

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Influência de *P. aryabhattai* e salinidade no perfil metabolômico e no metabolismo antioxidante da cultura de soja

Julia Lunara Jesuino
Magister Scientiae

**RIO PARANAÍBA - MINAS GERAIS
2025**

JULIA LUNARA JESUINO

Influência de *P. aryabhattai* e salinidade no perfil metabolômico e no metabolismo antioxidante da cultura de soja

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: André Luiz Firmino

**RIO PARANAÍBA - MINAS GERAIS
2025**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba

T

J58i
2025
Jesuino, Julia Lunara, 1998-
Influência de *P. aryabhatai* e salinidade no perfil
metabolômico e no metabolismo antioxidante da cultura de soja /
Julia Lunara Jesuino. – Rio Paranaíba, MG, 2025.
29 f.: il.

Orientador: OUTROS.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Agronomia - Produção Vegetal, 2025.

Referências bibliográficas: 26-29.

1. *Bacillus*. 2. Cloreto de potássio. 3. Estresse.
4. Metabolômica. I. , -0001-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Agronomia - Produção Vegetal.
Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal). III. Título.

633.34

JULIA LUNARA JESUINO

Influência de *P. aryabhattai* e salinidade no perfil metabólico e no metabolismo antioxidante da cultura de soja

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de janeiro de 2025.

Assentimento:

Julia Lunara Jesuino
Autora

André Luiz Firmino
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 15/04/2025 às 09:51:18 e pelo orientador em 15/04/2025 às 10:57:09. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **O8ZY.YT5X.P7R7** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois tudo que sou é resultado da Sua graça.

Sou grata à minha família pelo apoio constante. Sempre foram meu pilar, proporcionando amor e motivação nos momentos mais difíceis. Sem a compreensão e o carinho de vocês, essa jornada teria sido muito mais desafiadora.

A todos os amigos da pós-graduação, com um carinho especial para Layane Laura, você que tem estado ao meu lado desde os tempos da graduação e aceitou o desafio de estarmos juntas, sempre acreditou em nosso potencial. Esta etapa não teria sido possível sem você.

À Universidade Federal de Viçosa pela chance de cursar a pós-graduação. Um agradecimento especial para Fabrícia e Sinara, pela paciência e por sempre esclarecerem nossas dúvidas ao longo da jornada. Também agradeço a todos os professores pelo carinho e pelos conhecimentos compartilhados.

Sinto-me muito grata ao meu orientador, André Luiz Firmino, pela sua disponibilidade, confiança e atenção dedicada. Também quero expressar minha gratidão ao meu coorientador, Walter Vieira, pela parceria durante toda minha jornada acadêmica e pelos valiosos ensinamentos pessoais.

Um agradecimento especial a Letícia Mariane, Kassia, Juliana, Robert, Lindolfo, Brena e Natália pela amizade e pelo empenho nas análises. Vocês foram essenciais para alcançarmos essa conquista!

A Sementes Ouro Verde, que valoriza a importância da capacitação, por oferecer tempo e recursos necessários para a realização desse trabalho. Agradeço pela confiança e pelo apoio durante todo esse processo.

Ao Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), por fornecer a infraestrutura necessária para conduzir o experimento. E ao Grupo de Pesquisa em Análise Metabolômica, por permitir a realização das análises metabolômicas. Agradeço especialmente pela paciência e ajuda na condução desse estudo.

A todos vocês, e também àqueles que contribuíram indiretamente, meu sincero reconhecimento e agradecimento. Este trabalho é resultado de um esforço conjunto; sem a colaboração, apoio e incentivo de cada um, não teria chegado até aqui. Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Os caminhos que nos trouxeram até aqui não serão os mesmos que nos levarão daqui em diante.”

RESUMO

JESUINO, Julia Lunara, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2025. **Influência de *P. aryabhatai* e salinidade no perfil metabolômico e no metabolismo antioxidante da cultura de soja.** Orientador: André Luiz Firmino.

A agricultura brasileira desempenha um papel fundamental na economia, com a soja representando 58% da área cultivada no país. Apesar dessa área expressiva, a produtividade média ainda enfrenta desafios, alcançando apenas 58 sacas por hectare. Dentre os desafios enfrentados pela cultura, está a salinidade, que pode ser ocasionada por condições ambientais adversas ou por aplicações específicas de insumos. Nesse contexto, o uso de microrganismos, como as bactérias promotoras de crescimento de plantas, surge como uma estratégia promissora para mitigar os efeitos negativos desse estresse e melhorar a produtividade. Este estudo analisou a metabolômica e o metabolismo antioxidante da soja em resposta a diferentes condições, incluindo o uso de atenuador biótico (MPCP) e estresse abiótico (salinidade), associados ou não. O experimento foi realizado entre fevereiro e março de 2024, em casa de vegetação em Patos de Minas, MG. Utilizou-se a variedade de soja Olimpo IPRO. Cada parcela experimental consistiu em um vaso de 8 dm³, sendo os tratamentos: T1) Controle, T2) Cloreto de potássio, T3) *Priestia aryabhatai* e T4) *P. aryabhatai* + Cloreto de potássio. O estresse salino foi induzido com 12 dias, com a aplicação do cloreto de potássio (KCl) em concentração no solo de 4 dS m⁻¹. O delineamento utilizado foi de blocos casualizados, com dez repetições, totalizando 40 parcelas experimentais. Avaliou-se o metabolismo antioxidante através da atividade da peroxidase (POD), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT); a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a peroxidação lipídica (PL); além do perfil metabolômico. Os dados foram tabulados e analisados estatisticamente. Para os dados de metabolismo antioxidante utilizou-se o Software Speed Stat® e teste de Tukey, e para o perfil metabolômico utilizou-se o software MetaboAnalyst 5.0® e teste-t, ambos a 5% de significância. Os resultados para o metabolismo antioxidante mostraram aumentos significativos na atividade da SOD e da POD para o T2, além de redução nos teores de H₂O₂ e PL para os tratamentos 2 e 4. Além disso, o T3, apresentou aumento na produção de H₂O₂ e PL. Já a análise metabolômica, notou-se aumento no ácido palmítico/esteárico no controle, quando comparado a aplicação apenas da bactéria. Ainda se observou outros compostos significativos, especialmente para o T4, com aumento na produção de ácido fumárico e ácido succínico, quanto ao controle.

Esses resultados demonstram que a salinidade pode causar o efeito *primming*, ativando enzimas antioxidantes e ativando rotas metabólicas de defesa. Além disso, a presença de microrganismos, como o *P. aryabhatai*, pode inibir a síntese de ácidos graxos e vias do metabolismo secundário. Assim, conclui-se que a aplicação de KCl pode provocar o efeito *primming* positivo nas plantas, promovendo alteração no metabolismo antioxidante e no perfil metabolômico. Além disso, nas condições do estudo, o uso de *P. aryabhatai* promoveu efeito negativo nas plantas, potencializando o estresse oxidativo.

Palavras-chave: *Bacillus*; Cloreto de potássio; Estresse; Metabolômica.

ABSTRACT

JESUINO, Julia Lunara, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2025. **Influence of *P. aryabhatai* and salinity on the metabolomic profile and antioxidant metabolism of soybean crops.** Adviser: André Luiz Firmino.

