

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

Vânia de Lourdes das Graças Teles

**Desenvolvimento de procedimentos analíticos para avaliação ionômica e
metabolômica em manjeriço (*Ocimum basilicum* L. grecco a palla) exposto ao
Cádmio**

Belo Horizonte, MG

2021

UFMG/ICEX/DQ. 1.459

T. 666

Vânia de Lourdes das Graças Teles

**Desenvolvimento de procedimentos analíticos para avaliação ionômica e
metabolômica em manjeriço (*Ocimum basilicum* L. grecco a palla) exposto ao
cádmio**

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

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Malta Costa

Coorientador: Prof. Dr. Rodinei Augusti

Belo Horizonte

2021

Ficha Catalográfica

T269d Teles, Vânia de Lourdes das Graças
2021 Desenvolvimento de procedimentos analíticos para
T avaliação ionômica e metabolômica em manjeriço
(Ocimum basilicum L. grecco a palla) exposto ao cádmio
[manuscrito] / Vânia de Lourdes das Graças Teles.
2021.

157 f. : il.

Orientadora: Letícia Malta Costa.

Coorientador: Rodinei Augusti.

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

Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses. 2. Extração (Química)
- Teses. 3. Manjeriço - Teses. 4. Cádmio - Teses. 5.
Plantas - Efeito do cádmio - Teses. 6. Espectrometria
de massa - Teses. 7. Análise de componentes principais
- Teses. 8. Ionização - Teses. I. Costa, Letícia
Malta, Orientadora. II. Augusti, Rodinei,
Coorientador. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Desenvolvimento de Procedimentos Analíticos para Avaliação Ionômica e Metabotômica em Manjerição (*Ocimum basilicum* L. grecco a palla) Exposto ao Cádmiio"

Vânia De Lourdes Das Graças Teles

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profs. Letícia Malta Costa - Orientadora
UFMG

Prof. Rodinei Augusti - Coorientador
UFMG

Profs. Ana Rita de Araújo Nogueira
EMBRAPA

Profs. Adriana Nori de Macedo
UFMG

Profs. Clésia Cristina Nascentes
UFMG

Prof. Josué Carinhanha Caldas Santos
UFAL

Belo Horizonte, 03 de setembro de 2021



Documento assinado eletronicamente por Josué Carinhanha Caldas Santos, Usuário Externo, em 03/09/2021, às 18:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Adriana Nori de Macedo, Professora do Magistério Superior, em 03/09/2021, às 18:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Clésia Cristina Nascentes, Membro de comissão, em 03/09/2021, às 18:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por Rodinei Augusti, Professor do Magistério Superior, em 03/09/2021, às 18:08, conforme horário oficial
https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=986384&infra_sistema=... 1/2



de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Malta Costa**, Professora do Magistério Superior, em 03/09/2021, às 18:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Rita de Araújo Nogueira**, Usuário Externo, em 03/09/2021, às 18:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



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 0931649 e o código CRC 281CC014.

Aos meus pais, José Nazaré das Graças e Maria
Auxiliadora das Graças, pelo exemplo de vida.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à Deus por abençoar minha vida e pela oportunidade de realizar o doutorado sob orientação da Profa. Dra. Letícia Malta Costa. À esta professora minha admiração e agradecimento pelo incentivo, apoio e confiança ao longo dos últimos 4 anos. Obrigada também por me fazer enxergar na escuridão e reacender a luz científica para continuar a caminhada rumo às perspectivas técnico-analíticas;

Ao meu coorientador Prof. Dr. Rodinei Augusti pelos ensinamentos, apoio e grandes contribuições na discussão e avaliação dos resultados;

Aos meus filhos Kaíc Fernando e Fernando Kaíc, tesouros que ganhei de Deus, pela compreensão da minha ausência e conforto nos momentos mais difíceis;

Ao meu esposo Fernando Lúcio Teles, companheiro de longa jornada, o meu muito obrigada pelo apoio, incentivo e compreensão. Amo você!

À Léia, Lú, Jú e Sassá, da digníssima família “das Graças”, obrigada pela fraternidade que me suporta emocionalmente;

Ao engenheiro e sobrinho Felipe Augusto Vitoriano, politicamente “primo”, pela amizade, grandes parcerias profissionais e por ser tão presente na minha vida;

Ao meu cunhado Marcelo, pelas contribuições na habilidade em impressão 3D;

À Universidade Estadual de Roraima (UERR) pela liberação para realização do doutorado;

Ao Programa de Pós Graduação em Química da UFMG e à CAPES pela oportunidade e aos professores pelos ensinamentos;

Às profas. Dra. Adriana Nori e Dra. Mariana Ramos Almeida pelas valiosas contribuições neste trabalho;

Às professoras Dra. Clésia Nascentes e Dra. Cláudia C. Windmoller e aos colegas do LEAQUAA e da Pós Graduação, em especial à Giselle Vaz, Amanda Silveira, Igor Forattini, Ana Gabriela, Marcus Rezende, Izabella Gagliardi, Sofia Martins, Dayviston e Henrique pela convivência e trocas de experiências;

Ao Pedro Vendraminni que contribuiu com a obtenção das imagens por DESI-MSI no Laboratório ThoMSon da UNICAMP;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto, MUITO OBRIGADA!

É preciso crer no que se procura
para a beleza do que se encontra...
É preciso partir
para descobrir a emoção de ficar...

(Autor desconhecido)

RESUMO

Neste estudo, o manjeriçao (*Ocimum basilicum* L. grecco a palla) foi cultivado em soluçao nutritiva de Hoagland 5% v v⁻¹ e exposto a diferentes concentraçoes de Cd^{II}. Um procedimento de microextraçao assistida por ultrassom (MUS) foi otimizado (2% v v⁻¹ HNO₃, 100 µL H₂O₂, 50% de amplitude e 5 minutos de tempo de extraçao), validado e aplicado em folha, caule e raiz para determinaçao multielementar por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Os limites de detecçao e quantificaçao do procedimento variaram de 0,022 a 5,33 µg g⁻¹ (Be e K) e 0,066 a 20,1 µg g⁻¹ (Be e Ca), respectivamente. A partir dos resultados obtidos, foi realizada uma avaliaçao ionomica que indicou que o Cd acumulou preferencialmente nas raizes e translocou para a parte aerea causando serios danos as plantas, incluindo os efeitos na absorçao e translocaçao de elementos essenciais. A analise por componentes principais (PCA) e a analise de agrupamento hierarquico (HCA) discriminou folhas, caules e raizes pelo perfil ionomico para as diferentes suplementaçoes de Cd^{II}. Nos estudos metabolomicos, utilizou-se a espectrometria de massas por Paper Spray (PS-MS) para a identificaçao de glutathione (GSH), fitoquelatinas e seus derivados, alem de complexos de Cd em raizes cultivadas por 7 e 14 dias. Em plântulas expostas ao Cd foram identificados iso-PC₂(Cys), des-Gly-PC₃, iso-PC₃(Asn ou Ser ou Gln ou Glu), alem de diferentes complexos de Cd, formados pela planta como mecanismo de defesa a intoxicaçao. Por dessorçao induzida por ionizaçao electrospray acoplada a espectrometria de massas (DESI-MSI) foram analisados *imprint* de folhas (0; 1,0; 3,6; 5,0; 25,0 e 50,0 µM de Cd^{II}) e raizes (0 e 25,0 µM de Cd^{II}) e, tambem foi feita analise direta das folhas submetidas a diferentes concentraçoes de Cd^{II} (0; 1,0; 3,6; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 µM) para avaliaçao metabolomica *untarget*. As imagens mostraram que o Cd interferiu no metaboloma do manjeriçao por inibiçao/estimulo na sintese de metabolitos, incluindo a sinalizaçao biologica de 24, 20 e 8 potenciais biomarcadores de folhas, raiz e ambos os orgaos, respectivamente. Os resultados mostraram-se efetivos para analise ionomica e metabolomica *target* e *untarget* em folhas e raizes, sendo promissores para novos estudos envolvendo mecanismos de defesa das plantas expostas a diferentes metais toxicos.

Palavras-chave: microextraçao; manjeriçao; cadio; ionizaçao ambiente; imageamento.

ABSTRACT

In this study, basil (*Ocimum basilicum* L. grecco a palla) was cultivated in 5% v⁻¹ Hoagland nutrient solution and exposed to different concentrations of Cd^{II}. An ultrasound-assisted microextraction (MUS) procedure was optimized (2% v v⁻¹ HNO₃, 100 µL H₂O₂, 50% amplitude and 5 min extraction time), validated and applied to leaf, stem and root for multielemental determination by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The detection and quantification limits of the procedure ranged from 0.022 to 5.33 µg g⁻¹ (Be and K) and from 0.066 to 20.1 µg g⁻¹ (Be and Ca), respectively. From the results obtained, an ionic evaluation was performed indicating that Cd preferentially accumulated in the roots and translocated to the aerial part causing serious damage to plants, including effects on the uptake and translocation of essential elements. Principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) discriminated leaves, stems, and roots by ionic profile for the different Cd(II) supplementations. In metabolomics studies, Paper Spray Mass Spectrometry (PS-MS) was used to identify glutathione (GSH), phytochelatins and their derivatives, besides Cd complexes in roots that were cultivated for 7 and 14 days. In seedlings exposed to Cd, iso-PC₂(Cys), des-Gly-PC₃, iso-PC₃(Asn or Ser or Gln or Glu) and different Cd complexes formed by the plant as a defense mechanism to intoxication were identified. By Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging (DESI-MSI), leaf imprint (0; 1.0; 3.6; 5.0; 25.0 and 50.0 µM of Cd^{II}) and root imprint (0 and 25.0 µM of Cd^{II}) were analysed and a direct analysis of leaves submitted to different concentrations of Cd^{II} (0; 1.0; 3.6; 10.0; 25.0; 50.0 and 100.0 µM) was also performed for untarget metabolomic evaluation. The images showed that Cd interfered in the basil metabolome by inhibition/stimulation in metabolite synthesis, including biological signaling of 24, 20 and 8 potential biomarkers from leaves, root and both organs, respectively. The results proved to be effective for target and untarget ionic and metabolomic analysis in leaves and roots and they are promising for further studies involving defense mechanisms of plants exposed to different toxic metals.

Keywords: microextraction; basil; cadmium; ambient ionization; imaging.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismos de transporte e translocação de Cd em plantas. Adaptado de Song et al. (2017).....	28
Figura 2 – Principais etapas envolvidas na absorção de cádmio (Cd ^{II}) e sua desintoxicação por fitoquelatinas (PCs) em células vegetais. Adaptado de Ahmad et al. (2019).....	32
Figura 3 – Estrutura básica dos flavonoides, classes e exemplos. Fonte: Adaptado de Panche, Diwan e Chandra (2016)	34
Figura 4 – Formação das microbolhas e colapso para extração multielementar. Fonte: Própria.....	39
Figura 5 – Sonorreator <i>cup horn</i> Sonics VCX 505 (Newton, CT, USA).....	40
Figura 6 – Esquema de análise multielementar de extratos vegetais por ICP-MS. Fonte: Própria.....	43
Figura 7 – Esquema da análise de extratos por PS-MS. Fonte: Própria	46
Figura 8 – Esquema do funcionamento do DESI-MSI em amostras de folhas. Fonte: Adaptado de Teles <i>et al.</i> (2021)	49
Figura 9 – Desenvolvimento de radículas durante o processo de germinação das sementes de manjeriço <i>Grecco a Palla</i> (<i>Ocimum basilicum</i>). Fonte: Própria.....	52
Figura 10 - Cultivo do manjeriço em solução nutritiva de Hoagland a 5% v v ⁻¹ . Fonte: Própria.....	53
Figura 11 – Esquema do cultivo, cálculo da EC ₅₀ e separação dos tecidos vegetais para análise multielementar	54
Figura 12 – (A) Suporte para microtubos adaptado (B) copo do sonorreator <i>cup horn</i> . Fonte: Própria.....	56
Figura 13 – Preparo das amostras de raízes do manjeriço para análise por PS-MS.	60
Figura 14 – Análise de extratos das raízes do manjeriço por PS-MS. Fonte: Própria	60
Figura 15 – Folhas de manjeriço sendo analisadas por DESI-MSI por (A) Análise direta e (B) <i>imprint</i> . Fonte: Própria	61
Figura 16 – Fluxograma das análises de folhas e raízes de manjeriço por DESI-MSI sob diferentes condições experimentais	63

Figura 17 – Acumulação de biomassa ($\bar{x} \pm s$, n = 3) em tecidos de <i>Ocimum basilicum</i> var. Grecco a Palla afetados pelo aumento da concentração de Cd (1,0 -100,0 μM). Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos para um certo órgão (folha, caule ou raiz) como atestado pelo teste de comparação múltipla de Tukey (pós-teste ANOVA $p < 0,05$). Asteriscos indicam diferença significativa entre os órgãos no mesmo tratamento ($p < 0,05$). Os valores das porcentagens são relativos à folha, caule e raiz da amostra controle, em que foram considerados como 100 %.	65
Figura 18 – Amostras de manjeriço cultivadas em solução de Hoagland 5% v v ⁻¹ suplementadas com Cd ^{II} (A) 0 μM (B) 3,6 μM (EC ₅₀) (C) 25,0 μM (D) 100,0 μM após 15 dias de cultivo.	66
Figura 19 – Diagrama de Pareto para as respostas múltiplas (A) RM _{Cd} (mg kg ⁻¹) e (B) RM _{mult} (mg kg ⁻¹)	69
Figura 20 – (A) Superfície de resposta e (B) diagrama de contorno para a resposta RM _{mult} da concentração de HNO ₃ (%) em relação ao volume de H ₂ O ₂ (μL)	72
Figura 21 – Concentrações de Cádmio (A), alumínio (B), bário (C), berílio (D), lítio (E) e estrôncio (F) em folhas, caules e raízes de manjeriço expostas a diferentes concentrações de Cd ^{II} (0; 1,0; 3,6; 5,0; 10,0; 25,0, 50,0 e 100,0 μM), n=3.	78
Figura 22 – Concentrações (mg g ⁻¹) de cálcio (A), cobre (B), ferro (C), potássio (D), magnésio (E), manganês (F) e zinco (G) em folhas, caules e raízes de amostras de manjeriço expostas a diferentes concentrações de Cd (0; 1,0; 3,6; 5,0; 10,0; 25,0, 50,0 e 100,0 μM), n=3.	79
Figura 23 – Correlogramas para a concentração dos metais nas matrizes de manjeriço obtida por ICP-MS após aplicação do procedimento MUS: (A) folhas, (B) caules e (c) raízes	81
Figura 24 – Gráfico de escores para todas as amostras (folhas, caules e raízes) (A) e gráfico de <i>loadings</i> (B) gerado pela PCA com diferentes concentrações de Cd: controle (0 μM); 1 (3,6 μM); 2 (5,0 μM); 3 (25,0 μM); 4 (50,0 μM) e 5 (100,0 μM).	87
Figura 25 – Dendrograma para análise ionômica de manjeriço exposto a diferentes concentrações de Cd: controle (0 μM); 1 (3,6 μM); 2 (5,0 μM); 3 (25,0 μM); 4 (50,0 μM) e 5 (100,0 μM).	88
Figura 26 – Foto de manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> L.) após 14 dias de suplementação com Cd ^{II} . Amostra controle (esquerda) e contaminada a 10 μM de Cd ^{II} (direita). Fonte: Própria	89

Figura 27 – Espectros MS ² por PS(+)-MS com estrutura e fragmentos de <i>m/z</i> 308, GSH (A) <i>m/z</i> 322, hGSH (B) e <i>m/z</i> 613 GSSG (C) em raiz contaminada de manjeriçã a 10,0 µM de Cd durante 14 dias	91
Figura 28 – Espectro MS ² por PS(+)-MS com a estrutura de <i>m/z</i> 420 (GSH-Cd) e seus fragmentos	92
Figura 29 – Intensidade de sinal para <i>m/z</i> 308 (GSH), <i>m/z</i> 322 (hGSH), <i>m/z</i> 540 (PC ₂), <i>m/z</i> 613 (GSSG) e <i>m/z</i> 554 (hPC ₂) por PS(+)-MS para raízes de manjeriçã do grupo controle (0 µM) e 10 µM de exposição ao Cd ^{II} (14 dias, n = 2)	93
Figure 30 – Comparação da intensidade de sinal para <i>m/z</i> 355 (GSH), <i>m/z</i> 420 (hGSH), <i>m/z</i> 483 (des-Gly-PC ₂), <i>m/z</i> 509 (des-Cys-iso-PC ₂ (Glu)), <i>m/z</i> 540 (PC ₂), <i>m/z</i> 554 (hPC ₂), <i>m/z</i> 570 (iso- PC ₂ (Ser)), <i>m/z</i> 586 (iso-PC ₂ (Cys)), <i>m/z</i> 597 (iso-PC ₂ (Asn)), <i>m/z</i> 611 (iso-PC ₂ (Gln)), <i>m/z</i> 612 (iso-PC ₂ (Glu)), <i>m/z</i> 613 (GSSG), <i>m/z</i> 715 (des-Gly-PC ₃), <i>m/z</i> 772 (PC ₃), <i>m/z</i> 802 (iso-PC ₃ (Ser)), <i>m/z</i> 829 (iso-PC ₃ (Asn)), <i>m/z</i> 843 (iso-PC ₃ (Gln)), <i>m/z</i> 844 (iso-PC ₃ (Glu)) para amostras de raízes de manjeriçã exposto a 10 µM por 7 e 14 dias (n = 2)	95
Figura 31 – Comparação da intensidade de sinal para <i>m/z</i> 355 (Cys-Cd-Cys), <i>m/z</i> 420 (GSH-Cd), <i>m/z</i> 541 (Cys-Cd-GSH), <i>m/z</i> 652 (Cd-PC ₂), <i>m/z</i> 727 (GSH-Cd-GSH), de amostras de raízes de manjeriçã exposto a 10 µM por 7 e 14 dias (n = 2)	96
Figura 32 – Folhas nas concentrações (0; 1,0; 3,6; 5,0; 25,0 e 50 µM) após o <i>imprint</i> e seu <i>imprint</i> em (A) membrana PTFE (B) placa de TLC	97
Figura 33 – Comparação do <i>imprint</i> de folhas nas concentrações (0; 1,0; 3,6; 5,0; 25,0 e 50 µM) em diferentes substratos: (membrana PTFE) (A) e placa de TLC (B).....	98
Figura 34 – Diagrama de Venn para compostos identificados no <i>imprint</i> de folha (F) de manjeriçã cultivado em 0, 1, 3,6, 5, 25 e 50 µM de Cd ^{II} . (A) compostos nas menores concentrações; (B) Compostos nas maiores concentrações.....	99
Figura 35 – Potenciais Metabólitos biomarcadores de Cd em folhas de manjeriçã após exposição a diferentes concentrações de Cd.	101
Figura 36 – Imagem de metabólitos com características de distribuição espacial específica para folhas expostas a diferentes concentrações de Cd.....	102
Figura 37 – Imagem de possíveis metabólitos biomarcadores em folhas expostas a diferentes concentrações de Cd.....	104
Figura 38 – Imagem de metabólitos em folhas expostas a diferentes concentrações de Cd.que foram inibidos	105

Figura 39 – (A) Amostras de folhas de manjerição nas concentrações de Cd ²⁺ iguais a 0 (controle); 1; 3,6; 10; 25; 50 e 100 µM (B) Imagem de metabólitos obtidos pela análise direta das folhas expostas ao Cd.....	107
Figura 40 – Imagem de fitohormônios obtidos pela análise direta das folhas expostas a diferentes concentrações de Cd.....	109
Figura 41 – Amostras de manjerição analisadas por DESI-MSI, após <i>imprint</i> e o <i>imprint</i> de folha (A) e raiz (B)	110
Figura 42 – Diagrama de Venn para o número de compostos obtidos no <i>imprint</i> de folha (F) e raiz (R) de manjerição cultivado em 0 e 25 µM de Cd ^{II} . (A) 207 compostos identificados e (B) 79 compostos desconhecidos.....	110
Figura 43– Metabólitos comuns em raiz e folha de manjerição (A) biomarcadores em folha e/ou raiz e (B) inibidos pela presença de Cd	111
Figura 44 – Imagens de metabólitos específicos de (A) folha (F 0 µM), (B) Raiz (R 0 µM) e (C) ambos os �rg�os (F e R) de manjerição que foram inibidos pela presença de Cd.....	114
Figura 45 – Imagens de metabólitos biomarcadores de Cd em raiz de manjerição	115
Figura 46 – Imagens de metabólitos biomarcadores de Cd somente na folha (A) e em ambos os órgãos (folha e raiz) (B) de manjerição.....	116
Figura 47 – Imagens de metabólitos (A) de raiz com acumulação em folha exposta a Cd; (B) de folha com acumulação em raiz exposta a Cd	117
Figura 48 – Imagens de metabólitos com relação (A) antagônica na acumulação nos tecidos vegetais;(B) inibitória em folha; (C) inibitória, na distribuição espacial e acumulação em folha; (D) inibitória e de acumulação em raiz	118
Figura 49 – Potenciais biomarcadores de Cd em folha de manjerição. Todos os metabólitos foram detectados por DESI-MSI e apresentaram imagens com aumento da acumulação ou presença somente em plantas contaminadas.....	119
Figura 50 – Potenciais biomarcadores de Cd em raiz de manjerição. Todos os metabólitos foram detectados por DESI-MSI e apresentaram imagens com aumento da acumulação ou presença somente em plantas contaminadas.....	120
Figura 51 – Potenciais biomarcadores de Cd em folha e raiz de manjerição. Todos os metabólitos foram detectados por DESI-MSI e apresentaram imagens com aumento da acumulação ou presença somente em plantas contaminadas.....	121

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Condições operacionais do ICP-MS para determinação multielementar de folha, caule e raiz de manjeriço.....	51
Tabela 2 – Planejamento fatorial fracionado 2_{IV}^{4-1} , com triplicata no ponto central, para otimização do procedimento MUS nas diferentes matrizes de F, C e R do manjeriço	57
Tabela 3 – Fator de Translocação de Cd ($\bar{X} \pm s$, n=3) em diferentes concentrações de Cd ^{II} (μM) empregadas durante o cultivo de manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> L. grecco a palla). Letras iguais indicam que não há diferenças significativas pela ANOVA (pós teste Tukey, p< 0,05).....	67
Tabela 4 – Matriz do planejamento fracionário 2_{IV}^{4-1} para avaliação dos fatores que afetam a microextração multielementar por ultrassom com as respostas das concentrações de Cd (RM _{Cd}) e multielementar (RM _{mult}), mg kg ⁻¹ , para cada matriz de manjeriço (F, C e R) e suas respectivas correlações de Pearson.....	71
Tabela 5 – Faixa Linear, equação da regressão, coeficiente de correlação (R), LD e LQ do procedimento MUS (n = 10) empregando a técnica ICP-MS.....	73
Tabela 6 – Valores certificados e determinados dos metais no MRC de folha de espinafre NIST 1570a ($\bar{X} \pm sd$, n = 6), recuperação e precisão por ICP-MS.....	74
Tabela 7 – Porcentagem de Recuperação, $\bar{X} \pm sd$ (%), para as os analitos determinados nas matrizes de manjeriço (F, C e R) por ICP-MS (n = 3)	75
Tabela 8 – Comparação dos Limites de detecção, quantificação e concentrações de Cd (mg kg ⁻¹) obtidos por MW e MUS para preparo das matrizes folha, caule e raiz do manjeriço (n=3)	76
Tabela 9 - Avaliação de parâmetros de controle operacional para os procedimentos MUS e MW	77
Tabela 10 – GSH, PCs, seus derivados e complexos de Cd identificados em manjeriço por PS(+)-MS por longo tempo de exposição ao Cd (14 dias).....	90
Tabela 11 – Tentativa de identificação de metabólitos em folha fresca de manjeriço exposto a diferentes concentrações de Cd ^{II} (0; 1; 3,6; 10; 25; 50 e 100 μM)	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA: Ácido abscísico

ATPases: Adenosinatrifosfatases

C: Caule

CAX: *Cation exchangers antiporter*

CDF: *Cation diffusion facilitator* (facilitador de difusão de cátion)

CID: *Compound identification number* (número de identificação de composto)

CTR/COPT: COpper TRansporter

DESI-MS: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (Dessorção induzida por ionização eletrospray acoplada à espectrometria de massas)

DESI-MSI: *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging* (Imageamento por dessorção induzida por ionização eletrospray acoplada à espectrometria de massas)

DPR: Desvio padrão relativo

EC₅₀: Concentração efetiva que inibe 50 % do crescimento da raiz

FAAS: Espectrometria de Absorção Atômica com Chama

GSH: Glutathiona

hGSH: Homoglutathiona

GSSG: Glutathiona oxidada

hPC₂: Homofitoquelatina 2

HCA: Análise de Agrupamento hierárquico

HMA: *Heavy metal ATPases*

ICP-MS: *Inductively Coupled Plasma Mass spectrometry* (Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado)

ICP OES: *Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry* (Espectrometria de Emissão óptica com Plasma Indutivamente Acoplado)

ITR: Índice de Tolerância da Raiz

LCT: *Lysosomal cystine transporter*

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

F: Folha

MRC: Material de referência certificado

MS: *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas)

MTP: *Metal tolerance proteins*

MUS: Microextração Assistida por Ultrassom

MW: Digestão Assistida por Micro-ondas

n_i: Número de imagens

NRAMP: *Natural Resistance-Associated Macrophage Protein* : *proteína macrófoga natural associada a resistência*

PC: Fitoquelatina

PCA: Análise de componentes Principais (PCA)

PS-MS: *Paper Spray Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas com ionização por *Paper Spray*)

PTFE: Politetrafluoretileno

R: Raiz

ROS: *Reactive Oxygen Species* (espécies reativas de oxigênio)

TLC: *Thin-Layer Chromatography* (cromatografia de camada delgada)

US: Ultrassom

ZIP: *ZRT, IRT-like Protein*. IRT (iron-regulated transporter) e ZRT (zinc-regulated transporter)

YSL: *Yellow Stripe-Like*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 O Cádmio	23
3.2 A Espécie vegetal <i>Ocimum basilicum</i> L.	24
3.3 Ionômica vegetal <i>versus</i> Cd	26
3.4 Metabolômica Vegetal <i>versus</i> Cd.....	29
3.4.1 Aminoácidos e peptídeos.....	29
3.4.2 Glutathiona (GSH) e Fitoquelatinas (PCs).....	30
3.4.3 Flavonoides	32
3.4.4 Fitohormônios.....	35
3.4.5 Carboidratos.....	36
3.4.6 Ácidos orgânicos.....	36
3.5 Preparo de amostras.....	37
3.5.1 Procedimentos de digestão assistidos por radiação micro-ondas.....	37
3.5.2 Extração Assistida por Ultrassom.....	39
3.6 Técnicas analíticas empregadas para determinação de constituintes inorgânicos e metabólitos em amostras vegetais.....	41
3.6.1 Técnicas espectrométricas na quantificação de constituintes inorgânicos.....	42
3.6.2 Espectrometria de Massas com Ionização Ambiente	45
3.6.2.1 PS-MS	45
3.6.2.2 DESI-MSI	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 Amostras e reagentes	50
4.2 Equipamentos	50
4.3 Germinação e Cultivo das amostras	52
4.4 Testes de Toxicidade ao Cd.....	53
4.5 Pré-tratamento das amostras para análise elementar.....	55
4.5.1 Digestão assistida por radiação micro-ondas (MW)	55
4.5.2 Microextração assistida por ultrassom (MUS)	56
4.6 Validação do procedimento de microextração assistida por ultrassom	57

4.6.1	Linearidade.....	57
4.6.2	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	58
4.6.3	Veracidade e Precisão	58
4.6.4	Seletividade	59
4.7	Fator de Translocação e Bioacumulação de Cádmió.....	59
4.8	Preparo das amostras para identificação de GSH e PCs por PS-MS	59
4.9	Análise metabolômica por DESI-MSI	61
4.10	Tratamento dos Dados.....	61
4.11	Gerenciamento dos Resíduos.....	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	Testes de toxicidade	64
5.2	Fator de Translocação de Cd no manjeriçõ	66
5.3	Microextração assistida por Ultrassom (MUS)	68
5.4	Validação da MUS.....	72
5.4.1	Linearidade.....	72
5.4.2	Veracidade e Precisão	73
5.4.3	Seletividade	75
5.4.4	MW versus MUS.....	76
5.4	Análise ionômica de órgãos de manjeriçõ após exposição ao Cd	77
5.5	Identificação de GSH, PCs, derivados e complexos de Cd por PS-MS	88
5.6	Identificação de diferentes metabólitos por DESI-MSI empregando <i>imprint</i> da folha de manjeriçõ em placa de TLC.....	96
5.7	Análise direta de folhas de manjeriçõ por DESI-MSI.....	106
5.8	Análise metabolômica em <i>imprint</i> de folhas e raízes de manjeriçõ contaminadas com 25 µM de Cd ^{II}	109
6	CONCLUSÃO.....	123
7	REFERÊNCIAS	125
	APÊNDICE 1 - Cálculo e dados da % RTI	135
	APÊNDICE 2 - Planejamento experimental do procedimento MUS	136
	APÊNDICE 3 - Validação do procedimento MUS	139
	APÊNDICE 4 - Espectros de fragmentação das PCs, seus derivados e Complexos de Cd obtidos por PS(+)-MS.....	141
	APÊNDICE 5 - Resultados das análises por DESI-MSI	146

1. INTRODUÇÃO

Os vegetais são uma das principais fontes de nutrientes e contaminantes inorgânicos, pois as plantas absorvem estes elementos do ambiente de cultivo e os concentram em seus diferentes tecidos. Assim, os distintos processos de assimilação dos contaminantes inorgânicos pelos vegetais têm despertado o interesse da comunidade científica, pois a absorção de elementos tóxicos pode comprometer o metabolismo da planta e a cadeia alimentar, trazendo riscos biológicos, ambientais e à saúde humana.

O cádmio (Cd) é um elemento potencialmente tóxico e se acumula nos organismos vivos e ecossistemas. Segundo a *Environmental Protection Agency* (EPA), Cd é o terceiro contaminante de maior risco ao meio ambiente (após o Hg e Pb) (ISMAEL et al., 2019). Este elemento pode ser absorvido pelas plantas e, uma vez acumulado nos seus tecidos, interfere diretamente na absorção de outros elementos e na síntese e dinâmica de metabólitos (GARCÍA-SEVILLANO; GARCÍA-BARRERA; GÓMEZ-ARIZA, 2015; LOPES JÚNIOR; MAZZAFERA; ARRUDA, 2014; REMELLI et al., 2016), causando perturbação nas vias metabólicas e conseqüentemente estresse vegetal.

Contudo, a quantificação de elementos em matrizes biológicas demanda considerável habilidade laboratorial, pois a etapa de pré-tratamento é a mais crítica e susceptível a erros sistemáticos (KRUG; ROCHA, 2016). O preparo de amostra ideal deve apresentar como principais características a simplicidade, menor tempo de procedimento, frequência analítica, baixo consumo de reagentes, ausência de fontes de contaminação, seletividade, mínima geração de resíduos, segurança na manipulação e ser passível de aplicação a amostras de complexidades distintas.

Para a análise inorgânica, o uso das micro-ondas no preparo de amostras é o mais amplamente relatado na literatura, enquanto procedimentos com emprego de ultrassom vêm se expandindo de forma significativa em laboratórios analíticos devido a sua simplicidade, tempo de preparo e frequência analítica. Logo, a radiação ultrassônica é aplicada em procedimentos de forma eficiente, com reduzido custo e como pré-tratamento de amostras para análise de diversos elementos.

Procedimentos eficientes de preparo de amostras para determinações multielementares permitem compreender importantes fatores de fixação e

translocação do Cd na planta, traçando um perfil ionômico do vegetal. Em consonância com estas informações, estudos apontam que o Cd também interfere no metabolismo das plantas com diferentes respostas dos metabólitos primários e secundários (GARCÍA-SEVILLANO; GARCÍA-BARRERA; GÓMEZ-ARIZA, 2015; VILLIERS et al., 2011), sendo as fitoquelatinas (PCs) os principais biomarcadores do estresse.

As PCs são peptídeos sintetizados pelas plantas, algas e fungos, como resposta de defesa a estresse causado, principalmente, por metais tóxicos. O Cd é o metal mais efetivo na indução de PCs (ZENK, 1996) e se acumula preferencialmente nas raízes como resposta de defesa para diminuir a translocação do metal livre para a parte aérea da planta. Neste caso, são formados complexos com peptídeos que diminuem a toxicidade do metal nas espécies vegetais.

Quanto à detecção de PCs e metabólitos em tecidos vegetais expostos a metais tóxicos, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas é a técnica mais utilizada, uma vez que a análise sequencial permite maior sensibilidade, alta seletividade, precisão e exatidão. O emprego destas técnicas no monitoramento ambiental é provavelmente uma das melhores abordagens para análise metabolômica de vegetais, essencial dentro das ciências "ômicas" na compreensão da dinâmica metabólica, biossíntese e transporte de metabólitos em plantas expostas à metais tóxicos.

Diante destes aspectos, este estudo apresenta o desenvolvimento de um procedimento miniaturizado de preparo de amostras de elevada frequência analítica, simples e de baixo custo, empregando um sonorreator tipo *cup horn* para avaliação ionômica em amostras de folha, caule e raiz de manjeriço exposto ao Cd. Para o estudo metabolômico nesta espécie vegetal, serão apresentados os procedimentos desenvolvidos para identificação de PCs e diversos metabólitos por Espectrometria de Massas com ionização por Paper Spray (PS-MS) e Imageamento por Dessorção induzida por ionização eletrospray acoplada à Espectrometria de massas (DESI-MSI), respectivamente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver procedimentos analíticos empregando técnicas de espectrometria de massas para avaliação de constituintes inorgânicos e orgânicos no manjericão (*Ocimum basilicum* L. grecco a palla) após exposição ao Cd^{II} durante cultivo hidropônico.

2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar o índice de tolerância que inibe 50 % do crescimento da raiz de manjericão quando exposto ao Cd^{II};
2. Desenvolver de forma multivariada um procedimento analítico para determinação de Al, Ba, Be, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Sr e Zn por ICP-MS nas diferentes matrizes vegetais (folha, caule e raiz) empregando um procedimento de microextração assistida por ultrassom (MUS) em sonorreator tipo *cup horn*;
3. Correlacionar a translocação de Cd^{II} com outros elementos no manjericão exposto a diferentes concentrações durante cultivo;
4. Desenvolver de forma univariada um procedimento de extração de PCs, seus derivados e complexos de Cd em raízes de manjericão por PS-MS;
5. Avaliar a influência do tempo de exposição ao Cd^{II} na formação da GSH, PCs e complexos de Cd em raízes de manjericão por PS-MS;
6. Identificar os possíveis biomarcadores de Cd em folhas e raízes de manjericão por DESI-MSI, correlacionando-os com a concentração empregada no cultivo;
7. Identificar por DESI-MSI e correlacionar os possíveis metabólitos biomarcadores das folhas e raiz do manjericão após a exposição ao Cd^{II};
8. Avaliar a metabolômica *untarget* de manjericão com e sem exposição ao Cd^{II} a fim de evidenciar por imageamento químico os efeitos causados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção serão apresentadas considerações sobre o Cd, a espécie vegetal *Ocimum basilicum* L, bem como uma abordagem geral da ionômica e metabômica vegetal *versus* Cd. Posteriormente, uma breve exposição dos procedimentos de pré-tratamento aplicados às amostras de interesse e os princípios básicos das técnicas empregadas neste estudo (FAAS, ICP-MS, PS-MS e DESI-MSI).

3.1 O Cádmi

O Cd foi descoberto pelo químico alemão Friedrich Strohmeyer em 1817, a partir do aquecimento da calamina (Zn_2CO_3), que dava origem a um material desconhecido amarelo, posteriormente denominado sulfeto de cádmio (REMELLI et al., 2016). A etimologia da palavra cádmio é controversa, pois pode ser oriunda do latim *cadmia* ou do grego *Kadmeia* já que ambas têm o mesmo significado - calamina (termo usado para designar o minério rico em carbonato de zinco) (AZEVEDO, F. A.; CHASIN, 2003).

O Cd é o terceiro contaminante de maior risco ambiental (ISMAEL et al., 2019) e possui densidade, número atômico e massa igual a 8.6 g cm^{-3} , 48 e 112,411, respectivamente. O raio iônico de Cd^{II} é 0.97 \AA , o qual se assemelha ao Ca^{2+} e Na^+ com 0.99 \AA e 1.02 \AA , respectivamente. Isto explica, por exemplo, a substituição destes íons pelo Cd^{II} em sua forma mineral, especialmente de íons Ca^{2+} presentes nos ossos (REMELLI et al., 2016).

Na natureza, o Cd pode ser encontrado na forma de sulfeto formando a greenockita. As principais aplicações do Cd são no revestimento do aço e ferro, como estabilizador para cloreto de polivinila (PVC), pigmentos para plástico e vidro, baterias de Ni-Cd e ligas (AZEVEDO, F. A.; CHASIN, 2003). Logo, pode ser exposto ao meio ambiente por atividades antropogênicas, tais como mineração, fundição, queima de combustíveis, efluentes industriais e fertilizantes (CLEMENS, 2006; HAYAT et al., 2019). Devido à sua solubilidade e mobilidade em solo, é um contaminante inorgânico potencial para efeitos catastróficos ao meio ambiente (PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018).

O Cd ($[\text{Kr}]4d^{10}5s^2$) comumente possui número de oxidação igual a +2, conferindo ao íon características de alta polarizabilidade, ácido macio e alta afinidade por grupo doador de elétrons. O Cd^{II} e seus complexos com ligantes macios tem predominantemente caráter covalente, formando os mais estáveis complexos com os átomos $\text{S} \gg \text{N} > \text{O}$, cujos números de coordenação variam de 2 a 8, frequentemente com geometrias tetraédricas e octaédricas (ANDERSEN, 1983). Geralmente, a estabilidade dos complexos de Cd^{II} aumenta com o número de coordenação, formando com os grupos SH complexos muito estáveis (ANDERSEN, 1983; REMELLI et al., 2016). Por isso, a toxicidade de Cd em organismos vivos é determinada pelas reações de complexação do Cd^{II} com ligantes biológicos.

A estereoquímica dos complexos de Cd^{II} com aminoácidos e peptídeos é fundamental para a compreensão dos efeitos biológicos do elemento, uma vez que em solo contaminado, o Cd absorvido interfere no metabolismo das plantas. Algumas plantas podem tolerar uma pequena concentração de Cd, enquanto outras apresentam mudanças em seu fenótipo, como diminuição de massa, raízes e comprimento (HAYAT et al., 2019), clorose nas folhas, escurecimento das raízes e também aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CLEMENS, 2006). Quando bioacumulado em partes comestíveis, aumenta o risco de toxicidade crônica, sendo carcinogênico e passível de afetar os ossos, rins e sistemas respiratório e reprodutivo dos seres humanos (HAYAT et al., 2019).

3.2 A Espécie vegetal *Ocimum basilicum* L.

O manjericão (*Ocimum basilicum* L.) ou *basil*, pertencente à família Lamiaceae, é uma planta perene, cujas sementes possuem alta taxa de germinação (ALAMONOLE; SU, 2017). É uma espécie nativa da Ásia, mas cultivada em muitos países tropicais e subtropicais. Logo, apresenta grande diversidade genética (50 a 150 espécies) baseada nas características morfológicas como crescimento, composição aromática, cor, tamanho e forma das folhas e flor (MAKRI; KINTZIOS, 2008).

O manjericão possui efeitos medicinais como vermífugo, descongestionante e antibacteriano. Desta espécie são extraídos óleos essenciais característicos do aroma da planta, os quais são utilizados na indústria de alimentos e de cosméticos

(HILTUNEN; HOLM, 2006). Devido ao seu aroma, *Ocimum basilicum* L. é conhecido como “king of the herbs” (rei das ervas) (MAKRI; KINTZIOS, 2008). No Brasil, a variedade *grecco a palla* é considerada de pequeno porte e uma das mais populares na culinária brasileira. Além disso, é de fácil cultivo em hidroponia, acessível em vários mercados locais e suas sementes germinam sem necessidade de superação da dormência.

Como outras espécies vegetais, o manjeriço também é capaz de acumular Cd em seus tecidos. Alamo-Nole e Su (2017) avaliaram a translocação do Cd^{II} e nanopartículas (Cd-QDs). As plantas foram germinadas e cultivadas em solo contaminado com 25 mg kg⁻¹ e 50 mg kg⁻¹ de Cd e coletadas após 3 semanas e 6 semanas. Os resultados indicaram que o Cd é armazenado principalmente nas raízes e que Cd-QDs transloca mais facilmente do que o Cd iônico. As maiores translocações de Cd-QDs foram observadas nas primeiras três semanas para a concentração de 25 mg kg⁻¹ e a estabilidade das nanopartículas em água pode justificar a sua alta translocação.

Gharebaghi, Alborzi Haghghi e Arouiee (2017) avaliaram a resposta de *Ocimum basilicum* L. e *Ocimum basilicum* var. *Purpurescens* ao tratamento com Cd (0, 5, 10, 20 mg L⁻¹). Os resultados mostraram inibição da germinação das sementes pelo Cd quando comparada ao controle e uma diminuição do número, tamanho, massa das folhas e comprimento das raízes. Além disso, o Cd foi mais tóxico para a *Ocimum basilicum* var. *Purpurescens* do que para a *Ocimum basilicum* L.

Um estudo recente de Zahedifar e colaboradores (2018) mostrou que *Ocimum basilicum* L. cultivado em solo suplementado com 40 mg kg⁻¹ de Cd e a adição de KCl, K₂SO₄ e K-nano-quelato aumentou a concentração de Cd na parte aérea em 86, 82 e 76%, respectivamente, comparado com o controle. Além disso, o Cd reduziu a concentração de Zn, Cu e Mn na parte aérea, mas aumentou a concentração de Fe.

Contudo, não foram encontrados na literatura estudos que avaliam os efeitos da absorção, fixação e translocação de Cd nos tecidos vegetais do cultivar *grecco a palla*. Como o estresse abiótico causado pelo metal tóxico refletirá no ionoma e metaboloma da espécie vegetal, estes estudos podem ajudar a elucidar os efeitos da dinâmica do Cd^{II} na espécie *Ocimum basilicum* L.

Avanços recentes das ciências ômicas (ionômica, metabolômica, transcriptômica, proteômica, etc.) ajudaram na caracterização de metabólitos, fatores

de transcrição e proteínas induzíveis ao estresse abiótico, que por sua vez são utilizadas para a geração de culturas tolerantes à exposição por metais tóxicos (DU et al., 2020; SINGH et al., 2016; WATANABE et al., 2016). A compreensão dos mecanismos de tolerância ao Cd envolvendo a *ionômica* e *metabolômica* de plantas é importante por seu caráter interdisciplinar, contribuindo para estudos em diferentes áreas, como agronomia, biologia, química e bioquímica.

3.3 Ionômica vegetal *versus* Cd

A ionômica originou-se da fusão de ideias tanto do metabolismo quanto da nutrição mineral vegetal e foi proposta por Pauling e Robinson no início da década de 70 (SALT; BAXTER; LAHNER, 2008). O ionoma de uma planta relaciona-se ao maior número possível de elementos determinados em uma célula, tecido ou organismo (BAXTER, 2009), cujas interações variam de acordo com a espécie vegetal, o genótipo, variedade, órgão e ambiente em que são cultivados (BAXTER, 2009; WATANABE et al., 2016). Assim, a ionômica vegetal é uma ferramenta poderosa para estudar a dinâmica mineral de vegetais expostos à metal tóxico.

A presença de Cd em plantas induz o estresse oxidativo com consequências negativas ao desenvolvimento, como inibição no desenvolvimento de tecidos, necrose, clorose foliar e redução na síntese de clorofila, alterações das atividades fotossintéticas e no metabolismo de proteínas (CLEMENS, 2006; HAYAT; NAUMAN; NAZIR, 2019).

A presença de Cd nas plantas também compromete a absorção, o transporte e o metabolismo de nutrientes (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001), causando deficiência de elementos essenciais denominada "deficiência induzida" (ISMAEL et al., 2019). Pesquisas recentes mostram respostas ionômicas de diferentes órgãos de espécies vegetais sob efeitos do Cd (FENG et al., 2017; LOPES JÚNIOR; MAZZAFERA; ARRUDA, 2014). A absorção, sequestro e translocação de Cd envolve vários canais e transportadores de metais em plantas, os quais são influenciados pela suplementação de Cd, espécie vegetal e nível de nutrientes (ISMAEL et al., 2019). Elementos com propriedades químicas similares podem usar os mesmos

transportadores ou canais e também serem transportados pela mesma proteína, resultando em complexas interações entre si (CLEMENS, 2006).

A absorção de Cd do solo pelas plantas ocorre principalmente via canais de Ca^{2+} e transportadores ZIP (*ZRT*, *Zn-regulated transporter*, e *IRT*, *iron-regulated transporter*) (CLEMENS, 2006). A família de transportadores ZIP é nomeada por sua semelhança de sequência para *ZRT1* (*Zn-regulated transporter 1*) e *IRT1* (*iron-regulated transporter 1*) de *Arabidopsis thaliana* (At) (ISMAEL et al., 2019). Outras vias de absorção são os transportadores ATPases (adenosinatrifosfatases), ABC (*ATP-binding cassette*), YSL (*Yellow Stripe-Like*) que transportam os complexos de Cd, CAX (*Cation exchangers antiporter*), LCT (*lysosomal cystine transporter*), NRAMP (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein*), MTP (*Metal tolerance proteins*) e HMA (*Heavy metal ATPases*) (ISMAEL et al., 2019; SINGH et al., 2016).

O transportador IRT1 está relacionado ao transporte de outros cátions bivalentes tais como Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Cd^{II} , podendo induzir uma competição entre o Cd e os outros elementos durante a absorção pela planta. Contudo, os mecanismos de absorção e translocação de Cd em plantas ainda não estão bem esclarecidos (SONG; JIN; WANG, 2017), como mostra a Figura 1. Dessa forma, estas interações podem indicar a presença de transportadores comuns ou gerar informações sobre a assimilação de Cd pelos vegetais.

Além disso, a Figura 1 também apresenta a glutathiona (GSH) como precursora da formação das fitoquelatinas (PCs) e complexos de Cd (GSH-Cd e PC-Cd). Estes peptídeos são formados como mecanismo de defesa das plantas expostas à metais tóxicos, inclusive o Cd, mas seus mecanismos de translocação e fixação nos diferentes tecidos vegetais não estão bem esclarecidos.

Geralmente, o Cd se transloca para a parte aérea da planta, mas acumula-se preferencialmente nas raízes. Quando a concentração de Cd é superior a $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (KRÄMER, 2010) na parte aérea, a espécie vegetal é considerada hiperacumuladora. Contudo, o estudo do perfil ionômico é limitado para poucas espécies e esta lacuna é um estímulo para a comunidade científica, pois espécies vegetais e famílias diferentes provavelmente têm distintos mecanismos de absorção de elementos (BAXTER, 2009).

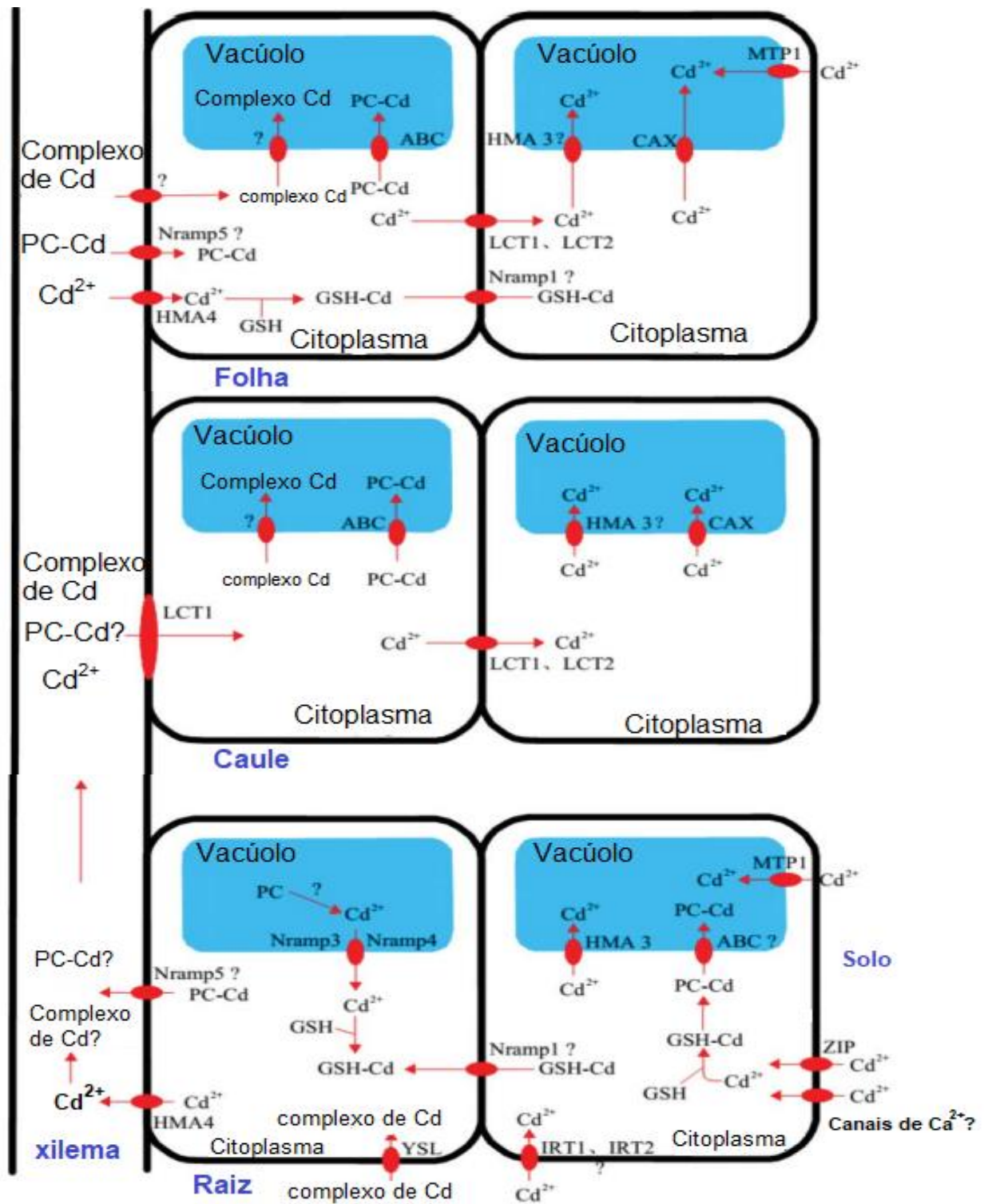


Figura 1 – Mecanismos de transporte e translocação de Cd em plantas. Adaptado de Song et al. (2017)

3.4 Metabolômica Vegetal versus Cd

Metabólitos são produtos de processos biológicos catalisados por enzimas (LEE et al., 2012) e são uma rica fonte de informação que reflete o estado fisiológico de um organismo (SALT; BAXTER; LAHNER, 2008). A identificação e/ou quantificação de metabólitos de baixa massa (< 2000 Da) (PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018) compreende uma das áreas das ciências ômicas, denominada metabolômica.

A metabolômica pode elucidar diversos processos bioquímicos que interferem no desenvolvimento vegetal, incluindo a exposição à contaminantes inorgânicos. A exposição à metal tóxico induz respostas de defesa, tais como imobilização na parede celular, exclusão na membrana plasmática, quelação, compartimentação em vacúolos e síntese de peptídeos em resposta ao estresse oxidativo (VERBRUGGEN; HERMANS; SCHAT, 2009a). Estes mecanismos refletem no metaboloma e conseqüentemente em biomarcadores para os metais tóxicos, inclusive o Cd (GARCÍA-SEVILLANO; GARCÍA-BARRERA; GÓMEZ-ARIZA, 2015; MOU et al., 2016). A seguir serão apresentadas algumas classes de metabólitos comuns em plantas.

3.4.1 Aminoácidos e peptídeos

Aminoácidos são compostos orgânicos que apresentam em sua estrutura os grupos funcionais ácido carboxílico e amina. Estes compostos estão envolvidos na síntese de proteínas (KUMAR et al., 2019) e são fundamentais para o desenvolvimento das plantas, precursores para muitos metabólitos com diferentes respostas para o estresse biótico (herbívoros e patógenos) e abiótico (radiação UV, temperatura, metais tóxicos, etc) (HILDEBRANDT et al., 2015) em diversas vias metabólicas. Como exemplo, o ácido glutâmico e ornitina, que são precursores da biossíntese de prolina (Pro) que por sua vez age como osmólito (estabiliza macromoléculas intracelulares para equilibrar o estresse ambiental) e estabilizador de ROS (PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018). A Pro também funciona como um antioxidante, protegendo as plantas de danos oxidativos induzidos por ROS sob condições de água limitada (ASHRAF et al., 2018).

O metabolismo da Pro em plantas é diferente de outros aminoácidos, pois entre os aminoácidos proteogênicos, apenas ela contém α -amino grupo como amina secundária (ASHRAF et al., 2018). Contudo, as concentrações celulares de outros aminoácidos como arginina (Arg), leucina (Leu), valina (Val), serina (Ser) e glicina (Gly) também são aumentadas em resposta ao estresse causado por metais tóxicos. A Gly está envolvida na síntese de peptídeos como glutathiona (GSH) e, conseqüentemente, PCs e a Arg na biossíntese de poliaminas e ornitina (PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018).

Os peptídeos são definidos como pequenas proteínas compostas geralmente por até 20 aminoácidos e presentes em concentrações fisiológicas muito baixas (nanomolar). Pequenos peptídeos ricos em Cys (< 160 aminoácidos) são mais raros nos organismos vivos (MURPHY; SMITH; DE SMETA, 2012).

Os peptídeos atuam como mensageiros moleculares devido ao seu envolvimento em processos-chave de desenvolvimento, tais como manutenção de meristemas, abscisão de órgãos, alongamento celular, proliferação e diferenciação celular, gravitropismo e defesa contra agressores bióticos (GHORBANI, 2014) e abióticos. Neste contexto, a GSH é um dos peptídeos tiólicos mais importantes produzidos pelas plantas expostas a metais tóxicos, pois é precursora para a síntese de PCs.

3.4.2 Glutathiona (GSH) e Fitoquelatinas (PCs)

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo abundante em plantas, cuja cadeia é formada por ácido glutâmico, cisteína e glicina ((γ -Glu-Cys)Gly). É fundamental na tolerância ao estresse biótico e abiótico, bem como na regulação do crescimento e do potencial redox do sistema, desenvolvimento e de múltiplas funções metabólicas (HASANUZZAMAN et al., 2017; HOSSAIN et al., 2017). A síntese da GSH é catalisada pela γ -glutamilcisteína sintase (γ ECS) e plantas com baixos níveis de GSH são hipersensíveis ao Cd (HOSSAIN et al., 2017). GSH oxidada por diferentes espécies reativas de oxigênio forma a glutathiona dissulfeto (GSSG), ou seja, duas moléculas de GSH via ligação dissulfeto (HOSSAIN et al., 2017).

Homólogos de GSH (hGSH) requerem enzimas específicas como glutathiona sintase (GSHS) ou homoglutathiona sintase (hGSHS). Neste caso, a Gly é substituída

por β -Ala (γ -Glu-Cys- β -Ala), mas com funções similares à GSH (HASANUZZAMAN et al., 2017). Estudos mostram que a hGSH coexiste com a GSH em leguminosas, principalmente nas raízes (COLVILLE et al., 2015).

A GSH é a primeira linha de defesa contra o Cd em muitos tipos de célula, atuando como agente quelante (HASANUZZAMAN et al., 2017) e substrato na síntese de PCs (Figura 2). Em plantas, as PCs são parte da ação defensiva não somente a metais, mas também a diferentes tipos de estresse como calor, salinidade, radiação UV-B e herbicidas (ZAGORCHEV et al., 2013).

As PCs são sintetizadas pela enzima fitoquelatina sintase (PCS) a partir da GSH, cuja estrutura típica $[(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}]$ apresenta $n \leq 6$ em plantas (CAO et al., 2015). Entretanto, diferentes espécies de plantas sintetizam peptídeos análogos de PCs, cujas estruturas distinguem na ligação com o C-terminal $[(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{X}]$, onde X pode ser os aminoácidos Ser, β -Ala, Gln ou Glu] (POŁEĆ-PAWLAK et al., 2005). Recentemente, foi feita uma classificação de 22 compostos em 9 famílias de PCs identificadas em folhas, caule e raiz de arroz exposto ao Cd (MOU et al., 2016). Os resultados apontaram que os níveis de GSH em raízes e caule diminuíram com aumento da concentração de Cd, indicando que este composto foi usado na síntese de PCs como proteção contra o Cd.

Biotióis como GSH e PCs são considerados potenciais biomarcadores da toxicidade de Cd em plantas (MOU et al., 2016). Eles podem formar complexos estáveis (Cd-GSH ou Cd-PC_n), cuja ligação ocorre via grupos SH da cisteína e a forma Cd-PC_n é cerca de 1000 vezes menos tóxica do que o íon livre (KNEER; ZENK, 1992).

Os complexos de Cd podem ter baixa e alta massa molecular (LMW, *low molecular weight* e HMW, *high molecular weight*). Quando o Cd é transportado do citosol para os vacúolos da célula, ele é compartimentado e são formados os complexos HMW (Figura 2). Interessante ressaltar que os tecidos jovens e maduros (folhas, pecíolos e caules) contêm maior concentração de enxofre do que as folhas senescentes, indicando habilidades das plantas em sintetizar ligantes fortes em folhas jovens, promovendo o sequestro nos vacúolos e tornando o principal mecanismo de desintoxicação (AHMAD et al., 2019).

O papel das PCs e GSH na desintoxicação de Cd é amplamente reportado na literatura, porém estes compostos não são os únicos relacionados à tolerância das

plantas, pois a Cys e outros compostos de baixa massa molecular também podem estar envolvidos neste processo.

