

**ANTONIO ARISTIDES PEREIRA GOMES FILHO**

**PARTICIPAÇÃO DO SILÍCIO NOS PROCESSOS DE ABSORÇÃO,  
TRANSLOCAÇÃO E ATENUAÇÃO DA TOXICIDADE DO ARSÊNIO EM ALFACE  
(*Lactuca sativa* L.)**

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

Orientador: Juraci Alves de Oliveira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G633p  
2022

Gomes Filho, Antonio Aristides Pereira, 1997-  
Participação do silício nos processos de absorção,  
translocação e atenuação da toxicidade do arsênio em alface (*Lactuca sativa* L.). / Antonio Aristides Pereira Gomes Filho. –  
Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (82 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Vegetal, 2022.

Referências bibliográficas: f. 71-82.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.573>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Plantas - Metabolismo. 2. Plantas - Efeito do arsênio.  
3. Arsênio - Toxicologia. 4. Stress oxidativo. 5. Antioxidantes.  
6. Silício. I. Oliveira, Juraci Alves de, 1965-. II. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa  
de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 572.42

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

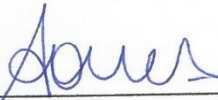
**ANTONIO ARISTIDES PEREIRA GOMES FILHO**


**PARTICIPAÇÃO DO SILÍCIO NOS PROCESSOS DE ABSORÇÃO,  
TRANSLOCAÇÃO E ATENUAÇÃO DA TOXICIDADE DO ARSÊNIO EM ALFACE  
(*Lactuca sativa* L.)**

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

APROVADA: 18 de agosto de 2022.

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
Antonio Aristides Pereira Gomes Filho  
Autor

  
\_\_\_\_\_  
Juraci Alves de Oliveira  
Orientador

*A minha avó (in memoriam), minha mãe e minhas irmãs.*

## AGRADECIMENTOS

A essa força maior que rege o Universo de forma majestosa.

A minha mãe e minhas irmãs, Stéffany Maia e Bárbara Maia.

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a Pós-graduação e ao programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, como um todo, pela ótima formação acadêmica e profissional.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Juraci Oliveira, pela ótima orientação, por ter sido sempre justo e disposto a discutir o andamento deste trabalho comigo e por todo o ensinamento repassado, não só acadêmico, mas também pessoal, se tornando uma referência para minha vida.

Ao professor Cléberon Ribeiro, pela disponibilização da infraestrutura para condução dos experimentos e ajuda em todo o resto.

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos meus amigos Daniel Coelho, Moab Andrade e Bruno Luan por esses quase dois anos de convivência e amizade na república Polígono.

Aos meus companheiros de laboratório, Fernando Brito, Daniel Coelho, Pedro Henrique e Vinícius Silva pela ajuda no trabalho, ensinamentos repassados e amizade cultivada.

Aos amigos que fiz em Viçosa, Julia Paiva, Lucas Realto, Welson Júnior, Bianca Bueno, Marlon Gomes, Thalita Rossi e Rodrigo Consentino pela amizade e momentos vividos.

Ao Toshik Silva pela ajuda na parte estatística do trabalho.

Ao professor Emílio de Castro, Camila Meireles e a Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, pela disponibilidade e ajuda nas análises anatômicas.

A todos os demais que participaram direta ou indiretamente durante a produção desse trabalho.

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

*“Se não houver frutos,  
valeu a beleza das flores;  
se não houver flores,  
valeu a sombra das folhas;  
se não houver folhas,  
valeu a intenção da semente.”*  
*(Henfil)*

## RESUMO

GOMES-FILHO, Antonio Aristides Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Participação do silício nos processos de absorção, translocação e atenuação da toxicidade do arsênio em alface (*Lactuca sativa* L.)**. Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

O arsênio (As) causa a superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) que acarreta danos em todo o metabolismo vegetal. Plantas contaminadas representam sério risco à saúde, visto que o consumo de alimentos contaminados é uma das formas de intoxicação em seres humanos. O silício é um elemento benéfico para plantas e reconhecido por aliviar o estresse abiótico, incluindo o estresse por As. Portanto, buscamos avaliar o efeito do silício, iônico e nanoparticulado, na mitigação do estresse por As em alface. Para isso, plantas de alface foram cultivadas hidronicamente por 40 dias e, após aclimação por 5 dias, foram submetidas a 50  $\mu\text{M}$  de arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) e arsenato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) e 2 mM de silício iônico (Si) e silício nanoparticulado (SiNP) durante dois períodos de exposição (24 e 72 h). Foram realizadas análises relacionadas a anatomia, fotossíntese e bioquímica dessas plantas. Os resultados mostraram que o As, tanto  $\text{As}^{\text{III}}$  quanto  $\text{As}^{\text{V}}$ , causa efeitos negativos sobre todos os parâmetros avaliados e ambas as formas de silício foram capazes de diminuir o estresse por As, por meio da diminuição da absorção e da concentração nas folhas, melhoria nos aspectos anatômicos e modulação da maquinaria antioxidante, onde se destaca uma reduzida peroxidação lipídica. Além disso, constatamos que nanopartículas de silício são tão eficientes quanto a forma iônica na diminuição do estresse por As.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Sistema antioxidante. Nanopartículas de silício.

## ABSTRACT

GOMES-FILHO, Antonio Aristides Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022. **Silicon participation in the processes of absorption, translocation and attenuation of arsenic toxicity in lettuce (*Lactuca sativa* L.).** Adviser: Juraci Alves de Oliveira.

Arsenic (As) causes the overproduction of reactive oxygen species (ROS) that damages the entire plant metabolism. Contaminated plants represent a serious health risk, since the consumption of contaminated food is one of the forms of intoxication in humans. Silicon is a beneficial element for plants and recognized for relieving abiotic stress, including As stress. Therefore, we sought to evaluate the effect of silicon, ionic and nanoparticulate, in the mitigation of stress by As in lettuce. For this, lettuce plants were grown hydroponically for 40 days and, after acclimatization for 5 days, were subjected to 50  $\mu\text{M}$  of arsenite ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) and arsenate ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) and 2 mM of ionic silicon (Si) and nanoparticulate silicon (SiNP) during two exposure periods (24 and 72 h). Analyzes related to the anatomy, photosynthesis and biochemistry of these plants were performed. The results showed that As, both  $\text{As}^{\text{III}}$  and  $\text{As}^{\text{V}}$ , causes negative effects on all parameters evaluated and both forms of silicon were able to reduce As stress, through decreased absorption and concentration in leaves, improvement in aspects anatomy and modulation of the antioxidant machinery, where a reduced lipid peroxidation stands out. Furthermore, we found that silicon nanoparticles are as efficient as the ionic form in decreasing As stress.

Keywords: Oxidative stress. Antioxidant system. Silicon nanoparticles.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Sala de crescimento de plantas com condições controladas.....  | 16 |
| <b>Figura 2.</b> Concentração de As e silício em folhas e raízes e fator de translocação em <i>Lactuca sativa</i> L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos.....   | 25 |
| <b>Figura 3.</b> Sintomatologia visual das plantas de <i>Lactuca. sativa</i> L. antes e depois da aplicação dos tratamentos.....  | 27 |
| <b>Figura 4.</b> Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de folhas e raízes de <i>Lactuca sativa</i> L. após 24 h de tratamento.....  | 29 |
| <b>Figura 5.</b> Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de folhas e raízes de <i>Lactuca sativa</i> L. após 72 h de tratamento.....  | 30 |
| <b>Figura 6.</b> Concentração de clorofila a, b e carotenoides em <i>Lactuca sativa</i> L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos.....   | 31 |
| <b>Figura 7.</b> Taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração e concentração interna de carbono ( $C_i$ ) em <i>Lactuca sativa</i> L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos.....          | 33 |
| <b>Figura 8.</b> Peroxidação lipídica em folhas e raízes de <i>Lactuca sativa</i> L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos.....   | 35 |
| <b>Figura 9.</b> Concentração de $H_2O_2$ em folhas e raízes de <i>Lactuca sativa</i> L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos.....   | 36 |
| <b>Figura 10.</b> Atividade da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e da peroxidase (POX) em folhas e raízes de <i>Lactuca sativa</i> L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos.....  | 38 |
| <b>Figura 11.</b> Concentração de ascorbato total (T-AsA), ascorbato reduzido (AsA) e ascorbato oxidado (DHA) em folhas e raízes de <i>Lactuca sativa</i> L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos.....                                 | 40 |
| <b>Figura 12.</b> Atividade da oxidase do ascorbato (AO) em folhas de <i>Lactuca sativa</i> L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos.....   | 41 |
| <b>Figura 13.</b> Atividade da peroxidase do ascorbato (APx) em folhas e raízes de <i>Lactuca sativa</i> L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos.....  | 42 |
| <b>Figura 14.</b> Atividade da redutase do monodehidroascorbato (MDHAR), redutase do dehidroascorbato (DHAR) e da redutase da glutaciona (GR) em folhas e raízes de <i>Lactuca sativa</i> L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos..... | 44 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 15.</b> Concentração de glutathione total, glutathione reduzida (GSH), glutathione oxidada (GSSG) e relação GSH/GSSG em folhas e raízes de <i>Lactuca sativa</i> L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos..... | 46 |
| <b>Figura 16.</b> Atividade da sintetase da $\gamma$ -glutamylcisteína ( $\gamma$ -GCS) em folhas de <i>Lactuca sativa</i> L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos.....   | 49 |
| <b>Figura 17.</b> Atividade da sintetase da glutathione (GS) em folhas de <i>Lactuca sativa</i> L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos.....  | 50 |
| <b>Figura 18.</b> Atividade da peroxidase da glutathione (GPx) em folhas de <i>Lactuca sativa</i> L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos.....  | 51 |
| <b>Figura 19.</b> Atividade da sulfotransferase da glutathione (GST) em folhas de <i>Lactuca sativa</i> L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos.....  | 52 |
| <b>Figura 20.</b> Matriz de correlação de Pearson em folhas e raízes de plantas de <i>Lactuca sativa</i> L.....  | 55 |

## SUMÁRIO

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 1.       | INTRODUÇÃO .....  | 12 |
| 2.       | MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 15 |
| 2.1.     | Cultivo, aclimação e aplicação dos tratamentos .....  | 15 |
| 2.2.     | Determinação da concentração de As e fator de translocação .....  | 16 |
| 2.3.     | Determinação da concentração de silício e fator de translocação .....   | 16 |
| 2.4.     | Sintomatologia visual .....   | 17 |
| 2.5.     | Alterações anatômicas .....   | 17 |
| 2.6.     | Análises fisiológicas .....   | 17 |
| 2.6.1.   | Concentração dos pigmentos cloroplastídicos .....   | 17 |
| 2.6.2.   | Determinação dos parâmetros de trocas gasosas .....   | 18 |
| 2.7.     | Análises bioquímicas .....  | 18 |
| 2.7.1.   | Análises do metabolismo oxidativo .....   | 18 |
| 2.7.1.1. | Peroxidação lipídica .....  | 18 |
| 2.7.1.2. | Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....   | 18 |
| 2.7.2.   | Análises de enzimas do sistema antioxidante .....   | 19 |
| 2.8.     | Avaliações do metabolismo ascorbato-glutationa (AsA-GSH) .....  | 19 |
| 2.8.1.   | Ascorbato total, reduzido e oxidado (T-AsA, AsA e DHA) .....  | 19 |
| 2.8.2.   | Determinação da atividade da oxidase do ascorbato (AO, EC 1.10.3.3) .....   | 20 |
| 2.8.3.   | Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APx, EC 1.11.1.11) .....  | 20 |
| 2.8.4.   | Determinação da atividade da redutase do monodehidroascorbato (MDHAR, EC 1.6.5.4), redutase do dehidroascorbato (DHAR, EC 1.8.5.1) e da redutase da glutaciona (GR, EC 1.6.4.2) ..... | 21 |
| 2.8.5.   | Glutaciona total, reduzida e oxidada (GSH e GSSG) .....   | 22 |
| 2.8.6.   | Determinação da atividade da sintetase da $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ -GCS, EC 6.3.2.2) .....   | 22 |
| 2.8.7.   | Determinação da atividade da sintetase da glutaciona (GS, EC 6.3.2.3) .....   | 23 |
| 2.8.8.   | Determinação da atividade da peroxidase da glutaciona (GPx, EC 1.11.1.9) .....  | 23 |
| 2.8.9.   | Determinação da atividade da sulfotransferase da glutaciona (GST, EC 2.5.1.18) .....  | 23 |
| 2.9.     | Determinação de proteínas .....   | 24 |
| 2.10.    | Correlação .....  | 24 |
| 2.11.    | Delineamento experimental e análise estatística .....   | 24 |
| 3.       | RESULTADOS .....  | 24 |
| 3.1.     | Concentração de As, silício e fator de translocação .....   | 24 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 3.2.     | Sintomatologia visual.....   | 27 |
| 3.3.     | Alterações anatômicas.....   | 28 |
| 3.4.     | Análises fisiológicas.....   | 31 |
| 3.4.1.   | Concentração dos pigmentos cloroplastídicos.....   | 31 |
| 3.4.2.   | Parâmetros de trocas gasosas.....  | 32 |
| 3.5.     | Análises bioquímicas.....  | 34 |
| 3.5.1.   | Metabolismo oxidativo.....   | 34 |
| 3.5.1.1. | Peroxidação lipídica.....  | 34 |
| 3.5.1.2. | Concentração de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....   | 35 |
| 3.5.2.   | Enzimas do sistema antioxidante.....   | 36 |
| 3.5.2.1. | Atividade da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX).....   | 36 |
| 3.6.     | Avaliações do metabolismo ascorbato-glutationa (AsA-GSH).....  | 39 |
| 3.6.1.   | Concentração de ascorbato total, reduzido e oxidado (T-AsA, AsA e DHA).....  | 39 |
| 3.6.2.   | Atividade da oxidase do ascorbato (AO).....  | 41 |
| 3.6.3.   | Atividade da peroxidase do ascorbato (APx).....  | 42 |
| 3.6.4.   | Atividade da redutase do monodehidroascorbato (MDHAR), redutase do dehidroascorbato (DHAR) e da redutase da glutaciona (GR)..... | 43 |
| 3.6.5.   | Concentração de glutaciona total, reduzida e oxidada (GSH e GSSG).....   | 45 |
| 3.6.6.   | Atividade da sintetase da $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ -GCS).....   | 48 |
| 3.6.7.   | Atividade da sintetase da glutaciona (GS).....   | 49 |
| 3.6.8.   | Atividade da peroxidase da glutaciona (GPx).....   | 50 |
| 3.6.9.   | Atividade da sulfotransferase da glutaciona (GST).....   | 51 |
| 3.7.     | Análise de correlação.....   | 52 |
| 4.       | DISCUSSÃO.....   | 57 |
| 5.       | CONCLUSÃO.....   | 70 |
|          | REFERÊNCIAS.....   | 71 |

## 1. INTRODUÇÃO

O arsênio (As) é um metaloide com toxicidade reconhecida, tanto em plantas como em animais, incluindo seres humanos, sendo considerado sério problema ambiental e de saúde pública em vários países (Herath et al., 2016; Bali e Sidhu, 2021). A contaminação ocorre, principalmente, através da ingestão de água e/ou alimentos contaminados (Mawia et al., 2021). 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). Ressalta-se que, nesse caso, o aporte desse contaminante se dá como um subproduto da exploração dos minérios em rochas de arsenopirita que, devido ao processo de lixiviação ácida, libera As para o meio (Teixeira et al., 2020). 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 cânceres (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  $20 \text{mg kg}^{-1}$  no solo (Rosas-Castor et al., 2014; Mondal et al., 2021).

Apesar de poder ser encontrado em formas orgânicas, como ácido monometilarsônico, ácido dimetilarsínico, arsenobetaina e arsenoaçúcares, as formas inorgânicas, como arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) e o arsenato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ), 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  $\text{As}^{\text{V}}$  é predominante e, por ser análogo ao fosfato, ambos competem pelas mesmas proteínas transportadoras (PHTs) para entrada na célula vegetal (Khan et al., 2021). A forma química  $\text{As}^{\text{III}}$  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 silício, o  $\text{As}^{\text{III}}$  também é absorvido pelo seu transportador NIP de influxo, denominado Lsi1, e que Lsi2, um transportador de efluxo de silício, é capaz de transportar  $\text{As}^{\text{III}}$  em direção ao xilema (Ma et al., 2006; Yamaji et al., 2008; Panda et al., 2010; Abbas et al., 2018). Além disso, enquanto os transportadores PHTs são unidirecionais, os transportadores NIPs 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 prejudiciais na bioquímica, fotossíntese, morfologia e no crescimento e desenvolvimento de plantas (Bali e

Sidhu, 2021). Além dos danos oxidativos nas membranas, proteínas e DNA (Finnegan e Chen, 2012), o  $\text{As}^{\text{V}}$ , ao substituir o fosfato no ATP, resulta na formação de ADP-As instável, deixando a célula desprovida de energia. Arsenito, por sua vez, reage com grupos sulfidríla (-SH) de diferentes proteínas, levando à restrição de muitas funções celulares, o que pode ocasionar danos irreversíveis no metabolismo vegetal (Abercrombie et al., 2008; Armendariz et al., 2016; Finnegan e Chen, 2012).

O principal mecanismo de desintoxicação celular do As consiste em reduzir  $\text{As}^{\text{V}}$  a  $\text{As}^{\text{III}}$ , reação catalisada pela enzima arsenato redutase, sendo o  $\text{As}^{\text{III}}$ , proveniente dessa redução ou da absorção direta, é complexado com glutathione e/ou fitoquelatinas e posteriormente transportado para o vacúolo (Li et al., 2016). Porém, esse mecanismo não consegue desintoxicar todo o As, especialmente em altas concentrações. Dessa forma, meios que possibilitem a ativação de mecanismos de defesa ou que possam reduzir a absorção, constituem formas de minimizar os efeitos tóxicos desse poluente, conforme pesquisas recentes que tem utilizado silício como agente mitigador desse estresse (Fleck et al., 2013; Tripathi et al., 2013; Sanglard et al., 2014).

O silício é um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre e reconhecidamente capaz de trazer benefícios às plantas, especialmente em condições de estresses bióticos e abióticos, como aqueles ocasionados por metais pesados (Sahebi et al., 2015; Zargar et al., 2019). As plantas absorvem o silício na forma de ácido monossilícico ( $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ), cuja concentração, na solução do solo, encontra-se entre 0,1 e 0,6 mM (Epstein, 1994; Hodson et al., 2005), alcançando valores nas plantas entre 0,1 e 10% do peso seco (Epstein, 1999; Ma e Takahashi, 2002).

Vários mecanismos envolvidos na participação do silício como agente de atenuação de danos celulares causados por metais pesados e As tem sido estudados. Estes envolvem a coprecipitação, 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, além de alterações nas estruturas vegetais e moleculares (Emamverdian et al., 2018; Bhat et al., 2019; Vaculík et al., 2020).

A forma usual de fornecimento de silício às plantas é como ácido monossilícico e, mais recentemente, como nanopartículas. Nanopartículas (NPs) são partículas com até 100 nm, as quais tem sido utilizadas em diversas áreas, inclusive na agricultura (Baker et al., 2017; Asgari et al., 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 possam ser inibidos ou

potencializados, dependendo se o silício é fornecido na sua forma iônica (Si) ou como nanopartículas (SiNPs).

Plantas contaminadas com As constituem importante via de acesso do poluente aos demais níveis da cadeia trófica, especialmente as espécies com alto consumo pela população, como é o caso das hortaliças folhosas, cujo consumo é, preferencialmente, *in natura*. Neste caso, essas plantas representam sérios riscos à saúde pública. A alface (*Lactuca sativa* L.) é, atualmente, uma das hortaliças mais consumida e produzida mundialmente (Andrade, 2019) e, no Brasil, o tipo crespa é a mais consumida (mais de 50%), principalmente por ser de grande porte, fácil manuseio e acondicionamento (Silva, 2017). Apesar disso, não se tem muitos estudos sobre se e como o silício mitiga o estresse por As nessas plantas, especialmente do ponto de vista fisiológico e bioquímico, e se o silício diminui a translocação do As para a parte aérea, diminuindo os riscos do consumo dessa hortaliça, o que constitui a hipótese para o trabalho. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar a toxicidade do As em alface, avaliando-se as alterações bioquímicas, estruturais e fisiológicas, e o papel do silício, na forma iônica e de nanopartículas, na atenuação desses danos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. *Cultivo, aclimação e aplicação dos tratamentos*

Sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), cultivar Elba, foram germinadas em espuma à base de resina fenólica, estéril e inerte, com 2x2 cm por bloco, e mantidas em bandejas de polietileno, sendo umedecidas com solução nutritiva de Clark (1975), com  $\frac{1}{2}$  de força iônica, sob aeração, durante 40 dias. Após seleção quanto ao tamanho e uniformidade de parte aérea e raiz (plantas com pelo menos 4 folhas completamente expandidas e raízes com comprimento de pelo menos 10 cm de comprimento), estas foram transferidas para vasos de polietileno (1 planta/vaso), contendo 275 mL de solução nutritiva de Clark (1975), com pH 6,5 (ajustado diariamente com KOH ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluídos), aeradas e mantidas em sala de crescimento de plantas com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, irradiância de  $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo luminoso de 16 horas, pelo período de 5 dias para aclimação (Figura 1).

Após o período de aclimação, as plantas foram submetidas a doses de 50  $\mu\text{M}$  de arsênio (As) (arsenato (As<sup>V</sup>) e arsenito (As<sup>III</sup>) e 2 mM de silício (Si iônico (Si) e Si nanoparticulado (SiNP)) dispostas nos seguintes tratamentos: (a) somente solução nutritiva (como controle); (b) arsenito (As<sup>III</sup>) (na forma de NaAsO<sub>2</sub>); (c) arsenato (As<sup>V</sup>) (na forma de Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O); (d) Si (na forma de K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>); (e) Si + As<sup>III</sup>; (f) Si + As<sup>V</sup>; (g) nanopartículas de silício (SiNP); (h) SiNP + As<sup>III</sup> e (i) SiNP + As<sup>V</sup>. Os tratamentos com a utilização de Si ou SiNPs tiveram a aplicação do silício iniciadas 24 h antes da aplicação do As. Os tratamentos tiveram duração de 24 e 72 h, nas mesmas condições laboratoriais anteriormente descritas, após os quais foram feitas as análises fisiológicas *in situ* e coleta de material (folhas e raízes) para as análises anatômicas e bioquímicas. Para as análises anatômicas o material foi imediatamente fixado em FAA<sub>50</sub> (formaldeído 37%: ácido acético glacial: álcool etílico 50%, 1:1:18, v/v) (Johansen, 1940) e, para as análises bioquímicas, foram armazenadas a -80 °C.

O K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> foi obtido através do produto Fertilício da empresa Plant Defender, e o potássio adicional introduzido por este nos tratamentos com silício foi subtraído do KCl e do KNO<sub>3</sub> e a perda de nitrato resultante foi suplementada com ácido nítrico diluído e a mesma concentração de K adicional nesses tratamentos foi adicionada aos tratamentos sem silício utilizando-se KCl. Já as SiNPs foram obtidas pela 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 ultrasonicação por 30 minutos 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  $25 \pm 2$  °C, irradiância de  $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo luminoso de 16 horas).

### **2.2. Determinação da concentração de As e fator de translocação**

Amostras de 0,1 g de material seco triturado de folhas e raízes foram homogêneas e mineralizadas em bloco de aquecimento, com temperatura controlada ( $100 - 120$  °C), utilizando a mistura nitro-perclórica, na proporção de 2:1, até todo o material vegetal ser oxidado (Marin et al., 1993). O extrato mineral foi diluído para 25 mL com água desionizada e a concentração de As determinada por meio de espectrofotometria de absorção atômica (Modelo AA-6701F, Shimadzu Corporation) com gerador de hidreto, e os resultados expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  massa seca (MS).

O fator de translocação (FT) foi calculado por meio da equação:  $\text{FT} = C_{\text{PA}}/C_{\text{R}}$ , em que:  $C_{\text{PA}}$  e  $C_{\text{R}}$  = concentração de As na parte aérea e raiz ( $\mu\text{g g}^{-1}$  MS), respectivamente.

### **2.3. Determinação da concentração de silício e fator de translocação**

A concentração de silício foi determinada segundo o método de Wei-min et al. (2005). Para isso, 0,1 g de material seco e triturado de folhas e raízes foram postos em tubos de polietileno de 50 mL, seguido de adição de 3 mL de NaOH (50%). Os tubos foram vedados, agitados em vórtex e autoclavados a  $120$  °C, por 20 minutos. Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  dessa solução foram adicionados a tubos de polietileno e em seguida adicionados 3 mL de ácido acético (20%) e 1 mL de molibdato de amônio ( $54 \text{ g L}^{-1}$ , pH 7,0) e agitados em vórtex. Após 5 min, foram adicionados a mistura 500  $\mu\text{L}$  de ácido tartárico (20%) e 100  $\mu\text{L}$  de solução redutora (mistura de solução A, composta por 2 g de sulfito de sódio e 0,4 g de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico

em 25 mL de água desionizada e solução B, composta de 25 g de bissulfito de sódio em em 200 mL água desionizada, sendo a mistura das soluções completada para 250 mL com água desionizada). A mistura foi completada para 5 mL com ácido acético. Após 30 min, a absorbância foi lida a 650 nm e os resultados expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  MS, com base numa curva-padrão de Si previamente estabelecida. O FT foi calculado utilizando a mesma fórmula utilizada para o FT de As.

#### 2.4. *Sintomatologia visual*

O registro fotográfico da sintomatologia visual foi realizado ao final do período de exposição aos tratamentos (24 e 72 h), utilizando-se câmera digital.

#### 2.5. *Alterações anatômicas*

As alterações anatômicas foram observadas e documentadas em fragmentos de folhas completamente expandidas (retiradas da porção média esquerda) e do ápice das raízes (aproximadamente 1 cm), por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras fixadas em FAA foram colocadas em um dessecador e submetidas a vácuo por 48 horas, seguido de desidratação em série etanólica (álcool etílico 60% e 70%, por 2 horas em cada série, e armazenadas em álcool etílico 70%). A análise foi precedida de desidratação adicional, com 1 hora em álcool etílico 90% e três séries, de 1 hora cada, em álcool 100%, seguido de secagem em ponto crítico (K850 Critical Point Dryer) e fixadas em *stubs* pulverizados com prata 20 nm utilizando o aparelho Quorum Q150T ES. A observação e documentação foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (Quanta FEG 450 FEI).

#### 2.6. *Análises fisiológicas*

##### 2.6.1. *Concentração dos pigmentos cloroplastídicos*

Amostras de 0,1 g de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e, em seguida, homogeneizadas com 2 mL de acetona 80% (v/v) e 10 mg de carbonato de cálcio. A mistura foi agitada no vórtex por 30 segundos e centrifugadas a 3000 xg, durante 15 min, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e as absorbâncias mensuradas a 663, 646 e 470 nm (Lichtenthaler e Wellburn, 1983) em leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific). Os teores dos pigmentos foram calculados segundo as fórmulas: clorofila a ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) =  $(12,21 \times (\text{Abs}_{663})) - (2,81 \times (\text{Abs}_{646}))$ ; clorofila b ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) =  $(20,13 \times (\text{Abs}_{646})) - (5,03 \times (\text{Abs}_{663}))$  e carotenoides totais ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) =  $(1000 \times [\text{Abs}_{470}]) - (3,27 \times [\text{Clorofila a}]) - (104 \times [\text{Clorofila b}])/229$ . Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa fresca (MF).

