



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
ESPECIALIZAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

ANTONIO ARISTIDES PEREIRA GOMES FILHO

**EMPREGO DO SILÍCIO COMO MITIGADOR DO ESTRESSE OXIDATIVO
CAUSADO PELO ARSÊNIO EM PLANTAS DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.)**

CHAPECÓ

2022

ANTONIO ARISTIDES PEREIRA GOMES FILHO

**EMPREGO DO SILÍCIO COMO MITIGADOR DO ESTRESSE OXIDATIVO
CAUSADO PELO ARSÊNIO EM PLANTAS DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.)**

Trabalho de Conclusão de Curso de especialização apresentado como requisito para obtenção do grau de Especialista em Produção Vegetal na Universidade Federal da Fronteira Sul.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 18 / 07 /2022

Assentimento:

Siumar Pedro Tironi

Vanessa Neumann Silva

André Luiz Radünz
(Orientador)

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Gomes Filho, Antonio Aristides Pereira
Emprego do silício como mitigador do estresse oxidativo
causado pelo arsênio em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.). /
Antonio Aristides Pereira GomesFilho. -- 2022.
24 f.:il.

Orientador: Doutor André Luiz Radünz

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Especialização
em Produção Vegetal, Chapecó,SC, 2022.

1. Agronomia; fisiologia vegetal; estresse abiótico;arsênio;
silício.. I. Radünz, André Luiz, orient. II. Universidade Federal da
Fronteira Sul. III. Título.

Emprego do silício como mitigador do estresse oxidativo causado pelo arsênio em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.)

Use of silicon as a mitigator of oxidative stress caused by arsenic in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants

Uso del silicio como mitigador del estrés oxidativo causado por el arsénico en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Antonio Aristides Pereira Gomes Filho

0000-0003-1663-6735

Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

aristide.sf136@gmail.com

André Luiz Radunz

0000-0002-2397-011X

Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

andre.radunz@uffs.edu.br

Juraci Alves de Oliveira

0000-0003-0150-2291

Universidade Federal de Viçosa (UFV)

jalves@ufv.br

Resumo:

A alface é uma hortaliça de grande importância econômica no Brasil e seu cultivo pode estar sujeito a contaminação por elementos potencialmente tóxicos como o arsênio (As). O As afeta todo o metabolismo vegetal e causa a superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem levar ao estresse oxidativo. A aplicação de silício vem se mostrando promissora em diversas culturas na redução do estresse oxidativo causado pelo As. Porém, até agora, nenhum estudo havia sido feito com alface e, além disso, com a aplicação de nanopartículas de silício (SiNP). O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o efeito do As sob o metabolismo oxidativo e antioxidante de plantas de alface e se o silício iônico (Si) e/ou nanoparticulado (SiNP) é capaz de mitigar o estresse causado pelo As nessas plantas. Foram avaliados marcadores do estresse oxidativo e enzimas antioxidantes. Os resultados mostram que o As causou a superprodução de EROs e peroxidação lipídica e que o silício, especialmente SiNP foi capaz de reduzir esses danos pela aumento da atividade enzimas antioxidantes. Conclui-se que a aplicação de silício pode ser empregada para mitigar o estresse por As em plantas de alface sob o ponto de vista do metabolismo redox.

Palavras-chave: peroxidação lipídica; antioxidantes; espécies reativas de oxigênio.

Abstract

Lettuce is a vegetable of great economic importance in Brazil and its cultivation may be subject to contamination by potentially toxic elements such as arsenic (As). As affects all plant metabolism and causes the overproduction of reactive oxygen species (ROS) that can lead to oxidative stress. The application of silicon has shown promise in several crops in reducing the oxidative stress caused by As. However, until now, no study had been done with lettuce and, moreover, with the application of silicon nanoparticles (SiNP). The objective of this research was to evaluate the effect of As on the oxidative and antioxidant metabolism of lettuce plants and whether ionic silicon (Si) and/or nanoparticulate silicon (SiNP) is able to mitigate As stress in these plants. Markers of oxidative stress and antioxidant enzymes were evaluated. The results show that As caused the overproduction of ROS and lipid peroxidation and that silico, especially SiNP was able to reduce this damage by increasing antioxidant enzyme activity. It is concluded that silicon application can be employed to mitigate As stress in lettuce plants from the redox metabolism point of view.

Keywords: lipid peroxidation; antioxidants; reactive oxygen species.

Resumen

La lechuga es una hortaliza de gran importancia económica en Brasil y su cultivo puede estar sujeto a la contaminación por elementos potencialmente tóxicos como el arsénico (As). Como afecta a todo el metabolismo de las plantas y provoca la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden provocar estrés oxidativo. La aplicación de silicio se ha mostrado prometedora en varios cultivos para reducir el estrés oxidativo causado por el As. Sin embargo, hasta ahora no se había realizado ningún estudio con lechuga y, además, con la aplicación de nanopartículas de silicio (SiNP). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del As en el metabolismo oxidativo y antioxidante de las plantas de lechuga y si el silicio iónico (Si) y/o el silicio nanoparticulado (SiNP) son capaces de mitigar el estrés causado por el As en estas plantas. Se evaluaron los marcadores de estrés oxidativo y las enzimas antioxidantes. Los resultados muestran que el As causó la sobreproducción de ROS y la peroxidación de lípidos y que el silicio, especialmente el SiNP fue capaz de reducir estos daños mediante el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes. Se concluye que la aplicación de silicio puede emplearse para mitigar el estrés por As en las plantas de lechuga desde el punto de vista del metabolismo redox.

Palabras clave: peroxidación lipídica; antioxidantes; especies reactivas del oxígeno.

1. Introdução

A alface (*Lactuca sativa* L.) é a hortaliza folhosa mais produzida e consumida no Brasil, no qual se destaca a tipo crespa, sendo uma hortaliza rica em vitaminas, minerais e bioativos, além de ser possuir grande importância socioeconômica no qual o consumo se dá principalmente *in natura*, na preparação de saladas, por exemplo (Andrade, 2019; Shams et al. 2019). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2016) a China, os Estados Unidos e a Espanha são os principais produtores com 10, 4 e 1 milhão de toneladas ao ano, respectivamente. O Brasil possui uma área plantada de cerca de 90 mil hectares, no qual as regiões Sudeste, Sul e Nordeste que concentram 64,1, 16,2, 10,5% da produção nacional, respectivamente (Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudanças [ABCSEM], 2016); Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE], 2020).

As plantas precisam de alguns elementos minerais para crescer e se desenvolver de forma adequada, para isso estas utilizam proteínas especializadas na captação e transporte de tais elementos, que por não serem perfeitas na seleção destes, a absorção e consequente transporte de elementos não essenciais, bem como de elementos tóxicos, acontece com certa frequência (Lindsay & Maathuis, 2017). Plantas contaminadas com elementos tóxicos, como o arsênio (As) constituem importante via de acesso do poluente aos demais níveis da cadeia trófica e para a alface isso se torna especialmente preocupante dado sua forma predominante de consumo.

O arsênio (As) é um semimetal com toxicidade reconhecida, tanto em plantas como em animais, incluindo seres humanos (Bali & Sidhu, 2021). A contaminação ocorre, principalmente, através da ingestão de água ou alimentos contaminados (Mawia et al., 2021), sendo considerado sério problema ambiental e de saúde pública em vários países (Herath, Vithanage, Bundschuh, Maity, & Bhattacharya, 2016). No Brasil, a atividade de mineração destaca-se como uma das principais fontes de contaminação, conforme constatado no Quadrilátero Ferrífero, em Minas Gerais, e em outras áreas de mineração, especialmente de ouro (McClintock et al., 2012). A Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (ATSDR) e a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificaram o As no grupo de substâncias perigosas prioritárias, relacionando-o como agente causal de diversos tipos de câncer (ATSDR, 2019; Rahman et al., 2020; Ghosh et al., 2021). Devido ao seu potencial cancerígeno e associação com outras doenças (cardiovasculares, neurológicas, renais e respiratórias), a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) definiram, como limite máximo de segurança, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ na água potável e 20 mg kg^{-1} no solo (Rosas-Castor, Guzmán-Mar, Hernández-Ramírez, Garza-González, & Hinojosa-Reyes et, 2014; Mondal et al., 2021).

Apesar de poder ser encontrado em formas orgânicas, como ácido monometil arsônico, ácido dimetilarsínico, arsenobetaína e arsenoaçúcares, as formas inorgânicas, como arsenito (As^{III}) e o arsenato (As^{V}), são mais predominantes no ambiente solo-água e, também, mais tóxicas e móveis que o As orgânico (Khalid et al., 2017). Em condições aeróbicas (oxidantes) o As^{V} é predominante e, por ser análogo ao fosfato, ambos competem pelas mesmas proteínas transportadoras, as

proteínas transportadoras de Pi (PHTs), para serem absorvidos (Khan et al., 2021). A forma química de As^{III} predomina em condições anaeróbicas (reduzidas) e entra na célula através de proteínas intrínsecas semelhantes à nodulina 26 (NIPs), uma subfamília da família das aquaporinas. Considera-se, ainda, que, por ser análogo ao Si, também é absorvido pelo seu transportador NIP de influxo, denominado Lsi1, e Lsi2, um transportador de efluxo que transporta As^{III} em direção ao xilema (Ma et al., 2006; Yamaji, Mitatni, & Jian, 2008; Panda, Upadhyay, & Nath, 2010; Abbas et al., 2018). Além disso, enquanto os transportadores PHT são unidirecionais, os transportadores NIP são bidirecionais (Abbas et al., 2018).

A toxicidade do As em plantas se deve, principalmente, ao desequilíbrio na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que causa estresse oxidativo com efeitos deletérios no crescimento, fotossíntese, morfologia e bioquímica (Bali & Sidhu, 2021). Além dos danos oxidativos nas membranas, proteínas e DNA (Finnegan & Chen, 2012), o As^V, ao substituir o fosfato no ATP, resulta na formação de ADP-As instável, deixando a célula desprovida de energia. As^{III}, por sua vez, reage com grupos sulfidríla (-SH) de diferentes proteínas, levando a restrição de muitas funções celulares, o que pode ocasionar danos irreversíveis no metabolismo vegetal (Abercrombie et al., 2008; Armendariz et al., 2016; Finnegan & Chen, 2012).

O principal mecanismo de desintoxicação celular do As consiste em reduzir As^V a As^{III}, reação catalisada pela enzima arsenato redutase. O As^{III}, proveniente dessa redução ou da absorção direta, é complexado com fitoquelatinas, com posterior transporte para o vacúolo (Li, Wang, & Song, 2016). Porém, esse mecanismo não consegue desintoxicar todo o As, especialmente em altas concentrações, e formas de mitigar seus efeitos e/ou diminuir sua absorção tem sido estudadas, como a promissora utilização de silício em pesquisas com plantas de arroz (Fleck, Mattusch, & Schenk, 2013; Tripathi et al., 2013; Sanglard et al., 2014).

O silício (Si) é um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre e reconhecidamente capaz de trazer benefícios as plantas, especialmente em condições de estresses bióticos e abióticos, como aqueles ocasionados por metais pesados (Sahebi et al., 2015; Zargar, Mahajan, Bhat, Nazir, & Deshmukh, 2019). As plantas absorvem o Si na forma de ácido monossilícico (H₄SiO₄), cuja concentração, na solução do solo, encontra-se entre 0,1 e 0,6 mM (Epstein, 1994; Hodson, White, Mead, & Broadley 2005), alcançando valores nas plantas entre 0,1 e 10% do peso seco (Epstein, 1999; Ma & Takahashi, 2002).

