



LUANA TELES BARROSO

**NANOTUBO DE CARBONO NA GERMINAÇÃO DE *Clitoria*
ternatea L.**

**LAVRAS – MG
2023**

LUANA TELES BARROSO

NANOTUBO DE CARBONO NA GERMINAÇÃO DE *Clitoria ternatea* L.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do Título de Mestre.

Dra. Michele Valquíria dos Reis
Orientadora

Dra. Heloisa Oliveira dos Santos
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Barroso, Luana Teles.

Nanotubo de carbono na germinação de *Clitoria ternatea* L. /
Luana Teles Barroso. - 2023.

59 p.: il.

Orientador(a): Michele Valquíria dos Reis.

Coorientador(a): Heloísa Oliveira dos Santos.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Nanotubo de carbono. 2. Cunhã. 3. Dormência fisiológica. I.
dos Reis, Michele Valquíria. II. dos Santos, Heloísa Oliveira. III.
Título.

LUANA TELES BARROSO

NANOTUBO DE CARBONO NA GERMINAÇÃO DE *Clitoria ternatea* L.

CARBON NANOTUBE ON GERMINATION OF *Clitoria ternatea* L.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do Título de Mestre.

APROVADA em 31 de Maio de 2023.

Dra. Michele Valquíria dos Reis

UFLA

Dra. Raquel Maria de Oliveira Pires

UFLA

Dra. Mariana Silva Artur

Wageningen University

Dra. Michele Valquíria dos Reis

Orientadora

LAVRAS - MG

2023

Aos meus queridos Avô Mario, Tia Maria de Lurdes, Primo Ricardo e amigo Zenóbio, que já partiram, mas que deixaram uma grande inspiração em mim quanto a simplicidade da vida e seus encantos.

Agradeço a todos aqueles que já se foram, mas que deixaram marcas profundas na minha trajetória, mostrando como a natureza é bela e pode ser trilhada como um caminho profissional.

Que este trabalho possa honrar suas memórias e inspirar novas gerações a preservar a natureza e a vida em todas as suas formas.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, que é minha maior inspiração e fonte de amor, sabedoria e orientação. Agradeço por sempre me apoiar em todas as decisões e me guiar da maneira mais correta possível.

Ao meu irmão, que sempre esteve ao meu lado, me dando suporte e sendo meu melhor amigo em todos os momentos, independente da situação.

À minha companheira, que sempre esteve presente e me apoiou em cada passo dado neste caminho. Obrigado por todo o amor, carinho e companheirismo.

À minha orientadora, Michele, pela paciência, dedicação e confiança em meu trabalho. Agradeço por me dar direcionamento, sugestões e contribuir para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

A todos os amigos e amigas que fiz aqui dentro da Universidade, que se tornaram minha família. Agradeço pela troca de experiências, pelas risadas, pelas conversas e por tornarem essa jornada muito mais leve e divertida.

Aos parceiros de pesquisa, pela estrutura e espaço oferecido para realização dos experimentos e análises. E a todos os amigos que me ajudaram durante toda a fase do mestrado, seja com uma palavra de conforto, um conselho ou com uma mão amiga.

A Universidade Federal de Lavras - Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, por todo o suporte prestado pelos docentes e pela secretaria. Gostaria de expressar minha gratidão à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos que possibilitou a realização desta pesquisa. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto de pesquisa apresentado e também a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela doação do nanotubo de carbono (CTNano).

Por fim, agradeço a Deus, por me dar força e me guiar nessa jornada. Sem a sua graça e o seu amor, nada seria possível. Obrigado por estar sempre ao meu lado.

RESUMO

A *Clitoria ternatea* L. é uma trepadeira herbácea e suas flores são comestíveis e medicinais. No Brasil, é principalmente utilizada como forrageira, mas recentemente têm popularizado na gastronomia, devido ao pigmento azul (antocianina) encontrado nas flores podendo ser utilizado como corante alimentício, na forma *in natura* e em chá. Contudo, umas das principais limitações da expansão do seu cultivo é a baixa taxa de germinação de sementes e vigor de plântula, devido à semente possuir um tegumento impermeável, que dificulta a entrada de água e prejudica uma germinação uniforme. Uma ferramenta importante que auxilia na caracterização das sementes, bem como o estágio inicial de desenvolvimento de plantas (plântulas) é a técnica de análise de imagem (Biospeckle e GroundEye), que permite de maneira otimizada analisar os parâmetros morfológicos das sementes e plântulas. Uma tecnologia que surge como uma inovação na área agrônômica no tratamento de sementes é a nanotecnologia, utilizando principalmente o nanotubo de carbono (NTC), que devido sua formação cilíndrica e sua escala nano, cria espaços no tegumento da semente, facilitando a entrada de água no embrião, melhorando a germinação. O objetivo do projeto foi avaliar o efeito do nanotubo de carbono de paredes múltiplas funcionalizado com ácido carboxílico (MultiWalled Carbon Nanotubes - MWCNT) na germinação e vigor de plântulas de *C. ternatea*. As sementes foram tratadas com MWCNT em diferentes concentrações (0, 100, 200, 400, 800 mg L⁻¹), buscando compreender a interação do MWCNT com as sementes e plântulas. No primeiro experimento, foi realizado com as sementes intactas a embebição por 24 horas, em diferentes concentrações de MWCNT para avaliação no teste de germinação. No segundo experimento, as sementes foram escarificadas de forma mecânica antes da embebição no MWCNT. No terceiro experimento, foi realizado o nanopriming (200 mg L⁻¹ MWCNT) e hidropriming (água) em sementes intactas e escarificadas. No último experimento, foram testadas tanto as sementes intactas, quanto escarificadas a exposição crônica ao MWCNT (200 e 800 mg L⁻¹), para aferir se há toxicidade do produto durante um maior tempo de exposição. Foram avaliados a germinação (%), IVG, plântulas normais (%), análise de movimentação de fluidos no embrião (Biospeckle) e parâmetros de crescimento da plântula através da análise de imagem (GroundEye). O MWCNT (200 mg L⁻¹) no primeiro e segundo experimento demonstrou uma melhora na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas, bem como a escarificação mecânica se mostrou um bom método para melhoria na superação de dormência e velocidade de germinação. No terceiro experimento, o método do nanopriming associado a escarificação mecânica chega a 74% de germinação, o mesmo encontrado no hidropriming, no entanto, as características de plântula do nanopriming indicam uma melhora nos parâmetros de crescimento, apontando uma melhora no vigor de plântulas. Quanto à avaliação da toxicidade (exposição crônica) é possível afirmar que mesmo a maior dose (800 mg L⁻¹) não possui efeitos nocivos à germinação e vigor de plântulas de *C. ternatea*. Portanto, o uso de MWCNT pode ser uma ferramenta valiosa para melhorar o cultivo da *C. ternatea* e explorar seu potencial gastronômico e medicinal.

Palavras-chave: Cunhã. Nanotecnologia na agricultura. Nanopriming. Dormência tegumentar.

ABSTRACT

The *Clitoria ternatea* L. is an herbaceous vine, and its flowers are edible and medicinal. In Brazil, it is primarily used as a forage plant, but it has recently gained popularity in gastronomy due to the blue pigment (anthocyanin) found in its flowers, which can be used as a food dye, both in its natural form and as a tea. However, one of the main limitations to the expansion of its cultivation is the low seed germination rate and seedling vigor, due to the seeds having an impermeable seed coat that hinders water entry and impairs uniform germination. An important tool that aids in the characterization of seeds, as well as the early stage of plant development (seedlings), is image analysis techniques (Biospeckle and GroundEye), which allow for optimized analysis of morphological parameters of seeds and seedlings. Nanotechnology, using primarily multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), is a technology that emerges as an innovation in seed treatment in the agronomic field. Due to its cylindrical structure and nano-scale, it creates openings in the seed coat, facilitating water entry into the embryo and improving germination. The objective of the project was to evaluate the effect of multi-walled carbon nanotubes functionalized with carboxylic acid (MultiWalled Carbon Nanotubes - MWCNTs) on the germination and vigor of *Clitoria ternatea* seedlings. The seeds were treated with MWCNTs at different concentrations (0, 100, 200, 400, 800 mg L⁻¹), aiming to understand the interaction of MWCNTs with the seeds and seedlings. In the first experiment, intact seeds were subjected to 24 hour imbibition at different concentrations of MWCNTs for evaluation in the germination test. In the second experiment, the seeds were mechanically scarified prior to imbibition in MWCNTs. In the third experiment, nanopriming (200 mg L⁻¹ MWCNTs) and hydropriming (water) were performed on intact and scarified seeds. In the last experiment, both intact and scarified seeds were subjected to chronic exposure to MWCNTs (200 and 800 mg L⁻¹) to assess whether there is toxicity of the product over a longer period of exposure. Germination (%), IVG, normal seedlings (%), fluid movement analysis in the embryo (Biospeckle), and seedling growth parameters through image analysis (GroundEye) were evaluated. MWCNTs (200 mg L⁻¹) in the first and second experiments showed an improvement in seed germination and seedling development, and mechanical scarification proved to be a good method for improving dormancy overcoming and germination speed. In the third experiment, the nanopriming method associated with mechanical scarification achieved 74% germination, the same as that found in hydropriming. However, the seedling characteristics of nanopriming indicate an improvement in growth parameters, indicating an enhancement in seedling vigor. As for the evaluation of toxicity (chronic exposure), it can be affirmed that even at the highest dose (800 mg L⁻¹), there are no harmful effects on the germination and vigor of *Clitoria ternatea* seedlings. Therefore, the use of MWCNTs can be a valuable tool to improve the cultivation of *Clitoria ternatea* and explore its gastronomic and medicinal potential.

Keywords: Cunhã. Nanotechnology in agriculture. Integumentary numbness.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	<i>Clitoria ternatea</i> L.	11
2.2	Propagação e características do cultivo	13
2.3	Superação de dormência	14
2.4	Nanotecnologia na agricultura	15
2.5	Nanotubo de carbono	16
2.6	Análise de imagem e caracterização de sementes	19
2.7	Biospeckle – Laser scanner	19
3	OBJETIVO	20
3.1	Objetivo Geral	20
3.2	Objetivos específicos	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	Caracterização das sementes	20
4.2	Preparo do Nanotubo de carbono	23
4.3	Experimento 1 - Embebição de sementes intactas em nanotubo de carbono ...	23
4.4	Experimento 2 – Embebição de sementes com escarificação mecânica	24
4.5	Experimento 3 – Nanopriming	25
4.6	Espectroscopia de Speckle laser	26
4.7	Experimento 4 – Exposição Crônica	27
4.8	Plântulas anormais	28
4.9	Análise de Plântulas – GroundEye	29
4.10	Análise estatística	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1	Caracterização das sementes	29
5.2	Experimento 1 – Embebição de semente Intacta em nanotubo de carbono	32
5.3	Experimento 2 – Embebição de sementes escarificadas em nanotubo de carbono	36
5.4	Experimento 3 – Nanopriming	39
5.5	Experimento 4 – Exposição crônica de sementes de <i>C. ternatea</i>	45
5	CONCLUSÃO	49
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Clitoria ternatea* L. é uma planta versátil conhecida por sua utilização tradicional na medicina Ayurvédica, como corante alimentar, como cobertura vegetal, na restauração de áreas degradadas, entre outras utilizações. Em todas as partes constituintes da planta, como nas raízes, sementes, flores e folhas tem potencialidade de uso, principalmente nos setores farmacêutico e alimentício (OGUIS et al., 2019).

No Brasil, é principalmente utilizada como forrageira, sendo cultivada no semiárido (BARROS et al., 2004; MARTINS et al., 2012), no entanto, na atual década tem se observado também a popularização do uso terapêutico e gastronômico de suas flores (SITI AZIMA; NORIHAM; MANSHOOR, 2017; MONTEIRO et al., 2020). No entanto há carência de estudos fitotécnicos que encorajam o cultivo em larga escala comercial visando produção satisfatória de flores.

Um ponto importante para o cultivo é ter sementes de boa qualidade. Contudo, a principal dificuldade na propagação da *C. ternatea* são a baixa taxa de germinação de sementes e vigor de plântulas, que são associados à impermeabilidade do tegumento, sendo comum na família Fabaceae (MAKASANA et al., 2017; SHOBHARANI; SUNDARESWARAN, 2018). Portanto o uso de técnicas para quebra de dormência é imprescindível no nessa cultura.

De acordo com a Regra de Análise de Sementes é indicado a escarificação química das sementes de *C. ternatea*, utilizando Ácido sulfúrico até 15 minutos para quebra de dormência (BRASIL, 2009). Este reagente requer um extremo cuidado por ser corrosivo aos tecidos do corpo humano, além de ser nocivo ao meio ambiente, no entanto, quando utilizado o método atinge cerca de 90 % de germinação. Buscando metodologias alternativas à utilização do ácido, a escarificação mecânica é um método eficaz que promove em média 85% na germinação, sendo que a taxa de germinação média de sementes não tratadas é de apenas 13% de sementes germinadas (DIAS, 1996).

O processo de escarificação mecânica pode ser feito de forma manual com auxílio de uma lixa, sendo um processo meticuloso e demorado, mas em comparação com método químico, tem uma metodologia mais sustentável. No entanto, dependendo da região da semente onde é realizada a escarificação, pode causar danos ao desenvolvimento inicial da plântula (DIAS, 1996; SHOBHARANI; SUNDARESWARAN, 2018).

A este respeito, a nanotecnologia vem desempenhando um papel importante na promoção da agricultura sustentável. O uso da nanotecnologia na germinação de sementes e

desenvolvimento de plantas é uma realidade e vem se destacando ao longo dos anos (YOUNIS et al., 2021). As nanopartículas (NPs) são partículas especializadas que possuem uma faixa de tamanho entre 1 e 100 Nm, possuem diferentes composições (Zn, Ag⁺³, Nanotubo de carbono, óxido de grafeno, etc) e características, que vem sendo exploradas para melhorar as condições de cultivo de culturas em geral (ASANDA et al., 2018; SILVA et al., 2019a; TIMOTEO et al., 2019a; PAIVA et al., 2023).

Possui diferentes formas de aplicação na agricultura, com destaques na criação de diversos produtos, como: pesticidas, herbicidas, fertilizantes, micronutrientes, atuando qualidade de sementes, plantas e solo, tem se destacado por ser um processo mais simples, econômico e inovador (TIMOTEO et al., 2019b; SILVA et al., 2019b; SILVA et al., 2019c; YOUNIS et al., 2021).

Na germinação de sementes, as NPs, principalmente à base de carbono na concentração ideal melhoraram a germinação e crescimento das plantas (RASTOGI et al., 2019; KHAN et al., 2020). Esta tecnologia vem sendo utilizada na agricultura e estudos encorajam a sua utilização na condução do manejo de plantas, sendo uma alternativa à utilização de produtos nocivos ao meio ambiente.

A fim de elucidar os entraves sobre sua germinação e desenvolvimento, é importante aferir de forma precisa e rápida sobre a qualidade de sementes. Neste sentido, a técnica de análise por imagens tem sido utilizada para classificações mais eficazes sobre características que influenciam na qualidade fisiológica das sementes (VENORA et al., 2007).