### 2.6.2. *Determinação dos parâmetros de trocas gasosas*

Os parâmetros de trocas gasosas (taxa de assimilação líquida de carbono (A) ( $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) ( $\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiração (E) ( $\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e a concentração interna de carbono ( $C_i$ ) ( $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  de ar)) foram determinados em folhas completamente expandidas, no final do período de exposição aos tratamentos (24 e 72 h), utilizando-se um analisador de gases no infravermelho (LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, EUA), sob irradiância saturante de  $800 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$   $400 \mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  de ar, entre 08 e 11 h, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 2.7. *Análises bioquímicas*

### 2.7.1. *Análises do metabolismo oxidativo*

#### 2.7.1.1. *Peroxidação lipídica*

A avaliação da peroxidação lipídica foi feita por meio da concentração de malondialdeído (MDA), uma espécie reativa do ácido tiobarbitúrico (TBARS), em 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  $10.000 \text{ xg}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 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  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 30 min, seguido de imersão em banho de gelo, por 10 min, e posterior centrifugação a  $3.000 \text{ xg}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 10 min. O sobrenadante foi utilizado para mensuração da absorbância a 440, 532 nm e 600 nm, em espectrofotômetro UV/visível Hitachi, modelo U-5100. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se a seguinte equação: 1)  $[(\text{Abs } 532_{+\text{TBA}} - \text{Abs } 600_{+\text{TBA}}) - (\text{Abs } 532_{-\text{TBA}} - \text{Abs } 600_{-\text{TBA}})] = A$ ; 2)  $[(\text{Abs } 440_{+\text{TBA}} - \text{Abs } 600_{+\text{TBA}}) 0,0571] = B$ ; 3)  $\text{MDA (nmol mL}^{-1}) = ((A-B)/157000) 10^6$  (Hodges et al., 1999). Os resultados foram expressos em  $\text{nmol de MDA g}^{-1} \text{ MF}$ .

#### 2.7.1.2. *Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*

Amostras de 0,3 g de folhas e de raízes foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM, e centrifugadas a  $10.000 \text{ xg}$ , por 15 min, a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (Kuo e Kao, 2003).

Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  de sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 80  $\mu\text{L}$  de sulfato ferroso amoniacal 250  $\mu\text{M}$  em ácido sulfúrico 25 mM, 50  $\mu\text{L}$  de laranja de xilenol 250  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{L}$  de sorbitol 100 mM (Gay e 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram estimadas com base em curva de calibração, previamente preparada com padrões de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo os resultados expressos em nmol g<sup>-1</sup> de MF.

### **2.7.2. Análises de enzimas do sistema antioxidante**

Para determinação da atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) amostras de 0,3 g de folhas e de raízes foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de um meio de extração constituído de tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 xg por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático sendo atividades determinadas pela adição deste aos seguintes meios de reação:

- 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, para SOD (Giannopolitis e Ries, 1977);
- Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM, para CAT (Havir e Mchale, 1987);
- Tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM e pirogalol 20 mM para POX (Kar e Mishra, 1976).

A atividade da SOD foi conduzida a 25 °C, em câmara de reação sob iluminação durante por 5 min e medida a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT e os resultados foram expressos em U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína (Beauchamp e Fridovich, 1971). Para CAT a atividade foi determinada medindo-se o decréscimo na absorbância, no primeiro minuto de reação, a 240 nm, a 30 °C e esta foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Anderson et al., 1995) e os resultados expressos em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína. Para a atividade da POX foi medido o incremento da absorbância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25 °C, sendo a atividade calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Chance e Maehley, 1955) e os resultados expressos em µmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

## **2.8. Avaliações do metabolismo ascorbato-glutationa (AsA-GSH)**

### **2.8.1. Ascorbato total, reduzido e oxidado (T-AsA, AsA e DHA)**

A determinação da concentração de ascorbato total (T-AsA) e reduzido (AsA) foi realizada em amostras de 0,3 g de folhas e de raízes, maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de TCA 5% (p/v), seguido de centrifugação a 12.000 xg, 15 min, a 4°C (Kampfenkel et al., 1995).

Para determinação da concentração de T-AsA, uma alíquota de 10 µL do sobrenadante foi adicionada a 10 µL de ditioneitol (DTT) 10 mM e 20 µL de tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 7,4, e incubado a 42 °C, por 15 min, seguido da adição de 10 µL de N-etilmaleimida (NEM) 0,5% e mantido sob agitação por 1 min, em temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados 150 µL de uma mistura contendo 50 µL de TCA 10%, 40 µL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 42%, 40 µL de 2,2'-bipiridil 4% e 20 µL de cloreto de ferro (FeCl<sub>3</sub>) 3%, mantido sob agitação por 1 min e incubada, por 40 min, a 42 °C. Após isso, a absorvância foi determinada em 525 nm (Kampfenkel et al., 1995).

Para a determinação da concentração de AsA, uma alíquota de 10 µL do sobrenadante foi adicionada a 30 µL de tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 7,4, e 160 µL de uma mistura contendo: 10 µL de água desionizada, 50 µL de TCA 10%, 40 µL de (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 42%, 40 µL de 2,2'-bipiridil 4%, 20 µL de FeCl<sub>3</sub> 3%, mantida sob agitação por 1 min e incubação, a 42 °C, por 40 minutos. A absorvância do extrato foi determinada em 525 nm. As concentrações de T-AsA e AsA foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões autênticos de ácido ascórbico.

A concentração de dehidroascorbato (DHA) foi quantificada a partir da diferença entre a concentração de T-AsA e de AsA. Os resultados foram expressos em mg 100g<sup>-1</sup> de MF.

### **2.8.2. Determinação da atividade da oxidase do ascorbato (AO, EC 1.10.3.3)**

Amostras de 0,3 g de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e, em seguida, homogeneizadas em 1,2 mL de meio de extração constituído de acetato de sódio 20 mM, pH 5,5, contendo cloreto de sódio 150 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 xg por 20 min, a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático (Cardello e Cardello, 1998).

A atividade da enzima foi determinada pela adição de 5 µL do extrato enzimático a 200 µL do meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 5,5, contendo ácido ascórbico 0,5 mM, e incubado por 5 min, a 30 °C. Seguiu-se a adição de 65 µL de ácido clorídrico (HCl) 0,2 N e a leitura da absorvância a 245 nm. Um branco para cada amostra foi realizado da mesma maneira, sendo o HCl adicionado antes da amostra para determinar a degradação não específica do ascorbato (Bergmeyer et al., 1983). A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 10 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e os resultados expressos em nmol de AsA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

### **2.8.3. Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APx, EC 1.11.1.11)**

Amostras de 0,3 g de folhas e de raízes foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM e ácido ascórbico 1 mM. O homogeneizado foi

centrifugado a 15.000 xg, por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático (Nakano e Asada, 1981).

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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM. O decréscimo na absorvância, 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 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Nakano e Asada, 1981; Murshed et al., 2008) e os resultados expressos em µmol de AsA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

**2.8.4. Determinação da atividade da redutase do monodehidroascorbato (MDHAR, EC 1.6.5.4), redutase do dehidroascorbato (DHAR, EC 1.8.5.1) e da redutase da glutathiona (GR, EC 1.6.4.2)**

Amostras de 0,3 g de folhas e de raízes foram maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizadas em 2 mL do meio de extração constituído de tampão MES/KOH 50 mM, pH 6,0, contendo cloreto de potássio (KCl) 40 mM, cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 2 mM e ácido ascórbico 1 mM, seguido de centrifugação a 14.000 xg, por 10 min, a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático (Murshed et al., 2008), sendo as atividades determinadas a 25 °C adicionando-se de 10 µL do extrato enzimático a 185 µL dos seguintes meios de reação a:

- Tampão HEPES 50 mM, pH 7,6, contendo ácido ascórbico 2,5 mM e 0,25 mM de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) para MDHAR;
- Tampão HEPES 50 mM, pH 7,0, contendo EDTA 0,1 mM e 2,5 mM de glutathiona reduzida (GSH) para DHAR;
- Tampão HEPES 50 mM, pH 8,0, contendo EDTA 0,5 mM e 25 mM de fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) para GR.

Após 3 minutos de incubação foi adicionado 5 µL da enzima oxidase do ascorbato, 80 U mL<sup>-1</sup> (0,4 U no poço), na mistura da MDHAR e decréscimo na absorvância foi monitorado durante 5 min a 340 nm sendo a atividade calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, sendo os resultados expressos em nmol de NADH min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína. 5 µL de DHA 0,2 mM foi adicionado a mistura da DHAR e o o incremento da absorvância, durante 5 min, foi medido a 265 nm sendo atividade da enzima foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 14 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e os resultados expressos em nmol de AsA min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína. E, por fim, na mistura da GR foi adicionado 5 µL de glutathiona oxidada (GSSG) 0,5 mM e a leitura da absorvância, durante 5 min, foi feita a 340

nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e os resultados expressos em  $\text{nmol de NADPH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína (Murshed et al., 2008).

#### **2.8.5. *Glutaciona total, reduzida e oxidada (GSH e GSSG)***

Amostras de 0,3 g de folhas e de raízes foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL do meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, contendo EDTA 5 mM (KPE), triton X-100 0,1% e ácido sulfossalicílico 0,6%. Seguiu-se a centrifugação a  $12.000 \text{ xg}$ , por 15 minutos, a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , e o sobrenadante utilizado nas análises quantitativas (Rahman et al., 2007).

Para determinação da concentração de glutaciona total 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionados a 120  $\mu\text{L}$  de uma mistura, na proporção 1:1 de 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,5 mM e GR 1  $\text{U mL}^{-1}$  e mantido em incubação a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 2 min. Em seguida foram adicionados 60  $\mu\text{L}$  de NADPH 0,24 mM e determinada a absorbância a 412 nm, durante 2 min, com leituras a cada 30 seg. A concentração de GSSG foi determinada numa alíquota de 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, obtido imediatamente após a etapa de centrifugação, com a adição de 4  $\mu\text{L}$  de 2-vinilpiridina diluído (1:10 em KPE). A mistura foi agitada fortemente e mantida à temperatura ambiente por 60 min, seguida da adição de 12  $\mu\text{L}$  de trietanolamina diluída (1:6 em KPE). Após 10 min, a concentração de GSSG foi determinada seguindo o mesmo procedimento descrito para quantificação da glutaciona total.

As concentrações de glutaciona total e GSSG foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões autênticos. A concentração de GSH foi estimada pela diferença entre glutaciona total e GSSG (Rahman et al., 2007). Os resultados expressos em  $\text{nmol g}^{-1} \text{ MF}$  e a relação GSH/GSSG também foi realizada.

#### **2.8.6. *Determinação da atividade da sintetase da $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ -GCS, EC 6.3.2.2)***

Amostras de 0,3 g de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de um meio de extração constituído de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo EDTA 5 mM. O homogeneizado foi centrifugado a  $20.000 \text{ xg}$ , por 20 minutos, a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  desse extrato foi adicionado a 900  $\mu\text{L}$  do meio de reação constituído de tampão Tris-HCl 100  $\mu\text{M}$ , pH 8,2, contendo glutamato de sódio 10  $\mu\text{M}$ , L-aminobutirato 10  $\mu\text{M}$ , EDTA 2  $\mu\text{M}$ , 0,2 mg de albumina sérica bovina (BSA),  $\text{MgCl}_2$  20  $\mu\text{M}$  e trifosfato de adenosina (ATP) 5  $\mu\text{M}$ . A mistura foi incubada em banho-maria, a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 30 min e, então, a reação foi paralisada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de TCA 50 % (p/v) (Rüegsegger e Brunold, 1992). A mistura foi centrifugada a  $10.000 \text{ xg}$ , 10 min, em temperatura ambiente, e a concentração de fosfato inorgânico no sobrenadante

foi determinado pelo método do fosfato-molibdato, com leitura de absorbância a 720 nm (Lindeman, 1958), sendo os resultados expressos  $\mu\text{g g}^{-1} \text{Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína.

#### **2.8.7. Determinação da atividade da sintetase da glutatona (GS, EC 6.3.2.3)**

Amostras de 0,3 g de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas 2 mL do meio de extração constituído de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo EDTA 5 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 xg, por 20 min, a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático. A atividade da enzima foi determinada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático a 900  $\mu\text{L}$  do meio de reação constituído de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,4, contendo KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  20 mM,  $\gamma$ -glutamato-cisteína 0,5 mM, glicina 1 mM, ATP 5 mM, fosfoenol piruvato 5 mM, DTT 5 mM e piruvato quinase 10 U/mL. A mistura foi incubada em banho-maria, a 37 °C, durante 45 min e, então, a reação foi paralisada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de TCA 50 % (p/v) (Cobbett et al., 1998). A mistura foi centrifugada a 10.000 xg, por 10 min, em temperatura ambiente, e o teor de fosfato inorgânico no sobrenadante foi determinado pelo método do fosfo-molibdato, por meio de leitura da absorbância a 720 nm (Lindeman, 1958), sendo os resultados expressos em  $\mu\text{g g}^{-1} \text{Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína.

#### **2.8.8. Determinação da atividade da peroxidase da glutatona (GPx, EC 1.11.1.9)**

Amostras de 0,3 g de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL do meio de extração constituído de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, contendo EDTA 1 mM e cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ) 10 mM (Nagalakshmi e Prasad, 2001). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 xg, por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático. Uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  desse extrato foi adicionada a 180  $\mu\text{L}$  do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, cloreto de sódio (NaCl) 0,114 M, GSH 1 mM, NADPH 0,2 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,25 mM e 1 unidade de GR (Nagalakshmi e Prasad, 2001). O decréscimo na absorbância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 340 nm, a 30 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Anderson e Davis, 2004) e os resultados expressos em  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína.

#### **2.8.9. Determinação da atividade da sulfotransferase da glutatona (GST, EC 2.5.1.18)**

Amostras de 0,3 g de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL do meio de extração constituído de tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,8, contendo EDTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM e PVPP 2 % (p/v) (Habig et al., 1974). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 xg, por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático. A atividade da enzima foi determinada pela adição de 20  $\mu\text{L}$  desse extrato a 180  $\mu\text{L}$  do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5, contendo GSH

20 mM e 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 0,1 M (Nagalakshmi e Prasad, 2001). O incremento na absorvância, no primeiro min de reação, foi medido a 340 nm, a 30 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e os resultados expressos em  $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína.

### **2.9. Determinação de proteínas**

A determinação de proteínas nos extratos enzimáticos foi realizada pelo método de Bradford (Bradford et al., 1976), utilizando 20  $\mu\text{L}$  de cada extrato enzimático e 200  $\mu\text{L}$  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).

### **2.10. Correlação**

Uma matriz de correlação de Pearson foi realizada para quantificar a relação entre os parâmetros fisiológicos e bioquímicos com absorção de As e silício nas diferentes partes da planta e nos diferentes períodos de exposição. A escala de valores no coeficiente de correlação varia entre +1 (indica uma relação positiva próxima) e -1 (indica uma relação negativa próxima). A relação entre duas variáveis se torna mais fraca quando o valor do coeficiente se aproxima de 0.

### **2.11. Delineamento experimental e análise estatística**

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (3x3) (fontes de arsênio x fontes de silício), com 5 repetições em cada tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativos ( $p \leq 0,05$ ), foi realizada comparação de médias (teste de Tukey) por meio do pacote estatístico ExpDes (Ferreira et al., 2018). Foi realizado, também, um teste F para comparar a variância quanto ao tempo de exposição aos tratamentos (24 e 72 h). A análise de correlação de Pearson foi realizada pelo pacote estatístico pacote corrplot (Wei et al., 2017). O programa estatístico R (R Core Team, 2021) foi usado para realizar as análises estatísticas.

## **3. RESULTADOS**

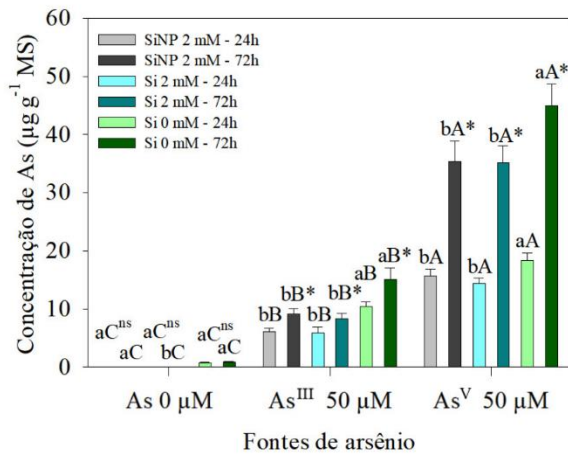
### **3.1. Concentração de As, silício e fator de translocação**

A concentração de As foi maior nos tratamentos com  $\text{As}^{\text{V}}$  do que com  $\text{As}^{\text{III}}$ , tanto nas raízes quanto nas folhas, mas a concentração de ambas as fontes aumentou com o período de exposição. Quando aplicado com Si, a concentração de As, no tratamento com  $\text{As}^{\text{III}}$ , foi diminuída em comparação ao tratamento com  $\text{As}^{\text{V}}$  nos dois períodos de exposição, tanto em folhas quanto nas raízes, enquanto que com SiNP isso se repete nas folhas, mas nas raízes só

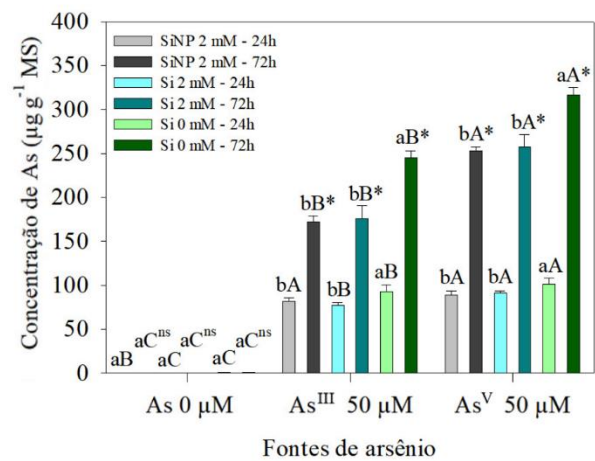
ocorre após 72h de exposição. Além disso, mesmo com a presença de Si ou SiNP, o tempo de exposição teve um efeito acumulativo nas concentrações de As (Figura 2A e B).

Entre as fontes de silício, tanto SiNP quanto Si causaram reduções significativas na concentração de As<sup>III</sup> e As<sup>V</sup> independente da parte da planta avaliada e do período de exposição, quando comparadas aos tratamentos sem silício. Além disso, não houve diferença entre Si e SiNP quanto a qual dessas fontes causou maiores reduções na concentração de As nem em folhas nem em raízes. Concentrações ínfimas foram observadas no controle, provavelmente, devido a alguma contaminação durante o experimento e/ou realização das análises (Figura 2A e B).

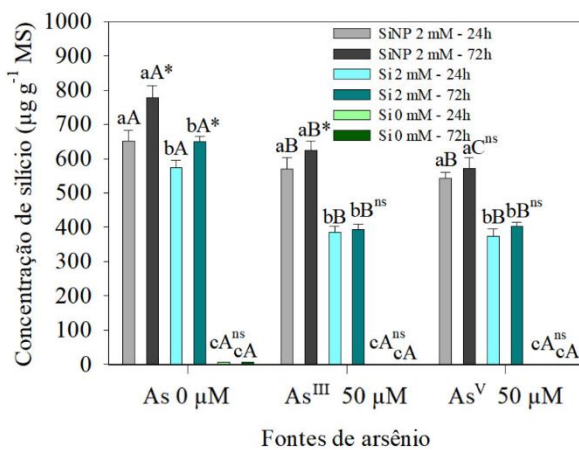
A



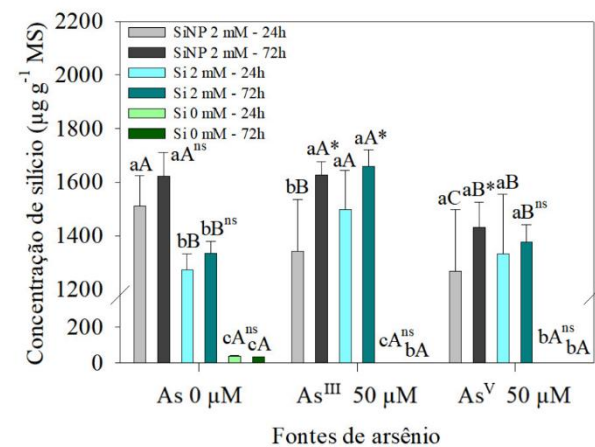
B

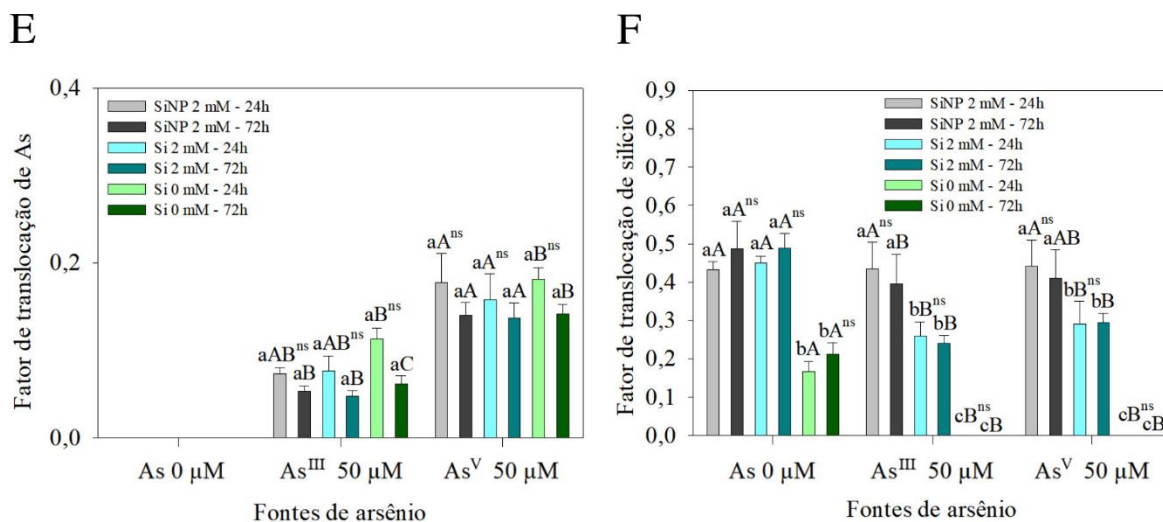


C



D





**Figura 2.** Concentração de As e silício em folhas (A) e (C) e raízes (B) e (D), respectivamente e fator de translocação de As (E) e de silício (F) em *Lactuca sativa* L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos: controle, As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, Si, Si + As<sup>III</sup>, Si + As<sup>V</sup>, SiNP, SiNP + As<sup>III</sup> e SiNP + As<sup>V</sup>. 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 a variância entre os períodos de exposição aos tratamentos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

A concentração de silício aumentou no tratamento Si + As<sup>III</sup>, nas raízes, nos dois períodos de exposição em comparação a concentração de Si + As<sup>V</sup> e Si sozinho, que não diferiram entre si. Nos tratamentos com SiNP, a presença de As reduziu o acúmulo de silício após 24 h de exposição, mas após 72 h isso ocorreu apenas para SiNP + As<sup>V</sup>. Entre as fontes de silício, na ausência de As, maiores concentrações de silício foram observadas para SiNP do que para Si, nos dois períodos de exposição, sem diferença significativa entre os períodos. Já nos tratamentos com As, não houve muitas diferenças significativas quanto as fontes de silício, porém quanto ao período de exposição somente Si + As<sup>V</sup> não diferiu, tendo os demais tratamentos apresentado maiores concentrações de silício após 72 h de exposição (Figura 2D).

Nas folhas, independente de a fonte ser Si ou SiNP, maiores concentrações de silício foram observadas na ausência de As, nos dois períodos de exposição. Além disso, maiores concentrações de silício foram observadas para SiNP, quando comparadas as fontes de silício, nos dois períodos de exposição, não só nos tratamentos sem As, como o que ocorreu nas raízes, mas também nos tratamentos com As<sup>III</sup> e As<sup>V</sup>. As maiores concentrações de silício ocorreram em 72 h, quando houve diferença quanto ao período de exposição (Figura 2C).

O FT de As foi baixo, sendo que As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup> diferiram apenas em 72 h de tratamento, com menor FT para o As<sup>III</sup> sem a presença de silício, mas sendo esse perfil de distribuição

mantido nos tratamentos com silício. A presença de silício, seja nanoparticulado ou iônico, não alterou a translocação. Além disso não houve diferença entre o período de exposição em nenhum dos tratamentos (Figura 2E).

O FT de silício, nos tratamentos sem As, não diferiu para Si e SiNP, quando comparados entre fontes de silício. Na presença de  $As^{III}$ , no entanto, esse FT foi reduzido em 72 h de exposição com SiNP, em comparação a SiNP sozinho, o que não foi observado no tratamento contendo  $As^V$  em nenhum dos períodos de exposição. Com Si, em presença tanto de  $As^{III}$  quanto de  $As^V$ , houve redução do FT nos dois períodos de exposição, em comparação a Si sozinho, sem diferença entre  $As^{III}$  e  $As^V$ . Ademais, entre as fontes de silício, o FT foi menor para Si do que para SiNP quando aplicados com  $As^{III}$  e  $As^V$  e, assim como o FT de As, não houve diferença entre o período de exposição em nenhum dos tratamentos (Figura 2F).

### 3.2. *Sintomatologia visual*

Sintomas visíveis de toxidez de As foram observados a partir de 24 h de exposição, evidenciados pelo menor volume e escurecimento das raízes que aumentaram com o prolongamento da exposição. A aplicação de Si ou SiNP revelou-se benéfica para as plantas reduzindo a toxicidade do As e aumentando o volume radicular e o crescimento da parte aérea na ausência deste (Figura 3A e B).