Vários mecanismos envolvidos na participação do Si como agente de atenuação de danos celulares causados por metais pesados e As tem sido estudados. Estes envolvem a co-precipitação, complexação, quelação e imobilização dos metais; a deposição e acúmulo de Si na parede celular e, com isso, aumento da retenção destes metais na parede; a estimulação do sistema antioxidante enzimático e não enzimático e alterações nas estruturas vegetais e moleculares (Emamverdian, Ding, Xie, & Sangari 2018; Bhat et al., 2018; Vaculik et al., 2020).

A forma usual de fornecimento de Si às plantas é como ácido monossilícico e, mais recentemente, como nanopartículas. Nanopartículas (NPs) são partículas com 100 nm ou menos, as quais tem sido utilizadas em diversas áreas, inclusive na agricultura (Baker et al., 2017; Asgari, Majd, Jonoubi, & Najafi, 2018). As NPs são altamente reativas devido à grande área superficial, além de poder apresentar comportamentos distintos dos materiais que lhe originaram, aumentando, por exemplo, o potencial de atravessar membranas biológicas (Remédios et al., 2012). Portanto, espera-se que os mecanismos de atenuação dos danos causados pelo As podem ser inibidos ou potencializados, dependendo se o Si é fornecido na iônica ou como nanopartículas (SiNPs).

Apesar disso, não se tem muitos estudos sobre como o Si mitiga o estresse por As nessas plantas, especialmente do ponto de vista bioquímico. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar a toxicidade do As em alface, avaliando-se as alterações no metabolismo oxidativo e antioxidante, e o papel do silício, na forma iônica e de nanopartículas, na atenuação desses danos.

2. Metodologia

2.1. Cultivo, aclimação e aplicação dos tratamentos

Sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) da cultivar Elba foram obtidas em comércio local e semeadas em espuma fenólica com dimensão de 2x2x2 por célula obtida pela empresa Green Up. Estas foram mantidas em bandejas de polietileno, aeradas e umedecidas com água destilada até o momento da germinação a partir do qual foram umedecidas com solução nutritiva

de Clark (1975), com $\frac{1}{2}$ de força iônica. Após 40 dias de germinação estas foram selecionadas quanto ao tamanho e uniformidade de parte aérea e raiz e transferidas para vasos de polietileno (1 planta/vaso) contendo 275 mL da solução nutritiva de Clark (1975), com pH 6,5 (ajustado diariamente), aerados e mantidas em sala de crescimento com intensidade luminosa, temperatura e fotoperíodo controlados ($230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, e 16/8 h claro/escuro), por 5 dias para aclimação (Figura 1).

Após o período de aclimação foram aplicados os tratamentos: (a) somente solução nutritiva (como controle); (b) arsenito (As^{III}) 50 μM (na forma de NaAsO_2); (c) arsenato (As^{V}) 50 μM (na forma de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); (d) Si 2 mM (na forma de K_2SiO_3); (e) Si + As^{III} ; (f) Si + As^{V} ; (g) nanopartículas de silício (SiNP) 2 mM; (h) SiNP + As^{III} e (i) SiNP + As^{V} . Os tratamentos com a utilização de Si ou SiNPs tiveram a aplicação do silício iniciadas 24h antes da aplicação do As. As plantas foram mantidas sob os tratamentos por 24 e 72h, nas mesmas condições laboratoriais anteriormente descritas e após esse período foi feito a coleta do material vegetal (folhas e raízes) e as amostras armazenadas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para posteriores análises.

O K_2SiO_3 foi obtido através do produto Fertilisilício da empresa Plant Defender, e as SiNPs da SkySpring Nanomaterials Inc. Em solução aquosa essas nanopartículas tendem a formar agregados, para se evitar isso, antes da aplicação, as SiNPs foram adicionadas a uma pequena quantidade de água desionizada e estas submetidas a ultrasonicção por 30 minutos para evitando a formação de agregados, obtendo-se uma maior homogeneização e dispersão adequada das mesmas.

Figura 1. Sala de crescimento de plantas com condições controladas (sistema de aeração, temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, irradiância de $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo luminoso de 16 horas).



Fonte: Autores (2022).

2.2. Metabolismo oxidativo

2.2.1. Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Para determinar a concentração de peróxido de hidrogênio se (H_2O_2) 200 mg de folhas e raízes foram homogeneizadas em um meio de extração contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM que será centrifugado a 10.000 xg por 15 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (Kuo & Kao, 2003).

Alíquotas de 20 μL de sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 80 μL de sulfato ferroso amoniacal 250 μM em ácido sulfúrico 25 mM, 50 μL de laranja de xilenol 250 μM e 50 μL de sorbitol 100 mM (Gay & Gebicki, 2000). A mistura foi homogeneizada e mantida no escuro, por 30 min, e a absorbância determinada em 560 nm e as concentrações de H_2O_2 foram estimadas com base em curva de calibração, previamente preparada com padrões de H_2O_2 , sendo os resultados expressos em nmol g^{-1} de MF.

2.2.2. Peroxidação lipídica

A avaliação da peroxidação lipídica foi feita por meio da concentração de malondialdeído (MDA), uma espécie reativa do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Hodges, DeLong, Forney, & Prange, 1999). Amostras de 0,2 g de folhas e de raízes, maceradas

em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de etanol 80% (v/v), seguido de centrifugadas a 10.000 xg, 4 °C, por 10 min. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada em 1,5 mL do ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,65% (p/v) em ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) e outra adicionada a somente TCA 20% (p/v). A mistura foi incubada a 95 °C, por 30 min, seguido de imersão em banho de gelo, por 10 min, e posterior centrifugação a 3.000 xg, 4 °C, por 10 min. O sobrenadante foi utilizado para mensuração da absorbância a 440, 532 nm e 600 nm. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se a seguinte equação: 1) $[(\text{Abs } 532_{+TBA} - \text{Abs } 600_{+TBA}) - (\text{Abs } 532_{-TBA} - \text{Abs } 600_{-TBA})] = A$; 2) $[(\text{Abs } 440_{+TBA} - \text{Abs } 600_{+TBA}) 0,0571] = B$; 3) $\text{MDA (nmol mL}^{-1}) = (A-B/157000) 10^6$. Os resultados foram expressos em nmol de MDA g⁻¹ MF.

2.3. Análises de enzimas do sistema antioxidante

2.3.1. Obtenção dos extratos enzimáticos

Para determinação da atividade de enzimas antioxidantes, amostras de 0,3 g de folha e raiz foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de seus respectivos meios de extração:

- 1) Tampão de fosfato 0,1 M (pH 6,8), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM (PMSF) e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) para dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX) (Peixoto, Cambraia, Sant'Anna, Mosquim, & Moreira, 1999).
- 2) Tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), ascorbato 1 mM e EDTA 1 mM para peroxidase do ascorbato (APx) (Nakano & Asada, 1981).

Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g, por 15 minutos a 4 °C, os sobrenadantes utilizados para determinação das atividades enzimáticas.

2.3.2. Determinação da atividade SOD (EC 1.15.1.1)

A atividade foi determinada pela adição de 50 µL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM. A reação foi conduzida a 25 °C, em uma câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida pela absorvância a 560 nm. A absorvância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolitis & Ries, 1977). Uma unidade de SOD será definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971).

2.3.3. Determinação da atividade da CAT (EC 1.11.1.6)

A atividade foi determinada pela adição de 10 µL do extrato enzimático a 200 µL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, seguido de incubação por 3 min, a 30 °C, e adição de 90 µL de H₂O₂ 12,5 mM (Havir & McHale, 1987). O decréscimo na absorbância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 240 nm, a 30 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson, Prasad, & Stewart, 1995) e os resultados expressos em µmol de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.3.4. Determinação da atividade da POX (EC 1.11.1.7)

A atividade foi determinada pela adição de 10 µL do extrato enzimático a 185 µL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, contendo H₂O₂ 20 mM, o qual foi incubado por 3 min, a 25 °C, seguido da adição de 5 µL de pirogalol 20 mM (Kar & Mishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorbância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance & Maehley, 1955) e os resultados expressos em µmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.3.5. Determinação da atividade APx (EC 1.11.1.11)

A atividade da enzima foi determinada pela adição de 10 µL do extrato enzimático a 185 µL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, contendo ácido ascórbico 0,5 mM, e incubado por 3 min, a 25 °C, seguido da adição de 5 µL de H₂O₂ 5 mM. O decréscimo na absorbância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 290 nm, a

25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nakano & Asada, 1981; Murshed, Lopez-Lauri, & Sallanon, 2008) e os resultados expressos em $\mu\text{mol de AsA min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.3.6. Determinação de proteínas

A determinação de proteínas nos extratos enzimáticos foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando 20 μL de cada extrato enzimático e 200 μL do reagente de Bradford, lido a 595 nm utilizando-se BSA como padrão. Todas as análises bioquímicas, com exceção a SOD e peroxidação lipídica, que foram realizadas em um espectrofotômetro UV/visível (Hitachi, U-5100), foram realizadas em um leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific).

2.4. Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (2x2) (fontes de arsênio x fontes de silício), com 5 repetições em cada tratamento. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Foi realizado, também, um teste F para comparar as médias quanto ao tempo de exposição aos tratamentos (24 e 72h). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R.

3. Resultados

3.1. Sintomatologia visual

Após 24 horas de tratamento pode-se observar sintomas de toxidez por As, especialmente nas raízes, evidenciado pelo menor volume radicular, conjuntamente a isso nota-se um escurecimento radicular nas plantas tratadas com As, tanto na forma de As^{III} como As^{V} , especialmente após 72 horas (Figura 2). Nas plantas contendo Si ou SiNPs, nota-se um maior volume radicular juntamente com um maior crescimento da parte aérea, especialmente quando se compara estas plantas antes da aplicação dos tratamentos (aclimatação) (Figura 2).

Figura 2. Sintomatologia visual das plantas de *L. sativa* L. antes e depois da aplicação dos tratamentos. Na parte superior, plantas no final do período de aclimatação e na parte inferior ao final do período de 24 horas (A) e 72 horas (B). Da esquerda para direita: controle, As^{III} , As^{V} , Si, Si + As^{III} , Si + As^{V} , SiNP, SiNP + As^{III} e SiNP + As^{V} .



Fonte: Autores (2022).

Nas plantas contendo combinações entre Si e As, seja na forma iônica ou nanoparticulada (SiNP), nota-se que houve uma redução nos sintomas, especialmente com 24 horas de tratamento. Com 72 horas, houve uma redução menor dos danos causados pelo As quando associados ao Si ou SiNPs (Figura 2).