A análise de imagem é uma técnica que tem por objetivo coletar informações quantitativas sobre a morfologia e a estrutura das sementes. Esta técnica é uma ferramenta importante na avaliação da qualidade das sementes, uma vez que permite a identificação de anomalias e imperfeições que podem afetar a germinação (LUZ et al., 2022). Este método vem sendo aplicado em alguns trabalhos utilizando espécies de diferentes segmentos, como no milho (ANDRIAZZI et al., 2020), em feijão (MONDO et al., 2009) e em arbóreas (LIMA et al., 2018).

A dissertação tem como objetivo principal investigar a dificuldade de propagação da espécie *C. ternatea*, utilizando o nanotubo de carbono como uma forma alternativa de tecnologia para melhorar a germinação das sementes, enquanto a técnica de análise de imagem permitirá uma avaliação objetiva da qualidade das sementes e plântulas.

A nanotecnologia pode fornecer resultados significativos para a melhoria da qualidade das sementes e a superação da dormência, tornando-as mais eficientes e viáveis para a produção de mudas. Espera-se que este estudo possa contribuir para a melhoria da qualidade de sementes

de *C. ternatea* e para o avanço na área de pesquisa envolvendo nanotecnologia e análise de imagem.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Clitoria ternatea* L.

A cunhã (*Clitoria ternatea* L.) é uma leguminosa perene, com número cromossômico diploide $2n = 16$ (JOSON; RAMIREZ, 1991). Possui sua origem um tanto controversa, entretanto, o epicentro específico é uma referência à Ilha de Ternate, situada nas Ilhas Molucas do leste da Indonésia, considerada como território nativo. Independentemente da origem nativa, hoje possui conhecimento Pantropical devido a suas diversas potencialidades (COOK et al., 2005).

Pertencente à família da Leguminosae (Fabaceae), tribo Phaseoleae, e subtribo Clitoriinae (COOK et al., 2005). Possui crescimento herbáceo, sendo uma trepadeira volúvel, perene, totalmente glabra, com ramos finos desprovidos de estruturas de fixação, de 2-3 m de comprimento. Folhas compostas imparipinadas, pecioladas, com 3-5 folíolos cartáceos, elipsoides, levemente discolares, de 3,5-6,0 cm de comprimento. Flores curto-pendunculadas, axilares, solitárias ou em curtos racemos de 2-3 flores, de cor azul-violeta com a garganta branca. Frutos do tipo legume deiscente, oblongo e quase reto, de 5-10 cm de comprimento (KINUPP; LORENZI, 2014).

A *Clitoria ternatea* L. é uma planta versátil conhecida por sua utilização tradicional na medicina Ayurvédica, corante alimentar, cobertura vegetal, restauração de áreas degradadas, entre outras utilizações. Vários estudos foram realizados nas raízes, sementes, flores e folhas de *C. ternatea* demonstrando suas potencialidades (OGUIS et al., 2019).

O extrato de raízes possui capacidade neuroprotetora, devido a propriedades ligadas ao aumento da memória do cérebro dos mamíferos, retardando indiretamente a ocorrência de doenças neurodegenerativas (TARANALLI; CHEERAMKUZHY, 2000; RAI et al., 2002; OGUIS, 2019). O estudo sobre cultivo *in vitro* com aplicação de auxina sintética propiciou uma boa produtividade de raízes adventícias, com desenvolvimento rápido comparado ao cultivo da planta em campo. Em análise do extrato das raízes adventícias *in vitro*, demonstrou que possuem metabólitos secundários valiosos, como pentacíclicos, triterpenóides, flavonóides,

fitosterol e ácidos graxos ligados às propriedades de aumento de memória de *C. ternatea* (LEE et al., 2021).

Tem potencial de atividade antimicrobiana em extratos (raízes, folhas, flores e raízes) contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila*. Ou seja, toda a planta tem capacidade antibiótica e pode ser utilizada como medicamento (JAMILL; PA'EE, 2018). Muitas bactérias, vírus e fungos patogênicos são os principais agentes que causam doenças em humanos. Portanto, desenvolver medicamentos naturais, através de extratos de plantas é uma realidade.

Na Índia, a flor é tradicionalmente utilizada no tratamento de problemas respiratórios. O extrato etanólico das flores de *C. ternatea* tem potencial antialérgico e antitússico em animais experimentais (cabras) acometidos com asma alérgica. O estudo revela que o extrato atua com poder antioxidante e antiinflamatório na região da traqueia dos animais e pode ser considerada uma alternativa terapêutica para atenuar os sintomas da asma alérgica (SINGH et al., 2018).

As flores da *C. ternatea* possuem uma quantidade significativa de compostos fenólicos e antocianinas que são consumidas em forma de chá, utilizadas como corantes e no enriquecimento nutricional de diversos alimentos e bebidas (NASCIMENTO et al., 2021). Na flor fresca, são encontrados de 12,0 a 19,0 g de proteína, 6,1 a 8,1 g de gordura, 71,8 g de carboidrato e 3,5 a 5,0 g de fibra, por 100 g de Massa Fresca. Já no que diz respeito aos micronutrientes, há quantidade significativa de K, Mg, Fe, Mn e Cu. Também são encontrados compostos bioativos do tipo flavonóides (123,75 mg. g⁻¹), saponinas e antocianinas (NITHIANANTHAM et al., 2013).

Diante disto, as flores podem ser uma fonte natural de antioxidantes e/ou como possível suplemento na indústria de alimentos e farmacêutica (JEYARAJ et al., 2021). Um estudo sobre a utilização de extrato de flores na parboilização de diferentes variedades de arroz, revela o método como agente de fortificação de fenólicos e flavonóides favorece a retenção de fitonutrientes nos grãos de arroz, tornando-o um alimento funcional (RAMLI et al., 2021).

Uma empresa (Bakery) que produz bolos (pão de ló) apreciados por consumidores de todo o mundo, desenvolveu uma pesquisa com intuito de incorporar mais compostos bioativos para melhorar sua qualidade. Observou-se que a adição de extrato das flores de *C. ternatea* na receita aumentou o teor de polifenóis e atividade antioxidante concomitante com redução da peroxidação lipídica. Os resultados sugerem que o extrato pode ser uma fonte potencial de

compostos benéficos à saúde humana, bem como aumenta a durabilidade dos bolos devido seu potencial antioxidante (PASUKAMONSET et al., 2018).

Foram desenvolvidos filmes (películas) de amido sensíveis ao pH, devido a incorporação de pigmento antocianina extraído da flor de *C. ternatea* (Indicador de pH), funcionando como uma embalagem inteligente. As embalagens foram utilizadas com amostras de camarões armazenadas durante 6 dias, no fim do armazenamento a cor do filme mudou de rosa claro para verde, indicando a deterioração do alimento (MARY et al., 2020).

A utilização de biofilmes com este extrato vem sendo utilizado também para medir a deterioração do leite. Portanto, o filme comestível sensível ao pH pode fornecer de forma didática o monitoramento da qualidade dos alimentos em relação a deterioração dos alimentos, aumentando a segurança na indústria de alimentos (CHO et al., 2021).

2.2 Propagação e características do cultivo

O principal método de propagação é através das sementes, mas também pode ser propagada por estaquia e *in vitro*, e a planta pode ser cultivada com ou sem suporte (MORRIS, 2009). É uma espécie rústica e de fácil cultivo, uma trepadeira que demanda pouco espaço e ainda pode ser consorciada com outras espécies, utilizando o milho como tutor por exemplo (KINUPP; LORENZI, 2014).

A espécie possui raízes profundas, bem adaptada a uma variedade de tipos de solo (pH 5,5-8.9) incluindo solos calcários e argilosos. Sobrevive em locais de chuvas prolongadas ou regiões em períodos prolongados de seca (GOMEZ; KALAMANI, 2003; GUPTA et al., 2010).

Para uma maior longevidade da espécie, é indicado o plantio por sementes. Para alcançar uma maior germinação e maturidade fisiológica, deve ser colhida quando os legumes estão secos e de coloração marrom-claro. Esta cor é importante para a colheita das sementes uma vez que representa um indicador de maior taxa de germinação (TURNOS, 2021). O rendimento de flores e conseqüentemente de sementes está relacionado a densidade de plantas. O espaçamento indicado para uma produção com alto rendimento de sementes é de 25 cm entre plantas e 25 cm entre linhas (CONTRERAS et al., 2012).

A descrição fenológica da espécie é pouco abordada e quase inexistente na literatura, entretanto, foi observado na Venezuela em condições de campo, que a fase vegetativa durou em média 30 dias, marcado pelo desenvolvimento dos primeiros ramos laterais. Aos 45 dias formam os ramos da segunda ordem. A emissão de folhas pentafoliolada (cinco folíolos)

indicam o início da floração, no entanto, isto pode variar de acordo com o manejo e localidade do cultivo (SUÁREZ et al., 2012).

O manejo da espécie utilizando bioinsumos como fertilizante é uma tendência. Quando o cultivo é tratado com diferentes tratamentos biológicos e produtos comerciais destinados a agricultura orgânica, demonstrou bons resultados na produção de biomassa. Tais estudos encorajam a expansão do manejo ecologicamente sustentável (ESPINOZA-CORONEL et al., 2020).

2.3 Superação de dormência

O principal problema encontrado na espécie de *C. ternatea* são as características morfológicas da semente. Apresenta um tegumento à prova d'água (hidrofóbico), resultando em baixo potencial germinativo, mudas heterogêneas, dificultando a semeadura direta (VILLANUEVA AVALOS et al., 2004).

A dormência de sementes é um fenômeno comum em muitas espécies de plantas, incluindo *C. ternatea*, e pode ser causada por fatores externos, como presença de sementes inviáveis ou restrições físicas, ou por fatores internos, como a falta de disponibilidade de reservas de amido e de água (YADAV et al., 2020). Na espécie *Clitoria ternatea*, a dormência de sementes é causada por uma camada de hialoplasma presente na casca das sementes, que impede a absorção de água e a germinação (SHUKLA et al., 2018).

O tratamento químico e mecânico é uma técnica comumente utilizada para superar a dormência de sementes em *Clitoria ternatea* L. Por exemplo, a remoção da camada hialoplasma pode ser feita por imersão em soluções ácidas ou por escarificação mecânica (VERMA; SINGH, 2017).

Foi observado métodos de superação de dormência, onde constatou que escarificação mecânica e tratamento com ácido sulfúrico (tempo máx. 20 min. de imersão) são eficientes na quebra de dormência, com resultados acima de 65% de germinação (DIAS, 1995). Mais recentemente, na Índia, resultados promissores com escarificação química com Ácido sulfúrico por 5 minutos (91% de germinação), no entanto, outros tratamentos com água em diferentes temperaturas demonstraram resultados acima de 70% de germinação (SHOBHARANI, 2018).

Buscando utilizar reagentes alternativos para superação de dormência em *C. ternatea*, em detrimento ao ácido sulfúrico que é muito utilizado, mas que possui natureza sintética e altas taxas injúrias ao embrião ou a má formação de plântulas, um estudo onde se utilizou como

reagente biológico, o ácido húmico, demonstrou taxas de germinação de 75% e 81% quando submetidos a imersão em 12 horas e 24 horas, respectivamente (PINCAY-GANCHOZO et al., 2021).

No entanto, muitos estudos ainda são necessários para entender completamente as causas da dormência e os métodos mais eficazes para superá-la.

2.4 Nanotecnologia na agricultura

A nanotecnologia surgiu na agricultura a pouco tempo, mas tem se destacado como uma nova ferramenta na agricultura sustentável. Soluções de nanomateriais são criados para remediação de solo, água, bem como aliados a fertilizantes e pesticidas, reduzindo a quantidade aplicada e ao mesmo tempo aumentando a produção e qualidade das culturas aliado à preservação do meio ambiente (CAMARA et al., 2019; PEREIRA et al., 2021).

Existem muitas aplicações da nanotecnologia na pesquisa voltadas para o setor agrícola, entre as utilizações, destaca-se o uso na germinação, bem como estimulantes no crescimento e desenvolvimento de plantas (MAHAKHAM et al., 2017; ACHARYA et al., 2020; PEREIRA et al., 2021). Os efeitos dos nanomateriais dependem das propriedades da sua composição, bem como seu tamanho e concentração, que vão determinar respostas biológicas distintas (PÉREZ-DE-LUQUE, 2017; ARCHARYA et al., 2020; PEREIRA et al., 2021).

As nanopartículas geralmente são separadas em dois grupos, sendo estes ativas e carreadoras, quando na forma ativa são utilizadas com finalidade causar efeito biológico, atuando como estimulante, antipatógeno ou ambos. Assim como podem ser carreadoras, que tem como principal característica carregar um ingrediente ativo e liberar para o meio de forma lenta e prolongada (CAMARA et al., 2019; FALSINI et al., 2019; KUMAR et al., 2020; SHAKIBA et al., 2020).

Uma das formas de aplicação da nanotecnologia na germinação de sementes, é por meio da técnica de Nanopriming (Condicionamento fisiológico utilizando nanopartícula). É um método avançado de priming de sementes no qual nanopartículas de tamanho $< 100\text{nm}$ são utilizadas com objetivo de aumentar a porcentagem de germinação de sementes, junto com o vigor de plântulas em diversas culturas (MAHAKHAM et al., 2017; DAWOOD et al., 2018). Além de ser um método simples, cujo sua ação promove uma melhor uniformidade na germinação de sementes, melhor absorção de nutrientes, eficiência no uso da água, resistência

a estresses abióticos, entre outras funcionalidades, mas como objetivo geral almeja-se melhoria na qualidade e desenvolvimento de culturas agrícolas (KATOCH et al., 2022).

Na germinação de sementes, os resultados com nanopartículas ativas do tipo metálicas são promissores, demonstrando serem capaz de melhorar a germinação de sementes, melhorar o crescimento e desenvolvimento das plantas e aumentar os níveis de clorofila e antioxidantes (PEREIRA et al., 2021).

Nanopartículas de ferro e cobre foram usadas para melhorar a germinação de sementes de trigo, cevada e milho, aumentando significativamente a taxa de germinação e o vigor das plântulas (ZHANG et al., 2017). Assim como, nanopartículas de prata têm sido utilizadas para melhorar a germinação de sementes de feijão, aumentando a porcentagem de germinação e a velocidade de emergência das plântulas (SARHAN et al., 2016). O uso de nanopartículas de zinco para tratamento de sementes de alface aumentou significativamente a porcentagem de germinação, a velocidade de emergência e o tamanho das raízes (KONG et al., 2015).

A aplicação foliar de nanopartículas pode modular a comunidade microbiana radicular. Em feijão mungo levou a uma extensão da zona da rizosfera, com aumento do volume da raiz em 58,9%, aumentos na atividade de enzimas da rizosfera, como fosfatase ácida (98,07%), fosfatase alcalina (93,02%) e fitase (108%), sendo estes fatores extremamente importantes para a absorção de nitrogênio e fósforo pelas plantas (RALIYA et al., 2016).