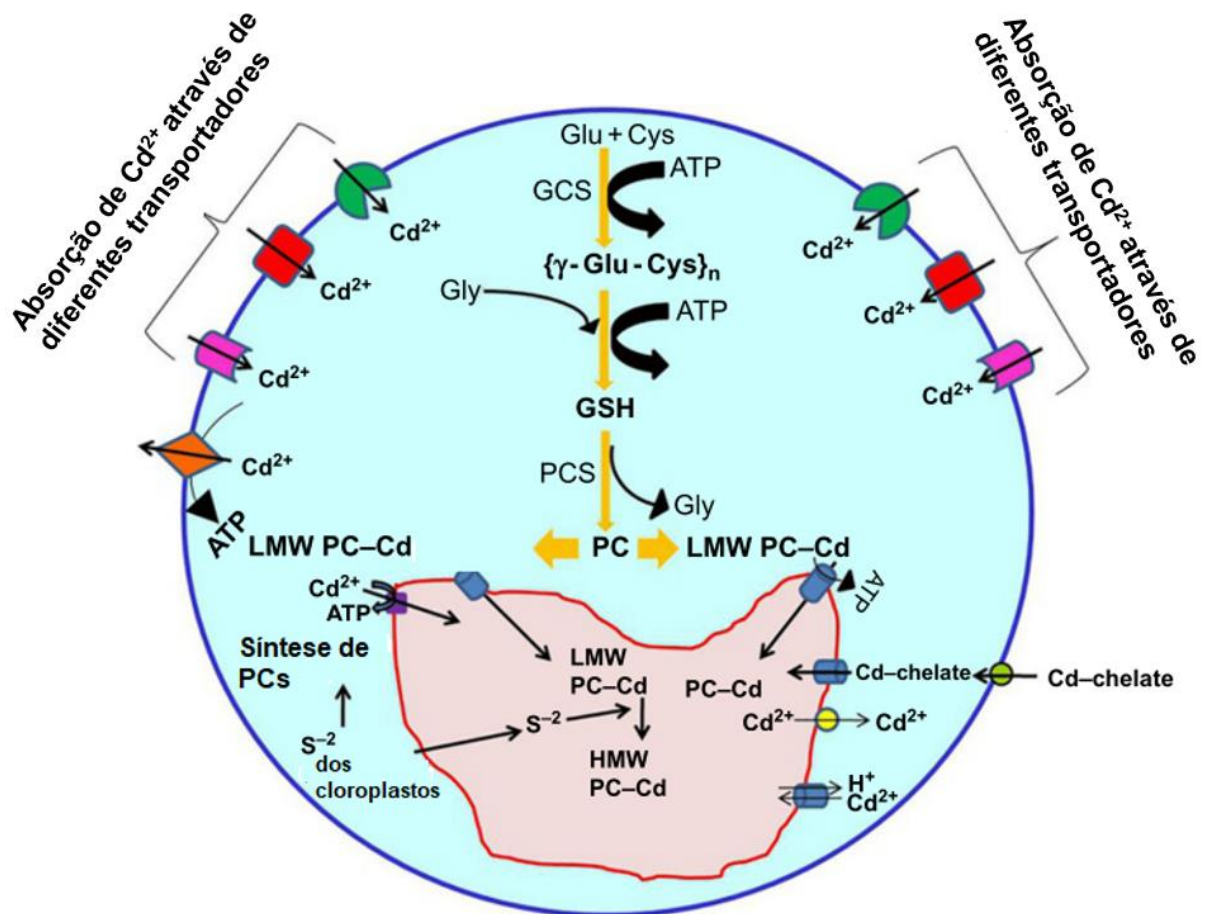


Figura 2 – Principais etapas envolvidas na absorção de cádmio (Cd^{II}) e sua desintoxicação por fitoquelatinas (PCs) em células vegetais. Adaptado de Ahmad et al. (2019)

3.4.3 Flavonoides

Os flavonoides são metabólitos secundários com variáveis estruturas fenólicas que são sintetizados em todas as partes das plantas. Apresentam atividades biológicas na proteção contra estresse biótico e abiótico, como antioxidantes e inibidores de enzimas (MIERZIAK; KOSTYN; KULMA, 2014; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

A partir da estrutura básica de dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um pirano (C), os flavonoides formam diferentes estruturas e são classificados em

flavonas, isoflavonoides, flavanonas, flavonóis ou catequinas, antocianinas, e chalconas, conforme mostrado na Figura 3. Todas as classes são encontradas em plantas e para o gênero *Ocimum*, flavonas e flavonóis são as mais comuns (HILTUNEN; HOLM, 2006). Flavonoides também podem ser encontrados como agliconas e glicosídeos (FREITAS et al., 2019).

As antocianinas são responsáveis pela pigmentação de folhas, flores e frutos e os isoflavonoides têm distribuição limitada nos vegetais e são essenciais no combate às doenças em seres humanos (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). Os neoflavonoides são uma classe de compostos polifenólicos enquanto as chalconas são flavonoides de cadeia aberta, com benefícios nutricionais, antioxidantes e antibacterianas (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

Os flavonoides tem propriedades quelantes com metais e papel fundamental na tolerância de vegetais ao Cd (LI et al., 2015). Como o Cd induz a formação de ROS, os flavonoides podem atuar como mecanismo de defesa das plantas, uma vez que o grupo hidroxila tem elevada capacidade de estabilização das ROS (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

As flavonas e catequinas são os flavonoides fundamentais na proteção às ROS (MIERZIAK; KOSTYN; KULMA, 2014; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016), ao extinguir diretamente os radicais através da transferência de um próton do anel A e/ou B e gerando radicais flavonoides menos ativos (MIERZIAK; KOSTYN; KULMA, 2014). Além disso, os flavonoides podem modular a resposta da planta ao estresse pelo controle do transporte de um dos mais importantes fitohormônios, a auxina (MIERZIAK; KOSTYN; KULMA, 2014).

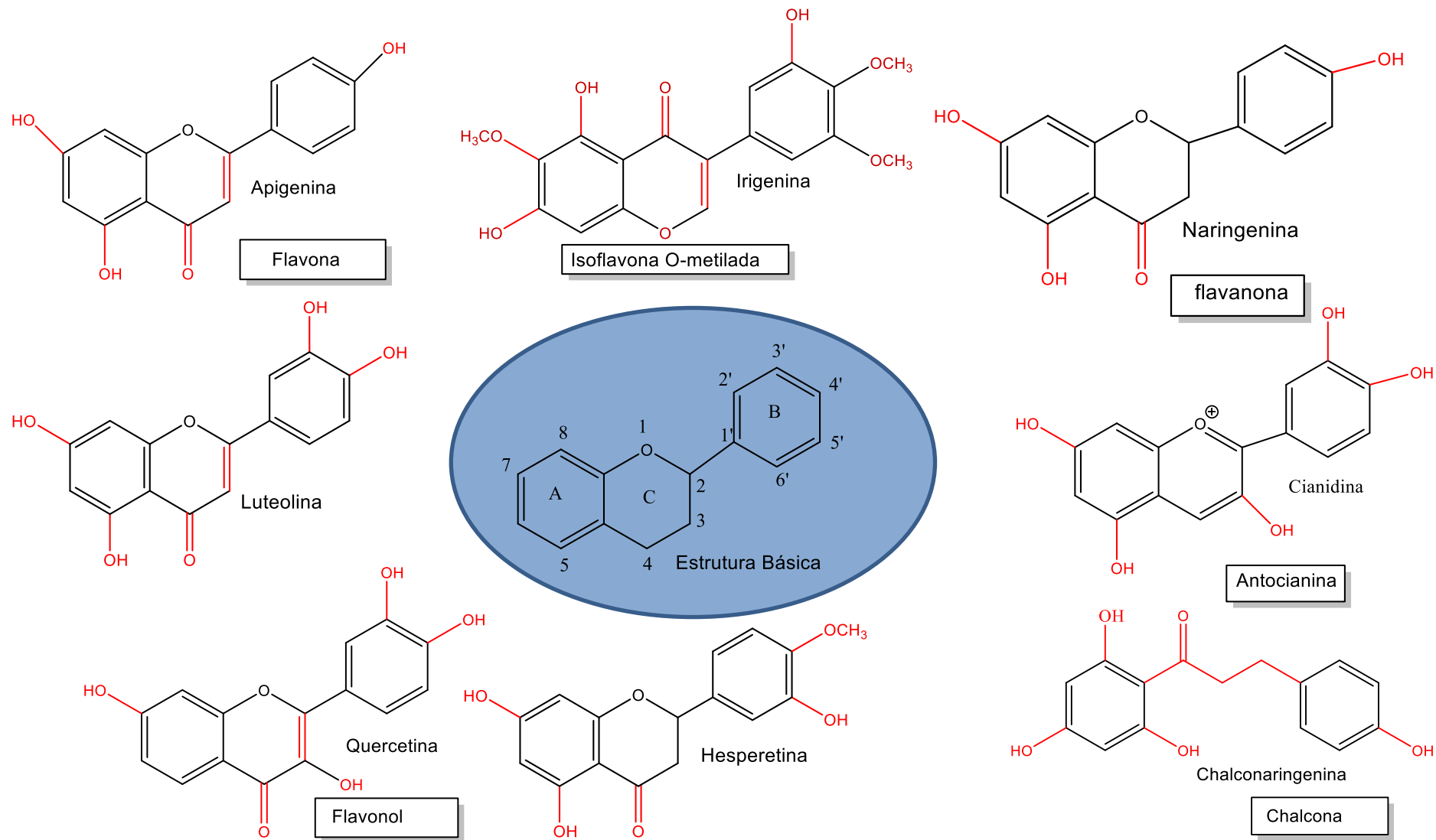


Figura 3 – Estrutura básica dos flavonoides, classes e exemplos. Fonte: Adaptado de Panche, Diwan e Chandra (2016)

3.4.4 Fitohormônios

Fitohormônios são mensageiros químicos naturais fundamentais para o desenvolvimento vegetal e sinalizadores de condições ambientais, incluindo estresse causado por metais tóxicos (BALI et al., 2018; SIDDIQUI; SAMI; HAYAT, 2020). As estruturas dos hormônios vegetais são diversas sendo os principais relatados como as adeninas (citocininas - CKs), terpenoides (giberelinas e ácido abscísico - ABA), brassinosteróides (BRs), lipídios (jasmonatos - JAs), auxinas (Aux) e etileno.

Em geral, os hormônios vegetais estimulam o desenvolvimento e crescimento de plantas e têm funções específicas. As citocininas, por exemplo, promovem a divisão celular e inibe a absorção de metais e a degradação do carotenóide induzida pelo estresse dos metais tóxicos (PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018). Junto com a citocinina, a auxina (especialmente o ácido indoleacético, IAA) e a giberelina têm efeitos estimulantes sobre o conteúdo de carotenóides das plantas (PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018).

Auxinas são muito importantes no desenvolvimento da raiz, transição mitótica e transcrição de genes (MIERZIAK; KOSTYN; KULMA, 2014). Enquanto as giberilinas tem importante função na germinação de sementes, alongação de folhas, caule e sementes, desenvolvimento de frutos e iniciação floral (BALI et al., 2018). Similarmente, os BRs são esteroides de plantas que regulam a floração, senescência, germinação e tolerância ao estresse (AMIR et al., 2019; BALI et al., 2018). Estudos revelaram que duas formas ativas de BRs, 24-epi-brassinosteróide e 28-homobrassinolide, têm um papel importante nas plantas expostas a Cd (AMIR et al., 2019).

Como um dos principais hormônios de imunidade (ZHAI et al., 2017), os jamonatos (JA) são ciclopentanonas que incluem o ácido jasmônico (JA) e seus vários derivados, que são sintetizados a partir do ácido linoleico (ZHAI et al., 2017). Estes fitohormônios estão relacionados à eliminação de efeitos tóxicos de metais pelo estímulo à acumulação de flavonoides e enzimas antioxidantes em plantas (AMIR et al., 2019; BALI et al., 2018) e efeitos inibidores sobre o conteúdo de carotenoides (PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018).

Com alguns jasmonatos, o etileno é um fitohormônio gasoso e produzido pela metionina (Met), sendo fundamental na germinação de sementes, crescimento vegetativo, abscisão de folhas, amadurecimento de frutas e senescência (AMIR et al., 2019). Além disso, o papel principal do etileno em plantas sob estresse a Cd tem sido muito reportado na literatura (AMIR et al., 2019).

Além destes fitohormônios, o ABA tem significativo papel no desenvolvimento e crescimento das plantas, controlando muitas respostas de estresse vegetal. Estudos apontam que a aplicação de ABA em cultivos de diferentes espécies vegetais minimiza a translocação e efeitos do Cd pela redução da taxa de transpiração e estímulo à formação de mecanismos de defesa (AMIR et al., 2019).

De modo geral, os hormônios desempenham papel importante no metabolismo vegetal e na tolerância ao estresse por Cd, atuando nos processos enzimáticos antioxidantes, redução na absorção do metal tóxico, no fenótipo e genótipo, formação de PCs, concentração de Pro e açúcares solúveis, bem como no aparato fotossintético dos vegetais (BALI et al., 2018).

3.4.5 Carboidratos

Assim como os fitohormônios, os açúcares são carboidratos que agem como sensores e são produzidos pela fotossíntese, regulando vários processos metabólicos em plantas (SIDDIQUI; SAMI; HAYAT, 2020). Açúcares como a sacarose, glicose e frutose têm função essencial no metabolismo intermediário e respiratório e são substratos para a síntese de aminoácidos, ácidos graxos e carboidratos complexos como o amido e a celulose (SMEEKENS, 2000).

A habilidade das plantas em monitorar e responder aos níveis de açúcares pode estar relacionado ao mecanismo de controle às condições ambientais (SHEEN; ZHOU; JANG, 1999). Como exemplo, a glicose interage com vários fitohormônios e sua concentração aumenta sob estresse abiótico (SIDDIQUI; SAMI; HAYAT, 2020). Frutose, galactose, talose e glucoheptose aumentam em dois genótipos de gramíneas em resposta ao Cd, sugerindo que este metal reduz a utilização de açúcares (XIE et al., 2014). Em *Arabidopsis thaliana* exposta ao Cd e com suplementação de glicose, é observado inibição da toxicidade pela diminuição de clorose e significativa redução da translocação de Cd na planta (SHI et al., 2015).

3.4.6 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos apresentam grupo funcional ácido carboxílico ($-\text{COOH}$) e são fundamentais na produção de energia celular (KUMAR et al., 2017). A concentração em folhas pode variar com a espécie vegetal, grau de desenvolvimento

e maturidade, pH e tipo de solo, dentre outras características (KUMAR et al., 2017; SIDHU; BALI; BHARDWAJ, 2019).

Baseado na dissociação e no número de grupos carboxílicos, os ácidos orgânicos podem formar complexos com cátions metálicos, induzindo seu deslocamento da solução e do solo. Portanto, estão envolvidos na mobilização e absorção de nutrientes e na desintoxicação de metais tóxicos nas plantas (SIDHU; BALI; BHARDWAJ, 2019). Os ácidos orgânicos podem formar complexos solúveis com Cd, facilitando sua absorção pelas raízes das plantas e reduzindo o transporte do íon livre através das membranas biológicas com regulação da translocação para a parte aérea (SIDHU; BALI; BHARDWAJ, 2019).

Existem muitos outros compostos com funções metabólicas essenciais em plantas, tais como lipídios, fosfoglicerolipídios, terpenos, alcaloides etc. Esta diversidade de compostos em vegetais motiva estudos metabolômicos em plantas expostas a metal tóxico, uma vez que podem refletir a perturbação imposta contribuindo na compreensão dos efeitos da exposição.

3.5 Preparo de amostras

O preparo de amostras é a etapa mais crítica no desenvolvimento de um procedimento. A escolha do modo de extração ou digestão depende da técnica a ser utilizada, da complexidade de cada matriz, bem como das especificidades dos analitos. Neste contexto, a energia proveniente de ondas eletromagnéticas (micro-ondas) e mecânicas (ultrassom) pode ser preferencialmente empregada para produzir digeridos adequados para a determinação de constituintes inorgânicos por técnicas espectrométricas.

3.5.1 Procedimentos de digestão assistidos por radiação micro-ondas

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas localizadas entre a radiação do infravermelho e a radiação das ondas de rádio, cuja faixa de frequência do espectro eletromagnético varia de 300 a 300.000 MHz (comprimentos de onda de 1 a 10^{-3} m). São radiações não ionizantes com energia inferior àquela necessária para quebrar ligações das moléculas comuns (KRUG; ROCHA, 2016). Segundo Krug (2016), as

ondas eletromagnéticas geram campos elétricos positivos e negativos alternados, provocando uma desordem no sistema (migração iônica) e agitação das moléculas polares (rotação de dipolos).

Na migração iônica, os íons dissolvidos pela ação do campo elétrico oscilante da radiação micro-ondas produzem um fluxo de corrente contrário ao fluxo de outras espécies presentes na solução, gerando dissipação de energia e aumento na temperatura do meio. Todos os íons presentes na solução promovem o aquecimento, mas a contribuição de cada um depende da concentração e mobilidades dos íons no meio reacional (KRUG; ROCHA, 2016; MORAES et al., 2016).

A radiação eletromagnética absorvida também promove o alinhamento das moléculas polares (momento dipolar permanente ou induzido) em uma solução. Este fenômeno é conhecido como rotação de dipolos, cuja resistência ao movimento de orientação em função do campo elétrico aplicado causa a dissipação de energia na forma de calor. Quando o campo é removido, as moléculas retornam ao estado inicial não alinhado, em um certo tempo (denominado tempo de relaxação dielétrica, t), gerando energia térmica (MORAES et al., 2016).

O aquecimento reacional necessário para a digestão da amostra também depende de outros fatores como a constante dielétrica e profundidade de penetração do material (ϵ''), viscosidade e a frequência. Com a modificação da frequência, observa-se mudança no valor da constante dielétrica e, portanto, na profundidade de penetração e no fator de dissipação de energia (MORAES et al., 2016).

Os frascos reacionais devem ser de material transparente às micro-ondas como, por exemplo, quartzo, PFA (perfluoroalcóxi), ou PTFE quimicamente modificado (TFM®). Adicionalmente, os frascos são introduzidos em um suporte externo com revestimento por Kevlar®, poliéter-éter-cetona (PEEK) ou cerâmica, para resistir à pressão sem que ocorra deformação do frasco de reação (MORAES et al., 2016).

A viscosidade aumenta a mobilidade molecular e conseqüentemente diminui a dissipação de energia térmica, pois com o aumento da temperatura as interações moleculares se tornam menos intensas reduzindo a resistência ao movimento. Contudo, este fenômeno ocorre somente na fase inicial (até a viscosidade não mais afetar a mobilidade das moléculas) (MORAES et al., 2016).

Como forma de melhorar a eficiência da digestão de amostras vegetais e a acidez residual, pesquisas recentes tem empregado soluções de HNO₃ diluídas e H₂O₂ (BARBOSA et al., 2015; TARANTINO et al., 2017). A decomposição do H₂O₂ gera o O₂ que contribui para a regeneração do HNO₃ nos frascos reacionais fechados durante a

digestão assistida por radiação micro-ondas, devido ao gradiente de temperatura, em que os gases permanecem a baixa temperatura e sofrem condensação (BARBOSA et al., 2015).

De modo geral, os procedimentos de preparo de amostras assistidos por radiação micro-ondas são bem estabelecidos na literatura científica e se apresentam como referência para comparação com novos métodos analíticos.

3.5.2 Extração Assistida por Ultrassom

A energia ultrassônica, inaudível ao ser humano, é formada por ondas mecânicas com frequência maiores que 16 kHz, que se propagam em meios materiais em ciclos consecutivos de compressão e expansão (KRUG; ROCHA, 2016). Durante estes ciclos, a onda ultrassônica promove a formação de cavidades para onde os gases dissolvidos migram e geram bolhas de dimensões micrométricas no meio líquido irradiado. Este fenômeno é chamado de cavitação e envolve as etapas de nucleação, crescimento e colapso das microbolhas (Figura 4). As bolhas formadas aumentam de tamanho até tornarem-se instáveis para posterior colapso e, conseqüentemente, extração do elemento(s) de interesse(s), como exemplo, o Cd.

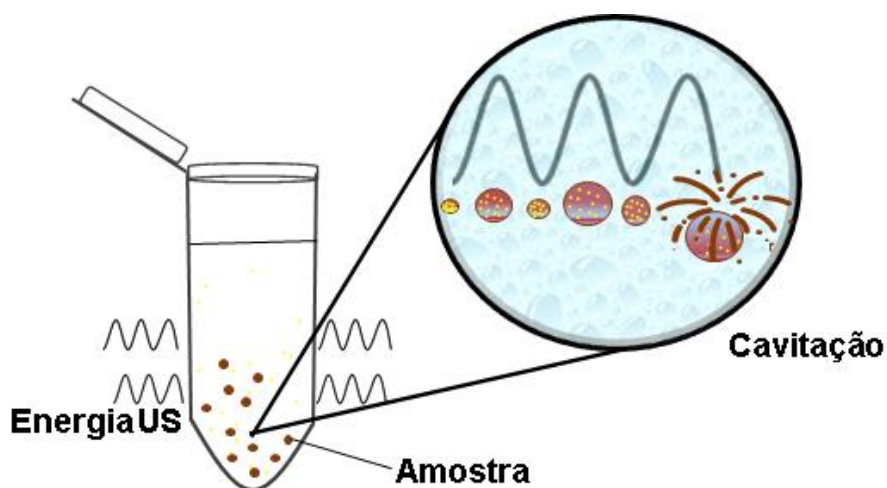


Figura 4 – Formação das microbolhas e colapso para extração multielementar. Fonte: Própria

O colapso das bolhas criado pela sonicação da solução resulta na geração de “hot spots” (local de alto gradiente de temperatura e pressão). Este processo facilita a solubilidade do analito, difusibilidade, penetrabilidade/transporte do solvente e

fragmentação da partícula (BENDICHO et al., 2012), resultando na extração elementar de analitos de matrizes sólidas.

Além das microbolhas, a sonólise é capaz de produzir radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio a partir de soluções aquosas, aumentando a energia oxidativa. Estes radicais também aumentam a eficiência de extração em uma variedade de amostras (CABALEIRO; DE LA CALLE, 2014).

Os processadores ultrassônicos como os banhos e sonda são muito utilizados no preparo de diferentes matrizes. Os primeiros apresentam regiões de diferentes intensidades de energia e por isso requer atenção do analista quanto à reprodutibilidade. Enquanto o sistema de sonda tem alta intensidade de energia US quando comparado ao banho ultrassônico (> 100 vezes) (PRIEGO-CAPOTE; LUQUE DE CASTRO, 2004), mas pode apresentar riscos de contaminação da amostra.

O sonorreator é um dispositivo comercial cuja sonda é acoplada a um “copo”, com circulação de água, onde serão alocados os frascos reacionais (Figura 5). Este sistema apresenta as vantagens de redução do risco de contaminação, maior transferência e distribuição de energia, frequência analítica e sem restrição do uso de reagentes (DE LA CALLE et al., 2009). Como o preparo de amostras é simultâneo, a uniformidade de distribuição da energia, geometria e espessura dos frascos são fatores críticos na reprodutibilidade do método (KRUG; ROCHA, 2016).

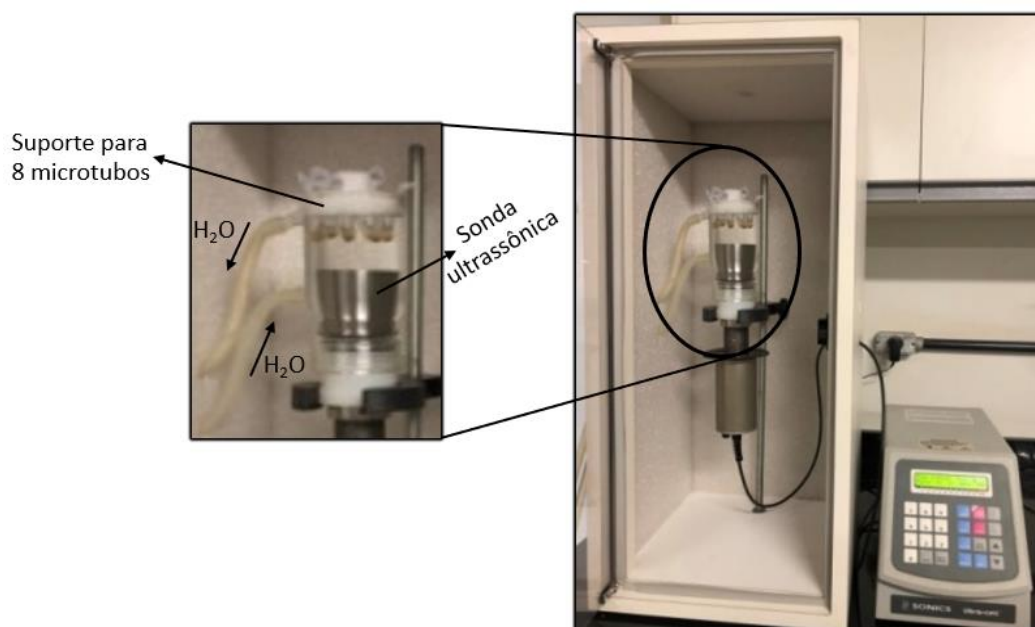


Figura 5 – Sonorreator *cup horn* Sonics VCX 505 (Newton, CT, USA)

A energia US tem sido aplicada no pré-tratamento de diferentes amostras, incluindo tecidos de plantas (CABALLO-LÓPEZ; LUQUE DE CASTRO, 2007; FILGUEIRAS et al., 2000), fertilizantes orgânicos (TEIXEIRA et al., 2014) e outras matrizes biológicas e ambientais (DE LA CALLE et al., 2009). Soluções de ácidos diluídos tem sido empregadas na maioria das aplicações, enquanto os protocolos apresentam massas de 1 a 30 mg, volumes de 1 a 2 mL e reduzido tempo de sonicação (CABALEIRO; DE LA CALLE, 2014; LAVILLA et al., 2012). Assim, como solução extratora, concentrações entre 1 e 5% (v.v⁻¹) de ácido nítrico, ácido clorídrico ou mistura destes tem sido empregado no preparo de amostras (BENDICHO et al., 2012).

A energia US representa uma boa perspectiva para procedimentos miniaturizados, com foco na redução de massa de amostra, eliminação (ou diminuição do consumo) de reagentes químicos e desenvolvimento de procedimentos rápidos (CABALEIRO; DE LA CALLE, 2014), com alta frequência analítica, refletindo diretamente na performance das técnicas de detecção (PRIEGO-CAPOTE; LUQUE DE CASTRO, 2004).

3.6 Técnicas analíticas empregadas para determinação de constituintes inorgânicos e metabólitos em amostras vegetais

A escolha de técnicas analíticas está diretamente relacionada às informações que o analista deseja processar, sendo fundamental a avaliação preliminar do limite de detecção das técnicas disponíveis, precisão, exatidão, faixa de concentração dos analitos, possíveis interferências e o adequado preparo de amostra.

A espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) é seletiva (SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, 2009), mas em estudos ionômicos tem aplicação limitada, demandando maior quantidade de amostra e longo tempo de análise para obtenção de dados necessários. Neste caso, é pertinente o emprego de técnicas multielementares, tais como espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para compreender a dinâmica, correlação e transporte dos diferentes constituintes inorgânicos na planta.

Por sua vez, a metabolômica vegetal utiliza a espectrometria de massas como a técnica central para detecção de uma variedade de classes de metabólitos em

diferentes órgãos de plantas, sendo a técnica de ionização a pressão atmosférica ESI (do inglês *electrospray ionization*) a mais amplamente empregada.

3.6.1 Técnicas espectrométricas na quantificação de constituintes inorgânicos

A espectrometria atômica é fundamental nos estudos dos elementos essenciais e não essenciais nas funções bioquímicas das plantas e/ou contaminantes inorgânicos. Para a determinação destes constituintes elementares, é necessário avaliar o intervalo de concentração nas amostras de interesse, procedimento de preparo de amostra adequado, limite de detecção e possíveis interferências das técnicas analíticas disponíveis.

Como uma técnica simples e robusta, a absorção atômica se baseia no princípio de que todo átomo no estado gasoso e fundamental pode absorver certa quantidade de radiação específica, definida por regras quânticas, que promove seus elétrons ao estado excitado. Assim, o equipamento de FAAS consiste em uma fonte de emissão de radiação, lâmpada de cátodo oco (LCO) e sistemas de nebulização-queima, ótico e eletrônico de detecção.

A quantidade de radiação absorvida está relacionada diretamente com a concentração do analito na solução, obedecendo a lei de Lambert - Beer (SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, 2009). Para as determinações quantitativas é necessário observar as limitações desta lei devido a desvios químicos, que são resultados de alterações químicas associadas a soluções relativamente concentradas, e ou desvios instrumentais que dependem do equipamento e da forma de medição.

Como toda técnica monoelementar, a FAAS pode ser empregada em diversas análises de tecidos vegetais com finalidades específicas, pois apresenta as vantagens de versatilidade, custo operacional moderado, fácil operação e manutenção, alta seletividade e poucas interferências espectrais. Contudo, em estudos ionômicos é desejável uma técnica multielementar para explorar a dinâmica do ionoma, não apenas os elementos individuais isoladamente (BAXTER, 2009). Neste caso, a ICP-MS pode ser a técnica empregada para análises de tecidos vegetais, pois possui alta sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão para avaliar desde elementos traço a macronutrientes (Figura 6).

pelos efeitos de matriz, geralmente são corrigidos através de padronização interna, adição de padrão, diluição isotópica utilização de gás auxiliar e configuração dos parâmetros instrumentais (SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, 2009).

Du e colaboradores (2020) avaliaram respostas ionômicas do arroz exposto a 50, 100, 150, 200 e 250 mg L⁻¹ de As^{III}, As^V, monometilarsênico (MMA) e dimetilarsênico (DMA) por 24 h. Neste trabalho, os autores observaram correlações positivas entre P e Fe em raízes de arroz tratadas com qualquer uma das espécies de As, sugerindo que P e Fe compartilham processos biológicos similares. Análise de agrupamento hierárquico (HCA) e componentes principais (PCA) evidenciou diferenciação ionômica entre raízes e parte aérea e discriminou espécies diferentes de As. Este estudo também revelou que os perfis ionômicos nas plantas de arroz são suficientes para detectar respostas a distúrbios ambientais.

Em um outro estudo de interações ionômicas, Watanabe e colaboradores (2016) empregaram ICP-MS para determinação multielementar em folhas e frutos de 24 espécies vegetais cultivadas em grandes campos agrícolas. Os resultados mostraram que os elementos homólogos compartilham o mesmo sistema de transporte e correlação significativa foi observada em algumas famílias. A comparação dos íons indicou que o Cd e o B acumularam preferencialmente na berinjela, provavelmente devido ao seu transporte eficaz no floema. Além disso, os autores apontaram que diferenças nas características do acúmulo mineral são susceptíveis em afetar os perfis ionômicos de diferentes famílias, proporcionando novos conhecimentos sobre as influências filogenéticas.

Com o objetivo de avaliar o transporte e distribuição de Cd e As em arroz, Feng et al. (2017) determinaram 16 elementos por ICP-MS em 14 partes diferentes de 21 genótipos de arroz. Os resultados mostraram que a concentração de Cd/As na raiz e nos nós foi significativamente mais alto quando comparado às outras partes. O nó I (próximo ao ápice) apresentou o maior teor de Cd, levando a um aumento nas expressões gênicas envolvidas na desintoxicação de Cd. A distribuição e transporte de Cu/Zn/Co para várias partes foi semelhante à do Cd, e a distribuição e transporte de Fe/Sb para várias partes foi semelhante à de As. Cu/Zn/Co/Mg mostrou correlação com Cd em raiz e nós, assim como Fe com As. Além disso, segundo os autores, o perfil ionômico refletiu as relações entre as partes da planta e correlações entre os elementos, sugerindo que os nós são centros de distribuição de elementos.

3.6.2 Espectrometria de Massas com Ionização Ambiente

A espectrometria de massas com ionização por eletrospray foi proposta por Fen para identificação de polipeptídeos e proteínas até 40KDa em 1989. Esta técnica consiste na ionização à pressão ambiente caracterizada pela formação de íons mais estáveis e minimização de fragmentações (HOFFMANN; STROOBANT, 2007). Seus princípios revolucionaram o estudo de biomoléculas, uma vez que permitiram o desenvolvimento de muitas outras técnicas de ionização ambiente classificadas segundo as diferenças nos processos de dessorção/ionização ou de amostragem/ionização (HUANG et al., 2011).

O processo de transferência de solução para fase gasosa, via ESI, envolve três etapas principais: I) produção de partículas carregadas quando uma alta voltagem é aplicada na extremidade do capilar onde a amostra é injetada; II) evaporação contínua do solvente e desintegração da microgota carregada; III) transferência de íons para a fase gasosa (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012). Similarmente a este processo de geração dos íons, as técnicas de espectrometria de massas por ionização ambiente tipo *Paper Spray* (PS-MS) e *Desorption Electrospray Ionization* (DESI-MS) são alternativas simplificadas e eficientes na detecção de diferentes compostos diretamente na amostra ou de superfícies auxiliares.

3.6.2.1 PS-MS

A PS MS (do inglês *Paper Spray Mass Spectrometry*) proposta por Wang e colaboradores em 2010 (LIN; LIOU, 2020) se tornou a mais popular variante da fonte de ionização ESI ao permitir análise de amostras complexas de forma direta e ao ar livre (MCBRIDE et al., 2019). Neste caso, uma pequena quantidade de amostra é colocada na superfície de um papel triangular sustentado por um clip metálico e posicionado na entrada do espectrômetro de massas (Figura 7). Uma alíquota de solvente é adicionada ao papel e sob aplicação de uma alta voltagem (2 a 5,5 KV), forma um spray de pequenas gotículas carregadas, o qual é induzido na ponta do papel, e os íons gerados são direcionados à entrada do espectrômetro de massas (MCBRIDE et al., 2019).

O solvente ou mistura de solventes (metanol:água e acetonitrila:água) forma espécies carregadas em solução, ácidos ou bases de *Bronsted- Lowry* que doam ou aceitam prótons, respectivamente, pelo equilíbrio ácido base.

A composição do solvente, bem como o ângulo e a distância da ponta do papel à entrada do equipamento podem afetar drasticamente a estabilidade da formação de íons e do sinal (LIN; LIOU, 2020; MCBRIDE et al., 2019). Além disso, o tipo de papel também é um parâmetro importante, sendo o papel cromatográfico o mais empregado em análises de amostras diversas. Outros métodos usando materiais modificados, incluindo papel com diferentes substratos, papel hidrofóbico e polímero condutor, também estão bem estabelecidos na literatura (LIN; LIOU, 2020).

No processo de formação de spray, há dois modos distintos. O primeiro modo ocorre em sistemas ricos em solvente, nos quais são criadas múltiplas conexões Taylor, resultando na produção de diversos tamanhos de gotas. Enquanto o outro modo ocorre em baixas taxas de fluxo de solvente e as correntes mais altas que podem ser produzidas como resultado de descarga corona. Estes processos dependem da composição do solvente (como a viscosidade ou a proporção de água para o solvente orgânico), vazão do solvente e voltagem aplicada (ESPY et al., 2012). A combinação de metanol e água é comumente empregada como solvente spray em diversas análises, mas outros solventes polares também podem ser aplicados, produzindo íons com uma distribuição interna de energia comparável à da ionização por nanoeletrospray (ESPY et al., 2012).

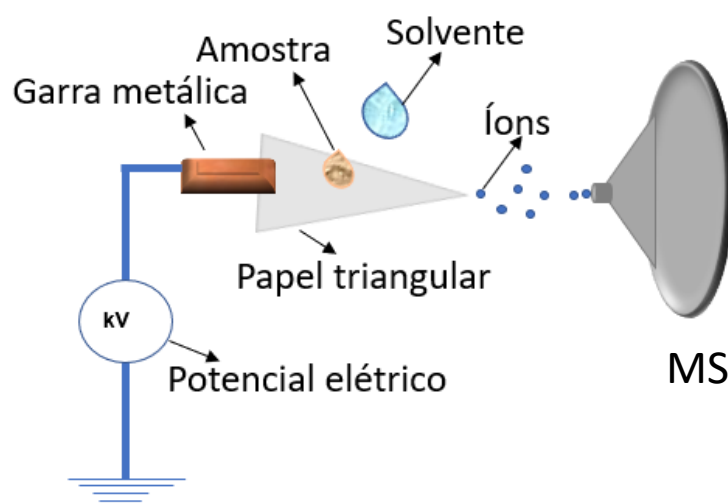


Figura 7 – Esquema da análise de extratos por PS-MS. Fonte: Própria

Nos últimos anos, a técnica PS-MS tem sido aplicada para *fingerprint* de diferentes amostras e em análises diretas de agroquímicos (PEREIRA et al., 2016), metabólitos em frutas (SILVA et al., 2019) e em plantas medicinais (BESSA et al., 2017).

Um interessante estudo de Sousa (2020) identificou GSH, PC₂, PC₃, complexos Sell-PC₂, AsIII-PC₃, As^V, As^{III}, ácido dimetilarsínico – DMA e ácido monometilarsônico - MMA) em extratos de raízes de linhaça dourada (*Linum usitatissimum* L.) co-expostas à As e Se durante o cultivo hidropônico. Neste estudo pioneiro do emprego da técnica PS-MS para identificação de fitoquelatinas foi otimizado um preparo de amostras com emprego de ácido fórmico 1% v v⁻¹ e controle rigoroso da temperatura durante o processo de extração e análise. Os resultados mostraram que a presença de As e Se ativou a síntese de PCs nas raízes como um mecanismo de tolerância da planta.

A versatilidade de aplicações da PS-MS apresenta uma alternativa de análise para técnicas convencionais, com vantagens como simplicidade, ausência ou mínimo preparo de amostra, tempo de análise, baixo custo, mínimo consumo de reagentes e geração de resíduos, bem como não exigência de reagentes específicos.

3.6.2.2 DESI-MSI

A técnica DESI (*Desorption Electrospray Ionization*) foi descrita por Cooks e colaboradores em 2004 (HOFFMANN; STROOBANT, 2007; XIAO et al., 2020) e seu princípio se baseia em um feixe de gotículas gerado por um fluxo baixo de solvente, aplicação de um gás nebulizador (N₂) e de um alto potencial de voltagem. Quando o feixe é direcionado a uma superfície, os fenômenos de dessorção, extração e ionização ocorrerão simultaneamente e os íons são direcionados para o capilar de entrada de uma interface de pressão atmosférica de um espectrômetro de massas (COOKS et al., 2006).

A técnica DESI pode ser aplicada em espectrometria de massas por imageamento (do inglês *Mass spectrometry imaging* – MSI) e foi introduzida para diagnóstico de câncer de mama humano. Atualmente apresenta-se uma técnica emergente e potencial para análise metabolômica de diferentes tecidos biológicos, como mostra a Figura 8 na análise direta de folhas saudável e contaminada por metal tóxico. A fonte DESI é acoplada a uma plataforma móvel automática que permite a

varredura pontual da amostra, gerando espectros de massas a cada pixel que compõem as imagens químicas 2D.

Considerando as diferentes aplicações em tecidos biológicos, DESI requer mínimo ou nenhum tratamento de amostra. Amostras são fixadas diretamente em um substrato (vidro, cerâmica ou polímeros (IFA et al., 2010) ou por impressão da amostra feita em membrana de politetrafluoretileno – PTFE, Teflon® poroso ou placa de cromatografia em camada delgada – TLC. Para o *imprint* das amostras, é necessária a aplicação de determinada pressão constante moderada, a fim de promover impressão ideal para análise (bem definida e sem espalhamento do extrato).

O *imprint* consiste na transferência dos metabólitos da planta para uma superfície plana e dura, mantendo sua distribuição espacial. Em tecidos vegetais, o *imprint* apresenta como desvantagem a quebra da integridade celular, pois os metabólitos podem ser "manchados" durante o processo de impressão (LEE et al., 2012). Contudo, a impressão é um método útil para amostras que podem murchar e degradar facilmente mesmo quando armazenadas sob baixa temperatura, como, por exemplo, folhas e flores (DONG et al., 2016). Além disso, o *imprint* é uma forma de contornar problemas de interferência da cutícula vegetal, uma vez que esta presença natural em folhas representa a primeira barreira para a imagem direta de MS de metabólitos, sendo necessária sua remoção com algum solvente apolar.

A maioria das amostras de plantas são secas a vácuo ou congeladas antes da MSI. Contudo, o alto teor de água nos tecidos das plantas representa um desafio durante a criosecção. Os tecidos das plantas são mais frágeis quando congelados e, além disso, é mais difícil obter seções finas e intactas para amostras de plantas ricas em água (DONG et al., 2016). O encolhimento ou descamação parcial da amostra é frequentemente observado na desidratação, e este fenômeno geralmente resulta em uma superfície irregular que afeta ainda mais a análise MSI. Além disso, a pressão a vácuo e o tempo de secagem devem ser cuidadosamente otimizados de acordo com a natureza da amostra e dos analitos, pois compostos como óleos essenciais voláteis, terpenos, álcoois e outras pequenas moléculas podem ser perdidos durante o processo (DONG et al., 2016).

Outra alternativa para análise MSI é a utilização de tecidos vegetais frescos, pois são quimicamente inalterados e livres de tratamento. Nessas condições, a disposição espacial das moléculas é preservada e o risco de contaminação química durante o manuseio da amostra é minimizado (DONG et al., 2016).

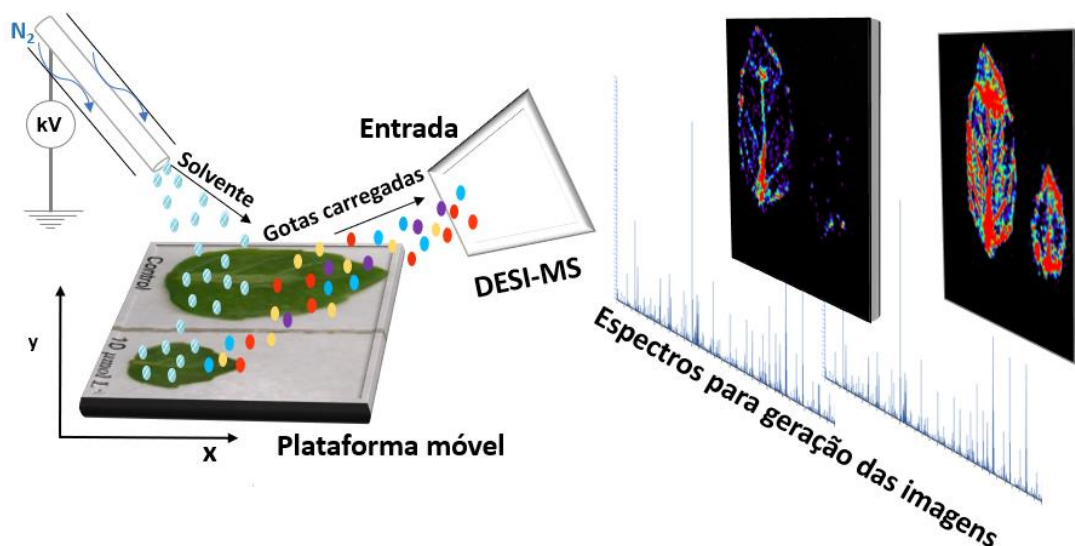


Figura 8 – Esquema do funcionamento do DESI-MSI em amostras de folhas. Fonte: Adaptado de Teles *et al.* (2021)

Estudos recentes mostram a aplicação da técnica DESI-MSI em tecidos de plantas para detecção de metabólitos primários, secundários, monitoramento ambiental e folhas de plantas expostas a metais tóxicos (DONG *et al.*, 2016; FREITAS *et al.*, 2019; GERBIG *et al.*, 2015; SOUSA, 2020).

Como exemplo do emprego da técnica DESI-MSI na elucidação de biomarcadores em tecido vegetal, De Moraes Pontes e colaboradores (2020) investigaram diferentes metabólitos associados à doença *Huanglongbing* (HLB) em folhas de laranjeira (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) sintomáticas, assintomáticas e saudáveis. Análises das folhas também foram realizadas por LC MS/MS e por meio do MSI foi possível identificar fitohormônios, ácidos orgânicos, carboidratos, flavonoides e aminoácidos já relatados previamente na literatura. Os metabólitos (ácido abieta-8,11,13-trien-18-óico e 4-acetil-1-metilciclohexeno) apresentaram maior distribuição nas folhas sintomáticas. Os autores também reportaram a importância da detecção desses metabólitos em folhas assintomáticas como diagnóstico de HLB, potencializando buscas de novos biomarcadores.

Neste sentido, a técnica DESI-MSI é promissora para estudos metabolômicos em plantas, uma vez que informações de imageamento químico de diferentes classes de compostos orgânicos presentes nos tecidos das plantas (folha e raiz) podem ajudar no esclarecimento da dinâmica, transporte e biossíntese de metabólitos sob os efeitos do metal tóxico, inclusive do Cd.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras e reagentes

As sementes de manjeriço, *Ocimum basilicum* L. grecco a palla (Isla Pak MULTI, lotes - 112860-008 S2 e 115553 – 002, 114381 – 002, 112860 – 008, 116578 – 005, 117114 – 003, 119376 – 000) foram adquiridas no Mercado Central de Belo Horizonte, MG. As amostras de 80 pacotes foram misturadas manualmente a fim de obter uma amostra composta de sementes para cultivo.

Os reagentes empregados na determinação elementar foram o HNO_3 65 % m m^{-1} (Merck, Germany), purificado pelo sistema DuoPUR (Milestone, Sorisole, Italy), H_2O_2 30% m m^{-1} (Merck, Germany) e a água ultrapurificada pelo sistema Milli-Q (Millipore Direct-Q 3 a 18,2 $\text{M}\Omega$ cm). Todos os materiais usados foram descontaminados em banho de HNO_3 10 % (v v^{-1}), por no mínimo 24 h, enxaguados com água ultrapurificada e secos à temperatura ambiente. O material de referência certificado de folha de espinafre SRM NIST 1570^a foi empregado na extração assistida por ultrassom.

Para as análises em PS-MS e DESI-MSI foi usado Metanol grau HPLC (Phillipsburg, NJ, USA). Ainda em PS-MS, foram usados ácido fórmico da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e papel cromatográfico CHR Whatman (Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) e K_2HPO_4 10 mM (Neon, São Paulo, Brazil).

Nas análises por DESI-MSI foram empregados como substratos para impressão das amostras, membrana de politetrafluoretileno (PTFE) com tamanho de poro de 0,45 μm e 47 mm de diâmetro (Allcrom) e placa de sílica TLC sílica gel 60W (*Analytical Chromatography*, Sigma Aldrich).

As curvas analíticas foram definidas em 6 e 7 níveis de concentração a partir da diluição de padrão 1000 mg L^{-1} de Cd (Fluka, Sigma Aldrich, Switzerland) e de padrão multielementar 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Al, Ba, Be, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Sr e Zn (ESI, M1-ICPMSE-100, USA) para determinações por FAAS e ICP-MS, respectivamente.

4.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos procedimentos de preparo das amostras foram: balança analítica Shimadzu AX 200 (São Paulo, Brasil), microcentrífuga Modelo

0222E24 600 W (Quimis®, São Paulo, Brasil), liofilizador 0222E24, MODULYOD-230 Thermo Electron Corporation (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany), forno de micro-ondas com cavidade Milestone ETHOS 1 (Soriso, Itália) equipado com rotor de alta pressão HPR-1000/10s e processador ultrassônico *cup horn* modelo VCX 505 (Sonic & Materials INC, EUA) operando com 500 W e 20 kHz.

Um espectrômetro de absorção atômica equipado com lâmpada de deutério Agilent SpretAA 240FS AA (Norwalk, CT, EUA) como corretor de fundo e uma lâmpada de cátodo oco ($\lambda = 228,8$ nm) (Santa Clara, USA) foi usada para a determinação de Cd. As condições instrumentais foram as seguintes: composição da chama ar/acetileno (fluxo de ar 13,50 e fluxo de acetileno 2,0 L min⁻¹), tempo de *delay* e medida de 10 s, largura da fenda de 0,5 nm e corrente 4,0 mA.

Um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado 7700 (Agilent Technology, Tóquio, Japão) foi usado para a determinação Cd, Al, Ba, Be, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Sr e Zn. A célula de colisão (gás He 99,99% de pureza) foi usada para correções de interferência isobárica. As condições instrumentais são apresentadas na Tabela 1 a seguir. A condição operacional do Equipamento ICP-MS foi otimizada usando solução padrão *Tunning* contendo Ce, Co, Li, Tl e Y 1µg L⁻¹ (Agilent Technologies, Tóquio, Japão).

Tabela 1 – Condições operacionais do ICP-MS para determinação multielementar de folha, caule e raiz de manjeriço

Parâmetros instrumentais	
Tocha	Quartzo ($\varnothing_{int} = 2,5$ mm)
Cones de interface	Ni
Tubos Tygon	$\varnothing = 1,02$ mm
Câmara de nebulização	concêntrica
Potência do plasma	1550 W
RF	1,8 V
Velocidade da Bomba Peristáltica	0,5 rps
Vazão do gás	1,09 L min ⁻¹ (modo <i>no gas</i>)
	1,20 L min ⁻¹ (modo He)
Vazão do fluxo de ar	4,7 mL min ⁻¹
Medidas	
Varredura	100
Tempo de integração	0,3 s
Replicatas	3
Resolução	< 1
<i>m/z</i> monitorados	He
	27Al ⁺ , 111Cd ⁺ , 44Ca, 55Mn ⁺ , 56Fe ⁺ , 137Ba ⁺ , 63Cu ⁺ , 66Zn ⁺ e
	modo <i>no gas</i> 88Sr ⁺ ;
	9Be ⁺ , 39K ⁺ , 7Li ⁺ , 24Mg ⁺

Um espectrômetro LCQ Fleet (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) equipado com fonte para ionização paper spray foi usado para identificação de GSH, PC e seus derivados. As análises foram realizadas no modo positivo segundo os seguintes parâmetros instrumentais: voltagem da fonte de 4,0 kV; voltagem capilar e temperatura de 17 V e 275 °C, respectivamente; lentes tubulares de 120 V; e faixa de massa de m/z 300 a 1100 divididos em intervalos de m/z 200. As energias de colisão para fragmentação dos compostos variaram de 20 a 30 eV.

Para identificação dos metabólitos nos tecidos vegetais foi empregada a técnica com ionização Ambiente por DESI-MSI Q Exactive Hybrid Quadrupole – Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Alemanha), com resolução de 140.000 FWHM e um erro na precisão de massa de no máximo 3 ppm. A plataforma móvel de fonte de ionização Ion Source modelo OS-3202D (OmniSpray, Prosolia, EUA) foi configurada para tamanho do pixel de 200 x 200 μm e taxa de varredura de 740 $\mu\text{m sec}^{-1}$. A faixa de massa, voltagem do spray, temperatura do capilar, nível de radiofrequência de S-lens e voltagem e resolução foram, respectivamente: m/z 100 a 1.000 no modo positivo e negativo, 5 kV, 300 °C, 70 e 25 V e 70.000.

4.3 Germinação e Cultivo das amostras

As sementes de manjeriço foram germinadas por 3 dias em papel *germitest* (adaptado em dessecador) e umedecidas diariamente para obtenção de 0,5 cm de comprimento de raiz, no mínimo (Figura 9).



Figura 9 – Desenvolvimento de radículas durante o processo de germinação das sementes de manjeriço *Grecco a Palla* (*Ocimum basilicum*). Fonte: Própria

Para realização do cultivo hidropônico, foram utilizados potes pretos de 1100 mL de capacidade, com folha de papel alumínio previamente adaptada a fim de evitar luminosidade na solução e, conseqüentemente, presença de algas. Com auxílio de uma agulha, foram feitos orifícios no papel alumínio com distanciamento de 2 cm.

O cultivo hidropônico foi realizado em solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND, 1959) 5% v v⁻¹ a partir das seguintes soluções estoque, nesta ordem, KNO₃ 1 mol L⁻¹, Ca(NO₃)₂.4H₂O 1 mol L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,5 mol L⁻¹, (NH₄)₂HPO₄ 0,25 mol L⁻¹, H₃BO₃ 10mmol L⁻¹, MnCl₂.4H₂O 18 mmol L⁻¹, CuSO₄.5H₂O 0,3 mmol L⁻¹, Na₂MoO₄.2H₂O 0,2 mmol L⁻¹, ZnSO₄.7H₂O 5 mmol L⁻¹, FeNaEDTA 100 mmol L⁻¹. O pH da solução foi mantido a 5,5 durante os experimentos.

4.4 Testes de Toxicidade ao Cd

Em cada pote com aproximadamente 660 mL de solução nutritiva, treze radículas foram colocadas sobre o papel alumínio, conforme Figura 10. Dessa forma, foram feitas triplicatas biológicas de amostra composta de 13 indivíduos cada uma. As soluções dos potes foram suplementadas com 0; 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 µM de Cd(NO₃)₂.4H₂O e a cada 3 dias foram realizadas trocas. Para a determinação da EC₅₀ (concentração efetiva que inibe 50 % do crescimento da raiz), as soluções dos potes foram suplementadas com 0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 µM de Cd(NO₃)₂.4H₂O. Após 15 dias de cultivo nas condições acima descritas, as amostras foram lavadas abundantemente com água deionizada a fim de evitar resíduos de soluções de cultivo na sua superfície.

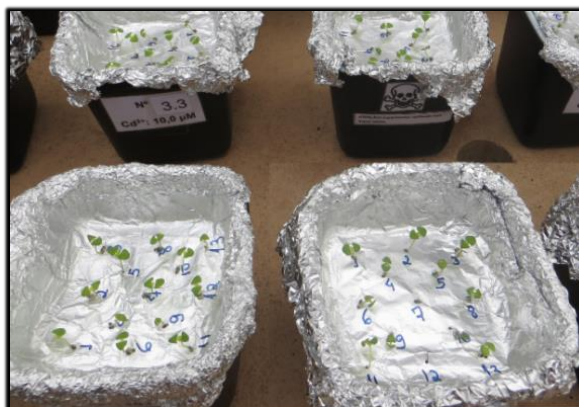


Figura 10 - Cultivo do manjerição em solução nutritiva de Hoagland a 5% v v⁻¹. Fonte: Própria

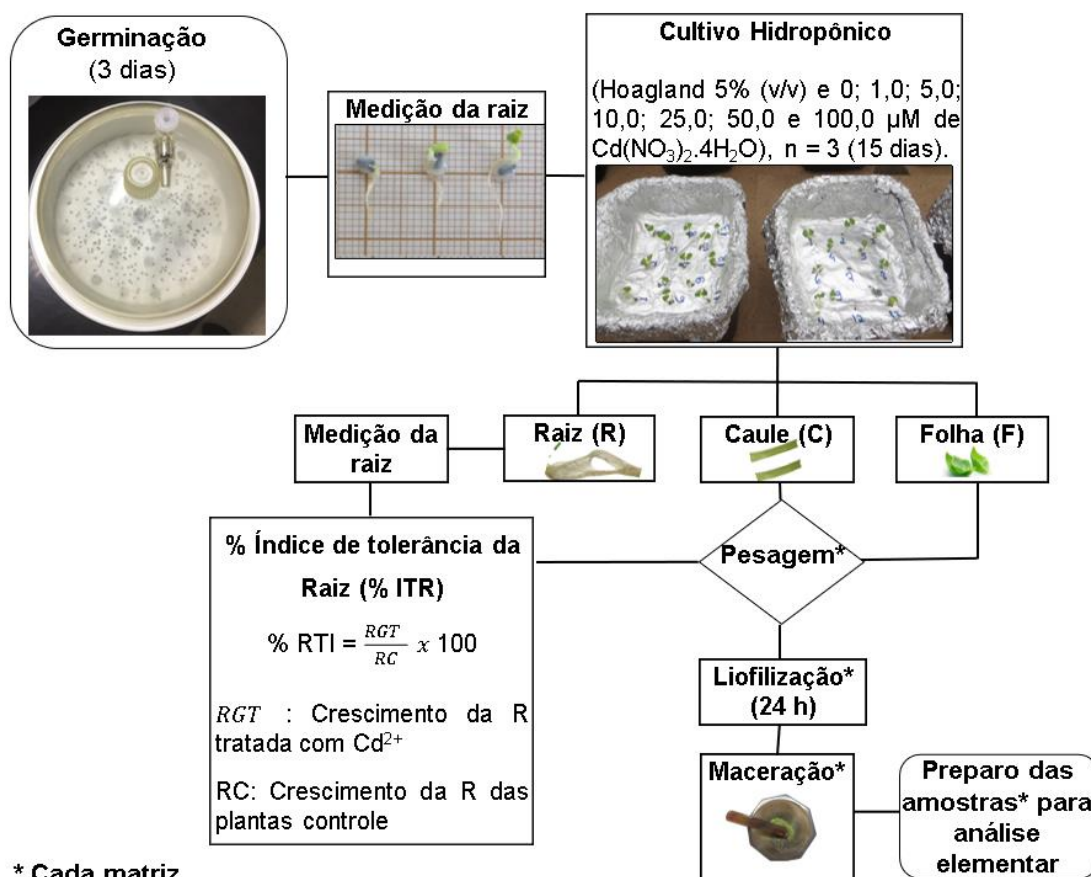
Posteriormente, as amostras foram dispostas em papel milimetrado para medição da parte aérea e raiz de cada planta. Em seguida, as amostras foram fracionadas manualmente em raiz (R), caule (C) e folha (F) e transferidas, separadamente, para tubos *Corning* de 15 mL e então armazenadas em freezer até preparo para análise.

A sensibilidade do manjeriço foi avaliada pela determinação da concentração efetiva que causa 50% de inibição do crescimento da raiz em comparação com o grupo controle (sem adição Cd^{II}). Assim, o comprimento da raiz foi medido no início do cultivo (d₀) e no último dia de exposição (d₁₅), da junção caule e raiz até a ponta da raiz (ABORODE et al., 2016) para o cálculo do índice de tolerância da raiz (% RTI) segundo a equação a seguir:

$$\% RTI = \frac{C_f}{C_i} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que C_f e C_i são os comprimentos da raiz das plantas expostas ao Cd e plantas controle (não foram tratadas com Cd), respectivamente.

Para obtenção da massa seca, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e então liofilizadas por, no mínimo, 24 h. Em seguida foram pesadas, maceradas em graal e pistilo de ágata e armazenadas em dessecador para posterior procedimento de preparo das amostras por micro-ondas (MW) e ultrassom (US), conforme Figura 11.



* Cada matriz

Figura 11 – Esquema do cultivo, cálculo da EC₅₀ e separação dos tecidos vegetais para análise multielementar

Após determinação da EC_{50} ($3,6 \mu\text{M}$ de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), também foi feito cultivo, em triplicata, nesta concentração para avaliação ionômica e metabolômica.

As análises por PS-MS foram realizadas somente nas amostras cultivadas nas concentrações 0 e $10,0 \mu\text{M}$ de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ com tempo de cultivo de 7 dias e 14 dias. Para as análises por DESI-MSI foram empregados 2 cultivos diferentes, sendo o 1º cultivo realizado com adições iguais a 0; 1,0; 3,6; 5,0; 25 e $50 \mu\text{M}$ e 2º cultivo a 0; 1,0; 3,6; 10,0; 25,0; 50,0 e $100,0 \mu\text{M}$ de Cd^{II} .

Contudo, devido às limitações da estrutura dos cultivos iniciais, somente os cultivos das amostras analisadas por PS-MS e DESI-MSI (2º cultivo) foram realizados em ambiente controlado, ou seja, a temperatura de $28,6 \pm 2,0^\circ\text{C}$, 12 h escuro/12 h luz a $830,1 \text{ lux}$ e $50 \pm 5\%$ de umidade.