3.2. Metabolismo oxidativo

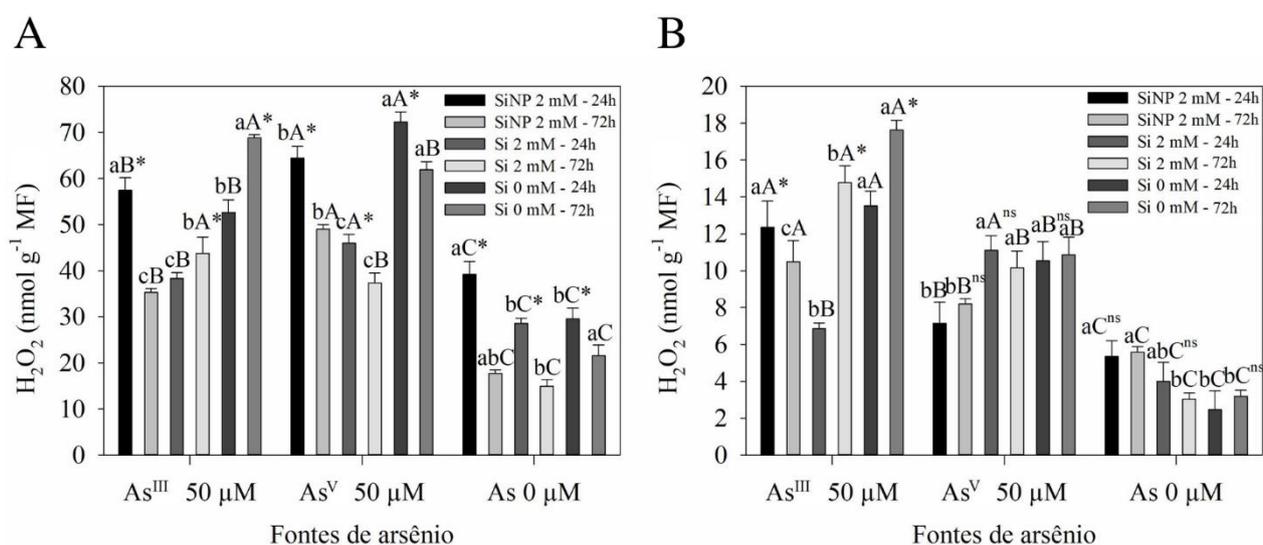
3.2.1. Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

As^{III} e As^{V} aumentaram significativamente a concentração de H_2O_2 , nas folhas, tanto com 24 quanto com 72h quando comparados ao controle. Porém com 24h isso ocorreu de forma mais proeminente para o As^{V} e com 72h com o As^{III} . O mesmo ocorre quando estes são aplicados com SiNP ou Si e comparados com os tratamentos sem As. Sendo, com exceção ao Si + As^{III} , após 72h, esse aumento mais significativo para o As^{V} , tanto com 24 quanto com 72h (Figura 3A).

Quando SiNP foi aplicado com As^{III} a concentração de H_2O_2 foi a menor, após 72h, em comparação as demais fontes de silício no mesmo período de exposição, bem como, Si também diminuiu a concentração quando comparado ao As^{III} sem silício no mesmo período. Com 24h de exposição o mesmo é observado para Si, mas para SiNP não, tendo este tratamento

aumentado a concentração de SiNP quando comparado até mesmo ao tratamento sem silício (Figura 3A). Já com As^V as fontes de silício reduziram da concentração de H₂O₂, porém, com Si essa redução foi maior quando comparada as demais, tanto com 24 quanto com 72h. Destaca-se ainda que sem a presença de As, SiNP aumentou a concentração de H₂O₂ após 24h em comparação a Si e ao controle, e 72h este não diferiu dos demais. Já Si apresentou uma concentração menor após 72h diferindo do controle. Além disso, todos os tratamentos diferiram quanto ao período de exposição aos tratamentos aumentando a concentração de H₂O₂ após 24h, com exceção do Si + As^{III} e do As^{III}, no qual ocorreu após 72h, indicando que a produção de H₂O₂ ocorre de maneira bastante rápida nas folhas e, com Si + As^{III} e As^{III} isso pode não ter ocorrido de maneira tão rápida devido a competição pela absorção e pela complexação com fitoquelatinas, respectivamente (Figura 3A).

Figura 3. Concentração de H₂O₂ em folhas (A) e raízes (B) de *Lactuca sativa* L. após 24 e 72h de exposição aos tratamentos: controle, As^{III}, As^V, Si, Si + As^{III}, Si + As^V, SiNP, SiNP + As^{III} e SiNP + As^V. Médias seguidas por letra maiúscula igual não diferem entre fontes de As; médias seguidas por letra minúscula igual não diferem entre fontes de silício pelo teste de Tukey (P<0,05) e * compara médias entre o período de exposição aos tratamentos pelo teste F (P<0,05).



Fonte: Autores (2022).

Nas raízes, assim como nas folhas, a concentração de H₂O₂ aumentou quando as plantas foram tratadas com As^{III} e As^V quando comparadas ao tratamento sem As tanto com 24 quanto com 72h. Porém, nesse caso, o As^{III} aumentou mais concentração nos dois períodos de exposição. Também ficou evidente que, quando As é aplicado com as fontes de silício, o aumento também ocorre em comparação aqueles sem As, sendo, com exceção ao Si + As^V, após 24h, um aumento mais significativo para o As^{III} (Figura 3B).

Entre as fontes de silício, quando aplicadas com As^{III} e comparadas com este sem silício, ocorre uma redução significativa da concentração de H₂O₂ após 24h, que não é observada para SiNP. Já com 72h isso ocorre para SiNP e Si sendo a uma concentração menor observada para SiNP. Já quando estas são aplicadas com As^V somente SiNP, tanto com 24 quanto com 72h diminui essa concentração. Acrescenta-se que SiNP, tanto após 24 quanto 72h, mesmo sem a presença de As, causou um aumento na concentração de H₂O₂ quando comparada ao controle, enquanto Si não. Além disso, somente quando os tratamentos com As^{III} foi exposto as fontes de silício ou aplicado sem estas houve diferença na concentração de H₂O₂ entre o período de exposição, sendo sem silício após 72h, com SiNP após 24h e com Si após 72h. Fica evidente que, apesar de não comparadas entre si, as folhas geraram uma concentração maior de H₂O₂ do que as raízes (Figura 3B).

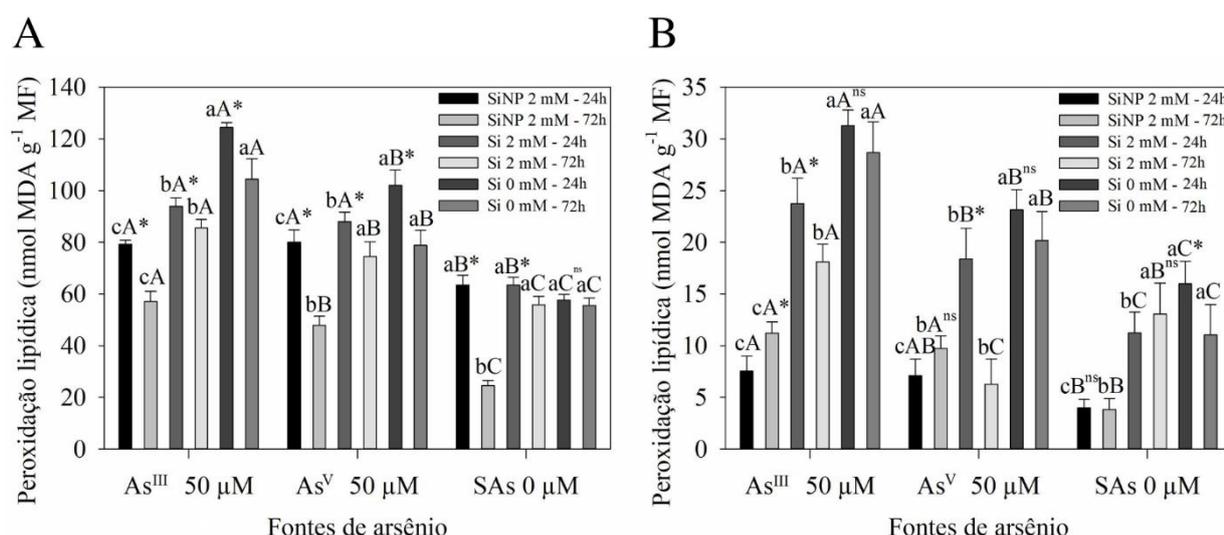
3.2.2. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica aumentou, nas folhas, nos tratamentos com As^{III} e As^V com 24h e o mesmo acontece com 72h de exposição quando comparados ao controle, tendo o As^{III} apresentado a maior peroxidação lipídica, nos dois períodos de exposição, quando comparado aos demais. Quando SiNP foi aplicado com As^{III} obteve-se a menor peroxidação com 24 e, com 72h, e o mesmo ocorre com o As^V. Contudo, a aplicação do mesmo com As^{III} e As^V resultou em uma maior peroxidação lipídica,

nos dois períodos de exposição, quando comparado com a aplicação deste sem a presença de As, sendo que com 24h não houve diferença entre As^{III} e As^V mas com 72h sim, tendo a aplicação de SiNP com As^{III} apresentado maior peroxidação lipídica nesse período. Resultados iguais são observados quando As^{III} e As^V são aplicados com Si (Figura 4A).

Destaca-se que SiNP apresentou uma menor peroxidação lipídica quando comparado com Si quando estes foram aplicados com As^{III} tanto com 24 quanto com 72h tendo o mesmo ocorrido quando estes foram aplicados com As^V. Além disso não houve diferença quando Si foi aplicado com As^V do que quando não havia nenhuma fonte de silício, com 72h de exposição. Quando aplicados sem As, não houve diferença entre as fontes de silício com 24h, mas com 72h SiNP apresentou uma peroxidação lipídica. Além disso todos os tratamentos diferiram quando ao período de exposição aos tratamentos diminuindo a peroxidação lipídica após 72 h de exposição, com exceção do controle que não diferiu (Figura 4A).

Figura 4. Peroxidação lipídica em folhas (A) e raízes (B) de *Lactuca sativa* L. após 24 e 72h de exposição aos tratamentos: controle, As^{III}, As^V, Si, Si + As^{III}, Si + As^V, SiNP, SiNP + As^{III} e SiNP + As^V. Médias seguidas por letra maiúscula igual não diferem entre fontes de As; médias seguidas por letra minúscula igual não diferem entre fontes de silício pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) e * compara médias entre o período de exposição aos tratamentos pelo teste F ($P \leq 0,05$).



Fonte: Autores (2022).

Nas raízes, de maneira análoga as folhas, a peroxidação lipídica também aumenta nos tratamentos As^{III} e As^V, tanto com 24 quanto com 72h em comparação ao controle, e, novamente As^{III} apresentou uma maior peroxidação lipídica nos dois períodos de exposição quando comparado aos demais. Quando aplicado com As^{III}, SiNP, novamente, diferiu das demais fontes de silício apresentando a menor peroxidação tanto com 24 quanto com 72h. Quando SiNP foi aplicado com As^V o mesmo acontece com 24 horas, mas com 72h este não difere de Si, mas os dois diferem do As^V sem aplicação de silício, tendo este apresentado uma peroxidação lipídica maior. Nos tratamentos sem As, SiNP obteve a menor peroxidação lipídica, tanto com 24 quanto com 72 h. Enquanto Si diferiu do controle, tendo uma menor peroxidação com 24h de tratamento, mas após 72h este não diferiu (Figura 4B).

Entre As^{III} e As^V a aplicação de SiNP não causou diferenças com 24 nem com 72h. Já com Si a peroxidação diminuiu quando aplicado com As^V nos dois períodos de exposição em comparação com o As^{III} na presença do mesmo. De maneira interessante, As^V, na presença de Si, diferiu do tratamento com somente Si apresentando uma menor peroxidação após 72h de exposição. Diferentemente do que ocorreu nas folhas, nas raízes o controle diferiu quanto ao tempo de exposição apresentando maior peroxidação após 24h de exposição, tendo, além destes, Si + As^{III}, Si + As^V e SiNP + As^{III} diferenciado, o que pode indicar um maior controle sobre as EROs neste órgão vegetal na presença de As (Figura 4B).