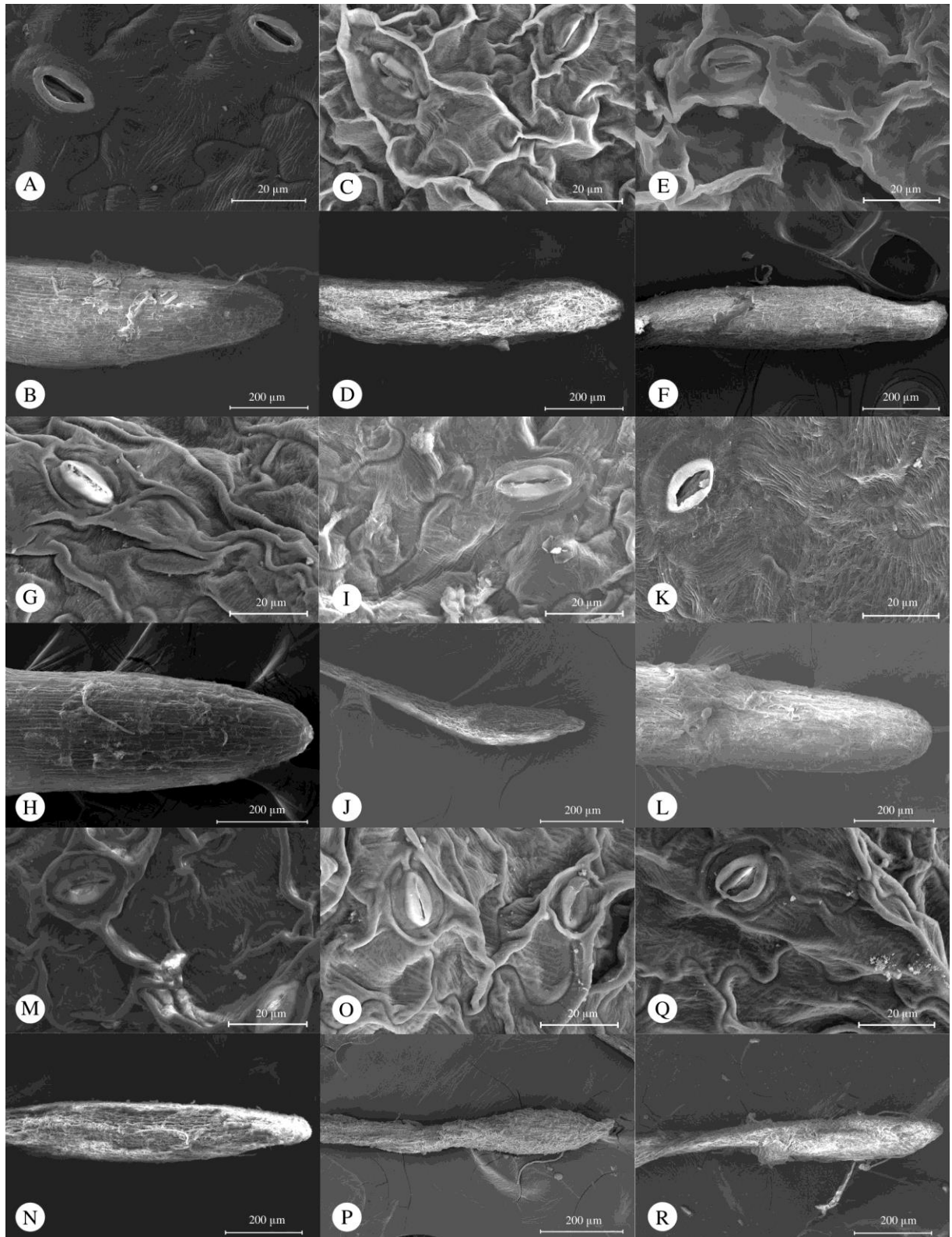




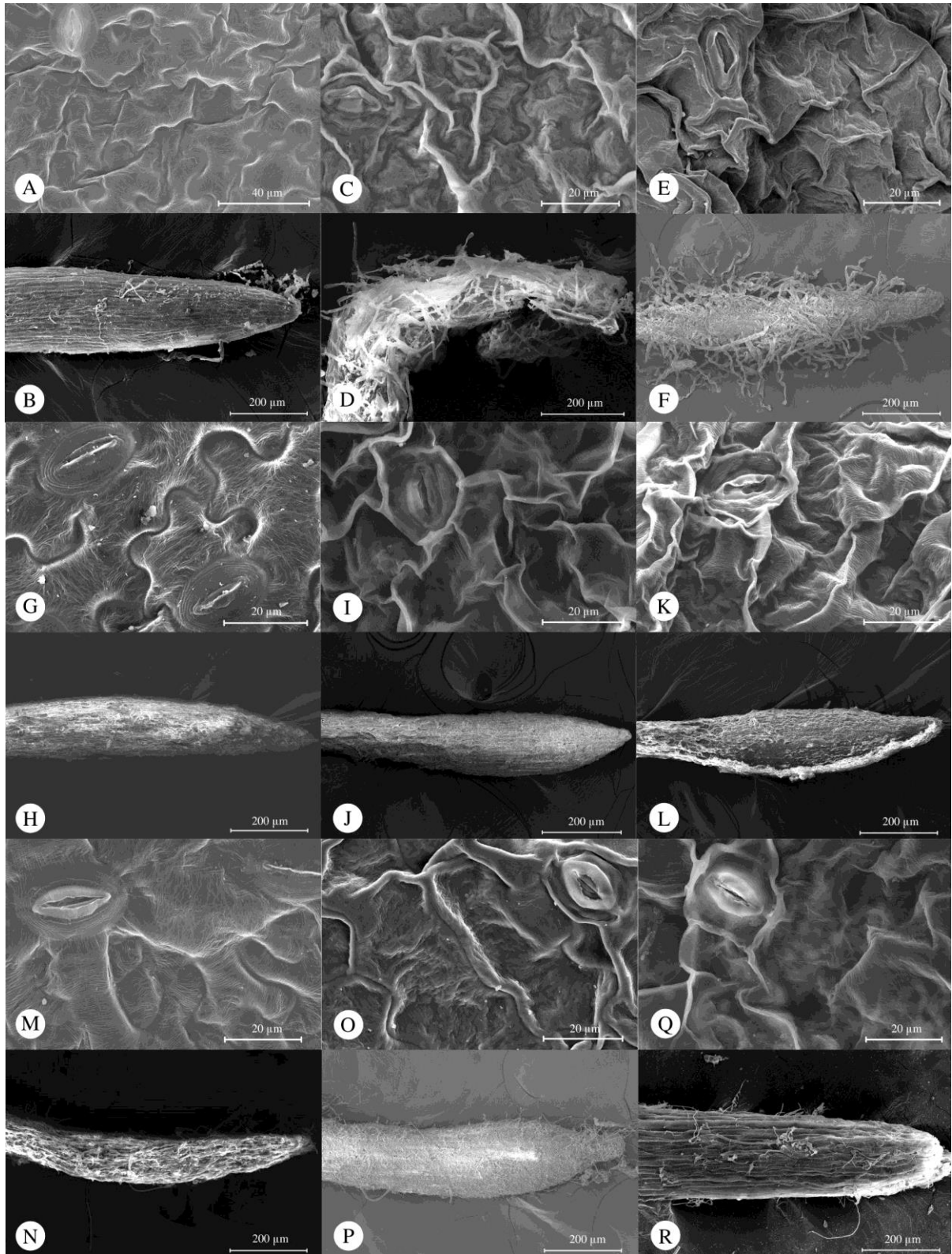
**Figura 3.** Sintomatologia visual das plantas de *Lactuca sativa* L. antes e depois da aplicação dos tratamentos. Na parte superior, plantas no final do período de aclimação e na parte inferior ao final do período de 24 (A) e 72 h (B) de exposição. Da esquerda para direita: controle,  $As^{III}$ ,  $As^V$ , Si, Si +  $As^{III}$ , Si +  $As^V$ , SiNP, SiNP +  $As^{III}$  e SiNP +  $As^V$ .

### 3.3. Alterações anatômicas

As imagens de MEV de raízes no tratamento controle, tanto com 24 h (Figura 4B) quanto com 72 h de tratamento (Figura 5B) mostram um desenvolvimento radicular típico para essas plantas, com ápices radiculares sem alterações visíveis, bem como as células epidérmicas foliares no mesmo tratamento (Figura 4A e Figura 5A) apresentam uma anatomia típica, com estômatos bem formados e sem alterações drásticas visíveis. Já nos tratamentos com  $As^{III}$  e  $As^V$ , aplicados de forma isolada (Figura 4C-F e Figura 5C-F), tanto as raízes quanto as células epidérmicas foliares apresentam alterações anatômicas bem visíveis com deformações no ápice radicular e nas células da epiderme foliar, destacando-se os estômatos, que apresentam alterações severas, com perda de turgescência nas células estomáticas. Essas alterações são ainda mais severas ao final do período de 72 h de tratamento (Figura 5C-F).



**Figura 4.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de folhas e raízes de *Lactuca sativa* L. após 24 h de tratamento: controle (A e B),  $As^{III}$  (C e D),  $As^V$  (E e F), Si (G e H), Si +  $As^{III}$  (I e J), Si +  $As^V$  (K e L), SiNP (M e N), SiNP +  $As^{III}$  (O e P) SiNP +  $As^V$  (Q e R).



**Figura 5.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de folhas e raízes de *Lactuca sativa* L. após 72 h de tratamento: controle (A e B), As<sup>III</sup> (C e D), As<sup>V</sup> (E e F), Si (G e H), Si + As<sup>III</sup> (I e J), Si + As<sup>V</sup> (K e L), SiNP (M e N), SiNP + As<sup>III</sup> (O e P) SiNP + As<sup>V</sup> (Q e R).

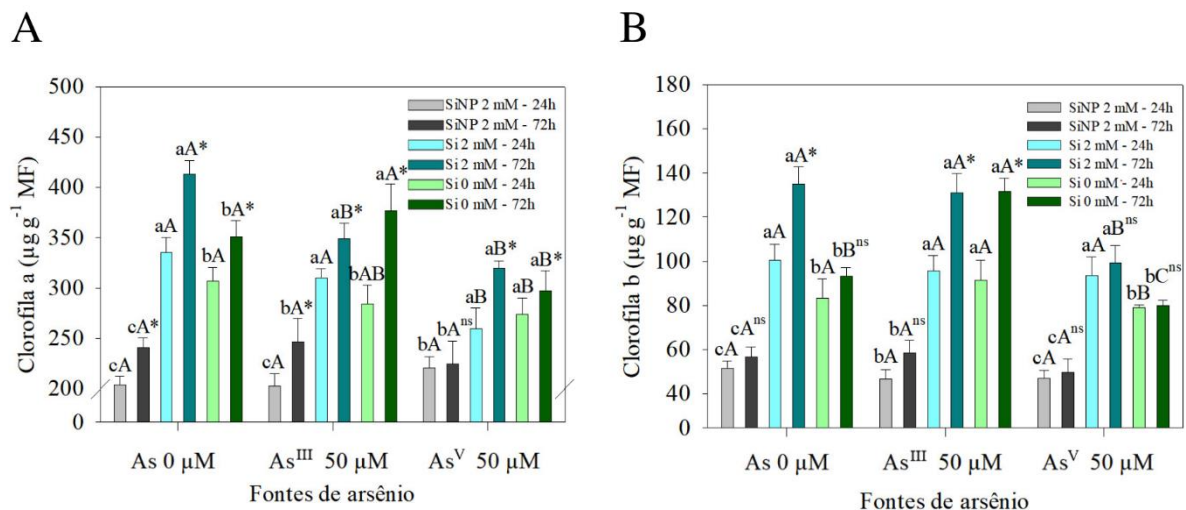
Algumas discretas alterações nas células epidérmicas, como estômatos deformados ocorreram nos tratamentos com Si ou com SiNP (Figura 4G e M e Figura 5G e M), sendo mais evidentes em SiNP. Nas raízes alterações só são observadas para SiNP, tendo o tratamento com Si uma anatomia muito semelhante ao controle (Figura 4H e N e Figura 5H e N).

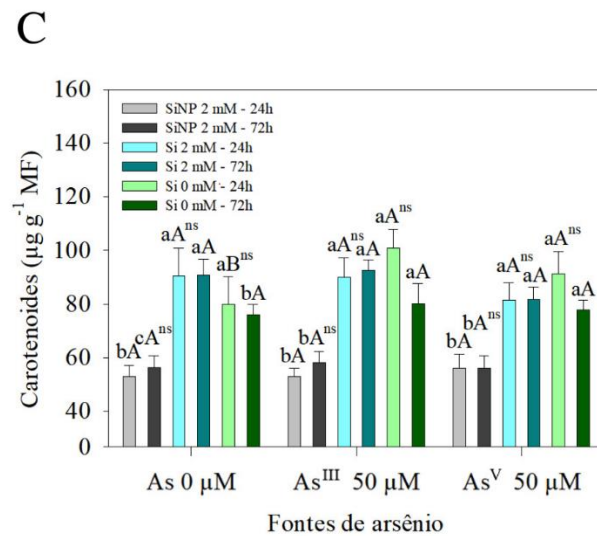
Nos tratamentos contendo Si + As, independente da forma de As, nota-se menores alterações nos aspectos anatômicos das raízes quando se compara estes com os tratamentos contendo somente As após 72 h de tratamento (Figura 5D, F, J e L), não sendo o mesmo observado células epidérmicas que não apresentam menores alterações tão claras, em nenhum dos períodos de exposição, ainda sendo possível observar danos nas mesmas (Figura 4C, E, I e K e Figura 5C, E, I e K). O mesmo se repete, de forma geral, nos tratamentos contendo SiNP (Figura 4O-R e Figura 5O-R).

### 3.4. Análises fisiológicas

#### 3.4.1. Concentração dos pigmentos cloroplastídicos

A concentração de clorofila a e b foi reduzida, nos dois períodos de exposição, pela aplicação de  $As^V$ , diferente dos resultados do  $As^{III}$ , cuja alteração foi verificada apenas na concentração da clorofila b, com aumento após 72 h. A concentração de carotenoides aumentou nos tratamentos com  $As^{III}$  e  $As^V$  com 24 h de exposição, sem que isso ocorresse em 72 h. Na presença de SiNP, não houve diferença nas concentrações dos pigmentos com  $As^{III}$  e  $As^V$  nos dois períodos de exposição. Na aplicação de Si também não houve alterações na concentração de carotenoides em nenhum dos períodos de exposição ao  $As^{III}$  e  $As^V$ , mas houve reduções sobre as concentrações de clorofila a nos dois períodos de exposição com  $As^V$  e, após 72 h, com  $As^{III}$ . Para clorofila b houve uma redução com  $As^V$  após 72 h sem diferenças para o  $As^{III}$  (Figura 6A, B e C).





**Figura 6.** Concentração de clorofila a (A), b (B) e carotenoides (C) em *Lactuca sativa* L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos: controle, As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, Si, Si + As<sup>III</sup>, Si + As<sup>V</sup>, SiNP, SiNP + As<sup>III</sup> e SiNP + As<sup>V</sup>. 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 a variância entre os períodos de exposição aos tratamentos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

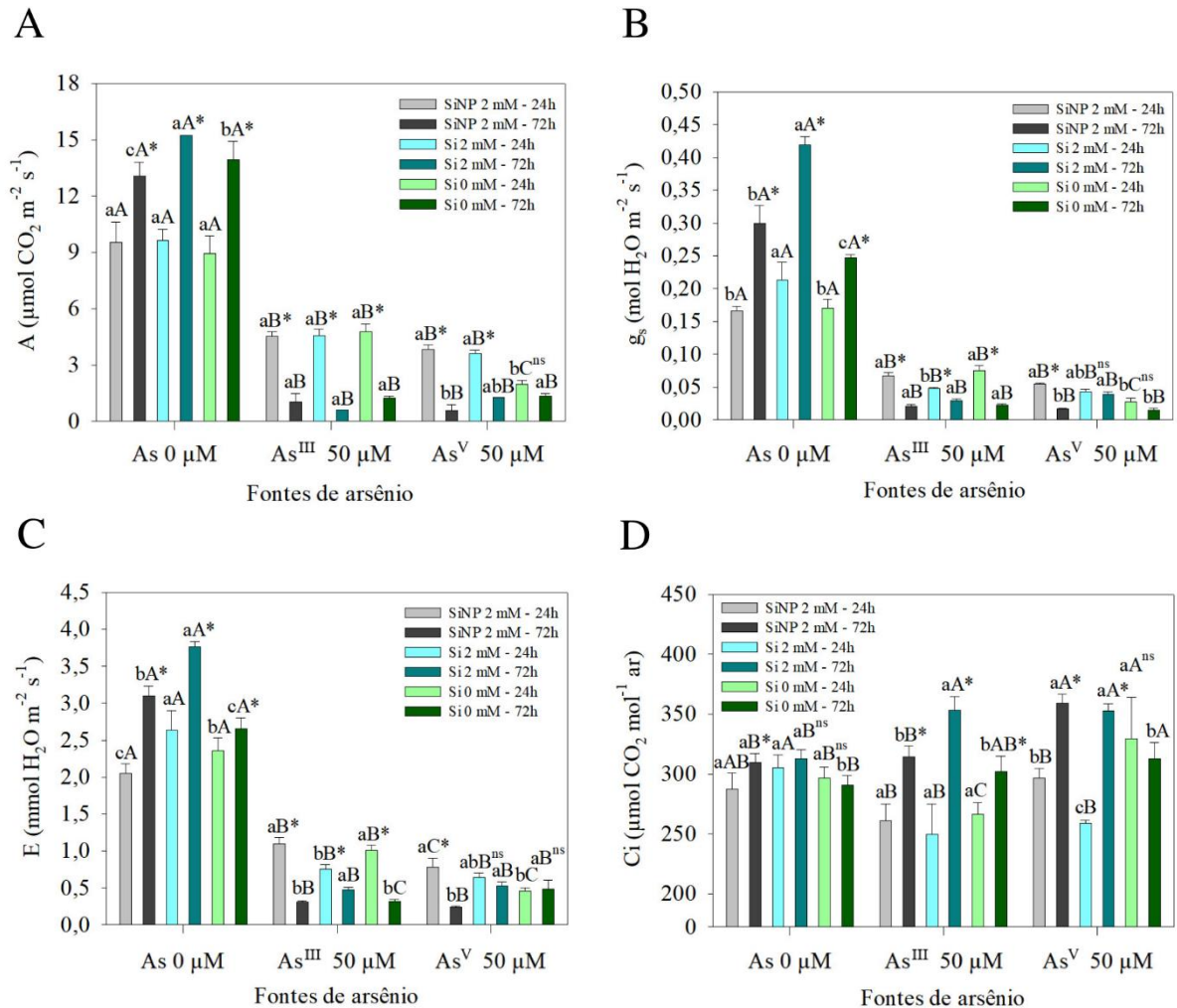
Quando as fontes de silício foram aplicadas com As<sup>III</sup> e As<sup>V</sup> o Si não diferiu na maior parte das vezes do tratamento com somente As<sup>III</sup> ou As<sup>V</sup>, apresentando em alguns tratamentos, concentrações maiores dos pigmentos, enquanto SiNP causou reduções na concentração de todos os pigmentos tanto quando aplicado com As<sup>III</sup> como quando aplicado com As<sup>V</sup> (Figura 6A, B e C).

### 3.4.2. Parâmetros de trocas gasosas

Entre as fontes de As, As<sup>V</sup> causou uma redução significativa da taxa de assimilação líquida de carbono (A) e condutância estomática ( $g_s$ ) em comparação ao As<sup>III</sup> após 24 h. Após 72 h não houve diferença entre As<sup>III</sup> e As<sup>V</sup>, mas ambas as fontes causaram redução em comparação ao controle nos dois períodos de exposição. Nos tratamentos com As<sup>III</sup> ou As<sup>V</sup> e silício, seja Si ou SiNP, houve reduções significativas nesses parâmetros em comparação a aplicação de silício sem As, não havendo diferença entre As<sup>III</sup> e As<sup>V</sup>, com reduções mais severas após 72 h de exposição, enquanto que os tratamentos sem As e com silício obtiveram incremento nesses parâmetros após 72 h (Figura 7A e B).

A transpiração (E) foi mais afetada pelo As<sup>V</sup> em 24 h de exposição, porém, após 72 h, a redução foi maior nos tratamentos com As<sup>III</sup>, mas ambas foram menores que o controle nos dois períodos de exposição. Quando as fontes de As foram aplicadas com SiNP, os tratamentos com As<sup>V</sup> tiveram os menores valores de E, em 24 h, mas As<sup>III</sup> também obteve redução em relação

ao SiNP sem As. Em 72 h, os tratamentos com As<sup>III</sup> e As<sup>V</sup> não diferiram, mas apresentaram menores valores de E que o tratamento com apenas SiNP. Quando aplicadas com Si, As<sup>III</sup> e As<sup>V</sup> não diferiram entre si, mas causaram uma redução na E nos dois períodos de exposição quando comparados aos tratamentos sem As (com somente Si) (Figura 7C).



**Figura 7.** Taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A), condutância estomática ( $g_s$ ) (B), transpiração (C) e concentração interna de carbono ( $C_i$ ) (D) em *Lactuca sativa* L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos: controle, As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, Si, Si + As<sup>III</sup>, Si + As<sup>V</sup>, SiNP, SiNP + As<sup>III</sup> e SiNP + As<sup>V</sup>. 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 a variância entre os períodos de exposição aos tratamentos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

A concentração interna de carbono ( $C_i$ ) foi maior nos tratamentos com As<sup>V</sup>, nos dois períodos de exposição em relação ao controle, mas não diferiu de As<sup>III</sup> após 72h, que por sua vez foi menor que o controle após 24 h, mas não após 72 h. Quando aplicados com SiNP não houve diferença entre estes tratamentos após 24 h, mas após 72 h As<sup>V</sup> causou um aumento do

$C_i$ . Com a utilização do Si, sem As, as plantas tiveram maiores valores de  $C_i$  em comparação com os tratamentos com  $As^{III}$  e  $As^V$  após 24 h, mas com 72 h ocorreu o contrário, não havendo diferença entre Si com  $As^{III}$  e  $As^V$  nos dois períodos exposição (Figura 7D).

Independente da fonte de silício utilizada, quando comparadas entre si, o parâmetro A não diferiu nos tratamentos contendo  $As^{III}$ . Os parâmetros  $g_s$  e E tiveram redução em 24 h nos tratamentos com Si, mas em 72 h a única diferença observada foi o incremento em E, causado pelo Si, em comparação a SiNP e a ausência de silício (somente  $As^{III}$ ) (Figura 7A, B e C). O parâmetro  $C_i$  não variou entre Si e SiNP e nem em comparação a fonte sem silício em 24 h. A única alteração ocorreu em 72 h, com incremento de  $C_i$  nos tratamentos com Si (Figura 7D).

Quando aplicado com  $As^V$ , de modo geral, os tratamentos com Si e com SiNP causaram aumentos A,  $g_s$ , e E, após 24 h de exposição, especialmente SiNP, mas isso não foi prolongado pelas 72 h, também de maneira mais significativa para SiNP (Figura 7A, B e C). Para  $C_i$  tanto Si quanto SiNP causaram uma diminuição após 24 h, especialmente Si, mas, após 72 h, ambas as fontes causaram um aumento em relação ao tratamento sem silício, não havendo diferença entre Si e SiNP quanto magnitude desse aumento (Figura 7D).

O prolongamento do período de exposição, de modo geral, causou efeitos ainda mais negativos nos tratamentos com As, sendo mais evidentes nos tratamentos com  $As^{III}$ , sendo neste isso notado independentemente da presença do silício (Figura 7A, B, C e D). Notou-se, ainda, de maneira interessante, que a aplicação de silício, seja Si ou SiNP, sem a presença de As, leva de a incrementos de A,  $g_s$  e E após 72 h sendo estes mais acentuados por Si do que por SiNP (Figura 7A, B e C). O mesmo não é observado para  $C_i$ , que não diferiu entre fontes de silício nem mesmo do controle, de maneira geral (Figura 7D).

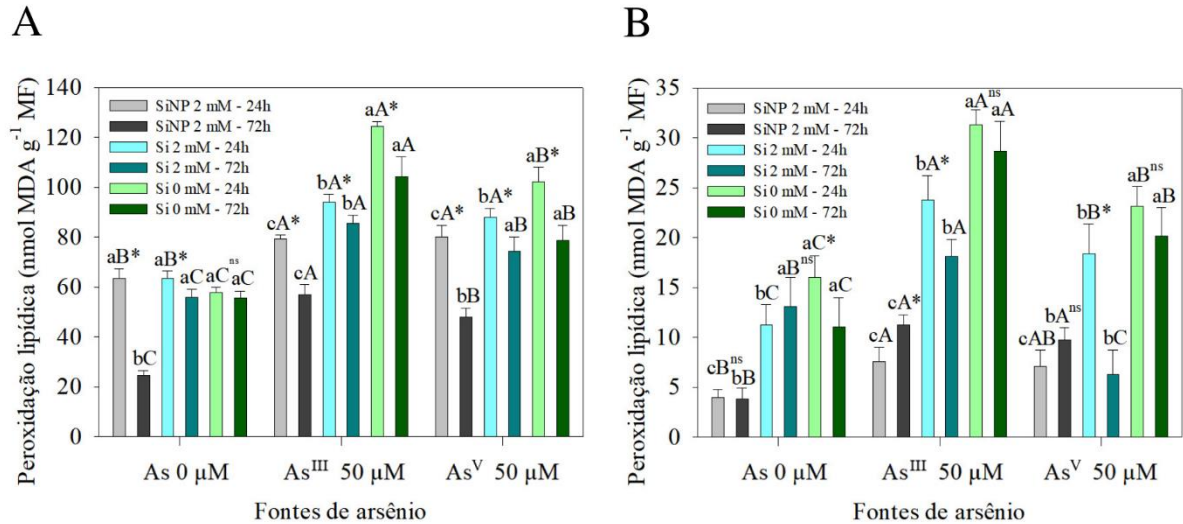
### 3.5. *Análises bioquímicas*

#### 3.5.1. *Metabolismo oxidativo*

##### 3.5.1.1. *Peroxidação lipídica*

Os danos às membranas, demonstrados pelos valores de peroxidação lipídica, foram maiores nos tratamentos com  $As^{III}$  do que nos com  $As^V$  mas ambas as fontes causaram maiores danos que o controle nos dois períodos de exposição, sendo nas folhas danos maiores com 24 h de exposição para  $As^{III}$  e  $As^V$ . A aplicação de SiNP com  $As^{III}$  e  $As^V$  resultou em uma maior peroxidação lipídica nas folhas e em raízes do que a aplicação de SiNP sem As e resultados semelhantes são obtidos com a aplicação de Si, com exceção a aplicação deste com  $As^V$  após 72 h nas raízes que foram menores que a aplicação de Si isolado (Figura 8A e B). Nas folhas, a peroxidação lipídica na aplicação de fontes de silício com As foi maior com  $As^{III}$  do que do que com  $As^V$  após 72 h, sendo, nesta parte da planta, os danos maiores ocorridos com 24 h de

exposição nesses tratamentos (Figura 8A). Nas raízes, com Si, os danos foram maiores com  $As^{III}$  do que com  $As^V$  nos dois períodos de exposição enquanto que com SiNP não houve diferença entre  $As^{III}$  e  $As^V$  em nenhum dos períodos de exposição e os danos foram maiores com  $As^{III}$  após 72 h de exposição (Figura 8B).

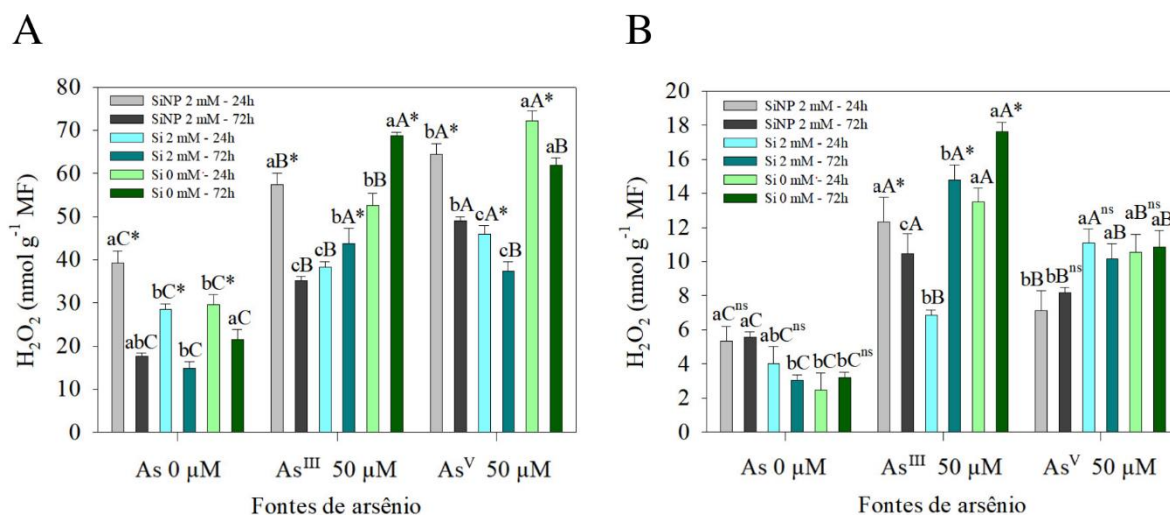


**Figura 8.** Peroxidação lipídica em folhas (A) e raízes (B) de *Lactuca sativa* L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos: controle,  $As^{III}$ ,  $As^V$ , Si, Si +  $As^{III}$ , Si +  $As^V$ , SiNP, SiNP +  $As^{III}$  e SiNP +  $As^V$ . Médias seguidas por letra maiúscula igual não diferem 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 a variância entre os períodos de exposição aos tratamentos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Quanto as fontes de silício, tanto Si quanto SiNP reduziram a peroxidação lipídica em folhas e raízes causada por  $As^{III}$  e por  $As^V$ , porém, de maneira geral, o SiNP apresenta maiores reduções desses danos. De maneira interessante, o prolongamento dos tratamentos com Si nas plantas expostas ao  $As^{III}$  e ao  $As^V$  aumentou a ação protetora em relação aos danos oxidativos tanto em folhas quanto em raízes, enquanto que para SiNP isso só ocorreu em folhas (Figura 8A e B).

