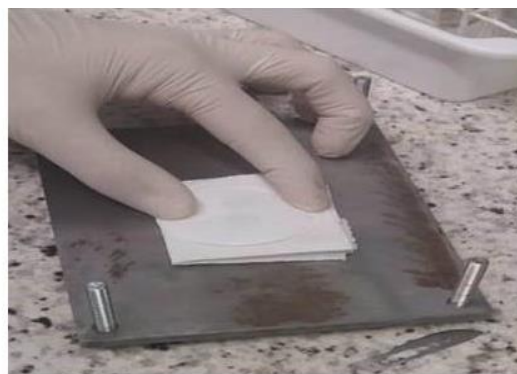
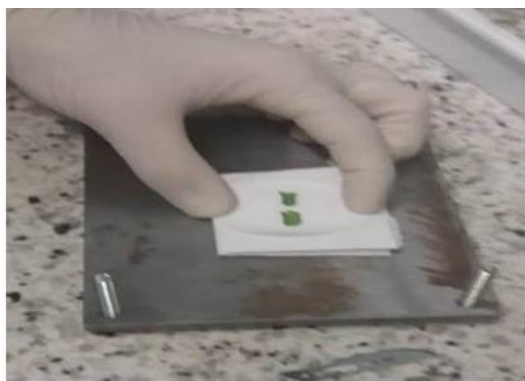
Tabela 4.1 – Concentração de exposição e co-exposição de arsenato (As^{V}) e selenito (Se^{IV}) utilizadas.

Tratamento	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
	Se^{IV}	As^{V}
1	0	0
2	5	0
3	25	0
4	0	50
5	5	50
6	25	50

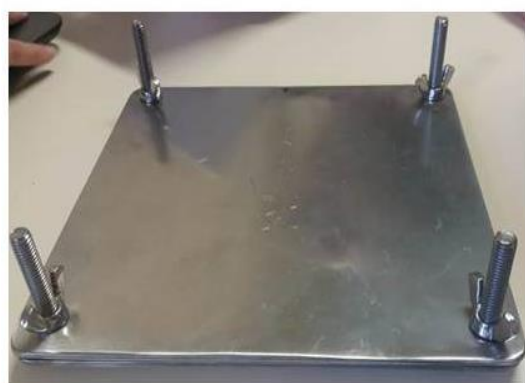
Todos os tratamentos foram realizados em triplicata e mantidos nas mesmas condições por quinze dias. As soluções foram trocadas a cada três dias.

4.3.4 Preparo da amostra para realização do *imprint*

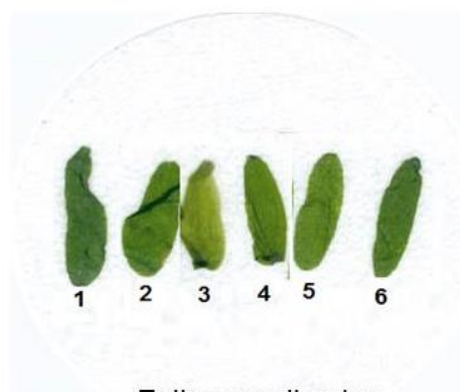
No *imprint* os analitos presentes nas folhas da planta são transferidos para uma placa de TLC sílica gel através da aplicação de pressão. Para realizar o procedimento de *imprint*, primeiramente lavou-se a folha com hexano. Esse procedimento tem o intuito de remover a camada protetora de cera e a cutícula da superfície da folha e melhorar a perfusão dos analitos[110]. Após a evaporação do hexano, a folha foi disposta entre uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE) e uma placa de sílica TLC, na seguinte ordem: membrana-folha-placa de sílica. Esse conjunto foi colocado em uma prensa manual, constituída de duas placas planas de aço inox, justapostas uma em cima da outra. A união destas placas é realizada por quatro parafusos que são apertados, fornecendo uma pressão sobre as amostras. A pressão nas amostras foi feita por um minuto. A Figura 4.1 mostra o esquema do preparo de amostra das folhas de linhaça dourada para análise por DESI-MSI. Após o *imprint*, a placa de sílica referente ao lado abaxial da folha (o lado de baixo), por possuir menor resistência na transferência dos compostos orgânicos das folhas, foi escolhida e utilizada para a análise por DESI-MSI.



Acondicionamento das folhas na membrana PTFE e placa de sílica TLC



Imprint



Folhas analisadas

Figura 4.1 – Esquema do preparo de amostra das folhas de linhaça dourada para análise por DESI-MSI. As folhas expostas e co-expostas a As^{V} e Se^{IV} dispostas na membrana de PTFE são dos tratamentos: **1**- Controle; **2** - Se^{IV} $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; **3** - Se^{IV} $25 \mu\text{mol L}^{-1}$; **4** - As^{V} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; **5** - Se^{IV} $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ + As^{V} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; **6** - Se^{IV} $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ + As^{V} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$.

4.3.5 Análises DESI-MSI

O espectrômetro de massas utilizado foi o *Q Exactive Hybrid Quadrupole – Orbitrap* (Thermo Fisher Scientific - Alemanha), instalado no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Este espectrômetro de massas combina dois analisadores o quadrupolo e o *orbitrap* de alta resolução e precisão de massas. A resolução do instrumento é de 140.000 FWHM (do inglês *full width at half maximum*) e um erro na precisão de massa de no máximo 3 ppm.

Utilizou-se a fonte de ionização DESI (Omni Spray Ion Source 2-D modelo OS-3201 da empresa Prosolia, EUA) (Figura 4.2). Essa fonte é uma

plataforma capaz de executar movimentos em duas dimensões, os quais são passíveis de controle por *software*.

Os parâmetros utilizados na operação do espectrômetro de massas e da fonte de ionização foram: voltagem do capilar de 5,0 kV, temperatura do capilar de 320°C, resolução de 70.000; o solvente utilizado para o *spray* foi o metanol com o fluxo de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$, a faixa de massa analisada foi m/z 100 a 1000 no modo de ionização positivo. Para a plataforma móvel, determinou-se o tamanho do passo de 200 μm , tamanho do pixel de 200 $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ e taxa de varredura de 740 $\mu\text{m sec}^{-1}$. As condições apresentadas, inclusive a geometria da fonte, foram resultantes de uma otimização do método para a obtenção da melhor resposta dos sinais e consequente resolução de imagem.



Figura 4.2 - Fonte de ionização DESI (Omni Spray Ion Source 2-D modelo OS-3201 da empresa Prosolia, EUA) utilizada nesse trabalho.

Os espectros de massas foram processados pelo *software* Qual Browser Xcalibur, as imagens foram convertidas utilizando o *software* Firefly (versão 2.1.05) e visualizadas pelo *software* BioMAP (versão 3.8.04).

4.4 Resultados e Discussão

Para obtenção das imagens foram testados a análise direta das folhas e o *imprint* em membrana de PTFE e em placa de sílica de TLC. As melhores imagens foram obtidas utilizando a placa de sílica de TLC. A imagem direta por DESI em folhas de plantas pode ser limitada pela camada de cera. A dessorção e ionização em DESI é energeticamente muito suave e não consegue penetrar essa camada[11]. Assim, para obter melhores imagens seria necessário a remoção da camada de cera com a utilização de compostos mais apolares que o hexano. O *imprint* em membrana de PTFE também não permitiu a obtenção de imagens com distribuição dos íons bem definidas. Isso pode ter acontecido devido ao espalhamento dos compostos, uma vez que a membrana tem um poder de adsorção menor que a placa de sílica de TLC.

Outro parâmetro avaliado foi o solvente de pulverização. Foram testados metanol e metanol com ácido fórmico 1% v/v, com o metanol apresentando os melhores resultados. Esses solventes permitem a dessorção somente de compostos polares do tecido vegetal e seria necessário testes com solventes ou misturas de solventes mais apolares para investigar metabólitos hidrofóbicos[111]. Os testes com outros solventes não foi possível por questões tempo e recursos financeiros.

Os íons referentes aos metabólitos encontrados nas folhas seguiram um padrão de distribuição. De acordo que esse padrão eles foram separados e agrupados em: 1) íons encontrados em todas as folhas, inclusive na controle, sendo denominados metabólitos não inibidos pela exposição e co-exposição; 2) íons encontrados na folha exposta ao Se^{IV} 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e co-expostas ao As^{V} 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e Se^{IV} 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, que foram denominados metabólitos formados pela exposição ao selenito e co-exposição ao arsenato e selenito; 3) íons não encontrados na folha exposta ao Se^{IV} , que foram denominados metabólitos inibidos pela exposição ao selenito; 4) íons encontrados nas folhas expostas ao As^{V} 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e co-expostas ao As^{V} 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e Se^{IV} 5 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$,

denominados metabólitos formados pela exposição ao arsenato e co-exposição ao arsenato e selenito. Para as plantas expostas e co-expostas ao arsenato não houve inibição de metabólitos.

Foram obtidas 90 imagens químicas (Apêndice C) que seguiram esses padrões de distribuição nas folhas de linhaça dourada. Entretanto, as imagens selecionadas e apresentadas aqui foram as que tiveram menos interferência do *background*. As imagens dos íons dos metabólitos encontrados nas folhas são mostrados a seguir nas Figuras 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6. As imagens possuem uma numeração que permite identificar qual tratamento de exposição e co-exposição a folha foi submetida. A escala de cor utilizada varia da cor preta até vermelho, indicando as regiões de ausência e de máxima concentração de metabólitos, respectivamente.

4.4.1 Metabólitos não inibidos pela exposição e co-exposição

Pode-se dizer que os metabólitos identificados em todas as folhas, inclusive na controle, não foram alterados pela exposição e co-exposição. A planta não utilizou esses metabólitos para a ativação dos seus mecanismos de tolerância ou eles estão presentes em grande quantidade na planta e somente uma pequena parte foi utilizada. Na Figura 4.3 tem-se a imagem química desses metabólitos. O íon de m/z 104 corresponde a colina, uma vitamina do complexo B muito importante para as plantas. Ela tem contribuição direta na formação dos lipídios da membrana vegetal através da fosfatidilcolina[112]. A colina também é um precursor da síntese da glicina betaína em certas plantas[113].

A trigonelina, um alcaloide associado ao metabolismo também foi identificada em todas as folhas. Esse metabólito corresponde ao íon de m/z 138 e pertence a uma classe de compostos de amônio quaternário que se acumulam em plantas em resposta ao estresse. A trigonelina em situação de estresse hídrico e salinidade pode garantir a síntese de aminoácidos essenciais[113].

O íon correspondente ao metabólito de m/z 300 é a lotaustralina, um glicosídeo cianogênico. A lotaustralina, juntamente com outros glicosídeos cianogênicos como linamarina, linustatina e neolinustatina são responsáveis por liberar compostos cianogênicos na linhaça dourada. Juntos os compostos

cianogênicos pode liberar cerca de 8 μM de cianeto/g de linhaça. No entanto, eles não acarretam danos a saúde humana, uma vez que o consumo de linhaça é relativamente baixo[16].

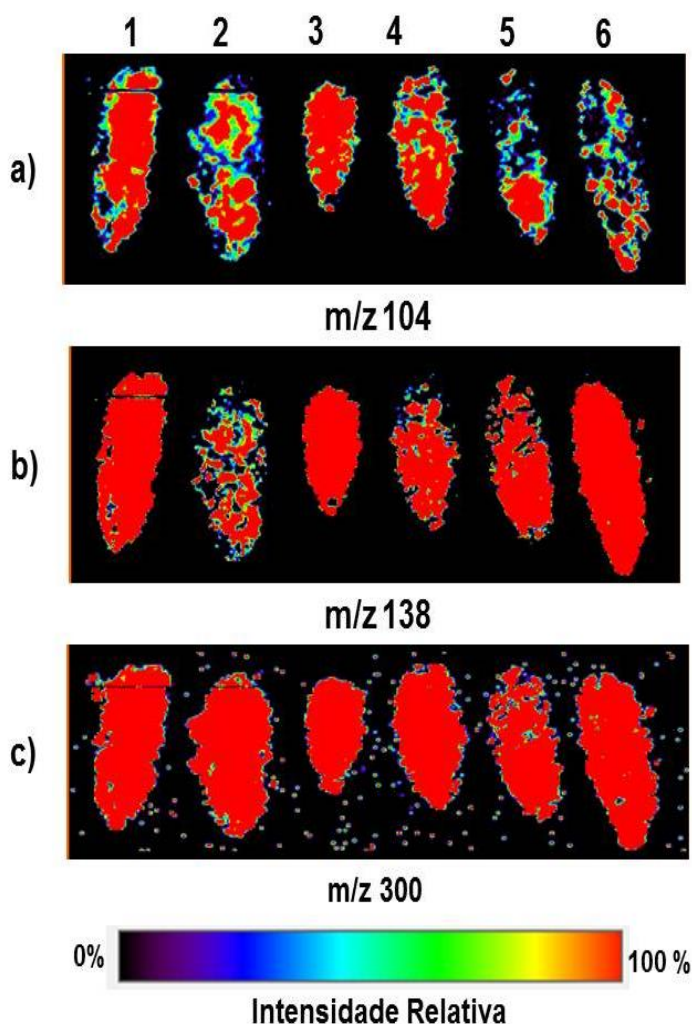


Figura 4.3 – Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos íons referentes aos metabólitos não alterados pela exposição e co-exposição (1- Controle; 2 - Se^{IV} 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 3 - Se^{IV} 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 4 - As^{V} 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 5 - Se^{IV} 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + As^{V} 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; 6 - Se^{IV} 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + As^{V} 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

As três imagens químicas da Figura 4.3, se referem aos metabólitos discutidos, nos mostra que o experimento foi conduzido corretamente. Uma vez que os íons identificados estão presente em todas as folhas de linhaça dourada com intensidade elevada e quaisquer diferenças nas intensidades das outras imagens são intrínseca as folhas. Além disso, a distribuição espacial dos íons nas imagens químicas estão de acordo com o formato e tamanho das folhas (Figura 4.1).