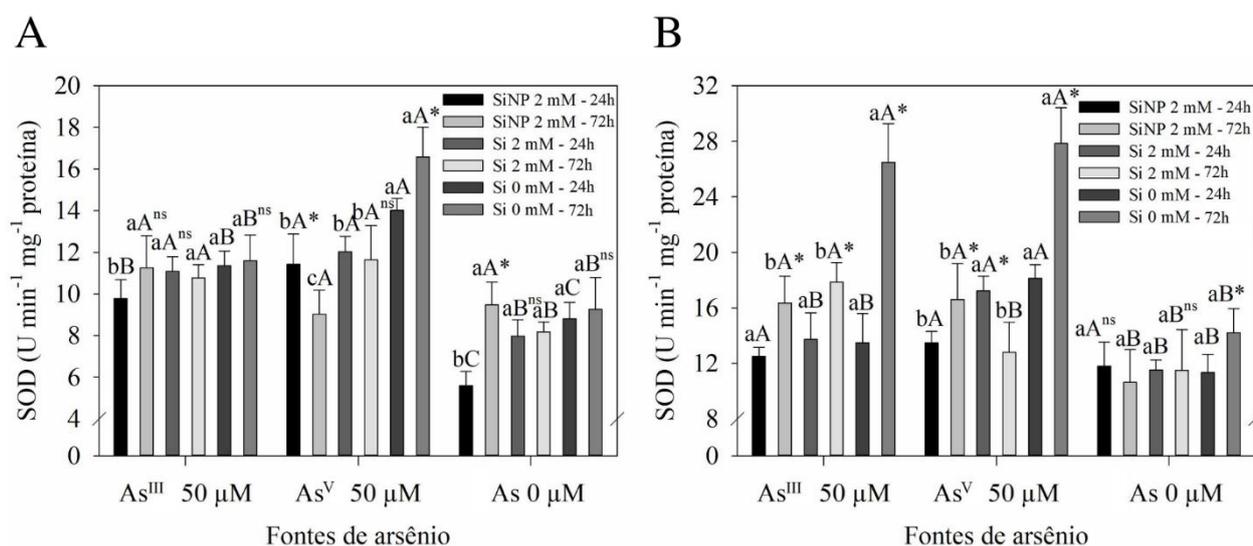
3.3. Atividade de enzimas do sistema antioxidante: dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX) e peroxidase do ascorbato (APx)

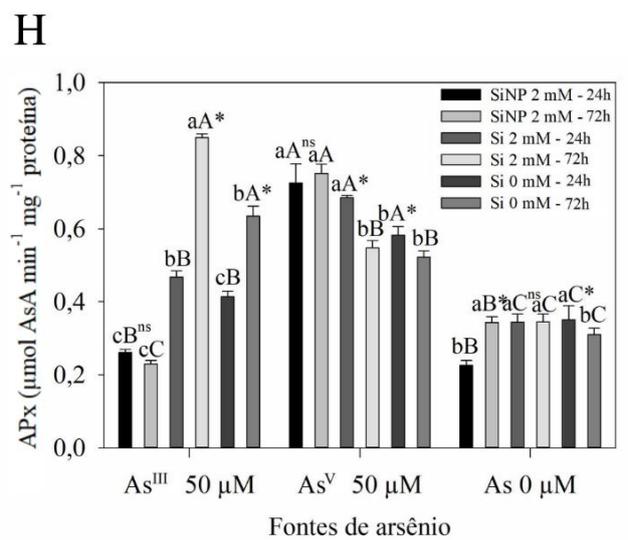
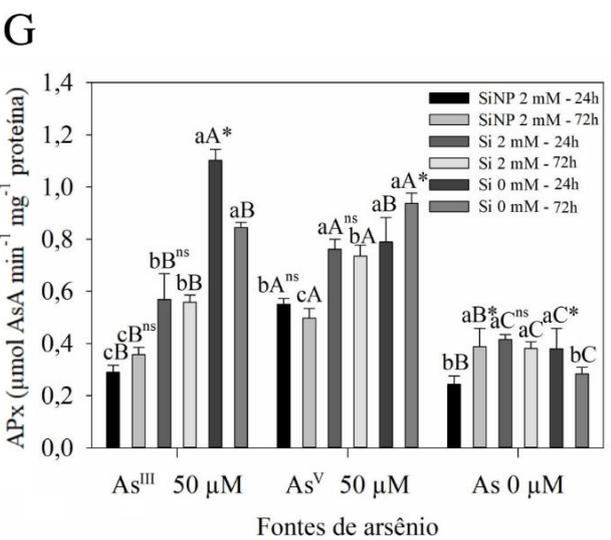
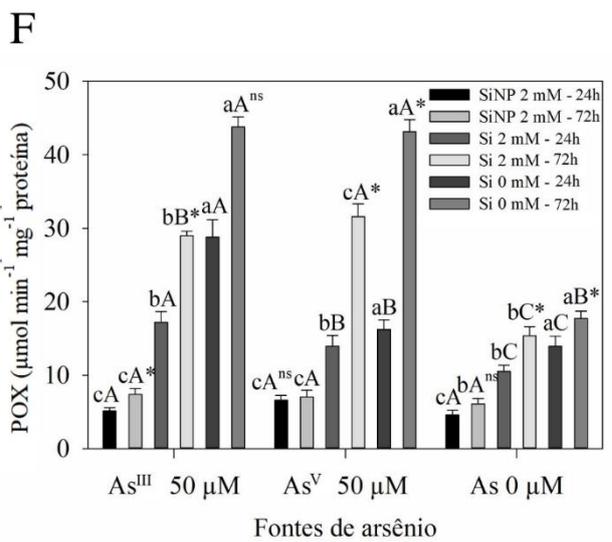
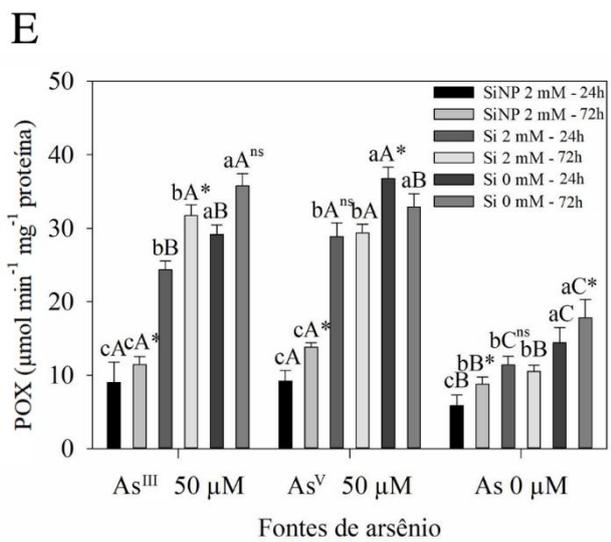
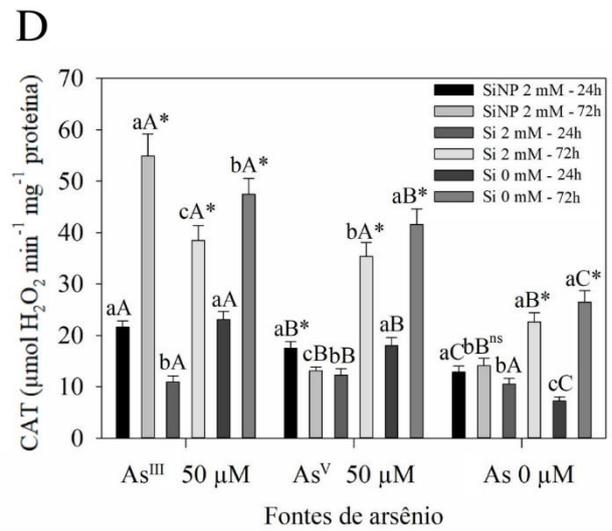
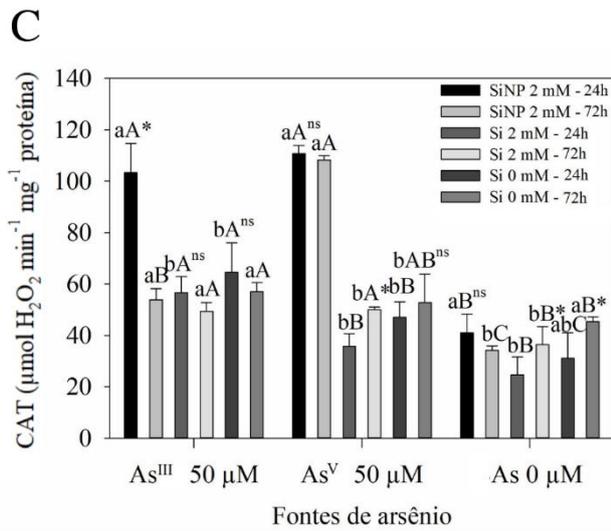
A atividade da SOD foi claramente aumentada pela presença do As nas folhas após 24h de exposição, tendo As^{III} e

As^V diferido do tratamento sem As e entre si, com As^V apresentando uma atividade maior para essa enzima. Porém, com 72h de tratamento As^{III} não diferiu da fonte sem As e, portanto, a atividade enzimática não foi alterada por essa fonte de As nesse período enquanto que com As^V sim. Além disso, As na presença de SiNP, após 24h, também aumentou a atividade dessa enzima, especialmente com As^V, mas, com 72h não, tendo a atividade desta sido a mesma independente da presença de ou não de As. Quando As foi aplicado com Si a atividade desta aumentou em relação ao controle, mas foi a mesma quando se compara As^{III} e As^V, nos dois períodos de exposição (Figura 5A).

Quando SiNP foi aplicado com As^{III} este diminuiu significativamente a atividade da SOD em comparação as demais fontes de silício após 24h de exposição. Após 72h, nenhuma fonte de silício diferiu entre si quando aplicadas com As^{III}. Já com As^V silício provocou uma redução na atividade da SOD, tanto com 24 quanto com 72h, sendo o SiNP, após 72h o que causou maior redução. Além disso, SiNP após 24h, foi o a única fonte que alterou significativamente a atividade da SOD na ausência de As, reduzindo-a quando comparado as demais fontes de silício, o que indica a dependência da presença do As para que o silício exerça alívio pelo aumento da atividade desta. Destaca-se, ainda, que nenhum dos tratamentos contendo Si, com ou sem As, diferiram quanto ao período de exposição mantendo a atividade da SOD a mesma com 24 e 72h, assim como o controle também não diferiu e nem As^{III}. Nos tratamentos com SiNP com ou sem a presença de As isso só ocorre com SiNP + As^{III} (Figura 5A).

Figura 5. Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em folhas (A) e raízes (B), catalase (CAT) em folhas (C) e raízes (D), peroxidase (POX) em folhas (E) e raízes (F) e da peroxidase do ascorbato (APx) em folhas (G) e raízes (H) de *Lactuca sativa* L. após 24 e 72 horas de exposição aos tratamentos: controle, As^{III}, As^V, Si, Si + As^{III}, Si + As^V, SiNP, SiNP + As^{III}, SiNP + As^V. Médias seguidas por letra maiúscula igual não diferem entre fontes de As; médias seguidas por letra minúscula igual não diferem entre fontes de silício pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) e * compara médias entre o período de exposição aos tratamentos pelo teste F ($P \leq 0,05$).





Fonte: Autores (2022).