As raízes expostas a nanopartículas de óxido de cério diminuem a comunidade bacteriana da rizosfera, mas aumentam o crescimento de microrganismos que promovem o crescimento das plantas (DAI et al., 2020). No entanto, existem estudos que apontam efeitos colaterais na microbiota do solo após alterações com nanopartículas. As nanopartículas de prata na quantidade de 100 mg kg^{-1} alteraram o pH do solo e afetaram negativamente os microrganismos envolvidos nos ciclos de nitrogênio, carbono e fósforo no cultivo do tomate (ZHANG et al., 2020).

Voltado para temática de melhoramento vegetal, um estudo investigou o papel coativo de nanopartículas de óxido de zinco e rizobactérias promotoras de crescimento em plantas de trigo contra o estresse por calor e seca, foi observado que estes agentes em sinergia, são eficazes para aliviar o estresse tanto do calor isolado, quanto combinado a seca (AZMAT et al., 2022).

2.5 Nanotubo de carbono

Os nanotubos de carbono (NTC) são estruturas nanométricas cilíndricas, formadas por folhas de grafeno enroladas (MASCANGIOLI; ZHANG, 2003), pode apresentar diferentes formas estruturais, podem ser formados por uma única parede, Single-Walled Carbon Nanotubes (SWNT), apresentarem paredes duplas, conhecidos como Double-walled carbon nanotubes (DWCNT), ou mesmo múltiplas paredes, sendo denominados MultiWalled Carbon Nanotubes (MWCNT) (GHORMADE et al., 2011).

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) são estruturas tubulares de carbono capazes de entrar nas células através de orifícios na membrana plasmática e produzir alterações na expressão gênica. Neste sentido, um estudo onde foi comparado a funcionalidade de (MWCNT) em relação a eletroporação (aumento da permeabilidade da membrana) em *Brassica oleracea* var. no transporte de água e nutrientes nas células radiculares, revelou que a ação fisiológica do MWCNT foi semelhante à obtida com eletroporação, ou seja, o MWCNT melhora a absorção de água e nutrientes tanto quanto a técnica da eletroporação (MARTINEZ-BALLESTA et al., 2020).

Existem algumas formas de aplicação de nanotubo de carbono no tratamento de sementes, uma delas é o nanopriming, uma tecnologia avançada de preparação de sementes que melhora a germinação, o crescimento e o rendimento das plantas, conferindo resistência a diferentes estresses. O nanopriming desencadeia uma série de efeitos fisiológicos benéficos, como a formação de nanoporos na parte aérea das plantas, que facilitam a absorção de água (NILE et al., 2022). Além disso, estimula a expressão de genes de aquaporinas, que regulam a ingestão de água e a dispersão de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas membranas celulares. Esse processo também promove a rápida hidrólise do amido, resultando na quebra da dormência das sementes e estimulando a germinação (SHELAR et al., 2023).

Utilizando nanotubo de carbono de parede múltiplas (MWCNT) funcionalizadas com ácidos carboxílicos, foi visto que o componente age na germinação de tomate, penetrando nas sementes, estimula o desenvolvimento da plântula, aumentam a absorção de água, resultando em plantas de tomate com o dobro de número de flores e frutos em comparação com o controle (KHODAKOVSKAYA et al., 2009, RATNIKOVA et al., 2015).

Recentemente, um estudo com nanopriming de sementes utilizou MWCNT na concentração de 20 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contribuiu na quebra de dormência de sementes de duas espécies nativas da floresta boreal de terras altas (*Alnus viridis* L. e *Shepherdia canadensis* L.). Observou-se que o nanoprming de sementes com MWCNT, seguido de estratificação à frio, foi

eficaz em melhorar a germinação para 90% em *Alnus viridis* L. em comparação à 60% do controle em ambas concentrações utilizadas. Na outra espécie, a combinação de MWCNT, estratificação a frio, escarificação mecânica e condicionamento hormonal (Ácido giberélico) em sementes de *Shepherdia canadensis* L., obteve também uma germinação acima de 90% em relação ao controle (ALI et al., 2020).

Em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) tratadas com MWCNT observou-se uma germinação precoce, crescimento e desenvolvimento do sistema radicular de forma rápida, que facilitou e otimizou a absorção de água e nutrientes durante seu desenvolvimento melhorando significativamente o rendimento de grãos por planta de 1,53 para 2,5 g, um aumento de 63% (JOSHI et al., 2018).

Um estudo que buscou avaliar o desenvolvimento de microorganismos, especificamente o *Mesorhizobium loti* em associação simbiótica com a leguminosa *Lotus japonicum*, utilizou Nanotubo de carbono de parede simples (SWNT), óxido de grafeno, MWCNT e carvão ativado. Foi observado que o uso de MWCNT aumentou o número de nódulos e a atividade da nitrogenase na interação rizóbio-planta em plantas tratadas com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de MWCNT, enquanto SWNT e óxido de grafeno inibiu a produção de nódulos e crescimento da planta (YUAN et al., 2017).

Nem sempre os efeitos do NTC são benéficos, como relatado neste estudo, que investigou o efeito de dois tipos de NTC, de MWCNT bruto e MWCNT funcionalizado com ácido carboxílico em espécies de gramíneas (Capim-rabo, capim-comum e festuca-dos-campos), detectou que ambos os tipos de NTC inibiram a germinação de sementes em todas as gramíneas tratadas com a concentração de $16,7 \text{ mg mL}^{-1}$. Assim como a suplementação do solo com MWCNT funcionalizado com ácido carboxílico diminuiu significativamente o rendimento de matéria seca em todas as gramíneas estudadas (GALA-CZEKAJ et al., 2017).

Neste estudo, com sementes de *Hyoscyamus niger* que foram expostas a diferentes concentrações ($50\text{-}800 \mu\text{g mL}^{-1}$) de SWNT sob diferentes níveis de estresse hídrico (0,5-1,5 MPa) por 14 dias, demonstrou que as sementes submetidas à seca apresentaram redução na porcentagem de germinação, no vigor e no comprimento das raízes e da parte aérea. Porém, quanto tratadas com SWNT na concentração de 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ aliviou significativamente o estresse hídrico durante a germinação e nos atributos de crescimento. Os resultados indicaram que o tratamento com baixas concentrações de SWNT pode melhorar a tolerância em mudas em condição de seca, aumentando a absorção de água e ativando o sistema de defesa da planta (HATAMI et al., 2017).

2.6 Análise de imagem e caracterização de sementes

A avaliação do potencial fisiológico das sementes e outros testes comuns para avaliação da qualidade utilizados em laboratórios, pode ser realizada por meio da técnica de análise de imagens, recentemente aprimorada e não destrutiva ao material (sementes), além de ter alta precisão, confiabilidade e agilidade (ANDRADE et al., 2016).

No Brasil, um sistema denominado GroundEye®, que possui diversas funções, dentre elas a avaliação da qualidade física e fisiológica de sementes. O equipamento funciona através da análise de imagens de alta resolução obtidas pelo próprio equipamento, que permitem extrair informações de cor, textura e geometria, servindo como parâmetro para o fornecimento dos índices de crescimento, uniformidade e vigor de plântulas (MANUAL GROUNDEYE, 2016).

A técnica de imagens pode ser utilizada para estimar a germinação, avaliar o vigor de sementes, o crescimento de plântulas e os ataques por patógenos e insetos; identificar as cultivares com mais facilidade; avaliar a pureza física das sementes; determinar as diferentes cores das sementes e os danos mecânicos; e classificar os tamanhos das sementes (GOMES JUNIOR et al., 2009).

2.7 Biospeckle – Laser scanner

A técnica de análise de imagem Biospeckle é utilizada para avaliar a dinâmica de sistemas biológicos e materiais, incluindo células, tecidos, plantas e alimentos. Essa técnica é baseada na medição da variação da interferência da luz em diferentes regiões da amostra, resultando em imagens construídas a partir desses dados. Para a realização dessa técnica, são necessários diversos componentes, como fontes luminosas, lentes, filtros e dispositivos de captura de imagem, que permitem a geração e a captura da interferência da luz gerada pela amostra (BRAGA, 2016).

A abordagem não invasiva, rápida e sensível do equipamento torna-o uma técnica vantajosa em relação a outros métodos de análise, pois não requer marcadores ou contrastes e possibilita o monitoramento em tempo real (OLIVEIRA et al., 2018). Seu uso tem sido amplamente descrito na literatura científica para avaliar diversos sistemas biológicos, incluindo a identificação de doenças em plantas (NASCIMENTO et al., 2015), a avaliação da qualidade de alimentos (SILVA et al., 2016) e a monitoração da dinâmica celular em culturas de células (COSTA et al., 2017).

Especificamente na avaliação de sementes, o Biospeckle tem sido amplamente explorado para monitorar o processo de germinação, determinar o tempo de germinação, avaliar o vigor e a qualidade das sementes e identificar sementes com danos ou desordens fisiológicas (ALMEIDA et al., 2019). Essa técnica pode ser útil para avaliar a qualidade de sementes de diferentes espécies, fornecendo informações quantitativas sobre a dinâmica da germinação e da absorção de água, além de ser uma técnica não invasiva, rápida e sensível (SOUZA et al., 2020).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização física das sementes de *C. ternatea*, avaliar a influência do nanotubo de carbono na germinação e analisar as plântulas através da ferramenta de análise de imagem.

3.2 Objetivos específicos

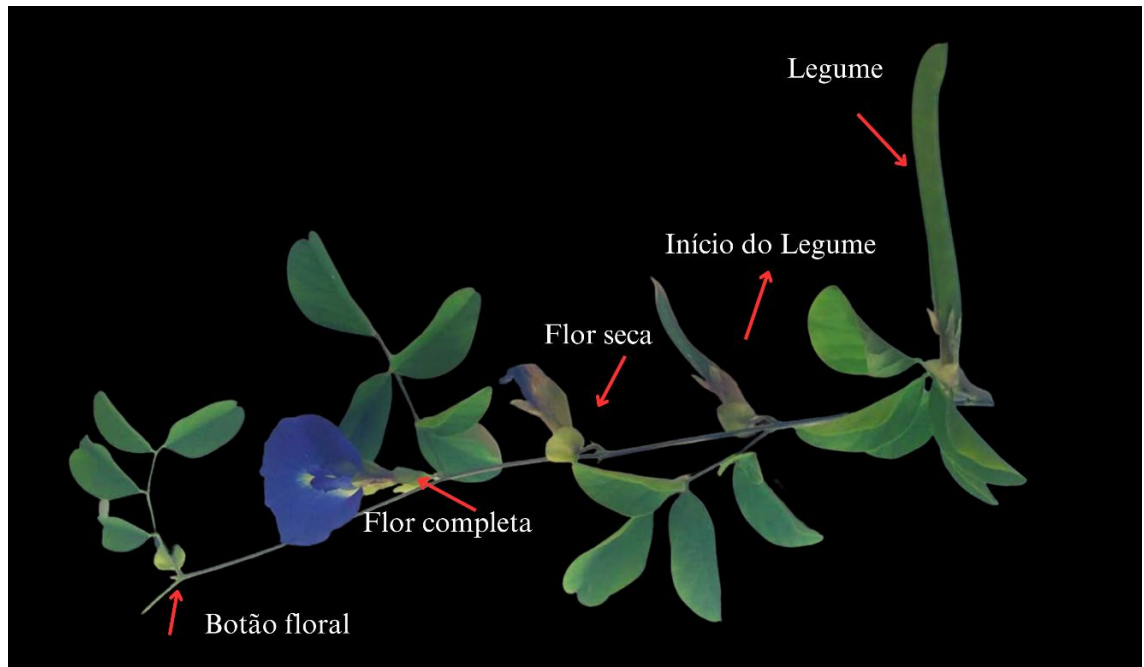
- Analisar e classificar quanto a qualidade das sementes e plântulas;
- Avaliar o efeito da utilização do nanotubo de carbono na germinação;
- Avaliar o efeito da escarificação em conjunto com o nanotubo de carbono na germinação;
- Analisar o efeito da exposição crônica das sementes de *C. ternatea* ao MWCNT;
- Vigor de plântulas após exposição ao MWCNT.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização das sementes

As sementes de *Clitoria ternatea* L. foram colhidas de plantas matrizes, utilizadas no paisagismo na Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) campus Sinop. As plantas matrizes estavam saudáveis e em pleno desenvolvimento. As sementes foram coletadas de plantas na fase reprodutiva que apresentavam botões, flores e legumes no mesmo período fenológico (Figura 1). Ao todo foram utilizadas 5 matrizes para a coleta dos legumes.

Figura 1 – Ramo de *Clitoria ternatea* L. apresentando desde o botão floral até o desenvolvimento do legume.



Fonte: Da autora (2023)

Os legumes que foram colhidos se apresentavam maduros, com objetivo de obter o máximo potencial fisiológico da semente (Figura 2). A coleta ocorreu no mês de agosto de 2022 e as sementes foram armazenadas sob refrigeração até o momento das análises.

Figura 2 – Legume no ponto de colheita com coloração marrom-claro.



Fonte: Da autora (2023)

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Sementes da UFLA. Onde primeiramente, foi realizada a captura de imagens do lote de sementes pelo equipamento GroundEye para caracterização e avaliação das sementes. Na bandeja do equipamento, uma amostra de 100 sementes foi disposta, de modo que ficassem separadas entre si para captura da imagem para obter os parâmetros: Dominância de Cor, Geometria, Diâmetro e Perímetro.

O equipamento é devidamente calibrado para selecionar a diferença de cores, geometria, diâmetro e perímetro presente na amostra. Cada semente é destacada no visor do computador acoplado ao equipamento, que permite identificar qual semente ela representa na amostra. Posteriormente a leitura e captura de imagem do lote, é originado um relatório com os dados individuais de cada semente representada na amostra.

Para determinar o peso de mil sementes, foi feita contagem das sementes manualmente, sendo 8 repetições de 100 sementes cada, para determinar o peso médio, depois foi utilizada a fórmula onde o peso da amostra é multiplicado por 1000 e dividido pelo número de sementes.

Para o teste de umidade, 5 amostras de 20 sementes foram dispostas em cadinhos de metal, pesadas e colocadas em estufa 105 °C por 24 horas, posteriormente foram retirados e colocados em dessecador com sílica gel, após 10 minutos foi realizado a pesagem novamente.

4.2 Preparo do Nanotubo de carbono

A solução estoque foi preparada utilizando 1 g de nanotubo de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com ácido carboxílico (CTNano-UFGM) e 1 L de água destilada, que foram colocados em béquer, para compor a solução estoque contendo 1000 mg L^{-1} de MWCNT. A solução foi levada ao sonicador (Brenson – Digital Sonifier®, modelos 250 & 450) com amplitude 50% de 15 minutos, por 3 vezes. Após a homogeneização da solução estoque (pH 5,5), a mesma foi colocada em frasco âmbar, protegido com papel alumínio e mantida sob refrigeração até a utilização. O papel alumínio tem função de proteção contra luz, visto que a solução é muito sensível e pode precipitar o NTC com facilidade com a luminosidade.

Através da solução estoque (1000 mg L^{-1} de MWCNT) foi realizada a diluição em água destilada para obtenção dos tratamentos de 100 mg L^{-1} ; 200 mg L^{-1} ; 400 mg L^{-1} ; 800 mg L^{-1} .