4.4.2 Metabólitos formados pela exposição ao selenito e co-exposição ao arsenato e selenito.

A exposição das plantas ao Se^{IV} na concentração de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a co-exposição das plantas ao Se^{IV} nessa mesma concentração com As^{V} na concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ causaram alterações metabólicas semelhantes nas folhas. As imagens químicas obtidas demonstram a formação ou inibição dos mesmos íons identificados (Figura 4.4). Possivelmente, o Se foi responsável por essas alterações já que elas estão presente nos dois tratamentos de mesma concentração.

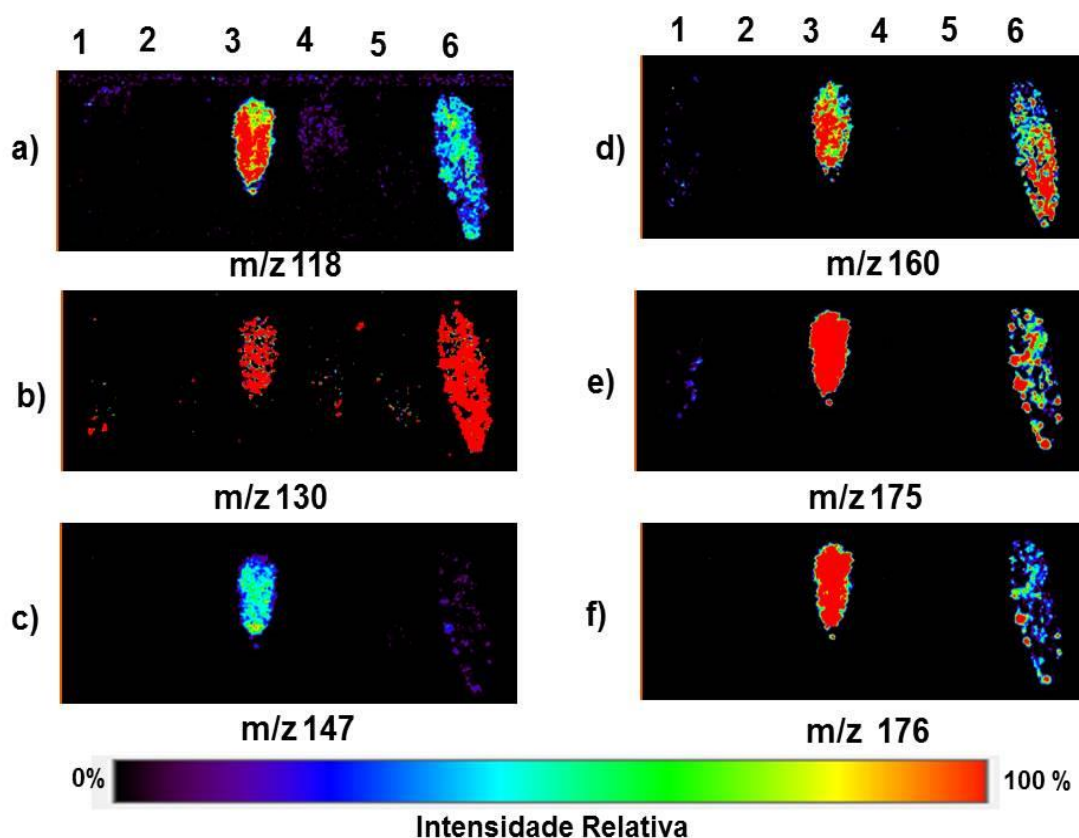


Figura 4.4 – Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos íons referentes aos metabólitos formados pela exposição ao selenito e co-exposição ao arsenato e selenito. (1- Controle; 2 - Se^{IV} $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; 3 - Se^{IV} $25 \mu\text{mol L}^{-1}$; 4 - As^{V} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; 5 - Se^{IV} $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ + As^{V} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; 6 - Se^{IV} $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ + As^{V} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$).

O íon m/z 118 foi identificado como o metabólito glicina betaína. As betaínas são uma classe de compostos que ocorrem naturalmente em plantas e têm um papel importante na resistência ao estresse osmótico [114]. Em

plantas, o estresse por metais/metaloídeos ou por qualquer outro fator como seca, frio e sal levam as plantas ao estresse por desidratação. A resposta fisiológica da planta ao estresse é o aumento de metabólitos que são usados no mecanismo de tolerância ao estresse osmótico, como as betaínas [115].

Não foi possível identificar o íon m/z 130 com base na pesquisa dos bancos de dados utilizados. O aminoácido glutamina (íon m/z 147) também se acumula nas plantas sujeitas ao estresse salino. Para evitar a toxicidade do íon amônio em excesso, as plantas aumentam a conversão dele em aminoácidos como a glutamina [116].

Os íons de m/z 160 e m/z 176 correspondem aos adutos de sódio e potássio da trigonelina, respectivamente. Como discutido anteriormente, um dos motivos da trigonelina se acumular em plantas é devido ao estresse. O fato dos adutos de sódio e potássio desse metabólito estarem presente somente nas folhas expostas as maiores concentração de Se^{IV} indica que esses tratamentos provocam maior estresse na planta. Uma vez, que a forma protonada da trigonelina (íon m/z 138) está presente em todas as folhas.

O íon m/z 175 corresponde a um importante aminoácido para as plantas, a arginina. Ela atua no transporte e armazenamento de nitrogênio e é um precursor para a síntese de outros aminoácidos e poliaminas. O metabolismo da arginina na planta também é influenciado por estresse abióticos, como déficit hídrico, salinidade e baixas temperaturas. Nessas situações, o aumento da síntese de arginina é comprovada [117].

4.4.3 Metabólitos inibidos pela exposição ao selenito

Os íons apresentados na Figura 4.5 correspondem aos metabólitos que foram inibidos pela exposição ao Se^{IV} na concentração de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$. É possível observar que esses metabólitos estão presentes em altas concentrações em todas as folhas, exceto na folha exposta ao Se^{IV} . Assim, pode-se inferir que eles foram utilizados na síntese de compostos que atuam nos mecanismos de tolerância a toxicidade do Se na planta. Além disso, os metabólitos inibidos podem ter sua síntese prejudicada devido ao estresse ocasionado.

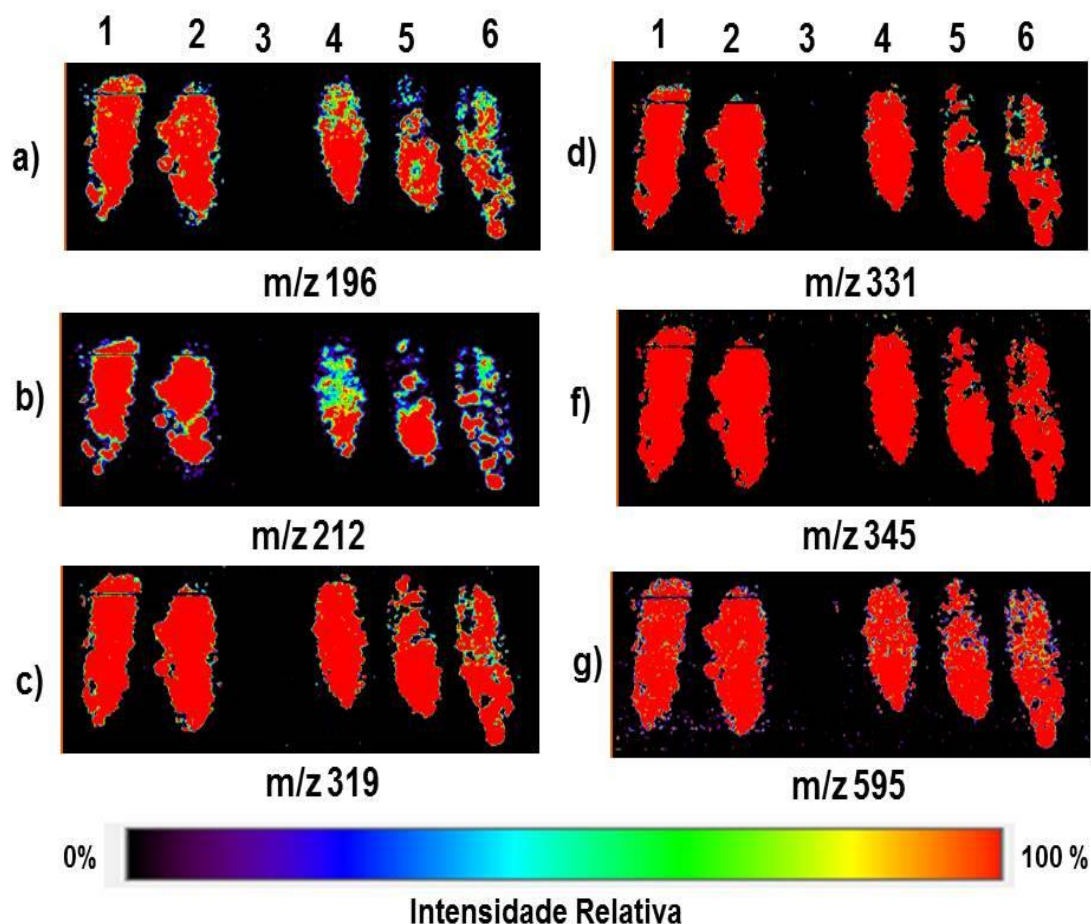


Figura 4.5 – Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos íons referentes aos metabólitos formados pela exposição ao selenito e co-exposição ao arsenato e selenito. (1- Controle; 2 - Se^{IV} $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; 3 - Se^{IV} $25 \mu\text{mol L}^{-1}$; 4 - As^{V} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; 5 - Se^{IV} $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ + As^{V} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; 6 - Se^{IV} $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ + As^{V} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Dentre os metabólitos apresentados da Figura 4.5, foi possível a identificação apenas do íon de m/z 595. Este composto corresponde a nicotiflorina (kaempferol-3-O- α -L-rutinosídeo) um flavonoide polifenólico. A função da nicotiflorina em plantas não é totalmente conhecida. No entanto, suas propriedades medicinais como: antitumoral, anti-inflamatório, anti-alérgico, antiviral e neuroprotetor são bastante estabelecidas [118]. O interessante é que a quantidade de nicotiflorina em plantas submetidas ao estresse abiótico tende a aumentar [119] e isso não aconteceu na exposição das plantas ao Se^{IV} na concentração de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$. O que pode ter ocorrido é que o excesso Se na planta diminui a síntese desse composto.

Os íons de m/z 319, 331, 345 e 595 não apresentaram intensidade alterada exceto pela exposição das plantas ao Se^{IV} na concentração de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$. Já os íons de m/z 196 e 212 apresentaram alterações de intensidade também nas folhas expostas e co-expostas ao As. Pode-se dizer então que alguns metabólitos podem ser menos produzidos pela planta apenas na exposição ao Se^{IV} e outros na exposição ao As^{V} .

4.4.4 Metabólitos formados pela exposição ao arsenato e co-exposição ao arsenato e selenito

Na Figura 4.6 tem-se as imagens dos metabólitos formados pela exposição ao As^{V} e co-exposição ao As^{V} e Se^{IV} . Esses metabólitos são produtos de reações ativadas pelo estresse ocasionado pela exposição e co-exposição, uma vez que eles não foram encontrados na folha da planta controle. São metabólitos que podem ser utilizados na identificação de danos que a planta sofreu na presença dos metaloides investigados. A menor intensidade dos íons na folha 5 ($\text{Se}^{\text{IV}} 5 \mu\text{mol L}^{-1} + \text{As}^{\text{V}} 50 \mu\text{mol L}^{-1}$) pode indicar que o Se^{IV} em baixa concentração combate os danos causados a planta, conforme já discutido anteriormente (capítulo 2).