Nas raízes, As^{V} provocou uma atividade maior dessa enzima em comparação com As^{III} e o controle após 24h, mas com 72h ambos causaram um aumento na atividade da mesma em relação ao controle. Além disso, a presença de SiNP após 24h não alterou a atividade da mesma entre as fontes de As mas, com 72h, plantas foram expostas ao As com SiNP apresentaram uma atividade maior. A presença de As aumentou, também, a atividade da SOD quando estava na presença de Si. Com 24h isso ocorreu para o As^{V} e com 72h para o As^{III} quando estes foram comparados sem a presença do mesmo (Figura 5B).

Ainda nas raízes, as fontes de silício não exerceram diferença quando foram aplicadas com As^{III} após 24h já com As^V , SiNP diminuiu a atividade da enzima enquanto Si não quando comparadas com os tratamentos sem silício. Com 72h ambas as fontes reduziram a atividade quando aplicadas tanto As^{III} quanto com As^V . Quando as fontes de silício foram aplicadas sem As nenhuma destas diferiu nem com 24 nem com 72h, o que indica que o efeito do silício nessa enzima, nas raízes, foi dependente da presença de alguma forma de As causando alívio do estresse pelo aumento desta, de forma geral (Figura 5B).

Na CAT, As^{III} sem a presença de silício, nas folhas, com 24h, causou um aumento da atividade desta em comparação ao As^V e ao controle. Sendo que As^V também aumentou, porém esse aumento foi menos expressivo do que o aumento causado por As^{III} . Com 72h o mesmo ocorre para As^{III} comparado ao controle, mas para As^V não. Quando aplicado com SiNP a presença de As, seja com As^{III} ou As^V , levou a um aumento da atividade da CAT independente do período de exposição, quando comparado sem a presença de As. Porém, com 72h esse aumento foi mais significativo para As^V . Já com Si, com 24h, esse aumento só foi visto quando aplicado com As^{III} , mas com 72h o aumento ocorreu tanto para As^{III} quanto para As^V , mas entre os dois não houve diferença na atividade da CAT (Figura 5C).

Já quanto as fontes de silício, com 24h, SiNP aumentou significativamente a atividade de CAT, quando comparada as demais fontes, tanto quando foi aplicada com As^{III} como com As^V . Com 72h, isso só acontece para As^V sendo que com As^{III} não há diferença entre nenhuma das fontes e com As^V , Si não diferiu deste sem fonte de silício. Quando aplicadas sem As as fontes de silício diminuíram a atividade da CAT comparadas controle, após 72h. Já após 24h SiNP e Si diferiram entre si, mas não diferiram do controle. Destaca-se ainda que As^{III} e As^V não diferiram quanto ao período de exposição mantendo a atividade da CAT nas folhas a mesma independente do período de exposição. Quando SiNP foi aplicada a alguma fonte de As, apenas com As^{III} esta diferiu, com aumento da atividade após 24h e com Si apenas com As^{III} esta não diferiu (Figura 5C).

Nas raízes, a presença de As^{III} e As^V , sem nenhuma fonte de silício aumentou a atividade da CAT, independente do período de exposição, sendo nos dois períodos esse aumento mais expressivo para o As^{III} . Quando foi aplicado com SiNP, As^{III} diferiu de As^V e da fonte sem As nos dois períodos de exposição, mas As^V não diferiu da fonte sem As após 72 horas de tratamento. Já quando aplicado com Si, As^V diferiu dos demais aumentando a atividade da CAT após 24h de tratamento, mas com 72h tanto As^{III} quanto As^V diferiram da fonte sem As, apresentando maiores atividades, mas não diferindo entre si (Figura 5D)

Entre as fontes de silício, quando aplicadas com As^{III} , Si, após 24h, apresenta menor atividade que as demais que não diferem entre si. Com 72h Si continua sendo a fonte com menor que apresenta menor atividade, mas SiNP, além de diferir de Si, também difere da fonte sem silício, apresentando a maior atividade entre estas. Quando as fontes de silício são comparadas com As^V , com 24h, o mesmo que ocorreu foi relatado anteriormente para as fontes de silício com As^{III} se repete, porém, com 72 h, apesar de as fontes diferirem entre si, SiNP apresenta a menor atividade para CAT, diferentemente do que ocorreu para as fontes de silício com As^{III} . Nota-se que as fontes de silício, para CAT, causam um aumento da atividade mesmo na ausência de As, com 24h, já que estas quando expostas sem As diferiram do controle neste período. Porém, de forma curiosa, após 72h SiNP difere dos demais apresentando uma atividade menor e, de todos os tratamentos, inclusive dos contendo As, é o único que não difere quanto ao período de exposição, apresentando, estatisticamente, a mesma atividade da CAT tanto com 24 quanto com 72h. Sendo que, com exceção SiNP + As^V , todos aumentaram a atividade da mesma após 72h de tratamento (Figura 5D).

Assim como visto para SOD e CAT, As^{III} e As^V , sem a aplicação de silício, aumentaram significativamente a atividade da POX nas folhas, nos dois períodos de aplicação, diferindo do tratamento sem As. Para essa enzima, após 24h, As^V causou esse aumento de forma mais expressiva, porém, após 72h de exposição isso ocorreu com As^{III} . O aumento da atividade também ocorreu As^{III} e As^V foram aplicados com SiNP e comparados com este sem As, tanto com 24 quanto com 72h, mas SiNP + As^{III} e SiNP + As^V não diferiram nem com 24 nem com 72h. O mesmo ocorre quando as fontes de As são aplicadas com Si com 72h de exposição, mas com 24h, houve diferenças entre todas as fontes de As na presença de Si com As^V apresentando a maior atividade da POX, mas com As^{III} também aumentando a atividade desta se comparado com o tratamento sem As (Figura 5E).

Quanto as fontes de silício, quando estas foram aplicadas com As^{III} houve redução da atividade da POX tanto com 24 quanto com 72h em comparados aos tratamentos sem nenhuma fonte de silício (com apenas As^{III}). De maneira análoga o mesmo

ocorre com as fontes de silício aplicadas com As^V . Entre SiNP e Si, tanto em As^{III} quanto em As^V e tanto com 24h quanto com 72h, SiNP foi quem causou estatisticamente a menor atividade da POX. Quando as fontes de silício foram aplicadas sem As, com 24h, o mesmo que ocorreu para As^{III} e As^V se repete, porém, com 72h SiNP e Si diferem do controle, mas não entre si, apresentando atividade mais baixa para essa enzima em comparação ao mesmo. Em relação ao período de exposição, todos os tratamentos contendo SiNP + As diferiram aumentando a atividade dessa enzima após 72h, já os tratamentos com Si + As, somente com As^{III} isso ocorreu e, nos tratamentos sem nenhuma fonte de silício, As^{III} não diferiu (Figura 5E).

Nas raízes, novamente, As^{III} e As^V diferiram de quando não havia As tanto com 24h quanto com 72h resultando em aumento a atividade da POX nestes. Porém, nesse órgão As^{III} , após 24h causou uma atividade maior que As^V e após 72h não houve diferença entre as duas fontes. Diferentemente do que aconteceu nas folhas, não houve diferença entre nenhuma fonte de As quando estas foram aplicadas com SiNP, nem com 24h nem com 72h, mantendo a atividade da enzima a mesma independente da presença de alguma forma de As. Já quando aplicado com Si, houve diferença entre todas as fontes, sendo, com 24h, a maior atividade vista em Si + As^{III} e com 72h em Si + As^V (Figura 5F).

Quando as fontes de silício, o mesmo que ocorreu nas folhas, quando essas foram aplicadas As^{III} , ocorreu nas raízes. SiNP causou uma redução da atividade da POX mais significativa que Si, mas Si também causou uma redução quando comparado aos tratamentos sem nenhuma fonte de silício, tanto com 24h quanto com 72h. Quando essas mesmas fontes são comparadas quanto ao As^V , com 24h, SiNP causou, novamente, uma maior redução da atividade dessa enzima em comparação as outras fontes, mas Si também reduziu quando comparado ao tratamento sem nenhuma fonte de silício, mas com 72h, SiNP e Si não diferem, mas ainda assim diminuem a atividade da POX (Figura 5F).

Quando aplicadas sem a presença de As, SiNP causa a maior redução da atividade em comparação as demais fontes, com 24h, mas com 72h SiNP não difere de Si, mas ambas diferem do controle, diminuindo, também a atividade da POX. Ainda nas raízes, quando comparados com relação ao tempo de exposição, diferentemente do que ocorreu nas folhas, SiNP + As^{III} diferiu, enquanto os demais tratamentos com SiNP não diferiram. Já com Si, todos os tratamentos diferiram. Além disso, As^{III} não diferiu enquanto As^V e o controle sim. Todos os tratamentos que diferiram apresentaram uma maior atividade dessa enzima após 72h de exposição (Figura 5F).

A APx catalisa a oxidação do ascorbato, com redução do H_2O_2 a água, diminuindo a concentração celular dessa ERO e, conseqüentemente, o estresse oxidativo. Nesse trabalho, a atividade da APx foi significativamente aumentada, nas folhas, pela presença de As, quando comparada sem a presença do mesmo. Após 24h de exposição, As^{III} causou esse aumento de forma mais significativa que As^V , mas com 72h ocorreu contrário. A aplicação das fontes de As com SiNP só foi significativamente maior com a aplicação de As^V tanto para 24h quanto para 72h, sendo a atividade desta a mesma com As^{III} e sem nenhuma fonte de As nos dois períodos de exposição. Já com Si, tanto com As^{III} quanto com As^V causaram aumentos significativos nos dois períodos, mas, com As^V esse aumento foi maior do que com As^{III} (Figura 5G).

Quando as fontes de silício foram aplicadas com As^{III} SiNP causou uma redução mais significativa que Si nos dois períodos de exposição. Mas Si também causou uma redução na atividade da APx quando comparado as plantas que não receberam silício. O mesmo ocorreu quando SiNP foi aplicado com As^V nos dois períodos de exposição, mas para Si essa redução só ocorreu com 72h. Com 24h a aplicação de Si não causou diferença do tratamento que não recebeu silício. Quando aplicadas sem As, SiNP causou uma redução da atividade da APx após 24h de exposição enquanto Si não, mas com 72h, tanto SiNP quanto Si causaram um aumento na atividade em comparação ao controle. Além disso, nenhum tratamento que recebeu Si, com ou sem As, diferiu quanto ao período de exposição aos tratamentos, mantendo a atividade da APx a mesma tanto com 24h quanto com 72h, assim como os com SiNP quando estavam com As. Quando SiNP foi aplicado sem a presença de As diferiu, bem como os que não tinham nenhuma fonte de silício (Figura 5G).

Nas raízes, assim como nas folhas, o As também causou um aumento na atividade da APx, porém, com 24h foi As^V que causou um aumento mais significativo entre as fontes de As e, com 72h foi o As^{III} , sendo que ambos diferiram entre si nos dois períodos de exposição e também diferiram dos tratamentos que não receberam As. Quando As foi aplicado com SiNP, após 24h, SiNP + As^V diferiu dos demais aumentando a atividade dessa enzima e com 72h tanto SiNP + As^{III} quanto SiNP + As^V

diferiram do tratamento sem As, com SiNP + As^{III} tendo a menor atividade entre os mesmos. Quando As foi aplicado com Si, independente do período avaliado, todos diferiram entre si, sendo com 24h uma atividade mais alta com As^V e com 72h com As^{III} (Figura 5H).