### 3.5.1.2. Concentração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )

As concentrações de  $H_2O_2$  aumentaram nos tratamentos contendo As, independente da presença de silício, tanto em folhas quanto em raízes (Figura 9A e B). Entretanto, nas folhas, esse acréscimo foi menos pronunciado para  $As^{III}$  do que para  $As^V$  quando aplicado com SiNP, nos dois períodos de exposição, enquanto que para Si isso ocorreu após 24 h, mas se inverteu após 72 h (Figura 9A).



**Figura 9.** Concentração de  $H_2O_2$  em folhas (A) e raízes (B) de *Lactuca sativa* L. após 24 e 72 h 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 a variância entre os períodos de exposição aos tratamentos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Nas raízes, por sua vez, a concentração  $H_2O_2$  foi maior para  $As^{III}$  do que para  $As^V$  na presença de SiNP, enquanto que para Si ocorreu o mesmo comportamento visto nas folhas (Figura 9B). De modo geral, quanto ao período de exposição, houveram aumentos nas na concentração de  $H_2O_2$  no período inicial de exposição caindo após 72 h, indicando que a produção de  $H_2O_2$  ocorre de maneira bastante rápida nas folhas (Figura 9A e B). Porém os tratamentos Si +  $As^{III}$  e  $As^{III}$  tiveram incrementos apenas após 72 h o que pode ser devido a competição do  $As^{III}$  e Si pelos sítios de absorção e pela complexação com fitoquelatinas, respectivamente (Figura 9A e B).

Entre as fontes de silício tanto Si quanto SiNP, de maneira geral, causaram reduções na concentração de  $H_2O_2$ , porém houve dependência entre os fatores. Enquanto Si causou uma queda maior que SiNP na presença de  $As^V$  nas folhas o contrário foi observado nas raízes nos dois períodos de tratamento. Já para  $As^{III}$ , uma redução maior foi causada por Si após 24 h e por SiNP após 72 h tanto em folhas quanto em raízes (Figura 9A e B).

### 3.5.2. Enzimas do sistema antioxidante

#### 3.5.2.1. Atividade da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX)

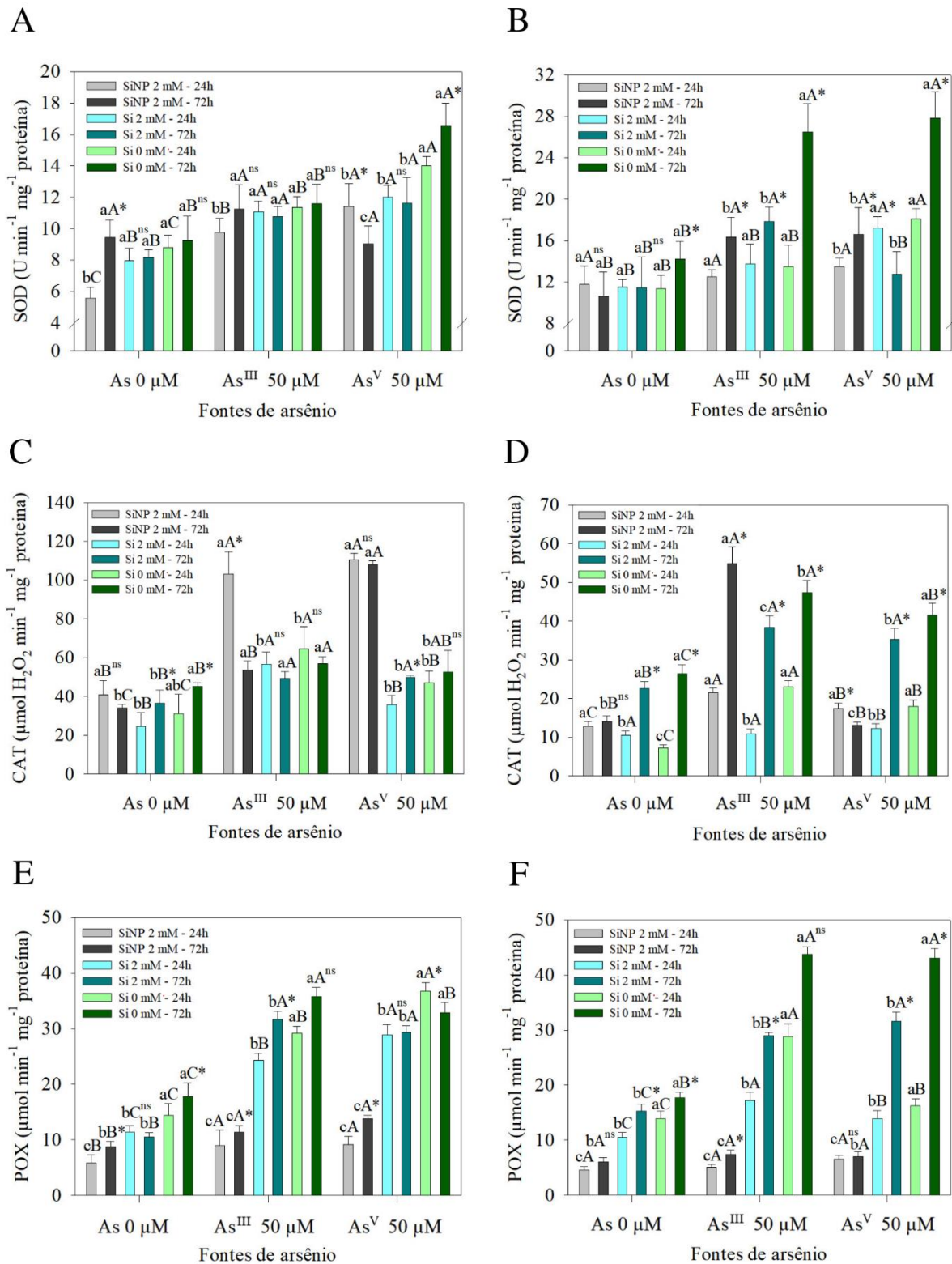
A exposição das plantas ao As induziu aumento na atividade da SOD nas folhas e nas raízes, e isso ocorreu especialmente com  $As^V$ , sendo que com  $As^{III}$  isso ocorreu com 24 h nas folhas e com 72 h nas raízes, tendo, de maneira geral, maiores aumentos na atividade

observados após 72 h de exposição nesses tratamentos (Figura 10 A e B). O fornecimento de SiNP juntamente com  $As^{III}$  e  $As^V$ , nas folhas, manteve o aumento da atividade da enzima em 24 h, mas em 72 h esse incremento não foi observado. Já com Si a atividade da enzima aumentou nos dois períodos de exposição, mas foi a mesma quando se compara  $As^{III}$  e  $As^V$  (Figura 10A). Nas raízes, quando As, seja  $As^{III}$  ou  $As^V$ , foi aplicado com SiNP, após 72 h, houve aumentos significativamente mais altos em relação ao SiNP sem As no mesmo período, enquanto que com Si,  $As^V$  causou aumento após 24 h e  $As^{III}$  após 72 h, sendo estes aumentos mais altos nestes respectivos períodos de exposição (Figura 10B). Diferenças entre as fontes silício, nos tratamentos com  $As^{III}$ , ocorreram apenas de forma mais significativa nas raízes, com ambas as fontes reduzindo a atividade da SOD após 72h. Com  $As^V$  ocorreram em ambas as partes da planta, com maior efetividade para SiNP. (Figura 10A e B).

A atividade da CAT foi aumentada tanto por  $As^{III}$  quanto por  $As^V$ , porém um aumento mais expressivo foi observado no tratamento com  $As^{III}$ , especialmente nas raízes, que aumentou com o período de exposição. De maneira geral a atividade também aumentou quando as plantas foram expostas a  $As^{III}$  e a  $As^V$  com Si e SiNP. Porém, entre fontes de silício, diferente do que aconteceu para SOD, aumentos adicionais foram são causados por SiNP na presença de  $As^{III}$  e  $As^V$  na maior parte dos tratamentos o que não é observado para Si, que nas folhas não difere dos tratamentos com somente  $As^{III}$  ou  $As^V$  e nas raízes causa redução da atividade em ambos os períodos de exposição (Figura 10 C e D).

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 e nas raízes, nos dois períodos de aplicação, porém sem diferença quanto ao período de exposição para  $As^{III}$ , enquanto que para  $As^V$  houve, sendo nas folhas maior atividade com 24 h e nas raízes com 72 h de exposição. Na presença de Si,  $As^{III}$  e  $As^V$  também causaram aumento da atividade da enzima, enquanto que com SiNP isso só ocorreu nas folhas. Em relação as fontes de silício, a forma iônica apresentou uma indução da atividade maior do que SiNP. No entanto, ambas as fontes causaram redução em relação aos

tratamentos com As isoladamente. Interessante observar que a aplicação de silício reduziu a atividade dessa enzima, independente da presença de As (Figura 10E e F).



**Figura 10.** Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em folhas (A) e raízes (B), catalase (CAT) em folhas (C) e raízes (D) e da peroxidase (POX) em folhas (E) e raízes (F) de *Lactuca sativa* L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos: controle, As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, Si, Si + As<sup>III</sup>, Si +

As<sup>V</sup>, SiNP, SiNP + As<sup>III</sup>, SiNP + As<sup>V</sup>. 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 a variância entre os períodos de exposição aos tratamentos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.6. *Avaliações do metabolismo ascorbato-glutationa (AsA-GSH)*

#### 3.6.1. *Concentração de ascorbato total, reduzido e oxidado (T-AsA, AsA e DHA)*

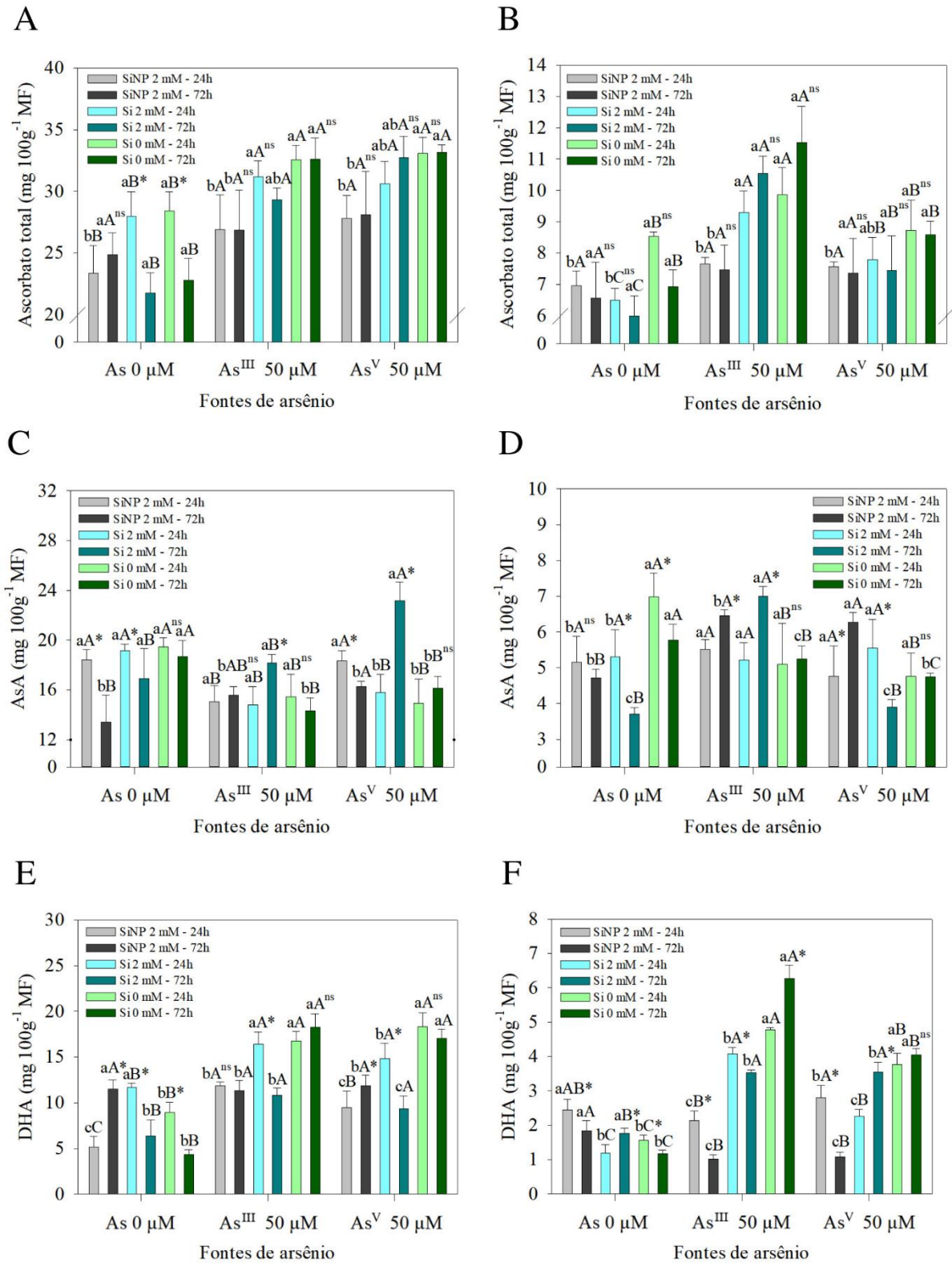
Nas folhas, a concentração de T-AsA aumentou e a de AsA diminuiu quando estas foram tratadas com As<sup>III</sup> e As<sup>V</sup>, que não diferiram entre si tanto com 24 quanto com 72 h, o que resultou em maior concentração de DHA, sendo estes não alterados pelo período de exposição aos tratamentos. Quando aplicadas com SiNP, As<sup>III</sup> e As<sup>V</sup> não diferiram entre si nos dois períodos de exposição para T-AsA, mas para AsA a concentração foi menor com As<sup>III</sup> após 24 h e a concentração de DHA maior no mesmo período. Com Si ocorreu o mesmo visto com SiNP para T-AsA, mas para AsA a concentração foi maior para As<sup>V</sup> após 72 h, mas isso não gerou concentrações de DHA menores no mesmo período (Figura 11A, C e E).

Tanto o silício iônico quanto nanoparticulado causaram menores concentrações de DHA na presença de As<sup>III</sup> e As<sup>V</sup> e, especialmente o SiNP que causou, também, menores concentrações de T-AsA do que a aplicação de As sem silício, causando a depender da fonte e do período de exposição maiores concentrações de AsA, mas em nenhum deste menores concentrações do mesmo o que pode estar ligado a menor concentração de As nessa parte da planta e consequentemente uma menor oxidação e necessidade de biossíntese desse composto pelo menor estresse pelo As (Figura 11A, C e E).

Nas raízes, entretanto, as fontes de As resultaram em acúmulo diferencial de T-AsA e DHA, com maiores concentrações nas plantas expostas ao As<sup>III</sup>, ao passo que a concentração de AsA reduziu neste tratamento. Porém, As<sup>V</sup> ainda causou uma alta concentração de DHA e uma menor concentração de AsA em relação ao controle nos dois períodos de exposição. A aplicação de SiNP com As causou menores concentrações de DHA após 72 h e aumentou a concentração de AsA no mesmo período, sem diferir na concentração de T-AsA nos dois períodos de exposição, em relação a aplicação de SiNP sem As. Já com Si, a concentração de T-AsA e DHA foi maior nos dois períodos de aplicação, especialmente com As<sup>III</sup> mas AsA só aumentou para As<sup>III</sup> após 72 h em relação a aplicação de Si sem As (Figura 11B, D e F).

Quando comparadas entre si, ambas as fontes de silício causaram menores concentrações de DHA e maiores de AsA de maneira geral, tanto com As<sup>III</sup> quanto com As<sup>V</sup>,

sendo para T-AsA uma menor concentração observada para SiNP com As<sup>III</sup> do que para Si e com As<sup>V</sup> ambas as fontes de silício causaram redução após 24 h (Figura 11B, D e F).

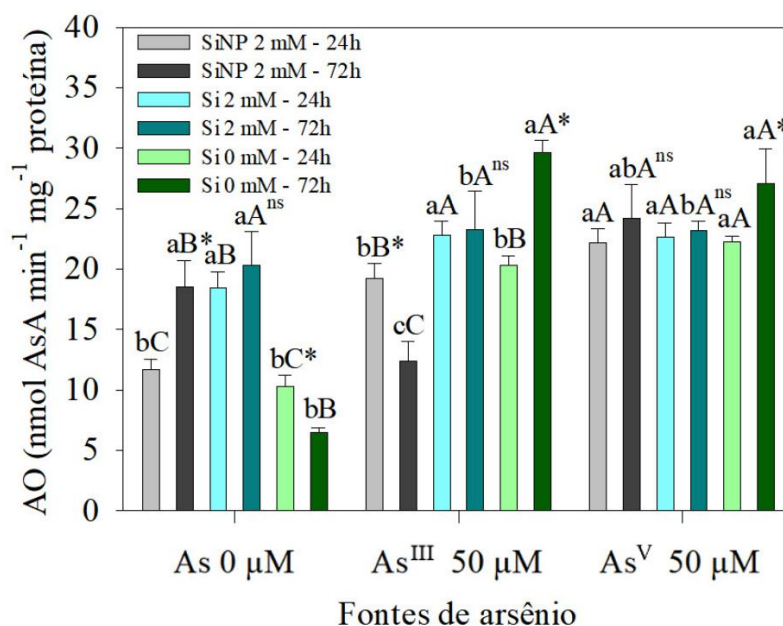


**Figura 11.** Concentração de ascorbato total (T-AsA) em folhas (A) e raízes (B), ascorbato reduzido (AsA) em folhas (C) e raízes (D) e ascorbato oxidado (DHA) em folhas (E) e raízes (F) de *Lactuca sativa* L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos: controle, As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, Si,

Si + As<sup>III</sup>, Si + As<sup>V</sup>, SiNP, SiNP + As<sup>III</sup>, SiNP + As<sup>V</sup>. 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 a variância entre os períodos de exposição aos tratamentos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.6.2. Atividade da oxidase do ascorbato (AO)

A oxidação do ascorbato, catalisada pela AO, foi significativamente aumentada pela presença de As, sem diferença entre As<sup>III</sup> e As<sup>V</sup> após 72 h, e de forma mais pronunciada no período nesse período de exposição. A aplicação do silício, em ambas formas químicas, causou aumento na atividade da enzima, na presença de As após 24 h, porém após 72 h a atividade caiu com SiNP na presença de As<sup>III</sup> e não diferiu, com a aplicação de Si, do tratamento sem As (Figura 12).

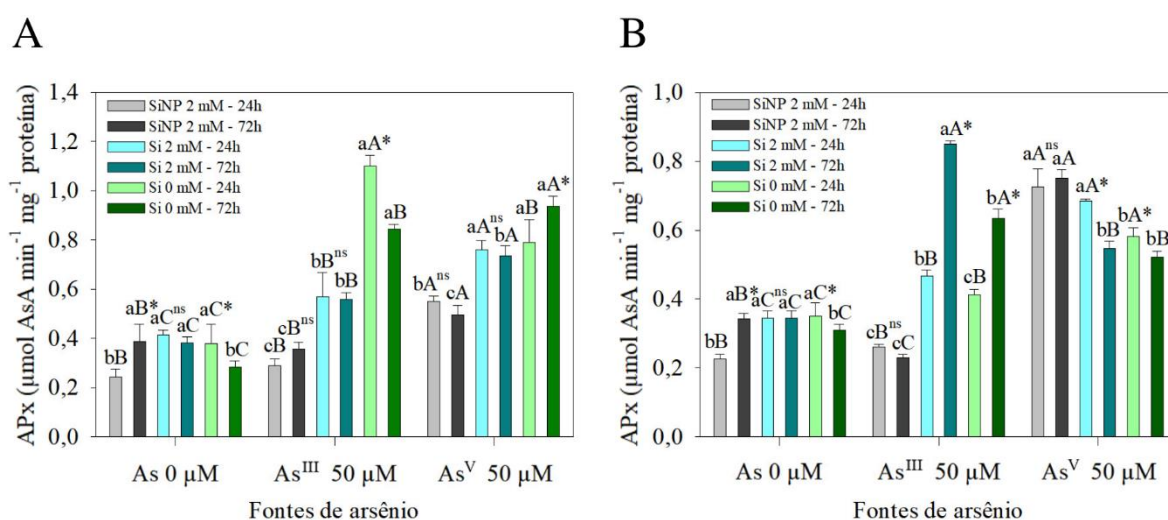


**Figura 12.** Atividade da oxidase do ascorbato (AO) em folhas de *Lactuca sativa* L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos: controle, As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, Si, Si + As<sup>III</sup>, Si + As<sup>V</sup>, SiNP, SiNP + As<sup>III</sup>, SiNP + As<sup>V</sup>. Médias seguidas por letra 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 a variância entre os períodos de exposição aos tratamentos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Entre fontes de silício, a aplicação de Si causou redução na atividade da AO com As<sup>V</sup> após 72 h, enquanto que SiNP não. Aumentos adicionais com As<sup>III</sup> após 24 h foram causados pelo Si, não observados para SiNP. Sendo que, após 72 h, ambas as fontes causaram redução da atividade, sendo esta de forma mais significativa para SiNP do que para Si quando comparado ao tratamento com somente As<sup>III</sup> (Figura 12).

### 3.6.3. Atividade da peroxidase do ascorbato (APx)

A atividade da APx foi significativamente aumentada, nas folhas, pela presença de As, sendo maior para o  $As^{III}$  no período inicial de exposição e para o  $As^V$  em 72 h. A aplicação das fontes de As com SiNP resultou em acréscimo da atividade apenas para o  $As^V$ , nos dois períodos de exposição. Com Si tanto  $As^{III}$  quanto  $As^V$  levaram a aumentos dessa enzima nos dois períodos de exposição, mas  $As^V$  causou aumentos mais significativos. Em nenhum dos tratamentos com  $As^{III}$  e  $As^V$  em conjunto com Si ou SiNP houve diferença entre o período de exposição, enquanto que a aplicação destes sem as fontes de silício houve, com  $As^{III}$  causando aumento da atividade após 24 h e  $As^V$  após 72 h de exposição (Figura 13A).



**Figura 13.** Atividade da peroxidase do ascorbato (APx) em folhas (A) e raízes (B) de *Lactuca sativa* L. após 24 e 72 h 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 a variância entre os períodos de exposição aos tratamentos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Quando se compara as fontes de silício, nota-se que tanto SiNP quando Si causaram redução na atividade dessa enzima quando aplicado com  $As^{III}$  nos dois períodos de exposição, mas que SiNP causou uma redução mais significativa que Si. E isso se repete com  $As^V$  com 72 h de exposição, mas com 24 h uma redução é observada apenas para SiNP, enquanto Si não difere do tratamento contendo apenas  $As^V$  (Figura 13A).

Nas raízes, assim como nas folhas, o As também causou um aumento na atividade da APx, mas, nesse caso, os maiores valores foram obtidos nos tratamentos com  $As^V$ , em 24 h, e com  $As^{III}$ , em 72 h, sendo a maior atividade em ambos nos períodos de exposição supracitados. A aplicação de As com SiNP resultou em incrementos na atividade da enzima das plantas

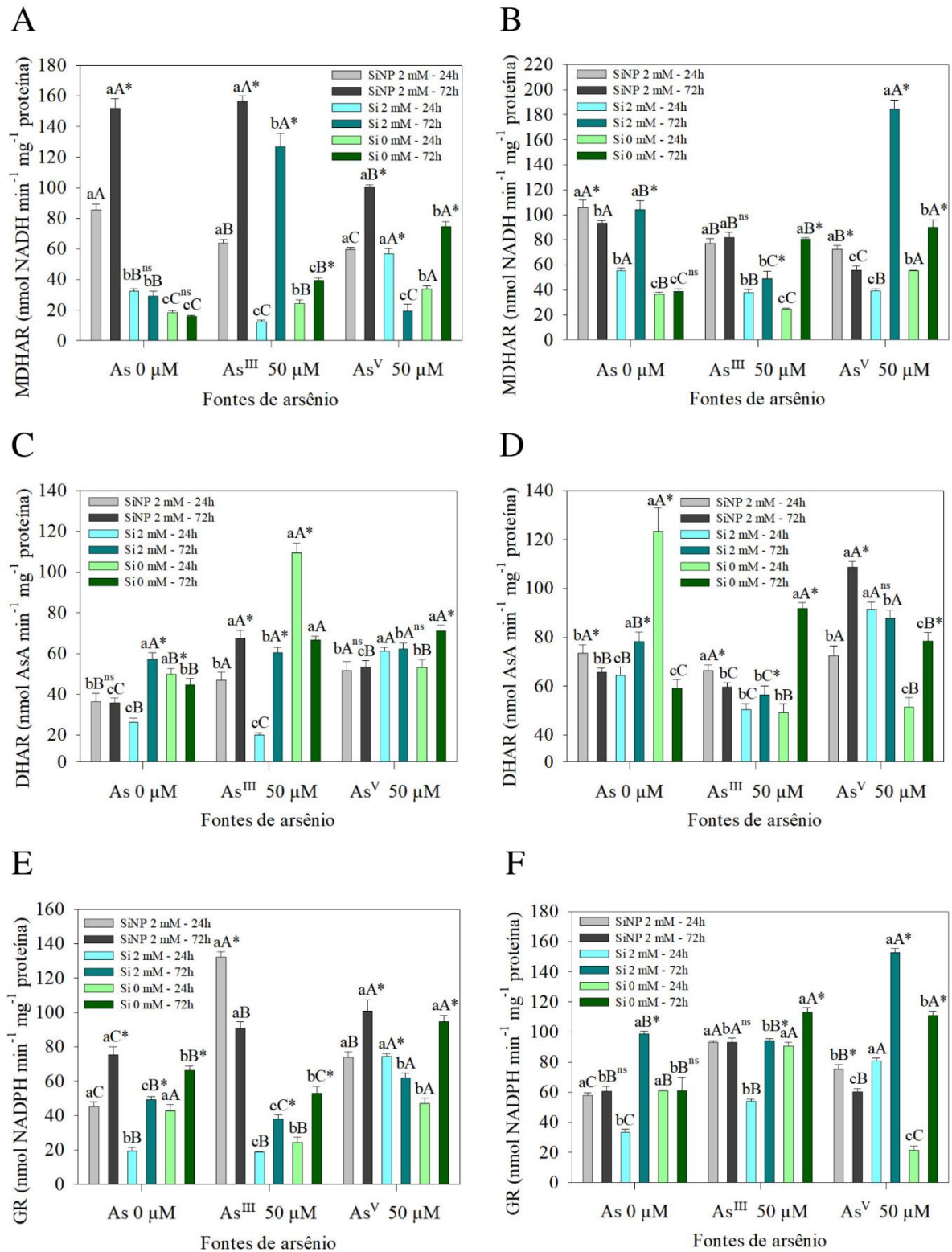
expostas ao  $\text{As}^{\text{V}}$  nos dois períodos de exposição, mas para  $\text{As}^{\text{III}}$  houve redução após 72 h de exposição, enquanto com o Si houve aumento da atividade nos tratamentos com ambas formas de As, com 24 h isso ocorreu de forma mais acentuada com  $\text{As}^{\text{V}}$  e com 72 h com  $\text{As}^{\text{III}}$  (Figura 13B).