Infelizmente, os íons correspondentes a esses metabólitos não puderam ser identificados com base no banco de dados utilizados. Um estudo que envolva a fragmentação desses íons seria necessário para uma identificação confiável. Uma vez que possíveis identificações desses íons pela massa exata apresentaram erro acima de 30 ppm.

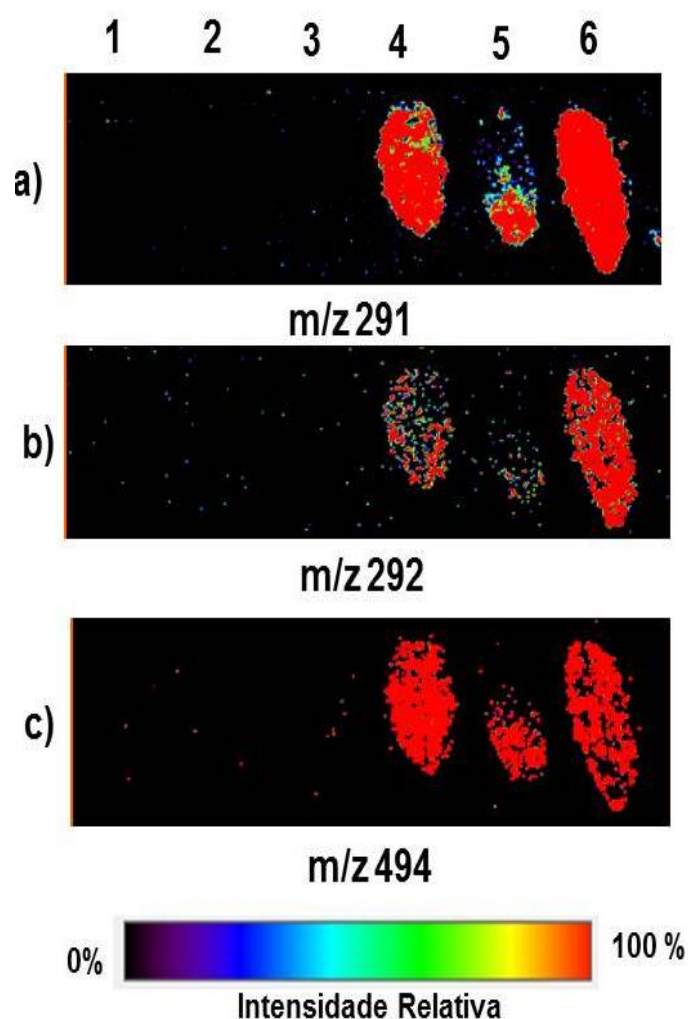
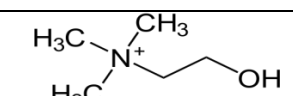
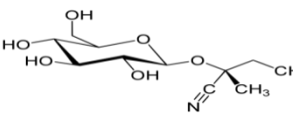
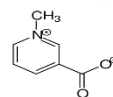
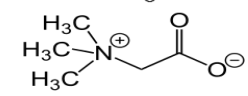
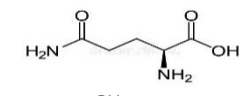
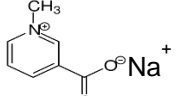
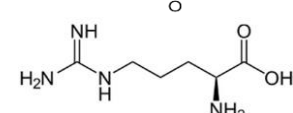
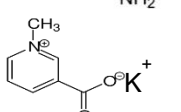
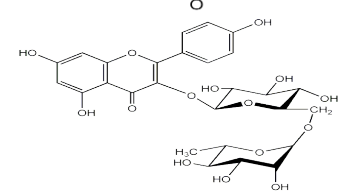


Figura 4.6 – Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos íons referentes aos metabólitos formados pela exposição ao selenito e co-exposição ao arsenato e selenito. (1- Controle; 2 - Se^{IV} $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; 3 - Se^{IV} $25 \mu\text{mol L}^{-1}$; 4 - As^{V} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; 5 - Se^{IV} $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ + As^{V} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; 6 - Se^{IV} $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ + As^{V} $50 \mu\text{mol L}^{-1}$).

4.4.5 Identificação

A identificação dos metabólitos foi feita utilizando as massas exatas dos íons, suas respectivas razões isotópicas, os erros entre as massas teórica e experimental e a busca em bancos de dados como Metlin [29], Lipidmaps [30], PubChem [31] dentre outros, finalizando com a confirmação na literatura. Os resultados encontrados para os íons são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Principais metabólitos detectados no *imprint* das folhas de linhaça dourada expostas e co-expostas a arsenato e selenito a partir de uma análise por DESI-MSI no modo positivo.

Massa Exata		Espécie Iônica	Erro (ppm)	Metabólito proposto	Estrutura
Teórica	Experimental				
104,10754	104,10737	$[C_5H_{13}NO + H]^+$	1,6	Colina	
300,08494	300,08447	$[C_{11}H_{19}NO_6 + K]^+$	1,6	Lotaustralina	
138,05550	138,05501	$[C_7H_7NO_2 + H]^+$	3,6	Trigonelina	
118,08680	118,08652	$[C_5H_{11}NO_2 + H]^+$	2,4	Glicina betaína	
147,07697	147,07624	$[C_5H_{10}N_2O_3 + H]^+$	5,0	Glutamina	
160,03687	160,03688	$[C_7H_7NO_2 + Na]^+$	-0,063	Trigonelina	
175,11898	175,11904	$[C_6H_{14}N_4O_2 + H]^+$	-0,34	Arginina	
176,01085	176,01087	$[C_7H_7NO_2 + K]^+$	-0,11	Trigonelina	
595,16630	595,16477	$[C_{27}H_{30}O_{15} + H]^+$	2,6	Nicotiflorina	

4.5 Conclusão

No estudo toxicometabólico, a técnica DESI-MSI possibilitou a obtenção de imagens químicas por espectrometria de massas de vários metabólitos naturais das folhas de plantas de linhaça dourada e de metabólitos que foram alterados pela exposição e co-exposição ao arsenato e selenito. Em uma única análise foi possível obter um padrão de distribuição nas folhas para 90 íons. Além disso, a técnica permitiu a análise de seis folhas de tratamentos distintos simultaneamente. Assim, pode-se concluir que a técnica tem grandes vantagens para estudos toxicometabólicos em tecidos vegetais.

Muitos dos metabólitos identificados que foram agrupados como formados pela exposição e co-exposição ao selenito estão relacionados os mecanismos de tolerância da planta ao estresse abiótico. Uma das causas desse estresse é a alta salinidade do meio hidropônico, que pode ter sido gerada pelos sais de sódio utilizados no preparo das soluções contaminantes de Se e As (Na_2SeO_3 e NaH_2AsO_4). Assim, não se pode afirmar que esses metabólitos foram formados por alterações metabólicas causadas por As e Se. Porém, para os metabólitos formados pela exposição ao arsenato pode-se inferir que eles estejam relacionados as alterações ocasionados pelo As, já que a folha exposta ao selenito na concentração de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ não apresentou a formação desses metabólitos. No entanto, os íons correspondentes não foram identificados, necessitando assim de mais estudos.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho desenvolvido nessa tese traz contribuições importantes na área da química analítica, química ambiental e fisiologia vegetal. Os mecanismos de tolerância estabelecidos e as alterações metabólicas sofridas pela planta de linhaça dourada frente a exposição e co-exposição ao As e Se pôde ser melhor entendidas.

As técnicas de espectrometria de massas com ionização ambiente DESI-MSI e PS-MS demonstraram grande potencial para identificação de metabólitos envolvidos nos mecanismos de tolerância da planta ao As e Se. Por PS-MS, foi possível realizar análise de especiação de As em extratos de raízes das plantas co-expostas com As e Se. Além disso, a identificação de GSH, PC₂, PC₃, Se^{II}-PC₂, As^{III}PC₃ nesses extratos comprovou a ativação do principal mecanismo de tolerância das plantas a metais/metaloídes tóxicos que é a complexação desses por PCs.

As análises por DESI-MSI permitiram verificar as alterações metabólicas ocasionadas pela exposição e co-exposição ao arsenato e selenito nas folhas das plantas. As distribuições espaciais dos metabólitos nas folhas obtidas por DESI-MSI mostrou quatro perfis de alterações. Muitos metabólitos identificados nas folhas estão relacionados ao estresse abiótico. A presença de metabólitos com alta intensidade em alguns tratamentos pode estar relacionada aos sais de sódio (Na₂HAsO₄ e Na₂SeO₃) utilizados para suplementar a solução nutritiva das plantas com As e Se.

A hipótese de que o Se em baixas concentrações ajuda a minimizar os efeitos tóxicos do As foi amparada em trabalhos anteriores da literatura e comprovada. Ocorreu uma diminuição da toxicidade do arsenato quando co-exposto com selenito (5 µmol L⁻¹), apesar da absorção e translocação de As terem aumentado. A explicação para o ocorrido seria a substituição do enxofre nos peptídios tiólicos das PCs por Se, aumentando assim a capacidade de complexação de As por elas. No entanto, neste trabalho, não foram identificados complexos de PC-SeAs nas análises por PS-MS. Outros trabalhos também não encontraram esses complexos [3] e propuseram que a diminuição da toxicidade do As na presença do Se em *Arabidopsis thaliana* está

relacionada ao aumento da síntese de GSH pelo Se e beneficiamento disso pelo As.

Nesse contexto, para trabalhos futuros sugere-se a realização de análises PS-MS de mais compostos envolvidos nos mecanismos de tolerância da planta bem como a utilização do DESI-MSI para confirmar a identidade deles nas raízes da planta. Apresenta-se também, como proposta para investigações futuras, a utilização de solventes mais hidrofóbicos como tolueno na remoção da camada de cera superficial das folhas para o *imprint* nas análises por DESI-MSI, com o objetivo de identificar metabólitos que estejam em estruturas mais profundas das folhas.

Adicionalmente, experimentos envolvendo o cultivo de plantas em solução nutritiva e contaminação por metais e metaloides tóxicos precisam ser bem planejados por que exigem uma estrutura para o descarte correto de grande quantidade de resíduos. Além disso, o local de cultivo deve ser próximo ao local de preparo da solução nutritiva devido ao grande volume de solução a ser transportada.

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS

- [1] R. Singh, A.K. Upadhyay, D.P. Singh, Regulation of oxidative stress and mineral nutrient status by selenium in arsenic treated crop plant *Oryza sativa*, *Ecotoxicol Environ Saf.* 148 (2018) 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.008>.
- [2] A.I. González de las Torres, I. Giráldez, F. Martínez, P. Palencia, W.T. Corns, D. Sánchez-Rodas, Arsenic accumulation and speciation in strawberry plants exposed to inorganic arsenic enriched irrigation, *Food Chem.* 315 (2020) 126215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126215>.
- [3] F.A. Aborode, A. Raab, M. Voigt, E.M. Krupp, J. Feldmann, The importance of glutathione and phytochelatins on the selenite and arsenate detoxification in *Arabidopsis thaliana*, *JES.* (2016) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.08.009>.
- [4] P. Soudek, A. Katrušáková, L. Sedláček, Š. Petrová, V. Kočí, P. Maršík, M. Griga, T. Vaněk, Effect of heavy metals on inhibition of root elongation in 23 cultivars of flax (*Linum usitatissimum* L.), *Arch Environ Contam Toxicol.* 59 (2010) 194–203. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9480-y>.
- [5] I. Smykalova, M. Vrbova, E. Tejklova, M. Vetrovcova, M. Griga, Large scale screening of heavy metal tolerance in flax/linseed (*Linum usitatissimum* L.) tested in vitro, *Ind Crops Prod.* 32 (2010) 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.06.027>.
- [6] R. Kumar, R.K. Mishra, V. Mishra, A. Qidwai, A. Pandey, S.K. Shukla, M. Pandey, A. Pathak, A. Dikshit, *Detoxification and Tolerance of Heavy Metals in Plants*, Elsevier Inc., 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00013-8>.
- [7] Q. Liu, X. Lu, H. Peng, A. Popowich, J. Tao, J.S. Uppal, X. Yan, D. Boe, X.C. Le, Trends in Analytical Chemistry Speciation of arsenic e A review of phenylarsenicals and related arsenic metabolites, *Trends Anal Chem.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.006>.
- [8] V.D.M. Silva, M.C.C. Macedo, A.N. dos Santos, M.R. Silva, R. Augusti, I.C.A. Lacerda, J.O.F. Melo, C.A. Fante, Bioactive activities and chemical profile characterization using paper spray mass spectrometry of extracts of *Eriobotrya japonica* Lindl. leaves, *Rapid Commun Mass Spectrom.* 34 (2020). <https://doi.org/10.1002/rcm.8883>.
- [9] M.R. Silva, L.G. Freitas, A.G. Souza, R.L.B. Araújo, I.C.A. Lacerda, H. V. Pereira, R. Augusti, J.O.F. Melo, Antioxidant Activity and Metabolomic Analysis of Cagaitas (*Eugenia dysenterica*) Using using Paper Paper Spray Spray Mass Mass Spectrometry Spectrometry, *J Braz Chem Soc.* 30 (2019) 1034–1044. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190002>.