Brazilian agriculture plays a fundamental role in the economy, with soy representing 58% of the cultivated area in the country. Despite this significant area, average productivity still faces challenges, reaching only 58 bags per hectare. Among the challenges faced by the crop is salinity, which can be caused by adverse environmental conditions or specific applications of inputs. In this context, the use of microorganisms, such as plant growth-promoting bacteria, appears as a promising strategy to mitigate the negative effects of this stress and improve productivity. This study analyzed the metabolomics and antioxidant metabolism of soybeans in response to different conditions, including the use of biotic attenuator (MPCP) and abiotic stress (salinity), associated or not. The experiment was carried out between February and March 2024, in a greenhouse in Patos de Minas, MG. The Olimpo IPRO soybean variety was used. Each experimental plot consisted of an 8 dm³ pot, with the treatments being: T1) Control, T2) Potassium chloride, T3) *Priestia aryabhatai* and T4) *P. aryabhatai* + Potassium chloride. Salt stress was induced after 12 days, with the application of potassium chloride (KCl) at a concentration of 4 dS m⁻¹ in the soil. The design used was a randomized block design, with ten replications, totaling 40 experimental plots. Antioxidant metabolism was evaluated through the activity of peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT); the production of hydrogen peroxide (H₂O₂) and lipid peroxidation (PL); in addition to the metabolomic profile. The data were tabulated and statistically analyzed. For antioxidant metabolism data, the Speed Stat® Software and Tukey test were used, and for the metabolomic profile, the MetaboAnalyst 5.0® software and t-test were used, both at 5% significance. The results for antioxidant metabolism showed significant increases in the activity of SOD and POD for T2, in addition to a reduction in the levels of H₂O₂ and PL for treatments 2 and 4. Furthermore, T3 showed an increase in the production of H₂O₂ and PL. In the metabolomic analysis, an increase in palmitic/stearic acid was noted in the control, when compared to the application of just the bacteria. Other significant compounds were also observed, especially for T4, with an increase in the production of fumaric acid and succinic acid, as for the control. These results demonstrate that salinity can cause a priming effect, activating antioxidant enzymes and activating metabolic defense routes.

Furthermore, the presence of microorganisms, such as *P. aryabhattai*, can inhibit the synthesis of fatty acids and secondary metabolism pathways. Thus, it is concluded that the application of KCl can cause a positive priming effect in plants, promoting changes in antioxidant metabolism and metabolomic profile. Furthermore, under the study conditions, the use of *P. aryabhattai* had a negative effect on plants, increasing oxidative stress.

Keywords: *Bacillus*; Potassium chloride; Stress; Metabolomics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-Atividade da superóxido dismutase (SOD) [μmg proteína μg^{-1}] no ensaio “Influência de <i>P. aryabhatai</i> e salinidade no perfil metabolômico e no metabolismo antioxidante da cultura de soja”. Rio Paranaíba, MG.	19
Figura 2-Atividade da peroxidase (POD) [μmol [purpurogalina] min^{-1} mg^{-1} proteína]. no ensaio “Influência de <i>P. aryabhatai</i> e salinidade no perfil metabolômico e no metabolismo antioxidante da cultura de soja”. Rio Paranaíba, MG.....	20
Figura 3- Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [μmol g^{-1} de matéria fresca] no ensaio “Influência de <i>P. Aryabhatai</i> e salinidade no perfil metabolômico e no metabolismo antioxidante da cultura de soja”. Rio Paranaíba, MG.....	21
Figura 4- Conteúdo de peroxidação lipídica [nmol de TBARS] no ensaio “Influência de <i>P. aryabhatai</i> e salinidade no perfil metabolômico e no metabolismo antioxidante da cultura de soja”. Rio Paranaíba, MG.	22
Figura 5- Boxplot do composto significativamente diferente entre o grupo tratado com bactéria (<i>P. aryabhatai</i>) e grupo controle, representados respectivamente pelas cores vermelha e verde. Rio Paranaíba, MG.	23
Figura 6- Heatmap dos compostos que apresentaram diferença significativa entre o tratamento de <i>P. aryabhatai</i> e o sal KCl em comparação ao controle. Rio Paranaíba, MG.	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1	Descrição e caracterização do experimento.....	14
2.2	Avaliações	14
2.2.1	<i>Localização e caracterização do experimento</i>	<i>15</i>
2.2.2	<i>Metabolismo antioxidante</i>	<i>15</i>
2.2.2.1	<i>Superóxido dismutase</i>	<i>15</i>
2.2.2.2	<i>Peroxidase</i>	<i>15</i>
2.2.2.3	<i>Peróxido de hidrogênio</i>	<i>16</i>
2.2.2.4	<i>Peroxidação de lipídios</i>	<i>16</i>
2.2.3	<i>Metabolômica</i>	<i>17</i>
2.2.4	<i>Análise estatística.....</i>	<i>18</i>
3	RESULTADOS	18
3.1	Metabolismo antioxidante.....	18
3.1.1	<i>Superóxido dismutase.....</i>	<i>18</i>
3.1.2	<i>Enzima peroxidase.....</i>	<i>19</i>
3.1.3	<i>Peróxido de hidrogênio</i>	<i>20</i>
3.1.4	<i>Peroxidação Lipídica</i>	<i>21</i>
3.2	Metabolômica.....	22
4	DISCUSSÃO.....	24
5	CONCLUSÕES.....	26
	REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira desempenha um papel fundamental na economia nacional, abrangendo uma área de 81,39 milhões de hectares na produção de grãos (CONAB, 2024). Essa atividade contribui direta e indiretamente para o desenvolvimento do país. Dentre as culturas mais expressivas, destaca-se a soja, conforme dados da CONAB (2024), a cultura ocupa 58% da área cultivada no território nacional na safra 2024/25.

A expansão da cultura do norte ao sul do Brasil, apresenta desafios relacionados à produtividade, pois apesar das grandes áreas cultivadas, a produtividade média é baixa, cerca de 58 sc ha⁻¹ (CONAB, 2024). Isso ocorre devido a fatores bióticos (organismos vivos) e abióticos (umidade, temperatura, nutrientes, entre outros) que as plantas estão sujeitas no campo, e podem causar estresse oxidativo e morte celular (MORAES *et al.*, 2022).

Entre os estresses de maior frequência, está o estresse salino, ou salinidade, que ocorre principalmente devido ao manejo inadequado de fertilizantes e corretivos. Essa salinidade ocorre quando a concentração de sais solúveis no solo é superior a 4,0 dS m⁻¹, podendo ser cátions de sódio (Na⁺), cálcio (Ca²⁺), magnésio (Mg²⁺) e potássio (K⁺), e/ou os ânions cloreto (Cl⁻), sulfato (SO₄²⁻), e nitrato (NO₃⁻) (EMBRAPA, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

O excesso de sais causa efeitos osmóticos, restringindo o transporte de água e levando à redução da abertura estomática e da fotossíntese. Com o tempo, o acúmulo de íons no citosol pode resultar em toxicidade. A resistência das plantas à salinidade varia conforme sua capacidade de compartimentar íons nos vacúolos e manter um balanço K⁺/Na⁺ (SILVEIRA, 2010).