Entre as fontes de silício, SiNP causou redução da atividade com 72 h, enquanto Si causou aumento nos dois períodos de exposição na presença de  $\text{As}^{\text{III}}$  em comparação ao tratamento sem silício. Já com  $\text{As}^{\text{V}}$  foi SiNP quem causou aumento nos dois períodos de exposição, enquanto com Si isso ocorreu apenas com 24 h e não diferiu após 72 h do tratamento sem silício (Figura 13B).

#### **3.6.4. Atividade da redutase do monodehidroascorbato (MDHAR), redutase do dehidroascorbato (DHAR) e da redutase da glutatona (GR)**

A presença de As, em folhas, seja  $\text{As}^{\text{III}}$  ou  $\text{As}^{\text{V}}$ , aumentou ou não diferiu do tratamento sem As nas atividades da MDHAR e da DHAR. Para a atividade da GR foi observado um comportamento diferente tendo o  $\text{As}^{\text{III}}$ , nos dois períodos de exposição, diminuído a atividade dessa enzima, que apesar de ter sido aumentada após 72 h ainda foi menor que o controle. Com exceção do tratamento com  $\text{As}^{\text{III}}$  na DHAR, os demais tratamentos com somente fontes de As promoveram aumento da atividade com o aumento do período de exposição. A aplicação de SiNP tanto com  $\text{As}^{\text{III}}$  quanto com  $\text{As}^{\text{V}}$  levou a aumentos da atividade da GR e da DHAR nos dois períodos de exposição, mas para MDHAR houve redução com  $\text{As}^{\text{V}}$  nos dois períodos de exposição e com  $\text{As}^{\text{III}}$  com 24 h, sendo que nessa enzima a aplicação de SiNP, mesmo sem As, levou a aumentos muito significativos da sua atividade. Com Si, de forma geral, as atividades foram diminuídas quando com  $\text{As}^{\text{III}}$  e aumentadas com  $\text{As}^{\text{V}}$  após 24 h de exposição e o mesmo se repetiu para GR após 72 h, mas para DHAR não houve diferença e para MDHAR ocorreu o contrário (Figura 14A, C e E).

Entre as fontes de silício, quando aplicadas com  $\text{As}^{\text{III}}$  houve bastante variação, mas de maneira geral SiNP causou um aumento em relação ao tratamento com apenas  $\text{As}^{\text{III}}$  enquanto Si causou redução. Com  $\text{As}^{\text{V}}$ , SiNP causou aumento em MDHAR, nos dois períodos de exposição, enquanto na atividade da GR isso ocorreu apenas com 24 h de exposição e na DHAR foi notada uma redução com 72 h de exposição. Para Si houve um aumento na atividade com 24 h das três enzimas, mas redução após 72 h de exposição (Figura 14A, C e E).



**Figura 14.** Atividade da redutase do monodehidroascorbato (MDHAR) em folhas (A) e raízes (B), redutase do dehidroascorbato (DHAR) em folhas (C) e raízes (D) e da redutase da glutatona (GR) em folhas (E) e raízes (F) de *Lactuca sativa* L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos: controle, As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, Si, Si + As<sup>III</sup>, Si + As<sup>V</sup>, SiNP, SiNP + As<sup>III</sup>, SiNP + As<sup>V</sup>. 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 a variância entre os períodos de exposição aos tratamentos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

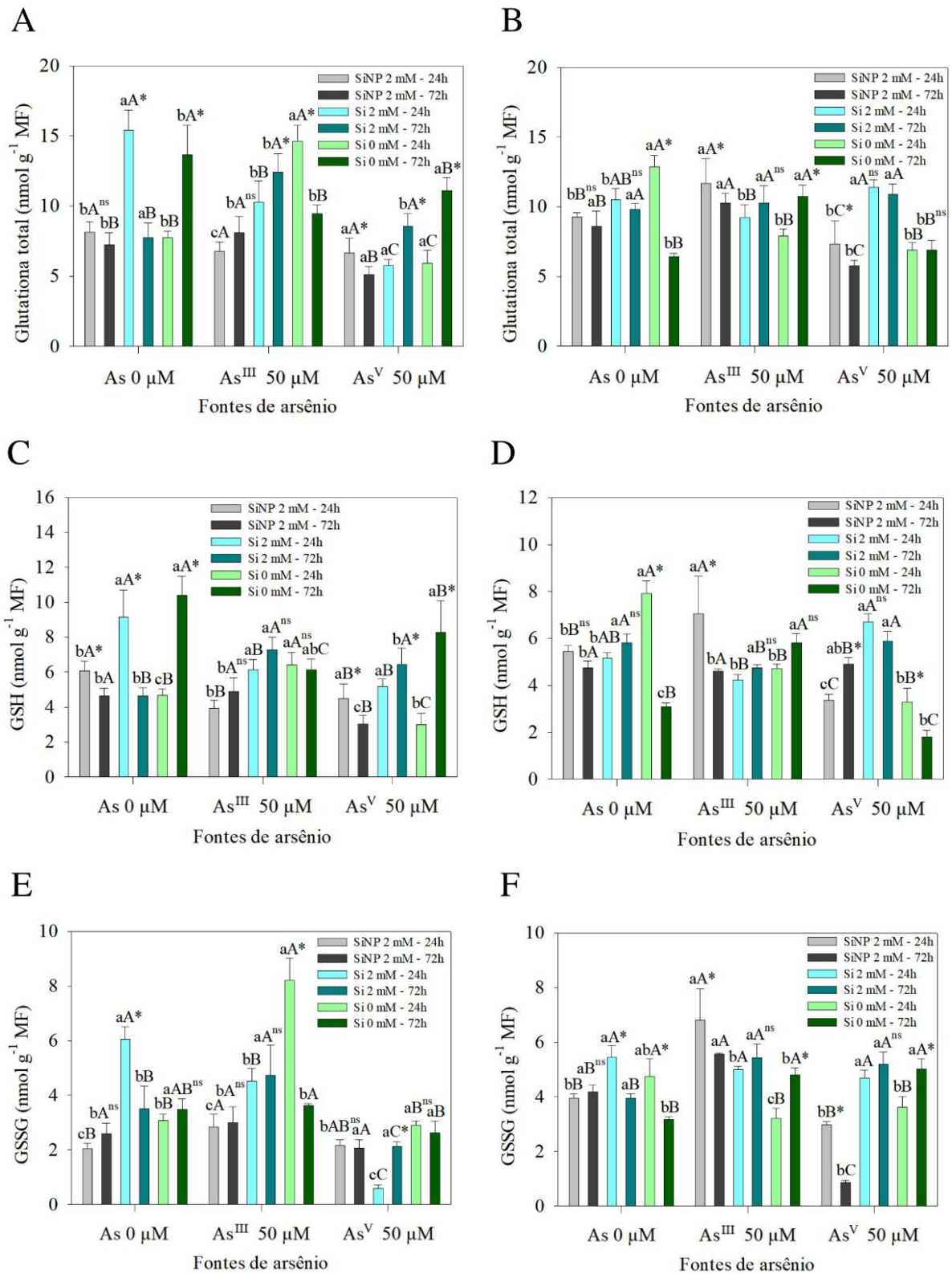
Nas raízes, após 72 h de exposição, tanto  $As^{III}$  quanto  $As^V$  causaram aumentos nas atividades das três enzimas em relação ao controle, mas com 24 h  $As^V$  continuou causando aumento da MDHAR enquanto  $As^{III}$  diminuiu, já na GR ocorreu o contrário e na DHAR ambos causaram redução. A aplicação de  $As^{III}$  com tanto com SiNP quanto com Si resultou em redução da atividade da MDHAR e da DHAR, mas aumento na GR, de modo geral, quando comparado ao SiNP ou Si sem As. Já quando com  $As^V$ , com SiNP, houve aumento da atividade da MDHAR e redução da DHAR e GR nos dois períodos de exposição, que também ocorreram com Si, com exceção da atividade da MDHAR com 72 h de exposição, de maneira geral (Figura 14B, D e F).

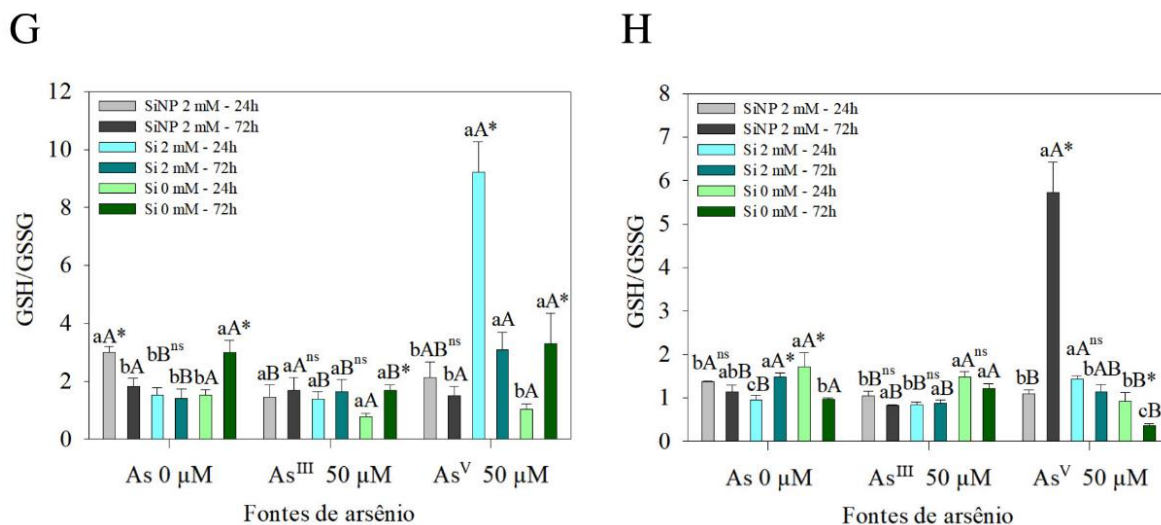
Quando as fontes de silício são aplicadas com  $As^{III}$ , de modo geral, SiNP não causou diferença ou aumentou as atividades enzimáticas, enquanto Si reduziu em comparação a  $As^{III}$  sem nenhuma fonte de silício e, quando aplicadas com  $As^V$ , os efeitos vistos foram muito dependentes do período de exposição. Para MDHAR, SiNP causou um aumento após 24 h mas redução após 72 h, enquanto com Si foi o contrário. Já para DHAR houve aumento nos dois períodos de exposição, porém Si causou aumentos mais significativos após 24 h enquanto SiNP após 72 h, enquanto que para GR Si causou aumento em ambos os períodos de exposição enquanto SiNP causou aumento após 24 h, mas redução da atividade após 72 h, sendo o aumento causado por Si mais significativo que o causado por SiNP (Figura 14B, D e F).

### **3.6.5. Concentração de glutathiona total, reduzida e oxidada (GSH e GSSG)**

As folhas das plantas expostas ao As, por 24 h, apresentaram acréscimos nas concentrações de glutathiona total, GSH e GSSG, quando tratadas com  $As^{III}$ , e diminuição naquelas expostas ao  $As^V$ , com exceção de GSSG com  $As^V$ , que não diferiu do controle. Em 72 h, entretanto, GSH e glutathiona total tiveram decréscimo tanto por  $As^{III}$  quanto por  $As^V$ , enquanto que para GSSG não houve diferença entre estes e o controle, mas  $As^{III}$  apresentou uma concentração maior de GSSG do que  $As^V$ . A aplicação de SiNP nos tratamentos com As, com 24 h, manteve inalterada a concentração de glutathiona total, resultado da diminuição da concentração da forma reduzida (GSH) e aumento da forma oxidada (GSSG). Após 72 h, a concentração glutathiona total foi aumentada quando aplicada com  $As^{III}$  e a de GSH diminuída com  $As^V$ , mas isso não resultou em aumentos ou reduções de GSSG por ambas as formas de As quando comparados ao tratamento sem As. Quando aplicados com Si, entretanto, tanto com  $As^{III}$  quanto com  $As^V$ , houve redução em todas as formas de glutathiona com 24 h de tratamento,

especialmente nos tratamentos com  $As^V$ . Com 72 h, ocorreu o contrário a não ser em GSSG com  $As^V$  que continuou menor que o controle. (Figura 15A, C e E).





**Figura 15.** Concentração de glutatona total em folhas (A) e raízes (B), glutatona reduzida (GSH) em folhas (C) e raízes (D), glutatona oxidada (GSSG) em folhas (E) e raízes (F) e relação GSH/GSSG em folhas (G) e raízes (H) de *Lactuca sativa* L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos: controle, As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, Si, Si + As<sup>III</sup>, Si + As<sup>V</sup>, SiNP, SiNP + As<sup>III</sup>, SiNP + As<sup>V</sup>. 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 a variância entre os períodos de exposição aos tratamentos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Quando as fontes de silício foram aplicadas com As<sup>III</sup>, SiNP reduziu as concentrações de todas as formas de glutatona após 24 h e após 72 h não diferiu do tratamento com apenas As<sup>III</sup>. Já Si diminuiu a concentração de glutatona total após 24 h e da mesma forma ocorreu para GSSG, aumentado a concentração desta após 72 h, não resultando em concentrações diferentes do tratamento com apenas As<sup>III</sup> para GSH nos dois períodos de exposição. De modo geral, SiNP causou reduções maiores que nas três formas de glutatona que Si na presença de As<sup>III</sup> o que não necessariamente é uma coisa boa, mas sim pode estar ligado a baixa concentração de As nessa parte da planta e uma concentração maior dessa fonte de silício nas folhas, portanto uma menor toxicidade por As e menor biossíntese desse antioxidante. Com As<sup>V</sup>, a concentração de glutatona total não foi alterada com 24 h de exposição, mas a concentração de GSH foi aumentada tanto por SiNP quanto por Si e a concentração de GSSG decaiu. Após 72 h a concentração de glutatona total foi reduzida por SiNP e a de GSH por ambas as fontes de silício, sem, no entanto, alterar a concentração de GSSG (Figura 15A, C e E).

Nas raízes, os tratamentos com As isoladamente causaram redução das concentrações dos tiois em 24 h, não diferindo entre si. Após 72 h As<sup>V</sup> apresentou alta concentração de GSSG e baixas concentrações de GSH que não resultaram em aumentos significativos de glutatona

total, enquanto  $As^{III}$  causou aumento em todas as formas em comparação ao controle. Quando as fontes de As foram aplicadas com SiNP  $As^{III}$  causou aumento da concentração de glutathiona total e  $As^V$  redução, nos dois períodos de exposição, sendo, de modo geral, isso observado para GSH e GSSG. Com Si, de modo geral, o efeito foi inverso, com  $As^V$  causando aumento e  $As^{III}$  redução, mas ambos causaram maiores concentrações de GSSG após 72 h (Figura 15B, D e F).

Quanto as fontes de silício, quando aplicadas com  $As^{III}$ , ambas causaram maiores concentrações de GGSG do que  $As^{III}$  sozinho nos dois períodos de exposição, mas SiNP apresentou maiores concentrações de glutathiona total e GSH após 24 h, enquanto Si não, nos dois períodos de exposição. Já quando aplicadas com  $As^V$  Si causou aumento de todas as formas de glutathiona, a não ser de GSSG após 72 h. Enquanto que SiNP não causou muitas diferenças comparado ao tratamento com somente  $As^V$ , mas causou uma redução significativa de GSSG após 72 h. Comparadas entre si, Si causou aumentos e SiNP reduções das três formas de glutathiona com  $As^V$  nos dois períodos de exposição (Figura 15B, D e F).

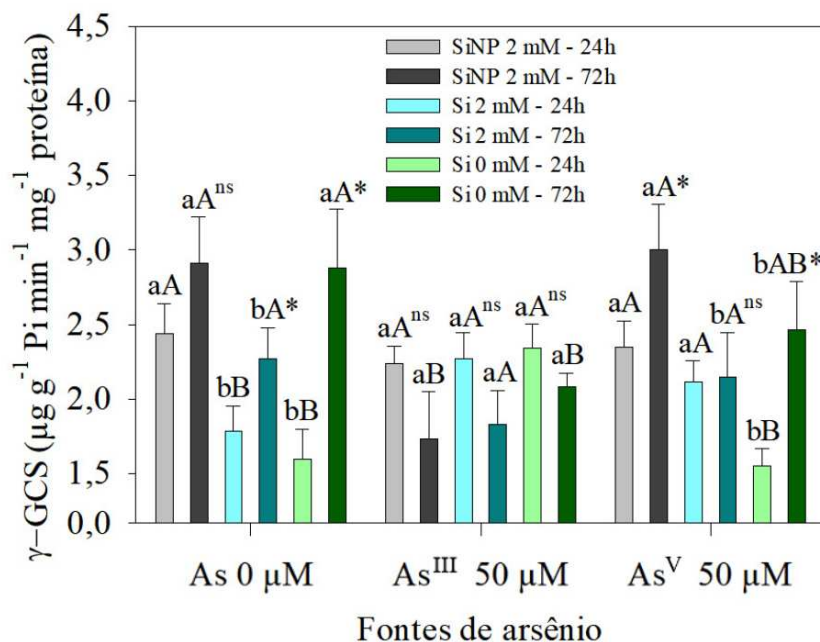
Os resultados para a relação GSH/GSSG mostram que as fontes de As afetaram de forma diferencial essa relação, enquanto nas folhas  $As^{III}$  causou uma diminuição após 72 h, nas raízes isso foi causado por  $As^V$ , ocorrendo, também, com 24 h de exposição. Quando aplicado com SiNP,  $As^{III}$  causou redução, nas folhas, após 24 h em relação ao controle, enquanto nas raízes ambos causaram reduções no mesmo período, mas com  $As^V$  houve aumento expressivo após 72 h. Quando aplicado com Si, nas folhas o  $As^V$  causou aumento da relação em ambos os períodos de exposição, enquanto  $As^{III}$  não diferiu do controle. Já nas raízes esse aumento causado por  $As^V$  só foi observado com 24 h, enquanto com  $As^{III}$  houve redução após 72 h (Figura 15G e H).

Entre fontes de silício, quando aplicadas com  $As^{III}$ , não houve diferença nas folhas, mas nas raízes ambas as fontes causaram redução em relação ao  $As^{III}$  sem silício com 24 h de exposição. Quando aplicadas com  $As^V$ , Si causou aumento da relação, nas folhas, do  $As^V$  sem silício após 24 h e do SiNP nos dois períodos de exposição, enquanto SiNP reduziu após 72 h em comparação a  $As^V$  sozinho. Nas raízes, Si continuou causando aumento da relação com 24 h de exposição, mas tanto Si quanto SiNP aumentaram a relação após 72 h, sendo este aumento maior para SiNP nesse período (Figura 15G e H).

### **3.6.6. Atividade da sintetase da $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ -GCS)**

A atividade da enzima apresentou significativo acréscimo em resposta ao  $As^{III}$ , em 24 h de exposição, sendo que esse perfil de resposta não se manteve com o prolongamento do tempo de exposição, com a atividade caindo com 72 h de exposição. Para o  $As^V$  não houve diferença do controle em nenhum dos períodos de exposição, mas a atividade foi significativamente maior

após 72 h de exposição nesse tratamento. Quando aplicado com SiNP,  $As^{III}$  causou redução da atividade no período de 72 h de exposição. Com Si, tanto  $As^{III}$  quanto  $As^V$  causaram aumento da atividade com 24 h de exposição, sem diferenças após 72 h de exposição (Figura 16).

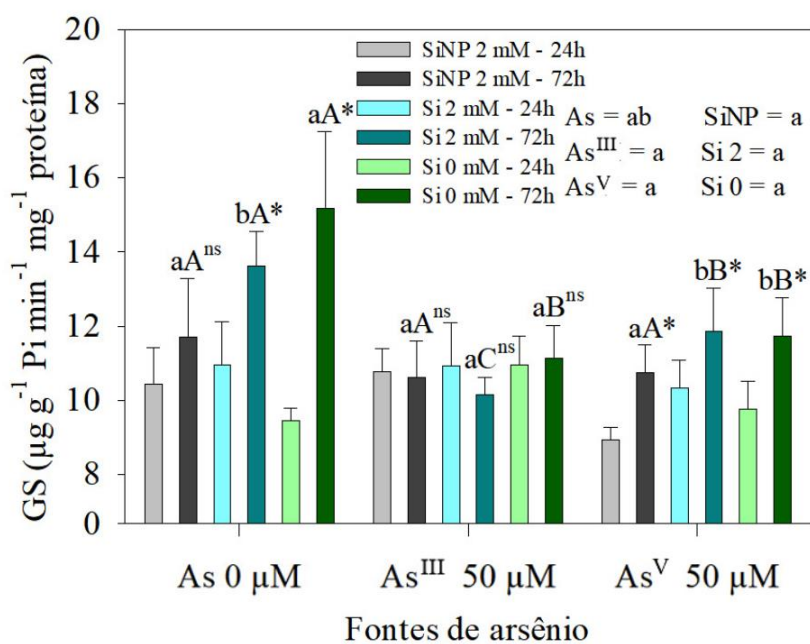


**Figura 16.** Atividade da sintetase da  $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ -GCS) em folhas de *Lactuca sativa* L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos: controle,  $As^{III}$ ,  $As^V$ , Si, Si +  $As^{III}$ , Si +  $As^V$ , SiNP, SiNP +  $As^{III}$ , SiNP +  $As^V$ . Médias seguidas por letra 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 a variância entre os períodos de exposição aos tratamentos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Quando as fontes de silício foram aplicadas com  $As^{III}$  não ocorreu nenhuma diferença significativas nem entre Si e SiNP, nem destas com o tratamento sem silício (somente  $As^{III}$ ). Assim como o período de exposição não causou nenhuma diferença na atividade da enzima em nenhum destes tratamentos. Com  $As^V$  tanto Si quanto SiNP causaram aumento da atividade após 24 h de exposição, mas após 72 h isso só ocorreu para SiNP (Figura 16).

### 3.6.7. Atividade da sintetase da glutatona (GS)

No período inicial de exposição aos tratamentos, a enzima GS não apresentou diferenças de atividade nas plantas expostas ao As e ao silício, independente das formas químicas utilizadas (Figura 17).



**Figura 17.** Atividade da sintetase da glutatona (GS) em folhas de *Lactuca sativa* L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos: controle, As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, Si, Si + As<sup>III</sup>, Si + As<sup>V</sup>, SiNP, SiNP + As<sup>III</sup>, SiNP + As<sup>V</sup>. 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 a variância entre os períodos de exposição aos tratamentos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

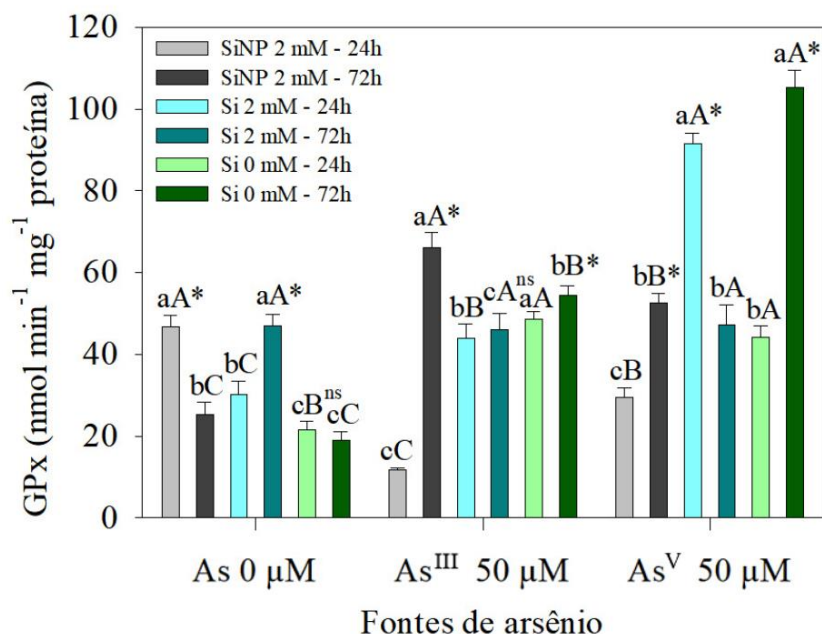
Com 72 h de exposição, As<sup>III</sup> e As<sup>V</sup> causaram redução da atividade na mesma intensidade. Quando aplicados com Si e SiNP, só ocorreram diferenças entre as fontes de As com Si, com ambas as fontes de As reduzindo a atividade, mas As<sup>III</sup> de forma mais significativa. Entre as fontes de silício, somente quando SiNP foi aplicado com As<sup>V</sup> que houve redução da atividade, não havendo diferença nos demais tratamentos e nem quando as fontes de silício foram aplicadas com As<sup>III</sup>. Interessante notar que a aplicação tanto de Si, mesmo na ausência de As, causou redução na atividade dessa enzima (Figura 17).

Quanto ao período de exposição, nenhum dos tratamentos com As<sup>III</sup>, independe da presença de silício, diferiu. Entretanto, em relação ao As<sup>V</sup>, todos os tratamentos diferem. Observa-se que todos os tratamentos que diferiram apresentaram atividades de GS maiores após 72 h de exposição (Figura 17).

### 3.6.8. Atividade da peroxidase da glutatona (GPx)

A GPx faz parte do sistema antioxidante enzimático das plantas e, assim como a APx, atua na eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Madhu et al., 2022). Assim como na APx, a atividade da GPx nas folhas aumentou, nos dois períodos de exposição, quando as plantas foram expostas a As<sup>III</sup> e As<sup>V</sup>, sendo, com 72 h, um aumento maior causado por As<sup>V</sup>. Quando as fontes de As foram

aplicadas com SiNP, houve redução e aumento da atividade com 24 e 72 h respectivamente, sendo que com  $As^{III}$  esses efeitos sempre foram mais significativos do que com  $As^V$  e no tratamento com somente SiNP. Com Si houve aumento com 24 h, sendo este maior para  $As^V$ , mas isso não foi observado com o prolongamento do período de exposição (Figura 18).