- [10] A. Tata, C.J. Perez, T.S. Hamid, M.A. Bayfield, D.R. Ifa, Analysis of metabolic changes in plant pathosystems by imprint imaging desi-ms, *J Am Soc Mass Spectrom.* 26 (2015) 641–648. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-1039-0>.
- [11] B. Li, S.H. Hansen, C. Janfelt, Direct imaging of plant metabolites in leaves and petals by desorption electrospray ionization mass spectrometry, *Int J Mass Spectrom.* 348 (2013) 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2013.04.018>.
- [12] R.G. Hemalatha, T. Pradeep, Understanding the molecular signatures in leaves and flowers by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI MS) imaging, *J Agric Food Chem.* 61 (2013) 7477–7487. <https://doi.org/10.1021/jf4011998>.
- [13] G. V. Sousa, V.L.G. Teles, E.G. Pereira, L. V. Modolo, L.M. Costa, Interactions between As and Se upon long exposure time and effects on nutrients translocation in golden flaxseed seedlings, *J Hazard Mater.* 402 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123565>.
- [14] A.J. Jhala, L.M. Hall, Flax (*Linum usitatissimum* L.): Current uses and future applications, *Aust J Basic Appl Sci.* 4 (2010) 4304–4312.
- [15] M.H. Saleem, M. Kamran, Y. Zhou, A. Parveen, M. Rehman, S. Ahmar, Z. Malik, A. Mustafa, R.M. Ahmad Anjum, B. Wang, L. Liu, Appraising growth, oxidative stress and copper phytoextraction potential of flax (*Linum usitatissimum* L.) grown in soil differentially spiked with copper, *J Environ Manage.* 257 (2020) 109994. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109994>.
- [16] Y.Y. Shim, B. Gui, P.G. Arnison, Y. Wang, M.J.T. Reaney, Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review, *Trends Food Sci Technol.* 38 (2014) 5–20. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.011>.
- [17] A. Goyal, V. Sharma, N. Upadhyay, S. Gill, M. Sihag, Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food, *J Food Sci Technol.* 51 (2014) 1633–1653. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1247-9>.
- [18] J. Lazko, B. Dupré, R.M. Dheilly, M. Quéneudec, Biocomposites based on flax short fibres and linseed oil, *Ind Crops Prod.* 33 (2011) 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.11.015>.
- [19] I. Smykalova, M. Vrbova, E. Tejklova, M. Vetrovcova, M. Griga, Large scale screening of heavy metal tolerance in flax / linseed (*Linum usitatissimum* L.) tested in vitro, *Ind Crop Prod.* 32 (2010) 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.06.027>.
- [20] J. Najmanova, E. Neumannova, T. Leonhardt, O. Zitka, R. Kizek, T. Macek, M. Mackova, P. Kotrba, Cadmium-induced production of phytochelatins and speciation of intracellular cadmium in organs of *Linum usitatissimum* seedlings, *Ind Crops Prod.* 36 (2012) 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.11.008>.

- [21] M. Hasanuzzaman, K. Nahar, K.R. Hakeem, M. Öztürk, M. Fujita, Arsenic Toxicity in Plants and Possible Remediation, Elsevier Inc., 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799937-1.00016-4>.
- [22] A. Gautam, A.K. Pandey, R.S. Dubey, Unravelling molecular mechanisms for enhancing arsenic tolerance in plants: A review, *Plant Gene*. 23 (2020) 100240. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2020.100240>.
- [23] H. Wu, X. Zhang, Q. Wang, L. Li, C. Ji, X. Liu, J. Zhao, X. Yin, A metabolomic investigation on arsenic-induced toxicological effects in the clam *Ruditapes philippinarum* under different salinities, *Ecotoxicol Environ Saf*. 90 (2013) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.02.022>.
- [24] F. Du, P. Liu, K. Wang, Z. Yang, L. Wang, Ionic responses of rice plants to the stresses of different arsenic species in hydroponics, *Chemosphere*. 243 (2020) 125398. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125398>.
- [25] J.M.O. Souza, M.F.H. Carneiro, A. Carolina, C. Paulelli, D. Grotto, A.M. Magalhães, *Quim. Nova*, 38 (2015) 118–127.
- [26] G. Dixit, A.P. Singh, A. Kumar, S. Mishra, S. Dwivedi, S. Kumar, P.K. Trivedi, V. Pandey, R.D. Tripathi, Reduced arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) shoot involves sulfur mediated improved thiol metabolism, antioxidant system and altered arsenic transporters, *Plant Physiol Biochem*. 99 (2016) 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.11.005>.
- [27] C. Pandey, M. Gupta, Selenium and auxin mitigates arsenic stress in rice (*Oryza sativa* L.) by combining the role of stress indicators, modulators and genotoxicity assay, *J Hazard Mater*. 287 (2015) 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.01.044>.
- [28] D. Zhao, H.B. Li, J.Y. Xu, J. Luo, L.Q. Ma, Arsenic extraction and speciation in plants: Method comparison and development, *Sci Total Environ*. 523 (2015) 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.051>.
- [29] N. Garg, P. Singla, Arsenic toxicity in crop plants: Physiological effects and tolerance mechanisms, *Environ Chem Lett*. 9 (2011) 303–321. <https://doi.org/10.1007/s10311-011-0313-7>.
- [30] T. Watanabe, E. Maejima, T. Yoshimura, M. Urayama, A. Yamauchi, M. Owadano, R. Okada, M. Osaki, Y. Kanayama, T. Shinano, The ionic study of vegetable crops, *PLoS One*. 11 (2016). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160273>.
- [31] M.E.V. Schmoger, M. Oven, E. Grill, Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants, *Plant Physiol*. 122 (2000) 793–801. <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.793>.
- [32] U. Saha, Selenium in the Soil-Plant Environment: A Review, *Int J Appl Agric Sci*. 3 (2017) 1. <https://doi.org/10.11648/j.ijaas.20170301.11>.

- [33] M. Gupta, S. Gupta, An Overview of Selenium Uptake, Metabolism, and Toxicity in Plants, *Front Plant Sci.* 7 (2017) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02074>.
- [34] M. Hasanuzzaman, M.H.M.B. Bhuyan, A. Raza, B. Hawrylak-Nowak, R. Matraszek-Gawron, J. Al Mahmud, K. Nahar, M. Fujita, Selenium in plants: Boon or bane?, *Environ Exp Bot.* 178 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104170>.
- [35] Z. Kolbert, Molnár, G. Feigl, D. Van Hoewyk, Plant selenium toxicity: Proteome in the crosshairs, *J Plant Physiol.* 232 (2019) 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.11.003>.
- [36] P.J. White, Selenium accumulation by plants, *Ann Bot.* 117 (2016) 217–235. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv180>.
- [37] M. Biology, Elenium in, *Proteins.* (2000).
- [38] L.H.E. Winkel, B. Vriens, G.D. Jones, L.S. Schneider, E. Pilon-Smits, G.S. Bañuelos, Selenium cycling across soil-plant-atmosphere interfaces: A critical review, 2015. <https://doi.org/10.3390/nu7064199>.
- [39] S. Rodrigo, O. Santamaria, L. Perez-Izquierdo, M.J. Poblaciones, Arsenic and selenium levels in rice fields from south-west of Spain: Influence of the years of monoculture, *Plant, Soil Environ.* 63 (2017) 184–188. <https://doi.org/10.17221/105/2017-PSE>.
- [40] D.K. Gupta, F.J. Corpas, J.M. Palma, *Heavy metal stress in plants*, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-38469-1>.
- [41] R. Feng, C. Wei, S. Tu, X. Sun, Interactive effects of selenium and arsenic on their uptake by *Pteris vittata* L. under hydroponic conditions, *Environ Exp Bot.* 65 (2009) 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.11.013>.
- [42] R. Chauhan, S. Awasthi, P. Tripathi, S. Mishra, S. Dwivedi, A. Niranjana, S. Mallick, P. Tripathi, R.D. Tripathi, R. Chauhan, V. Pande, Selenite modulates the level of phenolics and nutrient element to alleviate the toxicity of arsenite in rice (*Oryza sativa* L.), *Ecotoxicol Environ Saf.* 138 (2017) 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.015>.
- [43] K. Bluemlein, E. Klimm, A. Raab, J. Feldmann, Selenite enhances arsenate toxicity in *Thunbergia alata*, *Environ Chem.* 6 (2009) 486–494. <https://doi.org/10.1071/EN09101>.
- [44] C.S. Cobbett, Update on Heavy Metal Stress Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification, (2000).
- [45] E. de Souza, I. Silva, L. Ferreira, Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas, *Rev Bras Agrociencia.* 17 (2011) 167–173. <https://doi.org/10.18539/cast.v17i2.2046>.
- [46] N. Serrano, J.M. Díaz-cruz, C. Ariño, M. Esteban, Trends in Analytical Chemistry Recent contributions to the study of phytochelatins with an

- analytical approach, *Trends Anal Chem.* 73 (2015) 129–145.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.031>.
- [47] J. Ahmad, A.A. Ali, M.A. Baig, M. Iqbal, I. Haq, M. Irfan Qureshi, Role of Phytochelatins in Cadmium Stress Tolerance in Plants, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814864-8.00008-5>.
- [48] M.E. V Schmo, M. Oven, E. Grill, A. Hochanger, M.E.V.S. Germany, Detoxification of Arsenic by Phytochelatins in Plants 1, 122 (2000) 793–801.
- [49] B.L. Batista, M. Nigar, A. Mestrot, B.A. Rocha, F.B. Júnior, A.H. Price, A. Raab, J. Feldmann, Identification and quantification of phytochelatins in roots of rice to long-term exposure: Evidence of individual role on arsenic accumulation and translocation, *J Exp Bot.* 65 (2014) 1467–1479.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru018>.
- [50] P. Liu, W. Cai, L. Yu, B. Yuan, Y. Feng, Determination of Phytochelatins in Rice by Stable Isotope Labeling Coupled with Liquid Chromatography – Mass Spectrometry, (2015). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01797>.
- [51] L.B. Melendez, V.T. Kütter, M. Montes-Bayón, S.M. Sella, E. V. Silva-Filhob, Determination of Metallothioneins and Phytochelatins using HPLC-ICPMS, *Rev Virtual Quim.* 4 (2012) 612–622.
<https://doi.org/10.5935/1984-6835.20120047>.
- [52] C.H. Lin, W.C. Liao, H.K. Chen, T.Y. Kuo, Paper spray-MS for bioanalysis, *Bioanalysis.* 6 (2014) 199–208.
<https://doi.org/10.4155/bio.13.310>.
- [53] I. Pereira, S.R.M. Rodrigues, T.C. De Carvalho, V. V. Carvalho, G.S. Lobón, J.F.P. Bassane, E. Domingos, W. Romão, R. Augusti, B.G. Vaz, Rapid screening of agrochemicals by paper spray ionization and leaf spray mass spectrometry: which technique is more appropriate?, *Anal Methods.* 8 (2016) 6023–6029. <https://doi.org/10.1039/c6ay01154c>.
- [54] L.B. De Abreu, R. Augusti, L. Schmidt, V.L. Dressler, E.M. De Moraes Flores, C.C. Nascentes, Desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS) applied to the speciation of arsenic compounds from fern leaves (Bio)Analytical Research in Latin America, *Anal Bioanal Chem.* 405 (2013) 7643–7651. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6986-y>.
- [55] H. Wang, J. Liu, R. Graham Cooks, Z. Ouyang, Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry, *Angew Chemie - Int Ed.* 49 (2010) 877–880. <https://doi.org/10.1002/anie.200906314>.
- [56] C.D. Pereira, E.E. Garcia, F. V. Silva, A.R.A. Nogueira, J.A. Nóbrega, Behaviour of arsenic and selenium in an ICP-QMS with collision and reaction interface, *J Anal At Spectrom.* 25 (2010) 1763–1768.
<https://doi.org/10.1039/c003100c>.
- [57] N. Daq, Current status of DAQ Current status of DAQ, (2013) 1–75.