4.3 Experimento 1 - Embebição de sementes intactas em nanotubo de carbono

As soluções de MWCNT foram transferidas para um Erlenmeyer, protegido da luz com auxílio de papel alumínio e em seguida as sementes destinadas a cada tratamento. As sementes foram mantidas na forma intacta (sem escarificação). Por sequência, foram colocadas em imersão nas soluções de MWCNT e água destilada na B.O.D. de condicionamento fisiológico, sob aeração constante, para embebição das sementes, com temperatura controlada de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de 24 horas (MISHRA et al., 2004; CAMPBELL, 2020). Após este período, as sementes foram retiradas do Erlenmeyer e ligeiramente lavadas para retirar o excesso de MWCNT e colocadas sob papel para absorver o excesso de umidade aparente.

Para o teste de germinação, o experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, tendo um total de 6 tratamentos, sendo eles: Semente intacta sem embebição; Embebição em água destilada; Embebição em MWCNT 100 mg L^{-1} ; Embebição em MWCNT 200 mg L^{-1} ; Embebição em MWCNT 400 mg L^{-1} ; Embebição em MWCNT 800 mg L^{-1} . Todos os tratamentos de embebição foram realizados por 24 horas.

A bancada foi organizada e limpa com álcool 70%, o teste de germinação foi realizado sob papel, utilizando o papel Germitest. O papel foi pesado e teve 2,5 vezes do seu peso em água destilada para hidratação do mesmo. Em seguida, foram montados os testes sob o papel,

com 4 repetições de 50 sementes por tratamento, na forma de rolos para cada repetição e identificados de acordo com o tratamento. Por fim, os rolos do teste de germinação foram montados e colocados em pé, em um ângulo de 30° na prateleira do germinador com 25 °C de temperatura.

A metodologia foi realizada seguindo a Regra de Análise de Sementes (2009), com as especificações referente a espécie e adaptações quanto a primeira e segunda contagem, que foram realizadas com 5 e 10 dias após semeadura, e contagem final no 15° dia, onde foi estipulado o número de plântulas normais e anormais.

Foi calculado o índice de velocidade de germinação (IVG) através da equação 1:

$$(1) \text{IVG} = (N1/1) + (N2/2) + \dots + Nn/n$$

Onde: Nn = número total de sementes germinadas; n = intervalo de tempo.

Fonte: BRASIL (2009)

4.4 Experimento 2 – Embebição de sementes com escarificação mecânica

A condução experimental para realizar este estudo foi semelhante ao Experimento 1, porém, neste experimento as sementes foram previamente escarificadas de forma mecânica, com auxílio de uma lixa de parede n° 3, na região da extremidade nas sementes, totalizando 1.200 sementes escarificadas nesta condição, mantendo as mesmas concentrações de MWCNT referentes ao Experimento 1. Posteriormente, as sementes já escarificadas foram mantidas em imersão nas soluções de MWCNT (0 mg L⁻¹; 100 mg L⁻¹; 200 mg L⁻¹; 400 mg L⁻¹; 800 mg L⁻¹) de condicionamento fisiológico sob aeração constante para embebição das sementes, com temperatura controlada de 25 °C por um período de 24 horas. Por fim, os rolos do teste de germinação foram montados e colocados em pé, em um ângulo de 30° na prateleira do germinador com 25 °C de temperatura.

A montagem do teste de germinação seguiu as mesmo delineamento experimental que o Experimento 1. Para este experimento também foram avaliadas a primeira e segunda contagem de germinação, IVG e plântulas normais e anormais. A metodologia foi realizada seguindo a Regra de Análise de Sementes (2009), com as especificações referente a espécie e adaptações quanto a primeira e segunda contagem, que foram realizadas com 5 e 10 dias após semeadura, e contagem final no 15° dia.

4.5 Experimento 3 – Nanopriming

As sementes foram separadas em dois grupos, onde um passou por escarificação com lixa e outro não. As sementes foram escarificadas com lixa d'água nº 100 na região da extremidade da semente onde se encontra os cotilédones.

Para o teste de germinação, o experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com um esquema fatorial duplo de 2x2, sendo o fator primário a presença e ausência da escarificação, e fator secundário hidropriming e nanopriming. O tratamento que envolve o Nanopriming foi na concentração de 200 mg L⁻¹, por ser o melhor resultado dos experimentos anteriores. Portanto os tratamentos foram: Semente Intacta + Hidropriming; Semente escarificada + Hidropriming; Semente Intacta + Nanopriming (200 mg L⁻¹ de MWCNT); Semente escarificada + Nanopriming (MWCNT 200 mg L⁻¹). Utilizando 10 sementes com 5 repetições por tratamento, totalizando 200 sementes.

Primeiramente, em cada tratamento obteve-se o peso inicial das sementes com auxílio de uma balança analítica. Em seguida, foi realizada a preparação da solução de nanotubo de carbono na concentração de 200 mg L⁻¹ para os tratamentos de nanopriming. Para o condicionamento fisiológico, foram utilizados frascos Erlenmeyer com volume de 300 mL de solução respectiva para cada tratamento, onde ficaram por 24 horas sob temperatura de 25 °C, conforme foi realizado no Experimento 1 e 2.

Após o período do condicionamento fisiológico, as sementes foram levemente lavadas com água destilada, e secas em papel absorvente por cerca de 10 minutos para diminuir a umidade aparente. Neste momento, foram separadas cerca de 5 sementes de cada tratamento em estado túrgido (embebidas), colocadas em recipiente de polietileno para manter a umidade para serem avaliadas no equipamento Biospeckle. O restante das sementes, com finalidade do teste de germinação, foi obtido o peso úmido, em sequência, colocadas em saquinho de papel pardo e identificadas.

O próximo passo foi a secagem das sementes que estavam embebidas, onde foram colocadas em estufa de circulação forçada do ar, com temperatura de 30 °C até atingir em média 11% de umidade na semente, sendo uma umidade recomendada para Fabaceae. Para aferir este dado, foi realizado pesagens para acompanhar a umidade através de uma curva de secagem utilizando o peso inicial, o peso úmido e 2 pesagens para verificar a umidade, este processo demorou em torno de 28 horas.

No dia seguinte, as sementes com 11% de umidade seguiram para o teste de germinação. O teste foi realizado em caixa gerbox transparente, utilizando 5 caixas por tratamento. Foram utilizadas 2 folhas de papel mata-borrão em cada gerbox, em seguida, foi estipulado o peso do papel de cada tratamento para obter o valor de água a ser colocado 2,5 vezes o seu peso.

Os papéis de cada tratamento ficaram sob imersão em água por 15 minutos, em sequência foram dispostos na gerbox, contendo 10 sementes espaçadas equidistantes. As gerbox foram vedadas com auxílio de plástico filme e identificadas com caneta retroprojetor de acordo com seu tratamento, por fim foram colocadas na B.O.D., com período de luz intermitente e temperatura de constante de 25 °C.

As sementes foram avaliadas de acordo com o número de sementes germinadas a partir do 4º dia de teste e com número de plântulas normais e anormais no 10º dia. Diferentemente dos outros experimentos, a avaliação teve que ocorrer num período precoce (4º e 10º dia), visto que as plântulas quando se desenvolvem na caixa gerbox tem um crescimento mais rápido em comparação ao teste de germinação feito com papel germitest, além disto, a caixa é transparente e facilita a contagem de germinação sem precisar abrir a mesma.

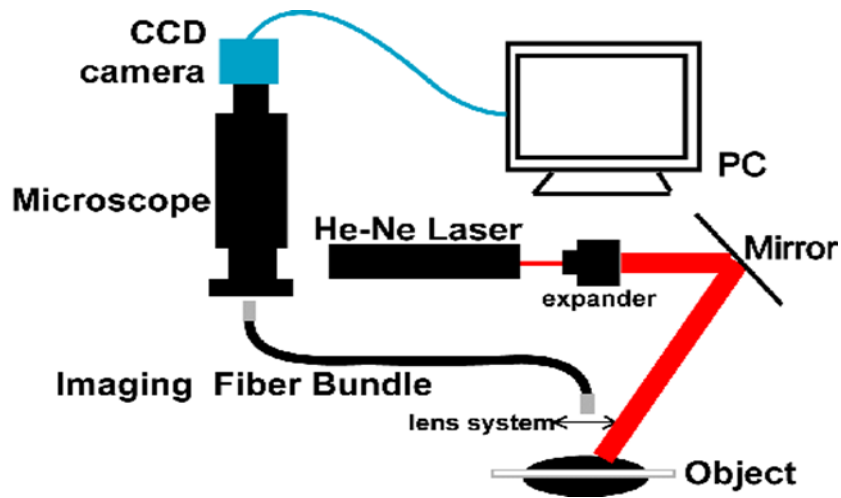
4.6 Espectroscopia de Speckle laser

Esta análise foi realizada no laboratório do Centro de Desenvolvimento e Instrumentação Aplicada à Agropecuária (CEDIA), da Universidade Federal de Lavras (MG), com as sementes que passaram pelo processo de embebição por 24 horas e se encontram túrgidas. Em cada tratamento, tinha um total de 5 sementes que foram submetidas a avaliação no Equipamento BioSpeckle.

Foi realizado a retirada do tegumento, assim como é realizado no teste tetrazólio, em seguida foi feita a retirada de um dos cotilédones com auxílio de lâmina e pinça, deixando somente um cotilédone e o embrião completo.

A semente foi posicionada em um pequeno apoio na incisão do laser e enquadrada para a leitura da imagem. São utilizados uma câmera CCD (Dispositivo de Carga Acoplada), um microcomputador para captura dos dados, e outro para o processamento das imagens com processador core i3 e 4 GB de memória RAM, um laser HeNe vermelho (632 nm) de 10 mW de potência e mesa óptica com sistema anti-vibração dispostos, como demonstrado na figura 3.

Figura 3 – Arranjo dos aparelhos experimentais durante a aquisição das imagens e iluminação por meio do laser.



Fonte: Singh et al. (2021)

O equipamento registrou 128 imagens durante o tempo de leitura e criou um padrão da movimentação do fluido que está ocorrendo dentro da semente. As imagens foram processadas e criados gráficos AVD (Absolute Value of the Differences) que corresponde a uma representação gráfica utilizada na análise do biospeckle, sendo um valor adimensional. O gráfico AVD é usado para avaliar a dinâmica da luz no interior da amostra (semente), explicando parâmetros como estado fisiológico, viabilidade, germinação, vigor e qualidade (BRAGA et al., 2016).

4.7 Experimento 4 – Exposição Crônica

O processo de escarificação de alguns tratamentos foi semelhante ao experimento 3. O tratamento que envolve o uso de MWCNT foi com a melhor concentração encontrada nos experimentos anteriores (200 mg L^{-1}) e acrescentou-se a maior concentração (800 mg L^{-1}) afim de observar se há efeito de toxicidade na germinação e plântulas, em exposição ao produto por um maior período de tempo.

O experimento teve um total de 6 tratamentos, sendo eles: Semente Intacta (SI) + Papel embebido de água destilada (H_2O); Semente com escarificação mecânica (EM) + Papel H_2O ; SI + Papel com MWCNT 200 mg L^{-1} ; EM + Papel com MWCNT 200 mg L^{-1} ; SI + Papel com MWCNT 800 mg L^{-1} e EM + Papel com MWCNT 800 mg L^{-1} .

Para o teste de germinação, utilizou-se 10 sementes com 5 repetições por tratamento, totalizando 300 sementes. O teste foi realizado em caixa gerbox transparente, onde foram utilizadas 2 folhas de papel mata-borrão em cada gerbox, em seguida, foi estipulado o peso do papel de cada tratamento para obter o valor de solução a ser colocado 2,5 vezes o seu peso.

Os papéis de cada tratamento ficaram sob imersão em solução respectiva por 15 minutos, em seguida foram dispostos na gerbox, contendo 10 sementes espaçadas equidistantes. As gerbox foram vedadas com auxílio de plástico filme e identificadas com caneta retroprojeter de acordo com seu tratamento, por fim foram colocadas na B.O.D., com período de luz intermitente e temperatura de constante de 25 °C.

A primeira contagem foi realizada no 4º dia e última contagem com 10 dias após implantação, onde foi determinado a porcentagem de sementes germinadas. A metodologia do teste de exposição crônica seguiu a descrição de Amâncio et al. (2020) com modificações para adequação da espécie.

4.8 Plântulas anormais

Para todos os experimentos realizados, na última contagem, além das plântulas normais foram classificadas as plântulas anormais, de acordo com a R.A.S (BRASIL, 2009). Foi adotado o modelo destinado a dicotiledôneas, tendo como referência a *Glycine Max* (Soja), que é uma Fabaceae, assim como a *Clitoria ternatea*.

Os critérios que determinaram anormalidade nas plântulas foram: Plântulas danificadas, com qualquer uma das suas estruturas essenciais ausentes ou tão danificadas que não possa ocorrer desenvolvimento proporcional; Plântulas Deformadas, quando apresentam desenvolvimento fraco, ou com distúrbios fisiológicos, ou com estruturas essenciais deformadas, ou desproporcionais; Plântulas Deterioradas, com qualquer uma de suas estruturas essenciais muito infectadas ou muito deterioradas, como resultado de uma infecção primária (da própria semente), que comprometa o seu desenvolvimento normal (BRASIL, 2009).

4.9 Análise de Plântulas – GroundEye

Na última contagem de todos os experimentos foram selecionadas plântulas ao acaso em cada tratamento para captura de imagens no GroundEye para caracterização e avaliação. Foram selecionadas 3 plântulas de cada repetição por tratamento.

Após a seleção das plântulas ao acaso, as mesmas foram mantidas em papel toalha umedecido para evitar escurecimento do vegetal até o momento da obtenção das imagens. As plântulas foram colocadas na bandeja do equipamento de forma espaçada equivalente, em seguida foi realizada a captura das imagens.

O modelo para análise das imagens foi adaptação do modelo utilizado para plântulas de Soja, visto que tem características das plântulas são bem semelhantes. O modelo conseguiu representar o que era hipocótilo e raiz primária de maneira eficaz, no entanto, algumas imagens tiveram que ser editadas “manualmente” de acordo com a condição real das plântulas.

Após a captura das imagens, foi gerado um relatório com as medidas dos parâmetros de: Comprimento da raiz primária, comprimento do hipocótilo, razão da raiz primária pelo hipocótilo, comprimento total, raízes secundárias e número de raízes secundárias. O relatório foi extraído e analisado estatisticamente comparando os tratamentos.

4.10 Análise estatística

Os dados dos testes de germinação e análise de plântulas foram submetidos à análise de variância, com nível de significância de 5%, sendo significativo, os dados foram comparados utilizando o teste Scott-Knott. As análises foram executadas com o auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das sementes

O peso de mil sementes foi de 44 gramas e a umidade do lote de sementes foi de 5,8%. As sementes possuem esta umidade com porcentagem baixa, devido ao ponto de maturação das sementes, visto que foram colhidas em fase de legume maduro, com coloração marrom claro (Figura 4). Além disto, como há uma dormência tegumentar, isto reforça a capacidade hidrofóbica das sementes em relação a umidade (SHUKLA; VERMA, 2012; TURNOS, 2021).