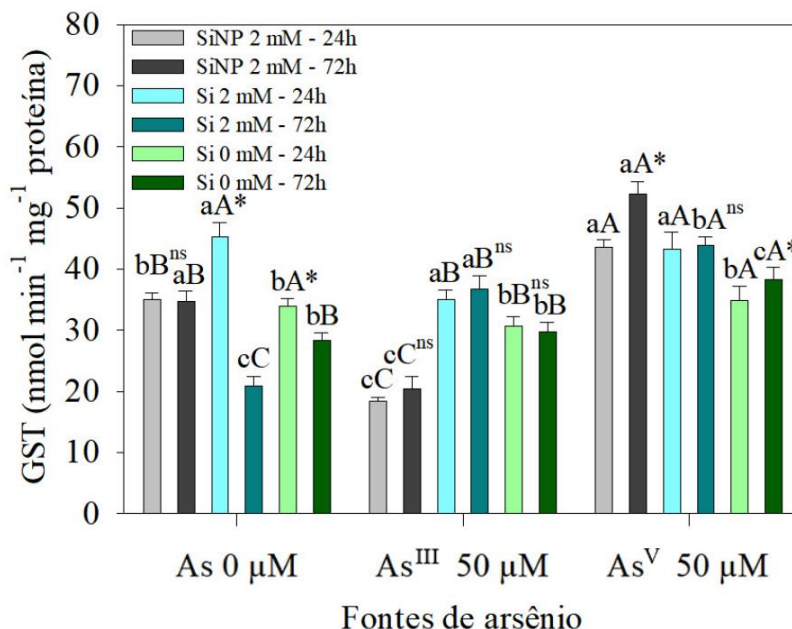
**Figura 18.** Atividade da peroxidase da glutatona (GPx) em folhas de *Lactuca sativa* L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos: controle,  $As^{III}$ ,  $As^V$ , Si, Si +  $As^{III}$ , Si +  $As^V$ , SiNP, SiNP +  $As^{III}$ , SiNP +  $As^V$ . Médias seguidas por letra maiúscula igual não diferem 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 a variância entre os períodos de exposição aos tratamentos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Quando as fontes de silício foram aplicadas com  $As^{III}$ , ambas causaram redução da atividade com 24 h de exposição, sendo esta maior causada por SiNP, mas com 72 h isso só ocorreu com Si, tendo SiNP aumentado a atividade. Já quando aplicadas com  $As^V$ , SiNP causou redução em ambos os períodos de exposição em relação ao tratamento com somente  $As^V$ , enquanto Si causou aumento da atividade com 24 h e redução após 72 h de exposição. Diferenças entre Si e SiNP ocorreram apenas com 24 h de exposição, com Si aumentando a atividade da enzima (Figura 18).

### 3.6.9. Atividade da sulfotransferase da glutatona (GST)

A atividade da GST foi reduzida por  $As^{III}$  com 24 h não sofrendo alteração por  $As^V$ , sendo que, após 72 h,  $As^V$  causou aumento e a atividade desta não foi alterada por  $As^{III}$ . Além disso,  $As^V$  diferiu de  $As^{III}$  nos dois períodos de exposição com aumento da atividade, sendo este maior após 72 h de exposição. Quando As foi aplicado com SiNP houve redução com  $As^{III}$  e

aumento da atividade com  $\text{As}^{\text{V}}$  em ambos os períodos de exposição. Quando com Si houve uma redução com  $\text{As}^{\text{III}}$  com 24 h, mas um aumento após 72 h que também foi observado para  $\text{As}^{\text{V}}$  no mesmo período de exposição, sendo este maior que o aumento causado por  $\text{As}^{\text{III}}$  (Figura 19).



**Figura 19.** Atividade da sulfotransferase da glutatona (GST) em folhas de *Lactuca sativa* L. após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos: controle,  $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{As}^{\text{V}}$ , Si, Si +  $\text{As}^{\text{III}}$ , Si +  $\text{As}^{\text{V}}$ , SiNP, SiNP +  $\text{As}^{\text{III}}$ , SiNP +  $\text{As}^{\text{V}}$ . 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 a variância entre os períodos de exposição aos tratamentos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Quando as fontes de silício foram aplicadas com  $\text{As}^{\text{III}}$ , SiNP causou redução da atividade enquanto Si causou aumento em ambos os períodos de exposição em comparação a aplicação de  $\text{As}^{\text{III}}$  sem silício, sem haver diferença significativa entre o período de exposição nesses tratamentos. Com  $\text{As}^{\text{V}}$  ambas as fontes causaram aumentos na atividade nos dois períodos de exposição, porém com 72 h de exposição, esse aumento foi maior com SiNP do que com Si, tendo o aumento causado por SiNP sido incrementado pelo período de exposição enquanto o causado por Si não (Figura 19).

### 3.7. Análise de correlação

Para se ter uma melhor compreensão dos resultados, a análise de correlação realizada e dividida em grupos, sendo que a concentração de As e silício estava presente em todos eles em sua determinada parte da planta correspondente. Os seguintes grupos foram definidos: grupos A e B: folhas, com 24 e 72 h de exposição, respectivamente, com as seguintes análises: clorofila a, clorofila b, carotenoides, A, E,  $g_s$  e  $C_i$ ; grupos C e D (folhas), E e F (raízes), ambos com 24

e 72 h de exposição, respectivamente, com as análises de SOD, CAT, POX, MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; grupos G e H (folhas), I e J (raízes), ambos com 24 e 72 h de exposição, respectivamente, com resultados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e análises do metabolismo ascorbato-glutationa. Apesar disso, independente do grupo avaliado, As e Si apresentaram correlação negativa, porém em nenhum desses grupos essa correlação foi fortemente negativa (Figura 20).

Nos grupos A e B verifica-se que As tem elevada correlação negativa com A, g<sub>s</sub> e E, especialmente com 24 h de exposição. Já silício apresentou correlação positiva com esses parâmetros, mas não tão fortes quanto as negativas causadas pelo As. Além disso, A, g<sub>s</sub> e E, apresentaram forte correlação positiva entre si nos dois períodos de exposição avaliados. Ademais, os pigmentos também apresentaram forte correlação positiva entre si nos dois períodos de exposição (Figura 20A e B).

Nos grupos C e D, As apresentou forte correlação positiva com a maioria das análises após 24 h de exposição, mas essa correlação diminuiu após 72 h, à exceção da CAT. Já silício apresentou correlações negativas com a maioria das análises, à exceção da CAT, além disso apresentou forte correlação negativa com POX nos dois períodos de exposição. De maneira interessante a SOD apresentou correlação positiva maior com a POX do que com a CAT, para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em ambos os períodos de exposição. MDA apresentou forte correlação positiva com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a POX, especialmente após 72 h de exposição (Figura 20C e D).

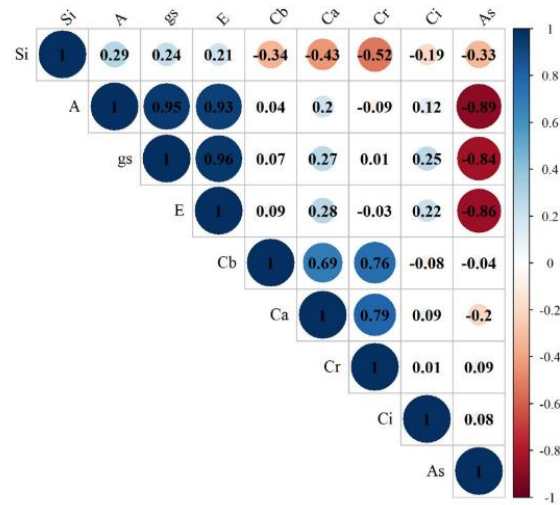
Nos grupos E e F, silício teve correlação negativa, contrariamente ao As, que apresentou correlação positiva, à exceção com silício. De maneira geral, houve fortes correlações positivas entre MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SOD, CAT e POX, especialmente após 72 h, pelo fato de que o sistema antioxidante está intimamente ligado a EROs (Figura 20E e F).

Houve uma forte correlação positiva do As com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando este foi avaliado na correlação com metabolismo ascorbato-glutationa, nos dois períodos de exposição. Já para o silício houve correlação negativa, mas não tão forte, que aumentou após 72 h de exposição. O As também mostrou forte correlação positiva com APx, que aumentou após 72 h de exposição. Enquanto que para o silício foi uma correlação negativa que diminuiu após 72 h. Ainda nesses grupos o As ainda teve forte correlação positiva com a AO após 24 h que caiu após 72 h AO e positiva com DHA nos dois períodos de exposição, além de GPx, GR, GST, DHAR e ascorbato total após 72 h, enquanto apresentou correlação negativa com GSH após 24 h de exposição. Já silício teve forte correlação positiva somente com MDHAR após 24 h, mas diminuiu após 72 h e forte correlação negativa com ascorbato total, e moderadamente negativas com DHA e DHAR após 24 h e com fortemente negativas com glutaciona total e GSH após 72 h. Além disso outras correlações que se destacam são as negativas entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSH, DHA com MDHAR e AsA e

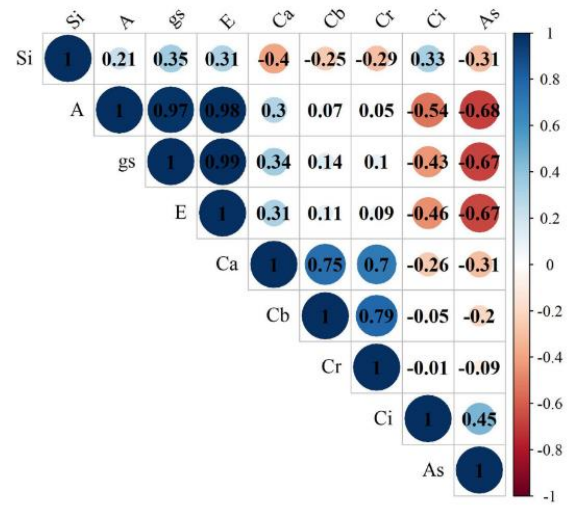
GR com glutathione total, GSH e GSSG e as positivas: glutathione total com GSH e GSSG e as relacionadas ao metabolismo do ascorbato quase que como um todo após 24 h de exposição. Já com 72 h as positivas entre GSH e glutathione total, GPx com APx e  $H_2O_2$  e muito das análises do metabolismo do ascorbato (Figura 20G e H).

Nos grupos I e J, As apresentou correlação fortemente positiva com APx,  $H_2O_2$  e DHA e nenhuma correlação fortemente negativa após 24 h, enquanto silício apresentou correlação positiva MDHAR e negativa com ascorbato total no mesmo período. Após 72 h As apresentou forte correlação positiva com  $H_2O_2$  e não tão fortemente positiva, mas ainda sim positiva com GR, DHAR, DHA e APx enquanto silício não apresentou correlações nem positivas nem negativas tão significativas nesse período, apenas com DHA. Outras correlações significativas foram as positivas entre glutathione total e GSH e ascorbato total e DHA com 24 h, e a negativa entre DHAR e DHA no mesmo período. Com 72 h as positivas entre ascorbato total e  $H_2O_2$  e MDHAR e GR e as negativas entre MDHAR e AsA (Figura 20I e J).

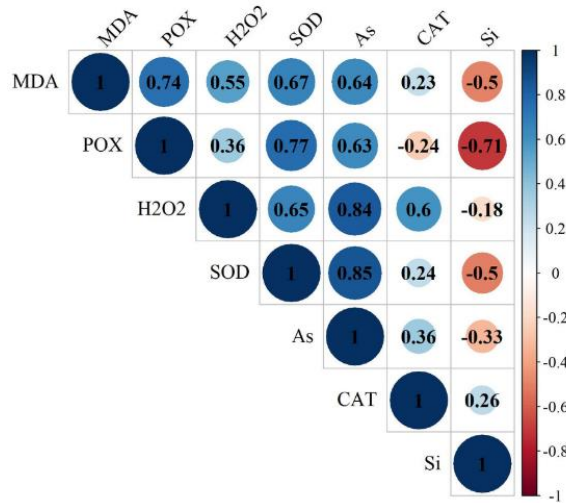
A



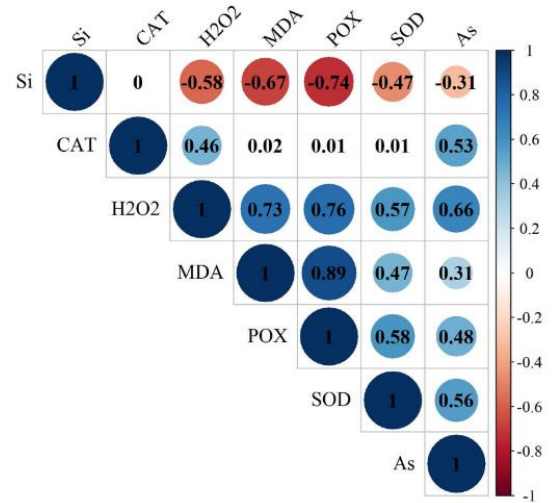
B



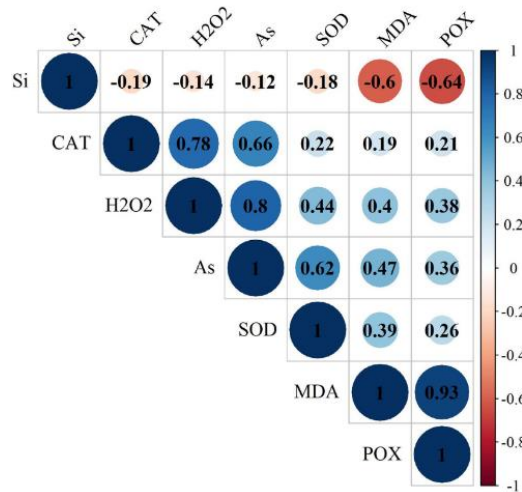
C



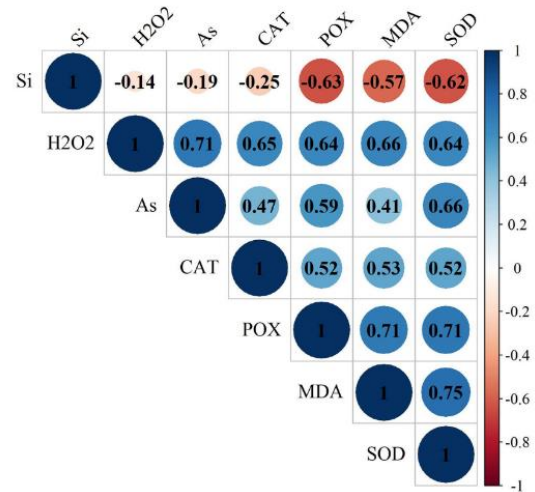
D



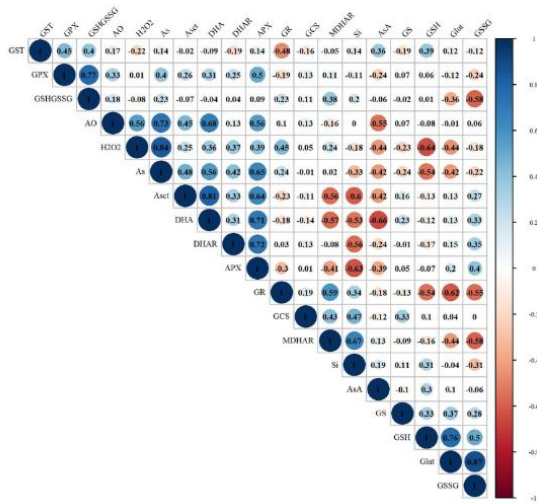
E



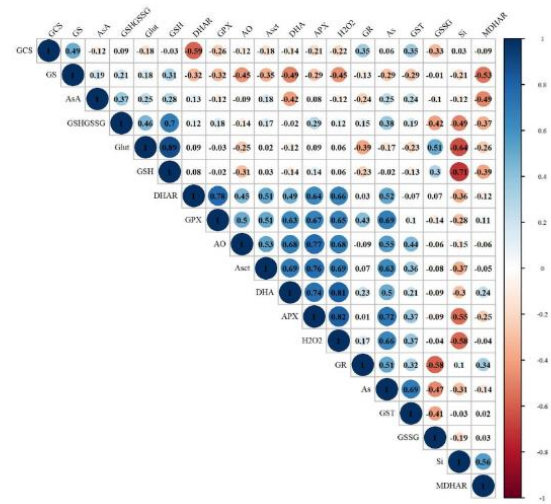
F



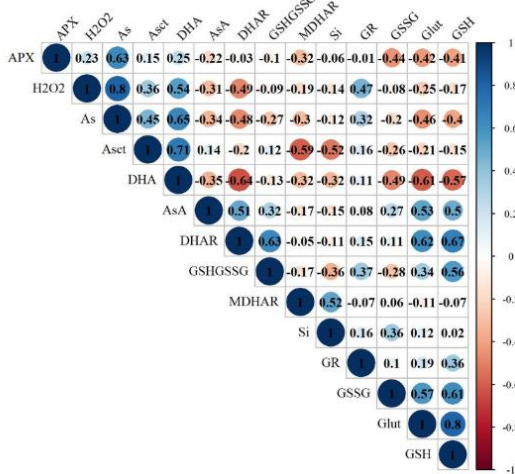
G



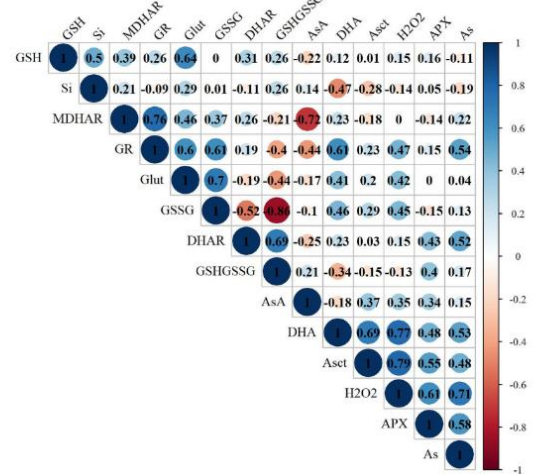
H



I



J



**Figura 20.** Matriz de correlação de Pearson em folhas e raízes de plantas de *Lactuca sativa* L. em diferentes grupos de análises, após 24 e 72 h de exposição aos tratamentos. A escala de valores no coeficiente de correlação varia entre +1 (indica uma relação positiva próxima) e -1 (indica uma relação negativa próxima). A relação entre duas variáveis se torna mais fraca quando o valor do coeficiente se aproxima de 0.

#### 4. DISCUSSÃO

A absorção, translocação e toxicidade do As em plantas é dependente de inúmeros fatores. E, apesar do gradiente de concentração ser a força motriz para a absorção de As, o estado de oxidação, o pH, a carga e a permeabilidade da membrana plasmática influenciam esses parâmetros (Bali e Sidhu, 2021; Abbas et al., 2018). Além disso, estes são afetados, também, pelo período de exposição, conforme observado para as duas formas de As ( $As^{III}$  e  $As^V$ ), em acordo com resultados observados em arroz (Sanglard et al., 2014), *Artemisia annua* (Kumari et al., 2017) e alface (Silveira et al., 2015).

Como  $As^V$  compete pelos mesmos transportadores com fósforo (PHTs) para entrada na célula, em condições de menor disponibilidade de fósforo, pode ocorrer aumento na absorção de  $As^V$  (Abbas et al., 2018; Khalid et al., 2017). Isso pode ter ocorrido nesse estudo, visto que a solução de Clark possui concentrações menores de fósforo (P) do que a maioria de outras soluções nutritivas, o que resultaria em maiores teores de  $As^V$  nas raízes, em comparação com os tratamentos com  $As^{III}$  (Gusman et al. 2013a). Além disso, os transportadores PHTs são unidirecionais, enquanto que os transportadores de  $As^{III}$ , proteínas intrínsecas semelhantes a nodulina-26 (NIPs), são bidirecionais (Abbas et al., 2018) e podem ter causado o transporte de  $As^{III}$  da raiz para a solução nutritiva, diminuindo sua concentração.

As maiores concentrações de As nas folhas das plantas tratadas com  $As^V$  pode ter ocorrido devido à elevada concentração deste nas raízes, sendo que os processos de redução e complexação não foram eficientes o suficiente a ponto de limitar o transporte para a parte aérea, o que foi evidenciado pelo FT após 72h, em que os valores para  $As^V$  foram maiores do que para  $As^{III}$  (Greger et al. 2015). Já uma menor concentração de  $As^{III}$  provavelmente ocorreu devido a uma menor concentração deste nas raízes, com a contribuição de uma baixa complexação, que fez com que parte deste ainda fosse transportado para a parte aérea, porém, em menor concentração do que o tratamento com  $As^V$ .

A ação do silício reduzindo as concentrações de As nas plantas envolve mecanismos diferentes para o  $As^V$  e o  $As^{III}$ . Para  $As^V$ , o silício pode ter estimulado a produção de exsudados que reduziram a absorção (Adrees et al., 2015; Bhat et al., 2019), conforme observado em arroz, tomate e alface (Guo et al., 2005; Greger et al., 2015; Marmioli et al., 2014). Além disso, Hu et al. (2018) relataram que o silício expressou negativamente a expressão do gene transportador de fósforo, e, visto que  $As^V$  compete pelo mesmo transportador, isso pode ter contribuído para uma menor absorção do mesmo. Para  $As^{III}$ , a redução na concentração está, provavelmente, competição pelos transportadores no processo de absorção, uma vez que o silício é absorvido por Lsi1, que é um NIP e, portanto, capaz de absorver  $As^{III}$  (Bali e Sidhu, 2021), conforme

demonstrado em arroz (Guo et al., 2009; Li et al., 2009; Zhao et al., 2009). Em alface, entretanto, estudos para a identificação deste transportador precisam ser realizados para corroborar essa justificativa.

Silício foi eficiente em reduzir a concentração de As nas folhas, o que representa um avanço do ponto de vista da segurança alimentar e da diminuição dos danos bioquímicos e fisiológicos nessas plantas. Além disso, SiNP foi tão eficiente quanto Si em diminuir a concentração de As nas raízes e nas folhas, o que é um dado promissor do ponto de vista agrônomo e tecnológico.

Como evidenciado pelas imagens de MEV, a presença de  $As^{III}$  e  $As^V$  causou significativas alterações anatômicas, tanto em folhas como em raízes, especialmente com o aumento do período de exposição, conforme demonstrado em trabalhos com outras espécies (Pita-Barbosa et al., 2015; Singh et al., 2018; Sarath et al., 2022). Os efeitos benéficos da presença de silício se tornaram evidentes, o que está relacionado à redução da absorção, complexação e imobilização do As, aliado à deposição e acúmulo de silício na parede celular (Mostofa et al., 2021; Vaculík et al., 2020; Líška et al., 2017).

Além de afetar a biossíntese dos pigmentos fotossintéticos, o As causa desestruturação das membranas dos cloroplastos (Abbas et al., 2018; Saleem et al., 2022). De modo geral, o  $As^{III}$  tem efeitos tóxicos mais severos do que o  $As^V$  (Finnegan e Chen, 2012) e, em função disso, decréscimos nos parâmetros fotossintéticos ocorreram nas plantas tratadas com  $As^{III}$ , mesmo com menores concentrações deste na folha do que de  $As^V$ , mas não na degradação de clorofilas como observado para  $As^V$ , pois estas, talvez, sejam mais estas sejam menos sensíveis a concentrações menores de As, visto que em concentrações maiores nas folhas  $As^V$  as afetou, sendo estes resultados semelhantes aos relatados por Gusman et al. (2013a) em alface.

Em resposta à ação oxidativa do estresse causado por As, observou-se aumento na concentração de carotenoides, o que faz sentido visto que a biossíntese de antioxidantes é aumentada na presença do As devido este causar estresse oxidativo (Zulfiqar e Ashraf, 2021). na primeira fase de exposição ao poluente (24 h), mas não foi mantido com o prolongamento do período de tratamento. O incremento observado, entretanto, não foi suficiente evitar as alterações dos parâmetros fotossintéticos.

Os parâmetros de trocas gasosas foram significativamente alterados por As, provavelmente pela redução da absorção de água diminuindo, portanto, a condutância estomática, a taxa de assimilação líquida de carbono e a transpiração como efeitos indiretos dos danos anatômicos (Abbas et al., 2018; Bali e Sidhu, 2021). Os danos anatômicos nos permitem afirmar que a absorção de água foi comprometida, e prolongada pelo tempo de exposição com

As<sup>III</sup>. Como houve o aumento em C<sub>i</sub> e a redução dos demais parâmetros, indica que houve alterações relacionadas à diminuição da atividade das enzimas do ciclo de Calvin-Benson, como a ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO), que prejudicou, portanto, a fixação do CO<sub>2</sub>. Isso foi ainda se torna ai mais confiável quando os dados de correlação são observados, já que o As teve uma correlação bastante negativa com A, g<sub>s</sub> e E, demonstrando que a presença deste afeta negativamente esses parâmetros, mas isso não foi observado para C<sub>i</sub>. Além disso, A, g<sub>s</sub> e E estão intimamente correlacionados, portanto danos em algum destes, provoca redução nos demais, enquanto que C<sub>i</sub> não está, como demonstrado na correlação. De Andrade et al. (2015) observou um aumento no C<sub>i</sub> pela exposição de As<sup>V</sup> e As<sup>III</sup> em arroz, bem como Gusman et al. (2013a) também observou um aumento de C<sub>i</sub> à medida que concentrações de As<sup>III</sup> e As<sup>V</sup> aumentavam em plantas de alface.

A utilização do Si e SiNP e, especialmente Si, sem As, aumentaram, de forma geral, A, g<sub>s</sub> e E, conforme relatos de benefícios aos processos fotossintéticos, além de mitigar danos causados por agentes estressores, bióticos e abióticos, com aqueles causados por metais pesados e As (Sanglard et al., 2014; Vaculík et al., 2020). Estes mecanismos envolvem redução na absorção dos poluentes, bem como a ativação do sistema de defesa da planta (Adrees et al., 2015; Bhat et al., 2019; Siddiqui et al., 2020). Em presença de As, observa-se que o silício foi capaz de mitigar parte dos danos tóxicos desse poluente, especialmente em relação aos danos estruturais, mas não foi capaz de mitigar os danos nos parâmetros fotossintéticos.

A absorção e transporte do silício pode envolver a participação de, pelo menos, quatro transportadores: Lsi1 (ou NIP2;1), Lsi2, Lsi3 e Lsi6 (ou NIP2;2) (Pontigo et al., 2015), identificados, inicialmente, em arroz (Ma et al., 2006; Ma et al., 2007; Yamaji et al., 2008; Yamaji et al., 2015). Homólogos desses transportadores já foram identificados em outras monocotiledôneas, como o milho (Mitani et al., 2009), cevada (Chiba et al., 2009) e trigo (Montpetit et al., 2012), mas, em dicotiledôneas, apenas os genes de Lsi1 e Lsi2 em plantas de abóbora e batata (Mitani et al., 2011; Mitani-Ueno et al., 2011; Vulavala et al., 2016). O Lsi6, homólogo a Lsi1, faz a exportação do xilema para distribuição na parte aérea (Yamaji et al., 2008) e, até agora não foi identificado genes de Lsi6 em nenhuma dicotiledônea. Sendo que em alface, nenhum transportador de silício foi identificado até o presente momento.

Portanto, apesar melhoria nas alterações anatômicas observadas pela aplicação do silício, a não reversão dos danos causados pelo As, em A, g<sub>s</sub> e E pode ter sido causada pela reduzida concentração e translocação nas e para as folhas que ocorreu na presença de As observada nesse trabalho. Porém, foi possível observar que o silício, na forma iônica ou de nanopartículas, causou alterações nos pigmentos na presença das fontes de As, o que pode

significar que mudanças nos parâmetros fotossintéticos poderiam ocorrer se as plantas fossem expostas por mais tempo aos tratamentos. Os dados de correlação corroboram com isso, visto que a correlação do silício com A,  $g_s$  e E foi positiva aumentando com o período de exposição, portanto, como dito, maiores períodos de exposição poderiam levar a reversão dos danos causados por As nesses parâmetros.

O malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica de membranas, associado ao acúmulo de  $H_2O_2$ , são indicadores de danos nas membranas de plantas causado pelo estresse oxidativo gerado por EROs, considerado o dano mais perigoso do As (Abbas et al., 2018; Morales e Munné-Bosh, 2019; Jung et al., 2019). Portanto aumentos no conteúdo de MDA e no conteúdo de  $H_2O_2$  são muito utilizados para determinar a extensão do estresse oxidativo em plantas (Kaya et al., 2020). Nas plantas expostas ao As observamos, que ambas as formas químicas causam aumentos significativos nesses parâmetros, mas que  $As^{III}$  causa aumento maiores nesses indicadores sendo o agente mais tóxico, conforme relatado por Gusman et al. (2013b). 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 por sua alta concentração (como os da GSH e fitoquelatinas) e posterior transporte para o vacúolo, o que resultou em estresse oxidativo.

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 et al., 2020), milho (Tripathi et al., 2016), tomate (Kaya e Ashraf, 2022) mostarda (Ahmad et al., 2021), tendo em todas estas a aplicação de silício iônico e/ou nanoparticulado diminuindo o estresse oxidativo na presença de As.

Nossos resultados corroboram com estes, especialmente na diminuição da peroxidação lipídica na presença de SiNP. Em algumas situações, observamos que a aplicação do silício isoladamente causou aumento na concentração de  $H_2O_2$ , contudo, isso não foi refletido em danos às membranas. Provavelmente, esse aumento está relacionado à indução de cascata de sinalização (Mostofa et al., 2021).

Além do  $H_2O_2$ , o aumento na geração de  $O_2^{\cdot-}$  é resultante do desequilíbrio redox na célula (Bakhat et al. 2017; Dumont e Rivoal, 2019). Na eliminação desses componentes oxidantes participam diversas enzimas e substâncias antioxidativas (Hasanuzzaman et al., 2020). Na sequência enzimática, a SOD causa a dismutação de  $O_2^{\cdot-}$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$ , que pode ser, então, convertido em água pela CAT e POX, que também são importantes antioxidantes enzimáticos que agem contra o estresse oxidativo (Hasanuzzaman et al., 2020). Portanto, incrementos nas atividades dessas enzimas em plantas expostas ao As são indicativos da

ativação do sistema de proteção celular, conforme observado em várias espécies vegetais (Sil e Biswas, 2020; Ahmad et al., 2021)

Nas plantas de alface a atividade da SOD foi dependente da forma de As e do tempo de exposição, com os maiores valores no maior período de exposição, de modo geral. Isso indica crescente e contínua geração de  $O_2^{\cdot-}$ . Resultante dessa ação, observou-se aumento da concentração de  $H_2O_2$  e, em consequência, incrementos nas atividades da CAT e da POX, confirmando a estreita sintonia dessas enzimas na regulação redox nas plantas (Rajput et al. 2021), que também foi observado em outras culturas agrícolas (Gusman et al., 2016b; Ahmad et al., 2021; González-Moscoso et al., 2022)

Apesar do aumento nas atividades das enzimas SOD, CAT e POX, estes não foram suficientes para diminuir o estresse oxidativo e posterior dano em membranas causadas por As, especialmente por  $As^{III}$ . A presença do As junto com silício aumentou, de forma geral, as respostas das enzimas antioxidantes, as quais se mostraram dependentes da forma de silício empregada bem como da forma química do As, sendo, em grande parte, esse aumento menor do que a aplicação do As sem fontes de silício o que ocorreu devido a menor absorção deste causada por essas fontes, causando menor estresse oxidativo, e, portanto, um requerimento menor da atuação destas enzimas. A exposição prévia das plantas ao silício, seguindo metodologia utilizada no presente estudo, ativa os mecanismos antioxidantes de forma mais eficiente, conforme relatado por Vaculík et al. (2020). Dessa forma, ficou claro a participação do silício na mitigação do estresse por As por estímulo dessas enzimas, que diminuiu o estresse oxidativo causado pelo As nos tratamentos com silício (Tripathi et al., 2013; Bhat et al., 2019; Maghsoudi et al., 2020; Kaya e Ashraf, 2022).

A superprodução de EROs e consequente estresse e dano oxidativo causada por diversos tipos de estresse ativa a maquinária antioxidante, para evitar/combater estes, visto que essa maquinária está intimamente relacionada ao metabolismo oxidativo em plantas (Xie et al., 2019). Os resultados de correlação deste trabalho corroboram amplamente com isso, visto que houve amplas correlações positivas entre  $H_2O_2$  e MDA, e destes com enzimas antioxidantes, ou seja, o aumento dessa EROs e consequente peroxidação lipídica causou a ativação da maquinaria antioxidante para tentar minimizar esses danos, em ambas as partes da planta avaliada e em ambos os períodos de exposição. Para além disso confirmam o potencial oxidativo que o As possui e o papel do silício na mitigação desses danos.

Além dessas enzimas, a via ascorbato-glutationa se constitui um importante mecanismo de defesa antioxidante em plantas, sendo a principal via de destoxificação do  $H_2O_2$  (Hasanuzzaman et al., 2019) essa via possui é constituída de enzimas que participam da

degradação e reciclagem do ascorbato e da glutathione, os quais são considerados os principais antioxidantes solúveis nas células vegetais (Foyer, 2001; Žur et al., 2021).

O ascorbato é o antioxidante mais abundante nas plantas (até 20 mM nos cloroplastos) e está presente na maioria, se não em todas as organelas celulares, sendo a molécula mais conhecida na eliminação de  $H_2O_2$  (Szarka et al., 2012). O pool de ascorbato nas células depende da sua biossíntese, realizada, principalmente, pela via Smirnoff-Wheeler, reciclagem e degradação (Venkatesh e Park, 2014; Szarka et al., 2012). As concentrações de ascorbato reduzido (AsA), oxidado (DHA) e total (T-AsA) foram significativamente alteradas pela exposição das plantas ao As, nos dois períodos de exposição, com redução na concentração de AsA e correspondente aumento na concentração de DHA. A concentração de T-AsA foi aumentada, e isso ocorreu, provavelmente, na tentativa de diminuir os danos causados por  $H_2O_2$  (Broad et al., 2020).

Finnegan e Chen (2012) relataram que a concentração de ascorbato total (ou alguma de suas formas) costuma aumentar durante o estresse por As, isso corrobora nossos resultados e o mesmo foi observado em arroz exposto tanto a  $As^{III}$  quanto a  $As^V$  (Das et al., 2018; Jung et al., 2019), milho (Tripathi et al., 2016), ervilha (Alsahli et al., 2020), tomate (Kaya e Ashraf, 2022) e trigo (Alamri et al., 2022). Nestes trabalhos, aqueles que tiveram a aplicação de silício iônico ou nanoparticulado junto do As, observaram que houve remediações da toxicidade causada pelo As. Isso ocorreu por diferentes mecanismos, como maiores níveis de AsA do que de DHA, por aumento de atividades de enzimas de reciclagem do ascorbato ou por causas indiretas como menor concentração de  $H_2O_2$  ou estímulo das atividades de peroxidases. A presença das fontes de As causaram aumento na concentração de T-AsA e DHA mesmo na presença de silício, porém o silício causou reduções significativas nesses compostos quando aplicados com as diferentes fontes de As, de forma geral. Isso está relacionado a um menor estresse, que pode ter sido causado pelos mecanismos visto acima.

A aplicação de As sem fonte de silício gerou um aumento de DHA, na presença de  $As^{III}$ , nas raízes, durante o prolongamento do período de exposição o que demonstra que a degradação deste foi continuada durante o estresse por esse agente sendo comprovada pelas atividades da peroxidase do ascorbato (APx) e da oxidase do ascorbato (AO) que tiveram aumento com a exposição das plantas ao  $As^{III}$ , porém, não resultaram em menores concentrações de  $H_2O_2$  e danos às membranas, como visto, especialmente para esta forma de As. Mas  $As^V$  também causou uma alta atividade destas enzimas e alta concentração de DHA, que também não resultaram em menores concentrações de  $H_2O_2$  como indicando a excessiva geração de EROs, conforme relatado por Gusman et al. (2013b) e Silveira et al. (2015). Porém para  $As^V$

isso ocorreu sem que o pool de ascorbato fosse aumentado nas raízes, o pode estar relacionado a uma interferência maior na reciclagem do DHA a AsA catalisado pela DHAR e/ou redução da enzima de biossíntese de ascorbato, enquanto que  $As^{III}$  causou aumento de T-AsA, sendo, portanto, o efeito do  $As^{III}$  mais ligado a duração do estresse e  $As^V$  a interferências na biossíntese ou reciclagem.

O efeito do silício, na forma de SiNP, resultou em redução na atividade dessas enzimas nos tratamentos com  $As^{III}$ , enquanto que com  $As^V$ , para APx, isso ocorreu somente nas folhas, causando aumento nas raízes. Como uma maior quantidade  $As^V$  do que de  $As^{III}$  foi observado nessa parte da planta, quando SiNP foi aplicado com  $As^V$ , esse pode ter sido a causa desse aumento, para reduzir a concentração de  $H_2O_2$ . Os efeitos causados pelo Si, de maneira geral, foram iguais ao do SiNP e a justificativa também se aplica, sendo resultados semelhantes observados em arroz e milho (Tripathi et al. 2013; 2016).

A degradação enzimática do ascorbato causado pela AO ficou muitos anos o papel da desconhecido visto que esta não participa da eliminação direta de EROs, pois seu acceptor de elétrons proveniente do ascorbato é o  $O_2$ , o que seria uma desvantagem devido ao consumo ascorbato sem nenhuma vantagem óbvia (De Tullio et al., 2013; Akram et al., 2017). Hoje já está claro seu papel em vários processos do desenvolvimento, como divisão e expansão celular e, por estar localizada na parede celular atua na percepção e sinalização de estresses, regulação do status redox do apoplasto (Akram et al., 2017; Foyer et al., 2020). Já a APx, como uma peroxidase, exerce papel importante na eliminação do excesso de  $H_2O_2$  utilizando duas moléculas de AsA para reduzir  $H_2O_2$  a água (Smirnoff, 2018; Asthir et al., 2020). Além disso a APx possui uma afinidade pelo  $H_2O_2$  muito alta, pelo menos 100 vezes maior que a da CAT (Anjum et al., 2014). A correlação vem, mais uma vez, confirmar o papel mitigador do silício e oxidativo do As nessas enzimas.

Apesar de AO não fazer parte do ciclo ascorbato-glutationa pois não está diretamente ligada a remoção de  $H_2O_2$ , a APx faz, e além dessa, outras três enzimas: MDHAR, DHAR e GR utilizando AsA e GSH para remoção eficiente do excesso de  $H_2O_2$ , sendo tanto AsA quanto GSH reciclados nesse ciclo (Hasanuzzaman et al., 2019). O primeiro produto formado pela oxidação de AsA é o MDHA, que pode ser reduzida a AsA pela ação da MDHAR utilizando NAD(P)H como doador de elétrons, ou espontaneamente duas moléculas de MDHA podem formar AsA e DHA que é instável em pH fisiológico e facilmente degradável, mas pode ser reduzido a AsA pela ação da DHAR utilizando GSH como substrato redutor e gerando GSSG que é então convertida a GSH pela ação da GR utilizando NADPH como doador de elétrons (Hasanuzzaman et al., 2019; Noctor et al. 2018; Asthir et al., 2020).

Os maiores incrementos de MDHAR e DHAR com As tiveram correspondente aumento das concentrações de T-AsA, especialmente nas folhas. Porém, apesar disso, as atividades das enzimas não foram suficientes em reduzir o estresse oxidativo, uma vez que as concentrações de AsA e DHA foram menores e maiores do que o controle, respectivamente. E  $As^V$  causou aumento nestas em comparação ao controle, portanto, este provavelmente afetou de forma mais significativa a enzima de biossíntese de ascorbato nas raízes. A aplicação de silício, no entanto, resultou em aumento das atividades dessas enzimas, mas foi dependente da forma de silício e de As, do órgão avaliado e do tempo de exposição. Portanto, nesse trabalho não é possível afirmar qual a extensão dos efeitos do Si e SiNP na reciclagem do ascorbato, mas é possível afirmar que promovem melhoria, visto que a concentração de T-AsA foi maior na aplicação de Si na presença das fontes de As, e SiNP, quando não causou aumento, não causou redução. Provavelmente isso tenha ocorrido pelo estímulo a biossíntese, já que a proporção de DHA ainda foi grande na co-aplicação de silício e As. A aplicação de silício iônico junto com As em plantas de arroz, tomate e milho, aumentaram as atividades dessas enzimas e isso foi relacionado ao estímulo para diminuir o estresse oxidativo (Tripathi et al., 2016; Khan e Gupta, 2018; Kaya e Ashraf, 2022).

A GR não participa diretamente da reciclagem do ascorbato, mas é muito importante no ciclo ascorbato-glutationa pois regenera GSH utilizada nessa reciclagem (Hasanuzzaman et al., 2019). Sua atividade foi diminuída por  $As^{III}$  nas folhas, mas aumentada nas raízes, que foi significativamente maior com 72 h, o que provavelmente ocorreu devido a um requerimento de GSH para complexação do  $As^{III}$  nessa parte da planta que teve a concentração aumentada de  $As^{III}$  após 72 h. Enquanto que com  $As^V$  foi diminuída nas raízes após 24h, mas aumentada nas folhas e raízes após 72 h, nesse caso isso ocorreu foi a não redução completa de  $As^{III}$  a  $As^V$  mesmo com 24 h, perdendo mais eficiência com o prolongamento dos tratamentos, visto que a concentração de  $As^V$  foi alta nas folhas mesmo com 24 h e aumentou após 72 h, sendo, então, provavelmente, requerido uma concentração de glutathione maior nessa parte da planta nesse período e nas raízes, portanto, após 72 h. A co-aplicação de SiNP + As causou aumentos na atividade dessa enquanto que Si + As isso foi mais proeminente com  $As^V$ . Entre as fontes de silício, de maneira geral, o Si causa reduções mais significativas que SiNP na presença de As, portanto, Si provoca uma mitigação melhor do estresse, visto que há, provavelmente, uma necessidade menor de uso da glutathione quando Si é empregado com As, causando aumentos menores do que As sem silício. Resultados semelhantes a esse foram observados em arroz com  $As^{III}$  e milho com  $As^V$  (Kiany et al., 2022; Tripathi et al., 2016).

A glutationa é o principal tiol de baixo peso molecular na maioria das células estando em concentrações na faixa milimolar em células vegetais (Noctor et al., 2012). Essa molécula é um tripeptídeo formado pela ligação de glutamato, cisteína e glicina ( $\gamma$ -glu-cys-gly) e além de ser um poderoso antioxidante participa de outros processos do desenvolvimento vegetal (Das e Roychoudhury, 2014; Asthir et al., 2020). É uma molécula de suma importância quando se trata do estresse por metais pesados, especialmente As, pois após a redução de  $As^V$  a  $As^{III}$  nas raízes, que é o primeiro passo da principal via de destoxicação do As, realizado enzimaticamente, a GSH pode formar complexos com  $As^{III}$  por possuir o grupo tiol e, também, é precursora das fitoquelatinas que são moléculas ricas em tióis e portanto capazes de complexar  $As^{III}$  sendo, posteriormente, esses complexos transportados para o vacúolo reduzindo a toxicidade do As (Finnegan e Chen, 2012; Mishra et al., 2019).

Sob condições não estressantes a concentração de GSH é de até 90% enquanto a de GSSG é de até 10%, mas sob estresse, como por As, essas concentrações podem mudar significativamente (Zechmann, 2020). Nesse estudo o As provocou alterações nessas proporções. Os aumentos causados por  $As^{III}$ , nas folhas, com 24 h, com posterior redução após 72 h pode estar relacionados a aclimação dessas plantas ao As, já que  $As^{III}$  foi encontrado em folhas, porém a concentração de  $As^{III}$  foi maior após 72 h, o que sugere que a concentração de glutationa nas raízes não foi suficiente para causar uma complexação total do  $As^{III}$  sendo a concentração deste, então, aumentado nas folhas. Além disso, uma realocação de energia para biossíntese para as raízes pode ter ocorrido após 72 h, visto que a concentração de todas as formas de glutationa aumentou nesse período nas raízes e diminuiu nas folhas na presença de  $As^{III}$ , provavelmente na tentativa de diminuir sua toxicidade, visto a sua alta concentração nesse período nas raízes, e por fim evitar sua translocação nas folhas, o que não ocorreu.

Os resultados vistos confirmam ainda mais uma maior interação que glutationa tem por  $As^{III}$  visto que o  $As^V$  causou diminuição, de forma geral, da glutationa tanto em folhas quanto em raízes, porém, como visto, essa forma aumentou a atividade da GR, especialmente com 72 h, que resultariam em maiores concentrações de GSH não observadas, que pode ter sido causada pela mais altas concentrações deste do que de  $As^{III}$  em ambas as partes da planta, que causaram uma toxicidade tão grande que apesar do aumento na enzima isso resultou em outros comprometimentos no metabolismo que acabaram por limitar esse aumento esperado. Que pelo contrário, geraram redução, resultando em concentrações altas de GSSG através do estresse oxidativo.

Assim como para ascorbato a presença do silício com a aplicação de  $As^{III}$  e  $As^V$  alterou as concentrações das formas de glutationa, porém estas alterações foram dependentes da fonte

de silício, parte da planta, fonte de As e período de exposição. Mas de maneira geral o que se nota é que mesmo na presença de silício a concentração desses compostos ainda é alta. Mas alguns resultados que se tornam claros é que SiNP diminuiu as concentrações na presença de  $As^V$  do que de  $As^{III}$  e causou reduções mais significativas do que ele aplicado sem silício nas raízes e que os efeitos do Si foram mais dependentes do período de exposição, especialmente nas folhas quando aplicados com as fontes de As e que entre fontes de silício esta causou, de maneira geral, aumentos mais significativos que SiNP. Visto que ambas as fontes de silício causaram diminuições nas concentrações de  $As^{III}$  e  $As^V$  de maneira igual, reduções na concentração de glutathione eram esperadas pelo menor estresse, portanto, de maneira geral SiNP é mais eficiente para mitigar esse estresse pela glutathione.

No arroz a aplicação de  $As^{III}$  resultou em maiores concentrações de GSH enquanto a aplicação de SiNP sem  $As^{III}$  não resultou em aumentos significativos, enquanto que SiNP +  $As^{III}$  resultou em aumentos maiores do que  $As^{III}$  sozinho (Kiany et al., 2022). Com  $As^V$ , na mesma planta, foram observados aumentos de glutathione total, mas a aplicação de Si +  $As^V$  a concentração foi menor do que o tratamento com somente  $As^V$  (Das et al., 2018). No milho,  $As^V$  aumentou glutathione total e a aplicação de Si ou SiNP com  $As^V$  aumentou ainda mais essas concentrações (Tripathi et al., 2016). Portanto, como visto, são encontradas muitas variações com a aplicação de silício para diversas plantas e um estudo mais aprofundado disso se torna necessário.

Foyer e Noctor (1998; 2011) sugeriram que a relação GSH/GSSG funciona como um sensor redox envolvido na percepção de EROs. Sendo a GR capaz de reduzir GSSG, esta ajuda as plantas a manter uma alta relação GSH/GSSG, que em condições normais é de pelo menos 20:1, porém em condições estressantes, como a concentração de GSH e GSSG se alteram, essa relação também (Abbas et al., 2018; Szarka et al., 2012). De maneira geral,  $As^{III}$  causou diminuição nessa relação nas folhas e  $As^V$  nas raízes. Isso provavelmente ocorreu, pois, as folhas não conseguem detoxificar  $As^{III}$  tão bem quanto as raízes, enquanto que nas raízes a quantidade de  $As^V$  foi elevada ao ponto de que somente a redução a  $As^{III}$  e posterior complexação e transporte para o vacúolo não foi suficiente para deixar de causar uma redução nessa relação como ocorreu em tomate e milho (Tripathi et al., 2016; Kaya e Ashraf, 2022)

De maneira geral, as alterações causadas pela co-aplicação de silício com As foram mais afetadas com  $As^V$ , tanto em folhas quanto em raízes. Entre as fontes não houve diferenças muito contrastantes com  $As^{III}$ , mas com  $As^V$ , Si com 24h nas folhas e SiNP e Si após 72h nas raízes aumentaram significativamente a relação. Apesar dos resultados para as concentrações de glutathione não terem sido tão claros, de acordo com os resultados visto aqui fica evidente a

participação do silício na sinalização do estresse, especialmente de  $As^V$  visto que essa relação é relatada como um sensor redox em plantas. As não muitas diferenças observadas com  $As^{III}$  podem ser devido a outras causas como o silício estimulando a biossíntese de fitoquelatinas que interagem com  $As^{III}$ , sendo isso observado em tomate, trigo e arroz (Sil e Biwas, 2020; Kaya e Ashraf, 2022; Kiany et al., 2022).

A biossíntese de GSH é dependente de ATP e ocorre através de duas reações, na primeira ocorre uma ligação peptídica entre os aminoácidos glutamato e cisteína, que é catalisado pela  $\gamma$ -GCS, formando  $\gamma$ -glutamilcisteína, o precursor imediato da molécula de glutathione, após isso,  $\gamma$ -glutamilcisteína, é ligado a glicina, pela GS resultando na formação da GSH de fato (Hasanuzzaman et al., 2019). Os resultados da atividade de  $\gamma$ -GCS acompanharam as variações nas concentrações de GSH nas plantas expostas ao  $As^{III}$ , enquanto que nos tratamentos com  $As^V$  as menores concentrações de GSH nas folhas podem ter sido causados pela redução na próxima etapa de biossíntese catalisada pela GS, já que não houve diferenças nessa para esta fonte de As.

A co-aplicação de SiNP ou Si com  $As^{III}$  ou  $As^V$  não causou as mesmas consonâncias vistas para a aplicação das fontes de As sozinho, isso pode ter sido causado por flutuações na atividade dessa enzima, sendo refletidas somente depois em concentrações de GSH, como por exemplo a aplicação de Si com as fontes de As aumentaram com 24 h e isso só se refletiu em aumentos de GSH após 72 h nesses tratamentos. Portanto, maiores ou menores atividades desta pode ter resultado em alterações em GSH em outros períodos não avaliados, além de que a GS também foi afetada com redução da atividade quando As foi aplicado com Si o que também refletiu nas concentrações de GSH. Entre as fontes de silício aumentos na atividade dessa enzima só foram observados com  $As^V$ , tendo SiNP causado aumentos mais significativos, que é um ponto positivo visto que isso estimularia a produção de GSH, que foi observada com 24 h de exposição, e isso ocorreu provavelmente devido a uma maior concentração de SiNP do que de Si nas folhas na presença de  $As^V$ . A íntima relação que os componentes desse ciclo possuem entre si e com  $H_2O_2$  ficou claro pela análise de correlação. E, tendo o As sido correlacionado positivamente com o  $H_2O_2$  em todas estas correlações, era esperado que este afetasse os componentes desse ciclo.

Noctor et al. (2012), sugerem que reação catalisada pela  $\gamma$ -GCS é mais relevante para a biossíntese de GSH do que a reação catalisada para GS e isso parece se confirmar nesse trabalho visto que não houve nenhuma diferença significativa após 24h de exposição aos tratamentos entre nenhum destes, independente da presença ou não de As ou silício, para a atividade da GS. Além disso, quando se avalia a escala de atividade, confirma-se ainda mais que  $\gamma$ -GCS exerce

um papel mais relevante, pois ela possui uma escala de atividade menor e, portanto, mais limitante. Após 72h  $As^{III}$  e  $As^V$  diminuíram a atividade dessa enzima e isso contribuiu com a  $\gamma$ -GCS para menores concentrações de GSH nesse período.

A co-aplicação só interferiu na atividade enzimática com Si, reduzindo a atividade dessa enzima, mas não em  $\gamma$ -GCS e isso não resultou em menores concentrações de GSH, isso sugere que quando Si é aplicado, a  $\gamma$ -GCS modula mais os níveis de GSH. Porém quando comparadas entre si, SiNP causou menores atividades dessa enzima que resultaram em menores concentrações de GSH nesse período, causado pela maior concentração de SiNP do que de Si nessa parte da planta.

A GPx é uma peroxidase e assim como outras peroxidases atua na remoção de  $H_2O_2$  evitando o estresse oxidativo, utilizando GSH ou tioredoxina como doadores de elétrons, ligando-as ao seu grupo tiol altamente reativo, sendo, também, capaz de reduzir hidroperóxidos orgânicos e lipídios (Hasanuzzaman et al., 2020). A atividade da GPx foi aumentada pela aplicação de As, o que só foi refletido na concentração de GSSG para  $As^{III}$  após 24h, o que pode significar que esta utilizou tioredoxina de forma preferencial, ao invés de GSH, como doador de elétrons para reduzir o  $H_2O_2$ . Acréscimos rápidos na atividade GPx e outras peroxidases ocorrem em resposta das plantas de alface expostas ao As (Silveira et al., 2015) comprova a alta toxicidade do As, por meio da geração de EROs, e a rápida resposta enzimática antioxidante, o que nem sempre é suficiente para reduzir a concentração de  $H_2O_2$  e a peroxidação lipídica.

O estímulo da atividade pela aplicação As com SiNP após 72 h de exposição resultou em menores concentrações de  $H_2O_2$  nesse período em comparação com 24h de exposição. Para Si isso não é observado. O estímulo diferencial pode estar ligado a taxa de translocação para folhas, visto que, novamente, a concentração de SiNP foi maior nas folhas, porém, de maneira geral tanto Si quanto SiNP causaram menor atividade dessa enzima do que na ausência de silício o que resultou em menores concentrações de  $H_2O_2$  e isso deve ter ocorrido pela menor concentração de As nessas partes da planta e pelo estímulo de outros componentes do sistema antioxidante.

Apesar de não eliminar espécies EROs, a GST auxilia na regulação do metabolismo sob estresse oxidativo, pois esta é capaz de conjugar moléculas tóxicas com GSH, tornando-os menos tóxicos, e transportando-os para o vacúolo (Tripathi et al., 2012). A estimulação da atividade da GST tem sido considerada um fator importante na tolerância ao estresse metálico (Dixon et al., 2010), tendo Kumar e Trivedi (2018) afirmado que estas respondem ao As. O aumento da atividade desta com  $As^V$  em relação ao  $As^{III}$  pode estar ligado ao mecanismo de

destoxificação do  $As^{III}$  com GSH e fitoquelatinas, que não ocorrem para  $As^V$  e, portanto, um requerimento da ativação dessa enzima de forma mais significativa.

A aplicação  $As^{III}$  com SiNP parece ter ajudado no processo de complexação do  $As^{III}$  visto que a atividade diminuiu e de Si também, porém só no período inicial dos tratamentos para essa fonte, enquanto que com  $As^V$  foi estimulada o que reforça o argumento relatado anteriormente, esses resultados são corroborados por Das et al. (2018) e Kaya e Ashraf (2022). Tanto Si quanto SiNP trouxeram melhoria a atuação dessa enzima, o SiNP causou uma redução ainda mais significativa do que Si com  $As^{III}$ , provavelmente pela estimulação dos mecanismos destoxificadores de  $As^{III}$  relatados anteriormente e trouxe, também, assim como Si, incrementos maiores da atividade com  $As^V$  reforçando a atuação desta para desintoxicar essa forma de As.

## 5. CONCLUSÕES

As formas inorgânicas de As, As<sup>III</sup> e As<sup>V</sup>, causaram efeitos negativos sob a anatomia, bioquímica e fisiologia de plantas de alface, que são aumentados com o prolongamento do tempo de exposição, sendo, de maneira geral, os efeitos mais tóxicos causados por As<sup>III</sup>. A rápida absorção e translocação para a parte aérea, especialmente de As<sup>V</sup>, aumentou as atividades de enzimas antioxidantes e a biossíntese de antioxidantes, como estratégia para mitigar os efeitos tóxicos do poluente. Apesar disso, estas alterações não incorreram em reduções suficientes nas concentrações de EROs, a ponto de evitar a peroxidação de membranas lipídicas. Além disso, a concentração de As encontrada em folhas representa um sério risco de contaminação e, portanto, na segurança alimentar, dado os efeitos nocivos que o As possui para seres humanos.