4.5 Pré-tratamento das amostras para análise elementar

Nas etapas de otimização do preparo das amostras foi utilizado um pool de cada matriz (F, C e R) cuja composição foi obtida pela mistura de amostras cultivadas sob diferentes concentrações de Cd.

4.5.1 Digestão assistida por radiação micro-ondas (MW)

Para o procedimento de digestão por MW, 5 mg de F e 2 mg de C e R de um pool de amostra foram pesados diretamente nos frascos reacionais de PFA, seguido da adição de 4,0, 3,0 e 1,0 mL de HNO_3 , H_2O e H_2O_2 , respectivamente. Foram preparados 10 brancos analíticos para avaliação do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do procedimento MW para determinação de Cd por FAAS.

O programa de aquecimento foi realizado à pressão de 700 W e consistiu em uma rampa de aquecimento de 10 min até 150°C , mantendo-se nessa temperatura por 20 min, com posterior resfriamento por 30 min. O volume final dos digeridos foi aferido para 10,0 mL com água ultrapura.

Para a determinação de Cd por FAAS, foram empregados seis níveis de concentração para a curva de calibração, variando de 0,05 a $1,05 \text{ mg L}^{-1}$, além do branco analítico.

4.5.2 Microextração assistida por ultrassom (MUS)

Para os procedimentos de microextração no sonorreator *cup horn* foi adaptado um suporte de isopor para 8 microtubos de 2,0 mL, conforme a Figura 12.



(A)



(B)

Figura 12 – (A) Suporte para microtubos adaptado (B) copo do sonorreator *cup horn*.
Fonte: Própria

Foi realizada a otimização de um procedimento de MUS em sonorreator tipo *cup horn* para cada matriz (F, C e R) empregando o planejamento fatorial 2_{IV}^{4-1} , com triplicata no ponto central (Tabela 2) com detecção por ICP-MS.

Para todos os ensaios do planejamento experimental, as amostras de F, C e R foram pesadas diretamente nos microtubos. Em todos os ensaios, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 12000 rpm. Em seguida, as soluções foram diluídas adequadamente antes da introdução no ICP-MS.

A partir da avaliação das variáveis significativas no planejamento anterior e com base na literatura, foi avaliada a melhor composição do solvente extrator (HNO_3 e H_2O_2) para o procedimento de extração de Cd em sonorreator *cup horn* a 5 min e amplitude 50 %. Para isso, empregou-se a metodologia de superfície de resposta composto central 2^2 (CCD), com quadruplicata no ponto central para a determinação de Cd por FAAS. As variáveis concentração de HNO_3 e volume de peróxido variaram de 2 a 10% e 50 a 100 μL , respectivamente. A otimização dos parâmetros mostrou que a microextração multielementar eficiente ocorreu empregando-se concentração final de ácido igual a 2% v/v (8 μL de HNO_3 , 292 μL de H_2O e 100 μL de H_2O_2). Após otimização, as massas de amostras foram padronizadas para 3 mg para todas as matrizes e foram empregadas também no preparo das amostras quantificadas por ICP-MS.

Tabela 2 – Planejamento fatorial fracionado 2_{IV}^{4-1} , com triplicata no ponto central, para otimização do procedimento MUS nas diferentes matrizes de F, C e R do manjeriço

Condições Fixas					
Massas das amostras: 5,0 mg de F, 2,0 mg de C e 2,0 mg de R					
Volume final: 400 μ L					
Variáveis	Unidade	Níveis			
		(-)	0	(+)	
Concentração de HNO ₃	%	25	50	75	
Volume de H ₂ O ₂	μ L	0	25	50	
Amplitude	%	25	50	75	
Tempo	min	5	10	15	
Experimento	HNO ₃ (%)	H ₂ O ₂ (μ L)	Amplitude (%)	Tempo (min)	
1	-	-	-	-	
2	+	-	-	+	
3	-	+	-	+	
4	+	+	-	-	
5	-	-	+	+	
6	+	-	+	-	
7	-	+	+	-	
8	+	+	+	+	
PC*	0	0	0	0	

* Ponto Central (n=3)

4.6 Validação do procedimento de microextração assistida por ultrassom

Para avaliação da eficiência analítica foram adotados os critérios de acordo com os guias do INMETRO (2018). Além disso, foi feita uma comparação dos procedimentos MUS e o MW para a determinação de Cd por FAAS.

4.6.1 Linearidade

A linearidade para determinação multielementar por ICP-MS foi avaliada a partir de um padrão 10 mg L⁻¹ (Al, Ba, Be, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Sr e Zn) em HNO₃ 0,4 % v v⁻¹, com 7 níveis de concentração (0; 5; 15; 30; 45; 60; 75 e 90 μ g L⁻¹). Os pontos das curvas analíticas foram preparados em triplicata e de forma aleatória.

Para avaliação da linearidade foram adotados os critérios de Souza e colaboradores (2005), para *outliers* com base nos resíduos padronizados de Jackknife, normalidade e independência dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner e Durbin-Watson, respectivamente. Em seguida, foi avaliada a homocedasticidade dos resíduos pelo teste de Levene modificado e a análise de regressão linear ($y = ax + b$) com estimativa dos parâmetros, desvios, significância e intervalos de confiança pela ANOVA.

4.6.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação instrumentais foram determinados a partir de 10 replicatas (INMETRO, 2018) de brancos dos procedimentos, conforme as seguintes equações:

$$LD = \frac{3,3 s}{b} \quad \text{Equação 2}$$

$$LQ = \frac{10 s}{b} \quad \text{Equação 3}$$

onde s: desvio padrão da resposta do branco e b: coeficiente angular da curva analítica.

4.6.3 Veracidade e Precisão

A avaliação da veracidade e precisão do procedimento MUS na determinação dos analitos Al, Ca, Cd, Cu, K, Mg, Mn, Sr e Zn foi realizada com 3 mg de MRC de folha de espinafre NIST 1570a.

Na ausência de Material de Referência Certificado (CRM) para os demais analitos deste estudo e para o manjeriço, a avaliação da exatidão e precisão do procedimento foi realizada pelo estudo de adição e recuperação para F, C e R de modo a simular a concentração real nestas três matrizes. Para isso, foi adicionado padrão multielementar nas matrizes brancas (0,005, 0,015 e 0,10 mg L⁻¹ para F e 0,05; 0,15 e 0,30 mg L⁻¹ para C e R). As amostras com concentrações média e alta adicionadas no caule e raiz foram diluídas 2,5 e 4 vezes, respectivamente, e a mais alta concentração na folha foi diluída 2 vezes para as medidas por ICP-MS.

A veracidade e precisão do procedimento foram avaliadas por meio das Equações 4 e 5, conforme INMETRO (2018).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

$$CV (\%) = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{concentração média determinada}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

4.6.4 Seletividade

Para avaliação do efeito de matriz, F, C e R sem o analito disponível (amostra branca) na faixa de estudo (baixa, média e alta) foram avaliados em triplicata por nível de concentração (INMETRO, 2018).

O estudo do efeito de matriz na determinação de Cd foi realizado em amostras com 10% de cada matriz (sem Cd), com adição de três concentrações em cada uma para determinação de Cd por ICP-MS (F: 15; 45 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$). Para avaliar os dados obtidos, por nível de concentração, foram empregados o teste F de homogeneidade de variâncias e o teste t de comparação de médias (INMETRO, 2018).

4.7 Fator de Translocação e Bioacumulação de Cádmio

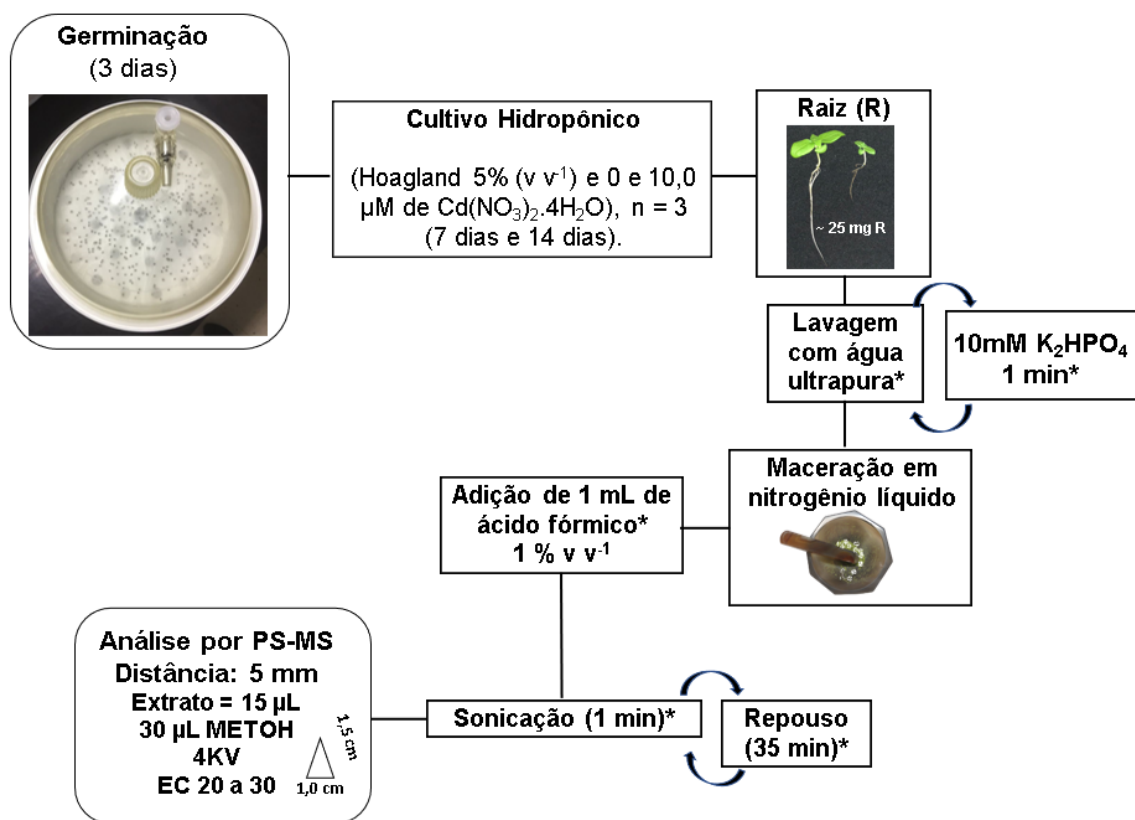
O fator de translocação (FT) (ALAMO-NOLE; SU, 2017) foi calculado pela equação 6 a seguir.

$$FT = \frac{[\text{Metal}]_{pa \text{ ou } fou \ c}}{[\text{Metal}]_r} \quad \text{Equação 6}$$

em que $[\text{Metal}]_{pa}$, $[\text{Metal}]_f$, $[\text{Metal}]_c$ e $[\text{Metal}]_r$ são as concentrações de Cd (mg kg^{-1}) na parte aérea da planta (caule e folha), na folha, caule e na raiz, respectivamente.

4.8 Preparo das amostras para identificação de GSH e PCs por PS-MS

Baseado em Sousa (2020), aproximadamente 25 mg de raiz fresca de manjeriço obtidas do mesmo cultivo (7 dias e 14 dias) foram lavadas em água ultrapura a $4,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e transferidas para uma solução de 10mM K_2HPO_4 , na mesma temperatura, por 1 min. As amostras foram novamente lavadas em água ultrapura e após remoção do excesso de água com papel de filtro, foram transferidas para um graal. Então, a amostra foi macerada em nitrogênio líquido e 1 mL de ácido fórmico 1% v v⁻¹ foi adicionado. A amostra foi transferida para microtubo de 2 mL para sonicação em banho de ultrassom ($3,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$) por 1 min. Após 35 min, a amostra foi sonicada novamente (1 min) e imediatamente analisada. Entre cada medida, as amostras ficaram armazenadas em banho de gelo, pois a fonte de análise por PS-MS requer ajustes manuais na plataforma móvel a cada troca do triângulo. Todo o procedimento de preparo das amostras supracitado está representado na Figura 13.



* Temperatura controlada < 5°C

Figura 13 – Preparo das amostras de raízes do manjericão para análise por PS-MS.

O papel cromatográfico foi cortado em triângulo isósceles (1,5 cm de lado e 1 cm de base) e sua base fixada em um clipe de cobre com a ponta rigorosamente posicionada a 5 mm do orifício de entrada do espectrômetro de massas (Figura 14). Para cada análise, 15 μL do extrato das raízes e 30 μL de metanol (solvente spray), nesta ordem, foram adicionados ao triângulo e, uma voltagem de 4 kV foi aplicada ao clipe para formação do spray.

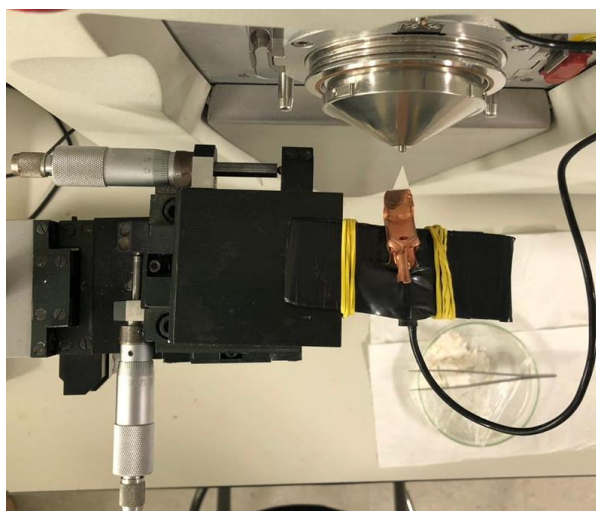


Figura 14 – Análise de extratos das raízes do manjericão por PS-MS. Fonte: Própria

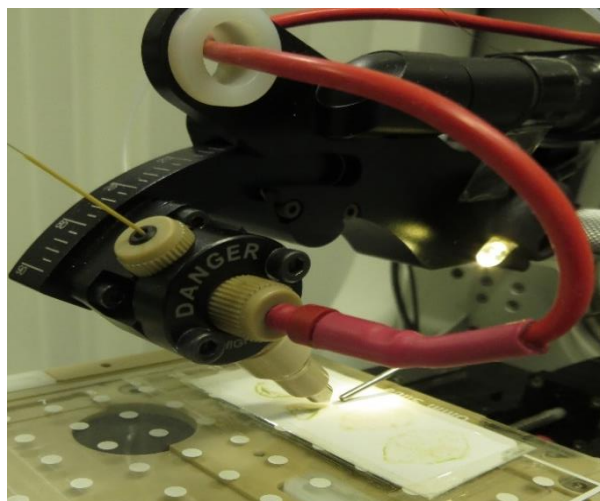
4.9 Análise metabolômica por DESI-MSI

Folhas frescas de manjeriço totalmente expandidas a partir do ápice foliar foram selecionadas para a análise. A superfície abaxial de cada folha foi lavada com hexano para remoção da camada natural de cera. As análises do 1º cultivo foram realizadas por *imprint* do lado abaxial das folhas, cujos analitos foram transferidos para substratos diferentes (membrana PTFE e placa de TLC) por meio de forte pressão. Foram analisados 2 cm da parte mais volumosa das raízes das plantas controle e contaminada a 25 µM (1º cultivo), cujo *imprint* foi feito diretamente na placa de TLC. As folhas do 2º cultivo foram fixadas em uma fita adesiva dupla face (com lado abaxial disponível para análise) aderida a uma lâmina de vidro.

Os substratos com *imprint* das amostras e lâmina de vidro para a análise direta foram posicionados diretamente na plataforma móvel de DESI-MSI. As Figuras 15 (A e B) e 16 mostra a análise por DESI-MSI e um fluxograma detalhado das condições de cultivo e análises das diferentes amostras por DESI-MSI, respectivamente



(A)



(B)

Figura 15 – Folhas de manjeriço sendo analisadas por DESI-MSI por (A) Análise direta e (B) *imprint*. Fonte: Própria

4.10 Tratamento dos Dados

Os tratamentos dos resultados de composição elementar nas folhas, cálculo do % ITR, a avaliação de *outliers*, testes de linearidade, cálculo da EC₅₀, análises estatísticas (ANOVA, teste t) e dos planejamentos experimentais foram realizadas pelo Microsoft Excel™ (Excel Version, 2007), OriginPro 8.0. e Design Expert 11.0.

As correlações de Pearson com significância de regressão ($p < 0,5$) e o gráficos correspondentes para F, C e R foram avaliados pelo software RStudio 3.5.1. Além disso, as respostas ionômicas para o estresse ao Cd foram avaliadas pela Análise de componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamento hierárquico (HCA) em Matlab R201A. As concentrações dos elementos individuais (variáveis) foram autoescaloadas antes da HCA via procedimento de Ward's e distância Euclidiana. A concentração de Cd no cultivo foi separada em grupos: controle (0 μM), 1 (3,6 μM), 2 (5,0 μM), 3 (25,0 μM), 4 (50,0 μM) e 5 (100,0 μM).

Nas análises por DESI-MSI, os softwares da plataforma móvel, do processamento de dados MS, da conversão das imagens, da geração/visualização das imagens foram: Prosolia OmniSpray 2D (version 2.0.1), Xcalibur Qual Browser, Firefly version 2.1.05 e BioMAP (version 3.8.04), respectivamente. Para cada imagem obtida, foi empregado *bin size* de até 5 no software BioMAP.

A identificação dos metabólitos obtidos por DESI-MSI foi proposta com base nas massas exatas dos íons e seus respectivos perfis de distribuição isotópica, em comparação com bases de dados online, tais como: Metlin¹, *human metabolome database* (HMDB),² *plant metabolome database* (PMDB)³, Dicionário de Produtos Naturais⁴, Pubchem⁵, Chemcalc⁶ e CEU Mass Mediator⁷.

Os diagramas de Venn foram construídos no site *Bioinformatics Evolutionary Genomics*⁸.

4.11 Gerenciamento dos Resíduos

Todos os resíduos gerados durante o trabalho experimental foram acondicionados em recipientes apropriados para encaminhamento ao Entrepasto do Departamento de Química do ICEX - UFMG.

¹ <https://metlin.scripps.edu>

² <https://hmdb.ca/>

³ <http://scbt.sastru.edu/pmdb>

⁴ dnp.chemnetbase.com

⁵ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

⁶ <https://www.chemcalc.org/>

⁷ <http://ceumass.eps.uspceu.es/mediator/List.xhtml>

⁸ <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>

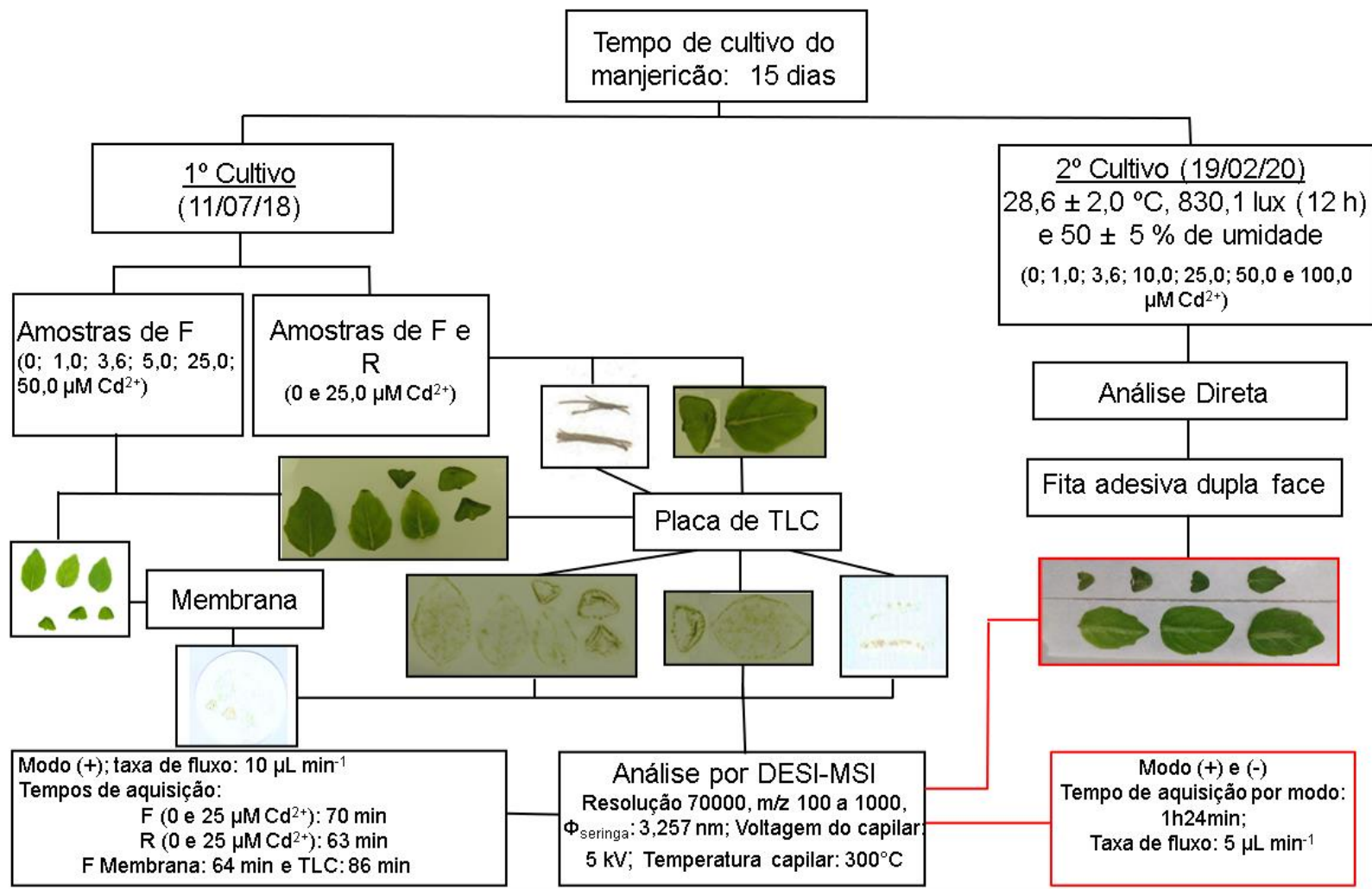


Figura 16 – Fluxograma das análises de folhas e raízes de manjericão por DESI-MSI sob diferentes condições experimentais

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Testes de toxicidade

A espécie *Ocimum basilicum* L. cultivar *grecco a palla* é muito sensível ao Cd, uma vez que pequenas concentrações empregadas no cultivo promoveram alterações no desenvolvimento das plantas. O comprimento das raízes foi medido no início do cultivo (dia 1) e após a coleta (dia 15) das amostras para avaliação do índice de tolerância da raiz (% ITR) e determinação da EC₅₀. Para o cálculo do % ITR, foi avaliado o crescimento da raiz empregando os níveis de concentração de cultivo supracitados, com obtenção de um valor de aproximadamente 3 µM para EC₅₀. Ao considerar a faixa de trabalho muito ampla, a EC₅₀ foi uma estimativa para cultivar as amostras nas concentrações de 0 a 5,0 µM equidistantes 1,0 µM. Os dados para cálculo do % ITR e EC₅₀ igual a 3,6 ± 0,3 µM são apresentados na Figura 1A e Tabelas 1A (Apêndice 1).

Assim, o cultivo do manjericão foi realizado na presença de Cd^{II} (0; 1,0; 3,6; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 ou 100,0 µM) e somente para a concentração 1,0 µM não foram observados sintomas de toxicidade de Cd como diminuição do número de folhas, clorose e escurecimento da raiz. Contudo, para as demais concentrações, além de mudanças fenotípicas, ocorreu também uma redução significativa de massa seca, conforme mostra a Figura 17.

Todas as concentrações de Cd^{II} utilizadas afetaram negativamente a acumulação de biomassa nos órgãos do manjericão (Figura 17). O aumento das concentrações superiores a 5 µM comprometeu gravemente a acumulação de biomassa nas plântulas de manjericão. A biomassa acumulada nas raízes, caules e folhas das plântulas tratadas com 3,6 ou 5,0 µM Cd foi aproximadamente 60% inferior às plantas controle, independentemente do órgão investigado (Figura 17). A acumulação de biomassa em F, C e R foi de 36, 31 e 27 %, respectivamente. Enquanto a 100,0 µM de Cd, a biomassa de F, C e R foi inibida em 91, 78 e 96%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle. Como esperado, as raízes foram os tecidos mais afetados pelo tratamento com Cd a 25,0 µM ou 100,0 µM (Figura 17). O comprometimento da acumulação de biomassa foi semelhante entre os tecidos das plântulas em todos os tratamentos, exceto para 25,0 e 100 Cd µM ($p < 0,05$). Os

resultados corroboram com os relatados para *Ocimum basilicum* var. *Purpurescens* (GHAREBAGHI; ALBORZI HAGHIGHI; AROUIEE, 2017). Similaridades ($p < 0,05$) também foram observadas para o caule nas concentrações $< 5 \mu\text{M}$ e entre as concentrações $> 3,6 \mu\text{M}$, com exceção da $50 \mu\text{M}$, devido provavelmente à função deste órgão no transporte de nutrientes.

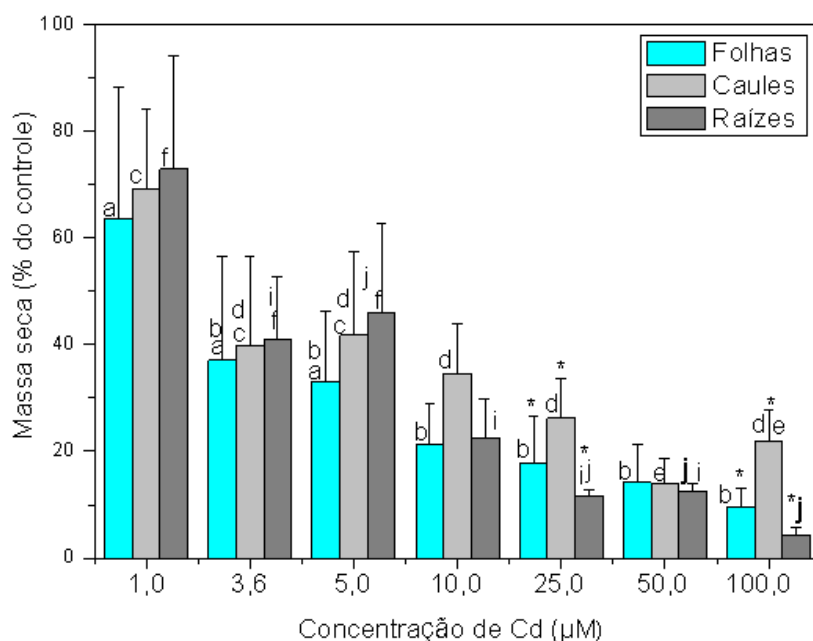


Figura 17 – Acumulação de biomassa ($\bar{X} \pm s$, $n = 3$) em tecidos de *Ocimum basilicum* var. *Grecco a Palla* afetados pelo aumento da concentração de Cd ($1,0 - 100,0 \mu\text{M}$). Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos para um certo órgão (folha, caule ou raiz) como atestado pelo teste de comparação múltipla de Tukey (pós-teste ANOVA $p < 0,05$). Asteriscos indicam diferença significativa entre os órgãos no mesmo tratamento ($p < 0,05$). Os valores das porcentagens são relativos à folha, caule e raiz da amostra controle, em que foram considerados como 100 %.

Em adição aos efeitos no desenvolvimento da planta, os principais sintomas de toxicidade no manjeriço foram clorose das folhas, escurecimento e aumento do diâmetro das raízes e diminuição do tamanho e número de folhas (Figura 18 A-D). Resultados similares foram obtidos em manjeriço e em outras espécies vegetais (GHAREBAGHI; ALBORZI HAGHIGHI; AROUIEE, 2017; SGHAYAR et al., 2015; ZAHEDIFAR et al., 2019). As plântulas tratadas com Cd reduziram o crescimento da raiz e parte aérea devido às células parenquimatosas significativamente maiores e ao córtex mais grosso, o que pode ser consequência do comprometimento do alongamento radicular e do aumento da resistência ao fluxo radial de água e nutrientes, respectivamente (MAKSIMOVIĆ et al., 2007). Estudos também apontam que os efeitos fitotóxicos típicos do cádmio, tais como perdas de biomassa e necrose das folhas

podem estar relacionadas a atrofia no mesófilo na presença de Cd^{II} , cujas principais funções estão relacionadas à fotossíntese e a troca de gases e água com a atmosfera (PEREIRA et al., 2018; WEBB, 1979).

Contudo, a maior dificuldade da análise de Cd em manjeriço está diretamente relacionada à pequena quantidade de amostra disponível, representando um desafio analítico. Os desafios típicos das microanálises (análises que lidam com amostras de baixa massa) são a homogeneidade e representatividade das amostras, além da precisão e exatidão dos resultados (KURFÜRST, 1998).

Neste sentido, o uso de energia US representa uma boa perspectiva para procedimentos miniaturizados, já que o princípio do procedimento está focado na redução da quantidade de amostra, eliminando (ou diminuindo) os reagentes químicos e desenvolvendo procedimentos rápidos.

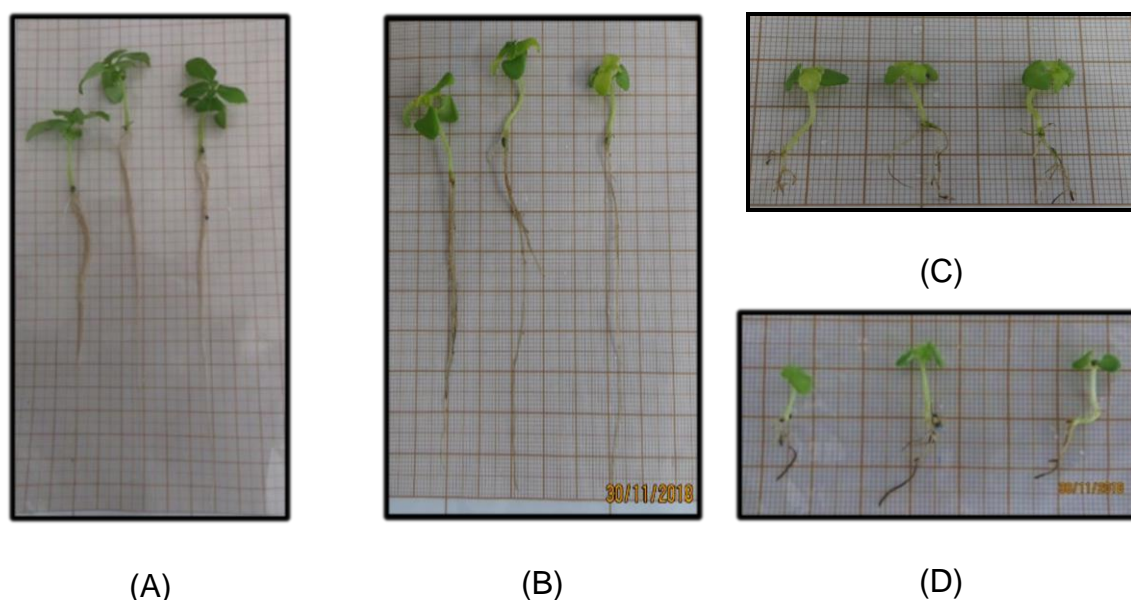


Figura 18 – Amostras de manjeriço cultivadas em solução de Hoagland 5% v v⁻¹ suplementadas com Cd^{II} (A) 0 μM (B) 3,6 μM (EC_{50}) (C) 25,0 μM (D) 100,0 μM após 15 dias de cultivo.

5.2 Fator de Translocação de Cd no manjeriço

A mobilidade de Cd no manjeriço foi estimada a partir do fator de translocação (FT). A Tabela 3 apresenta o FT de Cd em diferentes concentrações de intoxicação da planta.

Os resultados mostram que o FT para a F, C e parte aérea é diretamente proporcional ao aumento da concentração de Cd^{II} até 5,0 µM. O comportamento inverso foi observado para as concentrações de 10,0 a 100,0 µM. Quanto mais baixo o FT, mais elevada foi a concentração de Cd nas raízes, o que pode estar relacionado aos mecanismos de defesa da planta, que levam a formação de complexos com o Cd e das PCs. A formação das fitoquelatinas será abordada em detalhes no tópico 5.8. Porém, cabe ressaltar que a formação de complexos estáveis (Cd-PCs ou Cd-GSH) pode inibir a habilidade da planta transferir Cd^{II} das raízes para a folha. Outra hipótese que também pode explicar o observado, é quanto ao desequilíbrio das funções metabólicas no manjeriço em assimilar maior concentração de Cd em seus órgãos.

Tabela 3 – Fator de Translocação de Cd ($\bar{X} \pm s$, n=3) em diferentes concentrações de Cd^{II} (µM) empregadas durante o cultivo de manjeriço (*Ocimum basilicum* L. grecco a palla). Letras iguais indicam que não há diferenças significativas pela ANOVA (pós teste Tukey, p< 0,05).

Concentração de Cd ^{II} (µM) no cultivo	Fator de Translocação		
	Raiz - folha	Raiz - caule	Raiz - Parte aérea**
1,0	0,048 ± 0,001 ^a	0,17 ± 0,01	0,22 ± 0,01 ^c
3,6*	0,147 ± 0,003	0,26 ± 0,01	0,40 ± 0,01 ^d
5,0	0,22 ± 0,01	0,29 ± 0,01 ^b	0,51 ± 0,02
10,0	0,19 ± 0,01	0,28 ± 0,01 ^b	0,46 ± 0,02
25,0	0,11 ± 0,01	0,31 ± 0,03	0,42 ± 0,04 ^d
50,0	0,07 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,22 ± 0,02 ^c
100,0	0,041 ± 0,004 ^a	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,01
Análise de variância			
Valor de F	1217	413,1	862,9
Média Quadrática	0,074	0,1062	0,3232

*EC₅₀ ** Caule e folha

Na concentração de 3,6 µM (EC₅₀) foi verificada uma translocação da raiz para a folha, caule e parte aérea igual a 3,0; 1,5 e 1,9 vezes superior do que na concentração 1,0 µM, respectivamente. Aproximadamente 82 e 71% do Cd absorvido pelo manjeriço exposto a 1,0 e 3,6 µM ficaram retidos na raiz. Para as maiores concentrações de exposição (>10,0 µM), observa-se que ao duplicar a concentração de exposição ao Cd^{II}, o FT da raiz para a parte aérea diminui em aproximadamente 2 vezes, sugerindo a maior retenção na raiz como resposta de defesa às altas concentrações de exposição.

Os resultados indicam uma relação diretamente proporcional entre a translocação e a concentração, sendo que mudanças fenotípicas (clorose, tamanho de folhas, escurecimento da raiz) não foram observadas para a concentração 1,0 µM, o que pode indicar o manjeriço como um hiperacumulador de Cd em condições de

cultivo com baixas concentrações (< 1,0 µM) deste elemento. Contudo, mais estudos devem ser realizados nesta faixa de concentração para esclarecer esta observação.

5.3 Microextração assistida por Ultrassom (MUS)

O preparo das amostras por sonicação foi realizado no sonorreator tipo *cup-horn*, com adaptação de um suporte para microtubos de 2,0 mL. Foi considerado o princípio de frasco único, minimizando contaminação e perda dos analitos. Porém, para a quantificação de K, Cd, Ca, Mg, Fe, Zn e Cu no ICP-MS foi necessária diluição, exigindo mínima transferência do digerido.

A otimização multivariada por planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1} foi empregada na microextração de Cd e demais elementos por ICP-MS. Para avaliação inicial dos efeitos foram avaliados os fatores: amplitude (%), tempo (min), concentração de HNO₃ (%) e volume de H₂O₂ (µL), conforme apresentado na Tabela 5.

A resposta múltipla para o Cd (RM_{Cd}) foi calculada pela seguinte equação,

$$RM = \frac{CF1}{C_{maxF}} + \dots + \frac{CFn}{C_{maxF}} + \frac{CC1}{C_{maxC}} + \dots + \frac{CCn}{C_{maxC}} + \frac{CR1}{C_{maxR}} + \dots + \frac{CRn}{C_{maxR}} \quad \text{Equação 7}$$

em que CF, CC e CR são as concentrações de cada elemento em cada ensaio na folha, caule e raiz, respectivamente, e C_{max} é a mais alta concentração do elemento para cada matriz.

Para a avaliação multielementar, empregou-se a Resposta global múltipla (RM_{Mult}) para cada matriz, equação 8, considerando respostas múltiplas individuais, utilizando o mesmo princípio da Equação 8.

$$RM_{Mult} = \sum_{i=1}^n \frac{RMx}{RM_{max}} \quad \text{Equação 8}$$

em que RM_x é a resposta múltipla de cada analito em cada experimento, e RM_{max} é a mais alta resposta múltipla de cada elemento para cada matriz.

Os diagramas de Pareto mostrados na Figura 19 (A e B) para RM_{Cd} e RM_{Mult} indicaram que a concentração de HNO₃ (%) foi significativa na extração de Cd e dos elementos (Al, Ba, Cd, Cu, Fe, Li, Mn, Sr e Zn) por US e o volume de H₂O₂ (µL) foi um fator significativo somente para a extração de Cd.

A Tabela 2A (Apêndice 2) apresenta os resultados obtidos pela ANOVA para a RM_{Cd} e RM_{Mult}. A regressão foi significativa para ambas as respostas, pois F_{calculado} foi

igual a 6,99 e 4,37, respectivamente, e maior que o F_{tabelado} . A falta de ajuste não é significativa, pois $F_{\text{calculado}}$ igual a 1,25 e 0,3286, respectivamente, foram menores que F_{tabelado} . Em ambas as respostas, o HNO_3 e H_2O_2 foram os fatores que apresentaram maior porcentagem de contribuição, mas H_2O_2 não foi significativo para RM_{mult} .

Os gráficos de diagnóstico para RM_{Cd} (Figura 2A A-D do Apêndice 2) e RM_{mult} indicaram distribuição normal dos resíduos, sem nenhuma tendência ao longo do tempo (homocedasticidade dos dados), inexistência de amostras anômalas ou *outliers* e previsão satisfatória do modelo para ambas as respostas. Com base nos coeficientes estimados, pode-se verificar a maior influência das menores concentrações de HNO_3 para obtenção de maiores respostas.

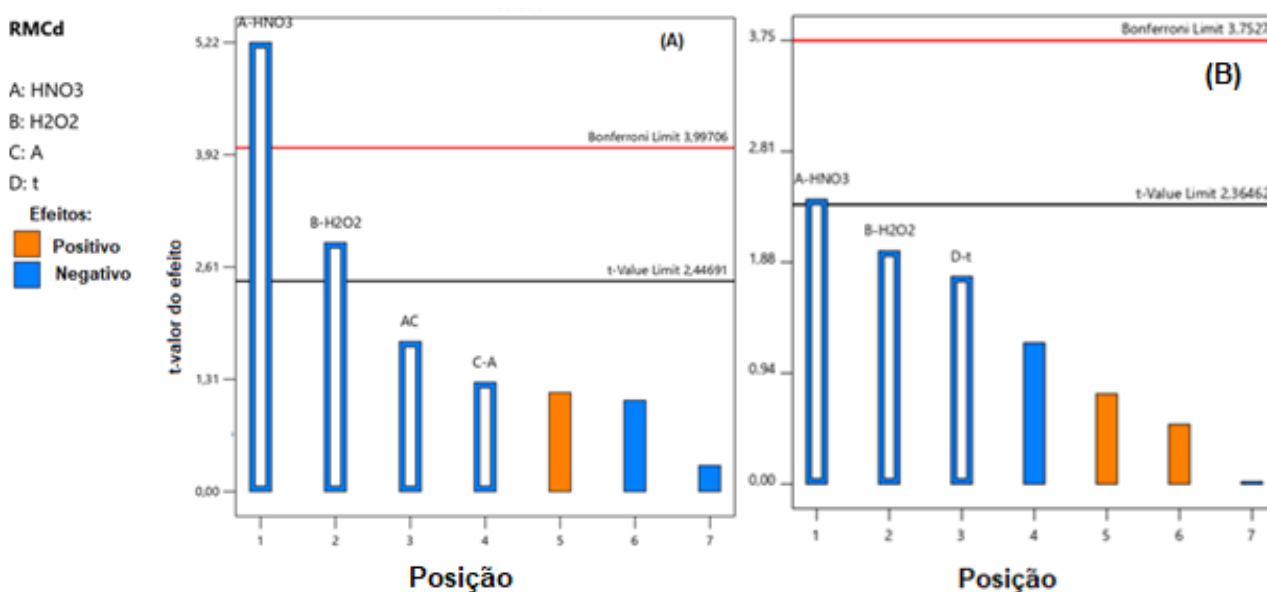


Figura 19 – Diagrama de Pareto para as respostas múltiplas (A) RM_{Cd} (mg kg^{-1}) e (B) RM_{mult} (mg kg^{-1})

Os modelos matemáticos para o planejamento fatorial fracionário são representados pelas Equações 9 e 10.

$$\text{RM}_{\text{Cd}} = 2,74 - 0,143x_1 - 0,0792x_2 - 0,0347x_3 - 0,029x_4 - 0,0478x_{13} \quad \text{Equação 9}$$

$$\text{RM}_{\text{Mult}} = 2,67 - 0,0795x_1 - 0,0650x_2 - 0,0577x_4 \quad \text{Equação 10}$$

onde 2,74 e 2,67 são as médias do total de 11 observações e x_1 , x_2 , x_3 , x_4 e x_{13} representam os efeitos de HNO_3 (%), H_2O_2 (μL), amplitude (%), tempo (min) e a interação de HNO_3 (%) e a amplitude (%), respectivamente.

A Figura 20 (A e B) mostra a superfície de resposta e o mapa de contorno, indicando que quanto menor a concentração de HNO₃ (%) combinado com H₂O₂ (μL), melhor será a resposta.

Foi avaliada a correlação de *Pearson* entre as respostas com base na concentração (mg kg⁻¹) de Cd e dos demais elementos para cada matriz em cada experimento (Tabela 4). Fortes correlações foram observadas para as matrizes F e C e uma correlação moderada para a R, indicando correlações positivas entre ambas as respostas. Estes resultados permitiram a avaliação global do sistema quanto à padronização do procedimento para determinação monoelementar (somente Cd) ou multielementar.

Dessa forma, como as respostas anteriores apontaram a redução de HNO₃ associado ao H₂O₂ e, com base em estudos prévios (CAPELO; MADURO; VILHENA, 2005; DE LA CALLE et al., 2009), foram realizados alguns ensaios de microextração multielementar somente na folha do manjeriço empregando HNO₃ diluído (concentrações < 10% v v⁻¹) combinado a H₂O₂. O H₂O₂ é considerado como um dos reagentes mais eficazes em sonoquímica, pois o US induz a sonólise de moléculas de H₂O e a dissociação térmica de moléculas de O₂, se presentes, para produzir diferentes tipos de espécies reativas, como •OH, •H, •O e •OOH (ZIEMBOWICZ; KIDA; KOSZELNIK, 2018). A partir dos resultados obtidos por ensaios univariados na folha, foi realizado um planejamento empregando a metodologia da superfície de resposta (2² composto central) para avaliação da melhor composição do solvente extrator para a determinação de Cd por FAAS nas três matrizes (TELES et al., 2021). Neste caso, a concentração de 2 % v v⁻¹ de HNO₃ e 100 μL de H₂O₂ mostraram as maiores respostas no domínio experimental.

Logo, a composição do solvente extrator do procedimento MUS para as três matrizes foi 8 μL de HNO₃, 292 μL de H₂O e 100 μL de H₂O₂, avolumando o digerido para 2 mL após sonicação. Sob estas condições, o procedimento é realizado na presença de uma concentração ácida de cerca de 0,3 mol L⁻¹ e a acidez do digerido é inferior a 0,06 mol L⁻¹. A otimização do procedimento MUS mostrou-se uma alternativa promissora no preparo de amostras cuja quantidade de amostra é um fator limitante na análise.

Tabela 4 – Matriz do planejamento fracionário 2_{IV}⁴⁻¹ para avaliação dos fatores que afetam a microextração multielementar por ultrassom com as respostas das concentrações de Cd (RM_{Cd}) e multielementar (RM_{mult}), mg kg⁻¹, para cada matriz de manjericão (F, C e R) e suas respectivas correlações de Pearson

Experimento	HNO ₃ (%)	H ₂ O ₂ (μL)	A (%)	t (min)	R _{Cd} (mg kg ⁻¹)				R _{Mult} * (mg kg ⁻¹)			
					Matriz				Matriz			
					F ¹	C ²	R ³	RM _{Cd} **	F ¹	C ²	R ³	RM _{mult} ***
1	25	0	25	5	947	289	1249	2,975	7,496	7,794	8,200	2,859
2	75	0	25	15	823	274	1185	2,743	6,627	7,507	7,343	2,613
3	25	50	25	15	911	256	1110	2,712	7,653	6,554	6,559	2,530
4	75	50	25	5	895	237	1022	2,563	7,610	6,343	7,515	2,616
5	25	0	75	15	910	290	1173	2,880	7,223	8,340	7,353	2,788
6	75	0	75	5	858	235	1093	2,573	7,492	6,448	7,529	2,615
7	25	50	75	5	926	279	1174	2,859	7,994	7,179	7,459	2,756
8	75	50	75	15	845	230	917	2,403	7,154	6,133	6,850	2,453
PC	50	25	50	10	934	265	1217	2,853	7,936	7,330	7,416	2,762
PC	50	25	50	10	936	257	1276	2,873	8,108	6,907	8,001	2,804
PC	50	25	50	10	797	255	1270	2,715	7,012	6,828	7,229	2,565

* Resposta Múltipla para concentração dos elementos (mg kg⁻¹) de Al, Ba, Cd, Cu, Fe, Li, Mn, Sr e Zn determinadas por ICP-MS

¹ Correlação de *Pearson* para folha = 0,80; ² Correlação de *Pearson* para caule = 0,94; ³ Correlação de *Pearson* para raiz = 0,54

** Resposta Múltipla de F, C e R para concentração de Cd (mg kg⁻¹) determinada por ICP-MS

*** Resposta global Múltipla de F, C e R para concentração dos elementos (mg kg⁻¹) determinadas por ICP-MS

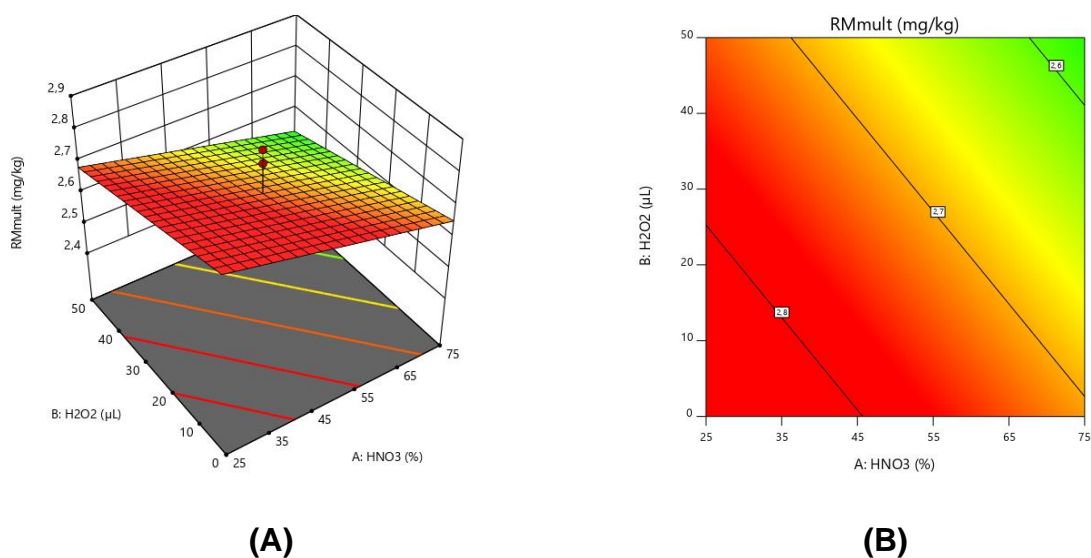


Figura 20 – (A) Superfície de resposta e (B) diagrama de contorno para a resposta R_{Mult} da concentração de HNO_3 (%) em relação ao volume de H_2O_2 (μL)

5.4 Validação da MUS

A validação do procedimento MUS foi realizada para todos os parâmetros de mérito recomendados pelo INMETRO (2018) para determinação de Cd, Al, Ba, Be, Ca, Cu, Fe, Li, K, Mg, Mn, Sr e Zn por ICP-MS. Contudo, considerando o grande volume de dados, será apresentado o detalhamento das informações gráficas somente para o Cd.

5.4.1 Linearidade

A avaliação da linearidade da curva analítica foi feita pelo procedimento dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), cujos resultados dos testes estatísticos são apresentados na Tabela 4A (Apêndice 3). A Tabela 5 mostra a equação de regressão, LQ e LD para todos os analitos.

De modo geral, os resultados mostraram que os resíduos apresentam distribuição normal ($R_{calculado} < R_{crítico}$), homocedasticidade ($t_L < t_{crítico}$) e independência a 99 % de confiança. Os resultados mostraram que a regressão foi altamente significativa para o modelo linear na faixa de concentração avaliada.

Considerando a análise de Cd, o gráfico de concentração *versus* resíduos (Figura 3A, Apêndice 3) mostra que o modelo não apresenta falta de ajuste, uma vez que há uma dispersão aleatória dos resíduos, não apresentando nenhuma tendência.

Tabela 5 – Faixa Linear, equação da regressão, coeficiente de correlação (R), LD e LQ do procedimento MUS (n = 10) empregando a técnica ICP-MS

Elemento	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Regressão	Coeficiente de Correlação (R)	Procedimento	
				LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Cd	0,6 - 90	$y = 12984x + 10509$	0,99539	0,212	0,644
Ca	30- 90	$y = 744,96x - 3295,4$	0,99397	9,96	30,2
K	24 - 90	$y = 102440x + 1 \times 10^7$	0,93260	8,02	24,3
Mg	16 - 90	$y = 60301x + 398466$	0,99596	5,28	16,0
Al	14 - 90	$y = 768,01x + 60,275$	0,99700	4,62	13,99
Ba	0,7 - 90	$y = 11285x - 2228$	0,99667	0,246	0,744
Be	0,1 - 90	$y = 10598x - 24477$	0,99817	0,033	0,099
Cu	0,9 - 90	$y = 48182x + 58200$	0,99443	0,297	0,900
Fe	4 - 90	$y = 34651x + 17793$	0,99390	1,30	3,95
Li	0,45 - 90	$y = 23807x - 34930$	0,99855	0,148	0,448
Mn	0,95 - 90	$y = 22545x - 15187$	0,99340	0,313	0,949
Sr	0,6 - 90	$y = 30365x - 64546$	0,99337	0,197	0,598
Zn	15 - 90	$y = 8284,9x + 24044$	0,99146	4,90	14,9

5.4.2 Veracidade e Precisão

O material de referência certificado (MRC) de folha de espinafre NIST 1570a foi empregado para avaliar o desempenho do procedimento MUS para os analitos Cd, Al, Ca, Cu, K, Mg, Mn, Sr e Zn. A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para os valores observados em comparação com os valores verdadeiros.

De modo geral, os resultados mostraram boa precisão, uma vez que o DPR para os analitos foi inferior a 9 %, exceto para o Al. As recuperações médias para todos os analitos ficaram entre 84 a 109 %, com exceção do Al e Ca. Os resultados

apresentaram exatidão e precisão adequadas para extração quantitativa de Cd, Cu, Mn, Sr, K e Zn e parcial de Mg (84 % de recuperação) por MUS.

Tabela 6 – Valores certificados e determinados dos metais no MRC de folha de espinafre NIST 1570a ($\bar{x} \pm sd$, n = 6), recuperação e precisão por ICP-MS

Elemento	Valor		Recuperação $\bar{X} \pm s$ (%)	DPR (%)	ER (%)
	Certificado $\bar{X} \pm sd$ (mg kg ⁻¹)	Encontrado $\bar{X} \pm sd$ (mg kg ⁻¹)			
Cd	2,89 ± 0,07	3,14 ± 0,23	109 ± 10	9,0	8,6
Al	310 ± 11	21,2 ± 2,5	6,85 ± 0,85	11,8	-93
Cu	12,2 ± 0,6	11,6 ± 0,7	95,4 ± 7,1	5,6	-4,9
Mn	75,9 ± 1,9	75,2 ± 5,2	99,1 ± 7,3	6,9	-0,9
Sr	55,6 ± 0,8	55,8 ± 3,5	100 ± 7	6,3	0,4
Zn	82,0 ± 3,0	80,7 ± 4,5	98,4 ± 6,6	5,6	-1,6
	$\bar{X} \pm sd$ (%)*	$\bar{X} \pm sd$ (%)			
Ca	1,5270 ± 0,041	0,25 ± 0,02	16,5 ± 1,24	7,05	-84
K	2,903 ± 0,052	2,536 ± 0,037	87,3 ± 2,0	1,48	-13
Mg	0,89**	0,74 ± 0,02	83,7 ± 1,8	2,11	-17

* fração em massa seca (%)

** De acordo com o MRC, não há informações suficientes para avaliar a incerteza associada ao valor; portanto, nenhuma incerteza é fornecida.

Contudo, vale ressaltar que devido a indisponibilidade de MRC para microanálise no nosso laboratório, foi utilizada neste trabalho uma massa 50 vezes inferior (3 mg) ao recomendado no certificado de análise do MRC de folha de espinafre NIST 1570a. Logo, as baixas recuperações de Al e Ca podem estar relacionadas à formação de sais e a quantidade de amostra utilizada no procedimento, uma vez que pode não ter sido representativa. Outro ponto a ser destacado é a interação do analito com a matriz que estão diretamente relacionadas à extração quantitativa (KRUG; ROCHA, 2016). Por outro lado, com exceção do Al, todos os demais elementos apresentaram DPR menores que 9 %.

Dados da literatura mostram que a extração máxima de Al em tecidos vegetais com sonda ultrassônica foi realizada com a utilização HNO₃ e HCl. No entanto, a recuperação variou de 18 a 85%. Quanto ao Ca, para a extração realizada somente com HNO₃ (1,4 mol L⁻¹) a recuperação foi de 80 a 95 % (KRUG, 2010).

Assim, na ausência de MRC para todos os analitos estudados, foi feito um estudo de adição e recuperação, em três níveis de concentração, para as matrizes do manjeriço (F, C e R). A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para as recuperações dos analitos Ba, Be, Cd, Fe e Li.

De modo geral, as recuperações obtidas para todos os elementos variam de 90 a 110%, exceto na F para Ba, Be e Li em 0,05 mg L⁻¹ e Li em 0,015 mg L⁻¹; no C e R para Be e Li para as concentrações 0,15 e 0,3 mg L⁻¹, na R para Cd e Ba em 0,3 mg L⁻¹ e Fe em 0,05 mg L⁻¹. Contudo, os resultados apresentaram recuperações condizentes com os critérios sugeridos pela AOAC - *Association of Official Analytical Chemists* (INMETRO, 2018).

Tabela 7 – Porcentagem de Recuperação, $\bar{X} \pm sd$ (%), para as os analitos determinados nas matrizes de manjeriçao (F, C e R) por ICP-MS (n = 3)

Espécie		Recuperação (%)		
Nível de Concentração Adicionada	Matriz	0,005 mg L ⁻¹	0,015 mg L ⁻¹	0,1 mg L ⁻¹
Cd	F	110 ± 8	101 ± 5	106 ± 0,3
Ba		86 ± 2	97 ± 6	108 ± 3
Be		89 ± 4	90,9 ± 0,4	93 ± 2
Fe		93 ± 8	101 ± 14	110 ± 2
Li		82 ± 4	83,8 ± 0,4	92 ± 4
Nível de Concentração Adicionada	Matriz	0,05 mg L ⁻¹	0,15 mg L ⁻¹	0,3 mg L ⁻¹
Cd	C	108 ± 3	99 ± 1	105 ± 1
	R	105 ± 2	108 ± 4	112 ± 1
Ba	C	110 ± 4	103 ± 1	104 ± 2
	R	109 ± 2	103 ± 3	111 ± 3
Be	C	95 ± 4	91 ± 2	89 ± 1
	R	91 ± 2	85 ± 4	85 ± 2
Fe	C	104 ± 6	112 ± 4	103 ± 0,3
	R	112 ± 12	90 ± 2	90 ± 9
Li	C	92 ± 5	92 ± 2	87 ± 1
	R	90 ± 3	85 ± 3	83 ± 2

5.4.3 Seletividade

A seletividade é um parâmetro importante para avaliar o procedimento na quantificação do analito na presença da própria matriz de interesse e outros analitos ou substâncias interferentes (INMETRO, 2018).

Para matrizes sem o analito disponível, o INMETRO (2018) propõe o procedimento por faixa de estudo (baixa, média e alta), com no mínimo 3 replicatas por nível de concentração. Neste sentido, foi avaliado o efeito de matriz somente para determinação de Cd por ICP-MS (Tabela 5A Apêndice 3). Os resultados e a Figura 4A (Apêndice 3) mostram que as matrizes de F, C e R não afetam a precisão do analito e não causam nenhum efeito sobre o resultado por nível de concentração a 95 % de confiança, exceto para a menor concentração na folha (a 99% de confiança).

5.4.4 MW versus MUS

Como o procedimento de digestão MW é amplamente empregado no preparo de amostras de diferentes matrizes, foi realizada uma comparação com o procedimento otimizado MUS para determinação exclusiva de Cd por FAAS. A Tabela 8 mostra as concentrações de Cd (mg kg^{-1}) obtidas por ambos os procedimentos com seus respectivos DPR para cada tipo de matriz (F, C e R).

Os testes estatísticos mostraram que não há diferenças significativas, a 95 % de confiança, nas concentrações de Cd (mg kg^{-1}) nas três diferentes matrizes. Para ambos os procedimentos, o DPR foi menor que 10 %. Além disso, o procedimento MUS apresentou melhor precisão, o que pode estar relacionado à vantagem de utilização de frasco único durante o preparo das amostras.

Uma comparação do LD e LQ de ambos os procedimentos mostram que aqueles determinados para o MUS foram inferiores aos obtidos por MW. Isto se deve ao fato da utilização de menor quantidade de reagentes no procedimento de microextração em sonorreator. Outra vantagem do procedimento MUS em relação ao MW é a acidez residual que foi menor do que 0,4% (v.v⁻¹). A Tabela 9 mostra uma avaliação dos parâmetros empregados nos procedimentos MUS e MW.

A comparação de ambos os procedimentos mostra que a MUS é potencialmente promissora para o preparo de amostras de diferentes complexidades, tendo em vista a alta frequência analítica, utilização de menor massa de amostra e maior precisão pelo uso de frasco único, baixo consumo de reagentes, menor geração de resíduo, procedimento rápido e seguro, menores LD e LQ e baixo custo operacional.