Por meio da análise visual foi possível observar a diferença no tamanho e coloração das sementes, o que pode caracterizar uma heterogeneidade do lote (Figura 4). Os legumes de *C. ternatea* são achatadas e lineares oblongas com tamanho de 4 a 13 cm de comprimento e 0,9 a 1,2 cm de largura, cada legume possui entre 6-10 sementes (MUKHERJEE et al., 2008). Observando os legumes do lote de sementes utilizado neste trabalho, pode-se dizer que têm

parâmetros semelhantes de comprimento e em média a mesma quantidade de semente por legume encontrados na literatura.

Figura 4 – Legume e sementes maduras de *C. ternatea*



Fonte: Da autora (2023)

Afim de aferir de maneira mais precisa sobre as características das sementes da *C. ternatea*, foram extraídos dados através da técnica de análise de imagem com auxílio do equipamento GroundEye, os parâmetros avaliados estão no Quadro 1 e Figura 5.

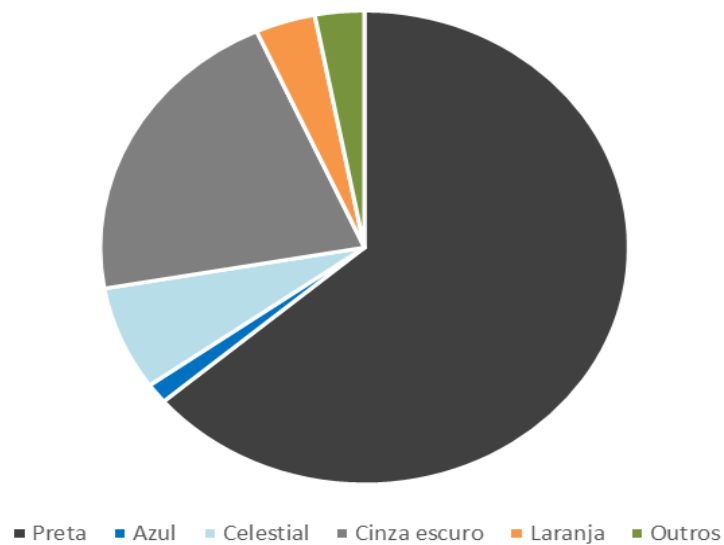
Quadro 1 – Características geométricas das sementes da espécie *Clitoria ternatea* L.

Características	Valores médios
Área (cm ²)	0,19
Esfericidade da forma	16,23
Comprimento (cm)	0,58
Largura (cm)	0,36
Perímetro (cm)	1,75

Fonte: Da autora (2023)

Estas características fornecidas com o equipamento GroundEye, permitiu aferir que a esfericidade da forma prevê que a semente tem um formato oblongo. Isto se confirma quando o comprimento é maior que a largura, que no caso deste lote, o comprimento das sementes teve em média 5.8 mm e largura de 3.6 mm. Na literatura, estes dados são rasos e inconsistentes, porém é possível afirmar que as sementes têm entre 5-7 mm de comprimento e 3- 4 mm de largura (JAMILL et al., 2018), o que confirma os resultados obtidos pela análise de imagem.

Figura 5 – Dominância de cor de sementes de *C. ternatea*.



Fonte: Da autora (2023)

Nesta amostra do lote de sementes, a predominância de coloração de sementes foi preta e seguido de cinza-escuro, demonstrando que mais de 80% das sementes têm tegumento escuro.

As sementes de *Clitoria ternatea* apresentam variações na coloração do tegumento das sementes, sendo que essa heteromorfia é comumente observada em gêneros da família Fabaceae. Essa característica está associada à qualidade fisiológica das sementes, sendo que a diferença na coloração pode indicar o estágio de maturação. Por essa razão, o índice morfológico visual pode fornecer informações valiosas sobre a maturidade fisiológica das sementes (CASTELLANI et al., 2009).

Em sementes de *Crotalaria ochroleuca* L., pertencente à família Fabaceae, possui variabilidade na coloração das sementes. As sementes de cor vermelha apresentam germinação e IVG baixo. Paralelo a isto, sementes de coloração cinza possuem altos valores nos mesmos

parâmetros, indicando que a cor do tegumento influencia na qualidade fisiológica da semente e seu poder germinativo (SILVA et al., 2016).

Como não foi realizado um teste de germinação para cada tipo de cor encontrada no lote de sementes, não foi possível afirmar que as sementes pretas e cinza-escuro efetivamente têm maior poder germinativo.

5.2 Experimento 1 – Embebição de semente Intacta em nanotubo de carbono

Após a embebição, as sementes de *C. ternatea* foram submetidas ao teste de germinação e após 5 dias e 10 dias foi constatado que o tratamento de 200 mg L⁻¹ MWCNT induziu a maior germinação (%) em relação aos demais tratamentos, com 17% e 28% das sementes germinadas respectivamente (Tabela 1). Os tratamentos que induziram as menores porcentagens de germinação aos 5 e 10 dias foram as sementes sem embebição, embebidas em água e com 800 mg L⁻¹ MWCNT. Para todos os parâmetros avaliados (IVG e porcentagem de plântulas normais) as sementes tratadas com 200 mg L⁻¹ MWCNT apresentaram os melhores resultados.

Tabela 1 – Parâmetros germinativos e plântulas normais. Os tratamentos com médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de significância para germinação de *C. ternatea*.

Tratamentos	Germinação com 5 dias (%)	Germinação com 10 dias (%)	IVG	Plântulas normais (%)
Sem Embebição	2 ± 0,00 C	7 ± 0,25 D	0,52 ± 0,03 C	7 ± 0,48 D
Embebição em H ₂ O	4 ± 0,48 C	7 ± 0,48 D	0,67 ± 0,14 C	8 ± 0,41 D
100 mg L ⁻¹ MWCNT	6 ± 0,00 B	13 ± 0,48 B	1,22 ± 0,05 B	12 ± 0,48 B
200 mg L ⁻¹ MWCNT	17 ± 0,65 A	28 ± 0,71 A	3,1 ± 0,20 A	22 ± 0,48 A
400 mg L ⁻¹ MWCNT	8 ± 0,48 B	10 ± 0,48 C	1,22 ± 0,10 B	9 ± 0,29 C
800 mg L ⁻¹ MWCNT	5 ± 0,48 C	6 ± 0,41 D	0,75 ± 0,12 C	6 ± 0,00 D

Fonte: Da autora (2023)

A germinação de sementes é influenciada por diversos fatores, tais como a disponibilidade de água, acesso a oxigênio, temperatura adequada e intensidade de luz. O uso

de MWCNT pode resultar em um aumento na germinação devido à sua habilidade em melhorar a absorção de água (NASCIMENTO et al., 2019). A partir dos dados estatísticos expressos na tabela, pode-se concluir que a concentração de 200 mg L⁻¹ MWCNT teve o maior impacto positivo na germinação (28%), IVG (3.1) e porcentagem de plântulas normais (22%).

Em um estudo com sementes de cevada, soja e milho tratadas com MWCNT mostraram que a melhora na germinação está associada ao aumento da expressão de genes de aquaporinas, que são responsáveis pelo transporte seletivo de moléculas de água, e ao mesmo tempo prevenindo a passagem de íons e outros solutos (KHODAKOVSKAYA, 2009). No entanto, a dormência tegumentar presente nas sementes de *C. ternatea* não foi quebrada de forma representativa pelo MWCNT, visto que a germinação foi baixa. Neste sentido entende-se que há indícios de melhora na germinação das sementes tratadas com 200 mg L⁻¹ MWCNT, mas não suficiente para a superação da dormência de forma expressiva pela forma que foram expostas.

Em um estudo, que utilizou MWCNT funcionalizado com ácido carboxílico, MWCNT bruto e óxido de grafeno, para aliviar a dormência das sementes e melhorar a germinação das sementes em duas espécies de turfeiras boreais (*Betula pumila* L. e *Rhododendron groenlandicum* L.). Foi demonstrado que em sementes *Betula pumila* L. tratadas com 20 ou 40 µg mL⁻¹ de MWCNT funcionalizado com ácido carboxílico apresentaram uma melhor germinação (75%) em relação ao controle (40%). Já em sementes de *Rhododendron groenlandicum* L., tratadas com todos os tipos de MWCNT e óxido de grafeno avaliado apresentaram mais de 90% de germinação, sendo superior as sementes não tratadas (controle - 80% de germinação) (ALI et al., 2020).

Um estudo na espécie *Sorbus luristanica* Bornm., mostrou que a técnica de embebição por 24 horas com MWCNT na concentração de 350 mg L⁻¹ auxiliou na quebra de dormência presente nas sementes desta espécie, além disto melhorou os parâmetros de germinação e plântulas (PILEHVAR et al., 2018).

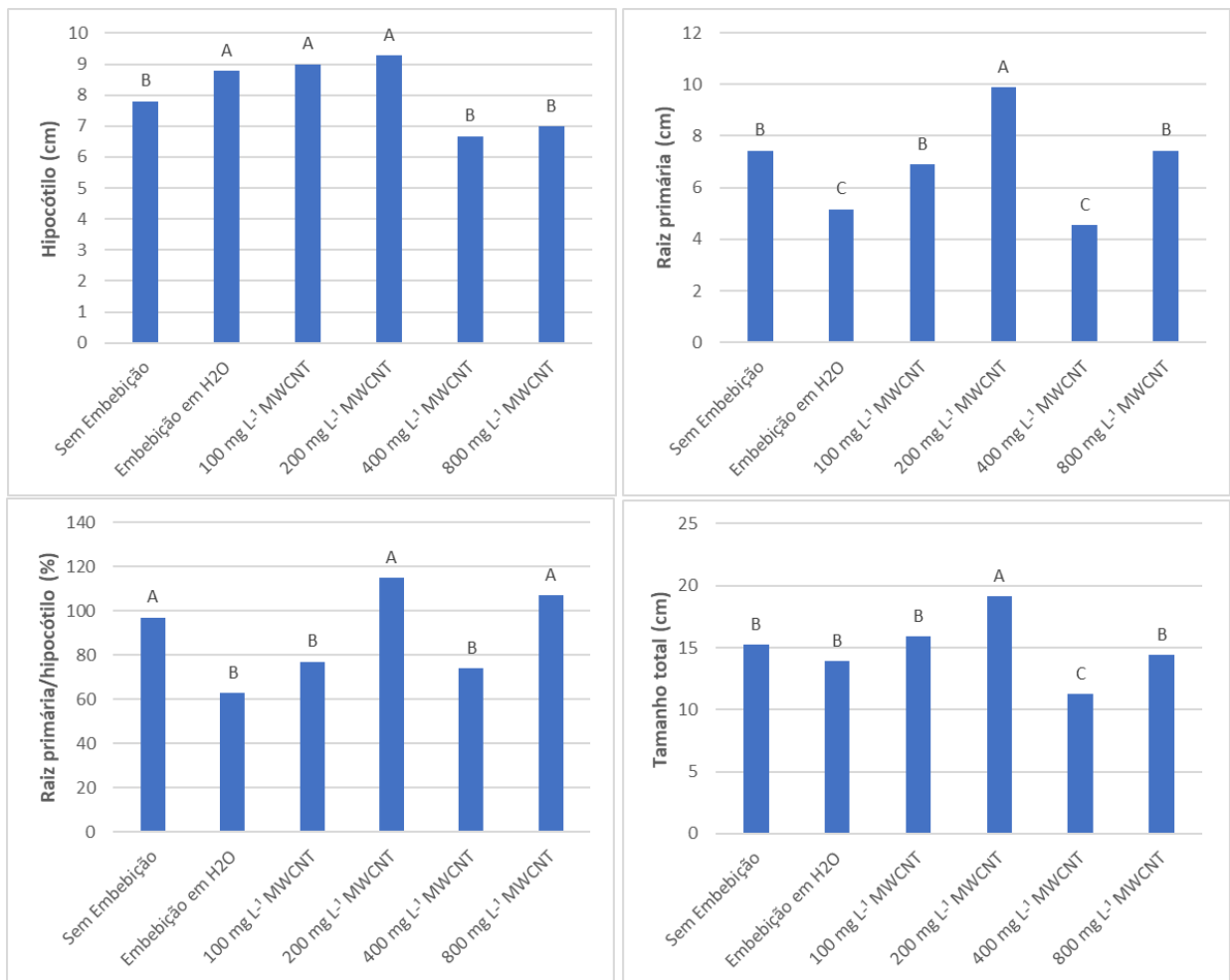
Vale destacar, que os resultados neste trabalho indicam que a presença de MWCNT na concentração avaliada (800 mg L⁻¹) não interfere no processo germinativo, visto que a porcentagem de germinação é igual ao tratamento sem a adição do MWCNT.

Mesmo com os devidos cuidados com desinfestações na mesa, utensílios e uso de EPI para prevenir contaminações, no tratamento com 400 mg L⁻¹ e 800 mg L⁻¹ ocorreu uma proliferação de fungo (não-identificado) nos rolos, que danificou muitas plântulas e ocasionou a podridão de algumas sementes e baixa porcentagem de plântulas normais.

Diferentemente do esperado, os tratamentos com as maiores doses de MWCNT tiveram maior proliferação de fungo durante a germinação. Há estudos que demonstram o contrário, como Gorczyca et al. (2022), observou no teste de germinação em ervilha, que o uso de MWCNT na concentração de 1 mg mL^{-1} limitaram o efeito da doença causada por patógenos presentes na microbiota natural das sementes.

Mesmo o MWCNT não tendo um efeito expressivo quanto a superação de dormência. Na concentração de 200 mg L^{-1} , todos os parâmetros avaliados em plântulas foram superiores aos demais tratamentos, onde, por exemplo, a média do tamanho total (cm) foi maior que todas (Figura 6).

Figura 6 - Parâmetros morfológicos de plântulas normais de sementes intactas. Os tratamentos com médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de significância para germinação de *C. ternatea*.



Fonte: Da autora (2023)

As plântulas provenientes de sementes tratadas com 200 mg L^{-1} MWCNT tiveram melhores resultados em relação ao controle e demais concentrações de NTC nos parâmetros de tamanho da raiz primária e tamanho total. Obteve 9.88 cm de comprimento de raiz primária, demonstrando um excelente crescimento radicular, além de hipocótilo/raiz com cerca de 115 e um tamanho total em média de 19.17 cm de comprimento na contagem final (Figura 7).

Figura 7 – Plântulas normais referentes ao experimento 1, utilizando sementes intactas.



Fonte: Da autora (2023)

Em um estudo com mudas de tomate tratadas a MWCNT *in vitro*, plântulas expostas a 60 mg L^{-1} MWCNT apresentaram hastes mais longas e maior desenvolvimento em relação a testemunha e menores concentrações (KHODAKOVSKAYA, 2009).

A forma que o MWCNT interage com a semente ainda não está claro, no entanto, há indícios que esta nanopartícula crie novos poros para penetração de água pelo tegumento, criando uma interação celular que permite uma melhor germinação e desenvolvimento de plântulas (MATHEW et al., 2020).

5.3 Experimento 2 – Embebição de sementes escarificadas em nanotubo de carbono

Após a escarificação mecânica e embebição por 24 horas, as sementes de *C. ternatea* foram submetidas ao teste de germinação e após 5 dias foi constatado que todos os tratamentos ultrapassaram uma germinação média de 85% (Tabela 3).