Entre as fontes de silício, quando aplicadas com As^{III}, com 24h, não houve diferença entre SiNP e o tratamento sem silício, mas Si diferiu das demais apresentando uma atividade maior da enzima. Com 72h todas as fontes diferiram entre si, mas SiNP apresentou uma atividade menor que as plantas que não receberam silício, enquanto Si uma atividade mais alta. Quando foram aplicadas com As^V SiNP e Si não diferiram entre si e apresentaram uma atividade mais alta, com 24h, do que aquelas que não receberam silício mas com 72h somente SiNP continuou exibindo uma atividade maior, enquanto Si não diferiu do tratamento sem fonte de silício, com ambos apresentando uma atividade mais baixa. Quando essas fontes foram aplicadas sem As, após 24h SiNP apresentou uma atividade mais baixa que as demais, mas com 72h esta não diferiu do Si, com ambos os tratamentos apresentando uma atividade mais alta que o controle no mesmo período. Com relação ao período de exposição, diferentemente do que ocorreu na parte aérea, somente quando foi aplicado com As os tratamentos com Si diferiram sendo com As^{III} a atividade mais alta vista após 72h e com As^V após 24h. Nos tratamentos com SiNP ocorreu o contrário. Quando foi aplicado com alguma forma de As não houve diferença entre o período de exposição, mas quando aplicado sem fonte de As este diferiu. Além disso, os tratamentos sem fontes de silício, independente da presença ou não de As, diferiram quanto ao período de exposição aos tratamentos (Figura 5H).

4. Discussão

As EROs como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical superóxido (O₂⁻), radical hidroxila (·OH), e oxigênio singlete (¹O₂) são as mais abundantes na célula vegetal e sua produção se dá em quase todos as organelas como os cloroplastos, mitocôndrias, citosóis, vacúolos, peroxissomos, membranas plasmáticas, apoplastos e paredes celulares (Kohli et al., 2019). Ao contrário do que se pensava, já se sabe que estas são importantes moléculas de sinalização em plantas e influenciam um amplo espectro de respostas vegetais de crescimento, desenvolvimento e resposta ao estresse biótico e abiótico através da expressão de genes (Mishra, Dwivedi, Mallick, & Tripathi, 2019; Dvořák, Krasylenko, Zeiner, Šamaj, & Takáč, 2021). Porém a produção excessiva de EROs causa estresse oxidativo, que é o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, a favor dos oxidantes que leva a uma interrupção da sinalização e controle redox e/ou dano molecular (Sies, 2018), causando então a peroxidação lipídica, danos em biomoléculas, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos e proteínas, o que, eventualmente, resulta em morte celular (Mishra et al., 2019; Dvořák et al., 2021).

O dano mais perigoso do As ao nível celular é superprodução de EROs e isso se dá pela redução de arsenato a arsenito, que é o primeiro passo realizado para desintoxicação de As pelas plantas, pela estimulação de enzimas produtoras de EROs como NADPH oxidases, inibição de enzimas envolvidas na cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias e cloroplastos, inativação de enzimas antioxidantes em diferentes compartimentos celulares e inibição de vias envolvidas na biossíntese de moléculas essenciais para a homeostase redox em células (Talukdar, 2013; Li et al., 2016; Abbas et al., 2018; Mishra et al., 2019).

O malondialdeído (MDA) é um produto da peroxidação lipídica de membranas, e seu conteúdo é amplamente utilizado como indicador de danos nas membranas de plantas causado pelo estresse oxidativo gerado por EROs (Morales & Munné-Bosh, 2019; Jung et al., 2019). Portanto aumentos no conteúdo de MDA e no conteúdo de H₂O₂ são indicadores conhecidos e muito utilizados para determinar a extensão do estresse oxidativos em plantas (Kaya, Ashraf, Alyemeni, & Corpas, 2020), bem como o causado pelo As, no qual inúmeros estudos mostram aumentos de H₂O₂ com consequente aumento de MDA em plantas estressadas por As. Nesse estudo isso se confirma, e, apesar de nas folhas, após 24h as concentrações de H₂O₂ terem sido maiores para As^V, após 72h é o As^{III} que causa maiores concentrações, assim como para as raízes e para concentração de MDA, o que confirma que, nesse trabalho, As^{III} causou um estresse oxidativo maior que As^V nas mesmas concentrações. Isso pode ter se dado pela rápida redução de As^V a As^{III} nas raízes, mas baixa eficiência da complexação do As^{III} com grupos tióis (como os da GSH e fitoquelatinas) e posterior transporte para o vacúolo, causando estresse oxidativo. Gusman, Oliveira, Farnese, & Cambraia (2013), constaram que danos causados pela exposição ao As^{III} foram mais severos do que os promovidos pelo As^V na peroxidação lipídica de plantas de alface, corroborando nossos resultados.

Em outras culturas agrícolas aumentos na concentração de H_2O_2 e na peroxidação lipídica causada por As também são observadas, como para o arroz (Tripathi et al., 2013), trigo (Maghsoudi, Arvin, & Ashraf, 2019), milho (Tripathi et al., 2016), tomate (Kaya & Ashraf, 2022) e mostarda (Ahamad et al., 2021), tendo em todas estas a aplicação de silício iônico e/ou nanoparticulado diminuído o estresse oxidativo na presença de As. Apesar de As^{III} e As^V quando aplicados com as fontes de silício ainda terem causado um aumento de H_2O_2 em comparação a aplicação de silício sem As, de maneira geral, nossos resultados corroboram com estes, especialmente na diminuição da peroxidação lipídica na presença de SiNP. A aplicação de SiNP sem a presença de As aumentou, de forma geral a concentração de H_2O_2 enquanto Si não, porém, isso não foi refletido na peroxidação lipídica, e, na raízes a quantidade de MDA dessa foi menor, bem como a de Si em relação ao controle, comprovando o papel protetor que o silício exerce sobre o estresse oxidativo em plantas (Mostofa et al., 2021).

Nas células vegetais a produção de EROs está em equilíbrio com a eliminação destas por antioxidantes, compostos enzimáticos e/ou não enzimáticos capazes de inibir ou extinguir EROs e retardar ou prevenir o estresse e posterior dano oxidativo e esse equilíbrio permite reações redox adequadas ao crescimento e desenvolvimento vegetal (Bakhat et al. 2017; Dumont & Rivoal, 2019). A superprodução de EROs induzida por As é controlada por estes antioxidantes (Abbas et al., 2018).

A superprodução de $O_2^{\cdot-}$ é tido como o precursor do estresse oxidativo e este pode si só pode causar danos as células, mas também pode reagir com H^+ e formar radical hidroperoxila ($HO_2^{\cdot-}$), que é muito mais reativo, estável e permeável através de membranas biológicas (Hasanuzzaman et al., 2019; Kohli et al., 2019), portanto, sua eliminação é muito importante em células vegetais e isso é feito através da dismutação espontânea ou enzimática através da SOD que é 10.000 vezes mais rápida que a dismutação espontânea (Dumanović et al., 2021). Sendo a primeira linha de defesa contra EROs em plantas, a SOD causa a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 , que pode ser, então, convertido a água pela CAT e POX, que também são importantes antioxidantes enzimáticos que agem contra o estresse oxidativo (Hasanuzzaman et al., 2020).

Variações muito grandes quanto a atividade dessas enzimas são relatadas na literatura quando plantas são expostas a As. No trigo, a aplicação de doses crescentes de As^V gerou aumentos da atividade da SOD, mas reduções na atividade CAT e POX (Sil & Biswas, 2020). Para mostarda, SOD e POX aumentaram, enquanto CAT diminuiu (Ahmad et al., 2021) Já pro arroz, as atividades variaram quanto a sensibilidade, tento para o arroz tolerante, a exposição a As^{III} aumentado a atividade da SOD, mas diminuído a da CAT e POX e para o arroz sensível somente a atividade da CAT diminuiu (Tripathi et al., 2013).

Nesse trabalho a atividade da SOD foi dependente da forma de As e do tempo de exposição, para As^V esta foi aumentada independente do período de exposição, enquanto que para o As^{III} foi observado um aumento após 24h nas folhas e após 72h nas raízes em relação ao controle. Quando observado aumento da atividade, este sempre foi significativamente maior após 72h, independente da forma de As. Esses resultados implicam que houve um aumento de $O_2^{\cdot-}$ pela presença na As nessas plantas e este foi continuamente gerado pela presença de As^V , sendo para As^{III} o aumento dependente do órgão vegetal e do tempo de exposição. Na ampla maioria dos trabalhos relatados, como nos citados acima para o trigo, arroz e mostarda, a atividade da SOD aumenta em resposta ao estresse por As, o que corrobora com estes resultados e, também, demonstra a importante participação dessa enzima na tentativa de diminuir o estresse oxidativo. De forma a corroborar ainda mais com estes resultados, aumentos na atividade da SOD em alface foram observadas em folhas e raízes quando expostas a As^{III} e As^V (Gusman et al., 2013).

Como o produto da dismutação do $O_2^{\cdot-}$ pela SOD é o H_2O_2 fica explicado o aumento da concentração deste nesse trabalho. O H_2O_2 , mesmo reconhecidamente um molécula sinalizadora em plantas em baixas concentrações é um ERO relativamente estável que possui uma meia-vida mais longa que outras EROs, podendo atravessar membranas celulares, através de aquaporinas e distâncias mais longas causando uma extensão maior dos danos oxidativos em altas concentrações (Das & Roychoudhury, 2014; HASANUZZAMAN et al., 2020). Sua neutralização e/ou eliminação, assim como para o $O_2^{\cdot-}$, é importante para evitar a formação de OH^{\cdot} que é a ERO mais reativa e tóxica conhecida (Das & Roychoudhury, 2014). CAT e POX são duas das enzimas capazes de manter a concentração de H_2O_2 em níveis não tóxicos para as células através de sua redução a água.

Tanto As^V quanto As^{III} causaram aumento das atividades da CAT e POX nesse estudo em relação ao controle, com

exceção da atividade da CAT nas folhas, após 72h, na presença de As^V. Rajput et al. (2021) afirmou que estas enzimas trabalham em estreita sincronia com a SOD na regulação redox de plantas, e isso se confirma no nosso estudo, visto que o aumento do H₂O₂ causou um aumento da atividade de CAT e POX.

Aumentos nas atividades dessas enzimas para combater o estresse por arsênio são relatados para dicotiledôneas como o tomate (González-MoscOSO et al., 2022), mostarda (Ahmad et al., 2021) e alface (Gusman et al., 2013). Atividades contrastantes dessas enzimas também podem ocorrer a depender da concentração e de onde o H₂O₂ é produzido em maior concentração, visto que são mais abundantes em compartimentos celulares diferentes e possuem afinidade diferencial pelo H₂O₂ (Dumanović et al., 2021).

Os aumentos nas atividades dessas três enzimas antioxidantes não foram suficientes para diminuir o estresse oxidativo e posterior dano em membranas causadas por As, visto que estes aumentaram, especialmente na presença de As^{III}. O silício estimula a atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD, CAT e POX em condições de estresse por As, como um mecanismo de mitigação do estresse oxidativo (Bhat et al., 2019; Tripathi et al., 2013).

Houve, de maneira geral, uma estimulação nas atividades de SOD, CAT e POX pela aplicação de silício nesse trabalho, porém isso foi dependente da forma de As e da fonte de silício. As alterações causadas por Si e SiNP nas fontes de As para a atividade dessas enzimas foram bastante variáveis, mas fica bastante claro que ambas as fontes diminuíram o estresse causado por As, quando comparadas com este aplicado isoladamente. Isso foi refletido pela menor peroxidação lipídica nos tratamentos em combinação de silício e As. Mesmo a aplicação de silício sem As também alterou a atividade dessas enzimas, especialmente na POX no qual houveram diminuições significativas pelo Si e mais ainda pelo SiNP após 24h de exposição.