- [58] U. Singh, K.L. Sahrawat, R. Jambunathan, J.R. Burford, The use of hydrogen peroxide for the digestion and determination of total nitrogen in chickpea (*Cicer arietinum* L.) and pigeonpea (*Cajanus cajan* L.), *J Sci Food Agric.* 35 (1984) 640–646. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740350609>.
- [59] P.V. Abdelnur, Imageamento químico por espectrometria de massas utilizando MALDI (MALDI Imaging Mass Spectrometry) aplicado a tecidos vegetais, Embrapa. (2011).
- [60] Z. Takáts, J.M. Wiseman, R.G. Cooks, Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): Instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology, *J Mass Spectrom.* 40 (2005) 1261–1275. <https://doi.org/10.1002/jms.922>.
- [61] D.R. Ifa, C. Wu, Z. Ouyang, R.G. Cooks, Desorption electrospray ionization and other ambient ionization methods: Current progress and preview, *Analyst.* 135 (2010) 669–681. <https://doi.org/10.1039/b925257f>.
- [62] A.T. Lebedev, Ambient ionization mass spectrometry, *Russ Chem Rev.* 84 (2015) 665–692. <https://doi.org/10.1070/rcr4508>.
- [63] A. Tata, M. Woolman, M. Ventura, N. Bernardis, M. Ganguly, A. Gribble, B. Shrestha, E. Bluemke, H.J. Ginsberg, A. Vitkin, J. Zheng, A. Zarrine-Afsar, Rapid detection of necrosis in breast cancer with desorption electrospray ionization mass spectrometry, *Sci Rep.* 6 (2016) 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep35374>.
- [64] S. Gerbig, H.E. Brunn, B. Spengler, S. Schulz, Spatially resolved investigation of systemic and contact pesticides in plant material by desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging (DESI-MSI), (2015) 7379–7389. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8900-2>.
- [65] M. Angel, M. Rodrigo, N. Cernei, M. Kominkova, O. Zitka, Ion Exchange Chromatography and Mass Spectrometric Methods for Analysis of Cadmium-Phytochelatin (II) Complexes, (2013) 1304–1311. <https://doi.org/10.3390/ijerph10041304>.
- [66] R.. G.C. Zoltán Takáts , Justin M . Wiseman , Bogdan Gologan, Mass Spectrometry Sampling under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization Zoltán Takáts , Justin M . Wiseman , Bogdan Gologan and R . Graham Cooks Source : Science , New Series , Vol . 306 , No . 5695 (Oct . 15 , 2004) , p, Science (80-). 306 (2004) 471–473.
- [67] A.L. Dill, L.S. Eberlin, D.R. Ifa, R.G. Cooks, Perspectives in imaging using mass spectrometry, *Chem Commun.* 47 (2011) 2741–2746. <https://doi.org/10.1039/c0cc03518a>.
- [68] J. Nizioł, M. Misiorek, T. Ruman, Mass spectrometry imaging of low molecular weight metabolites in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Primoris with 109 Ag nanoparticle enhanced target, *Phytochemistry.* 159 (2019) 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.11.014>.

- [69] Y.J. Lee, D.C. Perdian, Z. Song, E.S. Yeung, B.J. Nikolau, Use of mass spectrometry for imaging metabolites in plants, *Plant J.* 70 (2012) 81–95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04899.x>.
- [70] E.M. McBride, P.M. Mach, E.S. Dhummakupt, S. Dowling, D.O. Carmany, P.S. Demond, G. Rizzo, N.E. Manicke, T. Glaros, Paper spray ionization: Applications and perspectives, *TrAC - Trends Anal Chem.* 118 (2019) 722–730. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.028>.
- [71] J. Liu, H. Wang, R.G. Cooks, Z. Ouyang, Leaf spray: Direct chemical analysis of plant material and living plants by mass spectrometry, *Anal Chem.* 83 (2011) 7608–7613. <https://doi.org/10.1021/ac2020273>.
- [72] A.C.M. Moura, I.N. Lago, C.F. Cardoso, A. dos Reis Nascimento, I. Pereira, B.G. Vaz, Rapid monitoring of pesticides in tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) during pre-harvest intervals by paper spray ionization mass spectrometry, *Food Chem.* 310 (2020) 125938. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125938>.
- [73] N. Wang, H.Y. Tan, S. Li, Y. Xu, W. Guo, Y. Feng, Supplementation of micronutrient selenium in metabolic diseases: Its role as an antioxidant, *Oxid Med Cell Longev.* 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/7478523>.
- [74] H.J. Sun, B. Rathinasabapathi, B. Wu, J. Luo, L.P. Pu, L.Q. Ma, Arsenic and selenium toxicity and their interactive effects in humans, *Environ Int.* 69 (2014) 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.04.019>.
- [75] I. Saidi, Y. Chtourou, W. Djebali, Selenium alleviates cadmium toxicity by preventing oxidative stress in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings, *J Plant Physiol.* 171 (2014) 85–91. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2013.09.024>.
- [76] D. Han, S. Xiong, S. Tu, J. Liu, C. Chen, Interactive effects of selenium and arsenic on growth, antioxidant system, arsenic and selenium species of *Nicotiana tabacum* L., *Environ Exp Bot.* 117 (2015) 12–19. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2015.04.008>.
- [77] P.M. Finnegan, W. Chen, Arsenic toxicity: The effects on plant metabolism, *Front Physiol.* 3 JUN (2012) 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00182>.
- [78] M.A. Farooq, F. Islam, B. Ali, U. Najeeb, B. Mao, R.A. Gill, G. Yan, K.H.M. Siddique, W. Zhou, Arsenic toxicity in plants: Cellular and molecular mechanisms of its transport and metabolism, *Environ Exp Bot.* 132 (2016) 42–52. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2016.08.004>.
- [79] F.M. Bassuany, R. a Hassanein, D.M. Baraka, R.R. Khalil, Role of stigmasterol treatment in alleviating the adverse effects of salt stress in flax plant, *J Agric Technol.* 10 (2014) 1001–1020.
- [80] S.V.C. De Souza, R.G. Junqueira, A procedure to assess linearity by ordinary least squares method, *Anal Chim Acta.* 552 (2005) 25–35.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.07.043>.

- [81] Z. Yanqun, L. Yuan, C. Jianjun, C. Haiyan, Q. Li, C. Schwartz, Hyperaccumulation of Pb, Zn and Cd in herbaceous grown on lead-zinc mining area in Yunnan, China, *Environ Int.* 31 (2005) 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.02.004>.
- [82] INMETRO, Doq-Cgcre-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos, *Inst Nac Metrol Qual e Tecnol.* (2016) 31.
- [83] J.A. Malik, S. Goel, N. Kaur, S. Sharma, I. Singh, H. Nayyar, Selenium antagonises the toxic effects of arsenic on mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) plants by restricting its uptake and enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms, *Environ Exp Bot.* 77 (2012) 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.12.001>.
- [84] B. Hafeez, Role of Zinc in Plant Nutrition- A Review, *Am J Exp Agric.* 3 (2013) 374–391. <https://doi.org/10.9734/ajea/2013/2746>.
- [85] C.A. Lopes Júnior, P. Mazzafera, M.A.Z. Arruda, A comparative ionic approach focusing on cadmium effects in sunflowers (*Helianthus annuus* L.), *Environ Exp Bot.* 107 (2014) 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.002>.
- [86] S.B. Schmidt, P.E. Jensen, S. Husted, Manganese Deficiency in Plants: The Impact on Photosystem II, *Trends Plant Sci.* 21 (2016) 622–632. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.03.001>.
- [87] A.E.A. Päivöke, L.K. Simola, Arsenate toxicity to *Pisum sativum*: Mineral nutrients, chlorophyll content, and phytase activity, *Ecotoxicol Environ Saf.* 49 (2001) 111–121. <https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2044>.
- [88] T. Vernoux, F. Besnard, J. Traas, Auxin at the shoot apical meristem., *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2 (2010) 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001487>.
- [89] R. Chutia, S. Abel, J. Ziegler, Iron and phosphate deficiency regulators concertedly control coumarin profiles in *Arabidopsis thaliana* roots during iron, phosphate, and combined deficiencies, *Front Plant Sci.* 10 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00113>.
- [90] N. Mirza, Q. Mahmood, M.M. Shah, A. Pervez, S. Sultan, Plants as Useful Vectors to Reduce Environmental Toxic Arsenic Content, 2014 (2014).
- [91] N. Bjarnholt, B. Li, J. D'Alvise, C. Janfelt, Mass spectrometry imaging of plant metabolites-principles and possibilities, *Nat Prod Rep.* 31 (2014) 818–837. <https://doi.org/10.1039/c3np70100j>.
- [92] Z. Lin, M. Zhao, S. Zhang, C. Yang, X. Zhang, In situ arsenic speciation on solid surfaces by desorption electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Analyst.* 135 (2010) 1268–1275. <https://doi.org/10.1039/b919972a>.
- [93] and C.A.F. Júlio O. F. Melo, Viviane D. M. Silva, Priscila B. F. Arquelau,

- Mauro R. Silva, Rodinei Augusti, Artigo, Quim Nov. X (2020) 1–7.
- [94] H.J. Munoz Leonardo Pantoja, Diane Purchase, J.F. and H. Garelick, Analytical Methods Enhanced determination of As – phytochelatin complexes in *Chlorella vulgaris* using focused sonication for extraction of water-soluble species †, (2014) 791–797. <https://doi.org/10.1039/c3ay41629a>.
- [95] V. Vacchina, H. Chassaigne, M. Oven, M.H. Zenk, R. Łobiński, Characterisation and determination of phytochelatins in plant extracts by electrospray tandem mass spectrometry, *Analyst*. 124 (1999) 1425–1430. <https://doi.org/10.1039/a905163e>.
- [96] R. Mou, Z. Cao, X. Lin, L. Wu, Z. Cao, Z. Zhu, M. Chen, Characterization of the phytochelatins and their derivatives in rice exposed to cadmium based on high-performance liquid chromatography coupled with data-dependent hybrid linear ion trap orbitrap mass spectrometry, (2016) 1891–1900. <https://doi.org/10.1002/rcm.7669>.
- [97] B.A. Wood, J. Feldmann, Quantification of phytochelatins and their metal (loid) complexes : critical assessment of current analytical methodology, (2012) 3299–3309. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5649-0>.
- [98] Desenvolvimento de métodos não cromatográficos para especiação de selênio empregando ionização por dessorção e extração em fase sólida Desenvolvimento de métodos não cromatográficos para especiação de selênio empregando ionização por dessorção e extração , (2015).
- [99] Especiação química de arsênio em samambaia utilizando espectrometria de massas com ionização ambiente, (2016).
- [100] G. Abbas, B. Murtaza, I. Bibi, M. Shahid, N.K. Niazi, M.I. Khan, M. Amjad, M. Hussain, Natasha, Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants: Physiological, biochemical, and molecular aspects, *Int J Environ Res Public Health*. 15 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijerph15010059>.
- [101] M. Turull, G. Grmanova, À. Dago, C. Ariño, S. Díez, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, Phytochelatin synthesis in response to Hg uptake in aquatic plants near a chlor-alkali factory, *Chemosphere*. 176 (2017) 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.092>.
- [102] B.L. Batista, M. Nigar, A. Mestrot, B.A. Rocha, F.B. Júnior, A.H. Price, A. Raab, J. Feldmann, Identification and quantification of phytochelatins in roots of rice to long-term exposure : evidence of individual role on arsenic accumulation and translocation, 65 (2014) 1467–1479. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru018>.
- [103] F.J. Zhao, J.R. Wang, J.H.A. Barker, H. Schat, P.M. Bleeker, S.P. McGrath, The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*, *New Phytol*. 159 (2003) 403–410. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00784.x>.