Nas plantas, esse estresse causa desequilíbrio generalizado, reduz significativamente os processos fisiológicos e bioquímicos, inibe a fotossíntese e ativa um complexo de rota metabólica que envolve múltiplas transduções de sinal, incluindo cálcio, proteínas quinases e fosfatases. Além disso, aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são moléculas instáveis e altamente reativas, incluindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radicais superóxido (O₂^{•-}), radicais hidroxila (OH[•]) e oxigênio singlete (¹O₂). Essas moléculas podem acelerar as reações tóxicas, como mutações no DNA, degradação de proteínas e danos à membrana (ISLAM *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Para atenuar tais efeitos, estudos demonstram que o uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas pode ser uma opção. Essas bactérias apresentam mecanismos de tolerância ao sal, que incluem: (i) liberação de hormônios reguladores do crescimento de plantas (IAA, ABA, GA e citocininas); (ii) produção de enzimas ACCD que reduzem o nível de etileno

no tecido radicular; (iii) resiliência sistêmica induzida (ISR), e (iv) liberação de substâncias extrapoliméricas, como exopolissacarídeos (EPSs) e enzimas extracelulares (SHAHID *et al.*, 2022).

Nesse sentido, o gênero *Priestia* (gram-positivas, família *Bacillaceae*), anteriormente classificado como *Bacillus*, pode promover crescimento vegetal e prevenir estresse abiótico, como salinidade, quando associados às raízes das culturas (REZENDE *et al.*, 2021). Segundo Lu *et al.* (2021), o uso de *Pantoea ananatis*, melhorou o estresse oxidativo induzido por cloreto de sódio e melhorou os parâmetros de crescimento de mudas de arroz sintetizando vários metabólitos. Ainda, Abd_Allah *et al.* (2018), observaram que uma cepa endofítica, de *Bacillus subtilis*, aumentou a tolerância ao cloreto de sódio em grão de bico, regulando enzimas antioxidantes (peroxidase, catalase, superóxido dismutase e glutatona oxidase) e não antioxidantes. Apesar disso, atualmente, há uma carência de estudos nesse âmbito nas principais culturas produzidas no Brasil, incluindo a soja.

Assim, empregou-se a abordagem metabolômica exploratória para identificar e quantificar metabólitos diferencialmente acumulados na parte aérea da soja. Além disso, correlacionou-se com o metabolismo antioxidante, incluindo atividade enzimática (POD, SOD e CAT); teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica (PL). Essas enzimas antioxidantes previnem a formação de radicais livres e reduzem a produção de peróxido de hidrogênio, mitigando a peroxidação lipídica. O resultado obtido por meio de comparação entre organismos aplicados a diferentes ambientes pode ajudar nas descobertas de biomarcadores, fenotipagem metabólica e até a fisiologia ou toxicologia (PILON *et al.*, 2020; RAKUSANOVA; CAJKA, 2024).

O objetivo deste trabalho foi investigar a produção de metabólitos e alterações no metabolismo antioxidante da soja em resposta ao estresse salino e a presença de bactéria promotora de crescimento, em associação ou não.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição e caracterização do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, entre fevereiro a março de 2024. As avaliações bioquímicas, foram realizadas no Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). A análise metabólica foi conduzida no Laboratório de Bioquímica, da Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paraíba (UFV).

No experimento, foi utilizada a espécie *Glycine max* (L.) Merrill, variedade cultivada BRASMAX OLIMPO IPRO, que possui ciclo de aproximadamente 135 dias na região do Alto Paranaíba.

Utilizou-se delineamento de blocos casualizados, sendo cada vaso de 8L uma unidade experimental. Os vasos foram preenchidos com latossolo vermelho agricultável corrigido quimicamente, conforme recomendações da cultura (ALVAREZ *et al.*, 1999). Posteriormente foi misturado areia, na proporção de 1:1. Na semeadura utilizou-se 6 sementes por vaso.

Foram testados quatro tratamentos, sendo: (i) Controle, (ii) Cloreto de potássio (iii) *Priestia aryabhatai* e (iv) *P. aryabhatai* + Cloreto de potássio, com 10 repetições. Foi realizado a aplicação de *P. aryabhatai* com 5 ml, Kg UFC= 1×10^8 UFC/ml no tratamento da semente, deixado em contato por 5 minutos e posteriormente feito a semeadura.

Para simular o estresse salino, foi feita a adição gradativa do sal. Para isso, realizou-se a irrigação manual com a solução de cloreto de potássio (KCl), com início aos 12 dias após a semeadura (DAS) e posteriormente, semanalmente até a condutividade elétrica chegar a 4 dS m^{-1} . A concentração dos sais foi calculada pela equação: $[Cs (mmolc L^{-1}) = CE \times 10]$ em que: Cs = Concentração de sais; CE = condutividade elétrica pré-estabelecida (RHOADES *et al.*, 2000). A condutividade da solução do solo foi mensurada utilizando-se o condutivímetro digital.

No estágio V₁ foi realizado o desbaste, mantendo quatro plantas por vaso. Além disso, para monitorar a necessidade de irrigação, foi instalado um tensiômetro na profundidade de 10 cm, em um dos vasos. Para a irrigação, foi considerada a capacidade de campo de 40% a 65% de umidade (leitura de medidor pH Solo Terra Digital), conforme necessidade da cultura.

2.2 Avaliações

2.2.1 *Localização e caracterização do experimento*

As avaliações do metabolismo antioxidante foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP), no UNIPAM, e as análises metabolômicas no Grupo de Pesquisa em Análise Metabolômica (GEPAM), da Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Rio Paranaíba.

A coleta para as análises ocorreu quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento V₄. Para isso, todas as folhas desenvolvidas foram retiradas, embaladas em papel alumínio e congeladas em nitrogênio líquido, com a intenção de paralisar todas as reações imediatamente.

As folhas foram trituradas com pistilo em nitrogênio líquido. Em seguida, foram incorporados 10 mL de distribuição de fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹, pH 6,8, para diluição do extrato. As amostras foram detalhadas para tubos tipo Eppendorf e centrifugados a 10.000 rpm (6.000 g) por 30 minutos a 4°C (KAR; MISHRA, 1976). Após a centrifugação, as amostras foram divididas em duas sub amostras e armazenadas a -20°C para posterior análise do metabolismo antioxidante e estudo metabolômico.

2.2.2 *Metabolismo antioxidante*

2.2.2.1 *Superóxido dismutase*

A atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) foi determinada conforme o protocolo de Beauchamp e Fridovich (1971). Durante a preparação dos reagentes, os frascos foram envoltos em papel alumínio para evitar a influência da luz nas reações. Em um tubo de ensaio, foram misturados 2000 µL de concentrado de fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 7,8; 30 µL de extrato enzimático, 450 µL de solução de *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) + EDTA (5:4) e 500 µL de solução de Metionina + Riboflavina (1:1). As amostras foram comprovadas em duplicata: uma das amostras foi exposta à luz por 10 minutos, sem a proteção do papel alumínio, enquanto a outra foi mantida coberta. Após esse período, realizou-se a leitura de absorbância a 560 nm em espectrofotômetro.

2.2.2.2 *Peroxidase*

A atividade da peroxidase (POD) foi determinada conforme o protocolo descrito por Teisseire e Guy (2000). Em um tubo de ensaio, adicionou-se 500 μL de fosfato de potássio 50 mmol L^{-1} (pH 6,5), 30 μL de extrato enzimático, 250 μL de pirogalol (1,2,3-benzenotriol) a 20 mmol L^{-1} e 220 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 5 mmol L^{-1} , totalizando 1 mL. Os tubos de ensaio foram mantidos à temperatura ambiente por cinco minutos. Após esse período, a formação de purpurogalina, que apresenta coloração arroxeadada, foi quantificada em espectrofotômetro UV-visível a 430 nm. Para calcular a atividade enzimática, foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 2, 5 $\text{mmol L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, com a atividade expressa em μmol [purpurogalina] $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ [proteína].