Tabela 8 – Comparação dos Limites de detecção, quantificação e concentrações de Cd (mg kg^{-1}) obtidos por MW e MUS para preparo das matrizes folha, caule e raiz do manjeriço (n=3)

Matriz	Procedimento	MW	MUS
	LD	0,012 mg L^{-1}	0,006 mg L^{-1}
	LQ	0,036 mg L^{-1}	0,018 mg L^{-1}
Concentração de Cd (mg kg^{-1})			
F		119 ± 11 ^a	129 ± 1 ^a
C		342 ± 33 ^b	326 ± 11 ^b
R		1060 ± 58 ^c	1182 ± 36 ^c

Para cada matriz, letras iguais indicam que não há diferença significativa entre cada matriz segundo o teste t a 95 % confiança

Segundo Bizzi e colaboradores (2017), procedimentos verdes vão além da questão de reduzir reagentes e evitar a geração de resíduos, pois os protocolos de amostragem mais ecológicos devem fornecer digestões com baixas quantidades de carbono dissolvido combinadas a baixa acidez residual.

Tabela 9 - Avaliação de parâmetros de controle operacional para os procedimentos MUS e MW

Parâmetros	Procedimento	
	MUS	MW
Reagentes	HNO ₃ , H ₂ O e H ₂ O ₂	
Volume de reagente	400 µL	8 mL
Tempo (min)	5	60 ^a
Sistema	Aberto	Fechado
Transferência	Frasco único	Sim
Número de amostras por hora	64	10 ^b
Temperatura °C	25	150

^a20 min de aquecimento+30 min de resfriamento. ^b alta pressão

Somando-se as características supracitadas com a vantagem do procedimento MUS empregar apenas 3 mg amostra em 400 µL de solução de HNO₃/H₂O₂ para um volume final de 2 mL, pode-se considerar que o procedimento está em consonância com os princípios da química verde e é promissor para análises de matrizes heterogêneas, cuja massa de amostra seja um fator limitante na análise.

5.4 Análise ionômica de órgãos de manjeriço após exposição ao Cd

A concentração total de Cd, elementos essenciais (Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn and Zn) e não essenciais (Al, Ba, Be, Li e Sr) foi determinada em diferentes órgãos de plântulas de manjeriço para avaliar como o Cd afeta seu crescimento. A concentração de elementos não essenciais (Figura 21) e essenciais (Figura 22) em F, C e R apresenta diferentes perfis. Em geral, a acumulação de Cd em manjeriço segue a ordem: raiz > caule > folha (Figura 21A), sugerindo que esta espécie não seja acumulada na parte aérea. O acúmulo de Cd na raiz pode ser uma estratégia para proteger a função fotossintética das folhas do estresse oxidativo e de mecanismos de tolerância (ZAHEDIFAR et al., 2019). Por outro lado, os resultados apresentados mostraram um elevado fator de translocação de Cd em folhas e caules de manjeriço (partes comestíveis), exceto na amostra controle (sem Cd^{II}). Estes valores excederam o nível

máximo permitido de contaminantes em vegetais, de 0,2 e 0,1 mg/kg de peso úmido de folhas e caules, respectivamente (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2009).

A concentração de Be em caules e raízes foi < LQ ($0,099 \mu\text{g L}^{-1}$) e a concentração de Li em raízes também foi < LQ ($0,448 \mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 21 D e E). Ambos os elementos possuem os menores raios atômicos dos metais alcalinos e alcalino terrosos e, portanto, alta mobilidade e acumulação em folhas.

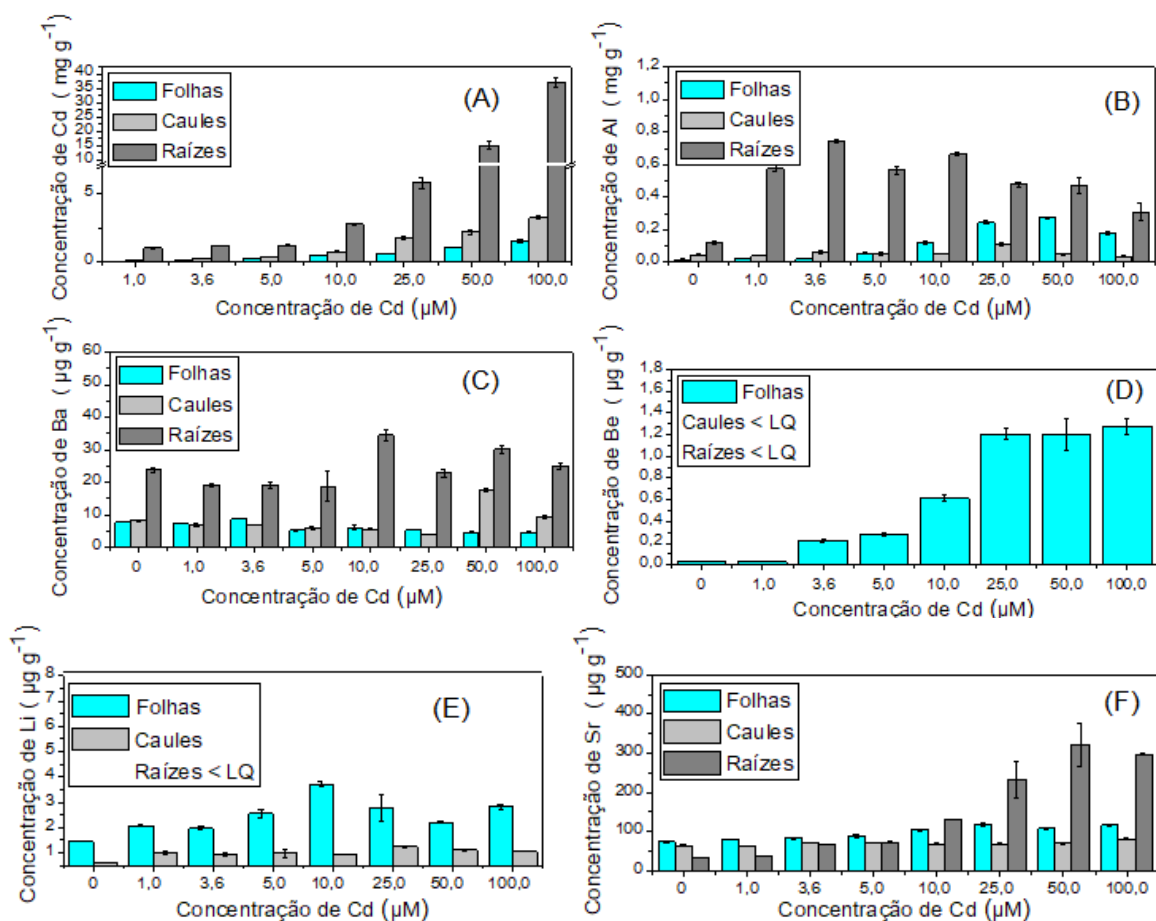


Figura 21 – Concentrações de Cádmi (A), alumínio (B), bário (C), berílio (D), lítio (E) e estrôncio (F) em folhas, caules e raízes de manjericão expostas a diferentes concentrações de Cd^{II} (0; 1,0; 3,6; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 μM), $n=3$.

Assim como o Cd, Ba (Figura 21 C) acumulou preferencialmente nas raízes em todas as concentrações abordadas neste estudo. Enquanto Sr (Figura 21 F) mostrou acumulação na raiz somente para as maiores concentrações ($\text{Cd}^{\text{II}} > 10,0 \mu\text{M}$).

A translocação dos macronutrientes Ca e Mg (Figura 22 A e E) para a folha é favorecida pela presença de Cd, enquanto para o K, Cu, Fe, Mn e Zn (Figura 22 B, C, D, F e G) o inverso é observado.

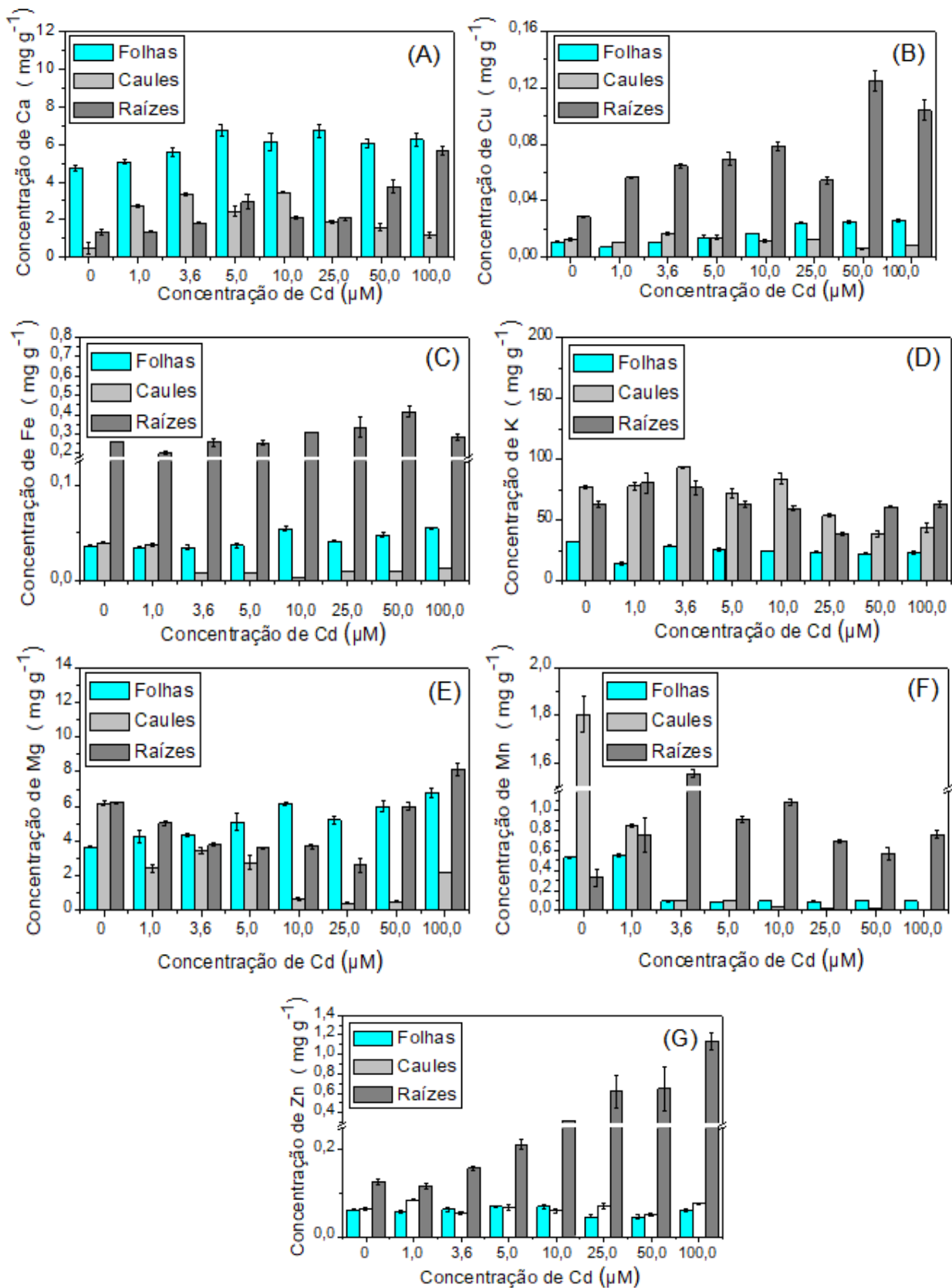


Figura 22 – Concentrações (mg g⁻¹) de cálcio (A), cobre (B), ferro (C), potássio (D), magnésio (E), manganês (F) e zinco (G) em folhas, caules e raízes de amostras de manjericão expostas a diferentes concentrações de Cd (0; 1,0; 3,6; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 µM), n=3.

De modo geral, Be, Li, Ca e Mg (3,6 a 50,0 μM de Cd^{II}), Mn (sem Cd^{II}) e Sr (0 até 5,0 μM de Cd^{II}) acumularam preferencialmente em folhas, enquanto K foi mais alto em caules para $\text{Cd}^{\text{II}} \leq 25,0 \mu\text{M}$. Comparado ao grupo controle, altas concentrações de Cu, Mn, Sr ($\text{Cd}^{\text{II}} \geq 25,0 \mu\text{M}$) e Zn foram observadas em raízes sob qualquer concentração de exposição, exceto para Mn e Zn a 0 e 1,0 μM .

A morfologia do manjericão contribuiu para as raízes reterem altas teores de Cd, já que plantas com numerosas raízes finas acumulam mais metais (DAS; SAMANTARAY; ROUT, 1997). Entretanto, esta espécie apresenta baixa tolerância ao Cd, diminuindo o crescimento e desenvolvimento, refletindo em baixa quantidade de massa de amostra.

Os resultados obtidos neste estudo provaram que o Cd causa forte alteração nas concentrações e distribuições de elementos essenciais e não essenciais. As plântulas de manjericão expostas a diferentes concentrações de Cd^{II} exibiram um padrão específico de distribuição nos órgãos, então o estudo ionômico é uma ferramenta valiosa para explicar as particularidades de cada interação.

Além disso, a comparação com dados da literatura é uma tarefa complexa, pois a translocação e acumulação de Cd está relacionada às espécies vegetais, a interação entre cultivares e metais, o estágio de desenvolvimento, as condições, formas e período de cultivo, as diferentes funções das raízes (coleta seletiva de íons do solo) e da parte aérea, além dos níveis de exposição ao elemento tóxico (KÜPPER; ANDRESEN, 2016; LI et al., 2016; ZAHEDIFAR et al., 2019). Contudo, é interessante avaliar a dinâmica dos elementos sob diferentes aspectos, a fim de verificar quais são similares aos resultados obtidos para o manjericão.

Assim, foi avaliado como os elementos Ba, Be, Ca, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Sr e Zn em F, C e R podem ser empregados na discriminação das respostas de plantas ao estresse por Cd. Para esta avaliação, foram consideradas as concentrações de Cd^{II} a partir da EC_{50} (0; 3,6; 5,0; 25,0; 50,0; 100,0 μM) para todos os elementos, exceto Al.

A Figura 23 mostra diversas correlações positivas (círculos azuis) e negativas (círculos vermelhos) entre Cd e os elementos, definindo o perfil ionômico para cada órgão da planta. Em geral, as correlações com Cd foram positivas com os distintos elementos nas F e R, enquanto correlações negativas foram mais evidentes em C. Além disso, as folhas apresentaram as correlações de maior significância entre os elementos.

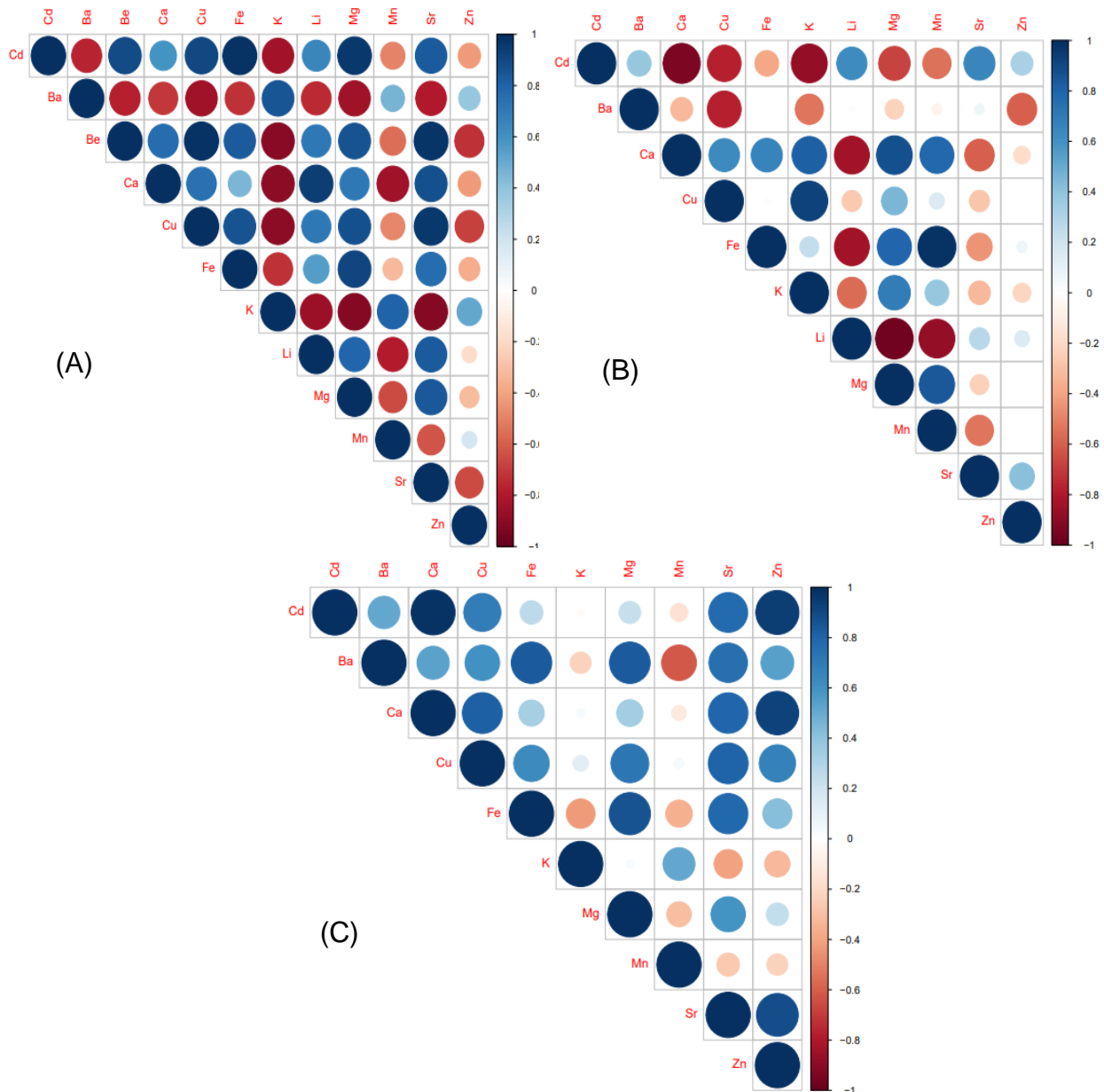


Figura 23 – Correlogramas para a concentração dos metais nas matrizes de manjericão obtida por ICP-MS após aplicação do procedimento MUS: (A) folhas, (B) caules e (c) raízes

O Cd^{II} é absorvido em células vegetais possivelmente por canais de Ca^{2+} e transportadores Fe^{2+} e Zn^{2+} (ZIP), como mecanismo de proteção contra a toxicidade ou como resultado da concorrência (CLEMENS, 2006; VERBRUGGEN; HERMANS; SCHAT, 2009a). Isto explica as correlações altamente positivas ($r > 0,94$ e $p < 0,05$, teste de Pearson) entre Cd-Ca e Cd-Zn na raiz. É interessante notar que Cd e Ca apresentaram altas correlações em todos os órgãos do manjericão, provavelmente porque compartilham o mesmo sistema de translocação. A espécie *Arabidopsis*

thaliana L. demonstrou que os canais de Ca^{2+} da célula protetora da membrana plasmática são altamente permeáveis ao Cd^{II} , o que sugere que o Cd^{II} é capaz de imitar o Ca^{2+} e entrar nas células usando os canais do Ca (PERFUS-BARBEOCH et al., 2002). Além disso, a concentração de íons Ca^{2+} é muito maior durante o estresse por Cd, o que estimula e interage ainda mais com proteínas conhecidas como calmodulina-proteínas (AMIR et al., 2019).

Nos resultados obtidos para folhas, o Fe apresentou correlação positiva com o Cd ($p < 0,05$, teste de Pearson), reforçando a hipótese de que o Fe se acumula preferencialmente na raiz, mas pode translocar para o órgão de alta demanda (folhas) apresentando efeito sinérgico com Cd. A literatura discute a competição entre Cd e Fe para as partes superiores das plantas e retenção de Fe pelas raízes de *H. annuus* L. (LOPES JÚNIOR; MAZZAFERA; ARRUDA, 2014) e *japonica* (LIU; HE; CHEN, 2011). Um efeito sinérgico na raiz também foi relatado entre Cd e Fe com a aplicação de 20 μM e 80 μM de Cd em plantas de *P. glomerata* (SKREBSKY et al., 2008).

O ferro é um elemento essencial para as plantas e está envolvido em processos de respiração, biossíntese de clorofila e fotossíntese, além de atuar como cofator em enzimas envolvidas na transferência de elétrons ou oxigênio. Ele é translocado das raízes para partes com alta demanda de Fe (KOBAYASHI; NOZOYE; NISHIZAWA, 2019). O Cd pode superar o Fe durante a absorção radicular, promovendo a deficiência de Fe e estimulando o gene IRT1, favorecendo uma absorção desequilibrada de outros metais em relação ao Fe (LEŠKOVÁ et al., 2017).

O zinco desempenha um papel metabólico essencial nas plantas, atuando como componente de uma grande variedade de enzimas, tais como desidrogenases, proteinases, peptidases e fosfohidrolases (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). O Zn tem propriedades físicas e químicas semelhantes ao Cd e compete pelos locais de ligação no solo e na superfície das raízes para a absorção pela planta (RIZWAN et al., 2016). Os resultados ($p < 0,05$, teste de Pearson) para folhas e caules apresentam correlações negativa e positiva ($r = -0,42$ e $r = 0,32$, respectivamente). Nas raízes, foi observada uma alta correlação entre Cd e Zn ($r = 0,94$).

Em geral, o Cd alterou negativamente a absorção de Zn nas folhas, contribuindo para a atividade das enzimas do metabolismo e sintomas dos carboidratos como clorose e necrose foliar (MARSCHNER, 2012). Distribuição oposta foi observada nas raízes, sugerindo que o Cd pode estimular a atividade dos transportadores de Zn e a formação de complexos, como as metalotioneínas (COBBETT, 2000), porque as

moléculas dependentes e ligantes de Zn são alvos da toxicidade do Cd (CLEMENS, 2006). Entretanto, as interações Zn-Cd parecem controversas, uma vez que são relatados efeitos antagônicos e sinérgicos nos processos de absorção e transporte (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001; SKREBSKY et al., 2008).

O Cádmio também tem semelhança química com o cobre, estimulando a atividade dos transportadores de Cu presentes na célula das raízes da planta (LOPES JÚNIOR; MAZZAFERA; ARRUDA, 2014). O Cu é um micronutriente com função na fotossíntese, respiração, metabolismo de C e N, atuando contra o estresse oxidativo (MARSCHNER, 2012) e como cofator de proteínas (PRINTZ et al., 2016). Os resultados demonstraram correlações significativas de Cd-Cu ($p < 0,05$, teste de Pearson) em folhas e raízes ($r > 0,70$) e caules ($r = - 0,77$), indicando a translocação de Cu das raízes para as folhas.

Em concordância com alguns resultados obtidos para o caule em nosso estudo, Zahedifar et al. (2019) também reportaram que Mn, Zn e Cu estavam negativamente correlacionados com Cd na parte aérea provavelmente devido à competição entre Cd e os metais absorvidos nas raízes. A correlação negativa no caule entre Cu e Cd observada em nosso estudo pode estar relacionada à sua translocação do caule para a folha. Resultados similares também foram obtidos para a planta *L. japonica* (LIU; HE; CHEN, 2011), com correlação negativa e positiva entre Cd-Mn e Cd-Fe, respectivamente, nas raízes e correlação negativa com Cd-Fe/Cu nos caules. A literatura relatou diferentes correlações de Cd com Zn e Cu, dependendo da matriz (DONG; WU; ZHANG, 2006; SKREBSKY et al., 2008).

Estrôncio acumulou em todos os órgãos de manjeriço, com forte correlação positiva com o Cd, o que sugere a ausência de barreiras para translocação. Nas folhas e raízes, a translocação foi semelhante ao Ca, provavelmente devido a propriedades físicas e químicas similares de seus íons (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2008). Entretanto, as interações entre Sr e Ca são complexas e Sr normalmente não pode substituir Ca em funções bioquímicas (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001).

Em relação ao Mn, elemento essencial para a fotossíntese, a interação com Cd mostrou um efeito antagônico ($p < 0,05$, teste de Pearson) em folhas e caules. Para a raiz, há uma correlação pouco significativa ($r = -0,17$, $p < 0,05$, teste de Pearson) sem relação linear entre os elementos. Então, as concentrações de Mn diminuiriam significativamente na parte aérea em função do aumento da concentração de Cd. Ele pode promover um estímulo da atividade dos transportadores de Mn^{2+} na membrana

das raízes (LOPES JÚNIOR; MAZZAFERA; ARRUDA, 2014) e/ou inibição da atividade da proteína transportadora IRT1 associada ao seu transporte das raízes para o caule em plantas mais altas (VERBRUGGEN; HERMANS; SCHAT, 2009b).

Bário e Berílio são relatados aparentemente como componentes não essenciais de planta (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). Na presença do Cd, Ba apresentou um efeito antagônico ($p < 0,05$, teste de Pearson) com Cd, Be, Ca, Cu, Fe, Li, Mg e Sr em folhas e com Cu e K em caule de manjeriço. Por outro lado, Be apresentou alta correlação positiva ($r = 0,897$ e $p < 0,05$, teste de Pearson) com Cd em folhas. Berílio é conhecido por concentrar-se principalmente em raízes (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001), mas nossos resultados mostraram que a presença do Cd pode promover a translocação de Be das raízes para as folhas.

Além do Be, Li acumula nas folhas e no caule e apresentou alta correlação positiva com Cd ($r > 0,70$ e $p < 0,05$, teste de Pearson), acumulando-se nestes órgãos à medida que a concentração de Cd aumentou. Lítio aparentemente compartilha os transportadores de K^+ e, portanto, é facilmente translocado para as folhas (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). Lítio é considerado um elemento não essencial (SHAHZAD et al., 2016) e o Cd geralmente não utiliza transportadores/canais dedicados a cátions monovalentes. Logo, o efeito do Cd na translocação de metais alcalinos pode ser uma forma de inibição não competitiva (SOLTI et al., 2011).

Os mecanismos de transporte para K, Mg e Ca discrimina cátions divalentes ou monovalentes, maiores ou menores (SOLTI et al., 2011). Nossos resultados apontam que o Cd tem alta correlação negativa com Ca, K e Mg no caule e K nas folhas ($p < 0,05$, teste de Pearson). Neste sentido, nossos resultados sugerem que o Cd entra nas células e compete com elementos essenciais (K, Mg, Ca e Fe) por meio do mesmo transportador transmembrana (DAS; SAMANTARAY; ROUT, 1997).

O potássio participa da síntese de proteínas, metabolismo de carboidratos, ativação de enzimas, equilíbrio catiônico, osmoregulação, movimento da água na planta, transferência de energia, transporte do floema e desempenha um papel mitigador em várias tensões abióticas, tais como toxicidade de metais (HASANUZZAMAN et al., 2018; WANG et al., 2013). Então nossos resultados sugerem que o Cd diminui a absorção e distribuição de K, comprometendo várias funções celulares.

A suplementação de Cd^{II} também afeta o aparelho fotossintético da planta, perturbando seu equilíbrio hídrico e inibindo a abertura dos estômatos (CLEMENS,

2006). O Magnésio é um elemento muito importante para o fotossistema da planta (LOPES JÚNIOR; MAZZAFERA; ARRUDA, 2014) e pode estar fortemente ligado por covalência como ocorre na molécula de clorofila (MARSCHNER, 2012), onde o Cd^{II} pode substituir o Mg^{2+} como íon central (KÜPPER; KÜPPER; SPILLER, 1996). Magnésio foi positivamente correlacionado com Fe em todos os órgãos, e o oposto foi observado para a interação de Mg e Mn nas folhas. Esta oposição pode ser atribuída às suas propriedades químicas similares e valência iônica idêntica, sugerindo competição ou compartilhamento pelos mesmos locais de transporte.

Neste sentido, folhas, caules e raízes apresentaram relações diferentes com o Cd, uma vez que elementos com propriedades análogas são absorvidos em plantas que utilizam os mesmos caminhos e transportadores ou quelantes (DU et al., 2020).

As respostas ionômicas sob estresse ao Cd em plântulas de manjeriço também foram caracterizadas por PCA (Figura 24 A e B) e HCA (Figura 25). Em PCA, dois componentes principais explicaram 75,32% da variação total, separando as amostras em três grupos diferentes (folhas, caules e raízes).

PC1 acumulou 49,43% da variância total, separando as raízes das folhas e caules. PC2 separou os caules e as amostras de controle das folhas e raízes nas concentrações mais altas (4 e 5). No PC1, os *loadings* Cd, Cu, Fe, Mg, Sr e Zn estão localizados no eixo positivo e influenciaram a separação das raízes das folhas, no eixo negativo. Isso significa que a raiz, em sua exposição mais alta de Cd, acumula micronutrientes como Cu, Fe e Zn, macronutrientes como Mg e não-essenciais como Sr e Cd. Em PC2, Li, Be e Ca influenciaram a separação das folhas e do caule das raízes. As folhas devem preferencialmente acumular estes elementos quando comparado ao caule. Além disso, Cd está intimamente relacionado com Zn, Cu e Sr, enquanto plântulas tratadas com menor concentração de Cd^{II} ($\leq 5 \mu M$ e controle) estavam intimamente relacionadas com K. Em HCA, o dendrograma também mostrou uma clara separação entre raízes de folhas e caule. Novamente, os maiores tratamentos de Cd nas raízes foram distinguidos das folhas e do caule (Figura 25).

De modo geral, PCA e HCA são ferramentas usadas para separar amostras de acordo com suas semelhanças. Em nosso estudo, foram usadas para agrupar amostras de manjeriço expostas a diferentes concentrações de Cd para elucidar o perfil ionômico. Neste sentido, não se trata apenas de um conjunto de informações sobre a composição mineral, mais do que isso, foi uma estratégia para investigar correlações e

interações de elementos, refletindo os perfis elementares e a adaptação da planta ao estresse.

Apesar do número pequeno de amostras, as informações na PCA mostraram que as maiores concentrações de Cd favoreceram o acúmulo nas raízes de Ca, Cu, Mn, Sr e Zn, incluindo o Cd. Além disso, foi identificada uma estreita relação do Cd com Zn, Cu e Sr, discutida acima. Resultados similares foram relatados para Cd, Zn e Cu em arroz (FENG et al., 2017). As folhas de manjeriço tratadas com alta concentração de Cd foram discriminadas pelas contribuições de Li, Be e Ca. Enquanto as raízes, órgão acumulador do Cd, discrimina Ba, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Sr e Zn, sendo observado que para a concentração de Cd < 5 µM estão relacionados à K, Ba e Mn. A PCA mostrou também uma distribuição espacial dos diferentes órgãos, consistente com o crescimento morfológico da planta sob estresse ao Cd. Portanto, as folhas e raízes são os principais reguladores de nutrientes e elementos não essenciais na planta de manjeriço.

Em complemento ao estudo ionômico, a metabolômica é uma poderosa ferramenta para compreender como o Cd afeta o metabolismo de diferentes compostos necessários ao desenvolvimento e defesa das plantas. A identificação destes compostos pode ajudar a compreender a dinâmica da translocação e fixação de Cd e os mecanismos de defesa vegetal ao metal tóxico. Neste sentido, a ionização ambiente por PS-MS e DESI-MSI mostraram-se como poderosas técnicas para identificação dos metabólitos.

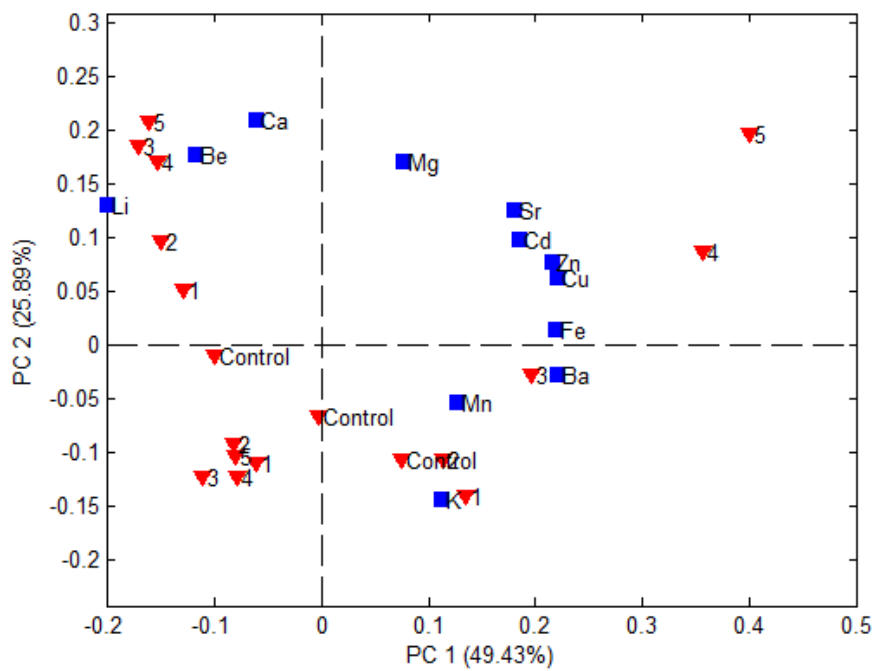
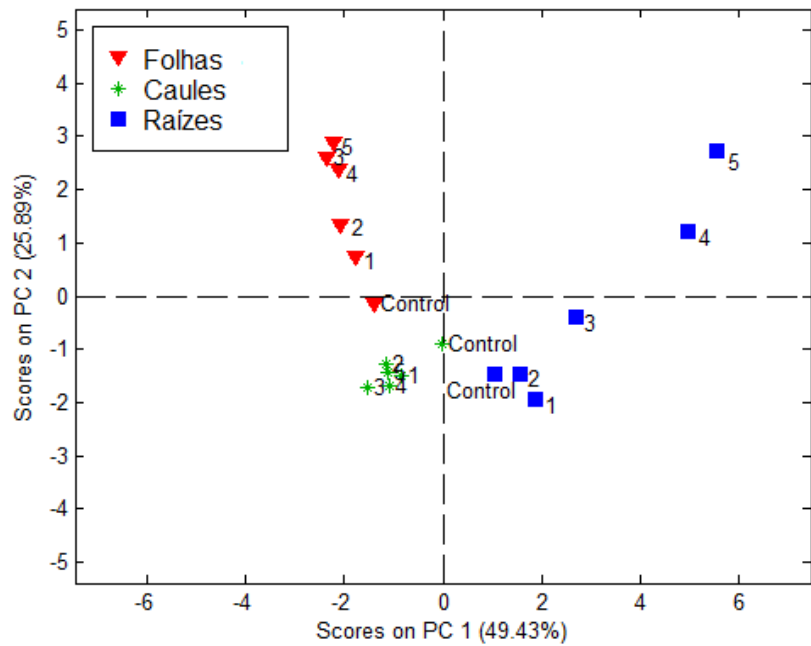


Figura 24 – Gráfico de escores para todas as amostras (folhas, caules e raízes) (A) e gráfico de *loadings* (B) gerado pela PCA com diferentes concentrações de Cd: controle (0 μM); 1 (3,6 μM); 2 (5,0 μM); 3 (25,0 μM); 4 (50,0 μM) e 5 (100,0 μM).

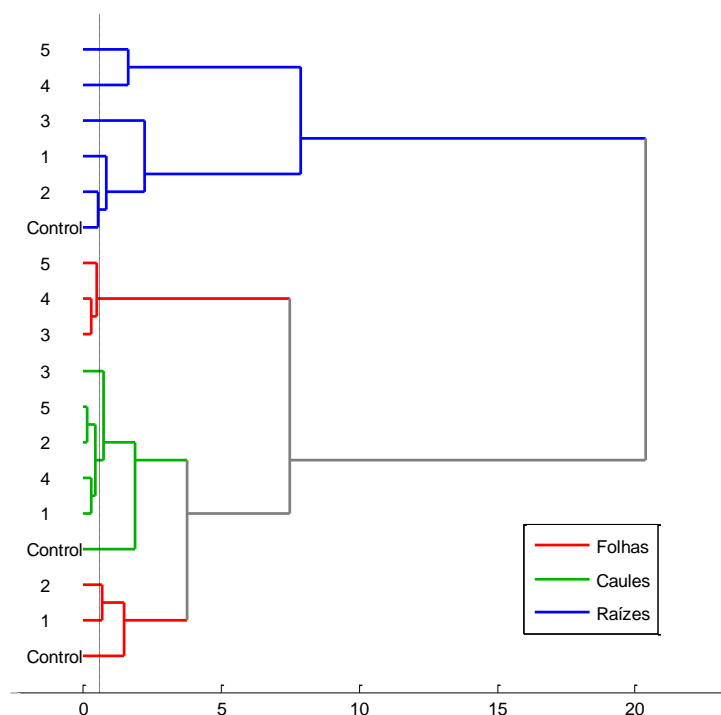


Figura 25 – Dendrograma para análise ionômica de manjericão exposto a diferentes concentrações de Cd: controle (0 μM); 1 (3,6 μM); 2 (5,0 μM); 3 (25,0 μM); 4 (50,0 μM) e 5 (100,0 μM).

5.5 Identificação de GSH, PCs, derivados e complexos de Cd por PS-MS

A raiz é o tecido vegetal fundamental na compreensão dos mecanismos de defesa da planta ao metal tóxico, pois absorve o Cd disponível e o concentra como meio de minimizar a translocação para a parte aérea. A maioria das espécies vegetais acumula Cd preferencialmente na raiz, motivando vários estudos neste órgão vegetal.

Logo, a análise dos peptídeos por PS-MS foi realizada somente na raiz do grupo controle e contaminado a 10 μM de Cd^{II} (Figura 26). Os extratos das raízes, obtidos após procedimento de preparo descrito no item 4.8, foram imediatamente analisados e, no intervalo das medidas armazenados em um banho de gelo. Este cuidado no armazenamento é necessário para preservação dos analitos, uma vez que a técnica requer a constante mudança do triângulo e ajustes da plataforma.

A Tabela 10 apresenta os 23 compostos detectados por PS(+)-MS na amostra de raiz controle e 10 μM , confirmados por MS/MS. Os compostos iso-PC₂(Cys), des-Gly-PC₃, iso-PC₃(Ser), iso-PC₃(Asn), iso-PC₃(Gln) e iso-PC₃(Glu), bem como os

complexos de Cd, não foram detectados na amostra controle. A Figura 27 (A, B e C) mostra os espectros de fragmentação da GSH, hGSH (homoglutationa) e GSSG (glutationa oxidada), respectivamente. Os demais espectros de fragmentação são apresentados nas Figuras 5A - 9A (Apêndice 4). Os fragmentos característicos dos íons moleculares protonados $[M + H]^+$ das PCs e seus derivados foram comparados com aqueles obtidos por ESI-MS descritos na literatura e apresentados na última coluna da Tabela 10. Todos os espectros de massas obtido para biotióis (número 1 a 18 - Tabela 10) mostram sinais em m/z 233, exceto os íons m/z 844 e 829, de forma semelhante com resultados obtidos por Mou e colaboradores (2016).



Figura 26 – Foto de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) após 14 dias de suplementação com Cd^{II} . Amostra controle (esquerda) e contaminada a $10 \mu M$ de Cd^{II} (direita). Fonte: Própria

Como exemplo, a GSH ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$) tem íon molecular protonado a m/z 308 $[M+H]^+$ no espectro *full scan*. Seus fragmentos característicos são m/z 233, 179, 130, correspondentes à perda de uma molécula de glicina, Gly (-75 Da), uma molécula de ácido glutâmico (-129 Da), e um grupo Cys-Gly (-178 Da), respectivamente (MOU et al., 2016) (Figura 25 A). A perda de resíduo da glicina resulta no fragmento principal de GSH e de PCs e seus derivados (m/z 233 corresponde ao grupo γ Glu-Cys). Além disso, o espectro MS^2 também mostra um pico em m/z 290, m/z 262 e m/z 179 correspondentes à perda de água (M-18), grupo CO (M-28) e NH_3 (M-17). Análises semelhantes são observadas para todos os peptídeos identificados neste trabalho.

Tabela 10 – GSH, PCs, seus derivados e complexos de Cd identificados em manjeriço por PS(+)-MS por longo tempo de exposição ao Cd (14 dias)

Nº	Tentativa de Identificação	Íon Selecionado	Fórmula	m/z	Fragmentos de íons MS/MS	Peptídeos/Complexos	Ref
1	GSH	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	308	130, 179, 233, 262, 290	(γGluCys)Gly	[1,2]
2	hGSH	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O ₆ S	322	130, 145, 176, 191, 233, 305,	(γGluCys)βAla	
3	PC ₂	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₉ N ₅ O ₁₀ S ₂	540	162, 179, 233, 248, 291, 308, 336, 362, 377, 411, 439, 522	(γGluCys) ₂ Gly	[1]
4	hPC ₂	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₃₁ N ₅ O ₁₀ S ₂	554	130, 191, 233, 320, 362, 423, 465	(γGluCys) ₂ βAla	[2]
5	des-Gly-PC ₂	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₆ N ₄ O ₉ S ₂	483	130, 233, 251, 354, 308, 465	(γGluCys) ₂	[1]
6	des-Cys-iso-PC ₂ (Glu)	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₈ N ₄ O ₁₁ S	509	233, 277, 309, 363, 380, 407	des-Cys-iso-PC ₂ (Glu)	[1]
7	iso-PC ₂ (Ser)	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₃₁ N ₅ O ₁₁ S ₂	570	209, 233, 248, 337, 352, 362, 441, 465	(γGluCys) ₂ Ser	[1]
8	iso-PC ₂ (Cys)*	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₃₁ N ₅ O ₁₀ S ₃	586	233, 248, 337, 351, 362, 465	(γGluCys) ₂ Cys	[1,3]
9	iso-PC ₂ (Asn)	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₁ S ₂	597	233, 263, 363, 465, 579	(γGluCys) ₂ Asn	[1]
10	iso-PC ₂ (Gln)	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₄ N ₆ O ₁₁ S ₂	611	203, 233, 248, 334, 362, 277, 535	(γGluCys) ₂ Gln	[1]
11	iso-PC ₂ (Glu)	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₃ N ₅ O ₁₂ S ₂	612	174, 205, 233, 249, 277, 344, 380, 406, 437, 480	(γGluCys) ₂ Glu	[1]
12	GSSG	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂	613	205, 233, 307, 483, 541, 595	(γGluCys) ₂ Gly ₂	[3]
13	PC ₃	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₄₁ N ₇ O ₁₄ S ₃	772	308, 377, 411, 465, 568, 539, 610, 643, 754	(γGluCys) ₃ Gly	[1]
14	des-Gly-PC ₃ *	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ N ₆ O ₁₃ S ₃	715	233, 249, 353, 362, 465, 481, 697	(γGluCys) ₃	[1]
15	iso-PC ₃ (Ser)*	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₃ N ₇ O ₁₅ S ₃	802	233, 307, 339, 424, 493, 481, 765	(γGluCys) ₃ Ser	[1]
16	iso-PC ₃ (Asn)*	[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₄₄ N ₈ O ₁₅ S ₃	829	309, 364, 466, 538, 580, 595, 623, 670, 698, 710, 741, 811	(γGluCys) ₃ Asn	[1]
17	iso-PC ₃ (Gln)*	[M+H] ⁺	C ₂₉ H ₄₆ N ₈ O ₁₅ S ₃	843	233, 309, 365, 437, 465, 437, 465, 538, 555, 712, 825	(γGluCys) ₃ Gln	[1]
18	iso-PC ₃ (Glu)*	[M+H] ⁺	C ₂₉ H ₄₅ N ₇ O ₁₆ S ₃	844	307, 377, 509, 555, 605, 696, 740	(γGluCys) ₃ Glu	[1]
19	Cys-Cd-Cys*	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂ Cd	355	120, 234, 266, 309, 337	Cys-Cd-Cys	[4]
20	GSH-Cd*	[M] ⁺	C ₁₀ H ₁₆ N ₃ O ₆ SCd ⁺	420	318, 346, 374, 402	(γGluCys)Gly-Cd	[4]
21	Cys-Cd-GSH*	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₈ S ₂ Cd	541	233, 306, 423, 598, 624	(γGluCys)Gly-Cd-Cys	[4]
22	Cd-PC ₂ *	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₇ N ₅ O ₁₀ S ₂ Cd	652	247, 276, 306, 361, 379, 404, 490	(γGluCys) ₂ Gly-Cd	[5]
23	GSH-Cd-GSH*	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂ Cd	727	233, 306, 423, 581, 598, 624	(γGluCys)Gly-Cd- (γGluCys)Gly	[4,5]

*Não detectado na amostra controle (0 μM de Cd^{II})

[1] MOU, CAO, *et al.*, 2016; [2] OVEN, RAITH, *et al.*, 2001; [3] CHASSAIGNE, VACCHINA, *et al.*, 2001; [4] RUBINO, PITTON, *et al.*, 2006; [5] NAVAZA, MONTES-BAYÓN, *et al.*, 2006

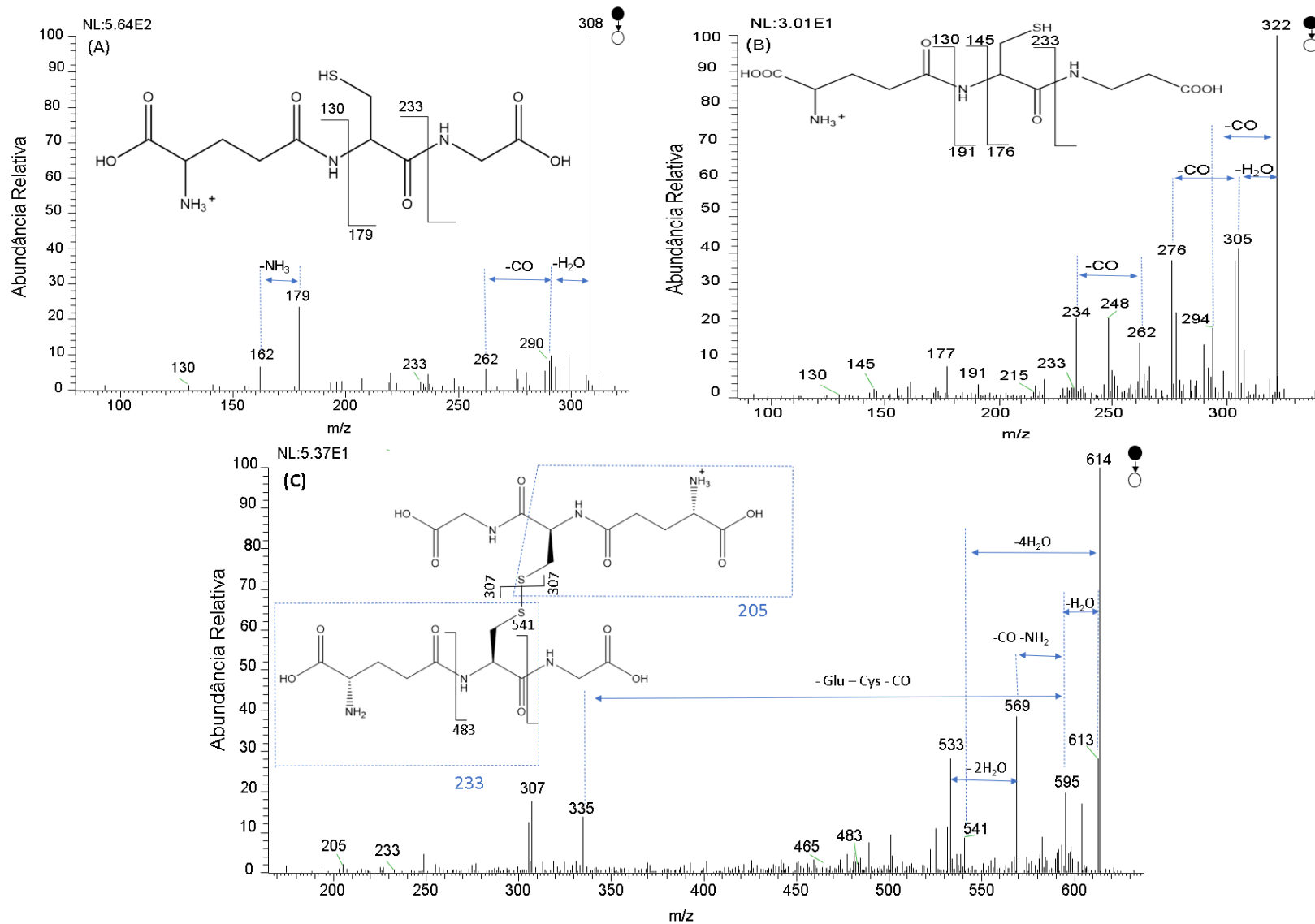


Figura 27 – Espectros MS² por PS(+)-MS com estrutura e fragmentos de m/z 308, GSH (A) m/z 322, hGSH (B) e m/z 613 GSSG (C) em raiz contaminada de manjeriço a 10,0 μM de Cd durante 14 dias

Além das PCs livres e seus derivados, as análises dos extratos de raízes de manjeriço expostas ao Cd (10 μ M) também apresentaram complexos de Cd. A Figura 28 ilustra os fragmentos característicos do complexo Cd-GSH ($C_{10}H_{16}N_3O_6SCd$, íon a m/z 420 $[M]^+$). Íons fragmento m/z 402, 318, 307 e 346 correspondem, respectivamente, à perda de uma molécula de H_2O (-18 Da), um resíduo de Gly e Cys (-102 Da), um Cd (-112 Da) e um resíduo de Gly (-74 Da). Análises similares foram aplicadas aos espectros de fragmentação para outros complexos (Cys-Cd-Cys (m/z 355), Cys-Cd-GSH (m/z 541), Cd-PC₂ (m/z 652) e GSH-Cd-GSH (m/z 727)) conforme a Fig. 9A (Apêndice 4).

Todos os espectros para os complexos de Cd são comparáveis aos obtidos por ESI-MS descritos na literatura (Tabela 10). Contudo, os espectros *full scan* para os complexos de Cd não mostraram o padrão isotópico para o Cd. Isto pode estar relacionado à baixa sensibilidade da técnica e a concentração destes analitos nos extratos de raízes, que se confunde com o ruído. Neste caso, somente uma técnica de alta sensibilidade e resolução poderia auxiliar na confirmação dos compostos.

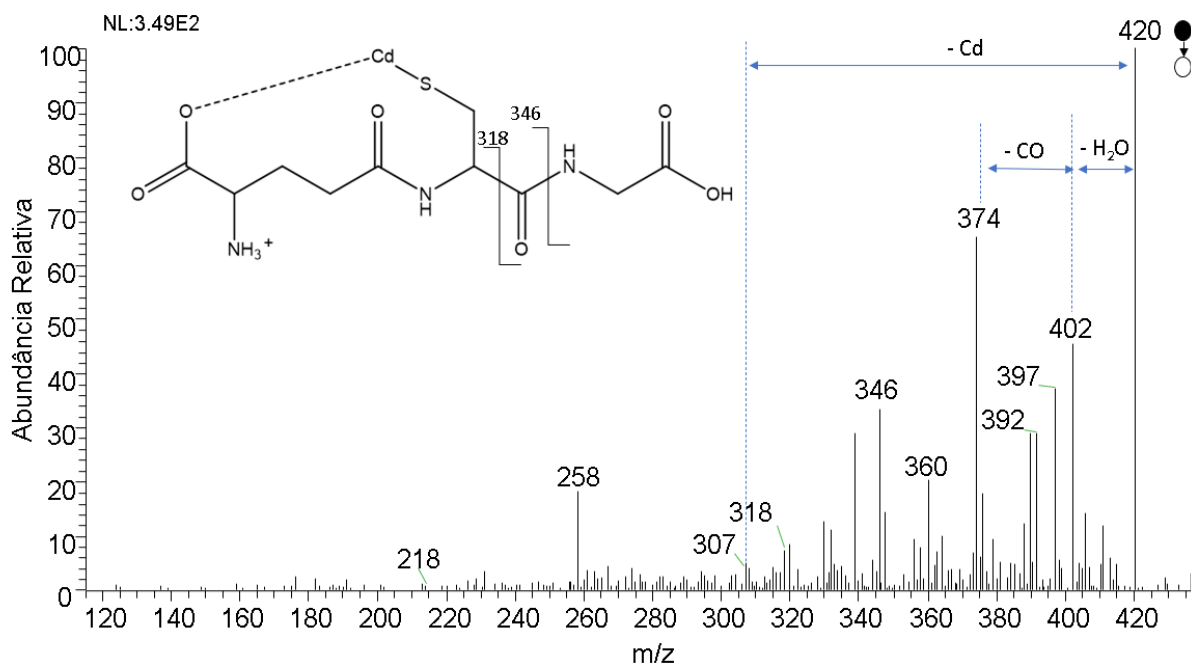


Figura 28 – Espectro MS² por PS(+)-MS com a estrutura de m/z 420 (GSH-Cd) e seus fragmentos

Os resultados mostraram que *Ocimum basilicum* L sintetiza GSH, hGSH, hPC₂, des-Gly-PC₂, PC₂₋₃, des-Cys-iso-PC₂(Glu), iso-PC₂(Ser), iso-PC₂(Gln), iso-PC₂(Asn), iso-PC₂(Glu), uma vez que estes peptídeos foram encontrados na amostra controle.

A presença de hPC₂ e hGSH é uma evidência de que esta espécie vegetal possui enzimas específicas para a síntese destes peptídeos. A Figura 29 mostra a intensidade do sinal para GSH, hGSH, PC₂, hPC₂, GSSG e PC₃ para as amostras de raízes controle e contaminada (10 µM) cultivadas por 14 dias. Com exceção da GSH, a intensidade dos sinais para todos os compostos aumenta com o aumento do tempo de exposição ao Cd^{II}, sugerindo a ativação de mecanismos de defesa da planta. Semelhanças são reportadas para raízes de arroz expostas ao Cd^{II} (MOU et al., 2016).

Somente para a GSH livre, a intensidade do sinal não difere estatisticamente para as plantas do grupo controle e contaminada, a 95 % de confiança. A intensidade dos sinais para hGSH, PC₂, hPC₂ e GSSG foram os mais altos em comparação com o grupo controle. Isto indica uma resposta positiva das plantas para regular a síntese de GSH com uma possível adaptação ao estresse e estímulo à formação de PCs como mecanismos de defesa. Neste caso, os derivados da GSH apresentaram resposta ao estresse metálico. Entretanto, a variação do conteúdo de GSH pode estar diretamente relacionada com a forma e condições de cultivo, exposição à concentração de Cd^{II} e espécies vegetais. Por exemplo, os resultados deste trabalho são similares aos obtidos para a cevada e alface cultivadas a 1 e 5 µM de Cd^{II} (AKHTER; MCGARVEY; MACFIE, 2012), mas em raízes de arroz a concentração de GSH foi superior quando comparado às raízes contaminadas por Cd^{II} a 50 - 100 µM (MOU et al., 2016).

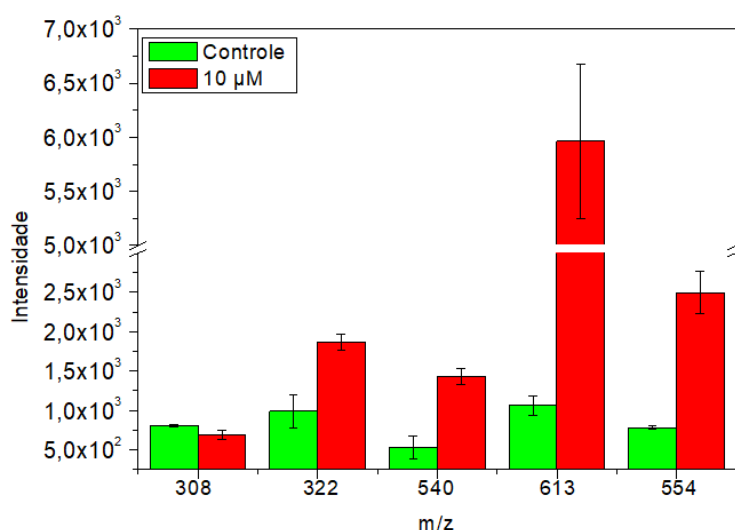


Figura 29 – Intensidade de sinal para *m/z* 308 (GSH), *m/z* 322 (hGSH), *m/z* 540 (PC₂), *m/z* 613 (GSSG) e *m/z* 554 (hPC₂) por PS(+)-MS para raízes de manjeriço do grupo controle (0 µM) e 10 µM de exposição ao Cd^{II} (14 dias, n = 2)

Homólogos de GSH e PC₂ também foram detectados em plantas, sendo que a hGSH é uma das mais frequentemente observada e sua síntese requer uma enzima específica, a glutathione sintetase (GSHS) ou a homoglutationa sintetase (hGSHS) (HOSSAIN et al., 2017). Em geral, hGSH tem funções similares à GSH e podem ser afetadas diferentemente pelo estresse em espécies vegetais capazes de sintetizar tanto hGSH quanto GSH, mas a importância de tais efeitos ainda não está clara (ZAGORCHEV et al., 2013). Estudos mostram que o hGSH coexiste com o GSH na planta da família *Leguminosae* (HASANUZZAMAN et al., 2017), mas os resultados desta pesquisa confirmam que o manjeriço também é capaz de sintetizar a hGSH.

A alta razão de GSH/GSSG é fundamental em muitas funções fisiológicas, e uma diminuição nesta relação pode ser um indicador de estresse oxidativo (HOSSAIN et al., 2017). GSH também é um metabólito sinalizador na homeostase celular, fundamental em reações de defesa e desenvolvimento de plantas e pode apresentar as formas de GSH e GSSG, em função da atividade da enzima glutathione redutase em detrimento do NADPH (HOSSAIN et al., 2017). Então, os resultados desta pesquisa podem indicar a formação de metabólitos onde a GSH é precursora, uma vez que haverá uma maior concentração de Cd acumulado na raiz potencializando as respostas de defesa da planta.

Para demonstrar a capacidade do manjeriço de se defender ao metal tóxico em função do tempo de cultivo, foi analisado o acúmulo de GSH, PCs e complexos formados após 7 e 14 dias de exposição ao Cd^{II} (Figura 30 e 31).

Os resultados sugerem que o tempo de exposição ao Cd é um fator determinante para estimular uma resposta diferente à planta sob estresse. A Figura 30 mostra que a intensidade do sinal durante um longo tempo de exposição ao Cd aumenta para *m/z* 509, 586, 597, 612, 829 e 843, provando que estes compostos podem ser biomarcadores do manjeriço para exposição prolongada ao Cd^{II}. Em contraste, a intensidade dos sinais para os íons *m/z* 308, 322, 540, 554, 570, 611, 715, 802 e 844 foi maior para o menor tempo de exposição.