Vaculik et al. (2020) relata que o pré-tratamento com silício ativa a maquinaria antioxidante e essas plantas posteriormente eliminam as EROs de forma mais eficaz e podem lidar melhor com o estresse oxidativo por metais pesados, o que pode confirmar estes resultados visto que o pré-tratamento foi feito nesse estudo. E, mesmo sem o pré-tratamento existem relatos parecidos com este (Bhat et al., 2019). Porém, resultados opostos já foram relatados por Líška *et al.* (2017), com silício diminuindo a atividades dessas enzimas quando expostas a metais pesados. O que fica claro é que uma relação entre o silício e a maquinaria antioxidante existe, mas que isso depende de muitos fatores, sendo necessário estudos mais aprofundados em genética em todas as espécies de plantas para revelar em quais mecanismos o silício atua na regulação das respostas ao estresse oxidativo e se este é um efeito direto ou indireto (Mostofa et al., 2021). Mesmo assim, para o As a maior parte dos estudos mostra um aumento na atividades dessas enzimas causada pela aplicação do silício, iônico ou nanoparticulado, como no trigo (Maghsoudi et al., 2019), arroz (Kiany et al., 2022) e tomate (Kaya & Ashraf, 2022), corroborando nossos resultados.

A APx utiliza duas moléculas de AsA para reduzir H₂O₂ a água e apesar de AsA poder eliminar H₂O₂, isso ocorre de maneira lenta, sendo a eliminação feita pela APx muito mais eficiente (Smifnoff, 2018; Asthir, Kaur, & Kaur, 2020). Além disso a APx possui uma afinidade pelo H₂O₂ muito alta, pelo menos 100 vezes maior que a da CAT (Anjum et al., 2014). A atividade da APx foi significativamente aumentada por As nesse trabalho, tanto em folhas quanto em raízes. Porém, esse aumento da atividade não resultou em menores concentrações de H₂O₂ e posterior dano nas membranas, o que indica que o As causou uma superprodução de EROs visto que a APx possui uma grande afinidade e sua atividade, bem como a das outras peroxidases vistas até aqui foram, de forma geral, aumentadas por As, mas, mesmo assim, houveram altas concentrações de H₂O₂ e danos as membranas lipídicas. Aumentos na atividade dessa enzima em plantas de alface também foram observadas por Gusman et al. (2013) e Silveira et al. (2015).

Quando as fontes de silício foram aplicadas sem As não houveram muitas diferenças quanto a atividade dessa enzima em comparação ao controle e a aplicação destas com As houve uma menor atividade desta pela aplicação de SiNP em conjunto com As^{III} mas com As^V isso não foi observado. Já com a aplicação de Si houve um estímulo da atividade especialmente quando aplicado com As^V, entre as fontes de silício. De maneira geral, SiNP causou reduções da atividade dessa enzima em comparação ao Si. Apesar dessas semelhanças não terem ficados claras quando a concentração de H₂O₂, ficou evidente que ambos diminuíram

a peroxidação lipídica. Portanto os mecanismos envolvidos nessas alterações da atividade da APx provavelmente foram diferentes.

O SiNP pode ter causado um efeito protetor ou impedido de forma mais eficiente a absorção de As^{III} e, portanto, houve uma menor “necessidade” de altas atividades da APx, enquanto o Si pode ter atuado realmente através do estímulo a atividade das peroxidases. Tripathi et al. (2013) relatou aumento na atividade da APx quando exposta a Si e As^{III} juntos, em arroz bem como Khan & Gupta (2018) na mesma cultura, mas em milho foi relatado uma redução da atividade pelo As, enquanto Si e SiNP aumentaram significativamente e Si e SiNP com As^V causou alívio das inibições mediadas por As^V (Tripathi et al., 2016). O que se nota na literatura é que respostas variáveis a depender da forma de As, cultura e tempo de exposição, mas que geralmente o silício promove alterações benéficas.

5. Conclusões

A aplicação de silício, seja na forma nanoparticulada ou iônica, diminuiu o estresse oxidativo causado por As em plantas de alface e melhorou o sistema antioxidante através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes, porém outros mecanismos como redução da absorção ou quelação desse metal também podem estar envolvidos, visto que o aumento na atividade de enzimas antioxidantes foi menor, de maneira geral, quando alguma das fontes de silício estava em co-aplicação com As do que com As sozinho. Portanto, sugere-se que investigações mais aprofundadas sejam feitas para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos. Apesar disso, este trabalho deixa claro a melhoria que as plantas obtiveram com a aplicação de silício em seu metabolismo redox, especialmente na forma nanoparticulada, demonstrando o potencial de rápida ação dessas partículas que provavelmente ocorrem devido a seu tamanho.

6. Referências Bibliográficas

- Abbas, G., Murtaza, B., Bibi, I., Shahid, M., Niazi, N. K., Khan, M. I., Amjad, M., et al. (2018). Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants: Physiological, biochemical, and molecular aspects. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(1), 59.
- Abercrombie, J. M., Halfhill, M. D., Ranjan, P., Rao, M. R., Saxton, A. M., Yuan, J. S., & Stewart, C. N. (2008). Transcriptional responses of Arabidopsis thaliana plants to As (V) stress. *BMC Plant Biology*, 8(1), 1-15.
- Agência de registro de substâncias tóxicas e doenças (2019) <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>. Acessado em 27.06.2022
- Ahmad, A., Khan, W. U., Ali Shah, A., Yasin, N. A., Naz, S., Ali, A., Tahir, A., et al. (2021). Synergistic effects of nitric oxide and silicon on promoting plant growth, oxidative stress tolerance and reduction of arsenic uptake in Brassica juncea. *Chemosphere*, 262, 128384.
- Anderson, M. D., Prasad, T. K., & Stewart, C. R. (1995). Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*, 109(4), 1247–1257.
- Andrade, R. R. D. (2019). *Efeito da concentração da solução nutritiva em cultivares de alface em sistema hidropônico tipo NFT, em clima Semiárido*.
- Anjum, N. A., Gill, S. S., Gill, R., Hasanuzzaman, M., Duarte, A. C., Pereira, E., Ahmad, I., et al. (2014). Metal/metalloid stress tolerance in plants: role of ascorbate, its redox couple, and associated enzymes. *Protoplasma*, 251(6), 1265–1283.
- Armendariz, A. L., Talano, M. A., Travaglia, C., Reinoso, H., Oller, A. L. W., & Agostini, E. (2016). Arsenic toxicity in soybean seedlings and their attenuation mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 98, 119-127.
- Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudanças (ABCSEM). (2016). *Folhas, cenário nacional*.
- Asthir, B., Kaur, G., & Kaur, B. (2020). Convergence of Pathways Towards Ascorbate–Glutathione for Stress Mitigation. *Journal of Plant Biology*, 63(4), 243–257.
- Bakhat, H. F., Zia, Z., Fahad, S., Abbas, S., Hammad, H. M., Shahzad, A. N., Abbas, F., et al. (2017). Arsenic uptake, accumulation and toxicity in rice plants: Possible remedies for its detoxification: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(10), 9142–9158.
- Bali, A. S., & Sidhu, G. P. S. (2021). Arsenic acquisition, toxicity and tolerance in plants-From physiology to remediation: A review. *Chemosphere*, 283, 131050.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276–287.
- Bhat, J. A., Shivraj, S. M., Singh, P., Navadagi, D. B., Tripathi, D. K., Dash, P. K., Solanke, A. U., et al. (2019). Role of silicon in mitigation of heavy metal

stresses in crop plants. *Plants*, 8(3), 1–20.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Chance, B., & Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. {black small square}. *Methods in Enzymology*, 2(C), 764–775.

Clark, R. B. (1975). Characterization of Phosphatase of Intact Maize Roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(3), 458–460.

Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 1–13.

Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuća, K., & Jačević, V. (2021). The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. *Frontiers in Plant Science*, 11, 552969.

Dumont, S., & Rivoal, J. (2019). Consequences of oxidative stress on plant glycolytic and respiratory metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–16.

Dvořák, P., Krasylenko, Y., Zeiner, A., Šamaj, J., & Takáč, T. (2021). Signaling Toward Reactive Oxygen Species-Scavenging Enzymes in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 2178.

Emamverdian, A., Ding, Y., Xie, Y., & Sangari, S. (2018). Silicon mechanisms to ameliorate heavy metal stress in plants. *BioMed Research International*, 2018.

Epstein, E. (1994). The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), 11-17.

Epstein, E. (1999). Silicon. *Annual review of plant biology*, 50, 641.

Finnegan, P. M., & Chen, W. (2012). Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. *Frontiers in physiology*, 3, 182.

Fleck, A. T., Mattusch, J., & Schenk, M. K. (2013). Silicon decreases the arsenic level in rice grain by limiting arsenite transport. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176(5), 785-794.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2016). Statistics division. http://faostat3.fao.org/browse/rankings/commodities_by_regions/E

Gay, C., & Gebicki, J. M. (2000). A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylene orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry*, 284(2), 217–220.

Ghosh, A., Pramanik, K., Bhattacharya, S., Mondal, S., Ghosh, S. K., Ghosh, P. K., & Maiti, T. K. (2021). Abatement of arsenic-induced phytotoxic effects in rice seedlings by an arsenic-resistant *Pantoea dispersa* strain. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(17), 21633-21649.

Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, 59(2), 309–14.

González-MoscOSO, M., Juárez-Maldonado, A., Cadenas-Pliego, G., Meza-Figueroa, D., SenGupta, B., & Martínez-Villegas, N. (2022). Silicon nanoparticles decrease arsenic translocation and mitigate phytotoxicity in tomato plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(23), 34147–34163.

Gusman, G. S., Oliveira, J. A., Farnese, F. S., & Cambraia, J. (2013). Mineral nutrition and enzymatic adaptation induced by arsenate and arsenite exposure in lettuce plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 71, 307–314.

Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Al Mahmud, J., Fujita, M., et al. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8), 1–52.

Hasanuzzaman, M., Borhannuddin Bhuyan, M. H. M., Anee, T. I., Parvin, K., Nahar, K., Al Mahmud, J., & Fujita, M. (2019). Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants*, 8(9) 384.

Havir, E. A., & McHale, N. A. (1987). Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. *Plant Physiology*, 84(2), 450–455.

Herath, I., Vithanage, M., Bundschuh, J., Maity, J. P., & Bhattacharya, P. (2016). Natural arsenic in global groundwaters: distribution and geochemical triggers for mobilization. *Current Pollution Reports*, 2(1), 68-89.

Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4), 604–611.

Hodson, M. J., White, P. J., Mead, A., & Broadley, M. R. (2005). Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. *Annals of botany*, 96(6), 1027-1046.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2020). *Censo Agropecuário*. <<https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/>>.

Jung, H. Il, Kong, M. S., Lee, B. R., Kim, T. H., Chae, M. J., Lee, E. J., Jung, G. B., et al. (2019). Exogenous Glutathione Increases Arsenic Translocation Into Shoots and Alleviates Arsenic-Induced Oxidative Stress by Sustaining Ascorbate–Glutathione Homeostasis in Rice Seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–14.

Kar, M., & Mishra, D. (1976). Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiology*, 57(2), 315–319.