2.2.2.3 *Peróxido de hidrogênio*

O teor de peróxido de hidrogênio foi quantificado por meio da reação com iodeto de potássio (KI), conforme descrito por Alexieva *et al.*, (2001). Em meio ácido, o iodeto de potássio reage com o peróxido de hidrogênio, liberando iodo e água, gerando um composto com coloração laranja-avermelhada. Para essa análise, 200 mg de folhas foram trituradas com pistilo em 1 mL de TCA a 0,1%. As amostras foram transferidas para tubos e centrifugadas a 9700 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, 200 μL do sobrenadante foi adicionado a 200 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 μL de uma solução de KI 1 mL. A solução de branco continha a mesma mistura, mas com 200 μL de TCA a 0,1% de substituição sobrenadante. As amostras foram mantidas no gelo e no escuro por uma hora. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 390 nm, e a quantidade de H_2O é expressa em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca.

2.2.2.4 *Peroxidação de lipídios*

A determinação foi realizada de acordo com a metodologia de Heath e Packer (1968). Inicialmente, 200 mg de material vegetal liofilizado em nitrogênio foram homogeneizados em 5 mL de solução contendo 0,25% de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% de ácido tricloroacético (TCA). O conteúdo foi transferido para tubos de ensaio com tampa e envolto em papel filme, sendo então incubado em banho-maria a 90°C por 1 hora. Após o resfriamento, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos à temperatura ambiente, em seguida, o sobrenadante coletado de cada amostra foi submetido a leituras de absorbância em

espectrofotômetro nas faixas de 560 e 600 nm. Os resultados são expressos em nmol de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por grama de matéria fresca.

2.2.3 *Metabolômica*

Para a análise metabolômica foi adotada metodologia adaptada por Eides (2024). Inicialmente, foi feita a extração utilizando 10 mg de folha e 2 ml de solução extratora a base de metanol (MeOH), clorofórmio (CHCl₃) e água ultra-pura (3:1:1), com 25 µL/ml de Adonitol Purex como padrão interno. As amostras, juntamente com a solução extratora, foram submetidas a agitação em disruptor de células (L-Beader 6 Loccus®), operando a 3500 rpm em ciclos de 60 segundos de agitação intercalados com 30 segundos de repouso. Esse processo foi auxiliado por esferas de aço inoxidável de 2,8 mm de diâmetro, após a agitação, 1 ml do sobrenadante foi transferido para novos microtubos e acrescentou-se 300 µL de Hexano (P.A). Em seguida, as amostras foram mantidas em repouso por 3 minutos e 500 µL do meio foram retirados e colocados em microtubos para secagem em concentrador de amostras a 40 °C ao longo de 16 horas.

Após a secagem das amostras, fez-se a derivatização. Para isso, foram adicionados 50 µL de solução de piridina (a base de hidrocloreto de metoxiamina e piridina – 20 mg/ml) e em seguida as amostras foram mantidas em bloco concentrador a 37°C por 2 horas. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex por 5 segundos, seguido da adição de 50 µL de solução BSFTA [Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide]. As amostras foram mantidas em repouso a 37 °C por 30 minutos para garantir a completa derivatização. Em seguida, as alíquotas derivatizadas foram transferidas para frascos de 2 ml contendo inserções redutoras de volume de 200 µL, preparadas para análise por GC-MS.

A análise foi realizada por cromatografia gasosa, utilizando espectrômetro de massas acoplado (GCMS-QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com coluna capilar DB-5MS (30 m × 250 µm diâmetro interno). A temperatura de injeção de amostras utilizada foi de 300 °C, com fluxo constante de gás hélio de 1,0 ml/min durante todo o processo. A temperatura inicial para separação cromatográfica foi de 80°C, sendo mantida por 2 minutos. Posteriormente, realizou-se o aumento da temperatura em 5°C a cada minuto, até a temperatura máxima de 315°C. Essa temperatura foi mantida por 5 minutos.

Os cromatogramas obtidos foram processados por meio do software MS-DIAL. Em seguida, os metabólitos foram anotados baseando-se na biblioteca NIST de acordo com a razão massa/carga dos fragmentos obtidos (TSUGAWA *et al.*, 2015).

2.2.4 Análise estatística

Após a realização das análises foi feita a tabulação dos dados. Nas análises do sistema antioxidante, os dados foram submetidos a análise de homoscedasticidade e normalidade. Posteriormente, realizou-se análise de variância e, quando significativa, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância, com o auxílio do Software Speed Stat® (CARVALHO *et al.*, 2020). As análises estatísticas dos dados de metabolômicas foram realizadas pelo software MetaboAnalyst 5.0 com uso do teste-t com p-valor < 0,05 sendo tomado como significativo e uso do fold change (FC) para avaliação da magnitude dos dados (XIA; WISHART, 2016).

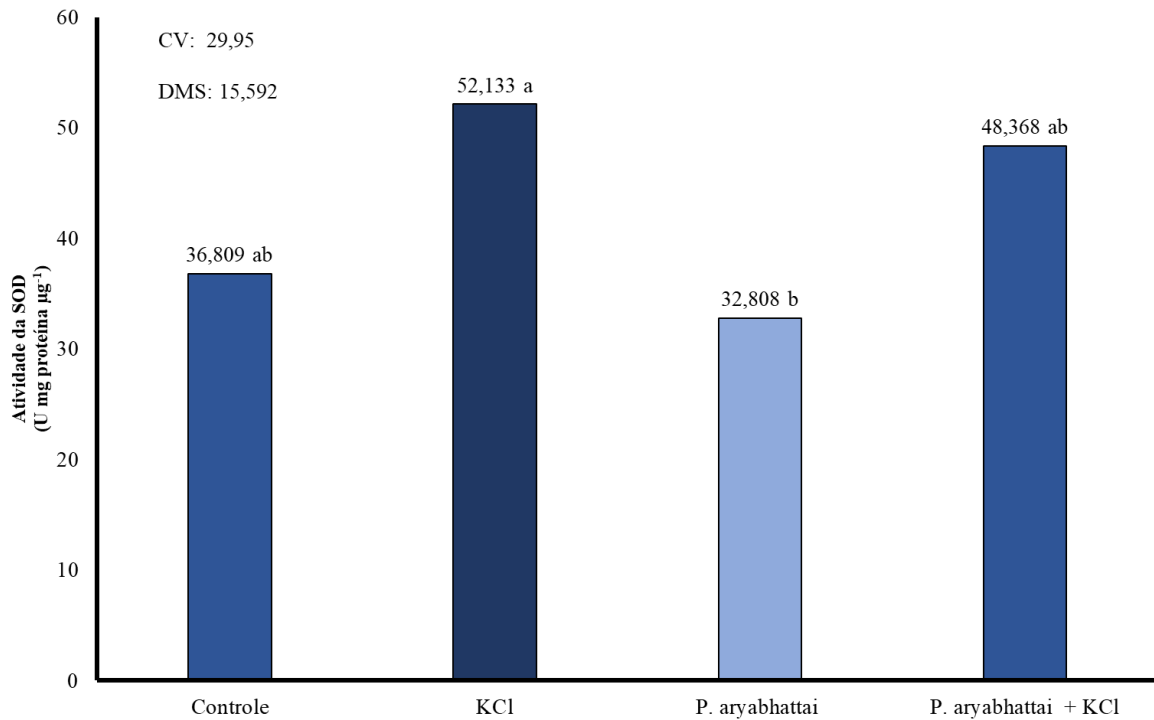
3 RESULTADOS

3.1 Metabolismo antioxidante

3.1.1 Superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) apresentou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos utilizados (Figura 1). O tratamento com apenas a aplicação de KCl apresentou um acréscimo de 41,6% em comparação ao Controle, e 58,9% em relação a aplicação do *P. aryabhattai*.