- [104] S. Nishida, G. Duan, N. Ohkama-Ohtsu, S. Uraguchi, T. Fujiwara, Enhanced arsenic sensitivity with excess phytochelatin accumulation in shoots of a SULTR1;2 knockout mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, *Soil Sci Plant Nutr.* 62 (2016) 367–372. <https://doi.org/10.1080/00380768.2016.1150790>.
- [105] J.L. Hall, Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, *J Exp Bot.* 53 (2002) 1–11. <https://doi.org/10.1093/jxb/53.366.1>.
- [106] N. Mirza, Q. Mahmood, M. Maroof Shah, A. Pervez, S. Sultan, Plants as useful vectors to reduce environmental toxic arsenic content, *Sci World J.* 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/921581>.
- [107] M. Bouhifd, T. Hartung, H.T. Hogberg, A. Kleensang, L. Zhao, Review : Toxicometabolomics, (2013). <https://doi.org/10.1002/jat.2874>.
- [108] Department of Chemistry . Faculty of Experimental Sciences . b Campus of International, *Anal Chim Acta.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.10.019>.
- [109] W. Dai, Z. Hu, D. Xie, J. Tan, Z. Lin, A novel spatial-resolution targeted metabolomics method in a single leaf of the tea plant (*Camellia sinensis*), *Food Chem.* 311 (2020) 126007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126007>.
- [110] Y. Dong, B. Li, S. Malitsky, I. Rogachev, A. Aharoni, F. Kaftan, A. Svatoš, P. Franceschi, Sample preparation for mass spectrometry imaging of plant tissues: A review, *Front Plant Sci.* 7 (2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00060>.
- [111] A. Badu-Tawiah, C. Bland, D.I. Campbell, R.G. Cooks, Non-Aqueous Spray Solvents and Solubility Effects in Desorption Electrospray Ionization, *J Am Soc Mass Spectrom.* 21 (2010) 572–579. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.12.012>.
- [112] Z. Mou, X. Wang, Z. Fu, Y. Dai, C. Han, J. Ouyang, F. Bao, Y. Hu, J. Li, Silencing of phosphoethanolamine N-methyltransferase results in temperature-sensitive male sterility and salt hypersensitivity in *Arabidopsis*, *Plant Cell.* 14 (2002) 2031–2043. <https://doi.org/10.1105/tpc.001701>.
- [113] S.Y. Neo, K.K. Ho, Genes associated with orchid flower, 2001. <https://doi.org/10.1201/9780203908426>.
- [114] K. V. Wood, C.C. Bonham, D. Miles, A.P. Rothwell, G. Peel, B.C. Wood, D. Rhodes, Characterization of betaines using electrospray MS/MS, *Phytochemistry.* 59 (2002) 759–765. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00049-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00049-3).
- [115] M. Ashraf, M.R. Foolad, Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance, *Environ Exp Bot.* 59 (2007) 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>.

- [116] C. Bredemeier, C.M. Mundstock, Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas, *Ciência Rural*. 30 (2000) 365–372. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782000000200029>.
- [117] H. Shi, T. Ye, F. Chen, Z. Cheng, Y. Wang, P. Yang, Y. Zhang, Z. Chan, Manipulation of arginase expression modulates abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*: Effect on arginine metabolism and ROS accumulation, *J Exp Bot*. 64 (2013) 1367–1379. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers400>.
- [118] S. Clemens, Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants, *Biochimie*. 88 (2006) 1707–1719. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.003>.
- [119] A.P. Barba de la Rosa, A. de León-Rodríguez, B. Laursen, I.S. Fomsgaard, Influence of the growing conditions on the flavonoids and phenolic acids accumulation in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) leaves, *Terra Latinoam*. 37 (2019) 449–457. <https://doi.org/10.28940/terra.v37i4.541>.

APÊNDICE

Apêndice A

Equações das Regressões Capítulo 2

Figura 2.4: As regressões exponenciais decrescentes são significativas ($p < 0.05$) equação para os dados: Se^{IV} ($Y = 7.0300 + 106.1849 \cdot \exp(-0.0231 \cdot x)$), Se^{VI} ($Y = 6.6534 + 91.4111 \cdot \exp(-0.1256 \cdot x)$), As^V ($Y = -11.9512 + 110.1673 \cdot \exp(-0.0127 \cdot x)$) e $As^V + Se^{IV}$ ($Y = 8.3863 + 124.6969 \cdot \exp(-0.0162 \cdot x)$).

Figura 2.5: A regressão exponencial decrescentes é significativa ($p < 0.05$) equação para os dados: Se^{IV} ($Y = 23.0846 + 97.6999 \cdot \exp(-0.00 \cdot x)$) e não significativa ($p > 0.05$) para Se^{VI} ($Y = 21.8426 + 35.1431 \cdot \exp(-0.0618 \cdot x)$). Regressões quadraticas são significativas ($p < 0.05$) equação para os dados: As^V ($Y = 117.3323 + 2.2893 \cdot x - 0.0014 \cdot x^2$) e $As^V + Se^{IV}$ ($Y = 99.7544 + 0.2346 \cdot x - 0.0040 \cdot x^2$).

Figura 2.6: As regressões exponenciais decrescentes são significativas ($p < 0.05$) equação para os dados: Se^{VI} ($Y = 376.929 + 3866.4348 \cdot \exp(-0.0445 \cdot x)$). Regressões quadraticas são significativas ($p < 0.05$) equação para os dados: Se^{IV} em folhas ($Y = 3.3728 + 2.9620 \cdot x - 0.0028 \cdot x^2$), Se^{VI} ($Y = 378.316 - 1.118 \cdot x + 0.016 \cdot x^2$) and Se^{IV} ($Y = -26.005 + 6.725 \cdot x + 0.003 \cdot x^2$) em caule, Se^{VI} ($Y = 220.938 + 4.923 \cdot x - 0.009 \cdot x^2$) e Se^{IV} ($Y = -431.833 + 21.579 \cdot x + 1.689 \cdot x^2$) em raízes.

Figura 2.7: Regressões quadraticas são significativas ($p < 0.05$) equação para os dados As^V ($Y = -0.5980 + 0.6276 \cdot x - 0.0016 \cdot x^2$), $As^V + Se^{IV}$ (Concentração As: $Y = 23.3460 + 1.9812 \cdot x - 0.0046 \cdot x^2$, Concentração Se: $Y = 51.8113 - 0.7016 \cdot x + 0.0036 \cdot x^2$) em folhas, As^V ($Y = -20.2588 + 2.2050 \cdot x - 0.0069 \cdot x^2$), $As^V + Se^{IV}$ (Concentração As: $Y = 7.1193 + 2.6525 \cdot x - 0.0033 \cdot x^2$, Concentração Se: $Y = 70.7053 - 1.5171 \cdot x + 0.0112 \cdot x^2$) em caule, As^V ($Y = 23.1982 + 1.4484 \cdot x + 0.0056 \cdot x^2$), $As^V + Se^{IV}$ (Concentração As: $Y = 235.7455 + 20.3452 \cdot x - 0.0688 \cdot x^2$, Concentração Se: $Y = 410.9742 - 5.4625 \cdot x + 0.0537 \cdot x^2$) em raiz.

Apêndice B

Espectros PS(+)-MS/MS GSH [γ -Glu-Cys-Gly]⁺ m/z 308; red-PC₂ [(GluCys)₂Gly]⁺ m/z 540; red-PC₃ [γ -(GluCys)₃Gly]⁺ m/z 772; SePC₂ [γ -(GluCys)₂SeGly]⁺ m/z 618; AsPC₃ [γ -(GluCys)₃AsGly]⁺ m/z 844

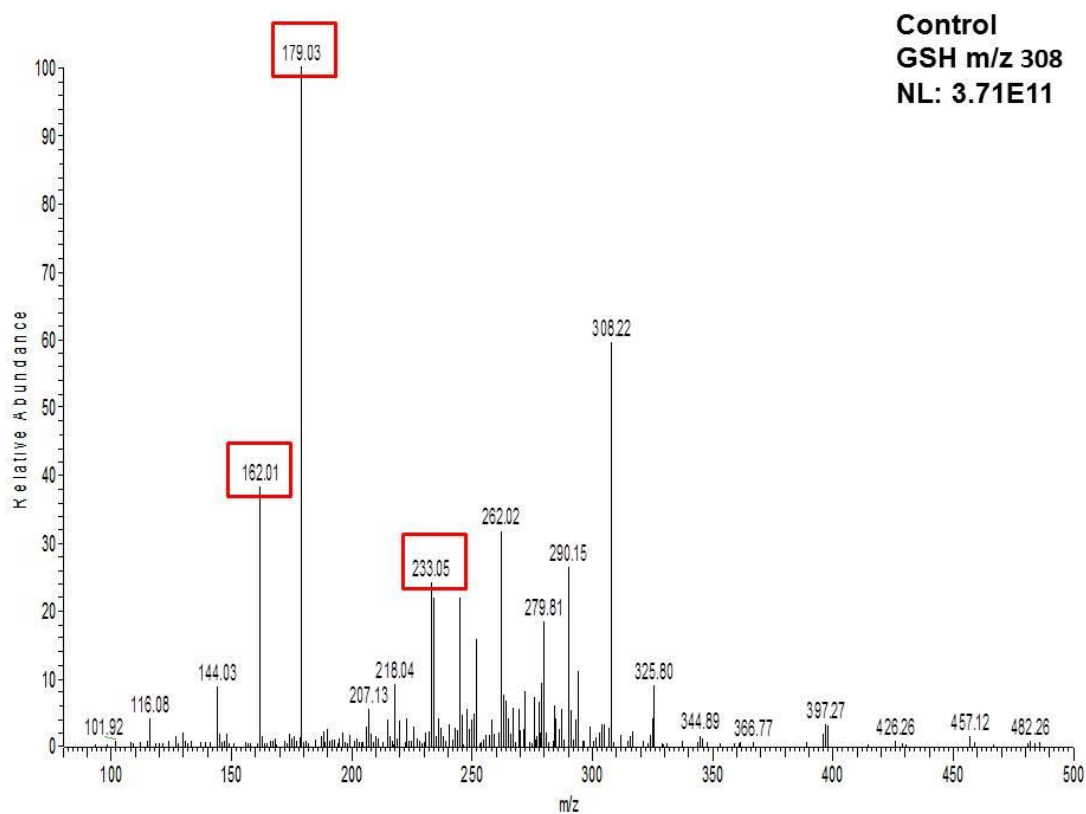


Figura A1 - Espectros PS(+)-MS/MS GSH [γ -Glu-Cys-Gly]⁺ m/z 308 para extratos de raízes de plantas controle

amostra 2 As +5uM Se 300-500_200131104833#1-26 RT: 0.00-0.39 AV: 26 NL: 1.09E1
 T: ITMS + c.NSI.Full.ms2.308.00@cid25.00 [80.00-500.00]

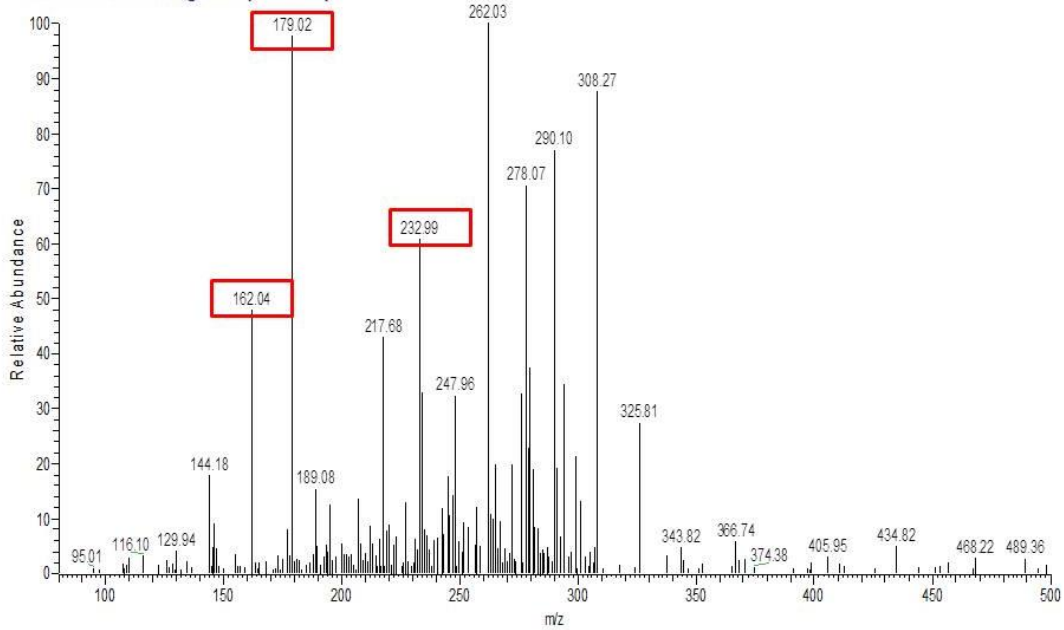


Figura A2 - Espectros PS(+)-MS/MS GSH $[\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}]^+$ m/z 308 para extratos de raízes de plantas expostas As^{V} ($50\mu\text{M}$) + Se^{IV} ($5\mu\text{M}$)

amostra 3 As+25uM Se 300-500_200131141034#4-26 RT: 0.04-0.49 AV: 23 NL: 4.47E1
 T: ITMS + c.NSI.Full.ms2.308.00@cid25.00 [80.00-300.00]