A aplicação de silício, seja iônico ou nanoparticulado, reduziu de forma eficiente a toxicidade do As nas plantas e o risco de contaminação. Isso ocorreu, principalmente, por três mecanismos: redução da absorção pelas raízes e conseqüente diminuição da concentração nas folhas, redução dos danos anatômicos e pela modulação do sistema antioxidante, principalmente, enzimático. Entre as fontes de silício não é possível afirmar qual promove maiores atenuações da toxicidade do As, mas é possível afirmar que o SiNP é tão eficiente quanto o Si no processo de mitigação dos danos, o que, por si só, já é um resultado promissor, visto que a nanociência ainda é um campo que carece de investigações sobre a atuação de nanopartículas em plantas.

A alface é uma hortaliça bastante consumida mundialmente e os resultados aqui apresentados mostraram avanços consideráveis sobre os efeitos que o As e o silício tem sobre essas plantas, complementando estudos que visam reduzir as contaminações por As e garantir segurança alimentar.

Como perspectivas futuras, recomendamos investigações mais aprofundadas sobre os mecanismos de absorção e, principalmente, translocação para a parte aérea de SiNP, visto que este foi encontrado em maiores concentrações, tanto em folhas quanto em raízes, do que Si. Além disso, incentivamos pesquisas que visem identificar e caracterizar a existência de transportadores de silício em plantas de alface, para que os mecanismos de alívio do estresse possam ser melhor compreendidos.

## REFERÊNCIAS

- Abbas G, Murtaza B, Bibi I, Shahid M, Niazi NK, Khan MI, Amjad M, Hussain M, Natasha** (2018) Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants: Physiological, biochemical, and molecular aspects. *Int J Environ Res Public Health* **15**: 59
- Abercrombie JM, Halfhill MD, Ranjan P, Rao MR, Saxton AM, Yuan JS, Stewart CN** (2008) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As (V) stress. *BMC Plant Biol* **8**: 1–15
- Adrees M, Ali S, Rizwan M, Zia-ur-Rehman M, Ibrahim M, Abbas F, Farid M, Qayyum MF, Irshad MK** (2015) Mechanisms of silicon-mediated alleviation of heavy metal toxicity in plants: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* **119**: 186–197
- Agência de registro de substâncias tóxicas e doenças (2019) <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>. Acessado em 27.05.2022
- Ahmad A, Khan WU, Ali Shah A, Yasin NA, Naz S, Ali A, Tahir A, Iram Batool A** (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
- Akram NA, Shafiq F, Ashraf M** (2017) Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Front Plant Sci* **8**: 613
- Alamri S, Siddiqui MH, Mukherjee S, Kumar R, Kalaji HM, Irfan M, Minkina T, Rajput, VD** (2022) Molybdenum-induced endogenous nitric oxide (NO) signaling coordinately enhances resilience through chlorophyll metabolism, osmolyte accumulation and antioxidant system in arsenate stressed-wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Environ Pollut* **292**: 118268
- Alsahli AA, Bhat JA, Alyemini MN, Ashraf M, Ahmad P** (2021) Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S) Mitigates Arsenic (As)-Induced Toxicity in Pea (*Pisum sativum* L.) Plants by Regulating Osmoregulation, Antioxidant Defense System, Ascorbate Glutathione Cycle and Glyoxalase System. *J Plant Growth Regul* **40**: 2515–2531
- Anderson JV, Davis DG** (2004) Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. *Physiol Plant* **120**: 421–433
- Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR** (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. *Plant Physiol* **109**: 1247-1257

- Andrade, RR (2019) Efeito da concentração da solução nutritiva em cultivares de alface em sistema hidropônico tipo NFT, em clima Semiárido. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Anjum NA, Gill SS, Gill R, Hasanuzzaman M, Duarte AC, Pereira E, Ahmad I, Tuteja R, Tuteja N** (2014) Metal/metalloid stress tolerance in plants: role of ascorbate, its redox couple, and associated enzymes. *Protoplasma* **251**: 1265–1283
- Armendariz AL, Talano MA, Travaglia C, Reinoso H, Wevar Oller AL, Agostini E** (2016) Arsenic toxicity in soybean seedlings and their attenuation mechanisms. *Plant Physiol Biochem* **98**: 119–127
- Asgari F, Majd A, Jonoubi P, Najafi F** (2018) Effects of silicon nanoparticles on molecular, chemical, structural and ultrastructural characteristics of oat (*Avena sativa* L.). *Plant Physiol Biochem* **127**: 152–160
- Asthir B, Kaur G, Kaur B** (2020) Convergence of Pathways Towards Ascorbate–Glutathione for Stress Mitigation. *J Plant Biol* **63**: 243–257
- Baker S, Volova T, Prudnikova SV, Satish S, Prasad MNN** (2017) Nanoagroparticles emerging trends and future prospect in modern agriculture system. *Environ Toxicol Pharmacol* **53**: 10–17
- Bakhat HF, Zia Z, Fahad S, Abbas S, Hammad HM, Shahzad AN, Abbas F, Alharby H, Shahid M** (2017) Arsenic uptake, accumulation and toxicity in rice plants: Possible remedies for its detoxification: A review. *Environ Sci Pollut Res* **24**: 9142–9158
- Bali AS, Sidhu GPS** (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. *Anal Biochem* **44**: 276–287
- Bergmeyer HU, Grassl M, Walter HE** (1983) In methods of enzymatic analysis (Bergmeyer, HU ed.) 3. ed., Volume II, p. 157-158
- Bhat JA, Shivaraj SM, Singh P, Navadagi DB, Tripathi DK, Dash PK, Solanke AU, Sonah H, Deshmukh R** (2019) Role of silicon in mitigation of heavy metal stresses in crop plants. *Plants* **8**: 1–20
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254

- Broad RC, Bonneau JP, Hellens RP, Johnson AAT** (2020) Manipulation of ascorbate biosynthetic, recycling, and regulatory pathways for improved abiotic stress tolerance in plants. *Int J Mol Sci* **21**: 1790
- Cardello HMA, Cardello L** (1998) Teor de vitamina C, atividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga (*Mangifera indica* L.) var. Haden, durante o amadurecimento. *Food Sci and Tech* **18**: 211-217
- Chance B, Maehley AC** (1955) Assay of catalase and peroxidase. *Met in Enzymo* **2**: 755-764
- Chiba Y, Mitani N, Yamaji N, Ma JF** (2009) HvLsi1 is a silicon influx transporter in barley. *Plant J* **57**: 810–818
- Clark RB** (1975) Characterization of Phosphatase of Intact Maize Roots. *J Agric Food Chem* **23**: 458–460
- Cobbett CS, May MJ, Howden R, Rolls B** (1998) The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. *Plant J* **16**: 73–78
- Das K, Roychoudhury A** (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environ Sci* **2**: 1–13
- Das S, Majumder B, Biswas AK** (2018) Modulation of growth, ascorbate-glutathione cycle and thiol metabolism in rice (*Oryza sativa* L. cv. MTU-1010) seedlings by arsenic and silicon. *Ecotoxicology* **27**: 1387–1403
- de Andrade SAL, Domingues AP, Mazzafera P** (2015) Photosynthesis is induced in rice plants that associate with arbuscular mycorrhizal fungi and are grown under arsenate and arsenite stress. *Chemosphere* **134**: 141–149
- De Tullio MC, Guether M, Balestrini R** (2013) Ascorbate oxidase is the potential conductor of a symphony of signaling pathways. *Plant Signal Behav* **8**: 1–4
- Dixon DP, Skipsey M, Edwards R** (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **71**: 338–350
- Dumont S, Rivoal J** (2019) Consequences of oxidative stress on plant glycolytic and respiratory metabolism. *Front Plant Sci* **10**: 1–16
- Emamverdian A, Ding Y, Xie Y, Sangari S** (2018) Silicon mechanisms to ameliorate heavy metal stress in plants. *Biomed Res Int* **2018**: 1-10
- Epstein E** (1994) The anomaly of silicon in plant biology. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 11–17
- Epstein E** (1999) Silicon. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 641–664

- Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA** (2018) ExpDes. pt: pacote experimental designs (Portuguese). R package version 1.2. 0.
- Finnegan PM, Chen W** (2012) Arsenic toxicity: The effects on plant metabolism. *Front Physiol* **3**: 1–18
- Fleck AT, Mattusch J, Schenk MK** (2013) Silicon decreases the arsenic level in rice grain by limiting arsenite transport. *J Plant Nutr Soil Sci* **176**: 785–794
- Foyer CH** (2001) Prospects for enhancement of the soluble antioxidants, ascorbate and glutathione. *Biofactors* **15**: 75-78
- Foyer CH, Kyndt T, Hancock RD** (2020) Vitamin C in Plants: Novel Concepts, New Perspectives, and Outstanding Issues. *Antioxidants Redox Signal* **32**: 463–485
- Foyer CH, Noctor G** (2011) Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiol* **155**: 2–18
- Gay C, Gebicki JM** (2000) A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. *Anal Biochem* **284**: 217–220
- Ghosh A, Pramanik K, Bhattacharya S, Mondal S, Ghosh SK, Ghosh PK, Maiti TK** (2021) Abatement of arsenic-induced phytotoxic effects in rice seedlings by an arsenic-resistant *Pantoea dispersa* strain. *Environ Sci Pollut Res* **28**: 21633–21649
- Giannopolitis CN, Ries SK** (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* **59**: 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. *Environ Sci Pollut Res* **29**: 34147-34163
- Greger M, Bergqvist C, Sandhi A, Landberg T** (2015) Influence of silicon on arsenic uptake and toxicity in lettuce. *J Appl Bot Food Qual* **88**: 234–240
- Guo W, Hou YL, Wang SG, Zhu YG** (2005) Effect of silicate on the growth and arsenate uptake by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in solution culture. *Plant Soil* **272**: 173–181
- Guo W, Zhang J, Teng M, Wang LH** (2009) Arsenic uptake is suppressed in a rice mutant defective in silicon uptake. *J Plant Nutr Soil Sci* **172**: 867–874
- Gusman GS, Oliveira JA, Farnese FS, Cambraia J** (2013a) Arsenate and arsenite: The toxic effects on photosynthesis and growth of lettuce plants. *Acta Physiol Plant* **35**: 1201–1209
- Gusman GS, Oliveira JA, Farnese FS, Cambraia J** (2013b) Mineral nutrition and enzymatic adaptation induced by arsenate and arsenite exposure in lettuce plants. *Plant Physiol Biochem* **71**: 307–314

- Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB** (1974) Glutathione-S-transferase. The first step in mercapturic and formation. *Journal of Biol Chem* **249**: 7130-7139
- Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Al Mahmud J, Fujita M, Fotopoulos V** (2020) Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants* **9**: 1–52
- Hasanuzzaman M, Borhannuddin Bhuyan MHM, Anee TI, 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**: 384
- Havir EA, McHale NA** (1987) Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. *Plant Physiol* **84**: 450–455
- Herath I, Vithanage M, Bundschuh J, Maity JP, Bhattacharya P** (2016) Natural Arsenic in Global Groundwaters: Distribution and Geochemical Triggers for Mobilization. *Curr Pollut Reports* **2**: 68–89
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK** (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**: 604–611
- Hu AY, Che J, Shao JF, Yokosho K, Zhao XQ, Shen RF, Ma JF** (2018) Silicon accumulated in the shoots results in down-regulation of phosphorus transporter gene expression and decrease of phosphorus uptake in rice. *Plant Soil* **423**: 317–325
- Johansen DA** (1940) *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Jung H II, Kong MS, Lee BR, Kim TH, Chae MJ, Lee EJ, Jung GB, Lee CH, Sung JK, Kim YH** (2019) Exogenous Glutathione Increases Arsenic Translocation Into Shoots and Alleviates Arsenic-Induced Oxidative Stress by Sustaining Ascorbate–Glutathione Homeostasis in Rice Seedlings. *Front Plant Sci* **10**: 1–14
- Kampfenkel K, Van Montagu M, Inzé D** (1995) Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Anal Biochem* **225**: 165–167
- Kar M, Mishra D** (1976) Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiol* **57**: 315–319
- Kaya C, Ashraf M** (2022) Sodium hydrosulfite together with silicon detoxifies arsenic toxicity in tomato plants by modulating the AsA-GSH cycle. *Environ Pollut* **294**: 118608
- Kaya C, Ashraf M, Alyemeni MN, Corpas FJ, Ahmad P** (2020) Salicylic acid-induced nitric oxide enhances arsenic toxicity tolerance in maize plants by upregulating the ascorbate-glutathione cycle and glyoxalase system. *J Hazard Mater* **399**: 123020

- Khalid S, Shahid M, Niazi NK, Rafiq M, Bakhat HF, Imran, M, Abbas T, Bibi I, Dumat C** (2017) Arsenic behaviour in soil-plant system: biogeochemical reactions and chemical speciation influences. In *Enhancing cleanup of environmental pollutants*. Springer, Cham 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. *Sci Rep* **8**: 1–16
- Khan I, Awan SA, Rizwan M, Ali S, Zhang X, Huang L** (2021) Arsenic behavior in soil-plant system and its detoxification mechanisms in plants: A review. *Environ Pollut* **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. *Environ Sci Pollut Res* **29**: 34725–34737
- Kumar S, Trivedi PK** (2018) Glutathione S-transferases: Role in combating abiotic stresses including arsenic detoxification in plants. *Front Plant Sci* **9**: 1–9
- Kumari A, Pandey N, Pandey-Rai S** (2017) Protection of *Artemisia annua* roots and leaves against oxidative stress induced by arsenic. *Biol Plant* **61**: 367–377
- Kuo MC, Kao C.** (2003) Alluminium effects on lipid peroxidation. *Biol Plant* **46**: 149–152
- Li N, Wang J, Song WY** (2016) Arsenic uptake and translocation in plants. *Plant Cell Physiol* **57**: 4–13
- Li RY, Ago Y, Liu WJ, Mitani N, Feldmann J, McGrath SP, Ma JF, Zhao FJ** (2009) The rice aquaporin *lsi1* mediates uptake of methylated arsenic species. *Plant Physiol* **150**: 2071–2080
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR** (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents . *Biochem Soc Trans* **11**: 591–592
- Lindeman W** (1958) Observations on the behavior of phosphate compounds in *Chlorella* at the transition from dark to light, *Proc, 2nd. Conference on the peaceful uses atomic energy* **24**: 8-15
- Líška D, Soukup M, Lukačová Z, Bokor B, Vaculík M** (2017) Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stress in plants: recent advances and future perspective. In: Tripathi DK, Singh VP, Ahmad P, Chauhan DK, Prasad SM, eds. *Silicon in plants: advances and future prospects*. CRC Press 1–28
- Ma JF, Takahashi E** (2002) *Soil, Fertilizer, and Plant Silicon Research in Japan*. Elsevier, Amsterdam

- Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi S, Katsuhara M, Ishiguro M, Murata Y, Yano M** (2006) A silicon transporter in rice. *Nature* **440**: 688–691
- Ma JF, Yamaji N, Mitani N, Tamai K, Konishi S, Fujiwara T, Katsuhara M, Yano M** (2007) An efflux transporter of silicon in rice. *Nature* **448**: 209–212
- Madhu, Sharma A, Kaur A, Tyagi S, Upadhyay SK** (2022) Glutathione Peroxidases in Plants: Innumerable Role in Abiotic Stress Tolerance and Plant Development. *J Plant Growth Regul* **41**: 1-16
- Maghsoudi K, Arvin MJ, Ashraf M** (2020) Mitigation of Arsenic Toxicity in Wheat by the Exogenously Applied Salicylic Acid, 24-Epi-Brassinolide and Silicon. *J Soil Sci Plant Nutr* **20**: 577–588
- Marin AR, Pezeshki SR, Masschelen PH, Choi HS** (1993) Effect of dimethylarsenic acid (dmaa) on growth, tissue arsenic, and photosynthesis of rice plants. *J Plant Nutr* **16**: 865–880
- Marmioli M, Pighi V, Savo-Sardaro ML, Marmioli N** (2014) The effect of silicon on the uptake and translocation of arsenic in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Environ Exp Bot* **99**: 9–17
- Mawia AM, Hui S, Zhou L, Li H, Tabassum J, Lai C, Wang J, Shao G, Wei X, Tang S, et al** (2021) Inorganic arsenic toxicity and alleviation strategies in rice. *J Hazard Mater* **408**: 124751
- McClintock TR, Chen Y, Bundschuh J, Oliver JT, Navoni J, Olmos V, Lepori EV, Ahsan H, Parvez F** (2012) Arsenic exposure in Latin America: Biomarkers, risk assessments and related health effects. *Sci Total Environ* **429**: 76–91
- Mishra S, Dwivedi S, Mallick S, Tripathi RD** (2019) Redox Homeostasis in Plants Under Arsenic Stress. In: *Redox homeostasis in plants*. Springer, Cham 179-198
- Mitani N, Yamaji N, Ago Y, Iwasaki K, Ma JF** (2011) Isolation and functional characterization of an influx silicon transporter in two pumpkin cultivars contrasting in silicon accumulation. *Plant J* **66**: 231–240
- Mitani N, Yamaji N, Ma JF** (2009) Identification of maize silicon influx transporters. *Plant Cell Physiol* **50**: 5–12
- Mitani-Ueno N, Yamaji N, Ma JF** (2011) Silicon efflux transporters isolated from two pumpkin cultivars contrasting in Si uptake. *Plant Signal Behav* **6**: 991–994
- Mondal S, Pramanik K, Ghosh SK, Pal P, Mondal T, Soren T, Maiti TK** (2021) Unraveling the role of plant growth-promoting rhizobacteria in the alleviation of arsenic phytotoxicity: A review. *Microbiol Res* **250**: 126809

- Montpetit J, Vivancos J, Mitani-Ueno N, Yamaji N, Rémus-Borel W, Belzile F, Ma JF, Bélanger RR** (2012) Cloning, functional characterization and heterologous expression of TaLsi1, a wheat silicon transporter gene. *Plant Mol Biol* **79**: 35–46
- Morales M, Munné-Bosch S** (2019) Malondialdehyde: Facts and artifacts. *Plant Physiol* **180**: 1246–1250
- Mostofa MG, Rahman MM, Ansary MMU, Keya SS, Abdelrahman M, Miah MG, Phan Tran LS** (2021) Silicon in mitigation of abiotic stress-induced oxidative damage in plants. *Crit Rev Biotechnol* **41**: 918–934
- Murshed R, Lopez-Lauri F, Sallanon H** (2008) Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate-glutathione cycle. *Anal Biochem* **383**: 320–322
- Nagalakshmi N, Prasad MNV** (2001) Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci* **160**: 291–299
- Nakano Y, Asada K** (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **22**: 867–880
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control. *Annu Rev Plant Biol* **49**: 249–279
- Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez Garcia B, Queval G, Foyer CH** (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ* **35**: 454–484
- Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez Garcia B, Queval G, Foyer CH** (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ* **35**: 454–484
- Noctor G, Reichheld JP, Foyer CH** (2018) ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Semin Cell Dev Biol* **80**: 3–12
- Panda SK, Upadhyay RK, Nath S** (2010) Arsenic Stress in Plants. *J Agron Crop Sci* **196**: 161–174
- Peixoto PHP, Cambraia J, Sant’Anna R, Mosquim PR, Moreira MA** (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev Bras Fisiol Veg* **11**: 137–143

- Pita-Barbosa A, Gonçalves EC, Azevedo AA** (2015) Morpho-anatomical and growth alterations induced by arsenic in *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae). *Environ Sci Pollut Res* **22**: 11265–11274
- Pontigo S, Ribera A, Gianfreda L, de la Luz Mora M, Nikolic M, Cartes P** (2015) Silicon in vascular plants: Uptake, transport and its influence on mineral stress under acidic conditions. *Planta* **242**: 23–37
- Rahman I, Kode A, Biswas SK** (2007) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc* **1**: 3159–3165
- Rahman MS, Jamal MAHM, Biswas PK, Rahman SM, Sharma SP, Saha SK, Hong ST, Islam MR** (2020) Arsenic Remediation in Bangladeshi Rice Varieties with Enhance Plant Growth by Unique Arsenic-Resistant Bacterial Isolates. *Geomicrobiol J* **37**: 130–142
- Rajput VD, Harish, Singh RK, Verma KK, Sharma L, Quiroz-Figueroa FR, Meena M, Gour VS, Minkina T, Sushkova S, et al** (2021) Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. *Biology (Basel)* **10**: 267
- Remédios C, Rosário F, Bastos V** (2012) Environmental Nanoparticles Interactions with Plants: Morphological, Physiological, and Genotoxic Aspects. *J Bot* **2012**: 1–8
- Rosas-Castor JM, Guzmán-Mar JL, Hernández-Ramírez A, Garza-González MT, Hinojosa-Reyes L** (2014) Arsenic accumulation in maize crop (*Zea mays*): A review. *Sci Total Environ* **488–489**: 176–187
- Rüegsegger A, Brunold C** (1992) Effect of cadmium on  $\gamma$ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. *Plant Physiol* **99**: 428–433
- Sahebi M, Hanafi MM, Siti Nor Akmar A, Raffi MY, Azizi P, Tengoua FF, Nurul Mayzaitul Azwa J, Shabanimofrad M** (2015) Importance of silicon and mechanisms of biosilica formation in plants. *Biomed Res Int*.
- Saleem MH, Mfarrej MFB, Alatawi A, Mumtaz S, Imran M, Ashraf MA, Rizwan M, Usman K, Ahmad P, Ali S** (2022) Silicon Enhances Morpho–Physio–Biochemical Responses in Arsenic Stressed Spinach (*Spinacia oleracea* L.) by Minimizing Its Uptake. *J Plant Growth Regul* **41**: 1-20
- Sanglard LMVP, Martins SCV, Detmann KC, Silva PEM, Lavinsky AO, Silva MM, Detmann E, Araújo WL, DaMatta FM** (2014) Silicon nutrition alleviates the negative impacts of arsenic on the photosynthetic apparatus of rice leaves: An analysis of the key limitations of photosynthesis. *Physiol Plant* **152**: 355–366

- Sarath NG, Shackira AM, El-Serehy HA, Hefft DI, Puthur JT** (2022) Phytostabilization of arsenic and associated physio-anatomical changes in *Acanthus ilicifolius* L. *Environ Pollut* **298**: 118828
- Siddiqui H, Ahmed KBM, Sami F, Hayat S** (2020) Silicon Nanoparticles and Plants: Current Knowledge and Future Perspectives. *Sustain Agricul Revi* **41**: 129–142
- Sil P, Biswas AK** (2020) Silicon nutrition modulates arsenic-inflicted oxidative overload and thiol metabolism in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Environ Sci Pollut Res* **27**: 45209–45224
- Silva ADD (2017) Rentabilidade econômica e características agronômicas da produção de mudas de alface em viveiro protegido destinadas ao cultivo hidropônico. [Piracicaba (SP)] Universidade de São Paulo
- Silveira NM, De Oliveira JA, Ribeiro C, Canatto RA, Siman L, Cambraia J, Farnese F** (2015) Nitric Oxide Attenuates Oxidative Stress Induced by Arsenic in Lettuce (*Lactuca sativa*) Leaves. *Water Air Soil Pollut* **226**: 226–379
- Singh R, Upadhyay AK, Singh DP** (2018) Regulation of oxidative stress and mineral nutrient status by selenium in arsenic treated crop plant *Oryza sativa*. *Ecotoxicol Environ Saf* **148**: 105–113
- Smirnoff N** (2018) Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radic Biol Med* **122**: 116–129
- Szarka A, Tomasskovics B, Bánhegyi G** (2012) The ascorbate-glutathione- $\alpha$ -tocopherol triad in abiotic stress response. *Int J Mol Sci* **13**: 4458–4483
- Teixeira MC, Santos AC, Fernandes CS, Ng JC** (2020) Arsenic contamination assessment in Brazil – Past, present and future concerns: A historical and critical review. *Sci Total Environ* **730**: 138217
- Tripathi DK, Singh S, Singh VP, Prasad SM, Chauhan DK, Dubey NK** (2016) Silicon nanoparticles more efficiently alleviate arsenate toxicity than silicon in maize cultivar and hybrid differing in arsenate tolerance. *Front Environ Sci* **4**: 46
- Tripathi P, Mishra A, Dwivedi S, Chakrabarty D, Trivedi PK, Singh RP, Tripathi RD** (2012) Differential response of oxidative stress and thiol metabolism in contrasting rice genotypes for arsenic tolerance. *Ecotoxicol Environ Saf* **79**: 189–198
- Tripathi P, Tripathi RD, Singh RP, Dwivedi S, Goutam D, Shri M, Trivedi PK, Chakrabarty D** (2013) Silicon mediates arsenic tolerance in rice (*Oryza sativa* L.)

- through lowering of arsenic uptake and improved antioxidant defence system. *Ecol Eng* **52**: 96–103
- Vaculík M, Lukačová Z, Bokor B, Martinka M, Tripathi DK, Lux A** (2020) Alleviation mechanisms of metal(loid) stress in plants by silicon: A review. *J Exp Bot* **71**: 6744–6757
- Venkatesh J, Park SW** (2014) Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants. *Bot Stud* **55**: 1-19
- Vulavala VKR, Elbaum R, Yermiyahu U, Fogelman E, Kumar A, Ginzberg I** (2016) Silicon fertilization of potato: expression of putative transporters and tuber skin quality. *Planta* **243**: 217–229
- Wei T, Simko V, Levy M, Xie Y, Jin Y, Zemla J** (2017) R package “corrplot”: Visualization of a Correlation Matrix. *Statistician* **56**: 316–324
- Wei-min D, Ke-qin Z, Bin-wu DUAN, Cheng-xiao S, Kang-le Z, Run C, Jie-yun, Z** (2005) Rapid determination of silicon content in rice. *Rice Sci* **12**: 145–147
- Xie X, He Z, Chen N, Tang Z, Wang Q, Cai Y** (2019) The Roles of Environmental Factors in Regulation of Oxidative Stress in Plant. *Biomed Res Int* **2019**: 21–27
- Yamaji N, Mitatni N, Jian FM** (2008) A transporter regulating silicon distribution in rice shoots. *Plant Cell* **20**: 1381–1389
- Yamaji N, Sakurai G, Mitani-Ueno N, Ma JF** (2015) Orchestration of three transporters and distinct vascular structures in node for intervascular transfer of silicon in rice. *Proc Natl Acad Sci* **112**: 11401-11406
- Zargar SM, Mahajan R, Bhat JA, Nazir M, Deshmukh R** (2019) Role of silicon in plant stress tolerance: opportunities to achieve a sustainable cropping system. *3 Biotech* **9**: 1–16
- Zechmann B** (2020) Subcellular roles of glutathione in mediating plant defense during biotic stress. *Plants* **9**: 1–21
- Zhao FJ, Ma JF, Meharg, AA, McGrath SP** (2009). Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol* **181**: 777-794
- Zulfiqar F, Ashraf M** (2021) Antioxidants as modulators of arsenic-induced oxidative stress tolerance in plants: An overview. *Journal of Hazardous Materials* **427**: 127891
- Žur I, Kopeć P, Surówka E, Dubas E, Krzewska M, Nowicka A, Janowiak F, Juzoń K, Janas A, Barna B, et al** (2021) Impact of ascorbate—glutathione cycle components on

the effectiveness of embryogenesis induction in isolated microspore cultures of barley and triticale. *Antioxidants* **10**: 1254