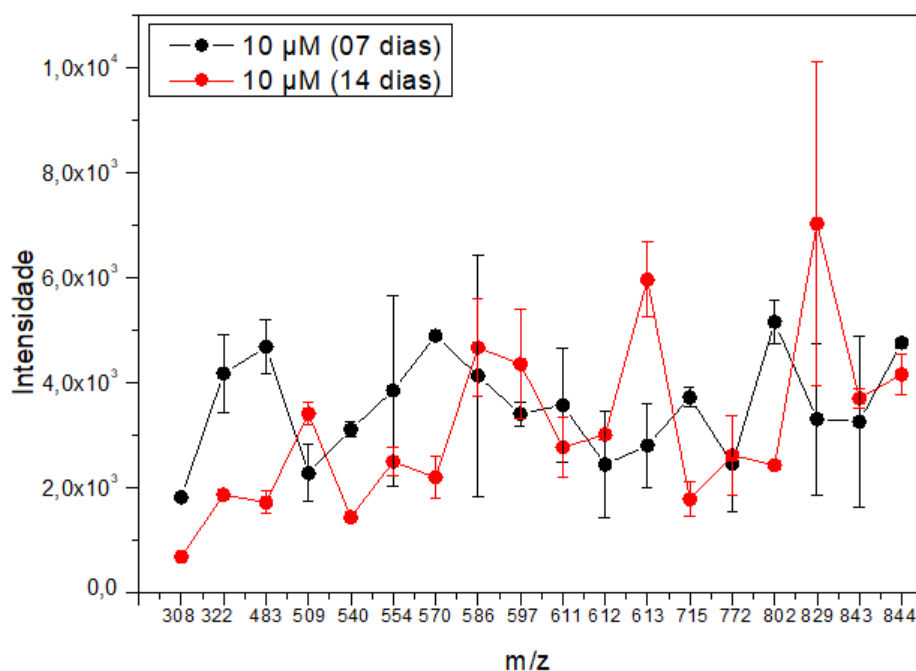


Figure 30 – Comparação da intensidade de sinal para m/z 355 (GSH), m/z 420 (hGSH), m/z 483 (des-Gly-PC₂), m/z 509 (des-Cys-iso-PC₂(Glu)), m/z 540 (PC₂), m/z 554 (hPC₂), m/z 570 (iso-PC₂(Ser)), m/z 586 (iso-PC₂(Cys)), m/z 597 (iso-PC₂(Asn)), m/z 611 (iso-PC₂(Gln)), m/z 612 (iso-PC₂(Glu)), m/z 613 (GSSG), m/z 715 (des-Gly-PC₃), m/z 772 (PC₃), m/z 802 (iso-PC₃(Ser)), m/z 829 (iso-PC₃(Asn)), m/z 843 (iso-PC₃(Gln)), m/z 844 (iso-PC₃(Glu)) para amostras de raízes de manjeriço exposto a 10 µM por 7 e 14 dias (n = 2)

O tempo de cultivo está diretamente relacionado à formação dos complexos em resposta à exposição ao Cd. A Figura 31 mostra que no menor tempo de cultivo do manjeriço ocorreu a formação preferencial de espécies simples (Cys-Cd-Cys, m/z 355 e GSH-Cd, m/z 420). A intensidade do sinal para Cys-Cd-GSH (m/z 541), em ambos os tempos de cultivo, não apresenta diferenças significativas, a 95 % de confiança. Além disso, as espécies Cd-PC₂ (m/z 652) e GSH-Cd-GSH (m/z 727) foram formadas somente no maior tempo de cultivo. Estes resultados sugerem que o longo tempo de exposição ao Cd induz a formação de diversos complexos no manjeriço como resistência ao aumento da acumulação de Cd nos diferentes órgãos, especificamente na raiz. No menor tempo de cultivo, as plântulas sintetizaram complexos mais simples, pois estavam no processo inicial de desenvolvimento e de adaptação às condições de cultivo.

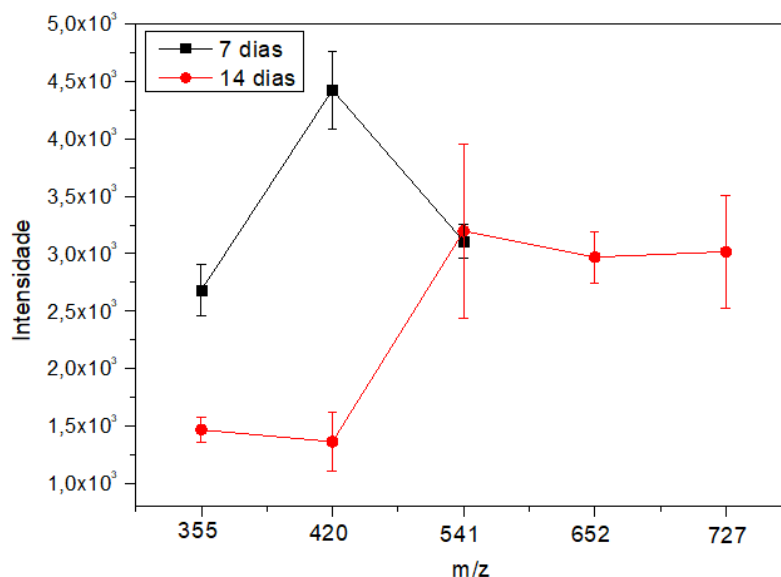


Figura 31 – Comparação da intensidade de sinal para m/z 355 (Cys-Cd-Cys), m/z 420 (GSH-Cd), m/z 541 (Cys-Cd-GSH), m/z 652 (Cd-PC₂), m/z 727 (GSH-Cd-GSH), de amostras de raízes de manjericão exposto a 10 µM por 7 e 14 dias (n = 2)

Os resultados alcançados indicaram que a técnica de ionização ambiente por PS-MS foi aplicada com êxito na detecção das PCs e seus derivados. Além disso, é uma técnica promissora para análise de outros metabólitos com as vantagens de ser um procedimento simples de preparo de amostras, com mínimo consumo de reagentes, tempo reduzido de análise e aplicável a pequenas quantidades de amostras.

5.6 Identificação de diferentes metabólitos por DESI-MSI empregando *imprint* da folha de manjericão em placa de TLC

As folhas de manjericão de diferentes concentrações de Cd^{II} foram analisadas por *imprint* (modo positivo) e análise direta (modos positivo e negativo), devido às características do tecido vegetal. A análise direta mostrou imagens autênticas da distribuição real dos metabólitos e similares ao *imprint*, com raras exceções.

As análises por DESI-MSI foram realizadas no laboratório ThoMSon da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Para as primeiras imagens foi feito o *imprint* de folhas em membrana PTFE e placa de TLC, a fim de avaliar o melhor substrato para a dessorção dos analitos.

A análise do *imprint* de folhas foi uma estratégia para avaliar como a exposição do manjericão a diferentes concentrações de Cd^{II} (0; 1,0; 3,6; 5,0; 25,0 e 50 µM) afeta o metaboloma da planta. A Figura 32 (A e B) apresenta as amostras e seus respectivos *imprints* em membrana PTFE e placa de TLC, respectivamente, para a análise simultânea por DESI-MSI. A Figura 33 mostra a comparação das imagens obtidas para estes *imprints*, cuja cor vermelha das imagens representa a intensidade máxima dos analitos nas amostras.

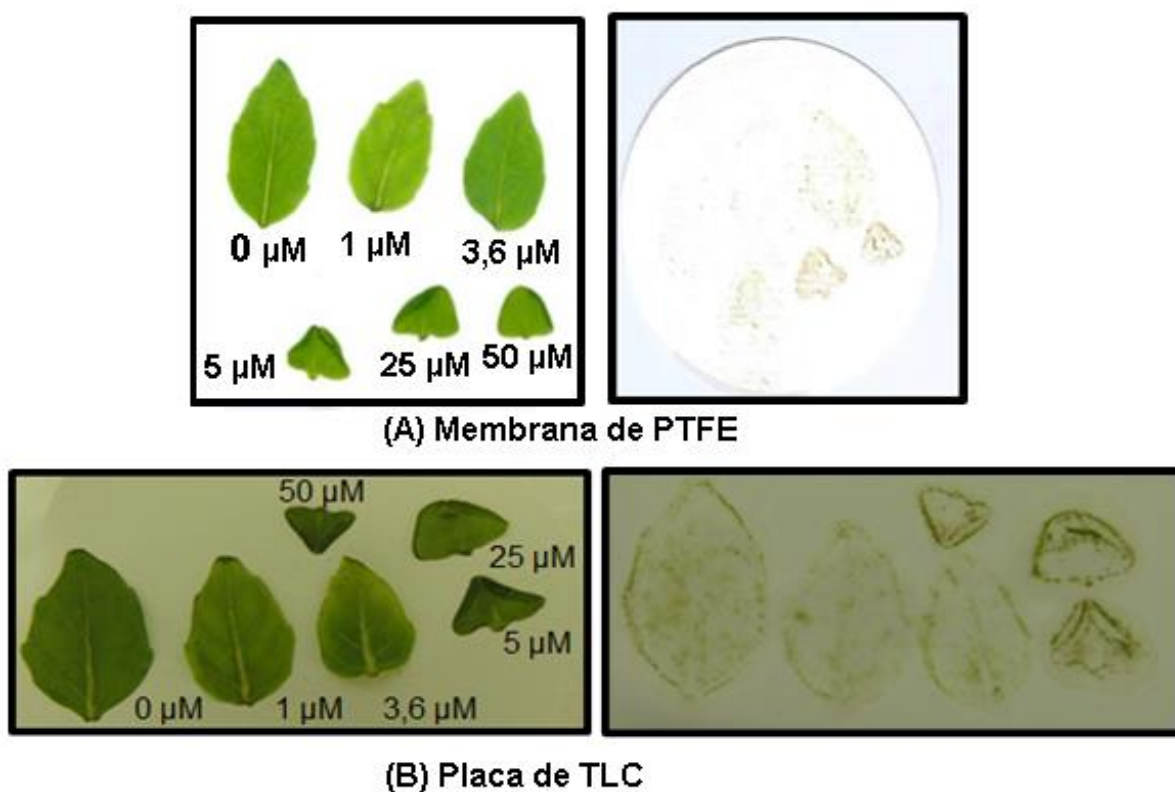


Figura 32 – Folhas nas concentrações (0; 1,0; 3,6; 5,0; 25,0 e 50 µM) após o *imprint* e seu *imprint* em (A) membrana PTFE (B) placa de TLC

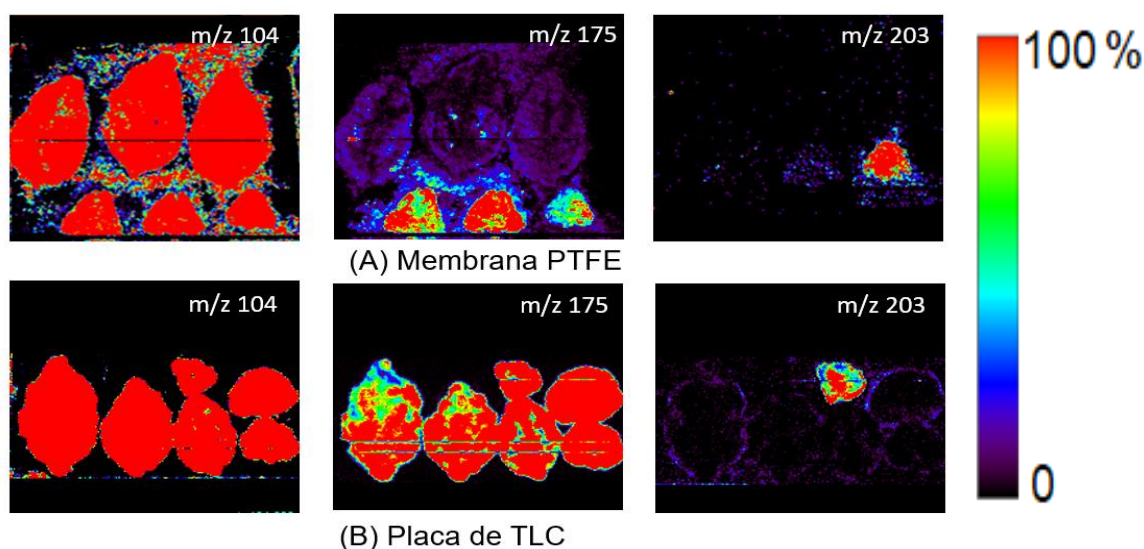


Figura 33 – Comparação do *imprint* de folhas nas concentrações (0; 1,0; 3,6; 5,0; 25,0 e 50 μ M) em diferentes substratos: (membrana PTFE) (A) e placa de TLC (B).

Embora as análises tenham empregado folhas diferentes de uma mesma planta, a placa de TLC foi o melhor substrato, uma vez que as imagens apresentaram melhor definição, menor espalhamento do extrato, menores desvios de massa, bem como maior confiabilidade na distribuição espacial dos analitos nas diferentes folhas. Logo, todas as demais análises por *imprint* foram realizadas em placa de TLC. Além disso, o número de imagens obtidas pelo *imprint* na placa TLC foi aproximadamente 5 vezes superior à membrana PTFE.

Os analitos de interesse (fitoquelatinas, seus derivados e os complexos de Cd) não foram detectados nas amostras analisadas por DESI-MSI devido, provavelmente, às condições de análise (tempo, temperatura e solvente). Contudo, os resultados permitiram uma avaliação metabolômica *untarget*, pois foram obtidas, no mínimo, 200 imagens (n_i = número de imagens) de diferentes metabólitos em cada análise.

A Tabela 8A (Apêndice 5) mostra a classificação dos metabólitos identificados, tais como aminoácidos e peptídeos (43), flavonoides (28), fitohormônios e derivados (6), ácidos orgânicos (9), carboidratos e conjugados (10), alcaloides (4) e outros (68), com seus respectivos desvios de massas (ppm), CID (*Compound identification number* - número de identificação de composto) e nível de identificação.

Os níveis de identificação são definidos como nível 1 (metabólitos identificados por duas ou mais propriedades espectrais), nível 2 e 3 (tentativa de identificação de

compostos e de classes, respectivamente) e nível 4 (compostos desconhecidos) (SALEK et al., 2013). Assim, a maioria dos compostos apresentados na Tabela 6A foram classificados no nível 2. Todos os compostos apresentaram erros de massa inferiores a 3,0 ppm, exceto os flavonoides (m/z 409,04, m/z 632,11), flavanonas (m/z 453,21), repenol (m/z 214,00), prenol lipídios (m/z 317,90), avasaponina (m/z 609,28), hidroxiácidos (m/z 223,13), fosfo-L glutamina (m/z 191,02), Met-Thr-OH ou Ser-Met-OH (m/z 192,02) e 2'',6''-Digalloyliriflophenone 3-C-glucoside (m/z 368,06).

Um total de 168 compostos foram identificados em folhas de manjeriço após *imprint* em placa de TLC. Conforme o diagrama de Venn apresentado na Figura 34 (A e B), os compostos foram separados de acordo com a concentração de intoxicação. A cor azul mostra a folha controle (F 0 μ M) com 6 metabólitos identificados (Figura 32A) e 20 desconhecidos (Figura 34B), característicos do manjeriço e que foram inibidos pela presença de Cd. Além disso, nestes diagramas observa-se a interseção de aproximadamente 86,2 % (131) e 58,7 % (98), respectivamente, de compostos comuns à todas as concentrações.

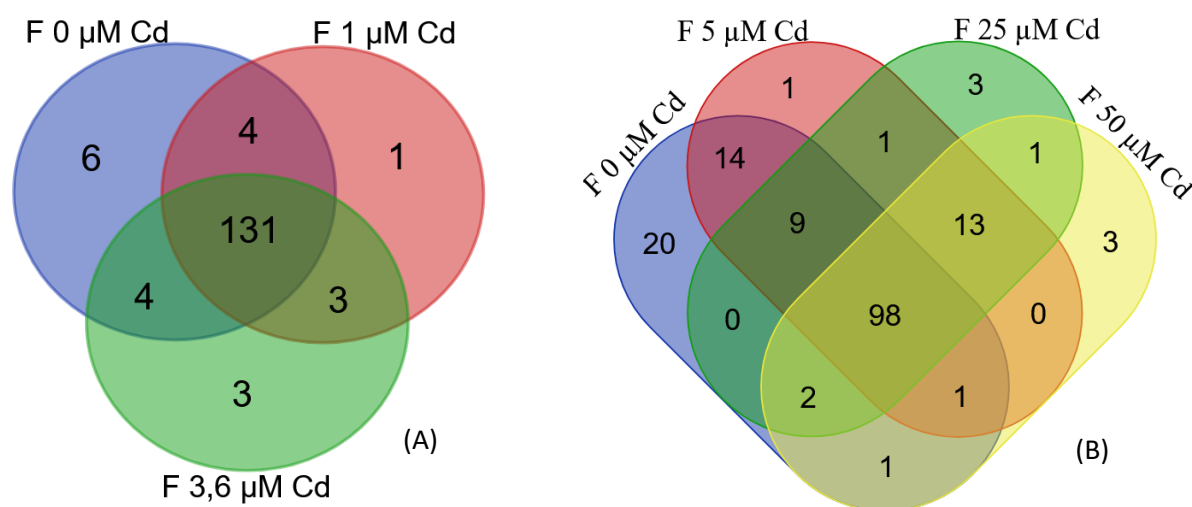


Figura 34 – Diagrama de Venn para compostos identificados no *imprint* de folha (F) de manjeriço cultivado em 0, 1, 3,6, 5, 25 e 50 μ M de Cd^{II}. (A) compostos nas menores concentrações; (B) Compostos nas maiores concentrações

Neste sentido, são quatro condições características quanto à presença de Cd: nenhuma alteração observada, potenciais biomarcadores diretamente proporcionais à concentração de exposição ao Cd, metabólitos com distintas distribuições espaciais

e potenciais biomarcadores característicos da exposição ao Cd. Para a primeira condição, o Cd não interferiu na síntese e nem na distribuição espacial de 48 metabólitos (**em negrito** na Tabela 6A, Apêndice 5). As outras condições apresentam metabólitos com diferenças em pelo menos uma concentração de exposição ao metal tóxico.

As imagens são ferramentas úteis para avaliar como o Cd pode afetar a distribuição espacial e acumulação dos metabólitos nos diferentes órgãos vegetais. A Figura 35 mostra que o Cd aumentou a intensidade dos metabólitos nas amostras mais contaminadas, tornando-os biomarcadores às distintas concentrações. Além disso, Cd também interferiu na dinâmica espacial de diferentes compostos (Figura 36).

Na Figura 35 pode-se observar que o Cd perturbou a acumulação dos metabólitos nas folhas, seja por redução de demanda metabólica nos processos bioquímicos ou um estímulo à síntese como mecanismo de defesa. Em geral, as imagens apontam possíveis novos biomarcadores de Cd e, em concordância com a literatura para respostas biológicas de diferentes espécies vegetais, houve o aumento da concentração de prolina (Pro), glutamina (Gln), sacarose (dissacarídeo), glicose, frutose e galactose (hexoses), lipídios e isoflavonas (SUN et al., 2010; XIE et al., 2014).

O Cd perturba as atividades metabólicas em nível celular e produz espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem induzir a síntese de biomarcadores. Logo, os compostos apresentados na Figura 37 são também possíveis biomarcadores específicos para a presença do elemento tóxico, pois não estão presentes no grupo controle. Vale ressaltar que a maioria das imagens obtidas neste estudo apontam novos candidatos a biomarcadores para Cd em plantas.

Sun e colaboradores (2010) verificaram que ácido piroglutâmico, isoflavonas e lipídios são potenciais biomarcadores de Cd em *Arabidopsis thaliana*. Outra pesquisa aponta que a concentração de fenóis em tecidos de plantas é um bom indicador para prever a extensão da tolerância das plantas ao estresse abiótico (SHARMA et al., 2019). Como exemplo, as imagens da Figura 37 mostram fenilpropanoides (m/z 219,03), originários da fenilalanina, e os flavonoides (m/z 383,09) presentes somente na folha mais contaminada.

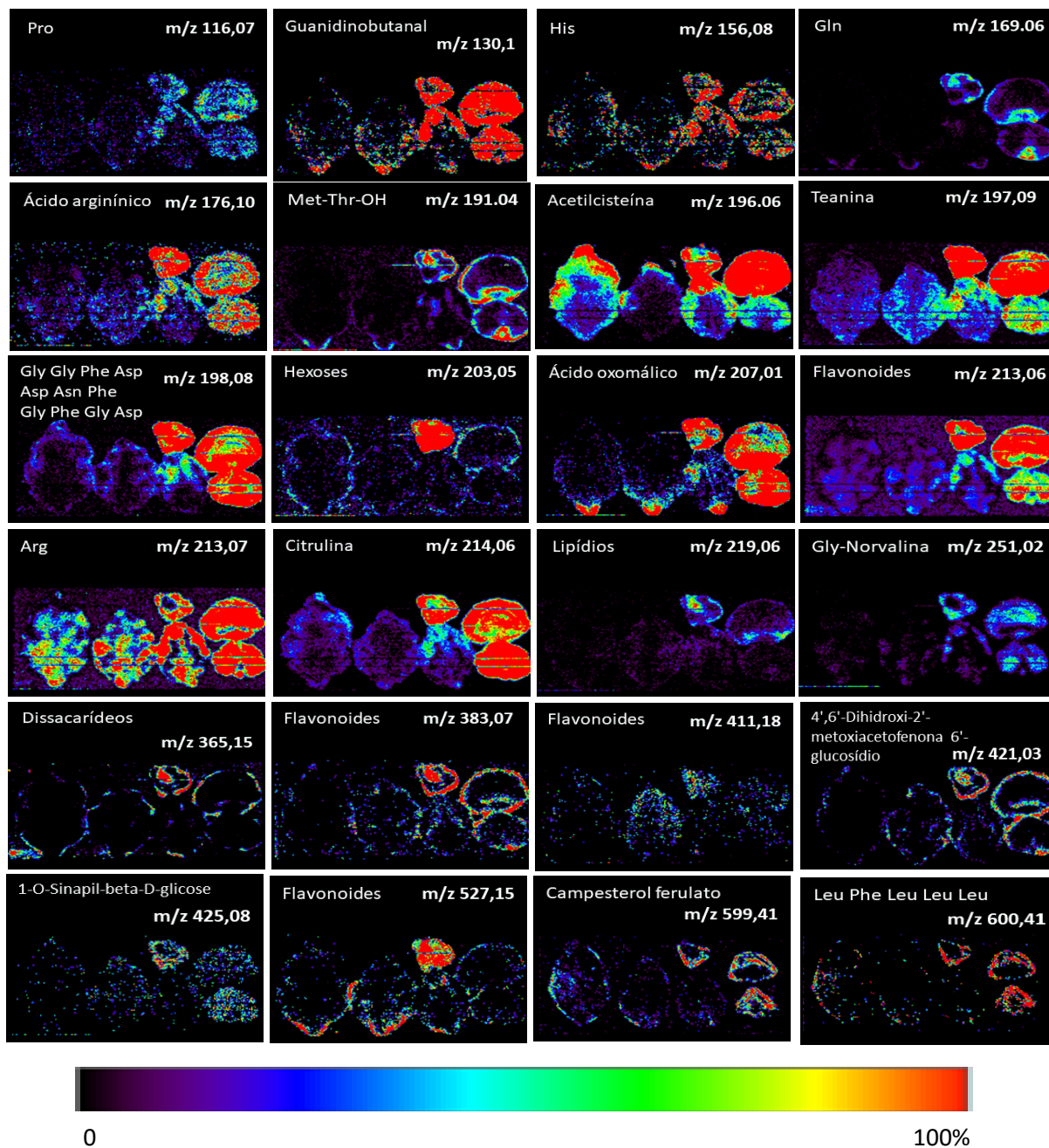


Figura 35 – Potenciais Metabólitos biomarcadores de Cd em folhas de manjericão após exposição a diferentes concentrações de Cd.

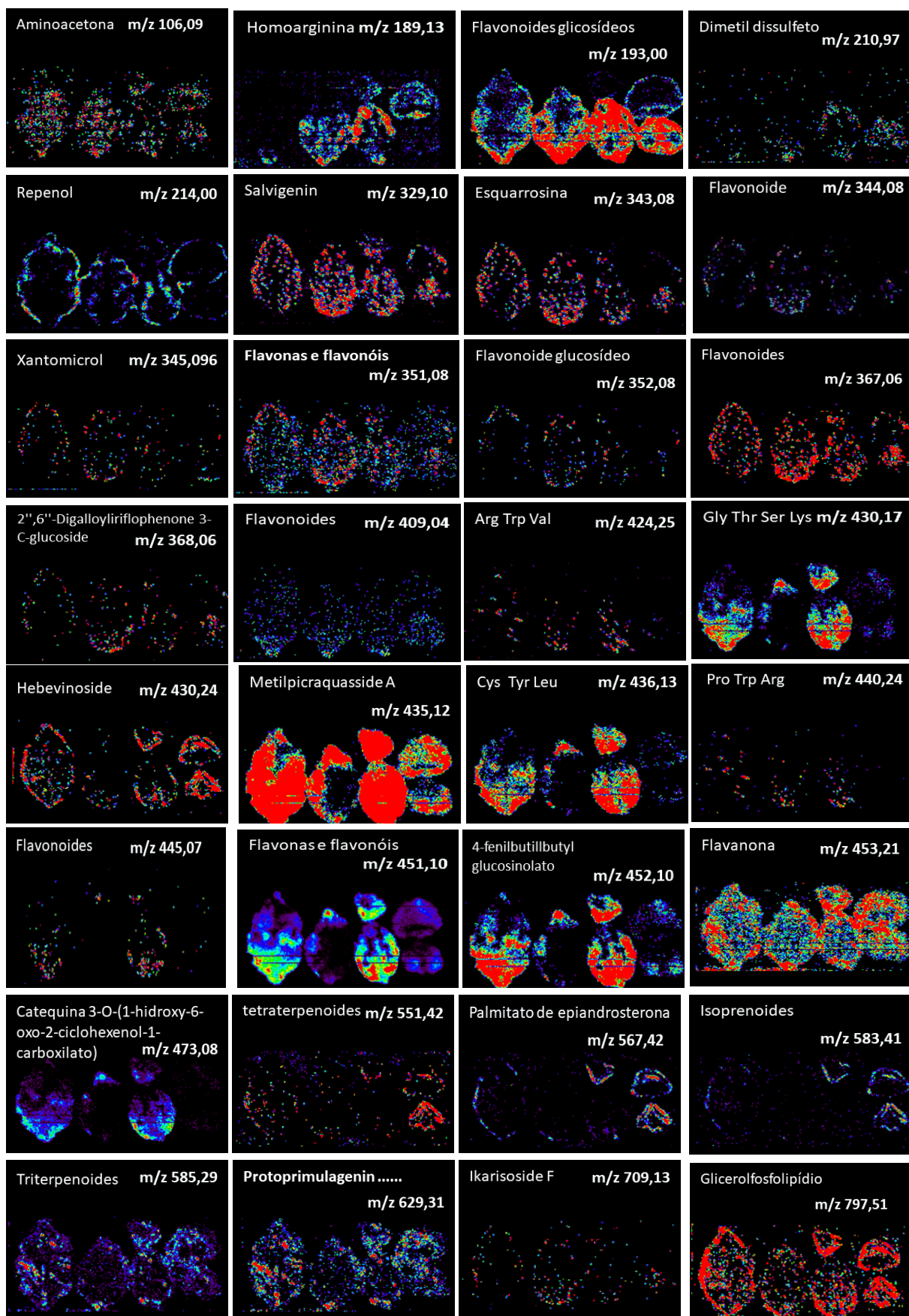
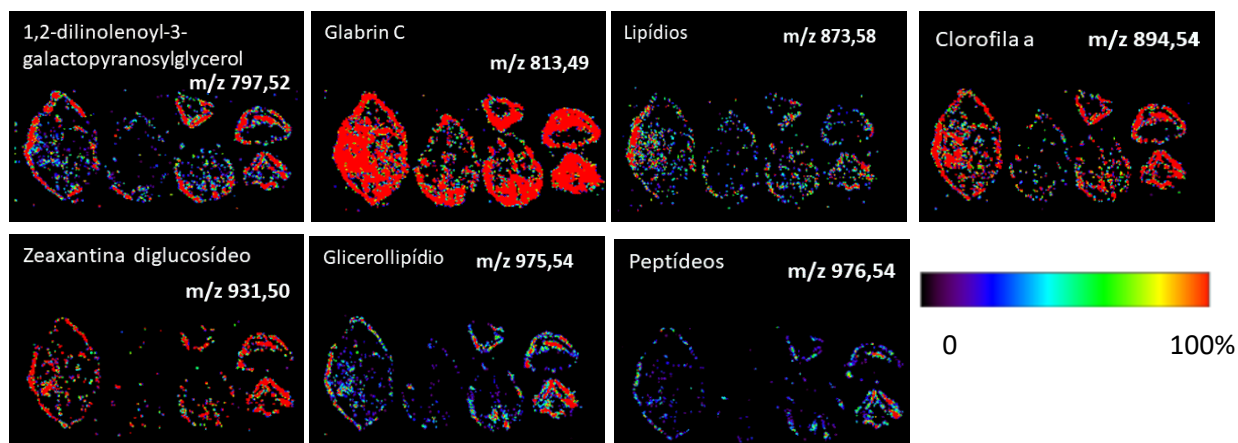


Figura 36 – Imagem de metabólitos com características de distribuição espacial específica para folhas expostas a diferentes concentrações de Cd



Continuação da Figura 36 – Imagem de metabólitos com características de distribuição espacial específica para para folhas expostas a diferentes concentrações de Cd

Além das diferentes habilidades das plantas em resposta ao estresse abiótico, a presença do metal tóxico também pode inibir a acumulação de vários metabólitos na folha. A Figura 38 apresenta a relação de íons cuja acumulação no órgão foi inibida por uma ou mais concentrações de exposição a Cd^{II}.

Quanto aos metabólitos não identificados, as Fig. 10 A e 11 A (Apêndice 5) mostram, respectivamente, o diagrama de Venn para a distribuição de compostos desconhecidos e imagens de alguns destes metabólitos nas diferentes folhas.

Os resultados do metaboloma do manjeriço sugerem que a toxicidade de Cd pode interferir nas rotas metabólicas, fornecendo diversas hipóteses sobre as perturbações observadas nas folhas frente às diferentes concentrações de exposição a Cd^{II}. Após a identificação dos metabólitos e biomarcadores, é interessante encontrar uma relação entre a exposição ao metal e o comprometimento das vias metabólicas (GARCÍA-SEVILLANO; GARCÍA-BARRERA; GÓMEZ-ARIZA, 2015). Entretanto, a compreensão de alterações metabólicas é uma tarefa complexa, pois um determinado metabólito pode desencadear inúmeras mudanças em muitas outras vias metabólicas.

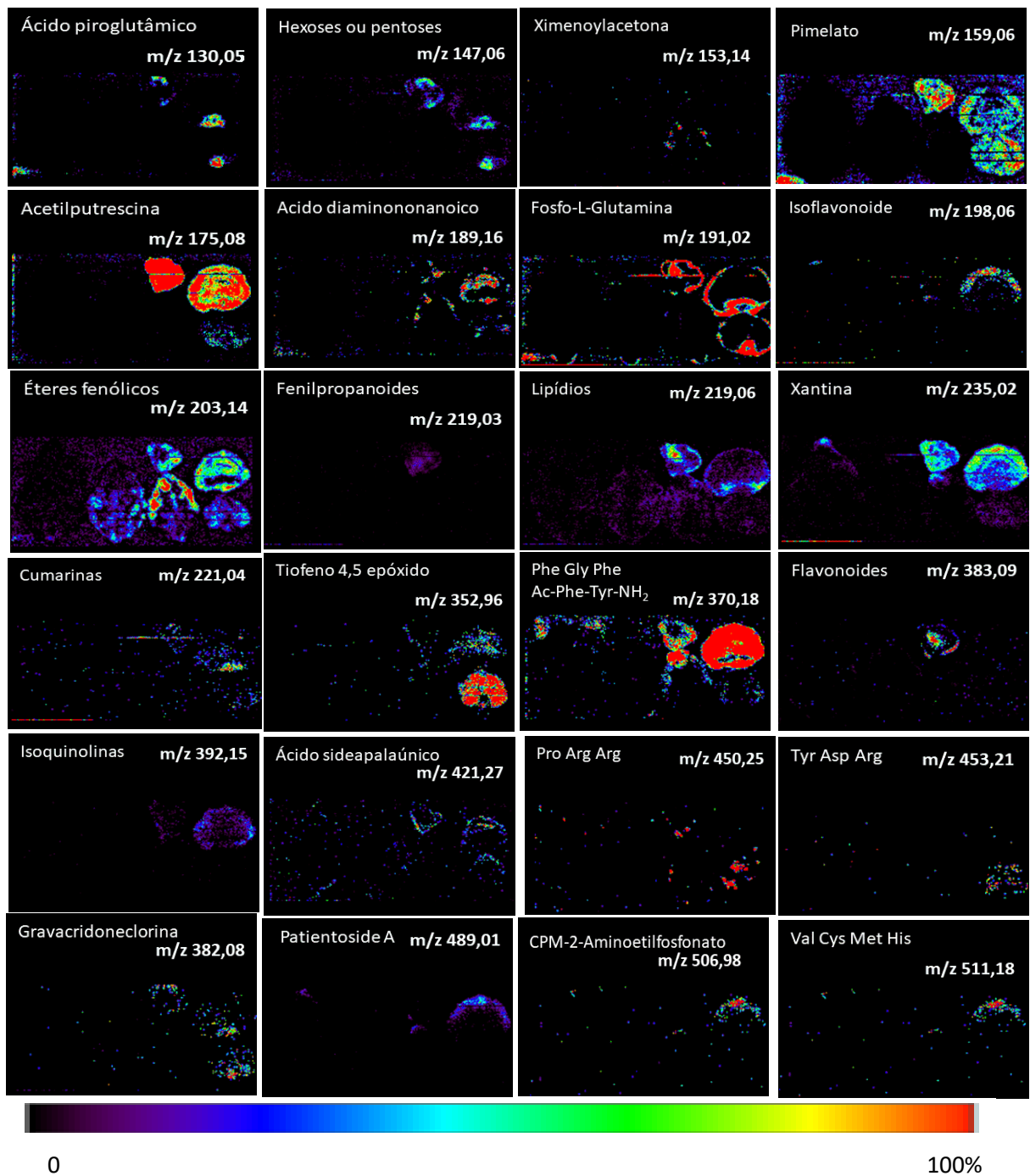


Figura 37 – Imagem de possíveis metabólitos biomarcadores em folhas expostas a diferentes concentrações de Cd.

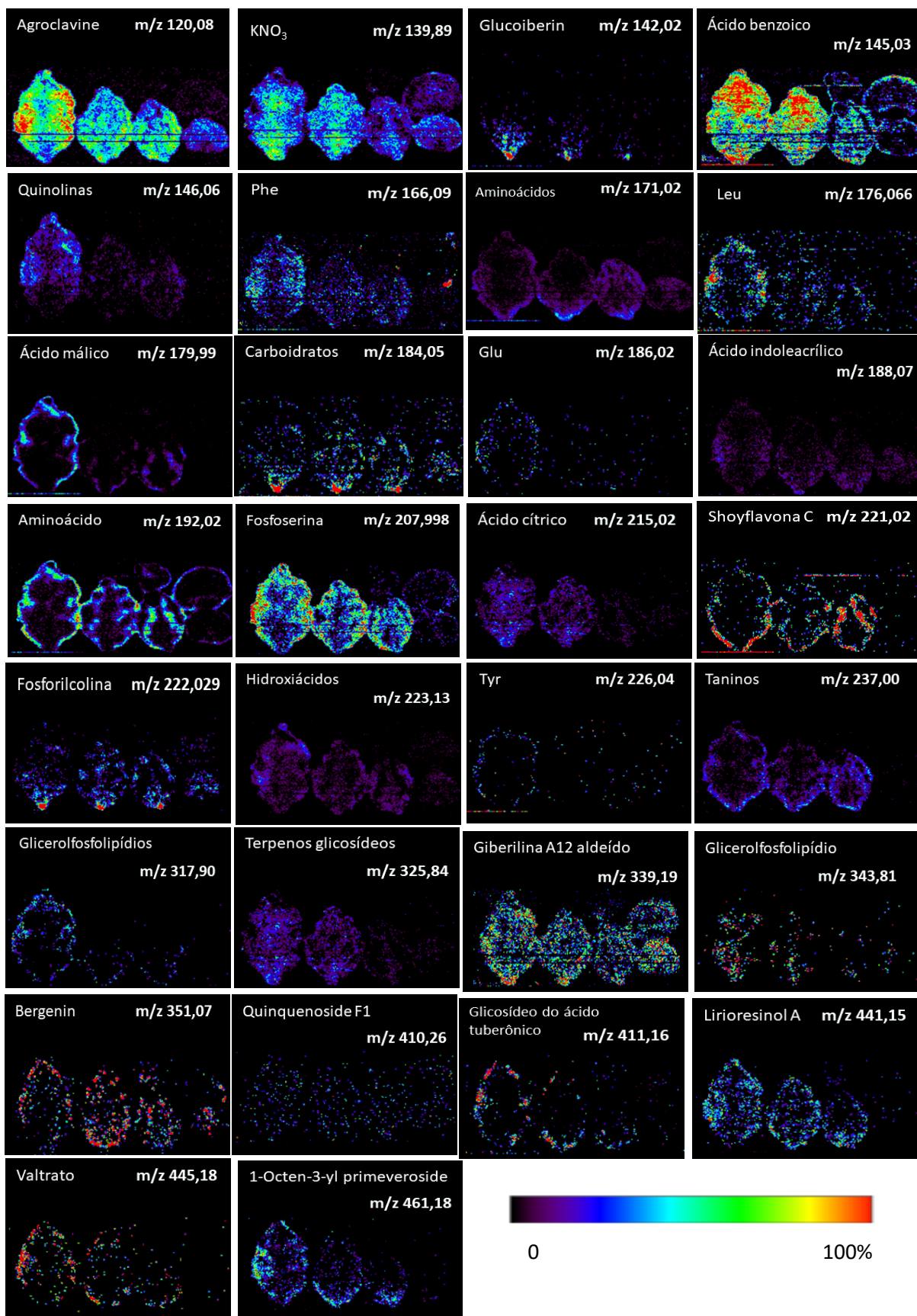


Figura 38 – Imagem de metabólitos em folhas expostas a diferentes concentrações de Cd. que foram inibidos

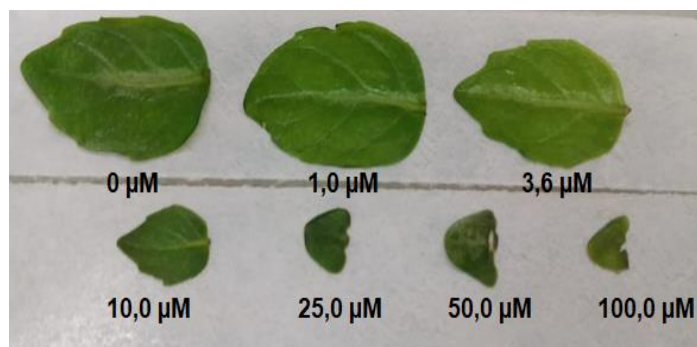
5.7 Análise direta de folhas de manjeriço por DESI-MSI

A análise direta nas folhas de manjeriço gerou um número maior de imagens no modo positivo do que o *imprint*. Entretanto, para simplificar a abordagem deste tópico somente serão apresentadas imagens inéditas e/ou que demonstraram melhor autenticidade da distribuição espacial. Neste caso, foram analisadas duas novas concentrações: 10,0 e 100,0 μM (concentração empregada no estudo das fitoquelatinas e máxima do cultivo, respectivamente). A Tabela 11 apresenta os metabólitos identificados no nível 2 a 4, em que os desvios de massa foram $< 2,34$ ppm, e a Figura 39 mostra as imagens dos íons identificados.

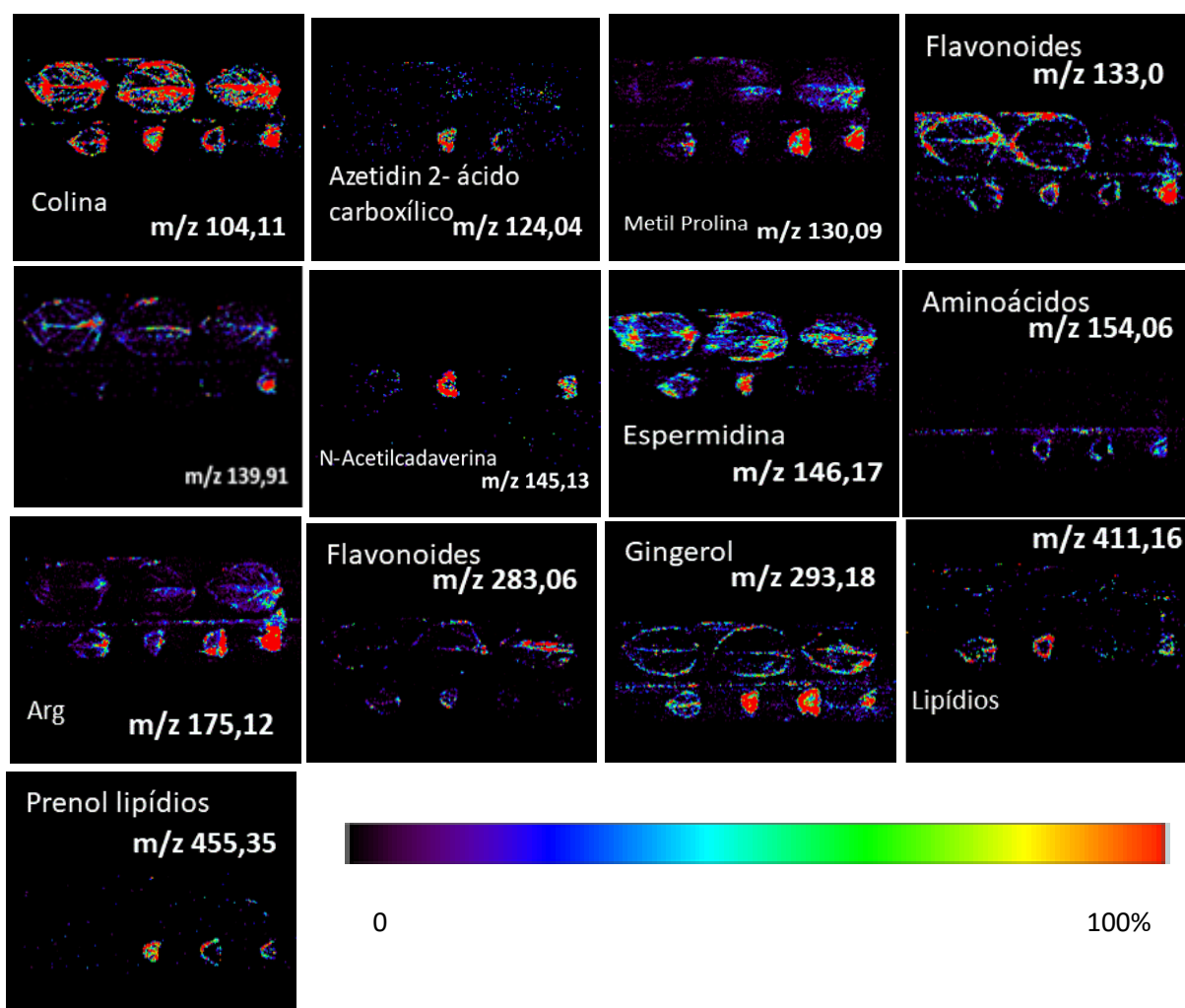
A análise direta das folhas apresentou detalhes da distribuição real dos metabólitos nas nervuras central e secundária, bem como nas margens do órgão. As imagens revelaram que a presença de Cd interferiu na acumulação de todos os compostos apresentados na Figura 39, que são biomarcadores de Cd, exceto a colina (m/z 104,11), azetidine-2-ácido carboxílico (m/z 124,04), metil prolina (m/z 130,09), flavonoides (m/z 133,0), N-Acetil cadaverina (m/z 145,13), Arg (m/z 175,12), aminoácidos (m/z 154,06), gingerol (m/z 293,18), lipídios (m/z 411,16) e prenol lipídios (m/z 455,35).

O composto metil prolina é considerado osmoprotetivo (respostas das plantas frente ao estresse osmótico) (ABDELLY et al., 2015). A imagem para este íon (m/z 130,09) mostra maior acumulação nas folhas mais contaminadas, sugerindo indução de sua formação devido, provavelmente, ao estresse osmótico causado pelo Cd. Efeito de inibição do acúmulo dos metabólitos espermidina (m/z 146,17) e flavonoides (m/z 283,06) também foi observado nas folhas, sugerindo o efeito antagônico destes metabólitos com aumento da contaminação.

O íon não identificado (m/z 139,91), Figura 39 B, mostrou um comportamento singular, pois sua acumulação não foi alterada em concentrações de Cd inferiores a 3,6 μM . Porém, na concentração 100 μM , a planta respondeu positivamente para a fixação deste composto.



(A)



(B)

Figura 39 – (A) Amostras de folhas de manjeriçao nas concentrações de Cd^{2+} iguais a 0 (controle); 1; 3,6; 10; 25; 50 e 100 μM (B) Imagem de metabólitos obtidos pela análise direta das folhas expostas ao Cd

Tabela 11 – Tentativa de identificação de metabólitos em folha fresca de manjeriço exposto a diferentes concentrações de Cd^{II} (0; 1; 3,6; 10; 25; 50 e 100 µM)

Tentativa de identificação			m/z		Desvio de massa (ppm)	CID	Nível de identificação
Nome do metabólito	Fórmula molecular	Íon	Teórica	Experimental			
Colina	C ₄ H ₁₄ ON	[M+H] ⁺	104,10754	104,1073	0,309	HMDB0000097	2
Azetidine -2-ácido carboxílico	C ₄ H ₇ NO ₂	[M+Na] ⁺	124,03708	124,03699	0,726	KEGGC08267	2
Metil Prolina	C ₆ H ₁₂ O ₂ N	[M+H] ⁺	130,08626	130,08633	0,575	HMDB0094704	2
Flavonoides	C ₁₆ H ₁₁ O ₅	[M-3H] ³⁻	132,9954	132,99571	2,331	-	3
Desconhecido	-	-	-	139,91471	-	-	4
N-Acetil cadaverina	C ₇ H ₁₆ N ₂ O	[M+H] ⁺	145,13354	145,13352	-0,020	HMDB0002284	2
Espermidina	C ₇ H ₂₀ N ₃	[M+H] ⁺	146,16572	146,16522	-0,313	HMDB0001257	2
Aminoácidos	C ₆ H ₈ O ₂ N ₃	[M-H] ⁻	154,0611	154,06212	0,259	-	3
Arginina	C ₆ H ₁₅ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	175,11950	175,11909	-0,138	HMDB0000517	2
Flavonoides	C ₁₆ H ₁₁ O ₅	[M-H] ⁻	283,0601	283,06143	0,824	-	3
Gingerol	C ₁₇ H ₂₅ O ₄	[M-H] ⁻	293,17809	293,17606	0,776	HMDB0005783	2
Lipídios	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	[M+Na] ⁺	411,16255	411,16217	-0,924	KEGGC08558	2
Prenol lipídios	C ₃₀ H ₄₇ O ₃	[M-H] ⁻	455,35197	455,35294	0,282	-	3
Fitohormônios							
Jasmone	C ₁₁ H ₁₆ O	[M+H] ⁺	165,12739	165,12725	-0,858	KEGGC08490	2
Ácido jasmônico	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	[M+Na] ⁺	233,11482	233,11469	-0,539	HMDB 5281166	2
Metil dihidrojasmonato	C ₁₃ H ₂₂ O ₃	[M+Na] ⁺	249,14612	249,14596	-0,625	HMDB102861	2
Ácido abscísico	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	[M+Na] ⁺	287,12538	287,12524	-0,489	HMDB 5280896	2
(-)-jasmonoyl-L-isoleucina	C ₁₈ H ₂₉ O ₄ N	[M+H] ⁺	324,21693	324,21672	-0,663	HMDB 5497150	2
Auxina b	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	[M+Na] ⁺	333,20363	333,20373	0,298	HMDB0038484	2
Auxina a	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	[M+Na] ⁺	351,2142	351,21382	-1,068	HMDB0038483	2

As auxinas e os ácidos abscísico e jasmônico são três das nove classes comuns de fitohormônios. As imagens para alguns dos hormônios destas classes (Figura 40) indicam uma acumulação dependente de concentrações específicas de Cd^{II}, sugerindo respostas distintas da planta à perturbação imposta. Interessante observar que as folhas contaminadas com 25 e 50 µM de Cd^{II} apresentaram uma intensidade de sinal diferenciada para todos os fitohormônios. Entretanto, para o jasmone (*m/z* 165,13),

hormônio que induz a produção eletiva de metabólitos secundários, a presença de Cd estimulou sua formação para as concontaminações > 10 µM. Em geral, as imagens obtidas corroboram com a literatura quanto ao papel dos fitohormônios como sinalizadores das condições ambientais, incluindo a resposta para o estresse abiótico causado por metal tóxico (BALI et al., 2018; SIDDIQUI; SAMI; HAYAT, 2020).

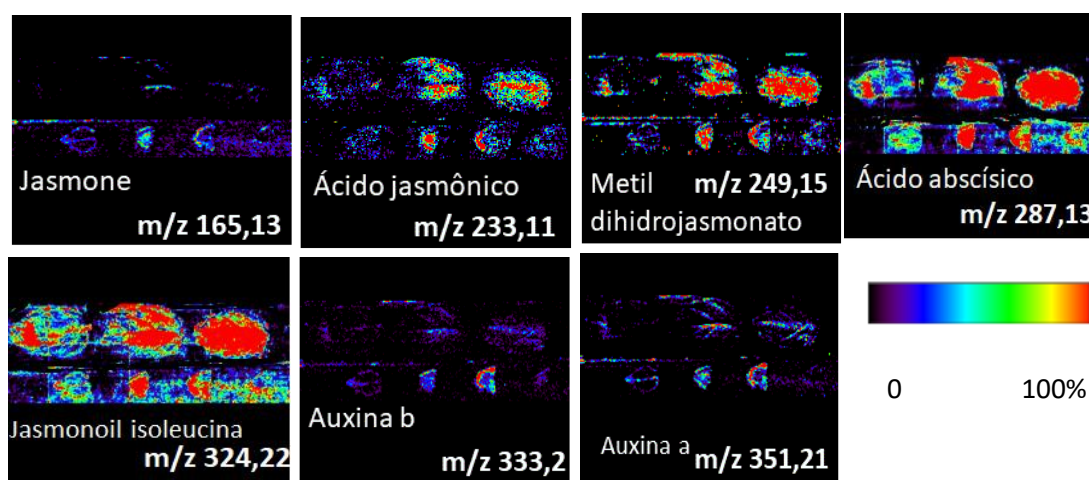


Figura 40 – Imagem de fitohormônios obtidos pela análise direta das folhas expostas a diferentes concentrações de Cd.

A análise direta das folhas e do *imprint* foram eficientes na avaliação da distribuição real dos metabólitos no órgão vegetal, sendo boas alternativas para identificação de metabólitos por imageamento químico de folhas. Entretanto, quando o objetivo da pesquisa se restringir à análise *target* para verificação da distribuição real no órgão vegetal, a análise direta mostra-se mais adequada e promissora, devido à sua maior definição.

5.8 Análise metabolômica em *imprint* de folhas e raízes de manjeriço contaminadas com 25 µM de Cd^{II}

As imagens dos *imprints* das folhas motivaram a análise de folhas e raízes da mesma planta para elucidar a dinâmica dos metabólitos e os efeitos do metal tóxico em órgãos distintos. Assim, escolheu-se uma única concentração de intoxicação para as folhas e raízes (0 e 25 µM) e procedeu-se a análise por DESI-MSI, conforme mostrado na Figura 41.

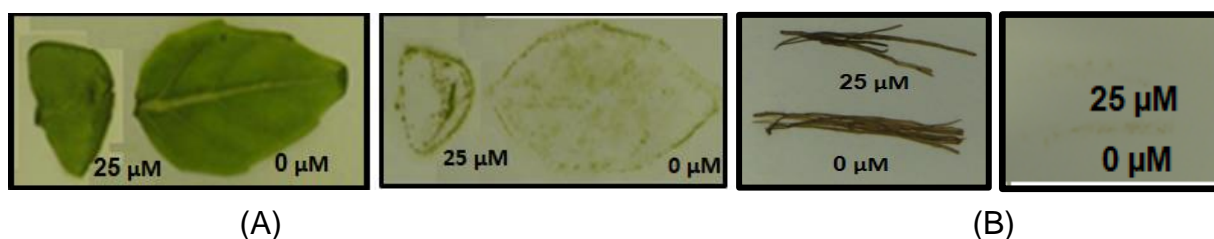


Figura 41 – Amostras de manjerição analisadas por DESI-MSI, após *imprint* e o *imprint* de folha (A) e raiz (B)

No total, foram obtidas 286 imagens, sendo que 27,6 % são de compostos desconhecidos. A Figura 42 (A e B) apresenta o diagrama de Venn para a distribuição de compostos na folha e raiz de manjerição - controle (F e R 0 μM) e contaminada (F e R 25 μM).

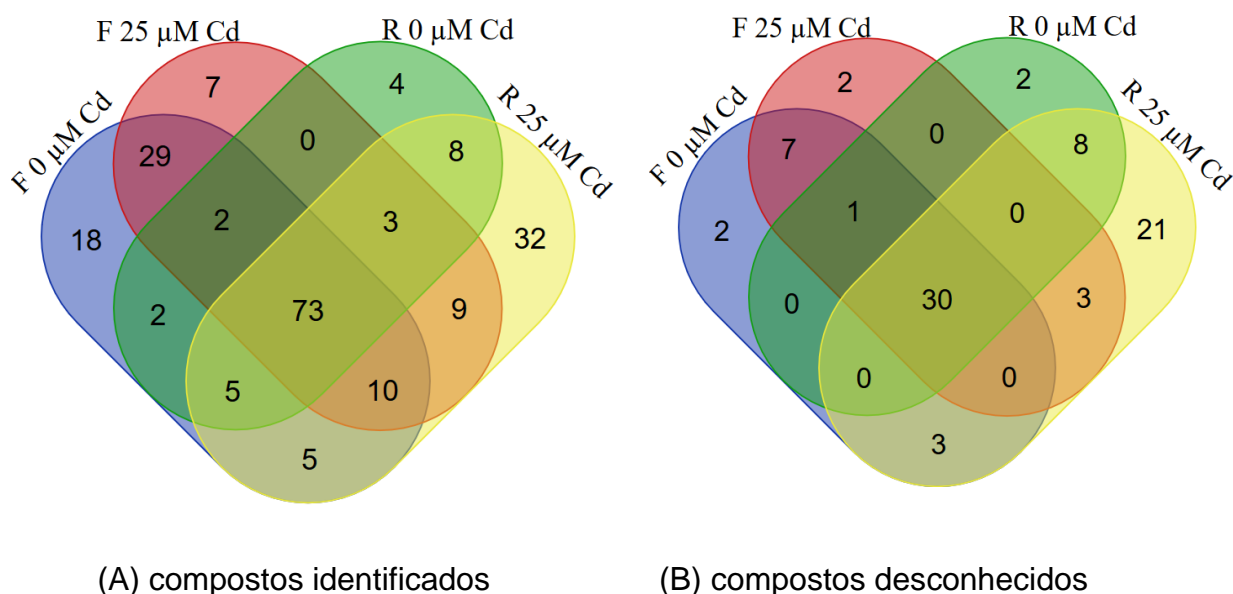


Figura 42 – Diagrama de Venn para o número de compostos obtidos no *imprint* de folha (F) e raiz (R) de manjerição cultivado em 0 e 25 μM de Cd^{II} . (A) 207 compostos identificados e (B) 79 compostos desconhecidos

Os diagramas de Venn (Figura 42) mostram que aproximadamente 35 % e 38 % dos compostos identificados ($n_i = 73$) e desconhecidos ($n_i = 30$), respectivamente, estão presentes em todas as amostras de folha e raiz, sendo, portanto, característicos do manjerição. Além disso, aproximadamente 10 % dos compostos identificados ($n_i = 20$) e 2,5 % desconhecidos ($n_i = 2$) são característicos da folha de manjerição e inibidos pelo Cd. Contudo, as imagens mostram que aproximadamente 80 % dos metabólitos identificados (**em negrito** na Tabela 7A, Apêndice 5) não apresentaram

diferenças na acumulação em ambos os tecidos vegetais estudados, ou seja, o Cd não perturbou a assimilação deles pela planta. Alguns destes metabólitos, embora presentes em todas as condições do estudo, apresentaram-se como possíveis biomarcadores (Figura 43 A) na raiz e/ou folha ou foram inibidos na folha pela presença de Cd (Figura 43 B). Vale ressaltar que o ácido glutâmico (m/z 192,02, Figura 43 B) foi inibido na folha e acumulado na raiz, sugerindo uma possível habilidade da planta em inverter a acumulação do metabólito nos órgãos como resposta de defesa à intoxicação por Cd.