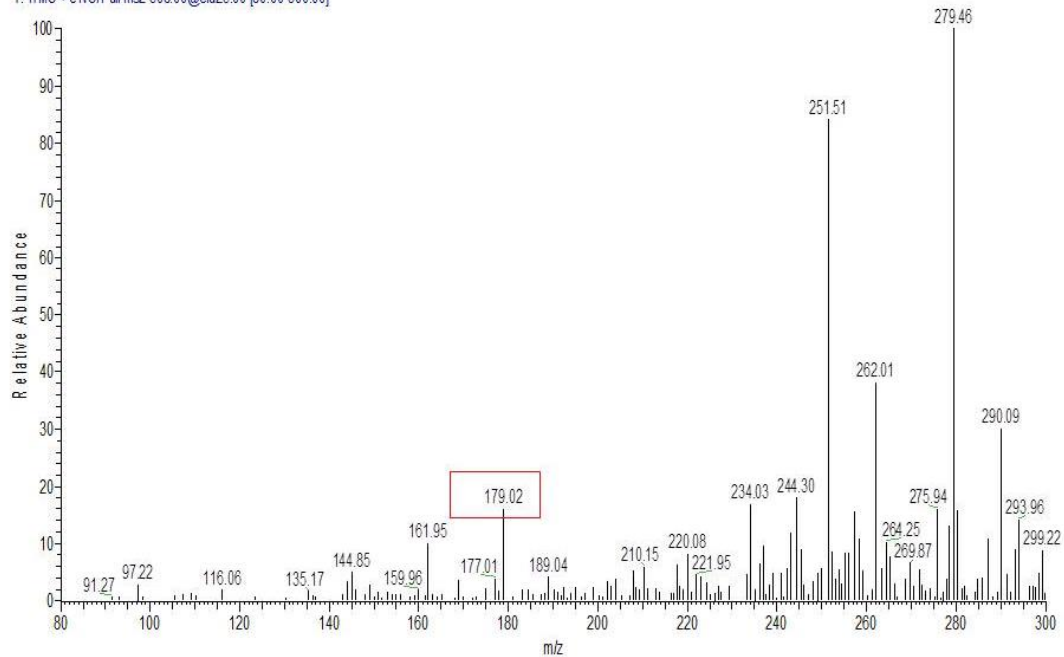


Figura A3 - Espectros PS(+)-MS/MS GSH $[\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}]^+$ m/z 308 para extratos de raízes de plantas expostas As^{V} ($50\mu\text{M}$) + Se^{IV} ($25\mu\text{M}$)

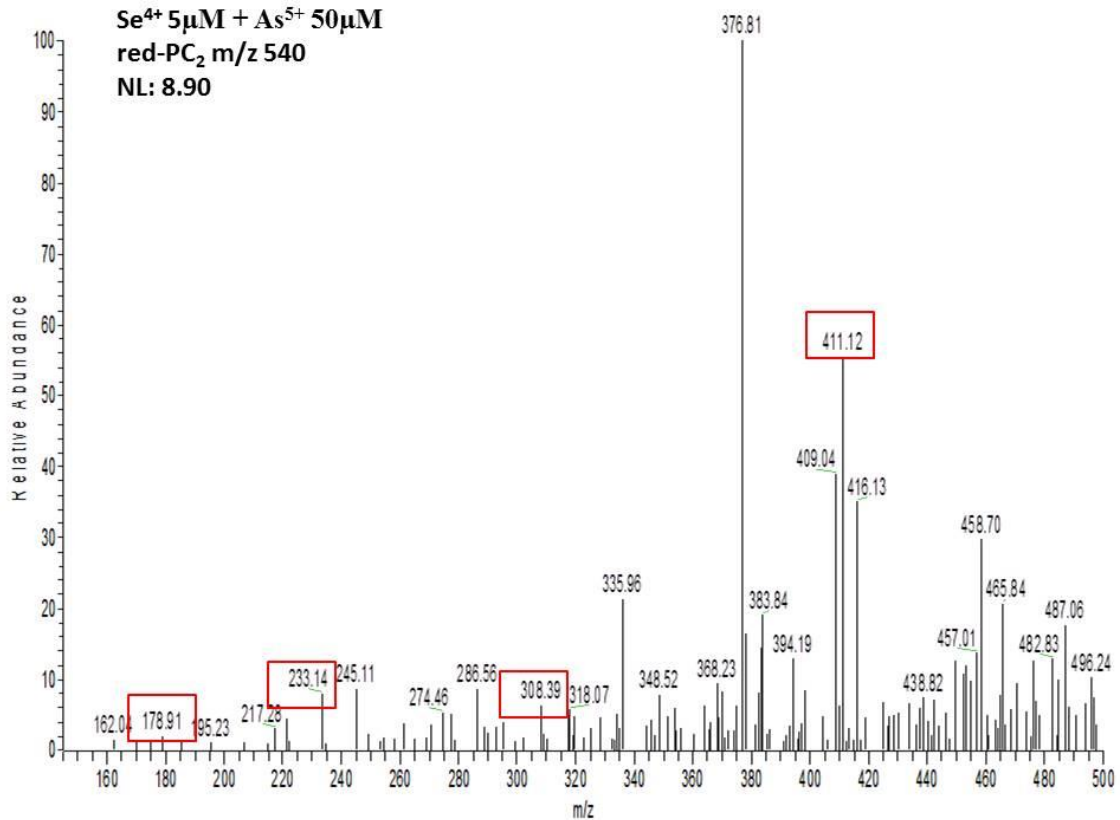


Figura A4 - Espectros PS(+)-MS/MS red-PC₂ [(GluCys)₂Gly]⁺ m/z 540 para extratos de raízes de plantas expostas As^V (50μM) + Se^{IV} (5 μM)

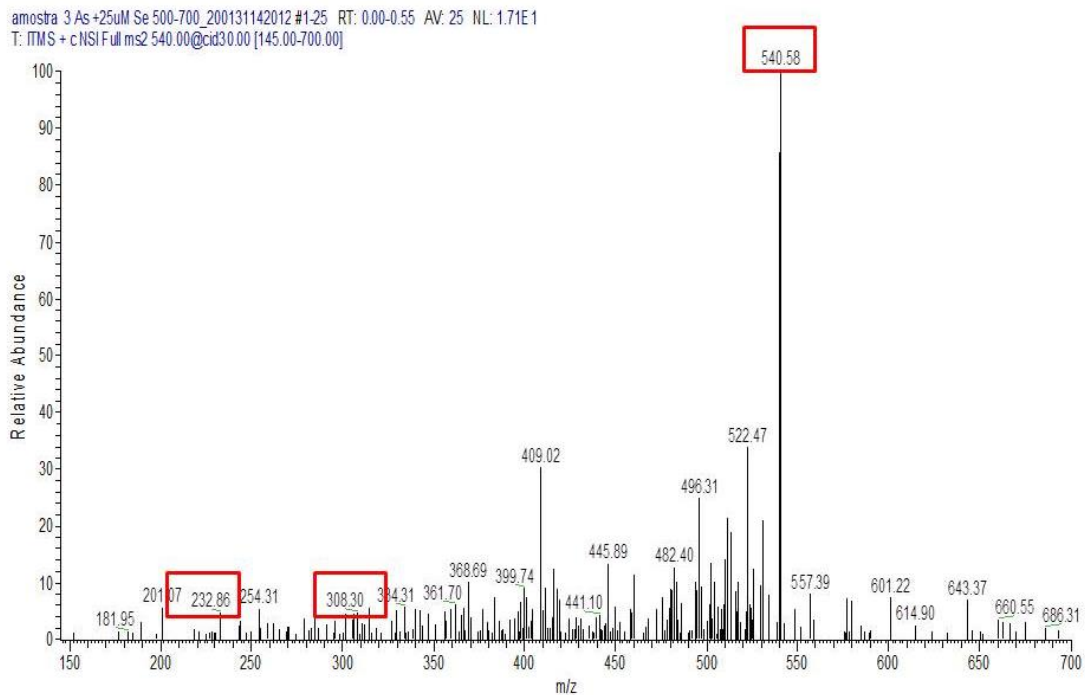


Figura A5 - Espectros PS(+)-MS/MS red-PC₂ [(GluCys)₂Gly]⁺ m/z 540 para extratos de raízes de plantas expostas As^V (50μM) + Se^{IV} (25 μM)

amostra 2 As +5uM Se 700-800_200131113516#4-26 RT: 0.04-0.44 AV: 23 NL: 3.10
T: FTMS + c NSI Full ms2 772.00@cid35.00 [210.00-900.00]

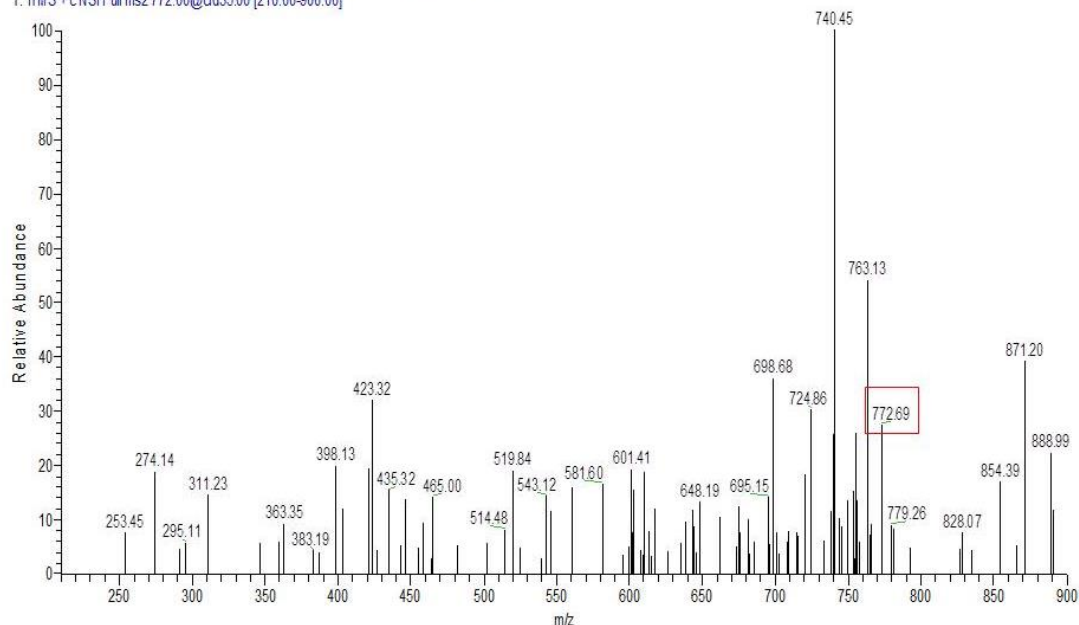


Figura A6 - Espectros PS(+)-MS/MS red-PC₃ [(GluCys)₃Gly]⁺ m/z 772 para extratos de raízes de plantas expostas As^V (50µM) + Se^{IV} (5 µM)

NL: 5.48

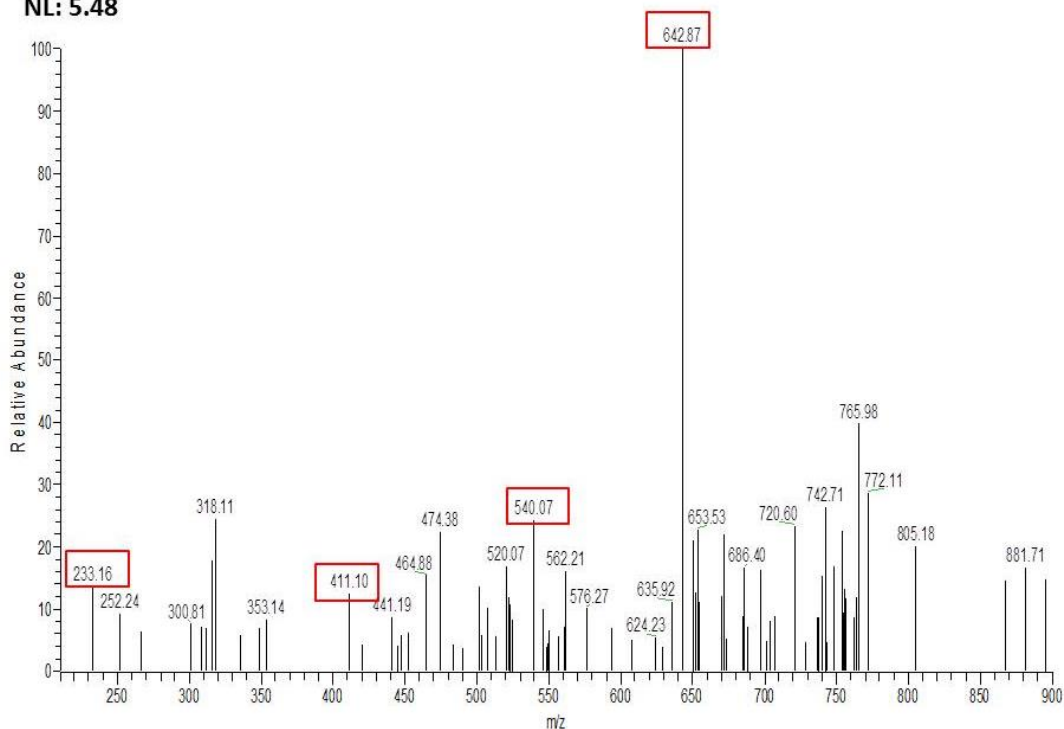


Figura A7 - Espectros PS(+)-MS/MS red-PC₃ [(GluCys)₃Gly]⁺ m/z 772 para extratos de raízes de plantas expostas As^V (50µM) + Se^{IV} (25 µM)

amostra 2 As+5uM Se 500-700 200131111455 #2-26 RT: 0.00-0.42 AV: 25 NL: 1.34E1
T: ITMS + cNSI Fullms2 618.00@cd30.00 [170.00-700.00]