O tratamento que induziu as menores porcentagens de germinação aos 5 dias foram as sementes com embebição em água e com 200 mg L⁻¹ MWCNT. Aos 10 dias os melhores tratamentos foram a testemunha (Sem embebição), 100 mg L⁻¹ MWCNT e 800 mg L⁻¹ MWCNT (Tabela 3). Na contagem final, indica uma queda drástica em todos os tratamentos nas plântulas normais. Mesmo tendo diferença estatística entre os tratamentos, biologicamente os tratamentos tiveram o mesmo efeito, ou seja, a presença do MWCNT em diferentes concentrações não interfere nos parâmetros germinativos, quando as sementes são escarificadas mecanicamente.

Tabela 3 – Parâmetros germinativos e plântulas normais. Os tratamentos com médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de significância para germinação de *C. ternatea*.

Tratamentos	Germinação com 5 dias (%)	Germinação com 10 dias (%)	IVG	Plântulas normais (%)
Sem Embebição	93 ± 1.03 A	95 ± 0.65 A	14.10 ± 0.27 A	32 ± 2.35 A
Embebição em H ₂ O	86 ± 1.38 B	88 ± 0.85 B	13.07 ± 0.34 B	19,25 ± 1.11 B
100 mg L ⁻¹ MWCNT	93 ± 0.65 A	94 ± 1.11 A	14.02 ± 0.23 A	36,25 ± 0.85 A
200 mg L ⁻¹ MWCNT	90 ± 1.22 B	92 ± 1.18 B	13.62 ± 0.35 B	34,50 ± 1.71 A
400 mg L ⁻¹ MWCNT	91 ± 1.31 A	91 ± 1.31 B	13.72 ± 0.39 B	21 ± 1.08 B
800 mg L ⁻¹ MWCNT	94 ± 0.48 A	96 ± 0.25 A	14.27 ± 0.11 A	32 ± 4.32 A

Fonte: Da autora (2023)

Em um estudo, onde as sementes de *C. ternatea* foram descascadas e colocadas em imersão em água por diferentes em tempos e temperaturas, o tratamento com água à 37 ° C por 24 horas, a germinação atingiu em média germinação (94%) e com IVG de 23 (SALLEH; PA'EE, 2021).

Os resultados expressam que a escarificação mecânica independe da concentração de nanotubo de carbono, visto que há uma germinação significativa desde a primeira contagem e

um IVG praticamente semelhante aos tratamentos. No entanto, neste trabalho foram contabilizadas na última contagem as plântulas normais e anormais. O percentual de plântulas normais foi baixo devido a escarificação mecânica ter causado danos físicos nas sementes, que resultou em anomalias e deformações no processo da germinação, como demonstrado na Figura 8:

Figura 8 – Classificação de plântulas anormais de *C. ternatea* observadas após a escarificação das sementes.

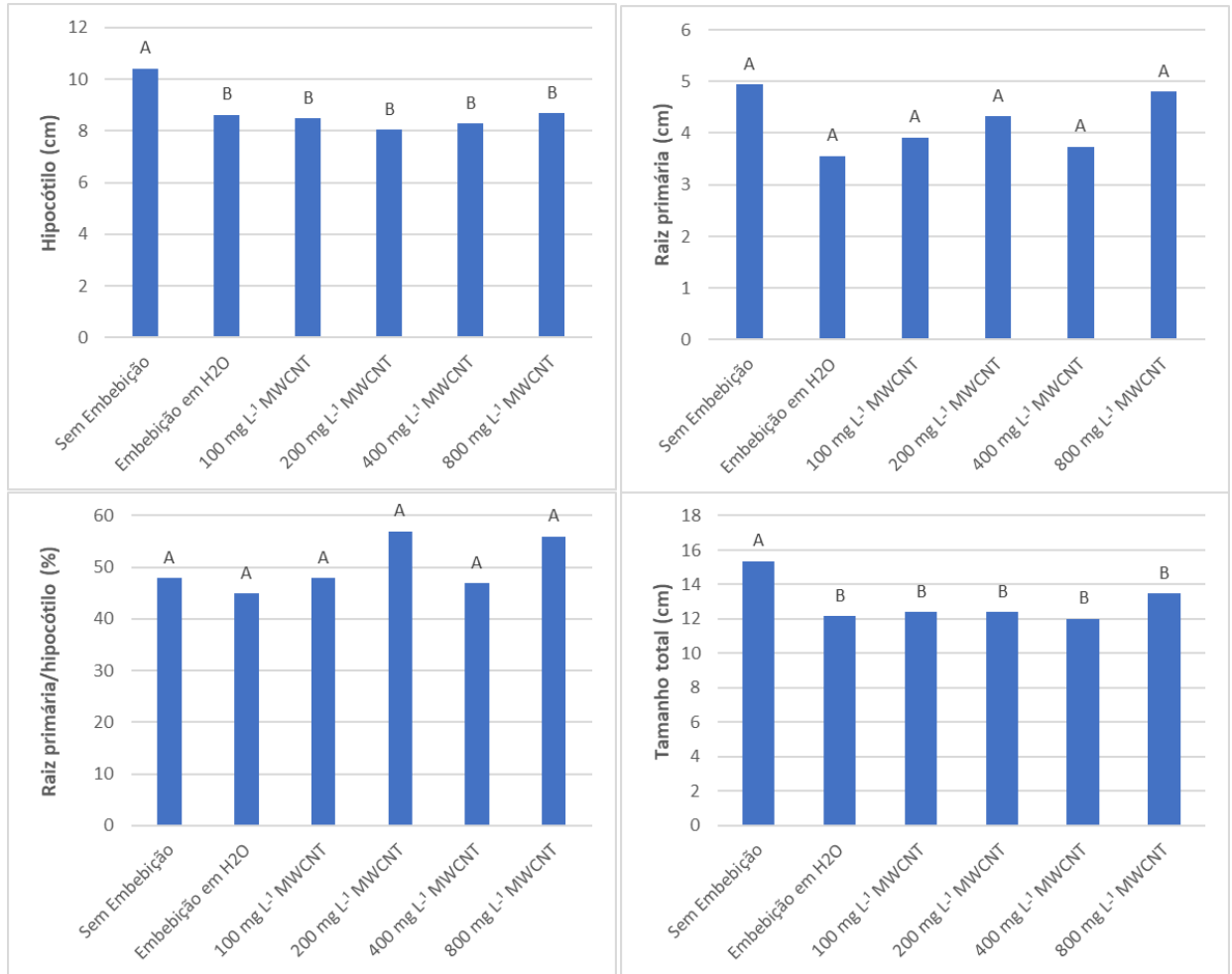


Fonte: Da autora (2023)

Assim como a escarificação mecânica resultou danos físicos em algumas plântulas no presente trabalho, foi observado em um estudo com germinação de sementes com diferentes acessos genômicos de *C. ternatea*, mostrou que foi possível alcançar uma germinação eficaz por meio da escarificação química utilizando ácido sulfúrico, no entanto, quanto maior o tempo de exposição ao ácido causou danos às plântulas e amarelecimento dos cotilédones (MAKASANA et al., 2016).

Por mais que a escarificação mecânica seja mais sustentável, de fácil acesso e demonstre maiores valores na germinação, está sujeita a causar deformidades nas plântulas de *C. ternatea* (Figura 9).

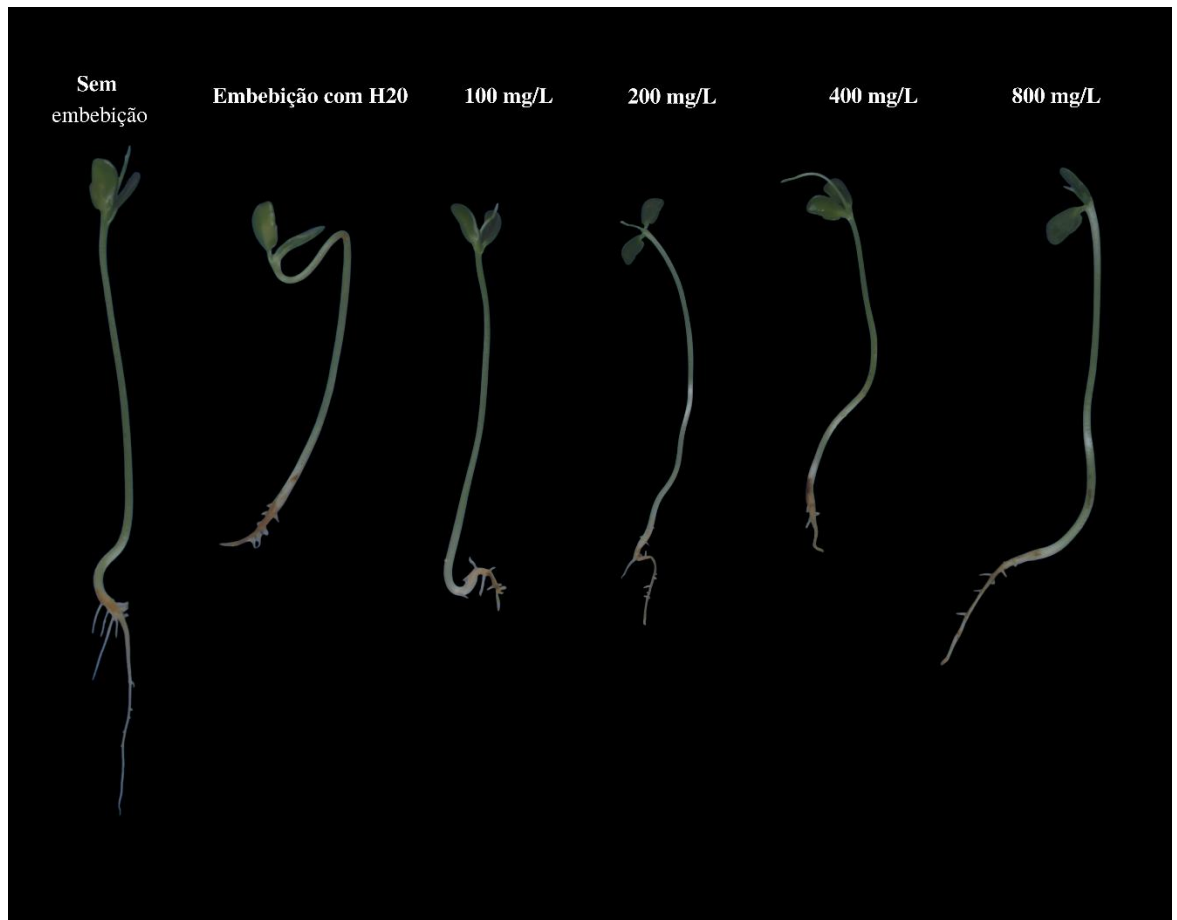
Figura 9 – Parâmetros morfológicos de plântulas normais com as sementes escarificadas e tratadas com MWCNT. Os tratamentos com médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de significância para germinação de *C. ternatea*.



Fonte: Da autora (2023)

As plântulas normais do experimento 2 não tiveram no geral, uma diferença expressiva em relação ao tamanho do hipocótilo, tamanho de raiz, razão e tamanho total. No entanto, a testemunha (sem embebição) teve os melhores resultados (Figura 10).

Figura 10 – Plântulas normais referentes ao experimento 2, com sementes escarificadas.



Fonte: Da autora (2023)

5.4 Experimento 3 – Nanopriming

Após 4 dias, as sementes intactas não apresentaram nenhuma germinação em ambos tratamentos, enquanto nas escarificadas teve diferença e demonstrou uma porcentagem maior de germinação na presença de 200 mg L^{-1} de MWCNT em relação ao hidropriming, atingindo respectivamente 44% e 16% de sementes germinadas (Tabela 5).

Tabela 5 – Parâmetros germinativos e plântulas normais de sementes escarificadas e intactas submetidas ao hidropriming (H₂O) e Nanopriming (200 mg l⁻¹ MWCNT). Em cada linha, médias precedidas das mesmas letras minúsculas, e em cada coluna, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de significância para germinação de *C. ternatea*.

		Germinação (%) com 4 Dias		Germinação (%) com 7 Dias	
Sementes					
Solução	Intacta	Escarificada	Intacta	Escarificada	
Hidropriming	0 ± 0.00 Aa	16 ± 0.63 Ba	28 ± 0.32 Bb	74 ± 1.22 Aa	
Nanopriming	0 ± 0.00 Ab	44 ± 0.20 Aa	44 ± 0.86 Ab	74 ± 0.73 Aa	
		IVG		Plântulas normais (%)	
Sementes					
Solução	Intacta	Escarificada	Intacta	Escarificada	
Hidropriming	0.20 ± 0.03 Bb	0.92 ± 0.08 Ba	14 ± 0.40 Aa	24 ± 0.93 Ba	
Nanopriming	0.46 ± 0.05 Ab	1.89 ± 0.03 Aa	12 ± 0.37 Ab	44 ± 0.58 Aa	

Fonte: Da autora (2023)

Na segunda contagem, aos 7 dias, as sementes intactas germinaram e teve diferença entre os tratamentos, obtendo uma maior germinação (44%) em sementes tratadas com 200 mg L⁻¹ MWCNT. Já as sementes escarificadas não houve diferença entre os tratamentos, apresentando uma média de 74% de germinação.

O índice de velocidade de germinação para sementes escarificadas e tratadas com 200 mg L⁻¹ MWCNT foi o maior que os demais tratamentos. Sementes escarificadas e que passaram pelo nanopriming 200 mg L⁻¹ MWCNT tiveram maior porcentagem (Tabela 6).

No geral, este resultado indica que a semente quando escarificada e exposta ao nanopriming (200 mg L⁻¹) é capaz de alcançar uma rápida germinação (IVG) de sementes de *C. ternatea*.

Na cultura da ervilha (*Pisum sativum*), foi observado que o nanopriming utilizando MWCNT (0,75-2,0 mg mL⁻¹) causa danos parciais à camada cerosa do tegumento da semente, que contribui para aumentar a capacidade de absorção de água pela semente, melhorando a germinação, o desenvolvimento radicular e parte aérea (LIANG et al., 2023).