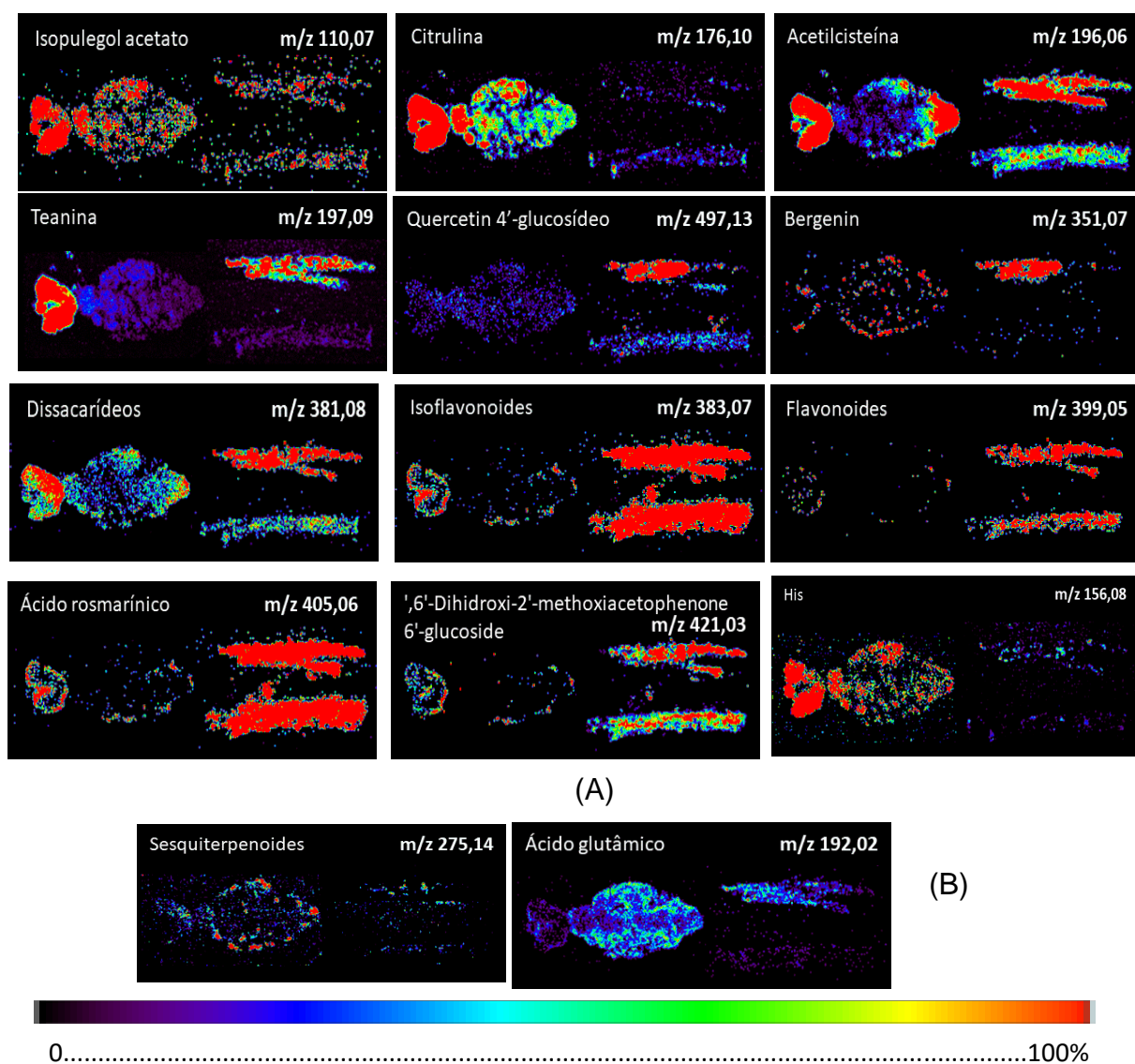


Figura 43– Metabólitos comuns em raiz e folha de manjericão (A) biomarcadores em folha e/ou raiz e (B) inibidos pela presença de Cd

Pelo diagrama de Venn (Figura 42 A), as cores azul (F 0 μ M) e verde (R 0 μ M) representam 18 e 4 compostos, respectivamente, presentes somente nas amostras

controle, demonstrando que estes metabólitos são específicos de cada órgão e são inibidos na presença de Cd^{II} (Figura 44 A e B). Além disso, o diagrama de Venn mostra que 2 metabólitos (interseção entre os grupos F e R 0 µM), Figura 44 C, estão presentes em ambos os tecidos controle, ou seja, Cd também pode ter inibido estes compostos. Interessante notar as imagens da Figura 44 C quanto à distribuição espacial da fosforilcolina (*m/z* 206,06) e do alcaloide gentiabetina (*m/z* 210,05) que se acumulam preferencialmente em raízes e folha não contaminadas, respectivamente.

Ao avaliarmos individualmente as amostras nos diagramas de Venn (Figuras 42 A e B), observa-se que a raiz contaminada (R 25 µM, cor amarela) apresenta o maior número de metabólitos (32 identificados e 21 desconhecidos). Como a raiz é o primeiro órgão da planta que entra em contato com o Cd, o seu metaboloma reflete este estresse com uma maior diversidade de metabólitos identificados como possíveis biomarcadores de Cd (Figura 45). Similarmente, 7 e 9 metabólitos (Figura 42, cor rosa e marrom) são biomarcadores de Cd somente nas folhas e em ambos os órgãos, respectivamente, conforme apresentado na Figura 46.

A Figura 12A (Apêndice 5) mostra imagens de alguns dos 79 metabólicos desconhecidos. As bases de dados utilizadas neste estudo não foram suficientes para tentativa de identificação destes compostos.

Além dos biomarcadores e compostos inibidos, as imagens também revelaram características marcantes nos tecidos de manjeriço, como por exemplo, prioridade de acumulação. As imagens da Figura 47 (A) e (B) apresentam metabólitos característicos de raiz (*n*_i = 3) e folha (*n*_i = 10) de manjeriço, que se acumularam na folha contaminada e raiz contaminada, respectivamente.

As imagens da Figura 47 (A) sugerem que estes metabólitos de raiz são estimulados na presença de Cd, com translocação para a parte aérea e/ou síntese pela folha. Além de absorver água e nutrientes, as raízes empregam muitas estratégias para defender e adaptar-se a diferentes pressões bióticas e abióticas (ALBRECHT et al., 2019). A resposta das plantas às perturbações pode alterar as atividades metabólicas dos órgãos, como exemplo, compostos oriundos do metabolismo de aminoácidos e açúcares devem ser sintetizados em folhas mas atribuídos e utilizados em grandes quantidades nas raízes (GARGALLO-GARRIGA et al., 2014). Similarmente, os metabólitos da Figura 46 (B) são característicos da folha e estimulados pelo Cd para fixação também na raiz da planta. Vale ressaltar que o

ácido arginínico (m/z 220,07), xantina (m/z 235,02) e peptídeos (m/z 511,17) foram hiperestimulados também na folha contaminada, mas o oposto (efeito de inibição) foi observado para 4,5 dihidropiperlongumina (m/z 352,07), peptídeos (m/z 457,11) e lipídios (m/z 441,15). Além disso, a Fig. 45 também mostra candidatos a biomarcadores de Cd na raiz, exceto os éteres fenólicos (m/z 203,14 - somente folha).

A análise simultânea das raízes e folhas fornece uma visão integrada do metaboloma da planta sob os diversos efeitos da absorção e translocação do Cd. As folhas e raízes são órgãos autotróficos e heterotróficos de plantas com diferentes funções fisiológicas que conseqüentemente apresentarão diferentes metabolomas e concentração de nutrientes (GARGALLO-GARRIGA et al., 2014). Ainda segundo estudo destes autores com plantas sob estresse hídrico e, em paralelo aos resultados deste trabalho, metabólitos relacionados ao metabolismo dos açúcares e aminoácidos deslocados da parte aérea para as raízes podem apresentar alterações metabólicas opostas (quando o metabolismo é ativado nas raízes, o inverso acontece na parte aérea) (GARGALLO-GARRIGA et al., 2014).

De todas as imagens apresentadas, pode-se inferir a complexidade metabólica nos órgãos vegetais em inibir ou estimular a acumulação dos diversos compostos. Observa-se ainda, relações antagônicas de acumulação (Figura 48 (A)), inibição em folha de metabólitos característicos de ambos os órgãos (Figura 48 (B)) e diferenças de distribuição espacial em metabólitos característicos de folha e raiz Figura 48 (C) e (D). Prolina betaína (m/z 144,10), ácido málico (m/z 178,99), peptídeos (m/z 457,17), carboidratos (m/z 689,21), quercetina (m/z 689,21), vulgaxantina (m/z 384,08), peptídeos (m/z 400,05) e Eugenol O-[α -L-Arabinofuranosyl-(1->6)- β -D-glucopiranoside] (m/z 481,17) revelados na Figura 48 são potenciais biomarcadores de Cd na raiz do manjericão.

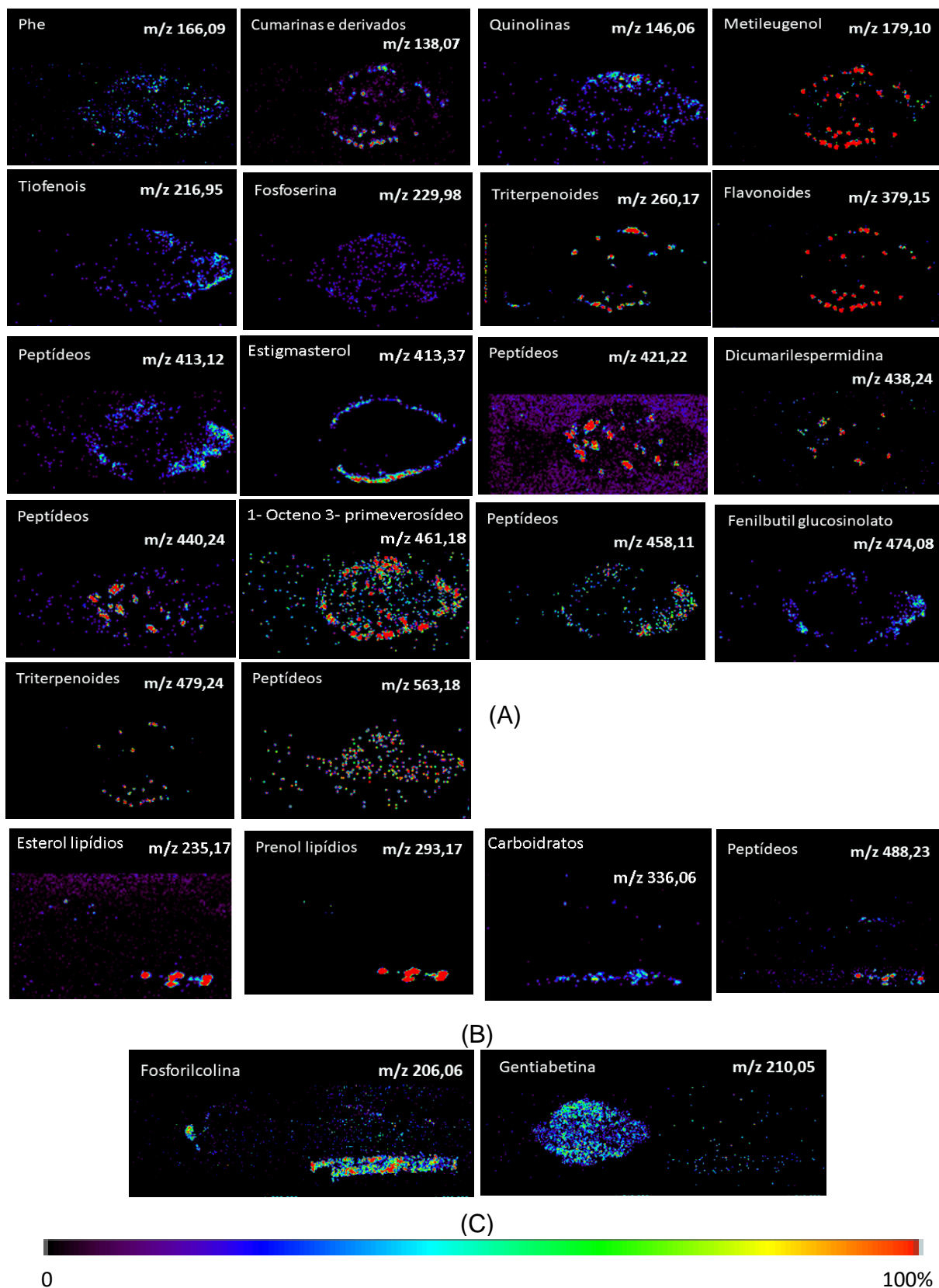
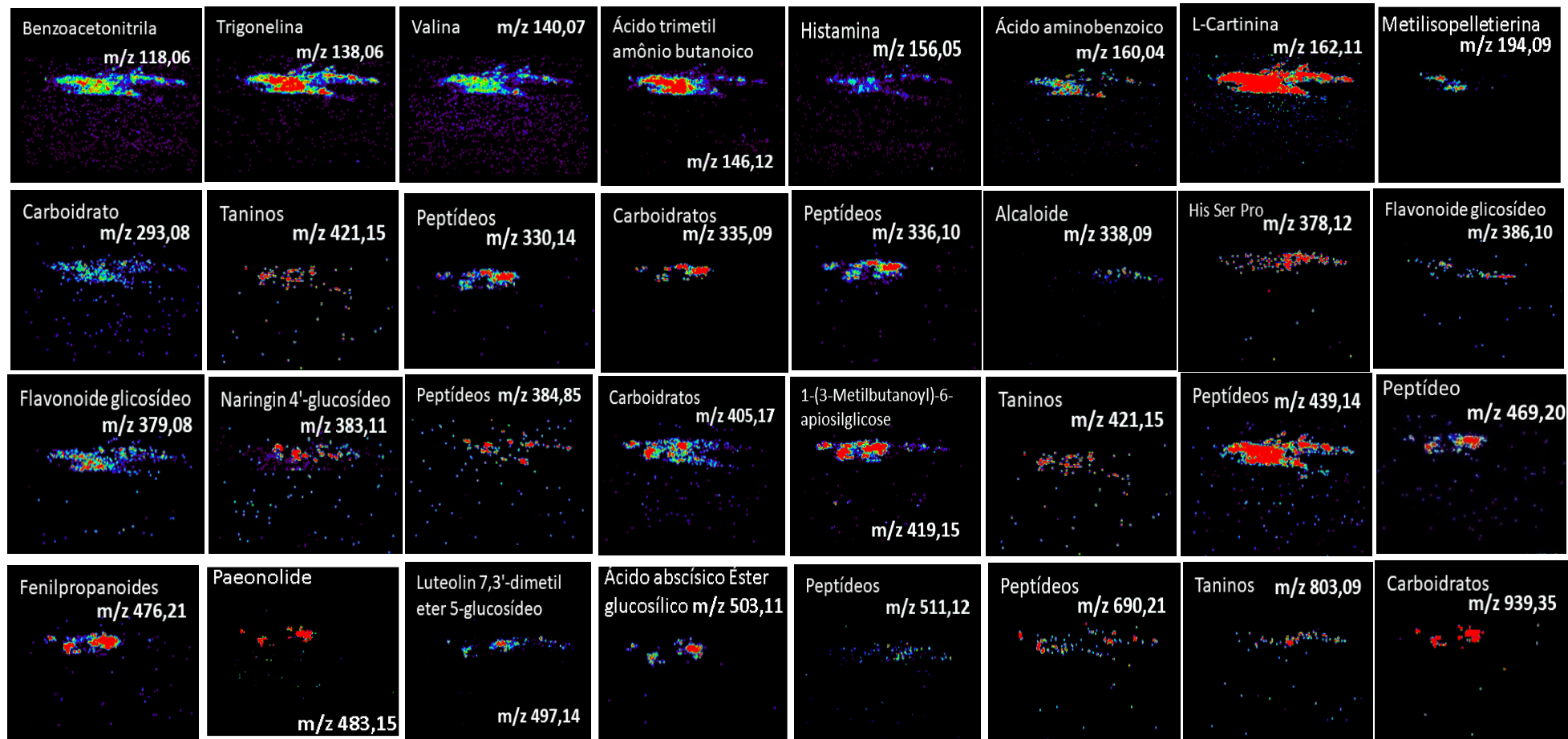


Figura 44 – Imagens de metabólitos específicos de (A) folha (F 0 μ M), (B) Raiz (R 0 μ M) e (C) ambos os órgãos (F e R) de manjeriço que foram inibidos pela presença de Cd



0 100%

Figura 45 – Imagens de metabólitos biomarcadores de Cd em raiz de manjericão

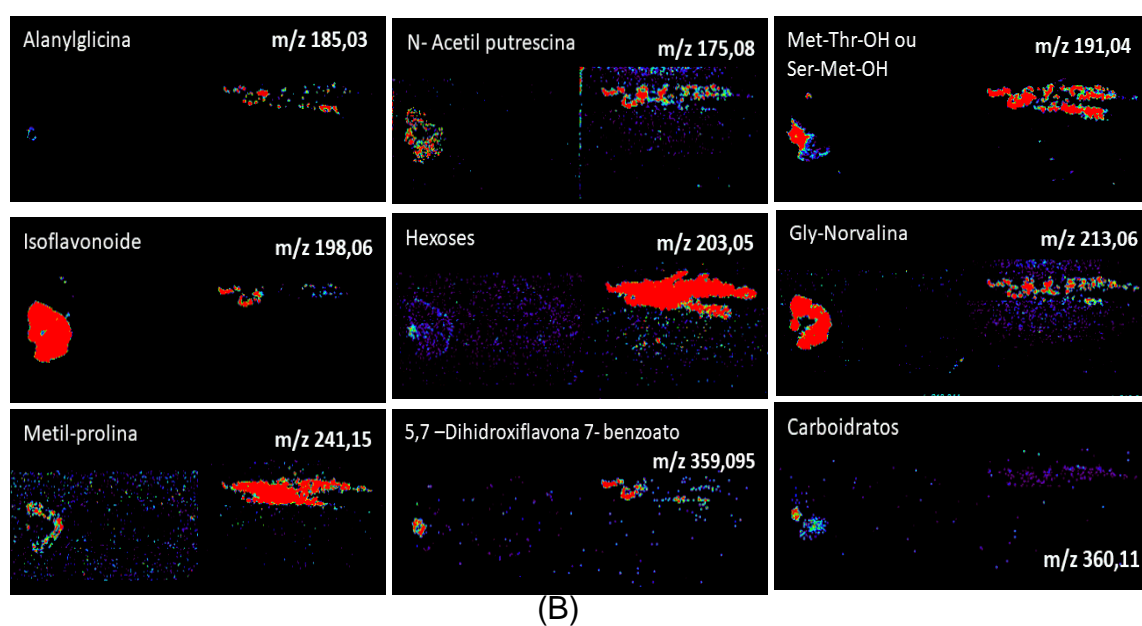
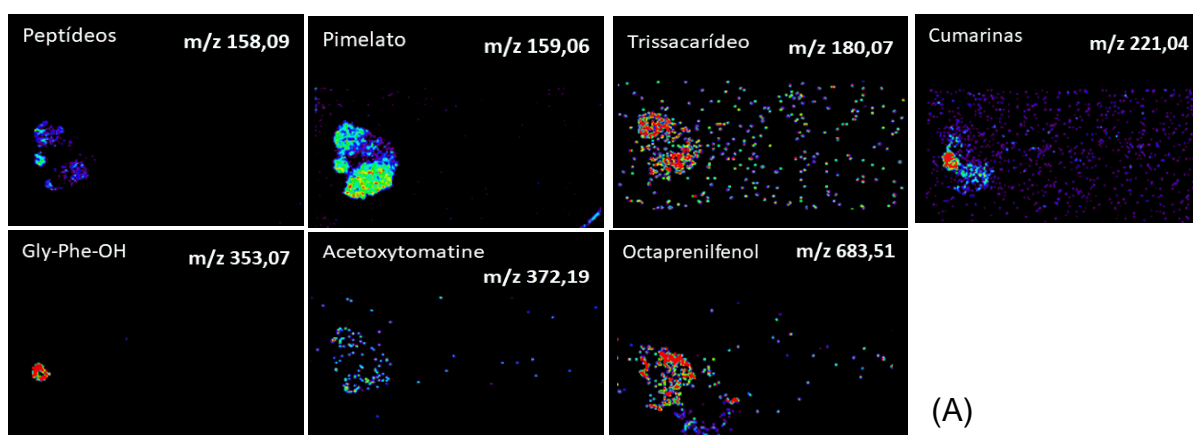


Figura 46 – Imagens de metabólitos biomarcadores de Cd somente na folha (A) e em ambos os órgãos (folha e raiz) (B) de manjericão

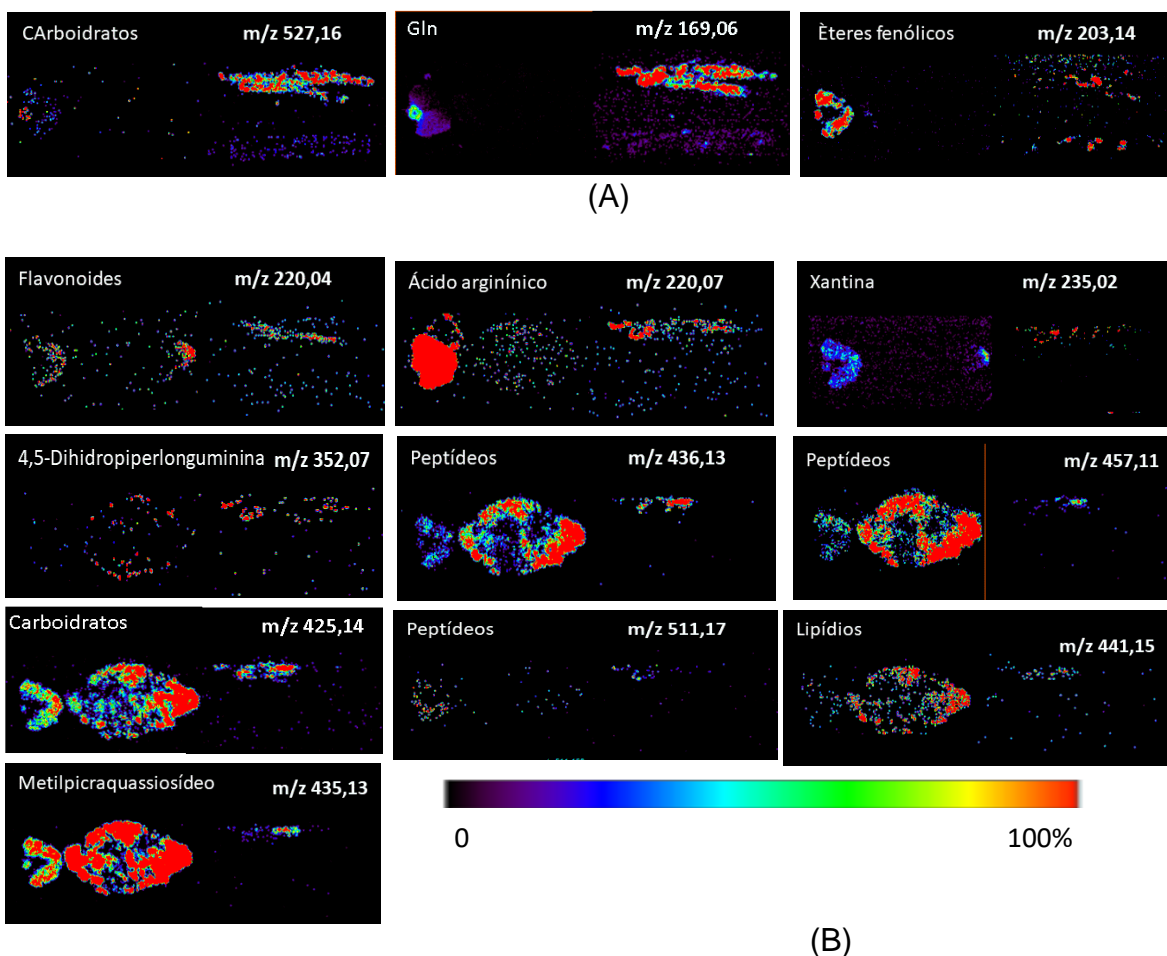
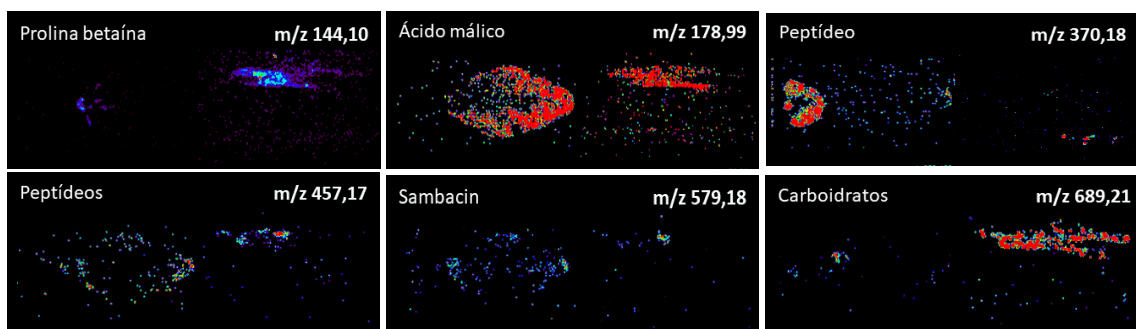


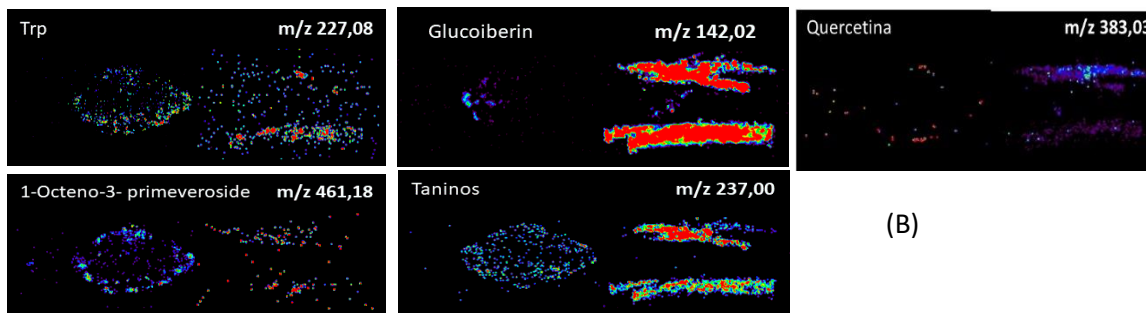
Figura 47 – Imagens de metabólitos (A) de raiz com acumulação em folha exposta a Cd; (B) de folha com acumulação em raiz exposta a Cd

Neste trabalho, são propostos 24, 20 e 8 potenciais biomarcadores de Cd em folhas, raiz e ambos os órgãos, respectivamente. As estruturas químicas destes compostos são apresentadas nas Figuras 49 a 51 e podem contribuir na elucidação dos efeitos metabólicos do Cd. Importante ressaltar que metabólitos identificados no nível 3 também indicaram candidatos a biomarcadores para a intoxicação com Cd^{II}.

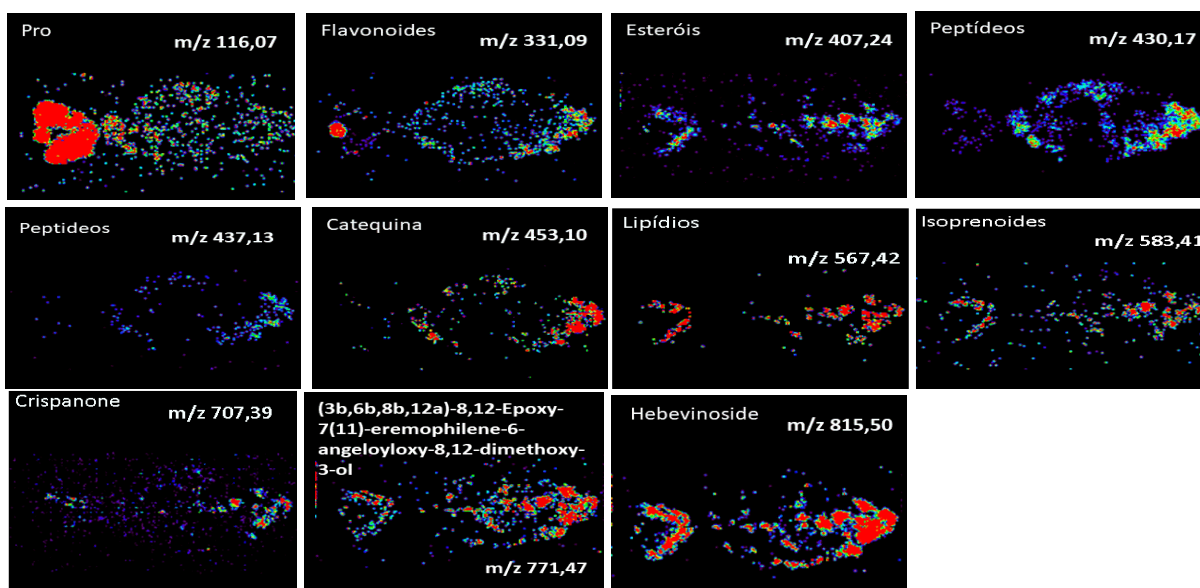
As auxinas são fitohormônios que aumentam atividades enzimáticas e reduzem conteúdo de peróxidos em plantas tratadas com Cd. Como exemplo, estudos de tolerância à toxicidade deste elemento mostraram a redução da concentração de Cd em *H. vulgare* e aumento da acumulação em raízes refletindo na diminuição da translocação do metal tóxico para a parte aérea de *A. thaliana* (BALI et al., 2018).



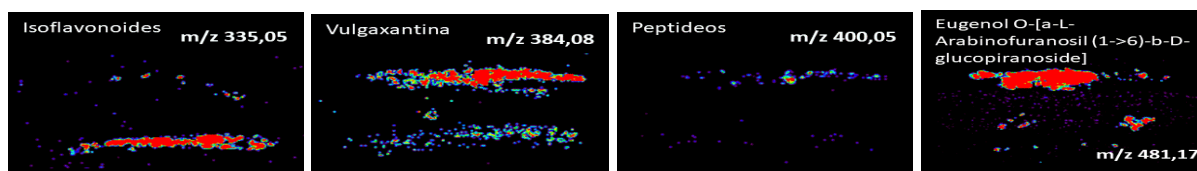
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 48 – Imagens de metabólitos com relação (A) antagônica na acumulação nos tecidos vegetais;(B) inibitória em folha; (C) inibitória, na distribuição espacial e acumulação em folha; (D) inibitória e de acumulação em raiz

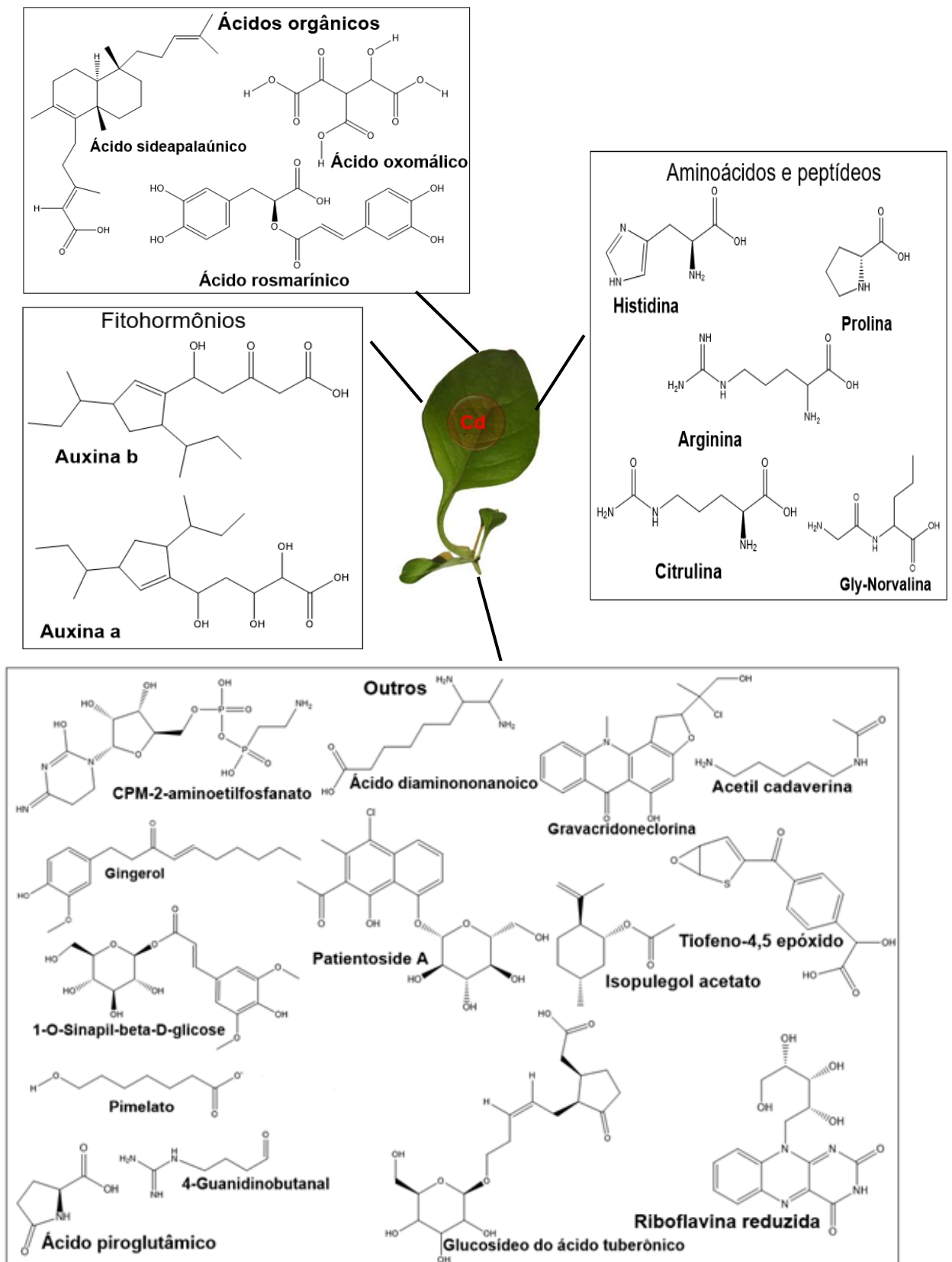


Figura 49 – Potenciais biomarcadores de Cd em folha de manjericão. Todos os metabólitos foram detectados por DESI-MSI e apresentaram imagens com aumento da acumulação ou presença somente em plantas contaminadas.

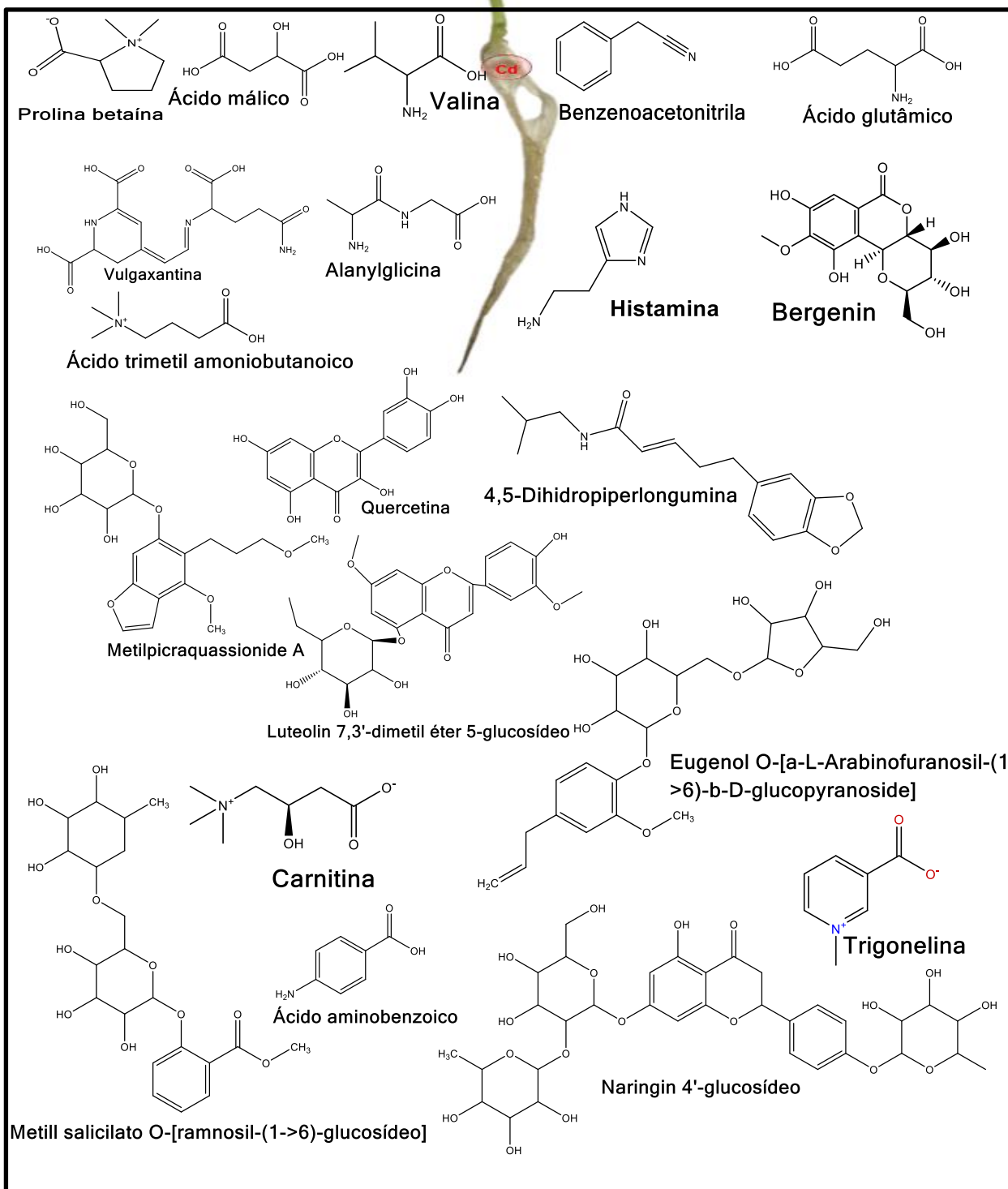


Figura 50 – Potenciais biomarcadores de Cd em raiz de manjericão. Todos os metabólitos foram detectados por DESI-MSI e apresentaram imagens com aumento da acumulação ou presença somente em plantas contaminadas.

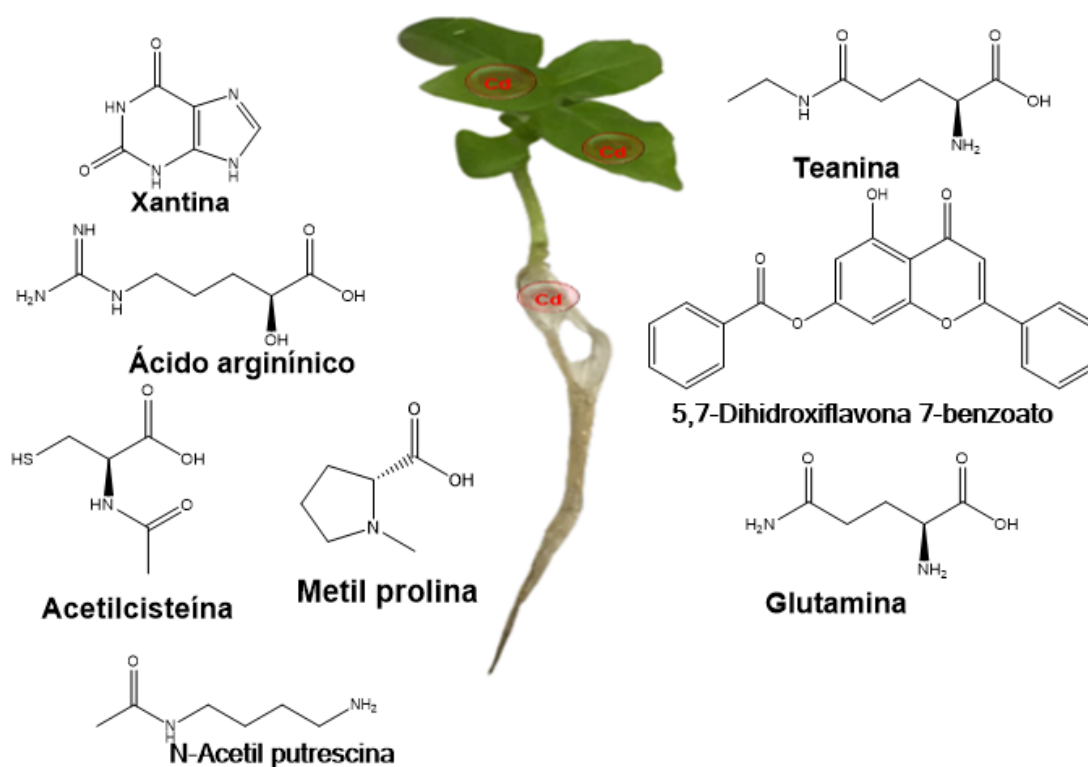


Figura 51 – Potenciais biomarcadores de Cd em folha e raiz de manjericão. Todos os metabólitos foram detectados por DESI-MSI e apresentaram imagens com aumento da acumulação ou presença somente em plantas contaminadas.

Interessante que o ácido rosmarínico, característico do manjericão (HILTUNEN; HOLM, 2006), mostrou-se como potencial biomarcador de Cd nas folhas. Os ácidos orgânicos são precursores de muitos outros compostos e podem formar complexos organometálicos estáveis com Cd^{II} , como exemplo, o ácido cítrico, málico e ácidos carboxílicos. A solubilidade destes complexos facilita a absorção do metal tóxico pelas raízes da planta (SIDHU; BALI; BHARDWAJ, 2019). Contudo, os mecanismos mediados pelos ácidos orgânicos para a translocação de Cd das raízes para os tecidos da parte aérea não estão bem esclarecidos.

Os aminoácidos (Pro, Asp, Ser e Gln), aminas (poliaminas e glicina betaína), carboidratos solúveis e amino-N ácido butírico (GABA) são considerados osmoprotetivos. Estudos relatam que assim como a GSH, a Pro é um composto que reduz o estresse oxidativo promovido pelo Cd, promovendo a atividade de enzimas antioxidantes (ABDELLY et al., 2015; XU; YIN; LI, 2009). Assim como a Pro, concentração celular de outros aminoácidos como Arg, Leu, Val, Ser e Gly também

aumentam em resposta ao estresse metálico nas plantas (PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018) e podem interferir em outras vias metabólicas. A Arg e Glu, por exemplo, estão envolvidos na síntese das poliaminas e GSH, respectivamente.

Os compostos fenólicos, poliaminas (putrescina) e flavonoides agem diretamente contra as ROS nas plantas, sendo que os primeiros são antioxidantes e o terceiro também age como sinalizador do estresse abiótico por metais tóxicos (PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018). Como exemplo, as xantofilas, pigmentos amarelos que formam o grupo dos carotenoides, agem na fotoproteção celular de espécies vegetais (PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018). Assim como outras classes de compostos orgânicos, os flavonoides incluem uma ampla família de metabólitos secundários e, portanto, podem provocar muitos impactos em diferentes rotas metabólicas dos vegetais.

A integração de dados da metabolômica com outros campos “ômicos”, como genômica, transcriptômica e proteômica, é um pré-requisito para elucidar a rede e as coordenadas das vias metabólicas. A identificação de metabólitos biomarcadores pode ser útil na compreensão dos fatores regulatórios que perturbam o metabolismo vegetal sob várias condições de estresse abiótico, como também no desenvolvimento de estratégias de melhoramento da tolerância ao estresse em cultivos diversos (PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018).

Os resultados obtidos nesta pesquisa mostram como a análise por DESI-MSI é uma ferramenta poderosa para compreender o metaboloma das plantas. As imagens obtidas para os metabólitos que desempenham papéis vitais no desenvolvimento e/ou mecanismo de defesa do manjeriço exposto ao Cd podem ajudar na elucidação do perfil metabólico de plantas. Os resultados também encorajam estudos adicionais para identificação dos compostos classificados nos níveis 3 e 4, análise de uma planta inteira para ilustrar a dinâmica dos metabólitos, bem como a aplicação de ferramentas quimiométricas para o tratamento das imagens hiperespectrais a fim de discriminar as diferentes amostras e metabólitos.

Vale ressaltar que este estudo também representa uma investigação pioneira sobre o papel de alguns metabólitos “chave” no mecanismo de tolerância ao Cd. Estas informações servem de motivação para pesquisas futuras com outras espécies vegetais e apresentam contribuições importantes para estudos ambientais e de saúde pública envolvendo exposição de plantas a diferentes metais tóxicos.

6 CONCLUSÃO

O procedimento MUS desenvolvido e validado neste trabalho empregou uma solução de HNO_3 2% v v⁻¹ e 100 μL H_2O_2 . Sob estas condições experimentais, os parâmetros foram adequados para análise multielementar por ICP-MS para 11 elementos, exceto para Al e Ca. Além disso, a acidez residual foi inferior a 0,06 mol L⁻¹ e uma menor quantidade de resíduo foi gerada, de acordo com os princípios da química verde.

O acúmulo de Cd ocorre preferencialmente nas raízes com translocação para a parte aérea, causando sérios danos às plantas. Correlações específicas entre pares de elementos demonstraram que o Cd interferiu na distribuição e acúmulo de elementos essenciais e não essenciais nos órgãos do manjericão, sugerindo que o Cd compromete funções vitais do desenvolvimento vegetal.

A análise quimiométrica por PCA mostrou-se uma ferramenta eficiente para avaliação ionômica de plantas expostas a metais tóxicos. As folhas de manjericão tratadas com alta concentração de Cd foram discriminadas pelas contribuições de Li, Be e Ca. As raízes acumularam a grande maioria dos elementos (Ba, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Sr e Zn), provando que este órgão é fundamental para a regulação de elementos macro e micronutrientes em plantas de manjericão.

A técnica PS-MS demonstrou sensibilidade, seletividade, rapidez, simplicidade e baixo custo para analisar fitoquelatinas e seus derivados, incluindo complexos com Cd. Os resultados também indicaram a presença de hGSH nas raízes do manjericão e que a exposição ao Cd aumentou o sinal de todos os compostos, exceto a GSH. Por outro lado, o tempo de cultivo (7 e 14 dias) mostrou-se como parâmetro importante para avaliar diferentes peptídeos bioindicadores de Cd, indicando que no menor tempo são formados prioritariamente os complexos mais simples (Cys-Cd-Cys e GSH-Cd).

As imagens obtidas por DESI-MSI mostraram-se poderosas ferramentas para análise *untarget* em folhas e raiz de manjericão, pois foram identificados potenciais biomarcadores de Cd em folhas e raízes. A análise direta de folhas forneceu um maior número de imagens quando comparado ao *imprint*, elucidando uma distribuição real dos metabólitos no órgão, sendo, portanto, indicado para análises com esta finalidade.

Além disso, distintos compostos inibidos ou acumulados nos órgãos vegetais comprovaram os distúrbios causados pelo metal tóxico no metaboloma da planta.

Portanto, a avaliação ionômica e metabolômica nos órgãos vegetais do manjeriço revelaram novas e importantes contribuições dos efeitos de absorção e translocação do Cd para a parte aérea. Estas informações podem ajudar na compreensão dos mecanismos de tolerância das plantas e motivar outros estudos em outras espécies vegetais sob estresse abiótico induzido por metais tóxicos.

7 REFERÊNCIAS

- ABDELLY, C. *et al.* Diversity , distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. **Annals of Botany**, v. 115, p. 433–447, 2015. DOI: 10.1093/aob/mcu239.
- ABORODE, F. A. *et al.* The importance of glutathione and phytochelatins on the selenite and arsenate detoxification in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 49, p. 150–161, 2016. DOI: 10.1016/j.jes.2016.08.009.
- AHMAD, J.; *et al.* Role of Phytochelatins in Cadmium Stress Tolerance in Plants. *In: Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants*. Elsevier Inc., 2019. p. 185–212. DOI: 10.1016/b978-0-12-814864-8.00008-5.
- AKHTER, M. F.; MCGARVEY, B.; MACFIE, S. M. Reduced translocation of cadmium from roots is associated with increased production of phytochelatins and their precursors. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 18, p. 1821–1829, 2012. DOI: 10.1016/j.jplph.2012.07.011.
- ALAMO-NOLE, L.; SU, Y. F. Translocation of cadmium in *Ocimum basilicum* at low concentration of CdSSe nanoparticles. **Applied Materials Today**, v. 9, p. 314–318, 2017. DOI: 10.1016/j.apmt.2017.08.014.
- ALBRECHT, U. *et al.* D. Rootstock effects on metabolite composition in leaves and roots of young navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) and pummelo (*C. grandis* L. Osbeck). **Trees**. v. 33, p. 243–265, 2019. DOI: 10.1007/s00468-018-1773-1.
- AMIR, R. *et al.* **Plant Signaling Molecules and Cadmium Stress Tolerance**: Elsevier Inc., 2019. DOI: 10.1016/b978-0-12-815794-7.00014-x.
- ANDERSEN, O. Chelation of cadmium. **Environmental Health Perspectives**, v. VOL. 54, p. 249–266, 1983. DOI: 10.1289/ehp.8454249.
- ASHRAF, M. A. *et al.* Dynamic Proline Metabolism: Importance and Regulation in Water-Limited Environments. *In: Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress*: Elsevier Inc., 2018. p. 323–336. DOI: 10.1016/B978-0-12-812689-9.00016-9.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **Metais: gerenciamento da toxicidade**. Editora Atheneu InterToxs., 2003
- BALI, A. S. *et al.* Mitigating Cadmium Toxicity in Plants by Phytohormones. Cadmium toxicity and tolerance in plants. *In: Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants: From Physiology to Remediation*. Elsevier Inc., 2018. p. 375–396. DOI: 10.1016/B978-0-12-814864-8.00015-
- BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S.. Electrospray Ionization Mass Spectrometry : A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, 2012. DOI: 10.1155/2012/282574.
- BARBOSA, J. T. P.; SANTOS, C. M. M.; PERALVA, V. N.; FLORES, E. M. M.; KORN, M.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G. A. Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products. **Food Chemistry**, v. 175, p. 212–217, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.092.
- BAXTER, I. Ionomics: studying the social network of mineral nutrients. **Current**

Opinion in Plant Biology, v. 12, n. 3, p. 381–386, 2009. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.05.002.

BENDICHO, C *et al.* **Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry** *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, Elsevier, , 2012. DOI: 10.1016/j.trac.2011.06.018.

BESSA, C. D. P. B *et al.* Identification of alkaloids from *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae) using CGC-MS and ambient ionization mass spectrometry (PS-MS and LS-MS). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 5, p. 819–830, 2017. DOI: 10.21577/0103-5053.20160234.

BIZZI, C. A. *et al.* Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 32, p. 1448–1466, 2017. DOI: 10.1039/c7ja00108h.

CABALEIRO, N.; DE LA CALLE, I. Miniaturized Alternatives to Conventional Sample Preparation Techniques for Solid Samples. *In: Miniaturization in Sample Preparation*. De Gruyter Open Ltd, 2014. p. 308–415. DOI: 10.2478/9783110410181.7.

CABALLO-LÓPEZ, A.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Determination of cadmium in leaves by ultrasound-assisted extraction prior to hydride generation, pervaporation and atomic absorption detection. **Talanta**, v. 71, n. 5, p. 2074–2079, 2007. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.09.024.

CAO, Z. Y.; SUN, L. H.; MOU, R. X.; ZHOU, R.; ZHU, Z. W.; CHEN, M. X. A novel method for the simultaneous analysis of seven biothiols in rice (*Oryza sativa* L.) using hydrophilic interaction chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 976–977, p. 19–26, 2015. DOI: 10.1016/J.JCHROMB.2014.11.007.

CAPELO, J. L.; MADURO, C.; VILHENA, C. Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid-liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. An overview. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, n. 3, p. 225–232, 2005. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2003.10.010.

CHASSAIGNE, H.; VACCHINA, V.; KUTCHAN, T. M.; ZENK, M. H. Identification of phytochelatin-related peptides in maize seedlings exposed to cadmium and obtained enzymatically in vitro. **Phytochemistry**, v. 56, n. 7, p. 657–668, 2001. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)00489-1.

CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1707–1719, 2006. DOI: 10.1016/j.biochi.2006.07.003.

COBBETT, C. S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. **Plant Physiology**, v. 123, n. 3, p. 825–832, 2000. DOI: 10.1104/pp.123.3.825.

COLVILLE, L.; *et al.* The distribution of glutathione and homoglutathione in leaf, root and seed tissue of 73 species across the three sub-families of the Leguminosae. **Phytochemistry**, v. 115, n. 1, p. 175–183, 2015. DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.01.011.

COOKS, R. G. *et al.* **Ambient mass spectrometry** *Science*, 2006. DOI: 10.1126/science.1119426.

- DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R. Studies on cadmium toxicity in plants: A review. **Environmental Pollution**, v. 98, n. 1, p. 29–36, 1997. DOI: 10.1016/S0269-7491(97)00110-3.
- DE LA CALLE, I. *et al.* Analytical evaluation of a cup-horn sonoreactor used for ultrasound-assisted extraction of trace metals from troublesome matrices. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 9, p. 874–883, 2009. DOI: 10.1016/J.SAB.2009.07.004.
- DE MORAES PONTES, J. G. *et al.* Mass spectrometry imaging as a potential technique for diagnostic of Huanglongbing disease using fast and simple sample preparation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-70385-4.
- DE SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 25–35, 2005. DOI: 10.1016/j.aca.2005.07.043.
- DONG, J.; WU, F.; ZHANG, G. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). **Chemosphere**, v. 64, n. 10, p. 1659–1666, 2006. DOI: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.01.030.
- DONG, Y. *et al.* Sample preparation for mass spectrometry imaging of plant tissues: A review. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. FEB2016, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.00060.
- DU, F. *et al.* Ionomic responses of rice plants to the stresses of different arsenic species in hydroponics. **Chemosphere**, v. 243, p. 125398, 2020. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125398.
- ESPY, R. D.; MULIADI, A. R.; OUYANG, Z.; COOKS, R. Graham. Spray mechanism in paper spray ionization. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 325–327, p. 167–171, 2012. DOI: 10.1016/j.ijms.2012.06.017.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cadmium in food. **EFSA Journal**, v. 980, p. 1–139, 2009.
- FENG, X. *et al.* Ionomic and transcriptomic analysis provides new insight into the distribution and transport of cadmium and arsenic in rice. **Journal of Hazardous Materials**, v. 331, p. 246–256, 2017. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.02.041.
- FILGUEIRAS, A. V. *et al.* Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 53, n. 2, p. 433–441, 2000. DOI: 10.1016/S0039-9140(00)00510-5.
- FREITAS, J. R. L.; VENDRAMINI, P. H.; AUGUSTI, R.; EBERLIN, M. N. Assessing the Spatial Distribution of Key Flavonoids in. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 7, p. 1437–1446, 2019.
- GARCÍA-SEVILLANO, M. Á.; GARCÍA-BARRERA, T.; GÓMEZ-ARIZA, J. L. Environmental metabolomics: Biological markers for metal toxicity. **Electrophoresis**, v. 36, n. 18, p. 2348–2365, 2015. DOI: 10.1002/elps.201500052.
- GARGALLO-GARRIGA, A. *et al.* Opposite metabolic responses of shoots and roots

- to drought. **Scientific Reports**, v. 4, p. 6829, 2014. DOI: 10.1038/srep06829.
- GERBIG, S *et al.* Spatially resolved investigation of systemic and contact pesticides in plant material by desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging (DESI-MSI). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 24, p. 7379–7389, 2015. DOI: 10.1007/s00216-015-8900-2.
- GHAREBAGHI, A.; ALBORZI HAGHIGHI, M.; AROUIEE, H. Effect of cadmium on seed germination and earlier basil (*Ocimum Basilicum* L. and *Ocimum Basilicum* Var. *Purpurescens*) seedling growth. **Trakia Journal of Science**, v. 15, n. 1, p. 1–4, 2017. DOI: 10.15547/tjs.2017.01.001.
- GHORBANI, S. Signaling Peptides in Plants. **Cell & Developmental Biology**, v. 03, n. 02, p. 98–101, 2014. DOI: 10.4172/2168-9296.1000141.
- GINÉ, M. F. **Espectrometria de Massas com fonte de Plasma (ICP-MS)**CPG/CENA-USP, 1999.
- HASANUZZAMAN, M.; BHUYAN, M. H. M. B.; NAHAR, K.; HOSSAIN, M. S.; AL MAHMUD, J.; HOSSEN, M. S.; MASUD, A.A. C.; MOUMITA; FUJITA, M. Potassium: A vital regulator of plant responses and tolerance to abiotic stresses. **Agronomy**, v. 8, n. 3, 2018. DOI: 10.3390/agronomy8030031.
- HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; ANEE, T. I.; FUJITA, M. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 2, p. 249–268, 2017. DOI: 10.1007/s12298-017-0422-2.
- HAYAT, M. T.; NAUMAN, M.; NAZIR, N. Environmental Hazards of Cadmium: Past, Present, and Future. *In*: **Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants**. Academic Press, 2019. p. 163–183. DOI: 10.1016/B978-0-12-814864-8.00007-3.
- HAYAT, M. T *et al.* N. Chapter 7 - Environmental Hazards of Cadmium: Past, Present, and Future. *In*: HASANUZZAMAN, M.; PRASAD, M. N. V.; FUJITA, M. (org.). **Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants**. Academic Press, 2019. p. 163–183. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00007-3>.
- HILDEBRANDT, T. M. *et al.* Amino Acid Catabolism in Plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 11, p. 1563–1579, 2015. DOI: 10.1016/j.molp.2015.09.005.
- HILTUNEN, R.; HOLM, Y. **BASIL The Genus *Ocimum***. Harwood Academic publishers, 2006.
- HOAGLAND, M. B. **Nucleic acids and proteins**. ACADEMIC PRESS, 1959. v. 201 DOI: 10.1038/scientificamerican1259-55.
- HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3^a ed. Wiley, 2007. v. 1796 DOI: 10.1007/978-1-4939-7877-9_17.
- HOSSAIN, M. A *et al.* **Glutathione in plant growth, development, and stress tolerance**. Springer. DOI: 10.1007/978-3-319-66682-2.
- HUANG, M. Z. *et al.* Ambient ionization mass spectrometry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 702, n. 1, p. 1–15, 2011. DOI: 10.1016/j.aca.2011.06.017.
- IFA, D. R.; WU, C.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G.. Desorption electrospray ionization and other ambient ionization methods: Current progress and preview. **Analyst**, v. 135, n. 4, p. 669–681, 2010. DOI: 10.1039/b925257f.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008Brazil, 2018.

ISMAEL, M. A. *et al.* Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. **Metallomics**, v. 11, n. 2, p. 255–277, 2019. DOI: 10.1039/c8mt00247a.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H.. **Trace elements in soils and plants**. 3rd ed . CRC Press. 2001

KNEER, R.; ZENK, M. H. Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. **Phytochemistry**, v. 31, n. 8, p. 2663–2667, 1992. DOI: 10.1016/0031-9422(92)83607-Z.

KOBAYASHI, T.; NOZOYE, T.; NISHIZAWA, N. K. Iron transport and its regulation in plants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 133, n. October 2018, p. 11–20, 2019. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.439.

KRÄMER, U. Metal Hyperaccumulation in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 517–534, 2010. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042809-112156.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras. Fundamentos sobre o preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. EditSBQ, São Paulo, 2016

KUMAR, V. *et al.* Amino acids distribution in economical important plants: a review. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 2, p. 197–207, 2019. DOI: 10.1016/j.biori.2019.06.004.

KUMAR, V *et al.* Analysis of organic acids of tricarboxylic acid cycle in plants using GC-MS, and system modeling. **Journal of Analytical Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2017. DOI: 10.1186/s40543-017-0129-6.

KÜPPER, H.; ANDRESEN, E. Mechanisms of metal toxicity in plants. **Metallomics**, v. 8, n. 3, p. 269–285, 2016. DOI: 10.1039/c5mt00244c.

KÜPPER, H.; KÜPPER, F.; SPILLER, M. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 2, p. 259–266, 1996. DOI: 10.1093/jxb/47.2.259.

KURFÜRST, Ulrich. **Solid Sample Analysis Direct and Slurry Sampling using GF-AAS and ETV-ICP**. Fulda, Germany, Springer, 1998

LAVILLA, I.; COSTAS, M.; GIL, S.; CORDERÍ, S.; SÁNCHEZ, G.; BENDICHO, C. Simplified and miniaturized procedure based on ultrasound-assisted cytosol preparation for the determination of Cd and Cu bound to metallothioneins in mussel tissue by ICP-MS. **Talanta**, v. 93, p. 111–116, 2012. DOI:10.1016/j.talanta.2012.01.056.