Figura 1-Atividade da superóxido dismutase (SOD) [$\mu\text{mg proteína } \mu\text{g}^{-1}$] no ensaio “Influência de *P. aryabhatai* e salinidade no perfil metabolômico e no metabolismo antioxidante da cultura de soja”. Rio Paranaíba, MG.



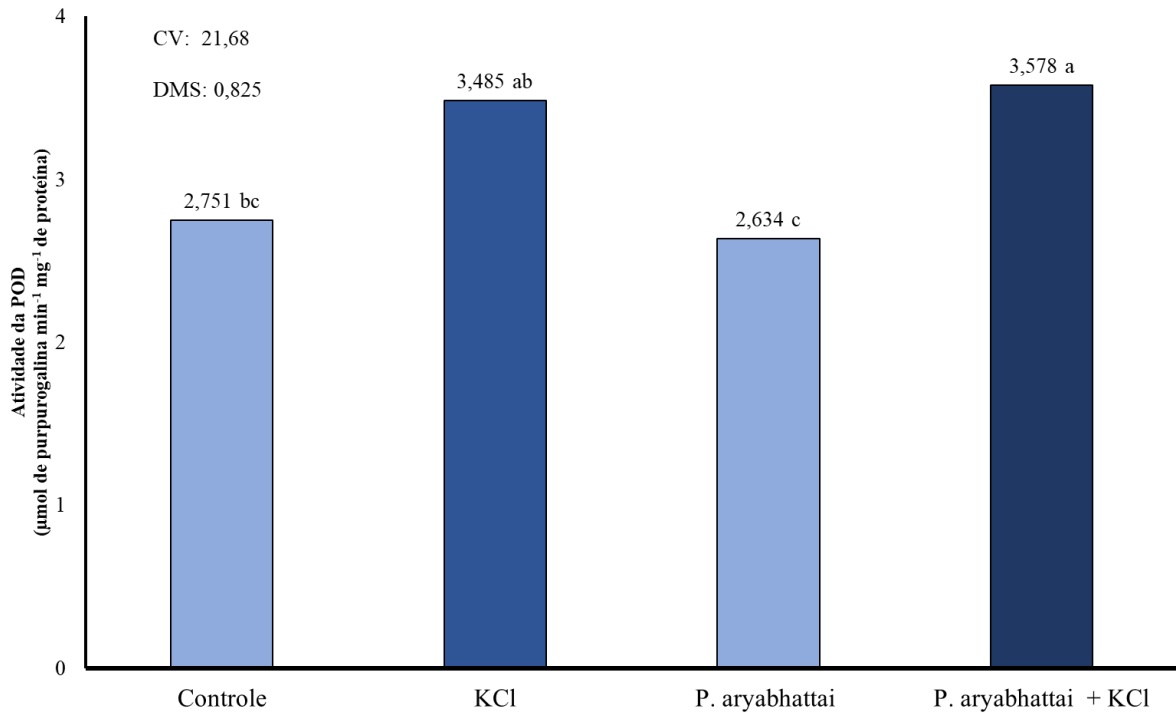
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

3.1.2 Enzima peroxidase

Ao analisar a atividade da enzima peroxidase (POD), constata-se que houve aumento tanto quando adicionado o KCl isolado, quanto junto a bactéria *P. aryabhatai* (Figura 2). O aumento foi de 26,6% e 32,2% respectivamente, comparado ao controle.

Já o tratamento que recebeu apenas a bactéria, apresentou menor atividade enzimática, sendo quando comparado ao uso isolado de KCl (24,42%) e associação da bactéria com KCl (26,38%).

Figura 2-Atividade da peroxidase (POD) [μmol [purpurogalina] min^{-1} mg^{-1} proteína]. no ensaio “Influência de *P. aryabhatai* e salinidade no perfil metabólico e no metabolismo antioxidante da cultura de soja”. Rio Paranaíba, MG.

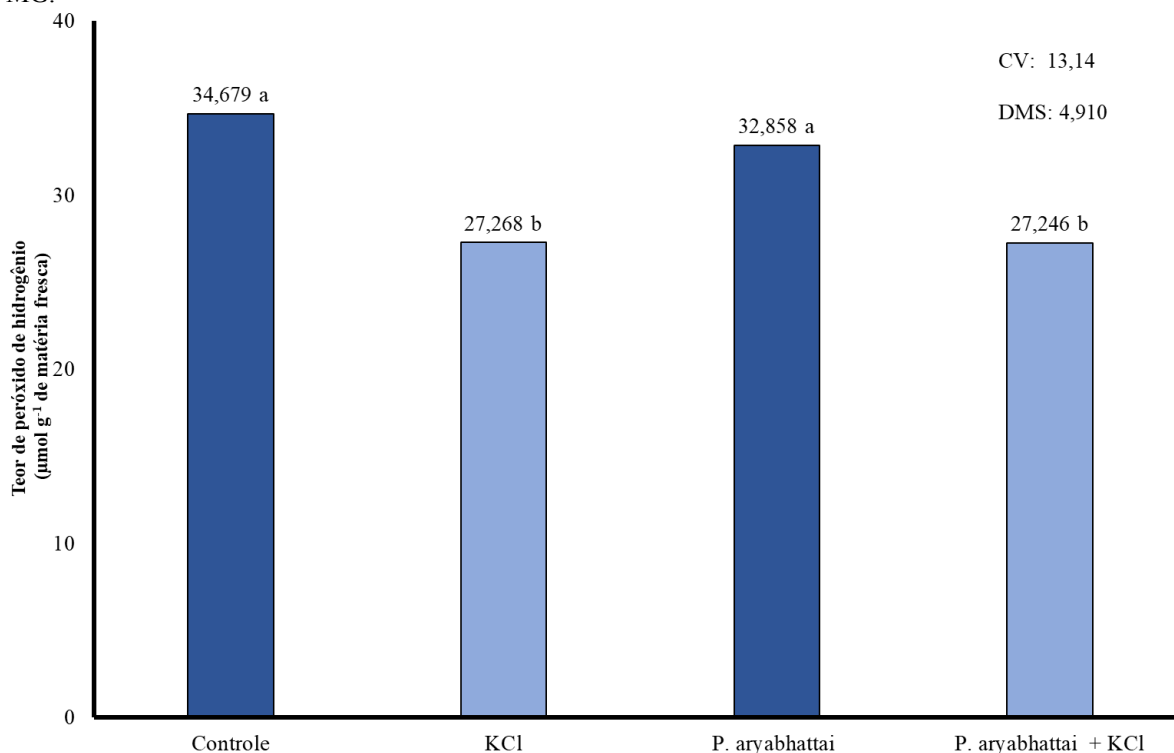


Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

3.1.3 Peróxido de hidrogênio

Ao analisar os teores de peróxido de hidrogênio, observa-se que KCl isolado e junto a bactéria *P. aryabhatai* foram semelhantes entre si, onde apresentaram uma diminuição de 21,5% quanto ao controle (Figura 3).