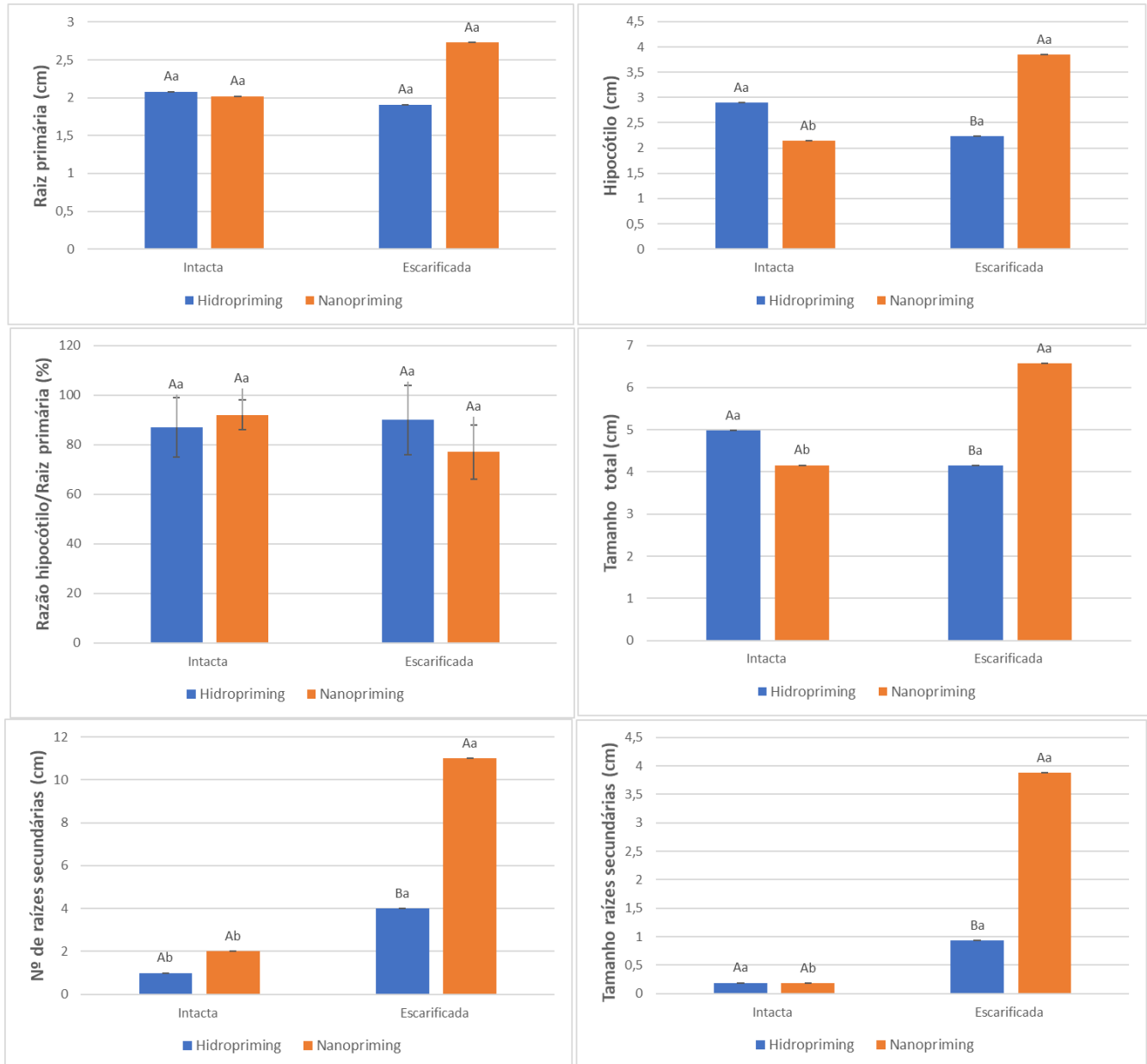
Em sementes de *Alnus subcordata*, uma espécie nativa do Irã, utilizando a técnica do nanopriming com MWCNT (100 mg L⁻¹ elevou o potencial de germinação das sementes em vários níveis de estresse hídrico, evidenciando a capacidade do MWCNT em permitir a entrada de água na semente mesmo em condições de escassez (RAHIMI et al., 2016).

As plântulas originadas das sementes intactas em relação as escarificadas não teve diferença nos parâmetros avaliados quando embebidas em água (H₂O), com exceção do número e comprimento de raízes secundárias, sendo as escarificadas o melhor resultado, com pelo menos 4 raízes secundária por plântula, medindo em média 0,93 cm de comprimento.

Quanto ao tratamento utilizando 200 mg L⁻¹, teve diferença no tamanho do hipocótilo, sendo as sementes escarificadas com comprimento de hipocótilo 3,85 cm em relação a semente intacta com 2,14 cm. O tamanho total das escarificadas foi superior (6,58 cm) em comparação com a semente bruta, assim como o número e comprimento de raízes secundárias.

Pode-se dizer que o melhor tratamento neste experimento é quando as sementes são escarificadas e condicionadas com 200 mg L⁻¹ MWCNT, tendo um maior desenvolvimento de plântulas normais com resultados expressivos no comprimento do hipocótilo, tamanho total, maior número e comprimento de raízes secundárias (Figura 11).

Figura 11 – Parâmetros morfológicos de plântulas normais de sementes intactas e escarificadas submetidas ao Hidropriming e Nanopriming. Em cada tratamento, médias precedidas das mesmas letras maiúscula, e em cada tipo de semente (intacta ou escarificada), médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de significância para germinação de *C. ternatea*.



Fonte: Da autora (2023)

Nanopartículas de prata (AgNPs) originadas da síntese verde através do extrato de folhas de *Citrus hystrix* foi utilizada no nanopriming de sementes envelhecidas de arroz. As sementes tratadas com AgNPs a 5 e 10 ppm apresentaram um aumento significativo tanto na germinação quanto no vigor das plântulas, em comparação com o tratamento hidropriming convencional e testemunha (MAHAKHAM et al., 2017; KATOCH et al., 2022).

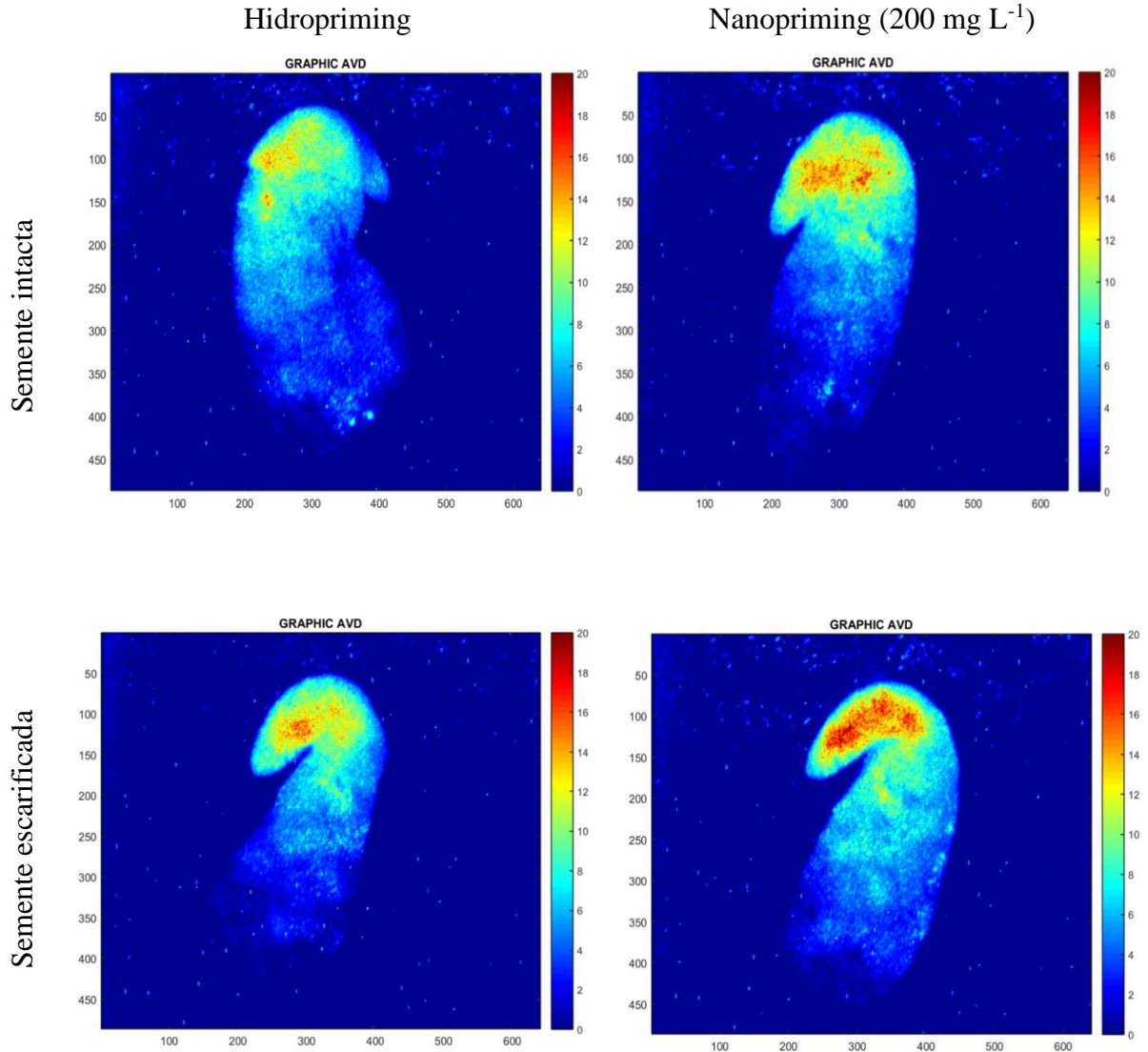
Observando o gráfico AVD (Figura 12) obtidos pelo Biospeckle, no tratamento onde a semente intacta (SI) e submetida ao hidropriming, tem-se uma movimentação mediana de fluídos na região próxima ao embrião, isto demonstra uma penetração lenta da água, além de pouco desenvolvimento celular na região. Comparando com o IVG (0,20) e germinação (28%) aos 7 dias, isto se confirma, uma vez que há uma lenta penetração de água a semente leva um maior tempo para sair da fase 1 entrar na fase 2 do processo de germinação, com isto tem um atraso no desenvolvimento, ocasionando em porcentagem baixa na germinação.

Quando a semente é escarificada (SE) e submetida ao hidropriming (Figura 12) a penetração de água ocorre de maneira muito mais rápida, visto que o tegumento é hidrofóbico e dificulta a entrada da água. Pode-se se observar no gráfico AVD, uma movimentação de fluídos mais alta principalmente na região do embrião e onde irá surgir a raiz primária, além disto é possível observar um maior desenvolvimento do embrião, que caracteriza uma indução para a fase 2 (indução do crescimento). Os dados do IVG (0,92) e % Germinação aos 7 dias (74%) confirma a penetração mais efetiva da água quando a semente é escarificada, que ocasionou uma germinação mais rápida e homogênea das sementes.

Quando a semente intacta é exposta ao nanopriming (200 mg L⁻¹ MWCNT) (Figura 12), observa-se uma atividade mais alta em relação quando é tratada somente com água, isto pode indicar a presença do MWCNT no interior da semente, bem como que tenha acontecido uma interação com o tegumento e que permitiu uma entrada de água no interior da semente. O gráfico AVD mede a movimentação de fluidos, então não há como aferir de forma precisa a presença do MWCNT, no entanto, o nanopriming resultou em um IVG (0,46) e germinação (44%) aos 7 dias comparados ao hidropriming, indicando que há uma diferença entre sementes intactas, ou seja, a presença do MWCNT permitiu uma melhora mesmo que discreta nos parâmetros germinativos da semente.

Quando a semente escarificada e exposta ao nanopriming (MWCNT 200 mg L⁻¹) (Figura 12), é possível identificar uma movimentação de fluídos intensa na parte do embrião, bem semelhante ao que ocorre quando escarificada e embebida em água. O IVG (1,89) é o mais expressivo de todos os tratamentos, ou seja, a semente germina com maior facilidade e velocidade neste tratamento, porém a germinação (74%) aos 7 dias é similar a semente escarificada e embebida com água. Isto quer dizer que, a presença do MWCNT de certa forma melhora a velocidade da germinação, mas o que efetivamente melhora a porcentagem de germinação é a escarificação, podendo afirmar que são processos independentes.

Figura 12 – Gráficos tridimensional AVD comparando as sementes intactas e escarificadas que passaram pelos tratamentos de hidropriming (água) e nanopriming (MWCNT 200 mg L⁻¹).



Fonte: Da autora (2023)

Em um estudo que utilizou o Biospeckle como uma ferramenta potencial para analisar o efeito do priming em sementes de *Cicer arietinum* (grão-de-bico), observou que o equipamento possui vantagens com destaque na proposta incluem sua rápida velocidade de operação, extrema simplicidade, baixo custo, exigência de menor número de componentes, algoritmos simples. Além disto, confirmou que o hidrocondicionamento por 24 horas e o condicionamento químico com KNO₃ na concentração de 1%, é eficaz para melhorar as características gerais de germinação de sementes de grão-de-bico (SINGH, 2021).

Os resultados mostraram que o nanopriming com MWCNT melhorou significativamente a germinação das sementes, e o biospeckle foi uma ferramenta importante para monitorar essa melhora. Com essa técnica, foi possível detectar alterações no fluxo de fluidos nas sementes, o que indicou que o MWCNT teve um efeito positivo na germinação e desenvolvimento das plântulas de *C. ternatea*.

5.5 Experimento 4 – Exposição crônica de sementes de *C. ternatea*

Após a separação das sementes intactas e escarificadas, foram submetidas ao teste de germinação com papel embebido com determinadas concentrações de cada tratamento e após 4 dias foi constatado que o tratamento com SI e expostas a 200 mg L⁻¹ MWCNT obteve 30% de germinação, e nenhuma germinada na testemunha (H₂O) e no 800 mg L⁻¹ MWCNT. As sementes escarificadas tiveram um IVG muito maior que em relação às sementes intactas e alcançaram 70% de germinação na testemunha, e 90% nos tratamentos com 200 e 800 mg L⁻¹ MWCNT. As sementes intactas em todos os tratamentos tiveram as menores porcentagens de germinação aos 4 dias de germinação e aos 7 dias os melhores resultados foram observados em sementes escarificadas incluindo a testemunha.

Na contagem final, a porcentagem de plântulas normais se manteve alta para as escarificadas e teve uma baixa para as sementes intactas. Mesmo tendo diferença estatística entre os tratamentos, pode se dizer que biologicamente os tratamentos tiveram o mesmo efeito na germinação. Em ambas as concentrações de MWCNT avaliadas, demonstrou porcentagem de germinação de 90% de plântulas normais, o que indica que as sementes escarificadas quando em contato crônico com MWCNT tem uma melhor germinação (Tabela 7).

Tabela 7 – Parâmetros germinativos e plântulas normais. Em cada linha, médias precedidas das mesmas letras minúsculas, e em cada coluna, médias seguidas por letras maiúsculas iguais, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de significância para germinação de *C. ternatea*.