- Kaya, C., & Ashraf, M. (2022). Sodium hydrosulfite together with silicon detoxifies arsenic toxicity in tomato plants by modulating the AsA-GSH cycle. *Environmental Pollution*, 294, 118608.
- Kaya, C., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., Corpas, F. J., & Ahmad, P. (2020). Salicylic acid-induced nitric oxide enhances arsenic toxicity tolerance in maize plants by upregulating the ascorbate-glutathione cycle and glyoxalase system. *Journal of Hazardous Materials*, 399, 123020.
- Khalid, S., Shahid, M., Niazi, N. K., Rafiq, M., Bakhat, H. F., Imran, M., ... & Dumat, C. (2017). Arsenic behaviour in soil-plant system: biogeochemical reactions and chemical speciation influences. In *Enhancing cleanup of environmental pollutants*, 97-140.
- Khan, E., & Gupta, M. (2018). Arsenic-silicon priming of rice (*Oryza sativa* L.) seeds influence mineral nutrient uptake and biochemical responses through modulation of Lsi-1, Lsi-2, Lsi-6 and nutrient transporter genes. *Scientific Reports*, 8(1), 1–16.
- Khan, I., Awan, S. A., Rizwan, M., Ali, S., Zhang, X., & Huang, L. (2021). Arsenic behavior in soil-plant system and its detoxification mechanisms in plants: A review. *Environmental Pollution*, 286, 117389.
- Kiany, T., Pishkar, L., Sartipnia, N., Iranbakhsh, A., & Barzin, G. (2022). Effects of silicon and titanium dioxide nanoparticles on arsenic accumulation, phytochelatin metabolism, and antioxidant system by rice under arsenic toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(23), 34725–34737.
- Kohli, S. K., Khanna, K., Bhardwaj, R., Abd Allah, E. F., Ahmad, P., & Corpas, F. J. (2019). Assessment of subcellular ROS and NO metabolism in higher plants: Multifunctional signaling molecules. *Antioxidants*, 8(12), 641.
- Kuo, M. C., & Kao, C. H. (2003). Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biologia plantarum*, 46(1), 149-152.
- Li, N., Wang, J., & Song, W. Y. (2016). Arsenic uptake and translocation in plants. *Plant and Cell Physiology*, 57(1), 4-13.
- Lindsay, E. R., & Maathuis, F. J. (2017). New molecular mechanisms to reduce arsenic in crops. *Trends in Plant Science*, 22(12), 1016-1026.
- Ma, J. F., & Takahashi, E. (2002). *Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan*. Elsevier.
- Ma, J. F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., ... & Yano, M. (2006). A silicon transporter in rice. *Nature*, 440, 688-691.
- Maghsoudi, K., Arvin, M. J., & Ashraf, M. (2020). Mitigation of Arsenic Toxicity in Wheat by the Exogenously Applied Salicylic Acid, 24-Epi-Brassinolide and Silicon. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20(2), 577–588.
- Mawia, A. M., Hui, S., Zhou, L., Li, H., Tabassum, J., Lai, C., ... & Hu, P. (2021). Inorganic arsenic toxicity and alleviation strategies in rice. *Journal of Hazardous Materials*, 408, 124751.
- McClintock, T. R., Chen, Y., Bundschuh, J., Oliver, J. T., Navoni, J., Olmos, V., ... & Parvez, F. (2012). Arsenic exposure in Latin America: Biomarkers, risk assessments and related health effects. *Science of the Total Environment*, 429, 76-91.
- Mishra, S., Dwivedi, S., Mallick, S., & Tripathi, R. D. (2019). *Redox Homeostasis in Plants Under Arsenic Stress*. Springer International Publishing.
- Mondal, S., Pramanik, K., Ghosh, S. K., Pal, P., Mondal, T., Soren, T., & Maiti, T. K. (2021). Unraveling the role of plant growth-promoting rhizobacteria in the alleviation of arsenic phytotoxicity: A review. *Microbiological Research*, 250, 126809.
- Morales, M., & Munné-Bosch, S. (2019). Malondialdehyde: Facts and artifacts. *Plant Physiology*, 180(3), 1246–1250.
- Mostofa, M. G., Rahman, M. M., Ansary, M. M. U., Keya, S. S., Abdelrahman, M., Miah, M. G., & Phan Tran, L. S. (2021). Silicon in mitigation of abiotic stress-induced oxidative damage in plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(6), 918–934.
- Murshed, R., Lopez-Lauri, F., & Sallanon, H. (2008). Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate-glutathione cycle. *Analytical Biochemistry*, 383(2), 320–322.
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867–880.
- Panda, S. K., Upadhyay, R. K., & Nath, S. (2010). Arsenic stress in plants. *Journal of Agronomy and crop science*, 196(3), 161-174.
- Peixoto, P. H. P., Cambraia, J., Sant'Anna, R., Mosquim, P. R., & Moreira, M. A. (1999). Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11(3), 137–143.
- Rahman, M. S., Jamal, M. A. H. M., Biswas, P. K., Rahman, S. M., Sharma, S. P., Saha, S. K., ... & Islam, M. R. (2020). Arsenic remediation in Bangladeshi rice varieties with enhance plant growth by unique arsenic-resistant bacterial isolates. *Geomicrobiology Journal*, 37(2), 130-142.
- Rajput, V. D., Harish, Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. R., Meena, M., et al. (2021). Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. *Biology*, 10(4).
- Remédios, C., Rosário, F., & Bastos, V. (2012). Environmental nanoparticles interactions with plants: Morphological, physiological, and genotoxic aspects. *Journal of Botany*.

- Rosas-Castor, J. M., Guzmán-Mar, J. L., Hernández-Ramírez, A., Garza-González, M. T., & Hinojosa-Reyes, L. (2014). Arsenic accumulation in maize crop (*Zea mays*): a review. *Science of the Total Environment*, 488, 176-187.
- Sahebi, M., Hanafi, M. M., Siti Nor Akmar, A., Rafii, M. Y., Azizi, P., Tengoua, F. F., ... & Shabanimofrad, M. (2015). Importance of silicon and mechanisms of biosilica formation in plants. *BioMed research international*, 2015.
- Sanglard, L. M., Martins, S. C., Detmann, K. C., Silva, P. E., Lavinsky, A. O., Silva, M. M., ... & DaMatta, F. M. (2014). Silicon nutrition alleviates the negative impacts of arsenic on the photosynthetic apparatus of rice leaves: an analysis of the key limitations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 152(2), 355-366.
- Shams, M., Ekinci, M., Turan, M., Dursun, A., Kul, R., & Yildirim, E. (2019). Growth, nutrient uptake and enzyme activity response of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) to excess copper. *Environmental Sustainability*, 2(1), 67-73.
- Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 122-126.
- Sil, P., & Biswas, A. K. (2020). Silicon nutrition modulates arsenic-inflicted oxidative overload and thiol metabolism in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(36), 45209-45224.
- Silveira, N. M., De Oliveira, J. A., Ribeiro, C., Canatto, R. A., Siman, L., Cambraia, J., & Farnese, F. (2015). Nitric Oxide Attenuates Oxidative Stress Induced by Arsenic in Lettuce (*Lactuca sativa*) Leaves. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226(11), 226-379.
- Smirnoff, N. (2018). Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 116-129.
- Talukdar, D. (2013). Arsenic-induced changes in growth and antioxidant metabolism of fenugreek. *Russian Journal of Plant Physiology*, 60(5), 652-660.
- Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, V. P., Prasad, S. M., Chauhan, D. K., & Dubey, N. K. (2016). Silicon nanoparticles more efficiently alleviate arsenate toxicity than silicon in maize cultivar and hybrid differing in arsenate tolerance. *Frontiers in Environmental Science*, 4, 46.
- Tripathi, P., Tripathi, R. D., Singh, R. P., Dwivedi, S., Goutam, D., Shri, M., Trivedi, P. K., et al. (2013). Silicon mediates arsenic tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) through lowering of arsenic uptake and improved antioxidant defence system. *Ecological Engineering*, 52, 96-103.
- Vaculík, M., Lukačová, Z., Bokor, B., Martinka, M., Tripathi, D. K., & Lux, A. (2020). Alleviation mechanisms of metal (loid) stress in plants by silicon: a review. *Journal of Experimental Botany*, 71(21), 6744-6757.
- Yamaji, N., Mitatni, N., & Ma, J. F. (2008). A transporter regulating silicon distribution in rice shoots. *The plant cell*, 20(5), 1381-1389.
- Zargar, S. M., Mahajan, R., Bhat, J. A., Nazir, M., & Deshmukh, R. (2019). Role of silicon in plant stress tolerance: opportunities to achieve a sustainable cropping system. *3 Biotech*, 9(3), 1-16.

Diretrizes do autor

1) Estrutura do texto:

Título nesta sequência: inglês, português e espanhol.

Os autores do artigo (devem ser colocados nesta sequência: nome, ORCID, instituição, e-mail). NOTA: O número ORCID é individual para cada autor, sendo necessário para registro no DOI, e em caso de erro não é possível efetuar o registro no DOI).

Resumo e Palavras-chave nesta sequência: Português, Inglês e Espanhol (o resumo deve conter o objetivo do artigo, metodologia, resultados e conclusão do estudo. Deve ter entre 150 e 250 palavras);

Corpo do texto (deve conter as seções: 1. Introdução, em que há contexto, problema estudado e objetivo do artigo; 2. Metodologia utilizada no estudo, bem como autores que sustentam a metodologia; 3.

Resultados (ou alternativamente, 3. Resultados e Discussão, renumerando os demais subitens), 4.

Discussão e, 5. Considerações finais ou Conclusão);

Referências: (Autores, o artigo deve ter no mínimo 20 referências tão atuais quanto possível. Tanto a citação no texto quanto o item de Referências, utilizar o estilo de formatação da APA - American Psychological Association. As referências devem ser completas e atualizadas. ordem alfabética crescente, pelo sobrenome do primeiro autor da referência, não devem ser numerados, devem ser colocados em tamanho 8 e espaçamento 1,0, separados entre si por um espaço em branco).

2) Disposição:

Formato Word (.doc);

Escrito em espaço de 1,5 cm, usando fonte Times New Roman 10, em formato A4 e as margens do texto devem ser inferior, superior, direita e esquerda de 1,5 cm;

Os recuos são feitos na régua do editor de texto (não pela tecla TAB);

Os artigos científicos devem ter mais de 5 páginas.

3) Figuras:

A utilização de imagens, tabelas e ilustrações deve seguir o bom senso e, preferencialmente, a ética e axiologia da comunidade científica que discute os temas do manuscrito. Nota: o tamanho máximo do arquivo a ser enviado é de 10 MB (10 mega).

Figuras, tabelas, quadros etc. (devem ter sua chamada no texto antes de serem inseridas. Após sua inserção, a fonte (de onde vem a figura ou tabela...) e um parágrafo de comentário para dizer o que o leitor deve observar é importante neste recurso. As figuras, tabelas e gráficos ... devem ser numerados em ordem crescente, os títulos das tabelas, figuras ou gráficos devem ser colocados na parte superior e as fontes na parte inferior.

4) Autoria:

O arquivo word enviado no momento da submissão NÃO deve conter os nomes dos autores.

Todos os autores precisam ser incluídos apenas no sistema da revista e na versão final do artigo (após análise dos revisores da revista). Os autores devem ser cadastrados apenas nos metadados e na versão final do artigo por ordem de importância e contribuição para a construção do texto. NOTA: Os autores escrevem os nomes dos autores na grafia correta e sem abreviaturas no início e no final do artigo e também no sistema da revista.

O artigo deve ter no máximo 10 autores. Para casos excepcionais, é necessária a consulta prévia à Equipe da Revista.