Figura 3- Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [$\mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca] no ensaio “Influência de *P. Aryabhatai* e salinidade no perfil metabólico e no metabolismo antioxidante da cultura de soja”. Rio Paranaíba, MG.

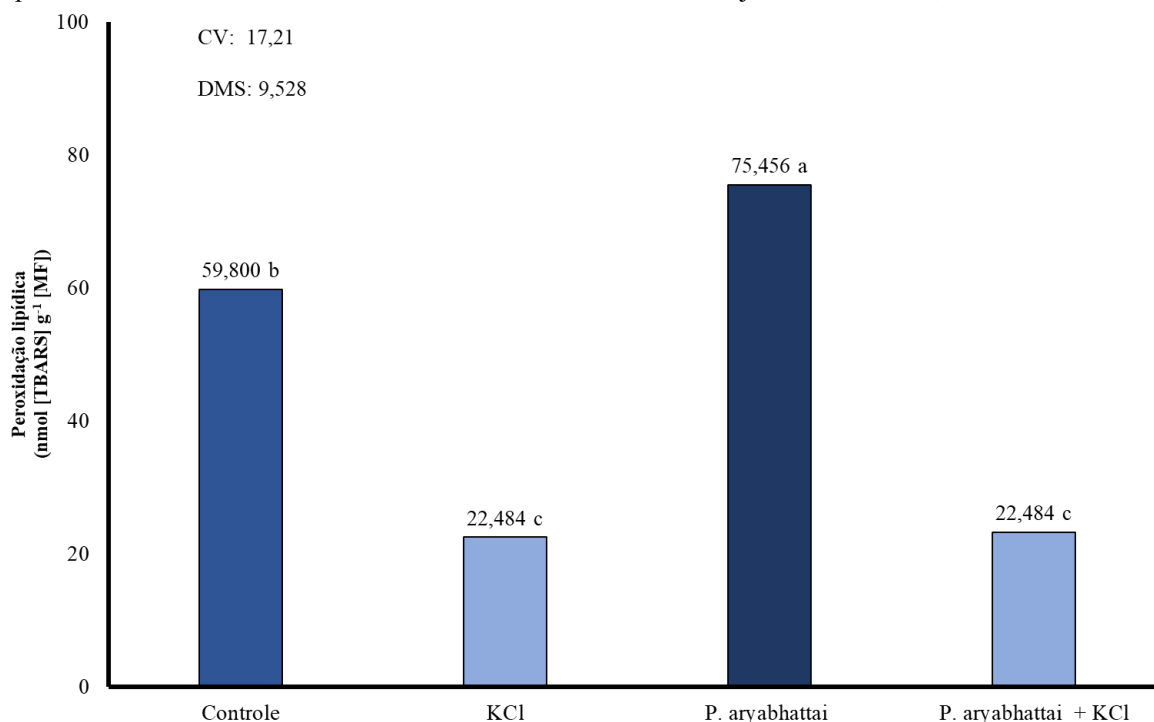


Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

3.1.4 Peroxidação Lipídica

Na peroxidação lipídica, observou-se uma queda nos tratamentos com KCL isolado e junto a bactéria *P. aryabhatai*, corresponderam a uma diminuição de 61,3% e 62,5%, respectivamente em relação ao controle. Por outro lado, o tratamento apenas com *P. aryabhatai* potencializou a peroxidação lipídica, com aumento de 26,1% quanto ao controle (Figura 4).

Figura 4- Conteúdo de peroxidação lipídica [nmol de TBARS] no ensaio “Influência de *P. aryabhattai* e salinidade no perfil metabolômico e no metabolismo antioxidante da cultura de soja”. Rio Paranaíba, MG.



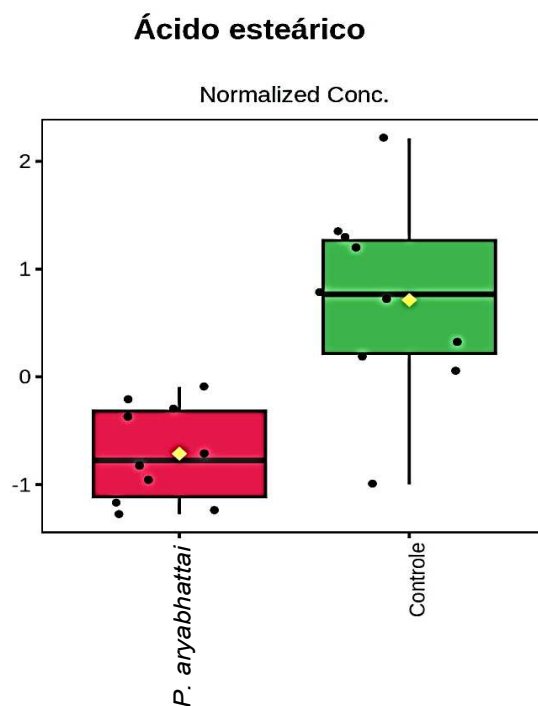
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

3.2 Metabolômica

Através da análise metabolômica foram identificados 270 compostos e estes não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tratamento com plantas que receberam o KCl em relação ao tratamento controle indicando que metabolicamente ambos os tratamentos apresentam abundâncias iguais em seus compostos.

No estudo do tratamento que recebeu aplicação de *P. aryabhattai* comparado ao tratamento controle foram encontrados 276 compostos onde apenas 1 apresentou diferença significativa sendo este o Ácido esteárico ($p = 0.033995$; $FC = 0.45344$) (Figura 5).

Figura 5- Boxplot do composto significativamente diferente entre o grupo tratado com bactéria (*P. aryabhatai*) e grupo controle, representados respectivamente pelas cores vermelha e verde. Rio Paranaíba, MG.