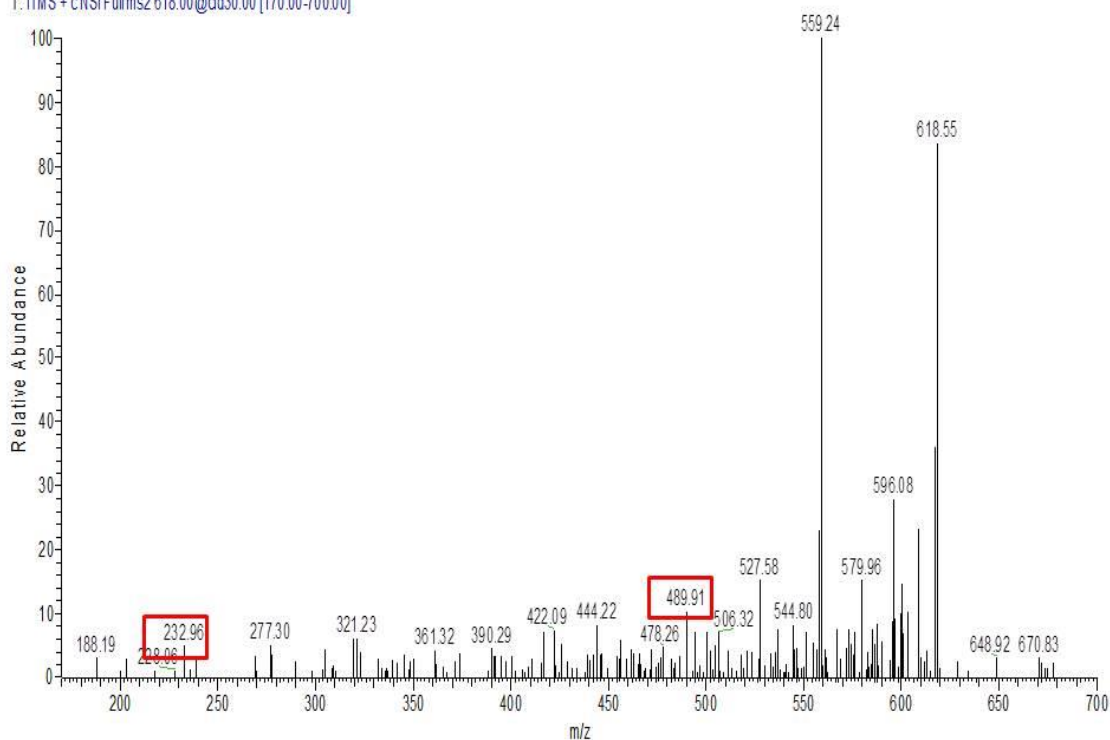


Figura A8 - Espectros PS(+)-MS/MS SePC₂ [γ-(GluCys)₂SeGly]⁺ m/z 618 para extratos de raízes de plantas expostas As^V (50μM) + Se^{IV} (5 μM)

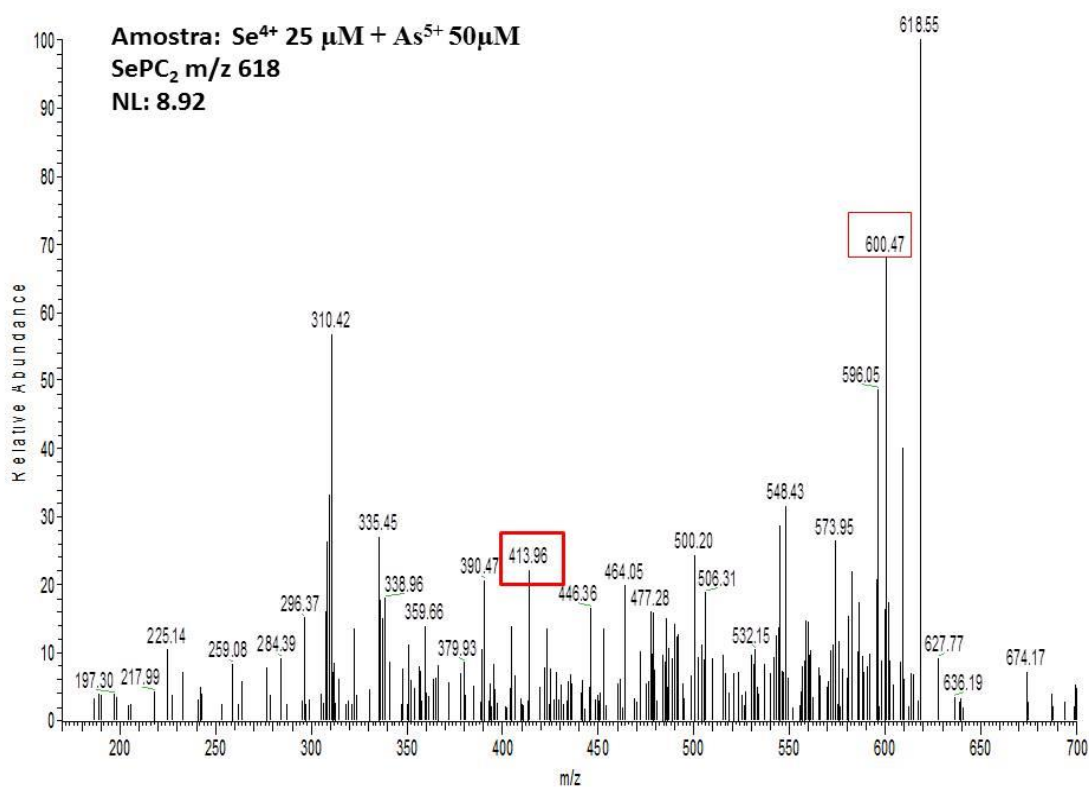


Figura A9 - Espectros PS(+)-MS/MS SePC₂ [γ-(GluCys)₂SeGly]⁺ m/z 618 para extratos de raízes de plantas expostas As^V (50μM) + Se^{IV} (25 μM)

amostra2 As +5uM Se 700-900_200131114937 #2-26 RT: 0.00-0.45 AV: 25 NL: 158
T: ITMS + c.NSI Full ms2 844.00@cid40.00 [230.00-900.00]

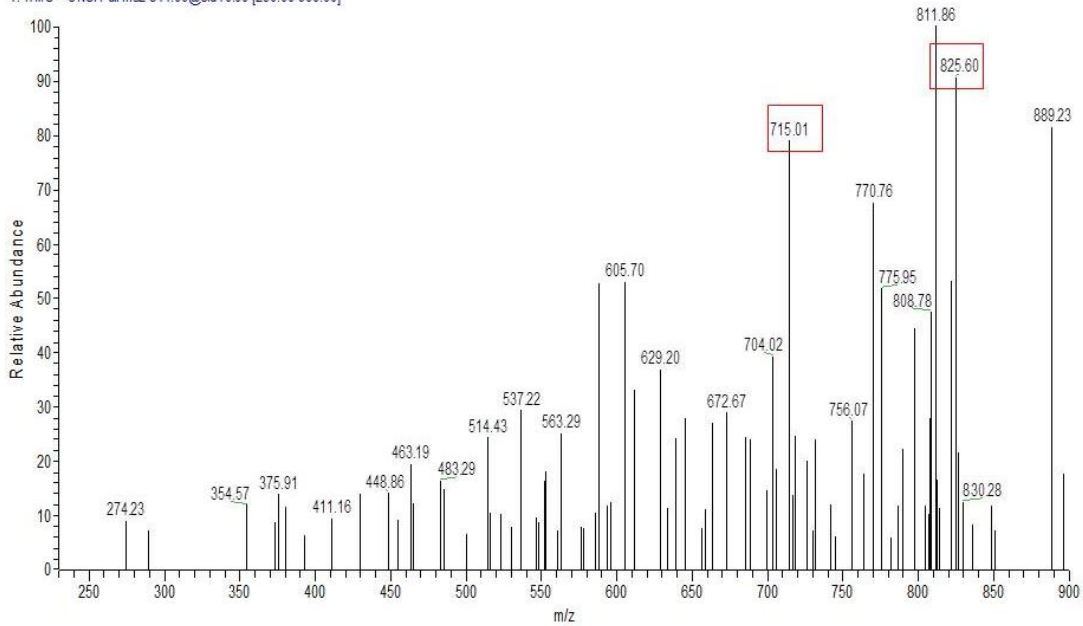


Figura A10 - Espectros PS(+)-MS/MS AsPC₃ [γ-(GluCys)₃AsGly]⁺ m/z 844 para extratos de raízes de plantas expostas As^V (50 μM) + Se^{IV} (5 μM)

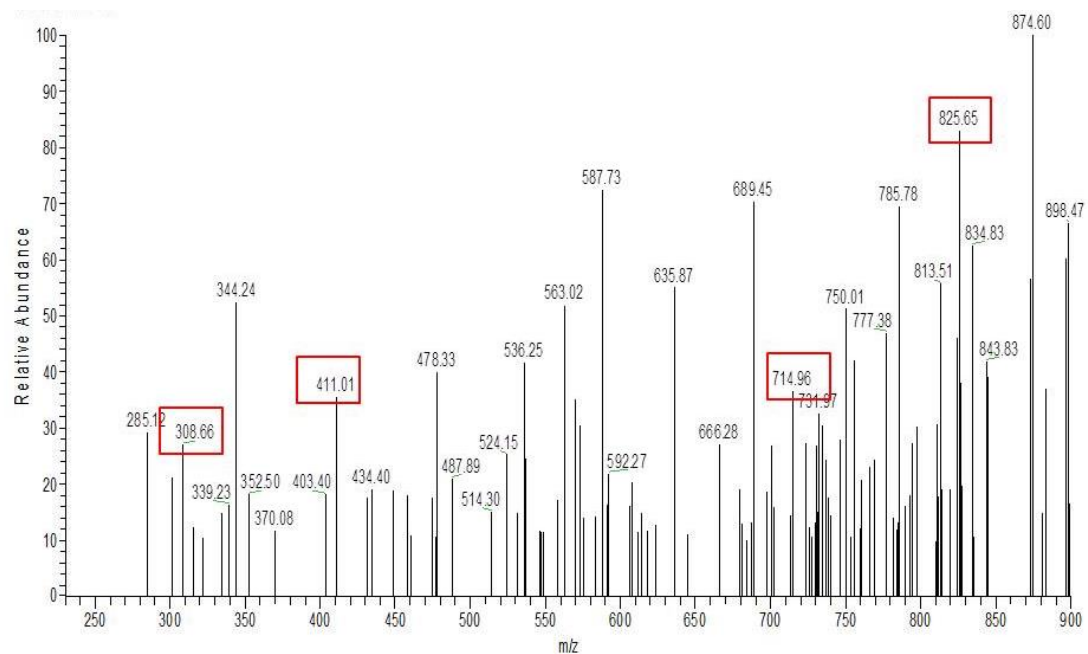


Figura A11 - Espectros PS(+)-MS/MS AsPC₃ [γ-(GluCys)₃AsGly]⁺ m/z 844 para extratos de raízes de plantas expostas As^V (50 μM) + Se^{IV} (25 μM)

Apêndice C

Imagens químicas obtidas por DESI-MSI dos íons referentes ao metabólitos formados pela exposição ao selenito e co-exposição ao arsenato e selenito