LEE, Y. J.; PERDIAN, D. C.; SONG, Z.; YEUNG, E. S.; NIKOLAU, B. J. **Use of mass spectrometry for imaging metabolites in plants**, **Plant Journal**, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.04899.x.

LEŠKOVÁ, A.; GIEHL, R. F. H.; HARTMANN, A.; FARGAŠOVÁ, A.; VON WIRÉN, N. Heavy metals induce iron deficiency responses at different hierarchic and regulatory levels. **Plant Physiology**, v. 174, n. 3, p. 1648–1668, 2017. DOI: 10.1104/pp.16.01916.

- LI, J.; LU, H.; LIU, J.; HONG, H.; YAN, C. The influence of flavonoid amendment on the absorption of cadmium in *Avicennia marina* roots. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 1–6, 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.05.004.
- LI, X.; ZHOU, Q.; SUN, X.; REN, W. Effects of cadmium on uptake and translocation of nutrient elements in different welsh onion (*Allium fistulosum* L.) cultivars. **Food Chemistry**, v. 194, p. 101–110, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.114.
- LIN, C. H.; LIOU, Y. W.. Design and construction of paper-spray ionization/mass spectrometry. *In: Ambient Ionization Mass Spectrometry in Life Sciences*. Elsevier, 2020. p. 207–239. DOI: 10.1016/B978-0-12-817220-9.00007-2.
- LIU, Z.; HE, X.; CHEN, W. Effects of cadmium hyperaccumulation on the concentrations of four trace elements in *Lonicera japonica* Thunb. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 4, p. 698–705, 2011. DOI: 10.1007/s10646-011-0609-1.
- LOPES JÚNIOR, C. A.; MAZZAFERA, P.; ARRUDA, M. A. Z. A comparative ionic approach focusing on cadmium effects in sunflowers (*Helianthus annuus* L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 107, p. 180–186, 2014. DOI: 10.1016/J.ENVEXPBOT.2014.06.002.
- MAKRI, O.; KINTZIOS, S.. *Ocimum* sp . (Basil): Botany , Cultivation , Pharmaceutical Properties , and Biotechnology Access details : Access Details : [subscription number 772810551]. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 13, n. 3, p. 123–150, 2008. DOI: 10.1300/J044v13n03.
- MAKSIMOVIĆ, I *et al.* Steady presence of cadmium and nickel affects root anatomy, accumulation and distribution of essential ions in maize seedlings. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 3, p. 589–592, 2007. DOI: 10.1007/s10535-007-0129-2.
- MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3^a ed. Elsevier, 2012 DOI: 10.1007/s13142-013-0222-3.
- MCBRIDE, E. M *et al.* Paper spray ionization: Applications and perspectives. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 722–730, 2019. DOI: 10.1016/j.trac.2019.06.028.
- MIERZIAK, J.; KOSTYN, K. KULMA, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16240–16265, 2014. DOI: 10.3390/molecules191016240.
- MORAES, D. P.; BIZZI, C. A.; NÓBREGA, J. A.; FLORES, E. M. M.; NOGUEIRA, A. R.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F. Preparo de amostras assitido por radiação micro-ondas. *In: Métodos de Preparo de Amostras para Aournal of Chemical Information and Modelingnálise Elementar*. 1^a ed., 2016.
- MOU, R. X.; CAO, Z. Y.; LIN, X. Y.; WU, L.; CAO, Z. Z.; ZHU, Z. W.; CHEN, M. X. Characterization of the phytochelatin 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. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 30, n. 16, p. 1891–1900, 2016. DOI: 10.1002/rcm.7669.
- MURPHY, E.; SMITH, S.; DE SMETA, I. Small signaling peptides in *Arabidopsis* development: How cells communicate over a short distance. **Plant Cell**, v. 24, n. 8, p. 3198–3217, 2012. DOI: 10.1105/tpc.112.099010.

- NAVAZA, A. P. *et al.* Study of phytochelatins and other related thiols as complexing biomolecules of As and Cd in wild type and genetically modified Brassica juncea plants. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 41, n. 3, p. 323–331, 2006. DOI: 10.1002/jms.992.
- OVEN, M.; RAITH, K.; NEUBERT, R. H. H.; KUTCHAN, T. M.; ZENK, M. H. Homophytochelatins are synthesized in response to cadmium in azuki beans. **Plant Physiology**, v. 126, n. 3, p. 1275–1280, 2001. DOI: 10.1104/pp.126.3.1275.
- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, 2016. DOI: 10.1017/jns.2016.41.
- PARIDA, A. K.; PANDA, A.; RANGANI, J. Metabolomics-Guided Elucidation of Abiotic Stress Tolerance Mechanisms in Plants. *In: Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress*. Elsevier Inc., 2018. p. 89–131. DOI: 10.1016/B978-0-12-812689-9.00005-4.
- PEREIRA, I. *et al.* Rapid screening of agrochemicals by paper spray ionization and leaf spray mass spectrometry: which technique is more appropriate? **Analytical Methods**, v. 8, n. 31, p. 6023–6029, 2016. DOI: 10.1039/c6ay01154c.
- PEREIRA, I. *et al.* An Interdisciplinary Approach to Evaluate the Mobility and Toxicity of Cadmium in a Soil–Plant System. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 46, n. 11, 2018. DOI: 10.1002/clen.201800134.
- PERFUS-BARBEOCH, L.; LEONHARDT, N.; VAVASSEUR, A.; FORESTIER, C. Heavy metal toxicity: Cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. **Plant Journal**, v. 32, n. 4, p. 539–548, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2002.01442.x.
- POŁEĆ-PAWLAK, K. *et al.* Cadmium speciation in Arabidopsis thaliana as a strategy to study metal accumulation system in plants. **Analytica Chimica Acta**, v. 540, n. 1, p. 61–70, 2005. DOI: 10.1016/j.aca.2004.10.048.
- PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 644–653, 2004. DOI: 10.1016/j.trac.2004.06.006.
- PRINTZ, B.; LUTTS, S.; HAUSMAN, J. F.; SERGEANT, K. Copper trafficking in plants and its implication on cell wall dynamics. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. May, p. 1–16, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.00601.
- REMELLI, M.; NURCHI, V. M.; LACHOWICZ, J.; MEDICI, S.; ZORODDU, M. A.; PEANA, M. Competition between Cd^{II} and other divalent transition metal ions during complex formation with amino acids, peptides, and chelating agents. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 327–328, p. 55–69, 2016. DOI: 10.1016/j.ccr.2016.07.004.
- RIZWAN, M.; ALI, S.; ABBAS, T.; ZIA-UR-REHMAN, M.; HANNAN, F.; KELLER, C.; AL-WABEL, M.; OK, Y. S. Cadmium minimization in wheat: A critical review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 130, p. 43–53, 2016. DOI: 10.1016/J.ECOENV.2016.04.001.
- SALEK, R. M. *et al.* The role of reporting standards for metabolite annotation and identification in metabolomic studies. **GigaScience**, v. 2, n^o 13, 2013. DOI: 10.1186/2047-217X-2-13.
- SALT, D. E.; BAXTER, I.; LAHNER, B. Ionomics and the Study of the Plant Ionome.

Annual Review of Plant Biology, v. 59, n. 1, p. 709–733, 2008. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092942.

SEREGIN, I. V.; KOZHEVNIKOVA, A. D. Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium. **Russian Journal of Plant Physiology** v. 55, n. 1, p. 1–22, 2008. DOI: 10.1007/s11183-008-1001-8.

SGHAYAR, S. et al. Analysis of cadmium translocation, partitioning and tolerance in six barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars as a function of thiol metabolism. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 3, p. 311–320, 2015. DOI: 10.1007/s00374-014-0977-9.

SHAHZAD, B.; TANVEER, M.; HASSAN, W.; SHAH, A. N.; ANJUM, S. A.; CHEEMA, S. A.; ALI, I. Lithium toxicity in plants: Reasons, mechanisms and remediation possibilities – A review. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 107, p. 104–115, 2016. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.05.034.

SHARMA, A.; SHAHZAD, B.; REHMAN, A.; BHARDWAJ, R.; LANDI, M.; ZHENG, B. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 1–22, 2019. DOI: 10.3390/molecules24132452.

SHEEN, J.; ZHOU, L.; JANG, J. Sugars as signaling molecules. **Current Opinion in Plant Biology**, p. 410–419, 1999.

SHI, Y. Z. *et al.* Glucose alleviates cadmium toxicity by increasing cadmium fixation in root cell wall and sequestration into vacuole in *Arabidopsis*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 57, n. 10, p. 830–837, 2015. DOI: 10.1111/jipb.12312.

SIDDIQUI, H.; SAMI, F.; HAYAT, S. Glucose: Sweet or bitter effects in plants-a review on current and future perspective. **Carbohydrate Research**, v. 487, n. August 2019, p. 107884, 2020. DOI: 10.1016/j.carres.2019.107884.

SIDHU, G. P. S.; BALI, A. S.; BHARDWAJ, R. Role of Organic Acids in Mitigating Cadmium Toxicity in Plants. *In: Cadmium Tolerance in Plants*. Elsevier Inc., 2019. p. 255–279. DOI: 10.1016/b978-0-12-815794-7.00010-2.

SILVA, M. R. *et al.* Antioxidant Activity and Metabolomic Analysis of *Cagaitas* (*Eugenia dysenterica*) Using Paper Paper Spray Spray Mass Mass Spectrometry Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 5, p. 1034–1044, 2019. DOI: 10.21577/0103-5053.20190002.

SINGH, S.; *et al.* Heavy metal tolerance in plants: Role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1–36, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2015.01143.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª edição, 2009.

SKREBSKY, E. C. *et al.* Effect of cadmium on growth, micronutrient concentration, and δ -aminolevulinic acid dehydratase and acid phosphatase activities in plants of *Pfaffia glomerata*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 4, p. 285–294, 2008. DOI: 10.1590/s1677-04202008000400004.

SMEEKENS, S. Sugar-induced signal transduction in plants. **Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 51, p. 49–81, 2000.

SOLTI, Á *et al.* Cd affects the translocation of some metals either Fe-like or Ca-like

way in poplar. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 494–498, 2011. DOI: 10.1016/j.plaphy.2011.01.011.

SONG, Y.; JIN, L.; WANG, X. Cadmium absorption and transportation pathways in plants. **International Journal of Phytoremediation**, v. 19, n. 2, p. 133–141, 2017. DOI: 10.1080/15226514.2016.1207598.

SOUSA, Giselle V. **Mecanismos de tolerância e alterações metabólicas em plantas de linhaça dourada (linum usitatissimum L.) expostas e co-expostas a arsênio e selênio mecanismos de tolerância e alterações metabólicas em plantas de linhaça dourada (linum usitatissimum L.** UFMG, 2020.

SUN, X. *et al.* The responses of Arabidopsis thaliana to cadmium exposure explored via metabolite profiling. **Chemosphere**, v. 78, n. 7, p. 840–845, 2010. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.11.045.

TARANTINO, T. B.; *et al.* Microwave-Assisted Digestion Using Diluted Nitric Acid for Multi-element Determination in Rice by ICP OES and ICP-MS. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 4, p. 1007–1015, 2017. DOI: 10.1007/s12161-016-0658-4.

TEIXEIRA, L. *et al.* Fast determination of trace elements in organic fertilizers using a cup-horn reactor for ultrasound-assisted extraction and fast sequential flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 119, p. 232–239, 2014. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.11.018.

TELES, V. L. G. *et al.* Identification of Metabolites in Basil Leaves by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging after Cd Contamination. **ACS Agricultural Science & Technology**, v. 1, n. 1, p. 21–28, 2021. DOI: 10.1021/acsagscitech.0c00038.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 3, p. 364–372, 2009. a. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.05.001.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. **New Phytologist**, v. 181, p. 759–776, 2009. b.

VILLIERS, F. *et al.* Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches. **Proteomics**, v. 11, n. 9, p. 1650–1663, 2011. DOI: 10.1002/pmic.201000645.

WANG, M. *et al.* The critical role of potassium in plant stress response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 7370–7390, 2013. DOI: 10.3390/ijms14047370.

WATANABE, T. *et al.* The ionomic study of vegetable crops. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0160273.

XIAO, Y.; DENG, J.; YAO, Y.; FANG, L.; YANG, Y.; LUAN, T. Analytica Chimica Acta Recent advances of ambient mass spectrometry imaging for biological tissues : A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1117, p. 74–88, 2020. DOI: 10.1016/j.aca.2020.01.052.

XIE, Y.; HU, L.; DU, Z.; SUN, X.; AMOMBO, E.; FAN, J.; FU, J. Effects of cadmium exposure on growth and metabolic profile of bermudagrass [Cynodon dactylon (L.) Pers.]. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–20, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0115279.

XU, J.; YIN, H.; LI, X. Protective effects of proline against cadmium toxicity in

micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. **Plant Cell Reports**, v. 28, n. 2, p. 325–333, 2009. DOI: 10.1007/s00299-008-0643-5.

ZAGORCHEV, L.; SEAL, C. E.; KRANNER, I.; ODJAKOVA, M. A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 7405–7432, 2013. DOI: 10.3390/ijms14047405.

ZAHEDIFAR, M. *et al.* Heavy metals content and distribution in basil (*Ocimum basilicum* L.) as influenced by cadmium and different potassium sources. **International Journal of Phytoremediation**, v. 21, n. 5, p. 435–447, 2019. DOI: 10.1080/15226514.2018.1537253

ZENK, M. H. Heavy metal detoxification in higher plants - A review. **Gene**, v. 179, n. 1, p. 21–30, 1996. DOI: 10.1016/S0378-1119(96)00422-2.

ZHAI, Q. *et al.* Jasmonates. **Hormone Metabolism and Signaling in Plants**, p. 243–272, 2017. DOI: 10.1016/B978-0-12-811562-6.00007-4.

ZIEMBOWICZ, S.; KIDA, M.; KOSZELNIK, P. The photochemical formation of hydrogen peroxide. **Proceedings**, v. 2, 188, 2018. DOI: doi:10.3390/ecws-2-04957.

WEBB, M. The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium – Topics in Environmental Health, Vol. 2, **Elsevier/North-Holland Biomedical Press**, Amsterdam 1979.

APÊNDICE 1 - Cálculo e dados da % RTI

Tabela 1A – Comprimento da raiz e Índice de Tolerância da raiz (%) após cultivo em solução de Hoagland 5% suplementada com diferentes concentrações de Cd^{II}

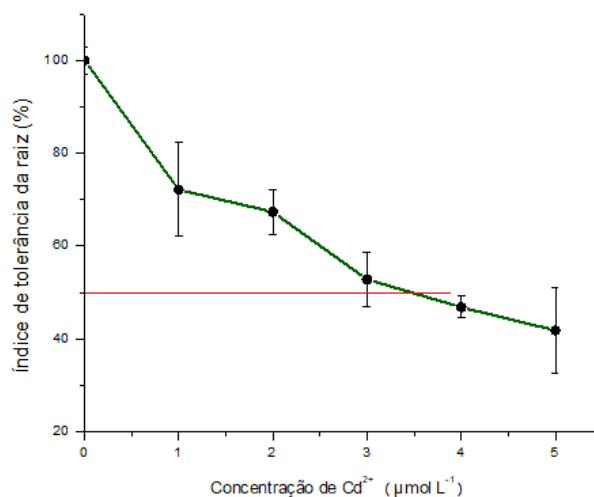
Concentração de Cd ^{II} no cultivo (µM)	Comprimento da raiz	ITR (%)
0	10,06 ± 4,95	100
1,0	7,26 ± 3,00	72,14 ± 10,09
2,0	6,50 ± 2,16	67,33 ± 4,85
3,0	5,31 ± 2,16	52,77 ± 5,81
4,0	4,71 ± 2,79	46,8 ± 2,32
5,0	4,20 ± 2,93	41,79 ± 9,24

Parameters

	Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
A1	0	0	--	--	0
A2	100	0	--	--	0
LOGx0	0,55129	0,03595	15,33628	6,02148E-4	0,15092
p	-0,87358	0,13057	-6,69048	0,00681	0,15092
span	100	0			
EC20	17,39708	4,87004			
EC50	3,55871	0,29456			
EC80	0,72796	0,15925			

Reduced Chi-sqr = 12,1513407207
 COD(R²) = 0,94681415282172
 Iterations Performed = 6
 Total Iterations in Session = 6
 Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.
 Some parameter values were fixed.
 Standard Error was scaled with square root of reduced Chi-Sqr.
 span, EC20, EC50, EC80 are derived parameter(s).
 Some input data points are missing.

(A)



(B)

Figura 1A – (A) Emprego da função *doseresponse* do software OriginPro 8.0 para cálculo do Índice de tolerância da raiz do manjericão (%) sob cultivo hidropônico em solução de Hoagland 5% suplementada com diferentes concentrações de Cd^{II} (B) Gráfico da %ITR

APÊNDICE 2 - Planejamento experimental do procedimento MUS

Tabela 2A – Tabela ANOVA para as respostas múltiplas para a concentração de Cd (RM_{Cd} , $mg\ kg^{-1}$) e multielementar (RM_{mult} , $mg\ kg^{-1}$) determinadas por ICP-MS

Fator	Contribuição (%)	RM_{Cd}					Contribuição (%)	RM_{mult}				
		SQ*	GL**	MQ***	F	p valor		SQ*	GL**	MQ***	F	p valor
Regressão		0,2417	4	0,0604	6,99	0,0192		0,111	3	0,037	4,37	0,0495
A – HNO ₃	55,7	0,1636	1	0,1636	18,91	0,0048	29,7	0,0506	1	0,056	5,97	0,0446
B – H ₂ O ₂	17,1	0,0502	1	0,0502	5,81	0,0526	19,8	0,0338	1	0,0338	3,99	0,086
C – Amplitude	3,29	0,0097	1	0,0097	1,12	0,3313	-	-	-	-	-	-
D – Tempo	2,29	0,0067	1	0,0067	0,745	0,4276	15,7	0,0267	1	0,0267	3,15	0,1193
AC – HNO ₃ e Amplitude	6,21	0,0183		0,0182	2,11	0,1967	-					
AB - HNO ₃ e H ₂ O ₂	0,18	-		-			-					
AD – HNO ₃ e tempo	2,70	-		-			-					
Resíduo		0,0519	6	0,0087				0,0593	7	0,0085		
Erro Puro		0,0148	2	0,0074				0,0326	2	0,0163		
Falta de Ajuste		0,0374	4	0,0093	1,25	0,4891		0,0268	5	0,0054	0,3286	0,8634
Total		0,2936	10					0,1704	10			

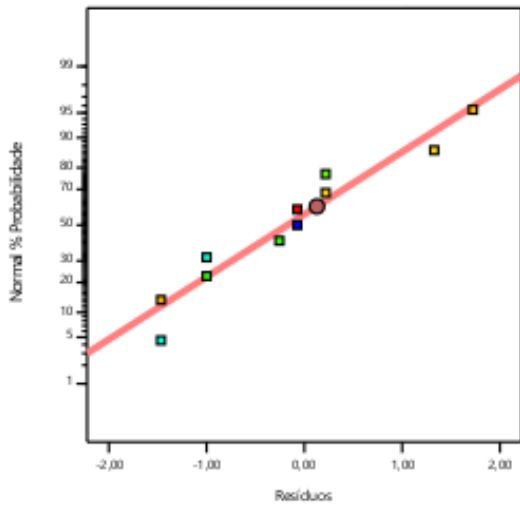
*SQ (Soma Quadrática)

**GL (grau de liberdade)

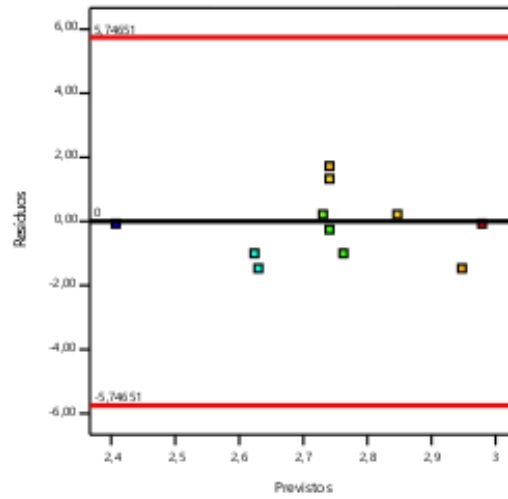
***MQ (Média Quadrática)

Tabela 3A – Coeficientes e seus intervalos de confiança obtidos pela ANOVA para as respostas múltiplas RM_{Cd} e RM_{Mult} ($mg\ kg^{-1}$)

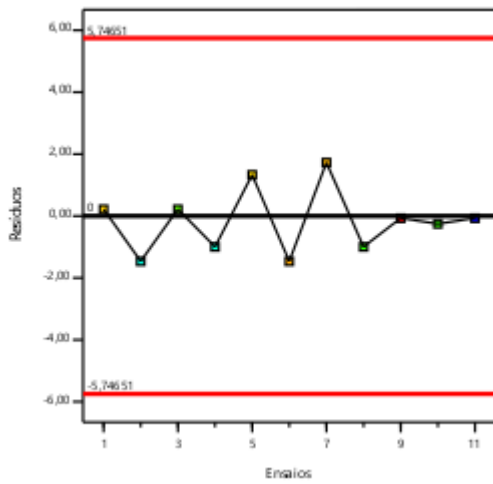
Fator	Coeficiente Estimado		GL		Erro padrão		Intervalo de confiança a 95 %			
	RM_{Cd}	RM_{Mult}	RM_{Cd}	RM_{Mult}	RM_{Cd}	RM_{Mult}	RM_{Cd}		RM_{Mult}	
							Baixo	Alto	Baixo	Alto
A – HNO_3	-0,1430	-0,0795	1	1	0,0287	0,0325	-0,2294	-0,0566	-0,1565	-0,0025
B – H_2O_2	-0,0792	-0,065	1	1	0,0336	0,0325	-0,1656	0,0071	-0,142	0,0120
C – Amplitude	-0,0347	-	1	-	0,0336	-	-0,1211	0,0516	-	-
D- Tempo	-0,029	-0,0577	1	1	0,0336	0,0325	-0,1154	0,0574	-0,1347	0,0192
AC	-0,0478	-	1	-	0,0336	-	-0,1341	0,0386	-	-



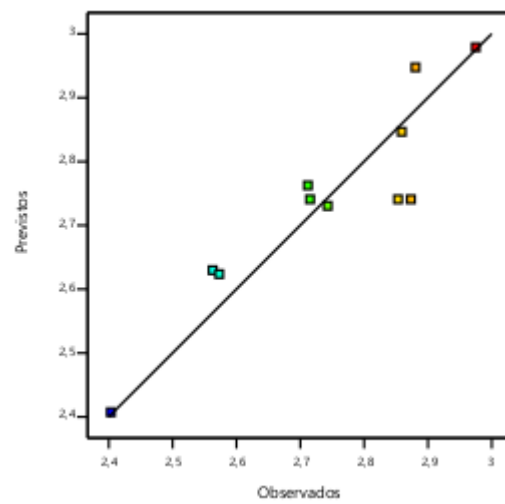
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 2A – Gráficos Diagnóstico para RM_{Cd} (A) Distribuição Normal dos resíduos (B) Relação dos resíduos com os valores previstos para a resposta (C) Relação dos resíduos com os ensaios realizados (D) Relação dos valores observados com os previstos

APÊNDICE 3 - Validação do procedimento MUS

Tabela 4A – Parâmetros estatísticos para avaliação da significância da regressão linear para determinação multielementar por ICP-MS.

Elementos	Significância da Regressão				ANOVA			
	F _{cal}	F _{crit}	α	Modelo	F _{cal}	F _{crit}	α	Modelo
Cd	3668,7	4,45	0,05	Significativo	0,351	3,10	0,05	Ajustado
Al	5814,84	4,60	0,05	Significativo	0,875	3,48	0,05	Ajustado
Ba	2605,1	4,49	0,05	Significativo	0,621	3,20	0,05	Ajustado
Be	8172,9	4,54	0,05	Significativo	1,806	3,32	0,05	Ajustado
Ca	2474,2	4,54	0,05	Significativo	0,946	3,32	0,05	Ajustado
Cu	2855,91	4,49	0,05	Significativo	1,168	3,20	0,05	Ajustado
Fe	2605,1	4,49	0,05	Significativo	0,621	3,20	0,05	Ajustado
K	235,24	4,45	0,05	Significativo	0,244	3,10	0,05	Ajustado
Li	9638,3	4,60	0,05	Significativo	0,968	3,48	0,05	Ajustado
Mg	3696,7	4,60	0,05	Significativo	0,231	3,48	0,05	Ajustado
Mn	2409,0	4,49	0,05	Significativo	0,469	3,20	0,05	Ajustado
Sr	2246,2	4,54	0,05	Significativo	1,806	3,32	0,05	Ajustado
Zn	1857,4	4,49	0,05	Significativo	0,622	3,20	0,05	Ajustado

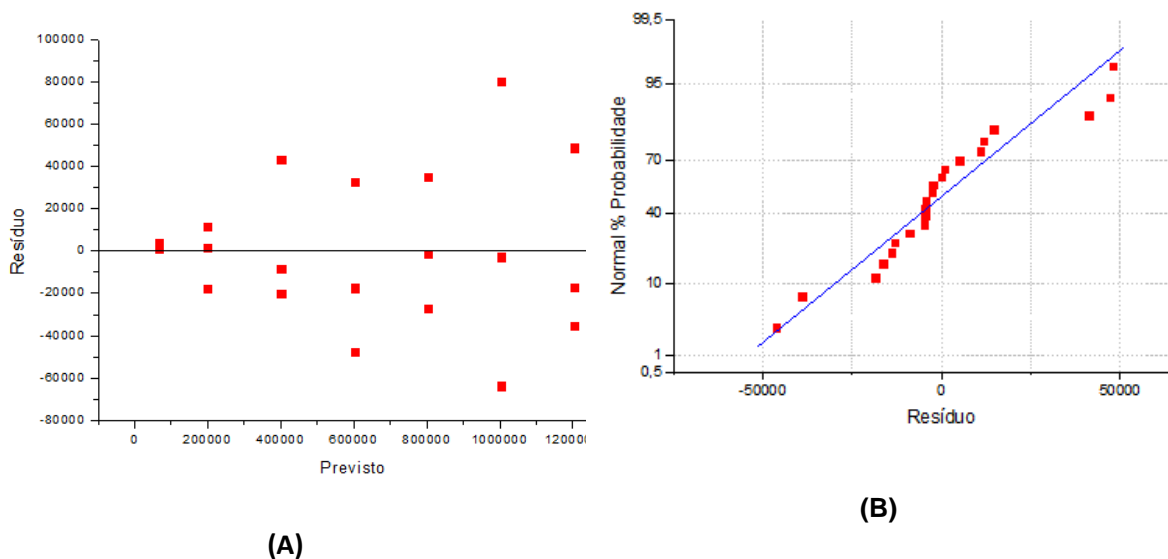


Figura 3A – Distribuição homocedástica dos resíduos (A) e normalidade dos resíduos (B), antes e após, respectivamente, a avaliação de *outlier* pelo teste de Jacknife para determinação de Cd por ICP-MS

Tabela 5A – Efeito de matriz para Folha, caule e raiz, para determinação de Cd por ICP-MS para três níveis de concentração (n = 3)

Elemento	Matriz	Nível de Concentração								
		15 µg L ⁻¹			45 µg L ⁻¹			75 µg L ⁻¹		
		F _{calculado} *	t _{calculado} **	% Efeito de matriz (DPR)	F _{calculado} *	t _{calculado} **	% Efeito de matriz (DPR)	F _{calculado} *	t _{calculado} **	% Efeito de matriz (DPR)
Cd	F	11,67	3,60	+ 8,40 (2,2)	11,47	1,78	+ 3,07 (0,7)	6,01	0,16	+ 3,72 (3,2)
	C	1,41	1,68	- 6,60 (9,0)	7,43	0,84	- 1,02 (4,5)	6,84	0,30	- 1,01 (6,4)
	R	4,25	1,85	- 5,21 (5,4)	11,63	1,81	- 4,37 (3,1)	9,54	1,10	+ 1,96 (3,5)

*F_{crítico} = 19,0 e **t_{crítico} = 2,776 (95% de confiança)

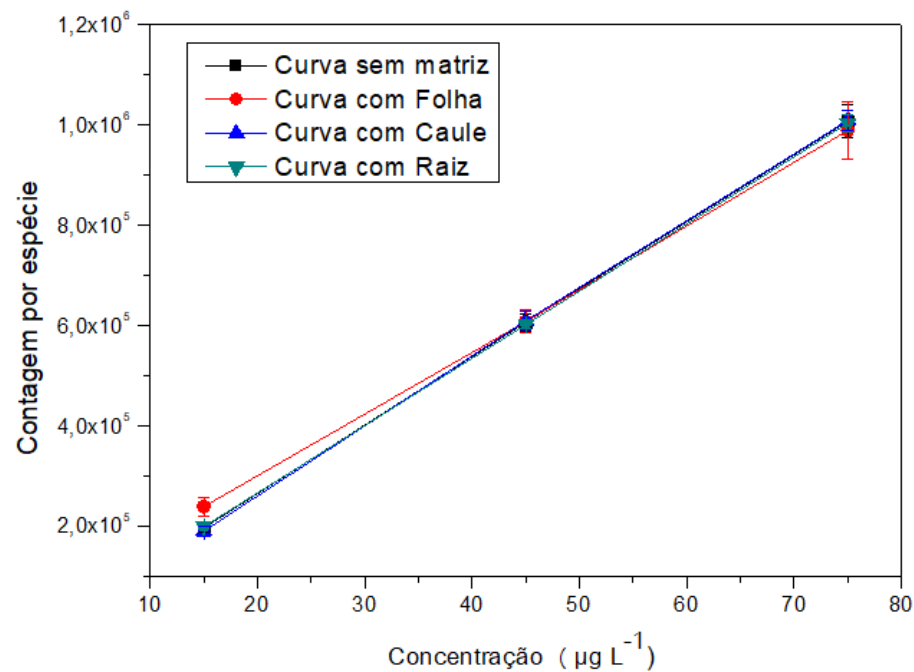


Figura 4A – Efeito de matriz na determinação de Cd em folhas, caule e raiz por ICP-MS

APÊNDICE 4 - Espectros de fragmentação das PCs, seus derivados e Complexos de Cd obtidos por PS(+)-MS

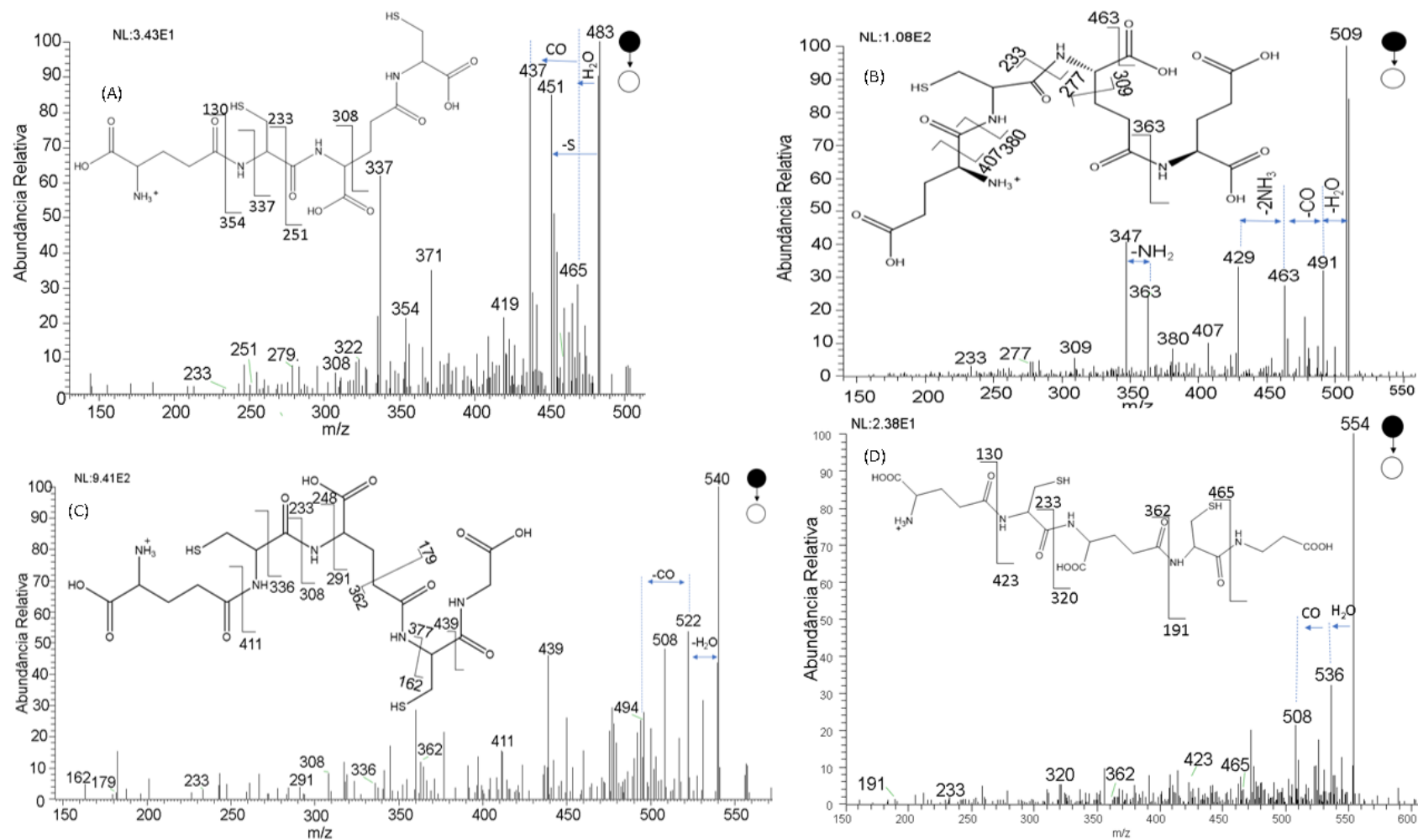


Figura 5A – Espectro MS² por PS(+)-MS com a estrutura dos compostos (A) des-Gly-PC₂ (m/z 483), (B) des-Cys-os-PC₂(Glu) (m/z 509) (C) PC₂ (m/z 540) e (D) hPC₂ (m/z 554) e seus fragmentos. Energia de colisão igual a 25.

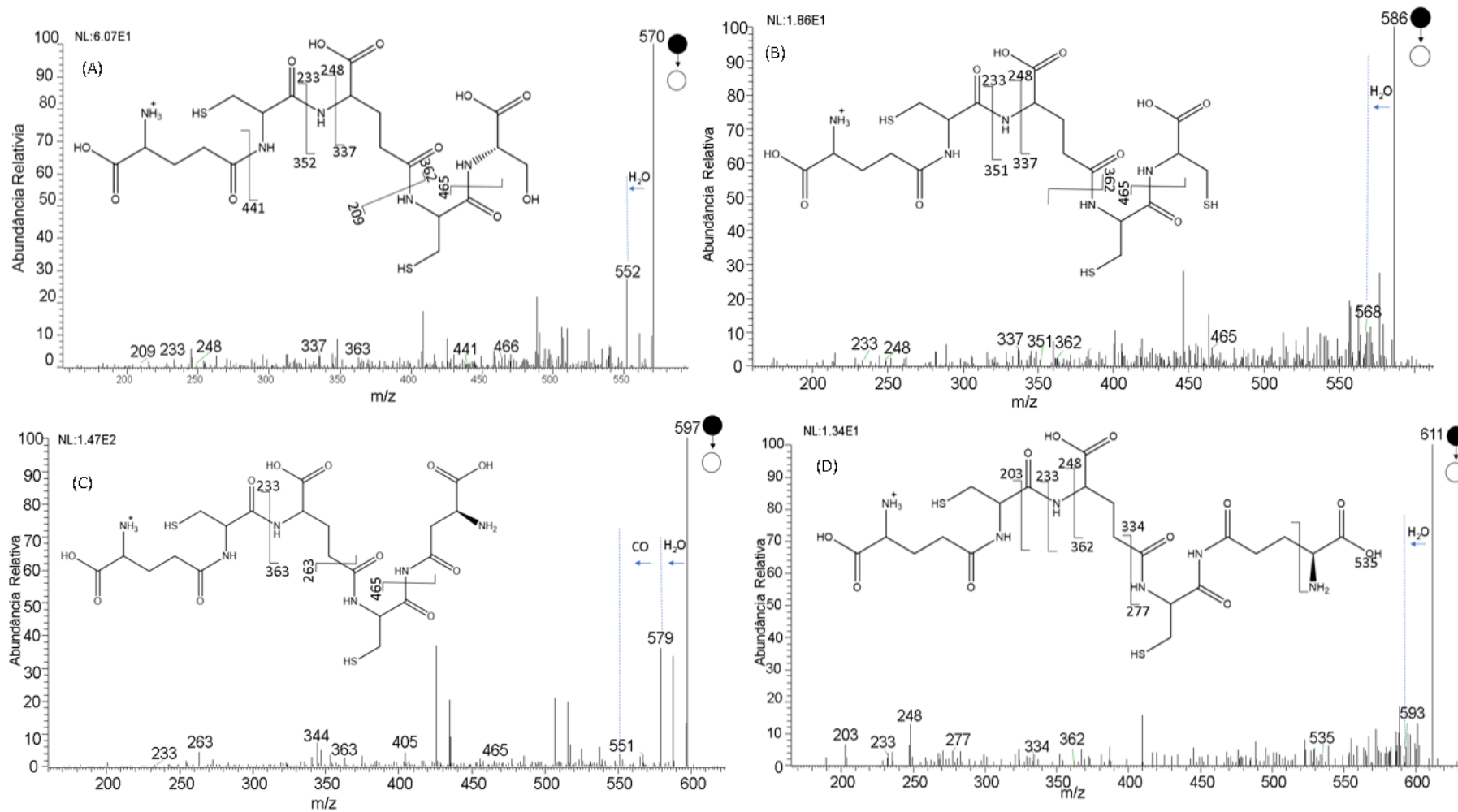


Figura 6A– Espectro MS² por PS(+)-MS com a estrutura dos compostos (A) PC₂(Ser) (*m/z* 570), (B) iso-PC₂(Cys) (*m/z* 586), (C) iso-PC₂(Asn) (*m/z* 597) e (D) iso -PC₂(Gln) (*m/z* 611) e seus fragmentos e seus fragmentos. Energia de colisão igual a 30

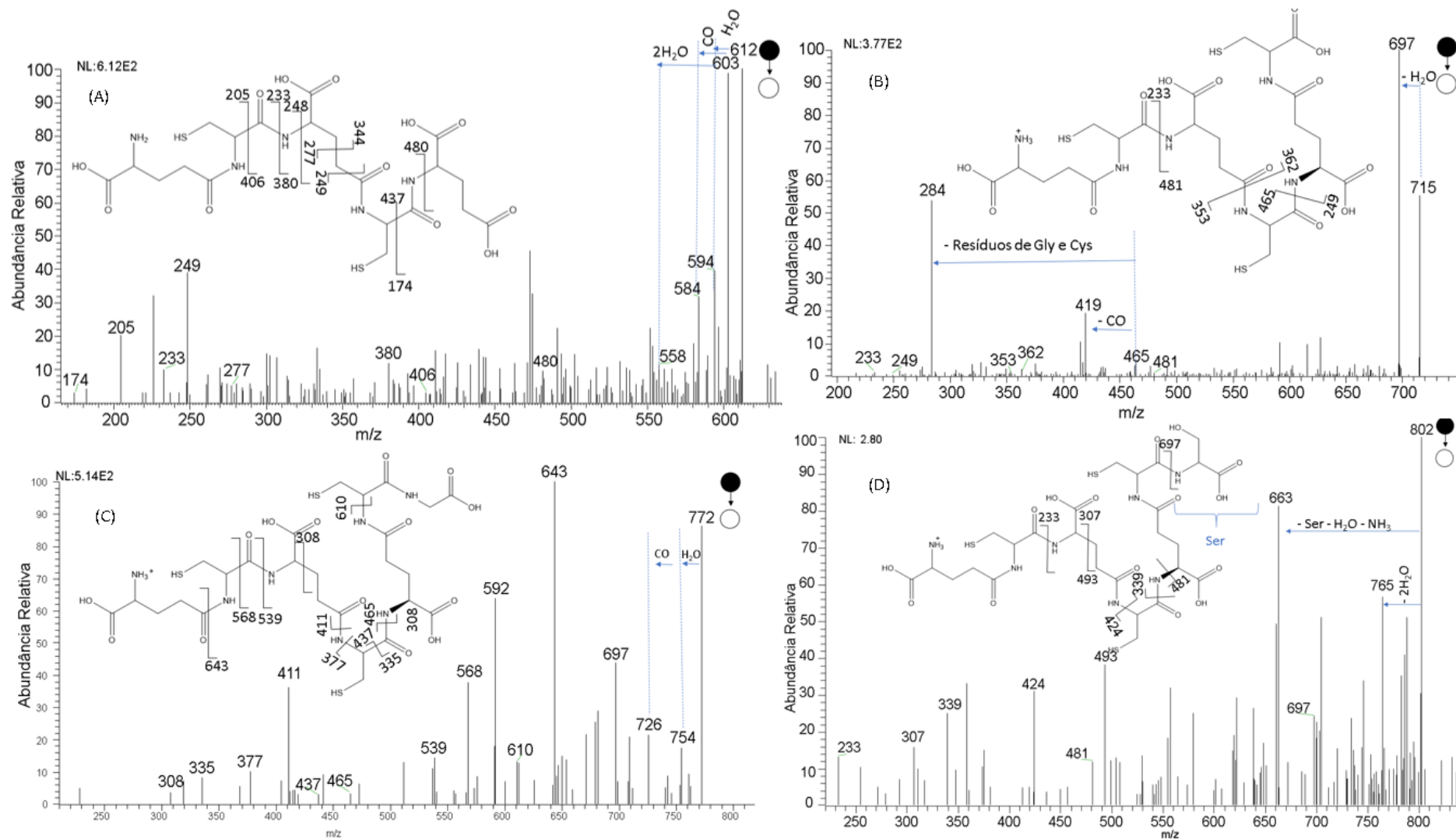


Figura 7A– Espectro MS² por PS(+)-MS com a estrutura dos compostos (A) iso-PC₂ (Glu) (*m/z* 612), (B) des-Gly-PC₃ (*m/z* 715), (C) PC₃ (772)e (D) iso-PC₃(Ser) (*m/z* 802) e seus fragmentos e seus fragmentos. Energia de colisão igual a 30.

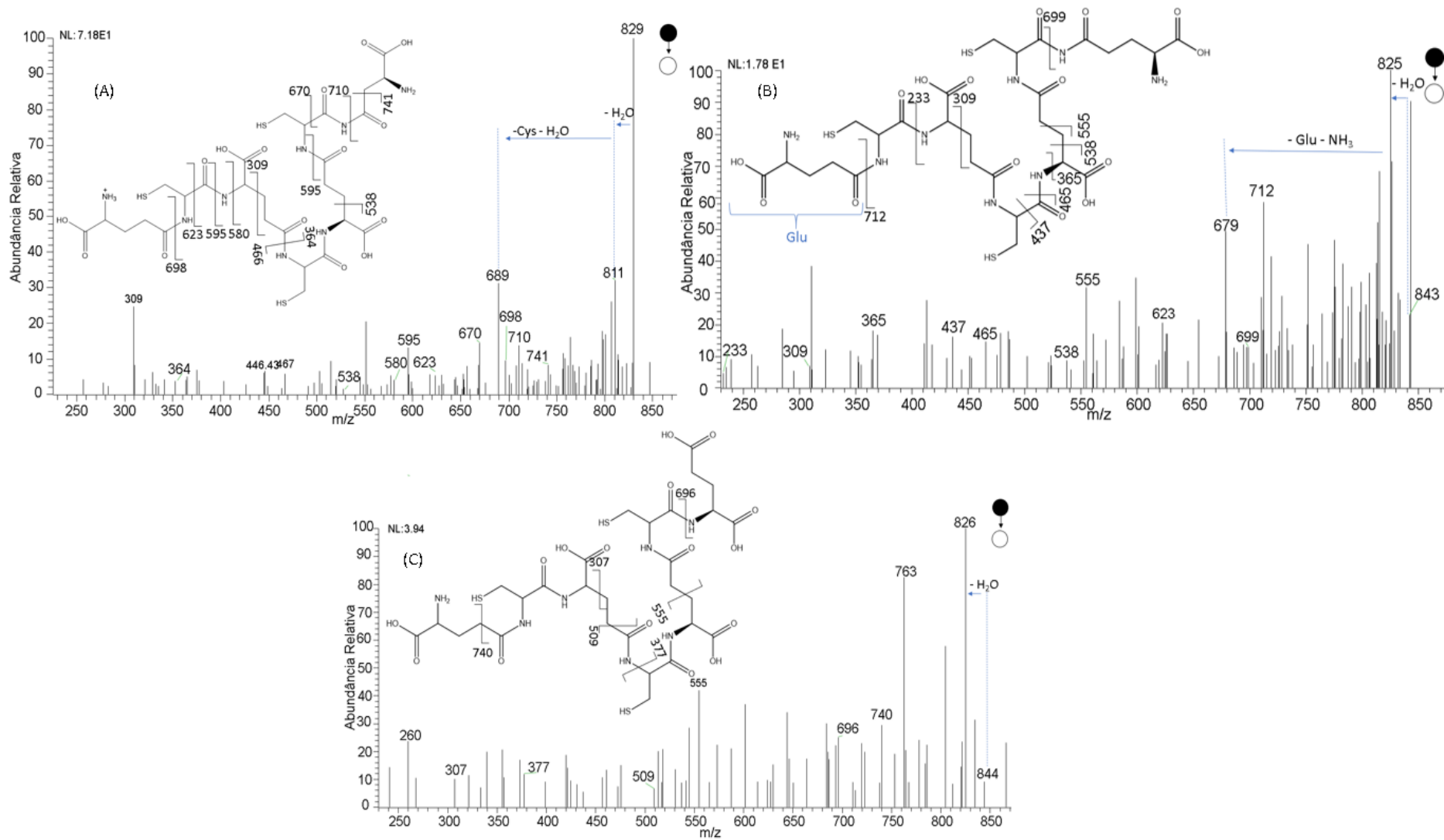


Figura 8A– Espectro MS² por PS(+)-MS com a estrutura dos compostos (A) iso-PC₃(Asn) (*m/z* 829) (B) iso-PC₃(Gln) (*m/z* 843) e (C) iso-PC₃(Glu) (*m/z* 844) e seus fragmentos e seus fragmentos. Energia de colisão igual a 30

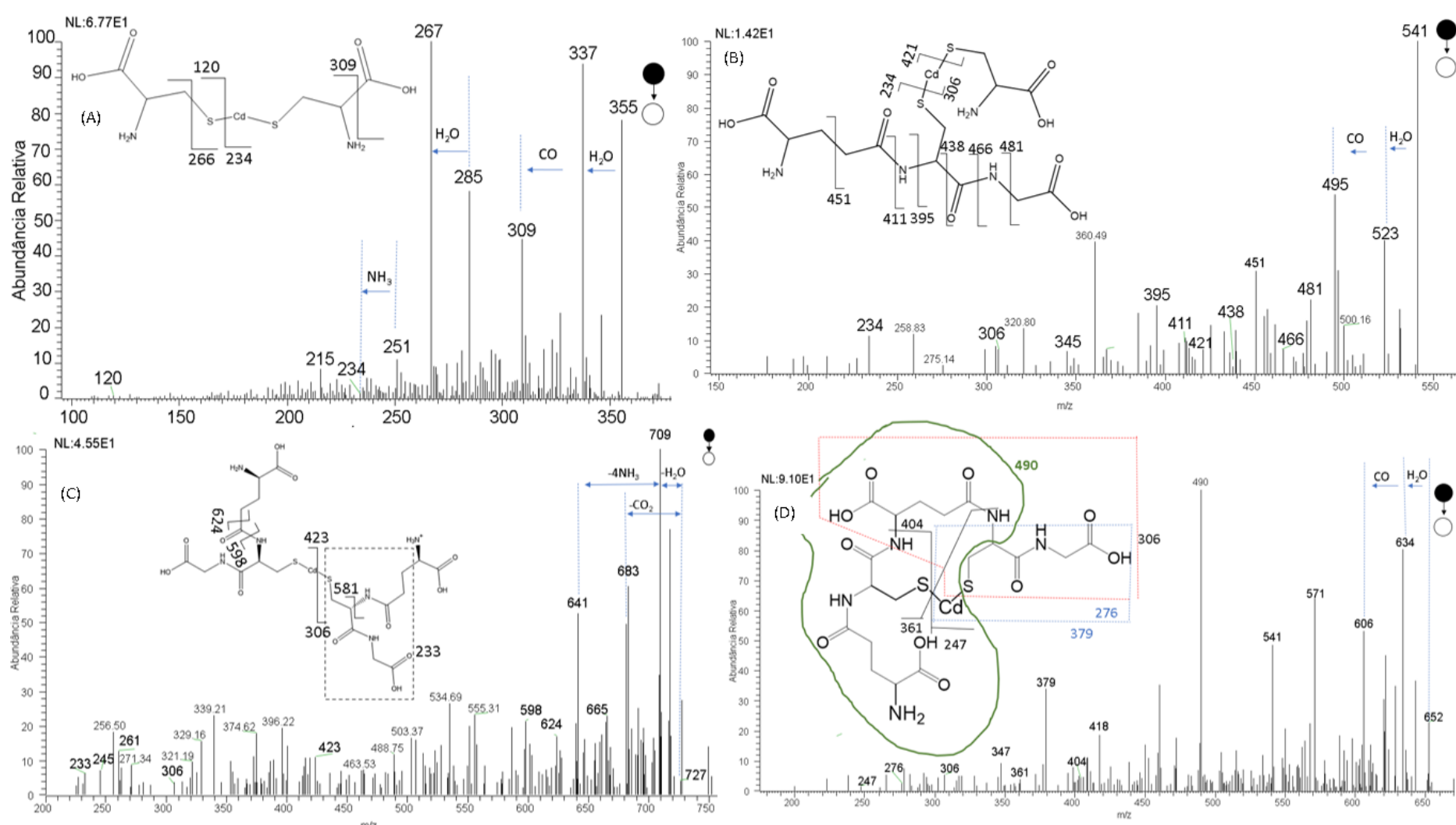


Figura 9A– Espectro MS² por PS(+)-MS com a estrutura dos complexos (A) Cys-Cd-Cys (m/z 355, Energia colisão = 20), (B) Cys-Cd-GSH (m/z 541, Energia colisão igual a 25), (C) Cys-Cd-GSH (m/z 727, Energia colisão igual a 30) e (D) Cd-PC₂ (m/z 652, Energia colisão igual a 30) e seus fragmentos e seus fragmentos.