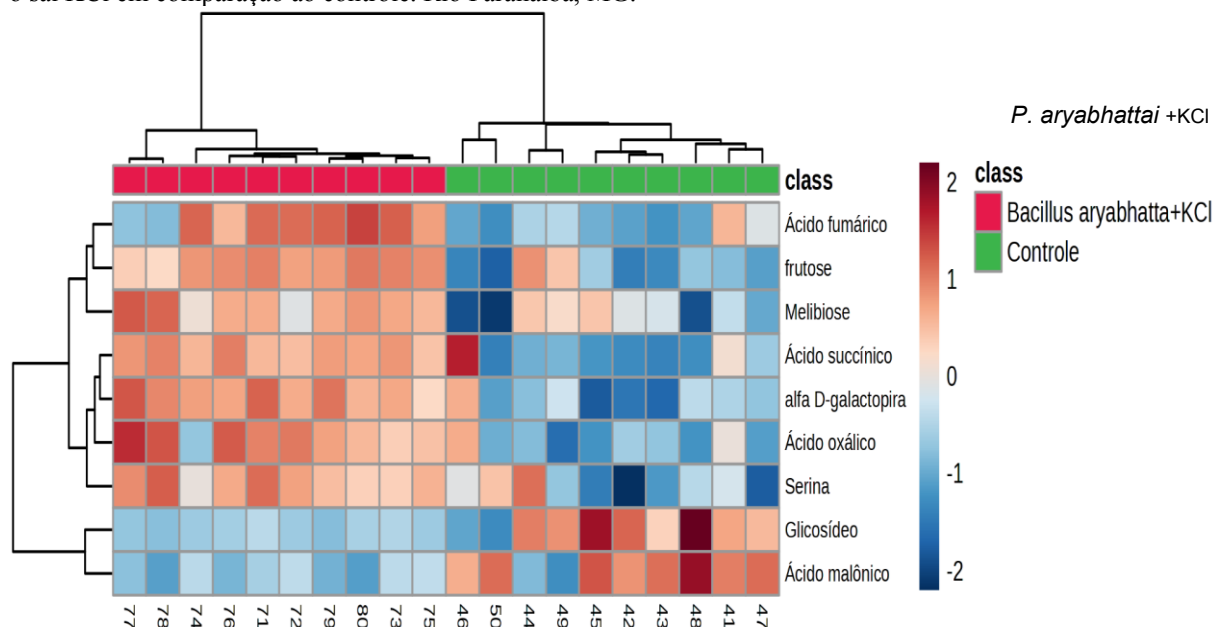
Já quando comparado o tratamento que recebeu aplicação de *P. aryabhatai* juntamente com o KCl e o tratamento controle, com os estudos metabólicos, foram encontrados 166 compostos onde 9 apresentaram diferença significativa e estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1- Lista de compostos que apresentaram diferença significativa na comparação entre o tratamento de *P. aryabhatai* e KCl e o tratamento controle. Rio Paranaíba, MG.

Composto	FC	p-valor
Alfa D-galactopiranosídeo	2.0513	9.81E-04
Frutose	2.4452	0.0024404
Ácido oxálico	4.4887	0.0040783
Ácido fumárico	7.935	0.012059
Ácido malônico	0.24674	0.013522
Melibiose	4.1661	0.031984
Serina	2.0631	0.031984
Glicosídeo	0.096393	0.039018
Ácido succínico	4.6865	1.84E-04

Entre os metabólitos significativos, 7 apresentaram maior abundância no tratamento com o microrganismo e o sal, enquanto 2 foram mais abundantes no tratamento controle (Figura 6).

Figura 6- Heatmap dos compostos que apresentaram diferença significativa entre o tratamento de *P. aryabhatai* e o sal KCl em comparação ao controle. Rio Paranaíba, MG.



4 DISCUSSÃO

No trabalho foi induzida a salinidade do solo, que segundo Cantarutti (2007) e Saelee (2022) se concentra em níveis de condutividade elétrica igual ou acima de 4 dS m⁻¹. Neste estudo, a condutividade média foi de 4,06 dS m⁻¹, e proporcionou uma resposta positiva no metabolismo antioxidante das plantas.

Observou-se que nos tratamentos com KCl houve diminuição da produção de peróxido de hidrogênio e também na peroxidação lipídica. Essa redução pode ser justificada pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes, SOD e POD, que catalisam as espécies reativas de oxigênio em moléculas não reativas, evitando a degradação celular (MARSCHNER, 2012; TAIZ *et al.*, 2017). Essas enzimas desempenham um papel fundamental na catalisação de reações bioquímicas essenciais para a manutenção de qualquer organismo. A superóxido dismutase (SOD) é reconhecida como a primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (EROs), catalisando a dismutação de dois radicais O₂⁻ para formar H₂O₂ e O₂. Em seguida, a peroxidase (POD) utiliza o H₂O₂ como agente oxidante, empregando composições de natureza fenólica como doadores de elétrons. Essa atividade enzimática pode servir como um marcador de estresse induzido por fatores bióticos e abióticos (BARBOSA *et al.*, 2014).

Isso pode estar relacionado ao efeito *priming* causado pela aplicação do sal. Esse efeito é conhecido como tolerância adquirida ao estresse induzida e é caracterizado pela produção de radicais livres em concentrações baixas, que sinalizam para a planta, potencializando os mecanismos antioxidantes (GALVIZ *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2021). Assim, em casos de estresses subsequentes a resposta das plantas será mais rápida e conseqüentemente, os danos serão menores. Aparentemente, a concentração de sal utilizada foi eficiente para causar esse efeito, ativando o sistema de defesa e tornando-as mais tolerantes ao estresse.

Outra observação que comprova tal efeito é que o uso apenas do *P. aryabhatai*, sem adição de sal, não aumentou a atividade das enzimas antioxidantes. Conseqüentemente, houve um aumento no teor de H₂O₂ e na peroxidação lipídica.

Resultados semelhantes foram obtidos em um experimento desenvolvido por Vardharajula *et al.*, (2011), em que plantas de milho sob estresse hídrico mostraram aumento na atividade enzimática, porém o aumento foi menor nos tratamentos com inoculação com *Bacillus* spp. Os autores notaram que o uso de *Bacillus amyloliquefaciens* apresentou menor atividade enzimática sob estresse em relação às outras três espécies de *Bacillus* spp. testadas.

Quanto aos resultados sobre o perfil metabolômico, notou-se aumento de ácido palmítico/esteárico no controle, quando comparado a aplicação apenas da bactéria. Esse resultado corrobora com os resultados obtidos por Deng *et al.*, (2023), que notou correlação negativa entre *Bacillus* e ácido palmítico/esteárico. Tal ácido participa da síntese de ácidos graxos e vias do metabolismo secundário das plantas. Isso confirma que a inibição de ácidos graxos pode prejudicar a tolerância ao estresse, como observado no presente trabalho. Os ácidos graxos apresentam funções na produção de energia e armazenamento de carbono, além de serem componentes estruturais das membranas (DE REZENDE *et al.*, 2016).

Já quando comparado o controle com o uso de KCl associado a bactéria foram encontrados diversos compostos, com destaque para o ácido fumárico e succínico, que participam de diversas vias metabólicas na planta, em especial a via do chiquimato. Segundo Yang *et al.* (2017), em resposta a estresses ocorre aumento na via do chiquimato, e conseqüente aumento no conteúdo de tirosina, sendo ambos os ácidos citados precursores desse aminoácido.

Os resultados obtidos no trabalho apresentam grande importância não só científica, mas também prática, pois podem auxiliar na tomada de decisão de produtores no campo. Os resultados obtidos com a aplicação do sal e dos microrganismos, foi possível constatar que fatores como a composição do solo e a densidade populacional dos microrganismos podem influenciar as plantas de maneiras inesperadas. Essas variações podem afetar o desenvolvimento vegetal de formas não previstas, demonstrando a complexidade das interações

entre os organismos do solo e os elementos externos introduzidos. Assim, torna-se evidente a necessidade de estudos mais aprofundados para compreender melhor essas relações e seus impactos no crescimento das plantas.

Embora o estudo apresente resultados relevantes, ainda se faz necessária a realização de pesquisas adicionais, envolvendo diferentes culturas e condições. Investigações futuras poderiam incluir experimentos de campo com parcelas maiores, o que permitiria um número mais amplo de coletas e aplicações ao longo do tempo. Isso contribuiria para a construção de uma linha temporal mais extensa e possibilitaria uma análise mais aprofundada do comportamento das plantas.