APÊNDICE 5 - Resultados das análises por DESI-MSI

Tabela 6A Tentativa de identificação de metabólitos obtidos no *imprint* de folha de manjeriço exposto a diferentes concentrações de Cd^{II} (0; 1,0, 3,6; 5,0; 10,0; 25,0 e 50 µM)

Classe	Tentativa de identificação			m/z		Desvio de massa (ppm)	CID (compound identification number)	Nível de identificação
	Nome do metabólito	Fórmula molecular	Íon	Teórica	Experimental			
Flavonoides	Flavonoides glicosídeos	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₃ S	[M+2K+H] ³⁺	192,9987	192,99872	0,104	-	3
	Isoflavonoides	C ₂₂ H ₁₈ O ₇	[M+2H] ²⁺	198,06018	198,05977	-2,070	-	3
	Flavonoide	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₆	[M+3H] ³⁺	213,06417	213,06363	-2,534	-	3
	Repenol	C ₁₈ H ₁₂ O ₁₀	[M+K+H] ²⁺	214,00729	214,00656	-3,411	LMPK12060080	2
	Shoyuflavone C	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₁	[M+Na+H] ²⁺	221,0251	221,02544	1,538	HMDB0034590	2
	Hydroxiflavonoides*	C ₁₅ H ₁₀ O ₃	[M+Na] ⁺	261,0522	261,05252	0,585	-	3
	Salvigenin	C ₁₈ H ₁₇ O ₆	[M+H] ⁺	329,10196	329,10184	-0,110	HMDB0128577	2
	Flavonoides*	C ₂₀ H ₂₀ O ₃	[M+Na] ⁺	331,13047	331,13034	-0,380	-	3
	Flavonoides	C ₃₄ H ₃₂ O ₁₅	[M+H+Na] ²⁺	352,0853	352,08621	2,585	-	3
	Flavonoides	C ₁₈ H ₁₄ O ₇	[M+H] ⁺	343,08178	343,0813	-0,071	-	3
	Flavonoides	C ₃₇ H ₂₈ O ₁₂	[M+H+Na] ²⁺	344,0773	344,07663	-1,947	-	3
	Flavonoides*	C ₂₁ H ₂₂ O ₃	[M+Na] ⁺	345,14666	345,14612	-1,565	-	3
	Xantomicol	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	[M+H] ⁺	345,09688	345,09674	-0,404	HMDB37600	2
	Flavonas e flavonóis	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	[M+Na] ⁺	351,08391	351,08383	-0,228	HMDB0128577	2
	Flavonoides	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	[M+K] ⁺	367,05785	367,05771	-0,372	-	3
	Isoflavonoides	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	[M+Na] ⁺	383,07374	383,07352	-0,571	-	3
	Flavonoides	C ₃₆ H ₃₈ O ₁₆	[M+H+K] ²⁺	383,09376	383,09412	0,940	-	3
	Flavonoides	C ₁₈ H ₂₀ O ₆	[M+2K-H] ⁺	409,04558	409,0437	-4,596	-	3
	Flavonoides	C ₂₄ H ₂₈ O ₇	[M+H-H ₂ O] ⁺	411,18022	411,18079	1,386	-	3
	Flavonoides	C ₂₄ H ₁₆ O ₆	[M+2Na-H] ⁺	445,0664	445,0658	-1,348	-	2
	Flavononas e flavonóis	C ₂₂ H ₂₀ O ₉	[M+Na] ⁺	451,1005	451,10011	-0,865	-	3
	Flavanonas	C ₃₀ H ₃₂ O ₆	[M+H-2H ₂ O] ⁺	453,20658	453,20929	5,980	-	3
	Catechin 3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexene-1-carboxylate)	C ₂₂ H ₂₀ O ₉	[M+2Na-H] ⁺	473,08245	473,08267	0,465	LMPK12020108	2
	Flavonoides	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₁	[M+Na] ⁺	527,15479	527,15381	-1,855	-	3
	Kaempferol 3-O-sophorotrioside 7-O-sophoroside*	C ₄₅ H ₆₀ O ₃₁	[M+2Na] ²⁺	571,145695	571,14563	-0,114	HMDB29264	2
	Flavonoides*	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₄	[M+Na] ⁺	632,1142	632,11151	4,256	-	3
	Flavonoides*	C ₃₄ H ₃₂ O ₁₅	[M+H-2H ₂ O] ⁺	645,1614	645,16284	2,232	-	3
	Flavonoides glicosídeos*	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₉ S	[M+H] ⁺	705,1331	705,13477	2,300	-	3
Ikarisioside F	C ₃₁ H ₃₆ O ₁₄	[M+2K-H] ⁺	709,1300	709,13115	1,622	LMPK12111712	2	

Aminoácidos e peptídeos

Prolina	C ₅ H ₁₀ NO ₂	[M+H] ⁺	116,07061	116,07066	0,473	HMDB0000162	2
Prolina betaina*	C ₇ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	144,10191	144,10193	0,172	HMDB0004827	2
Histidina	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	156,07675	156,07671	-0,256	HMDB0000177	2
Homometionina*	C ₆ H ₁₃ NO ₂ S	[M+H] ⁺	164,07398	164,07407	0,549	KEGG C17213	2
Fenilalanina	C ₉ H ₁₂ NO ₂	[M+H] ⁺	166,08626	166,08609	-0,994	HMDB0000159	2
Glutamina	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	[M+Na] ⁺	169,05836	169,05853	0,985	HMDB0000641	2
Aminoácidos	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	[M+K] ⁺	171,01665	171,01669	0,234	-	3
Arginina	C ₆ H ₁₅ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	175,1195	175,1190	-0,273	HMDB0000517	2
Asparagina*	C ₄ H ₇ N ₂ O ₃	[M+2Na-H] ⁺	177,02466	177,02467	0,068	HMDB0000168	2
Leucina ou isoleucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	[M+2Na-H] ⁺	176,0658	176,0656	-0,795	HMDB0000687	2
Ácido glutâmico	C ₅ H ₉ NO ₄	[M+K] ⁺	186,01632	186,01595	-1,968	HMDB03339	2
Homoarginina	C ₇ H ₁₇ O ₂ N ₄	[M+H] ⁺	189,1346	189,13478	0,939	HMDB00670	2
Fosfo-L- glutamina	C ₅ H ₁₁ N ₂ O ₆ P	[M+H-2H ₂ O] ⁺	191,02217	191,02287	3,664	KEGG C21785	2
Met-Thr-OH ou Ser-Met-OH	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₇ S	[M+H+Na] ²⁺	191,04054	191,03993	-3,193	-	3
Aminoácidos	C ₅ H ₉ NO ₄	[M+2Na+H] ⁺	192,02487	192,02434	-2,760	-	3
Acetilcisteína	C ₅ H ₉ NO ₃ S	[M+CH ₃ OH+H] ⁺	196,06381	196,06384	0,035	HMDB0001890	2
Teanina	C ₇ H ₁₄ O ₃ N ₂	[M+Na] ⁺	197,08966	197,0896	-0,322	HMDB0034635	2
Gly Gly Phe Asp ou Asp Asn Phe	C ₁₇ H ₂₂ N ₄ O ₇	[M+2H] ²⁺	198,08197	198,08169	-1,439	-	3
Fosfoserina	C ₃ H ₈ NO ₆ P	[M+Na] ⁺	207,99811	207,99802	0,433	HMDB0001721	2
Citrulina	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	[M+K] ⁺	214,0588	214,05876	-0,187	HMDB00904	2
Tirosina	C ₉ H ₁₁ NO ₃	[M+2Na-H] ⁺	226,0451	226,04478	-1,412	HMDB0000158	2
Glu Asp Cys Cys*	C ₁₅ H ₂₄ N ₄ O ₉ S ₂	[M+2H] ²⁺	235,0565	235,05663	0,553	-	3
Gly-Norvalina	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	[M+2K-H] ⁺	251,0195	251,01917	-1,315	-	3
His Tyr Gly Cys ou Gly Asn Cys Trp*	C ₁₄ H ₂₃ N ₅ O ₄ S	[M+H+Na] ²⁺	251,0800	251,07964	-1,434	-	3
L-Prolyl-L-prolyl-L-cysteinyll-L-cysteinyll-L-prolyl-L-proline*	C ₂₆ H ₄₀ N ₆ O ₇ S ₂	[M+H+Na] ⁺	318,11820	318,11829	0,283	-	3
Cys Val Trp Trp ou Ala Met Trp Trp*	C ₃₀ H ₃₆ N ₆ O ₅ S	[M+2Na] ²⁺	319,11260	319,11271	0,345	-	3
Arg Leu Leu Asn Asn*	C ₂₆ H ₄₈ N ₁₀ O ₈	[M+H+Na] ⁺	326,1811	326,1810	-0,307	-	3
His Pro Ala*	C ₁₄ H ₂₁ N ₅ O ₄	[M+Na] ⁺	346,14858	346,14893	1,011	-	3
Phenylalanyl-phenylalanyl-glycine	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₄	[M+H] ⁺	370,17613	370,17554	-1,594	-	3
Pro Gln Val Cys* ou Pro Met Ala Gln ou Pro Leu Asn Cys	C ₁₈ H ₃₁ N ₅ O ₆ S	[M+H-2H ₂ O] ⁺	410,1867	410,18747	1,877	-	3
Arg Trp Val	C ₂₂ H ₃₃ N ₇ O ₄	[M+H-2H ₂ O] ⁺	424,2460	424,24576	-0,566	-	3
Gly Thr Ser Lys	C ₁₅ H ₂₉ N ₅ O ₇	[M+K] ⁺	430,16986	430,1702	0,790	-	3
Cys Tyr Leu ou Thr Met Phe	C ₁₈ H ₂₇ N ₃ O ₅ S	[M+K] ⁺	436,1303	436,13004	-0,596	-	3
Pro Trp Arg	C ₂₂ H ₃₁ N ₇ O ₄	[M+H-H ₂ O] ⁺	440,2410	440,24058	-0,954	-	3
Pro Arg Arg	C ₁₇ H ₃₃ N ₉ O ₄	[M+Na] ⁺	450,2548	450,25372	-2,399	-	3
Tyr Asp Arg	C ₁₉ H ₂₈ N ₆ O ₇	[M+H] ⁺	453,20922	453,20938	0,353	-	3
Gly Arg Arg Ala*	C ₁₇ H ₃₄ N ₁₀ O ₅	[M+K] ⁺	497,23507	497,23541	0,684	-	3

	Val Cys Met His ou Ala His Met Met	C ₁₉ H ₃₂ N ₆ O ₅ S ₂	[M+Na] ⁺	511,17733	511,1774	0,137	-	3
	Thr Arg Arg Ala*	C ₁₉ H ₃₈ N ₁₀ O ₆	[M+K] ⁺	541,26129	541,26135	0,111	-	3
	Cys Cys Met Tyr*	C ₂₀ H ₃₀ N ₄ O ₆ S ₃	[M+K] ⁺	557,09591	557,09503	-1,580	-	3
	Glu Glu Arg Tyr*	C ₂₅ H ₃₇ N ₇ O ₁₀	[M+H] ⁺	596,26802	596,26837	1,107	-	3
	D-Leucyl-D-phenylalanyl-D-leucyl-D-leucyl-D-leucine	C ₃₃ H ₅₅ N ₅ O ₆	[M+H-H ₂ O] ⁺	600,41249	600,41235	-0,233	-	3
	L-Seryl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-glutamyl-L-glutamine*	C ₂₆ H ₃₉ N ₇ O ₁₀	[M+H] ⁺	610,2831	610,28265	-0,737	-	3
	Glabin C	C ₄₁ H ₆₄ N ₈ O ₉	[M+H] ⁺	813,48745	813,48785	0,492	HMDB0033612	2
	L-Lysyl-L-seryl-L-serylglycyl-L-lysyl-L-leucyl-L-isoleucyl-L-seryl-L-leucine	C ₄₁ H ₇₇ N ₁₁ O ₁₃	[M+2Na-H] ⁺	976,54195	976,54309	1,167	-	3
Fitohormônios	Ácido indoleacético (auxina)	C ₁₁ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	188,07061	188,07101	2,153	HMDB0000734	2
	Gibberellin A37 glucosil ester*	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₀	[M+2Na] ²⁺	277,1046	277,10471	0,397	HMDB0038611	2
	Ácido abscísico*	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	[M+K] ⁺	303,0993	303,09897	-1,089	HMDB0035140	2
	Carlactone*	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	[M+Na] ⁺	325,17796	325,1774	-1,722	KEGG C20693	2
	Giberilina A12 aldeído	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	[M+Na] ⁺	339,19307	339,19308	0,041	Metlin 53653	2
	Jasmolone glucosídeo*	C ₁₇ H ₂₆ O ₇	[M+Na] ⁺	365,15707	365,15683	-0,660	HMDB0032870	2
	Glucosídeo do ácido tuberônico	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	[M+K] ⁺	427,13657	427,13649	-0,187	KEGGC08558	2
Ácidos orgânicos	ácido benzoico	C ₇ H ₆ O ₂	[M+Na] ⁺	145,02600	145,02611	0,0754	HMDB01870	2
	Ácido guanidinovalérico (2-Oxoarginine*)	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	160,10806	160,10796	-0,600	KEGGC13688	2
	ácido málico	C ₄ H ₆ O ₅	[M+2Na-H] ⁺	178,9927	178,99271	0,056	HMDB0000744	2
	Ácido 7,8-Diaminononanoico	C ₉ H ₂₁ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	189,15975	189,15968	-0,393	KEGG C01037	2
	Ácido 3- oxomálico	C ₆ H ₇ O ₈	[M+H] ⁺	207,01354	207,01405	2,446	KEGG C01990	2
	ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	[M+Na] ⁺	215,01622	215,01648	1,192	HMDB0000094	2
	Ácido arginínico	C ₆ H ₁₄ O ₃ N ₃	[M+2Na-H] ⁺	220,0665	220,06657	0,318	HMDB0003148	2
	(+)-Dysideapalaunic acid	C ₂₅ H ₄₀ O ₂	[M+K] ⁺	421,26599	421,26596	-0,07	PUBCHEM14061248	2
	Ácido chicórico*	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	[M+Na] ⁺	497,06905	497,06975	1,408	HMDB0002375	2
	Carboidratos e carboidratos conjugados	Pentoses ou hexoses	C ₆ H ₁₁ O ₄	[M+H] ⁺	147,06519	147,06497	-1,464	-
4',6'-Dihydroxy-2'-methoxyacetophenone 6'-glucoside		C ₁₅ H ₂₀ O ₉	[M+H+Na] ²⁺	184,05389	184,05364	-1,358	HMDB34862	2
Hexoses		C ₆ H ₁₆ O ₆	[M+Na] ⁺	203,05261	203,05287	1,284	-	3
Dissacarídeos		C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	[M+Na] ⁺	365,10543	365,1058	1,006	-	3
2'',6''-Digalloyliriflophenone 3-C-glucoside		C ₃₃ H ₂₈ O ₁₈	[M+H+Na] ²⁺	368,06258	368,06085	-4,700	HMDB0029629	2
4,6 dihidroxi – 2-metoxiacetofenona glucosídeo		C ₁₅ H ₂₀ O ₉	[M+2K-H] ⁺	421,0298	421,02963	-0,404	HMDB0034862	3
4-Phenylbutyl glucosinolate		C ₁₇ H ₂₅ NO ₉ S ₂	[M+H] ⁺	452,1043	452,1037	-1,327	HMDB37603	2
Patientoside A		C ₁₉ H ₂₁ ClO ₈	[M+2K-H] ⁺	489,01208	489,01346	2,822	HMDB37098	2
CMP-2-aminoetilfosfonato		C ₁₁ H ₂₀ N ₄ O ₁₀ P ₂	[M+2K-H] ⁺	506,9845	506,98471	0,414	HMDB0060067	2
Colina*		C ₅ H ₁₃ ON	[M+H] ⁺	104,10699	104,10729	2,876	HMDB0000097	2
Aminoacetona		C ₃ H ₇ NO	[M+CH ₃ OH+H] ⁺	106,0863	106,08615	1,434	HMDB0002134	2
Monoterpenos*		C ₁₂ H ₂₀ O ₂	[M+H+Na] ²⁺	110,0714	110,07148	0,727	-	3

Outros	Agroclavine	C ₁₆ H ₁₈ N ₂	[M+2H] ²⁺	120,08105	120,080901	1,251	KEGG C09023	2
	Ácido piroglutâmico	C ₅ H ₈ O ₃ N	[M+H] ⁺	130,04987	130,04991	0,308	HMDB0000267	2
	4-Guanidinobutanal	C ₅ H ₁₁ N ₃ O	[M+H] ⁺	130,09749	130,09758	0,692	KEGGC02647	2
	Nitrato	NO ₃ ⁻	[M+2K-H] ⁺	139,91468	139,91463	-0,380	HMDB0002878	2
	Glucoberin	C ₁₁ H ₂₁ NO ₁₀ S ₃	[M+3H] ³⁺	142,0182	142,01854	2,394	HMDB0038406	2
	Quinolinas	C ₇ H ₇ ON	[M+H] ⁺	146,06004	146,06018	0,959	-	3
	Ximenoylacetone	C ₂₉ H ₅₄ O ₂	[M+2H+Na] ³⁺	153,1387	153,13869	-0,065	HMDB35952	2
	Pimelato	C ₇ H ₁₁ O ₄	[M+H] ⁺	159,06519	159,06511	-0,474	HMDB0000857	2
	4-Álcool coumaril*	C ₉ H ₁₀ O ₂	[M+Na] ⁺	173,0573	173,05769	2,249	HMDB0003654	2
	N-Acetilputrescina	C ₆ H ₁₄ N ₂ O	[M+2Na-H] ⁺	175,0818	175,08177	-0,171	HMDB0002064	2
	3,4-dimethoxibenzaldeído*	C ₉ H ₁₀ O ₃	[M+Na] ⁺	189,05222	189,05246	1,294	HMDB0032138	2
	Éteres fenólicos	C ₁₄ H ₁₈ O	[M+H] ⁺	203,14304	203,1432	0,788	-	3
	Dimetildissulfeto	C ₂ H ₆ S ₂	[2M+Na] ⁺	210,9714	210,97089	-2,417	HMDB0005879	2
	Sulfato	SO ₄ ²⁻	[M+2K-H] ⁺	212,84222	212,84285	2,960	KEGG C13192	2
	Fenilpropanoides	C ₉ H ₈ O ₅	[M+Na] ⁺	219,02639	219,02641	0,025	-	3
	Lipídios	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	[M+Na] ⁺	219,06278	219,06247	-1,415	-	3
	N-(4-hidroxifenil)etoxicarbotioamida	C ₉ H ₁₁ NO ₂ S	[M+Na] ⁺	220,04082	220,04109	1,227	HMDB0033179	2
	Cumarinas	C ₁₁ H ₉ O ₅	[M+H] ⁺	221,04445	221,04451	0,06	-	3
	Fosforilcolina	C ₅ H ₁₅ NO ₄ P	[M+K] ⁺	222,0298	222,02919	-2,747	HMDB0001565	2
	Hidroxiácidos	C ₁₁ H ₂₀ O ₃	[M+Na] ⁺	223,13101	223,13029	-3,227	-	3
	Ethyl α-D-glucopyranoside*	C ₈ H ₁₆ O ₆	[M+Na] ⁺	231,0839	231,08369	-0,949	HMDB0029968	2
	Álcoois e polióis*	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	[M+Na] ⁺	233,07843	233,0784	-0,129	-	3
	Xantina	C ₇ H ₈ N ₄ O ₃	[M+K] ⁺	235,0228	235,0229	2,425	HMDB0000292	2
	Taninos	C ₂₇ H ₂₀ O ₁₈	[M+2K+H] ³⁺	236,9995	237,0008	2,447	-	3
	Hidroxicumarinas*	C ₁₃ H ₁₂ O ₄	[M+Na] ⁺	255,06278	255,06219	-2,313	-	3
	7-Hidroxi-2-metil-4-oxo-4H-1-benzopirano-5-ácido acético*	C ₁₂ H ₁₀ O ₅	[M+Na] ⁺	257,04259	257,04272	0,506	HMDB40408	2
	Sesquiterpenoides*	C ₁₅ H ₁₈ O ₃	[M+Na] ⁺	269,11482	269,11496	0,536	-	3
	Lipídios prenil*	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	[M+Na] ⁺	289,14103	289,14084	-0,658	-	3
	glicerolfosfolipídios	C ₅₁ H ₉₉ O ₁₃ P	[M+3H] ³⁺	317,9019	317,90042	-4,656	-	3
	Terpenos glicosídeos	C ₄₈ H ₇₈ O ₂₀	[M+3H] ³⁺	325,8435	325,84283	-2,056	-	3
	Casuarine 6-α-D-glucosídeo*	C ₁₄ H ₂₂ O ₈ N	[M+H] ⁺	332,13399	332,13376	-0,690	HMDB0031999	3
	glicerolfosfolipídios	C ₄₆ H ₈₂ O ₁₆ P ₂	[M+2K+H] ³⁺	343,81435	343,81526	2,647	-	3
	Lactapiperanol D*	C ₁₈ H ₂₈ O ₅	[M+Na] ⁺	347,18344	347,18274	-2,016	HMDB0033631	3
	Ácido cibárico*	C ₁₉ H ₁₈ ClNO ₄	[M+Na] ⁺	382,08221	382,08298	2,015	HMDB0038580	2
	Gravacridoneclorina	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	[M+Na] ⁺	392,14684	392,14581	-2,627	HMDB30384	2
	Fumarincina	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	[M+Na] ⁺	392,14684	392,14581	-2,627	KEGGC09444	2
	Alocriptina	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	[M+Na] ⁺	392,14684	392,14581	-2,627	KEGGC02134	2
	Clusin*	C ₂₂ H ₂₆ O ₇	[M+Na] ⁺	425,15707	425,15671	-0,857	HMDB29542	2
	Bergenin	C ₁₄ H ₁₆ O ₉	[M+Na] ⁺	351,06865	351,06897	0,912	KEGG C09919	2
	Thiophene-4,5-epoxide	C ₁₄ H ₁₂ O ₄ S	[M+2K-H] ⁺	352,9647	352,96494	0,680	HMDB60925	2
	Terpenos glicosídeos*	C ₁₉ H ₃₀ O ₈	[M+Na] ⁺	409,18329	409,18356	0,662	-	3
	Scarolide*	C ₂₅ H ₃₈ O ₃	[M+Na] ⁺	409,27132	409,27124	-0,186	PUBCHEM21628590	2
	Quinquenoside F1	C ₄₂ H ₇₄ O ₁₅	[M+2H] ²⁺	410,2587	410,25769	-2,462	HMDB39398	2
	1-O-Sinapilglicose	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	[M+K] ⁺	425,08446	425,08459	0,317	HMDB0041175	2
	Aspidoalbina*	C ₂₄ H ₃₂ N ₂ O ₅	[M+H] ⁺	429,2384	429,23962	2,842	KEGG C09038	2

Hebevinoside	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₄	[M+Na+H] ²⁺	430,2444	430,24359	-1,883	-	3
Methylpicraquassioside A	C ₁₉ H ₂₄ O ₁₀	[M+Na] ⁺	435,12617	435,1257	-1,080	HMDB38347	
Lipídios	C ₁₉ H ₃₀ O ₉	[M+K] ⁺	441,152	441,1521	0,092	-	3
Valtrato	C ₂₂ H ₃₀ O ₈	[M+Na] ⁺	445,18329	445,18289	-0,896	KEGG C09801	2
1-Octen-3-yl primeveroside	C ₁₉ H ₃₄ O ₁₀	[M+K] ⁺	461,1789	461,17953	2,339	HMDB32960	2
Tetraterpenoide	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	[M+H-H ₂ O] ⁺	551,42529	551,42438	-1,650	-	3
Palmitato de epiandrosterona	C ₃₅ H ₆₀ O ₃	[M+K] ⁺	567,4174	567,41614	-2,228	PUBCHEM6453037	2
Isoprenoides	C ₄₀ H ₅₄ O ₃	[M+H] ⁺	583,41457	583,41449	-0,141	-	-
Triterpenoides	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₄	[M+2Na] ²⁺	585,2881	585,28809	-0,017	-	3
Cucurbitacin E*	C ₃₂ H ₄₄ O ₈	[M+K] ⁺	595,26662	595,26593	-1,167	KEGG C08797	2
Campesterol ferulato	C ₃₈ H ₅₆ O ₄	[M+Na] ⁺	599,40708	599,40796	1,212	HMDB0036285	2
Agavasaponina*	C ₅₆ H ₉₀ O ₂₇	[M+H+Na] ²⁺	609,28227	609,28015	-3,480	HMDB0033814	2
Protoprimulagenin A 3-[rhamnosyl-(1->4)-rhamnosyl-(1->4)-[rhamnosyl-(1->2)]-glucosyl-(1->?)]-glucuronide]	C ₆₀ H ₉₈ O ₂₆	[M+H+Na] ²⁺	629,3156	629,31555	-0,079	HMDB33158	2
Crispanone *	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	[2M+K] ⁺	707,3920	707,39301	1,428	HMDB35286	2
glicerolfosfolípido	C ₄₂ H ₇₇ O ₁₀ P	[M+Na] ⁺	795,5147	795,51361	-1,370	-	3
Glicerollípídios	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₀	[M+Na] ⁺	797,51742	797,5163	-0,187	-	3
Feofitina a*	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	[M+H] ⁺	871,57375	871,57391	0,1836	KEGG C05797	2
Lipídios	C ₅₁ H ₈₈ O ₆	[M+2K-H] ⁺	873,5771	873,57794	0,962	-	3
Clorofila a	C ₅₅ H ₇₂ O ₅ N ₄ Mg	[M+H] ⁺	893,54314	893,54364	0,560	HMDB0038578	2
Zeaxantina diglucosídeo	C ₅₂ H ₇₆ O ₁₂	[M+K] ⁺	931,49738	931,49524	-2,297	KEGG C15969	2
Glicerollípídios	C ₅₁ H ₈₄ O ₁₅	[M+K] ⁺	975,54473	975,54388	-0,8713	-	3

*Metabólitos presentes em todas as folhas, cuja distribuição espacial não foi afetada pelas concentrações de Cd

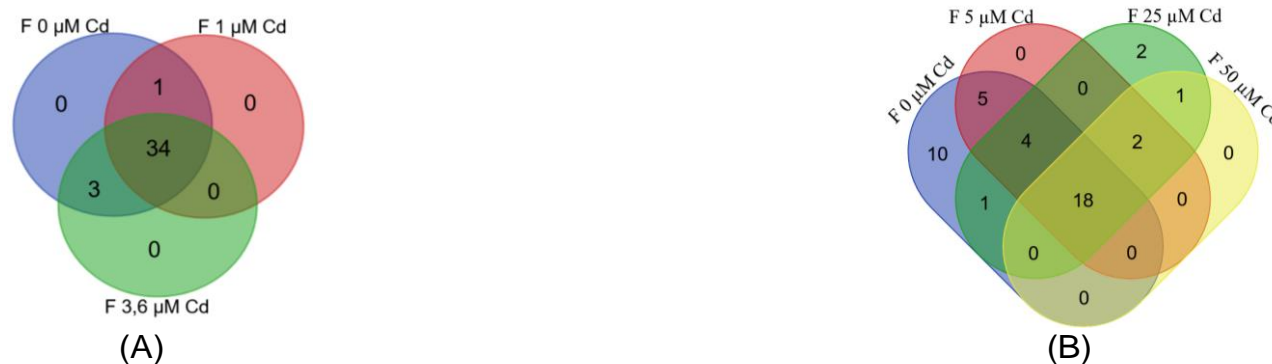


Figura 10A – Diagrama de Venn para o número de compostos não identificados no *imprint* de folha (F) de manjericão cultivado em 0, 1, 3,6, 5, 25 e 50 µM de Cd^{II}. (A) 38 compostos nas menores concentrações; (B) 43 compostos nas maiores concentrações

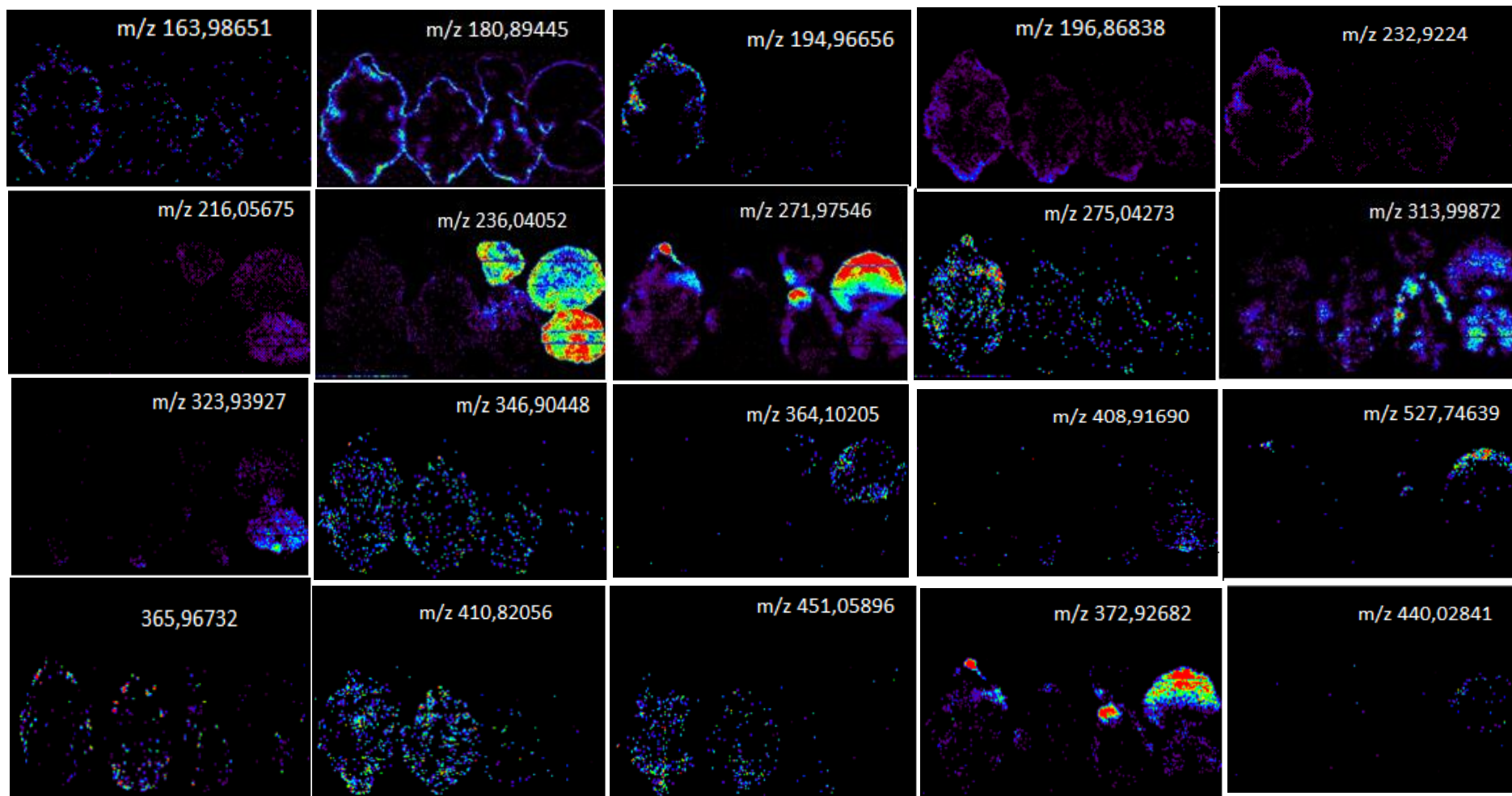


Figura 11A – Alguns metabólitos desconhecidos (candidatos a biomarcadores e metabólitos inibidos) obtidos no *imprint* de folha de manjericão exposto a diferentes concentrações de Cd^{II} (0; 1,0; 3,6; 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 µM)

Tabela 7A Tentativa de identificação de metabólitos obtidos no *imprint* de folha e raiz de manjeriço exposto a diferentes concentrações de Cd^{II} (0 e 25 µM)

Classe	Tentativa de identificação			m/z		Desvio de massa (ppm)	CID	Nível de identificação
	Nome do metabólito	Fórmula molecular	Íon	Teórica	Experimental			
Flavonoides	Flavonoides glicosídeos ¹	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₃ S	[M+H+2K] ³⁺	192,9987	192,9985	0,622	-	3
	Isoflavonoides	C ₂₂ H ₁₈ O ₇	[M+2H] ²⁺	198,06018	198,05962	2,827	-	3
	Repenol ¹	C ₁₈ H ₁₂ O ₁₀	[M+H+K] ²⁺	214,00729	214,00614	5,374	LMPK12060080	2
	Flavonoides	C ₂₂ H ₁₈ O ₇	[M+2Na] ²⁺	220,0418	220,04154	1,18	-	3
	Shoyuflavona C	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₁	[M+H+Na] ²⁺	221,0251	221,0257	-2,715	HMDB0034590	2
	Flavanol ¹	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	[M+H+K] ²⁺	235,04896	235,04926	-1,276	-	3
	Hidroxi flavonoides ¹	C ₁₅ H ₁₀ O ₃	[M+Na] ⁺	261,0522	261,05148	2,758	-	3
	Isoflavonoides ¹	C ₁₇ H ₁₄ O ₃	[M+Na] ⁺	289,0835	289,08363	-0,045	-	3
	Isoflavonoides ¹	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	[M+H] ⁺	319,1176	319,11803	-1,347	-	3
	salvigenina ²	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	[M+H] ⁺	329,10196	329,10184	0,118	HMDB0128577	2
	Flavonoide ²	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₆	[M+H] ⁺	331,09301	331,0924	1,842	-	3
	5'-O-beta-D-Glucosylpyridoxine ¹	C ₄₀ H ₃₈ O ₉	[M+2H] ²⁺	332,1331	332,13376	-0,702	KEGG C03996	2
	Isoflavonoides	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	[M+Na] ⁺	335,0526	335,05231	0,866	-	3
	Flavonoides ²	C ₁₈ H ₁₅ O ₇	[M+H] ⁺	343,08178	343,0813	0,071	-	3
	Flavonas e flavonóis	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	[M+Na] ⁺	351,08391	351,08383	0,228	-	3
	5,7-Dihydroxyflavona 7-benzoato	C ₂₂ H ₁₄ O ₅	[M+H] ⁺	359,0914	359,09139	-0,028	LMPK12110191	2
	Artemetin 5-glucosyl-(1->4)-rhamnoside	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₇	[M+H+Na] ²⁺	360,1115	360,11094	1,555	LMPK12112941	2
	Flavonoides ²	C ₁₈ H ₁₄ O ₇	[M+Na] ⁺	365,0621	365,06293	-2,942	-	3
	Flavonoides glicosídeos	C ₂₁ H ₁₈ O ₉	[M+H-2H ₂ O] ⁺	379,0824	379,08258	-0,475	-	3
	Flavonoides	C ₂₃ H ₂₂ O ₅	[M+H] ⁺	379,1545	379,15497	-1,240	-	3
	Flavonoides ¹	C ₁₈ H ₁₄ O ₈	[M+Na] ⁺	381,0581	381,05774	0,945	-	2
	Quercetina	C ₁₅ H ₁₄ O ₉	[M+2Na-H] ⁺	383,03495	383,03457	-0,986	HMDB0005794	3
	Isoflavonoides	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	[M+Na] ⁺	383,07374	383,07354	-0,518	-	3
	Flavonoide glicosídeo	C ₃₆ H ₃₈ O ₁₆	[M+2Na] ²⁺	386,0972	386,09638	2,124	-	3
	Naringin 4'-glucosídeo	C ₃₃ H ₄₂ O ₁₉	[M+H+Na] ²⁺	383,11481	383,11558	2,009	HMDB0033738	2
	Flavonoides	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	[M+Na] ⁺	399,04752	399,04754	0,04	-	2
	Flavonoides ²	C ₆₀ H ₅₀ O ₂₄	[M+3Na] ³⁺	407,74617	407,74667	-1,226	-	3
	Isoflavonoides ¹	C ₂₁ H ₁₈ O ₉ S	[M+H-2H ₂ O] ⁺	411,0545	411,05422	0,681	-	3
	Flavonas e flavonóis ²	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	[M+2K-H] ⁺	437,00411	437,0033	1,854	-	3
	Flavonoides ¹	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M+Na] ⁺	441,1156	441,11575	-0,340	-	3
	Flavonas ou flavonóis	C ₂₂ H ₂₀ O ₉	[M+Na] ⁺	451,1000	451,10092	-2,039	-	3
	Flavanonas ²	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₉	[M+H+Na] ²⁺	453,0986	453,09835	-0,552	-	3
Flavonoides	C ₄₈ H ₃₈ O ₁₆	[M+H+K] ²⁺	455,0933	455,09264	1,450	-	3	
Catechin 3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexene-1-carboxylate) ²	C ₂₂ H ₂₀ O ₉	[M+2Na-H] ⁺	473,08245	473,08229	-0,338	LMPK12020108	2	
Flavonas ¹	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₄	[M+H-2H ₂ O] ⁺	485,0725	485,07379	2,659	-	3	
Isoflavonoides	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₃	[M+H] ⁺	497,12952	497,12825	-2,555	-	3	

Aminoácidos e peptídeos	Luteolin 7,3'-dimetil éter 5-glucosídeo	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₀	[M+Na] ⁺	497,14237	497,14198	-0,784	LMPK12111050	2
	Salvigenina ²	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	[2M+Na] ⁺	679,17915	679,17754	2,371	HMDB0128577	2
	Vulgaxantina I	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₇	[M+2Na-H] ⁺	384,0778	384,07692	2,291	HMDB0029840	2
	Prolina ²	C ₅ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	116,07061	116,07095	2,971	HMDB0000162	2
	Valina ou norvalina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	[M+Na] ⁺	140,0682	140,06813	0,500	HMDB0000883	2
	Prolina betaína	C ₇ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	144,1019	144,10189	0,069	HMDB0004827	2
	Histidina	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	156,07675	156,07673	-0,148	HMDB0000177	2
	Ala Ala Pro Gly	C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₅	[M+2H] ²⁺	158,08706	158,08683	0,275	-	2
	Homometionina	C ₆ H ₁₃ NO ₂ S	[M+H] ⁺	164,07398	164,07374	-1,438	KEGG C17213	2
	Fenilalanina	C ₉ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	166,08626	166,08636	0,631	HMDB0000159	2
	Glutamina	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	[M+Na] ⁺	169,05836	169,05827	-0,552	HMDB0000641	2
	Arginina ¹	C ₆ H ₁₄ O ₂ N ₄	[M+H] ⁺	175,1195	175,1190	0,273	HMDB0000517	2
	Leucina, isoleucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	[M+2Na-H] ⁺	176,0658	176,06586	-0,341	HMDB0000687	2
	Citrulina ¹	C ₆ H ₁₃ O ₃ N ₃	[M+H] ⁺	176,10297	176,10308	-0,625	HMDB0000904	2
	Asparagina ¹	C ₄ H ₈ O ₃ N ₂	[M+2Na-H] ⁺	177,02466	177,02472	-0,339	HMDB0000168	2
	Alanylglicina	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	[M+K] ⁺	185,0323	185,03241	0,591	HMDB0006899	2
	Met-Thr-OH ou Ser-Met-OH	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₇ S	[M+H+Na] ²⁺	191,04054	191,04028	1,361	-	3
	Ácido glutâmico ¹	C ₈ H ₁₁ NS	[M+K] ⁺	192,02438	192,02436	-0,096	HMDB0000148	2
	Acetilcisteína	C ₅ H ₉ NO ₃ S	[M+ CH ₃ OH+ H] ⁺	196,06381	196,06379	-0,077	HMDB0001890	2
	Theanine	C ₇ H ₁₄ O ₃ N ₂	[M+Na] ⁺	197,08966	197,08965	-0,069	HMDB0034365	2
	fosfoserina ¹	C ₃ H ₈ NO ₆ P	[M+Na] ⁺	207,99811	207,99816	-0,240	HMDB0000272	2
	Gly-Norvaline ou Acetyl-L-ornithine	C ₇ H ₁₄ O ₃ N ₂	[M+K] ⁺	213,0636	213,06343	-0,801	-	3
	Triptopano	C ₁₁ H ₁₂ O ₂ N ₂	[M+Na] ⁺	227,07912	227,07912	0,093	HMDB0000929	2
	N-Methyl-L-proline	C ₆ H ₁₁ NO ₂	[2M+H-H ₂ O] ⁺	241,1548	241,15446	0,093	HMDB0094704	2
	Ser Ser Val ou Thr Thr Ala ²	C ₁₁ H ₂₁ N ₃ O ₆	[M+K] ⁺	330,1062	330,10535	2,575	-	3
	L-Arginine, L-aspartate	C ₁₀ H ₂₁ N ₅ O ₆	[M+Na] ⁺	330,1384	330,13849	0,259	Metlin 525382	2
	Cys Cys Ile ou Ala Cys Val ou Met Ala Ala	C ₁₁ H ₂₁ N ₃ O ₄ S	[M+2Na-H] ⁺	336,09699	336,09756	-1,696	-	3
	Ala His Pro ¹	C ₁₄ H ₂₁ N ₅ O ₄	[M+Na] ⁺	346,14858	346,14937	-2,282	-	3
	Gly-Phe-OH ou Phe-Gly-OH	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₆	[M+Na] ⁺	353,0744	353,07413	0,765	-	3
	Phenylalanyl-phenylalanyl-glycine ou Ac-Phe-Tyr-NH ₂	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₄	[M+H] ⁺	370,17613	370,17554	1,594	-	3
	His Ser Pro	C ₁₄ H ₂₁ N ₅ O ₅	[M+K] ⁺	378,11798	378,11743	1,454	-	3
	Val Arg Gln ou Arg Ile Asn	C ₁₆ H ₃₁ N ₇ O ₅	[M+H-H ₂ O] ⁺	384,23593	384,23533	1,562	-	3
	Cys His Cys	C ₁₂ H ₁₉ N ₅ O ₄ S ₂	[M+K] ⁺	400,05155	400,05094	1,525	-	3
	Pro Gln Val Cys ¹	C ₁₈ H ₃₁ N ₅ O ₆ S	[M+H-2H ₂ O] ⁺	410,1867	410,1866	0,244	-	3
Pro Pro His Ala	C ₁₉ H ₂₈ N ₆ O ₅	[M+H] ⁺	421,21939	421,21960	0,013	-	3	

	Gly Thr Ser Lys²	C ₁₅ H ₂₉ N ₅ O ₇	[M+K] ⁺	430,16986	430,1702	-0,790	-	3
	Cys Tyr Leu	C ₁₈ H ₂₇ N ₃ O ₅ S	[M+K] ⁺	436.1303	436.12964	1.513	-	3
	Cys Cys Phe Thr	C ₁₉ H ₂₈ N ₄ O ₆ S ₂	[M+H-2H ₂ O] ⁺	437,1323	437,13203	0,618	-	3
	Met Pro Gly Pro	C ₁₇ H ₂₈ N ₄ O ₅ S	[M+K] ⁺	439,1412	439,14208	-2,004	-	3
	Pro Trp Arg	C ₂₂ H ₃₁ N ₇ O ₄	[M+H-H ₂ O] ⁺	440,241	440,24087	0,295	-	3
	His Gly Cys Lys¹	C ₁₇ H ₂₉ N ₇ O ₅ S	[M+H] ⁺	444.2024	444.20241	-0.0225	-	3
	Lys Met Lys	C ₁₇ H ₃₅ N ₅ O ₄ S	[M+K] ⁺	444,2041	444,20424	-0,315	-	3
	Gln Ser Thr Gln ou Asn Lys Ser	C ₁₇ H ₃₀ N ₆ O ₉	[M+H-H ₂ O] ⁺	445,2047	445,20467	-0,607	-	3
	Asp							
	Gly Asn Asn Asp	C ₁₄ H ₂₂ N ₆ O ₉	[M+K] ⁺	457,10798	457,10826	0,603	-	3
	Asn Cys Ala Gln ou Gly Gln Gln Cys	C ₁₅ H ₂₆ N ₆ O ₇	[M+Na] ⁺	457,14759	457,14787	0,615	-	3
	Cys Asn Pro Ser	C ₁₅ H ₂₅ N ₅ O ₇ S	[M+K] ⁺	458,1106	458,11188	2,794	-	3
	Pro Val Arg Gly¹	C ₁₈ H ₃₃ N ₇ O ₅	[M+K] ⁺	466,2175	466,21734	-0,343	-	3
	Asp Pro Thr His ou Pro Glu His Ser	C ₁₉ H ₂₈ N ₆ O ₈	[M+H] ⁺	469,2041	469,20394	-0,341	-	3
	Lys Tyr Gly Ser	C ₂₀ H ₃₁ N ₅ O ₇	[M+Na] ⁺	476,2116	476,21263	2,163	-	3
	Gly Tyr Val Trp ou Ala Thr Trp Phe	C ₂₇ H ₃₃ N ₅ O ₆	[M+H-2H ₂ O] ⁺	488,2303	488,23119	1,823	-	3
	Gly Arg Arg Ala¹	C ₁₇ H ₃₄ N ₁₀ O ₅	[M+K] ⁺	497,23507	497,23541	-0,684	-	3
	Asp Asp Ser His	C ₁₇ H ₂₄ N ₆ O ₁₀	[M+K] ⁺	511,1185	511,11815	0,685	-	3
	Met His Val Ser ou Leu His Cys Thr	C ₁₉ H ₃₂ N ₆ O ₆ S	[M+K] ⁺	511,1736	511,17433	-1,428	-	3
	Thr Arg Arg Ala¹	C ₂₃ H ₃₆ N ₆ O ₉	[M+K] ⁺	541,26129	541,26135	-0,1111	-	3
	Cys Cys Met Tyr¹	C ₂₀ H ₃₀ N ₄ O ₆ S ₃	[M+K] ⁺	557,09591	557,09503	1,580	-	3
	Peptídeos	C ₂₃ H ₃₀ N ₆ O ₈	[M+2Na-H] ⁺	563,1837	563,18364	0,106	-	3
	Asp Trp Tyr Tyr	C ₃₃ H ₃₅ N ₅ O ₉	[M+2Na-H] ⁺	690,2146	690,21347	1,634	-	3
	Glycyl-L-valyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-L-glutaminy-L-lysine¹	C ₃₅ H ₅₅ N ₉ O ₉	[M+H] ⁺	746,4196	746,41986	0,348	-	3
	Peptídeos²	C ₃₆ H ₆₀ N ₁₂ O ₉	[M+H-H ₂ O] ⁺	787,4579	787,45886	-1,219	-	3
	Peptídeos²	C ₄₁ H ₇₅ N ₁₅ O ₁₀	[M+Na] ⁺	960,5714	960,57288	-1,541	-	3
	Glabrin C¹	C ₄₁ H ₆₄ N ₈ O ₉	[M+H] ⁺	813,48745	813,48785	-0,492	HMDB0033612	2
Fitohormônios e derivados	Esterol lípidios	C ₂₈ H ₄₆ O ₄	[M+H+Na] ²⁺	235,1681	235,16749	2,594	-	3
	Giberilina A37 glucosil ester¹	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₀	[M+2Na] ²⁺	277,1046	277,10478	0,650	HMDB0038611	2
	Ácido abscísico¹	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	[M+K] ⁺	303,0993	303,09906	0,792	HMDB0035140	2
	Carlactone¹	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	[M+Na] ⁺	325,17796	325,17727	-2,122	KEGG C20693	2
	Glucosídeo do ácido 7-Epi-12-hidroxijasmônico	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	[M+Na] ⁺	411,16225	411,16171	-2,052	HMDB0040706	2
Ácidos orgânicos	4-ácido Aminobenzoico	C ₇ H ₇ NO ₂	[M+Na] ⁺	160,0369	160,03683	-0,436	HMDB0001392	2
	Ácido málico	C ₄ H ₆ O ₅	[M+2Na-H] ⁺	178,9927	178,99267	0,168	HMDB0000744	2
	Ácido 3-oxomálico¹	C ₆ H ₆ O ₈	[M+H] ⁺	207,01354	207,01419	3,122	KEGGC01990	2
	Ácido arginínico	C ₆ H ₁₃ O ₃ N ₃	[M+2Na-H] ⁺	220,0665	220,06657	-0,318	HMDB0003148	2
	Ácido Coumárico²	C ₉ H ₈ O ₃	[2M+H] ⁺	367,0578	367,05771	0,042	HMDB0041592	2
	Ácido rosmarínico	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	[M+2Na-H] ⁺	405,0557	405,05544	0,642	HMDB0003572	2
Pentoses hexoses	C ₆ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	147,0652	147,06527	-0,476	-	3	
Trissacarídeos	C ₂₀ H ₃₇ NO ₁₄	[M+2H+Na] ³⁺	180,0751	180,07458	2,888	-	3	

Carboidratos e carboidratos conjugados	hexoses	C ₆ H ₁₂ O ₆	[M+Na] ⁺	203,05261	203,05252	-0,44	-	3
	D-erythro-L-galacto-Nonulose	C ₉ H ₁₈ O ₉	[M+Na] ⁺	293,0843	293,08417	0,444	HMDB0029955	2
	Cappariloside A¹	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₆	[M+H-H ₂ O] ⁺	317,11375	317,11467	-2,901	HMDB0034937	2
	Carboidratos e carboidratos conjugados	C ₁₁ H ₂₀ O ₁₀	[M+Na] ⁺	335,09487	335,09448	-1,158	-	3
	Carboidratos e carboidratos conjugados	C ₈ H ₁₆ N ₃ O ₈ P	[M+Na] ⁺	336,05727	336,05571	4,642	-	3
	Carboidratos	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₇	[M+H+Na] ²⁺	360,1115	360,11094	1,555	-	3
	Dissacarídeos	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	[M+K] ⁺	381,0794	381,07917	0,604	-	3
	1,2,10-Trihydroxydihydro-trans-linalyl oxide 7-O-beta-D-glucopyranoside	C ₁₆ H ₃₀ O ₁₀	[M+Na] ⁺	405,1730	405,17267	0,814	HMDB0033237	2
	Glucotropaeolin¹	C ₁₄ H ₁₉ NO ₉ S ₂	[M+H] ⁺	410,0574	410,05738	0,049	KEGG C02153	2
	4,6 dihidroxi – 2-metoxiacetofenona glucosídeo	C ₁₅ H ₂₀ O ₉	[M+2K-H] ⁺	421,0298	421,02941	-0,797	HMDB0034862	3
	Carboidratos	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	[M+Na] ⁺	425,1418	425,14156	0,565	-	3
	Metilpicraquasioside A	C ₁₉ H ₂₄ O ₁₀	[M+Na] ⁺	435,12617	435,12588	0,666	HMDB0038347	2
	4-fenilbutil glucosinolato²	C ₁₇ H ₂₅ NO ₉ S ₂	[M+Na] ⁺	474,0863	474,08589	-1,919	HMDB0038415	2
	Eugenol O-[α-L-Arabinofuranosyl-(1->6)-β-D-glucopiranoside]	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	[M+Na] ⁺	481,16803	481,16781	-0,463	HMDB37603	2
	Paeonolide	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₂	[M+Na] ⁺	483,14785	483,14753	-0,662	KEGG C10715	2
	Carboidratos	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	[M+Na] ⁺	527,1583	527,15778	0,986	-	3
	Sambacin	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₂	[M+K] ⁺	579,1838	579,18329	0,880	HMDB0038883	2
	Carboidratos	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	[M+Na] ⁺	689,2111	689,21037	1,059	-	3
	Carboidratos	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	[2M+Na] ⁺	939,3468	939,34622	0,617	-	3
	Alcaloides	Agroclavine¹	C ₈ H ₉ N	[M+H] ⁺	120,08078	120,080901	1,117	KEGG C09023
Trigonelina		C ₇ H ₇ NO ₂	[M+H] ⁺	138,055	138,05492	0,579	HMDB0000875	2
Metilispelletierina		C ₉ H ₁₇ NO	[M+K] ⁺	194,0942	194,09386	1,752	HMDB0030326	2
Elaeokanine C³		C ₁₂ H ₂₁ NO ₂	[M+H-H ₂ O] ⁺	194,15449	194,15399	2,575	KEGG C10592	
Gentiatibetine		C ₉ H ₁₁ NO ₂	[M+2Na-H] ⁺	210,05014	210,05003	0,524	HMDB0033485	2
Sedamine³		C ₁₄ H ₂₁ NO	[M+H] ⁺	220,1696	220,16949	0,500	C10171	2
Cistoditina A¹		C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₂	[M+H-2H ₂ O] ⁺	322,135	322,13498	0,062	Metlin 405397	2
1,2,3,4-Tetrahydro-1-(2-thio-3-pyrrolidiny)-beta-carboline-3-carboxylic acid		C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₂ S	[M+Na] ⁺	338,0934	338,0927	2,070	HMDB0034767	2
Aspidoalbina¹		C ₂₄ H ₃₂ N ₂ O ₅	[M+H] ⁺	429,2384	429,23973	-3,099	KEGGC09038	2
Isopulegol acetate ou Linalil acetato		C ₁₂ H ₂₀ O ₂	[M+H+Na] ²⁺	110,0714	110,07153	-1,181	-	3
Terpenos	Triterpenoides	C ₃₀ H ₄₆ O ₇	[M+2H] ²⁺	260,17	260,17033	-1,268	-	2
	Monoterpenoide¹	C ₁₃ H ₁₈ O ₄	[M+Na] ⁺	261,10973	261,10986	0,497	-	3
	Terpenos¹	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	[M+Na] ⁺	289,14103	289,14115	-0,415	-	3
	Acetylbalchanolide	C ₁₇ H ₂₄ O ₄	[M+H] ⁺	293,1747	293,17474	-0,136	HMDB0039275	2
	Lactapiperanol D¹	C ₁₈ H ₂₈ O ₅	[M+Na] ⁺	347,18344	347,18284	1,728	HMDB0036693	2
	Scalarolide¹	C ₂₅ H ₃₈ O ₃	[M+Na] ⁺	409,27132	409,27099	-0,797	HMDB0033631	2
	α-Tocopherolquinone²	C ₂₉ H ₅₀ O ₃	[M+Na] ⁺	469,36618	469,3652	2,088	HMDB34408	2

Lipídios	Triterpenoides	C ₂₇ H ₃₆ O ₆	[M+Na] ⁺	479,2404	479,24094	1,127	-	3
	Isoprenoides ²	C ₄₀ H ₅₄ O ₃	[M+H] ⁺	583,41457	583,41422	-0,603	-	3
	Triterpenoides ¹	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	[2M+H] ⁺	969,645	969,64784	-2,929	-	3
	Lipídios prenol ¹	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	[M+K] ⁺	275,1408	275,14071	0,327	-	3
	Lipídios esteróis ¹	C ₂₉ H ₅₀ O ₅	[M+Na] ⁺	501,35505	501,35502	-0,650	-	3
	Lipídios ¹	C ₅₁ H ₈₂ O ₂₃	[M+H+Na] ²⁺	543,2622	543,26186	0,626	-	3
	Lipídios ²	C ₃₅ H ₆₀ O ₃	[M+K] ⁺	567,4174	567,41614	-2,228	-	3
	Glicerolfosfolipídios ¹	C ₄₂ H ₇₈ NO ₈ P	[M+H] ⁺	756,55433	756,55289	1,903	-	3
	Glicerolfosfolipídios ¹	C ₄₂ H ₇₈ NO ₈ P	[M+Na] ⁺	778,5357	779,53526	0,565	-	3
	Glicerolfosfolipídios ¹	C ₄₃ H ₇₇ O ₁₂ P	[M+H-2H ₂ O] ⁺	781,5025	781,50306	-0,717	-	3
Glicerolfosfolipídios ¹	C ₄₅ H ₇₉ O ₁₀ P	[M+H-H ₂ O] ⁺	793,53835	793,54166	-4,171	-	3	
Outros	Colina ¹	C ₅ H ₁₃ ON	[M+H] ⁺	104,10699	104,10729	2,876	HMDB0000097	2
	Benzeneacetonitrila	C ₈ H ₇ N	[M+H] ⁺	118,0651	118,06529	-1,609	HMDB34171	2
	Ácido pirolutâmico	C ₅ H ₈ O ₃ N	[M+H] ⁺	130,04991	130,05002	1,156	HMDB0000267	2
	Cumarinas e derivados	C ₁₆ H ₁₈ O ₄	[M+2H] ²⁺	138,0675	138,06763	-0,942	-	3
	Glucosídeo	C ₁₁ H ₂₁ NO ₁₀ S ₃	[M+3H] ³⁺	142,0182	142,01848	-1,972	HMDB0038406	2
	Uridine 5'-diphosphate ³	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₁₂ P ₂	[M+2H+Na] ³⁺	143,002	143,0017	2,098	HMDB00295	2
	Quinolinas	C ₉ H ₇ NO	[M+H] ⁺	146,060	146,06002	-0,137	-	2
	4-Trimethylammoniobutanoic acid	C ₇ H ₁₅ NO ₂	[M+H] ⁺	146,1176	146,11746	0,958	HMDB0001161	2
	Histamina	C ₅ H ₉ N ₃	[M+2Na-H] ⁺	156,0508	156,05065	0,961	HMDB0000870	2
	pimelato	C ₇ H ₁₁ O ₄	[M+H] ⁺	159,06519	159,06525	0,407	HMDB0000857	2
	L-Carnitina	C ₇ H ₁₅ NO ₃	[M+H] ⁺	162,1125	162,112332	-0,925	HMDB0000062	2
	N-Acetylputrescine	C ₆ H ₁₄ N ₂ O	[M+2Na-H] ⁺	175,0818	175,08177	0,171	HMDB0002064	2
	Metileugenol	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	[M+H] ⁺	179,1067	179,10698	-1,563	HMDB0031864	2
	Éteres fenólicos	C ₁₄ H ₁₉ O	[M+H] ⁺	203,14304	203,14298	-0,0304	-	3
	fosforilcolina	C ₅ H ₁₅ NO ₄ P	[M+Na] ⁺	206,0558	206,05533	2,281	HMDB0001565	2
	Tiofenóis	C ₇ H ₈ OS	[M+2K-H] ⁺	216,9486	216,94892	-1,475	-	3
	Cumarinas	C ₁₁ H ₈ O ₅	[M+H] ⁺	221,04445	221,04451	0,06	-	3
	Álcoois e polióis ¹	C ₇ H ₁₄ O ₆	[M+K] ⁺	233,0422	233,04216	-0,157	-	3
	Fosfo L-Serina	C ₃ H ₈ NO ₆ P	[M+2Na-H] ⁺	229,98012	229,98009	-0,130	HMDB00272	2
	Xantina	C ₇ H ₈ N ₄ O ₃	[M+K] ⁺	235,0228	235,02283	0,134	HMDB0000292	2
	Taninos	C ₂₇ H ₂₀ O ₁₈	[M+2K-H] ⁺	236,9995	236,99965	0,633	-	3
	Hidroxicumarinas ¹	C ₁₃ H ₁₂ O ₄	[M+Na] ⁺	255,06278	255,06267	-0,432	-	3
	7-Hidroxi-2-metil-4-oxo-4H-1-benzopirano-5-ácido acético ¹	C ₉ H ₁₄ O ₆	[M+K] ⁺	257,0422	257,0411	0,350	HMDB40408	2
	Marmesin rutinoside ¹	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₃	[M+2H] ²⁺	278,10821	278,10821	-1,492	HMDB41413	2
	p-Coumaroylagmatine ¹	C ₁₄ H ₂₀ N ₄ O ₂	[M+2Na-H] ⁺	321,1298	321,13053	-2,273	KEGG C04498	2
	Salicylic beta-D-glucuronide	C ₁₅ H ₁₇ NO ₁₀	[M+H-2H ₂ O] ⁺	336,0725	336,07291	-1,220	HMDB0240252	2
	Bergenin ²	C ₁₄ H ₁₆ O ₉	[M+Na] ⁺	351,06865	351,06853	0,342	KEGG C09919	2
	4,5-Dihydropiperlonguminina	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	[M+2K-H] ²⁺	352,07173	352,07144	0,824	HMDB0041488	2
	2-[4-(3,4-Methylenedioxyphenyl)butyl]-4(1H)-quinolinone ¹	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	[M+2Na-H] ⁺	366,1077	366,10864	-2,568	HMDB0030382	2
	Acetoxytomatine	C ₅₂ H ₈₅ NO ₂₃	[M+2H+Na] ³⁺	372,1850	372,18533	-0,887	HMDB0034485	2
Estigmaterol	C ₂₉ H ₄₈ O	[M+H] ⁺	413,37779	413,37772	-0,716	HMDB0000937	2	
1-(3-Methylbutanoyl)-6-apiosylglucose	C ₁₆ H ₂₈ O ₁₁	[M+Na] ⁺	419,1524	419,15226	0,334	HMDB39953	2	
Taninos	C ₁₉ H ₂₆ O ₉	[M+Na] ⁺	421,1453	421,14602	-1,710	-	3	

1-O-Sinapoylglucose¹	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	[M+K] ⁺	425,08446	425,08509	-1,482	HMDB0041175	2
Estilbenos²	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	[M+K] ⁺	427,13649	427,1373	-1,896	-	3
N1,N10-Dicoumaroylspermidine	C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₄	[M+H] ⁺	438,2387	438,23843	0,616	HMDB0033469	2
Lipídios	C ₁₉ H ₃₀ O ₉	[M+K] ⁺	441,1521	441,15174	-0,816	-	3
1-Octen-3-yl primeveroside	C ₁₉ H ₃₄ O ₁₀	[M+K] ⁺	461,1784	461,17878	0,824	HMDB32960	2
Fenilpropanoides¹	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₄	[M+H] ⁺	483,0769	483,07564	-2,61	-	3
3-Fosfoglicerol-glutaciona¹	C ₁₃ H ₂₄ N ₅ O ₁₁ PS	[M+Na] ⁺	484,0761	484,07635	0,516	KEGG C03928	2
Brassinolide¹	C ₂₈ H ₄₈ O ₆	[M+Na] ⁺	503,3343	503,33444	0,278	HMDB0034081	2
glicose Ester ácido abscísico glicose	C ₂₁ H ₃₀ O ₉	[M+2K-H] ⁺	503,1063	503,10736	-2,107	KEGG C15970	2
Acetyl dipeptide-1 cetyl ester²	C ₃₃ H ₅₇ N ₅ O ₅	[M+H-2H ₂ O] ⁺	568,4232	568,42352	-0,563	Metlin 448263	2
Campesterol ferulate²	C ₃₈ H ₅₆ O ₄	[M+Na] ⁺	599,40708	599,40814	1,766	HMDB0036285	2
2-Octaprenylphenol	C ₄₆ H ₇₀ O	[M+2Na-H] ⁺	683,5138	683,5168	0,176	KEGG C05810	2
Crispanone²	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	[2M+K] ⁺	707,392	707,39087	1,597	HMDB35286	2
Anthenoside A¹	C ₃₈ H ₆₅ NO ₉	[M+2Na-H] ⁺	724,4371	724,43578	1,822	52931577	2
(3b,6b,8b,12a)-8,12-Epoxy-7(11)- eremophilene-6-angeloyloxy-8,12- dimethoxy-3-ol	C ₂₂ H ₃₄ O ₆	[2M+H-H ₂ O] ⁺	771,46834	771,46543	3,77	HMDB0031964	2
Taninos	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₃	[M+H] ⁺	803,0938	803,09414	-0,423	-	3
Pirofeofitina b¹	C ₅₃ H ₇₀ N ₄ O ₄	[M+H-H ₂ O] ⁺	809,537	809,53577	1,519	HMDB34248	2
Hebevinoside²	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₄	[M+H-2H ₂ O] ⁺	815,4952	815,49574	-0,662	HMDB35981	2
Feofitina a²	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	[M+H] ⁺	871,57375	871,57223	1,744	KEGG C05797	2
Clorofila a²	C ₅₅ H ₇₂ MgN ₄ O ₅	[M+H] ⁺	893,54314	893,54364	-0,560	HMDB0038578	2

¹Cd não perturbou a acumulação em ambos os órgãos (Folha e raiz) ²Metabólitos específicos de folha, Cd não perturbou a acumulação ³Metabólitos específicos de raiz, Cd não perturbou a acumulação

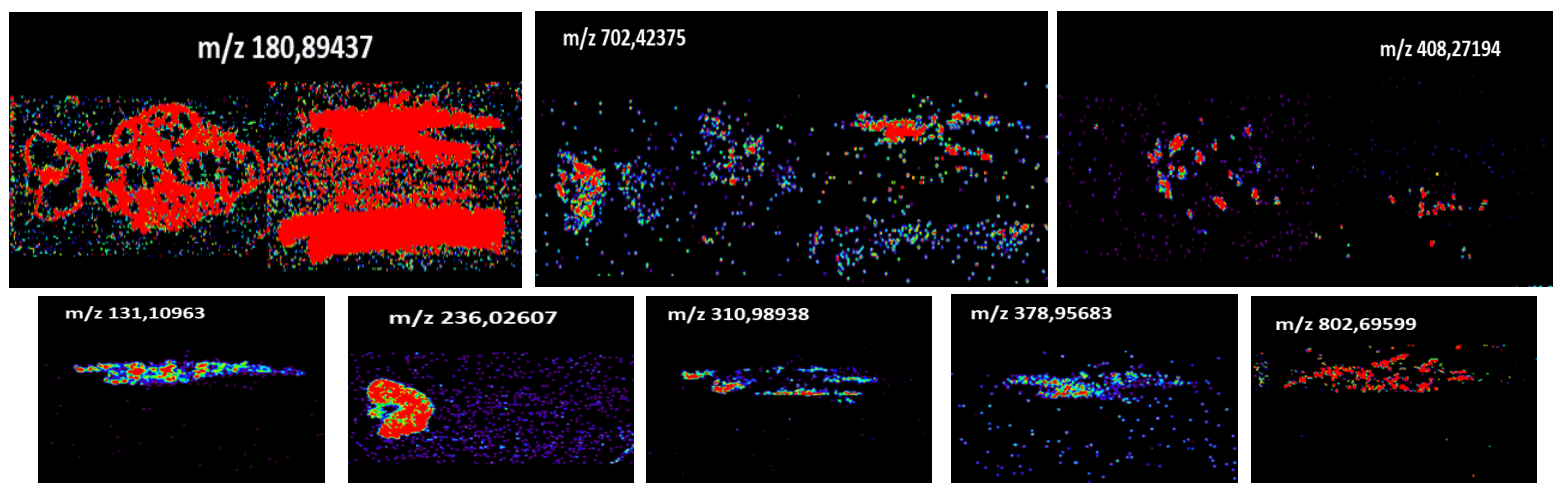


Figura 12A – Alguns metabólitos desconhecidos (potenciais biomarcadores e metabólitos inibidos) obtidos no *imprint* de folha e raiz de manjericão exposto à 0 e 25 µM de Cd^{II}