Adicionalmente, seria interessante acompanhar o desenvolvimento fenológico das culturas, observando variáveis como massa seca, número de nós e vagens, além de avaliar a produtividade. Visando a aplicação prática dos resultados no contexto agrícola, também seria pertinente considerar a análise dos custos operacionais e do retorno financeiro associado a cada estratégia de manejo.

5 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos, conclui-se que a aplicação de KCl pode provocar o efeito *priming* positivo nas plantas, promovendo alteração no metabolismo antioxidante e no perfil metabólico. Além disso, nas condições do estudo, o uso de *P. aryabhattai* promoveu efeito negativo nas plantas, potencializando o estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

ABD_ALLAH, E. F.; ALQARAWI, A. A.; HASHEM, A.; RADHAKRISHNAN, R.; AL-HUQAIL, A. A.; AL-OTIBI, F. O. N.; MALIK, J. A.; ALHARBI, R. I.; EGAMBERDIEVA, D. Endophytic bacterium *Bacillus subtilis* (BERA 71) improves salt tolerance in chickpea plants by regulating the plant defense mechanisms. **Journal of Plant Interactions**, v. 13, n. 1, p. 37-44, 2018.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, 2001.

ALVAREZ, V. V. H.; RIBEIRO, A. C. Calagem1. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. V. H. (Ed.). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em minas gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. p. 43-60.

ARAÚJO, E. B. G.; SÁ, F. V. S.; OLIVEIRA, F. A.; SOUTO, L. S.; PAIVA, E. P.; SILVA, M. K. N.; MESQUITA, E. F.; BRITO, M. E. B. Crescimento inicial e tolerância de cultivares de meloeiro a salinidade. **Revista Ambiente & Água**, v. 11, n. 2, p. 463-471, 2016.

BARBOSA, R. M.; SILVA, A. de M. M.; WILLADIN L.; ULISSES C. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciencia rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BEAUCHAMP, C.O., FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.

CANTARUTTI, R. B.; BARROS, N. F. de; PRIETO, H. E.; NOVAIS, R. F. Avaliação da fertilidade do solo e recomendação de fertilizantes. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007.

CARVALHO, A. M. X. D.; MENDES, F. Q.; MENDES, F. Q.; TAVARES, L. D. F. SPEED Stat: a free, intuitive, and minimalist spreadsheet program for statistical analyses of experiments. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. e327420312, 2020.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB, 2023. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**. v. 12 - SAFRA 2024/25- n.2 – Segundo levantamento. Novembro, 2024.

DE REZENDE, F. M.; ROSADO, D.; MOREIRA, F. A.; DE CARVALHO, W. R. S. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. **Laboratório de Ensino de Botânica**, 93, 2016.

DENG, Z.; WANG, J.; HE, Y. Biochar-based *Bacillus subtilis* inoculant for enhancing plants disease prevention: microbiota response and root exudates regulation. **Biochar**, v. 5, n. 1, p. 81, 2023.

EIDES, J. R. Metabolomics as a Tool for Analysis of Wheat Leaves from Different Cultivars Infected with *Pyricularia oryzae*. **ACS Agricultural Science & Technology**, v. 4, n. 5, p. 535-543, 2024.

EMBRAPA. **Guia Prático para Interpretação de Resultados de Análises de Solo**. Aracajú: EMBRAPA, 2015.

GALVIZ, Y. C. F.; RIBEIRO A.; SOUSA, G. M. Sim, as plantas têm memória. **Fisiologia Vegetal Teórica e Experimental**, 32, p.195-202, 2020.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: II. Role of electron transfer. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 125, n. 3, p. 850-857, 1968.

ISLAM, F.; YASMEEN, T.; ALI, S.; ALI, B.; FAROOQ, M. A.; GILL, R. A. Priming-induced antioxidative responses in two wheat cultivars under saline stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, p. 1-12, 2015.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. **Plant physiology**, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.

LIU, H.; CAPAZ, A. J.; CAPAZ, J.Á. Preparando as colheitas para o futuro: religando a memória do estresse. **Tendências em Ciência Vegetal**. 2021.

LU, L.; CHANG, M.; HAN, X.; WANG, Q.; WANG, J.; YANG, H.; GUAN, Q.; DAI, S. Beneficial effects of endophytic *Pantoea ananatis* with ability to promote rice growth under saline stress. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 4, p. 1919-1931, 2021.

MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. New York, p. 651, 2012.

MORAES, S. P. DE O.; RODRIGUES, J. F. M.; ESCOBAR, M. E. O.; ARAÚJO, F. S.; OLIVEIRA, T. S. DE. Beneficial effects of silicon in plants under abiotic stress conditions: A new approach. **Revista Ciência Agronômica**, v. 53, p. e20218213, 2022.

OLIVEIRA, F. F. M.; MORAIS, M. B.; SILVA, M. E. S.; SARAIVA, Y. K. F.; ARRUDA, M. V. M.; SILVA, J. N. C.; ALBUQUERQUE, C. C. Ecophysiological response of *Lippia gracilis* (Verbanaceae) to duration of salt stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 178, p. 202-210, 2019.

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n. 3, p.137-143, 1999.

PILON, A. C.; SELEGATO, D. M.; FERNANDES, R. P.; BUENO, P. C. P.; PINHO, D. R.; CARNEVALE NETO, F.; FREIRE, R. T.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P. Metabolômica de plantas: métodos e desafio. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p. 329-354, 2020.

RAKUSANOVA S.; T. CAJKA, T. Tips and tricks for LC–MS-based metabolomics and lipidomics analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 117940, 2024.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 876 p. 2014.

REZENDE, C. C.; SILVA, M. A.; FRASCA, L. D. M.; FARIA, D. R.; DE FILIPPI, M. C. C.; LANNA, A. C.; NASCENTE, A. S. Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, e50810212725, 2021.

RHOADES, J. D.; KANDIAH, A. M.; MARSHALI, A. M. **Uso de águas Salinas para produção agrícola**. Campina Grande: UFPB, p.117, 2000.

SAELEE, N. Effects of soil salinity on nutritional compositions of fresh Jak (*Nypa fruticans*) sap. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 114, p. 104767, 2022.

SHAHID, M.; ZEYAD, M. T.; SYED, A.; SINGH, U. B.; MOHAMED, A.; BAHKALI, A. H.; PICHTEL, J. Stress-tolerant endophytic isolate *Priestia aryabhatai* BPR-9 modulates

physio-biochemical mechanisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) for enhanced salt tolerance. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 17, p. 10883, 2022.

SILVEIRA, J. A.; SILVA, S. L.; SILVA, E. N.; VIÉGAS, R. A. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**, v. 1, p. 161-18, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.A.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science**, v. 153, n. 1, p. 65-72, 2000.

TSUGAWA, H.; CAJKA, T.; KIND, T.; MA, Y.; HIGGINS, B.; IKEDA, K.; KANAZAWA, M.; VANDERGHEYNST, J.; FIEHN, O.; ARITA, M. MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. **Nature methods**, v. 12, n. 6, p. 523-526, 2015.

VARDHARAJULA S.; ALI S. Z.; GROVER M.; REDDY G.; BANDI V. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. **Journal of Plant Interactions**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2011.

XIA, J.; WISHART, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. **Current protocols in bioinformatics**, v. 55, n. 1, 2016.

YANG, D. S.; ZHANG, J.; LI, M. X.; SHI, L. X. Metabolomics analysis reveals the salt-tolerant mechanism in Glycine soja. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 36, p. 460-471, 2017.