		Germinação (%) com 4 Dias		Germinação (%) com 7 Dias	
Sementes					
Solução	Intacta	Escarificada	Intacta	Escarificada	
H ₂ O	0 ± 0.20 Ab	50 ± 1.32 Ba	10 ± 0.58 Ab	70 ± 1.22 Aa	
200 mg L ⁻¹ MWCNT	30 ± 0.37 Ab	70 ± 0.60 Aa	35 ± 0.81 Ab	90 ± 0.73 Aa	
800 mg L ⁻¹ MWCNT	0 ± 0.00 Ab	80 ± 0.87 Aa	10 ± 0.45 Ab	90 ± 0.49 Aa	
		IVG		Plântulas normais (%)	
Sementes					
Solução	Intacta	Escarificada	Intacta	Escarificada	
H ₂ O	0.22 ± 0.09 Ab	2.45 ± 0.48 Ba	20 ± 0.51 Ab	70 ± 0.93 Aa	
200 mg L ⁻¹ MWCNT	0.64 ± 0.12 Ab	2.86 ± 0.21 Aa	20 ± 0.89 Ab	90 ± 0.58 Aa	
800 mg L ⁻¹ MWCNT	0.14 ± 0.06 Ab	3.11 ± 0.27 Aa	10 ± 0.37 Ab	90 ± 0.57 Aa	

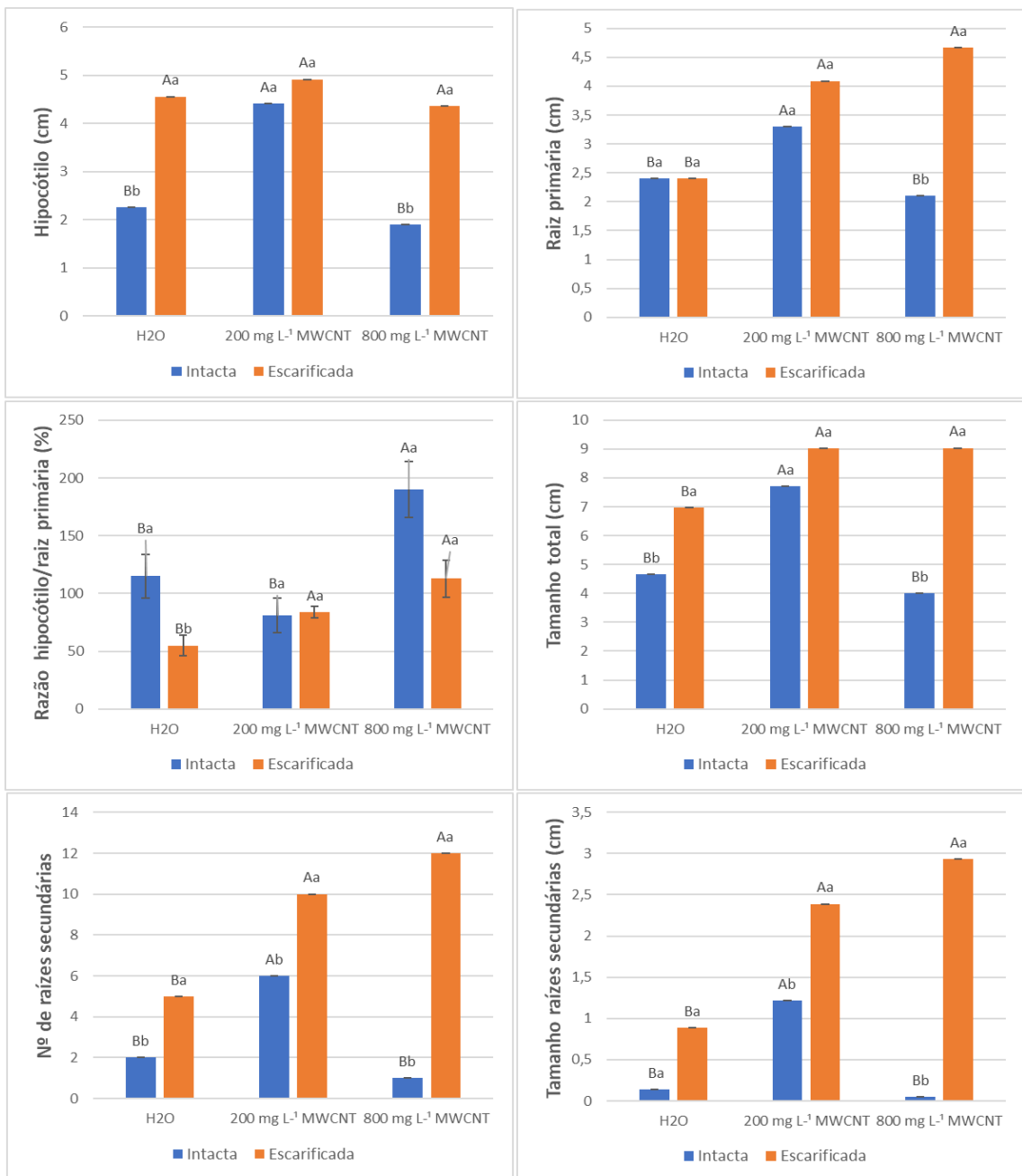
Fonte: Da autora (2023)

Em um experimento foi investigado o efeito da exposição a longo prazo de nanotubo de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) funcionalizados com ácido carboxílico no crescimento das culturas de cevada, soja e milho em condições de cultivo hidropônico. A concentração utilizada foi de 50 mg mL⁻¹ e após 20 semanas não foram observados efeitos tóxicos significativos no desenvolvimento das plantas. Os resultados apontam mudanças fenotípicas positivas, como o aumento da fotossíntese, maior número de raízes e crescimento aéreo, confirmando ser um potencial na para uso na hidroponia (LAHIANI et al., 2018).

Observando as sementes intactas em relação aos tratamentos, obteve melhor resultado quando utilizado a concentração de 200 mg L⁻¹, tendo maior comprimento de hipocótilo, raiz primária, tamanho total, número e comprimento de raízes secundárias, em comparação com a testemunha (H₂O) e a concentração de 800 mg L⁻¹. Já quando são esscarificadas, o tamanho da

raiz primária, tamanho total, número e raízes secundárias é melhor quando exposto ao MWCNT em ambas concentrações (200 e 800mg L⁻¹) em relação a testemunha. Quanto a razão raiz primária/hipocótilo não teve diferença entre os tratamentos (Figura 13).

Figura 13 – Parâmetros morfológicos de plântulas normais em sementes intactas e escarificadas sob condição de exposição crônica de 10 dias. Em cada tratamento, médias precedidas das mesmas letras maiúscula, e em cada tipo de semente (intacta ou escarificada), médias seguidas por letras minúsculas iguais, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de significância para germinação de *C. ternatea*.



Fonte: Da autora (2023)

As sementes escarificadas e embebidas com água (H₂O) tiveram os melhores resultados em relação as sementes intactas nos parâmetros de comprimento do hipocótilo, tamanho total e número de raízes secundárias. Em relação a concentração de 200 mg L⁻¹, as sementes escarificadas tiveram maior número e comprimento de raízes secundárias, os outros parâmetros não se diferenciaram. Já a concentração de 800 mg L⁻¹ quando escarificadas, teve melhor resultado em relação as sementes intactas no tamanho do hipocótilo, comprimento da raiz primária, tamanho total, número e comprimento de raízes secundárias, demonstrando que não houve um efeito tóxico nos parâmetros de crescimento das plântulas e pelo contrário, melhorou o desenvolvimento radicular na maior concentração de MWCNT (Figura 10).

À medida que a aplicação dos nanotubos de carbono (NTCs) se intensificam na agricultura, sua presença no meio ambiente e nos ecossistemas torna-se inevitável, e as plantas assumem o papel de principais produtores primários. Entender o efeito tóxico do NTC nas plantas é imprescindível, mas para sua compreensão exige análises complexas a nível molecular. Na espécie *Arabidopsis thaliana*, da família Brassicaceae, foi investigado o efeito de altas concentrações de MWCNT. Os resultados sugerem que o alongamento radicular e foliar foram inibidos de forma severa, gerando altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), indicando que o MWCNT causou estresse oxidativo na planta (YANG et al., 2021).

Figura 10 – Plântulas normais referentes ao experimento de exposição crônica.



Fonte: Da autora (2023)

Resultados opostos foram obtidos por Stampoulis et al. (2009) que relataram uma redução de 60% na biomassa de abobrinha após 15 dias de exposição a MWCNT na concentração de 1000 mg L⁻¹ em condições hidropônicas, considerado uma toxidez moderada do produto com a espécie.

Vale ressaltar que o tempo de exposição das plântulas com o MWCNT embebido no papel foi relativamente curto, comparado a outros experimentos em condições hidropônicas como discutido anteriormente. Toda via, os resultados das plântulas neste experimento são promissores em questão de desenvolvimento de raízes e parte aérea, desta forma, estudos futuros buscando aplicação do MWCNT na fase de muda é interessante do ponto de vista fitotécnico para observar se há incremento no desenvolvimento das plantas de *C. ternatea*.

6 CONCLUSÃO

No primeiro experimento, o tratamento com concentração de MWCNT 200 mg L⁻¹ resultou no melhor desenvolvimento das plântulas, embora a porcentagem de germinação tenha sido relativamente baixa. Isso sugere que o MWCNT pode ter influência na germinação de sementes de *C. ternatea*, mas não superou completamente a dormência.

A escarificação mecânica melhorou o potencial germinativo, mas a porcentagem de plântulas normais foi baixa em todos os tratamentos. A técnica do hidropriming e nanoprimering utilizadas em sementes escarificadas influenciou no incremento germinativo, e melhorou significativamente os parâmetros de plântulas normais na concentração de MWCNT 200 mg L⁻¹.

A exposição crônica ao MWCNT durante a germinação não mostrou sinais de toxicidade. Em geral, a escarificação mecânica seguida de embebição em água por 24 horas é capaz de melhorar a germinação de sementes de *C. ternatea*, enquanto a presença de MWCNT contribui para o desenvolvimento inicial das plântulas.

Esses resultados indicam o potencial do uso de nanopartículas na germinação e no desenvolvimento de plantas saudáveis e produtivas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como toda nova tecnologia utilizada na agricultura a investigação quanto a seu uso deve ser complexa e com carácter multidisciplinar. Nesta dissertação, foram obtidos dados primários

para esclarecimento prévio sobre a ação do nanotubo de carbono na resolução de um problema recorrente na espécie *C. ternatea*, relacionado a baixa germinação de sementes.

Estudos utilizando MWCNT como reguladores de crescimento na fase de muda devem ser investigados para observar o impacto no metabolismo vegetal, afim de analisar o risco de órgãos vegetais com possível carácter nocivo para o consumo humano.

A quantificação do MWCNT nos tecidos vegetais é uma futura análise a ser realizada, bem como a exposição contínua do MWCNT para observar os parâmetros fitotécnicos da espécie no estágio reprodutivo.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, P. *et al.* Nanoparticle-Mediated Seed Priming Improves Germination, Growth, Yield, and Quality of Watermelons (*Citrullus lanatus*) at multi-locations in Texas. **Scientific Reports**. Texas, v.10, n.5037, p.1-20, 2020.
- ALI, H. Md. *et al.* Carbon Nanotubes Improved the Germination and Vigor of Plant Species from Peatland Ecosystem Via Remodeling the Membrane Lipidome. **Nanomaterials**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 1852, 16 set. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nano10091852>
- ALI, H. Md. *et al.* Carbon Nanoparticles Functionalized with carboxylic acid improved the germination and seedling vigor in upland boreal forest species. **Nanomaterials MDPI**. v.10, n. [s.n], p.1-23, 2020. <https://doi.org/10.3390/nano10010176>
- ALMEIDA, L. C. *et al.* Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de trigo por meio do biospeckle. **Revista Ceres**, v. 66, n. 4, p. 383-391, 2019.
- AMÂNCIO, B. C. S. *et al.* Sandwich method applied to the screening of allelopathic action in *Byrsonima* spp.(Malpighiaceae). **Biologia**, v.75, n.2, p. 175-182, 2020.
- ANDRADE, D. B. *et al.* Detection of green seeds in soybean lots by the seed analysis system (SAS). **International Journal of Current Research**, [s.l], v. 8, n. 2, p. 26462- 26465, 2016.
- ANDRIAZZI, C.V. *et al.* Evaluation of physiological quality of Corn seeds by GroundEye L800® system. **Revista Agro Ambiente On-Line**, Lavras, v. 14, n. , p. 1-10, 30 nov. 2020.
- ASANDA, *et al.* **Handbook of nanomaterials for industrial applications**. Elsevier. 1ªed. v.5, 2018. p.1073-12751.
- AZMAT, A. *et al.* Coactive role of zinc oxide nanoparticles and plant growth promoting rhizobacteria for mitigation of synchronized effects of heat and drought stress in wheat plants. **Chemosphere**.[s.l], v.297, n.[s.n], p.1-13, 2022.
- BARROS, N. N.; ROSSETTI, A. G.; CARVALHO, R. B. DE. Fenó de cunhã (*Clitoria ternatea* L.) para acabamento de cordeiros. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 499–504, 2004.
- BRAGA, R. A. *et al.* **A Practical Guide to Biospeckle Laser: Analysis Theory and Software**. 1 ed. Minas Gerais, Lavras: UFLA, 2016. 158p.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA; ACS, 2009. 399 p.
- CAMARA, M.C. *et al.* Development of stimuli-responsive nano-based pesticides: emerging opportunities for agriculture. **Journal of nanobiotechnology**, São Paulo.v. 17, n. 1, p. 1-15, 21 set. 2019.
- CAMPBELL, S.M. *et al.* Substrate Type and Temperature on Germination Parameters of Butterfly Pea. **Horttech**. n.30, v.3, p.1-6, 2020.
- CASTELLANI, E. D.; AGUIAR, I. B.; PAULA, R. C. Bases para a padronização do teste de germinação em três espécies de *Solanum* L. **Revista Brasileira de Sementes**. v.3, n.2, p.77-85, 2009.
- CHO, Tong-Fei *et al.* Evaluation of milk deterioration using simple biosensor. **Journal of food measurement and characterization**, Malásia, p. 1-9, 9 set. 2021.

- CONTRERAS, C. I. M. *et al.* Evaluación de la distancia entre plantas sobre el rendimiento y calidad de semilla de *Clitoria ternatea* L. cv. Tehuana. **Tropical and subtropical Agroecosystems**. v.15, p.489-497, México, 2012.
- COOK, B. G. *et al.* **Tropical Forages: an Interactive Selection Tool**. Disponível em: <https://www.tropicalforages.info/text/entities/clitoria_ternatea.htm?zoom_highlight=clitoria>. Acesso em: 20 nov 2022.
- COSTA, R. F. *et al.* Caracterização de células de levedura por meio da técnica de biospeckle. **Ciência Rural**, v. 47, n. 7, p. 1174-1178, 2017.
- DAI, Y. *et al.* Uptake, Transport, and Transformation of CeO₂ Nanoparticles by Strawberry and Their Impact on the Rhizosphere Bacterial Community. **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, [S.L.], v. 8, n. 12, p. 4792-4800, 12 fev. 2020.
- DAS, Manish *et al.* Effect of moisture content and storage temperature on germination and seedling vigor index in *Clitoria ternatea* L. Medicinal Plants - **International Journal Of Phytomedicines And Related Industries**, Índia, v. 11, n. 4, p. 387, 2019. Diva Enterprises Private Limited. <http://dx.doi.org/10.5958/0975-6892.2019.00050.9>.
- DAWOOD, M. G. *et al.* Stimulating Plant Tolerance Against Abiotic Stress Through Seed Priming. **Advances In Seed Priming**, [S.L.], p. 147-183, 2018. Springer Singapore. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-0032-5_10
- DIAS, M. C. Métodos para superação da dormência em sementes de cunhã (*Clitoria ternatea* L.) e sua influência na germinação. Revista Universidade do Amazonas. **Série: Ciências Agrárias**, v. 4/5, n. 1/2, p. 39-46, 1996.
- ESPINOZA-CORONEL, A. L. *et al.* Crecimiento Y Rendimiento De *Clitoria Ternatea* Con La Aplicación De Fertilizantes Biológicos. **Revista Nexo Agropecuario**. v.8, n.2, p.1-9. Ecuador. 2020.
- FALSINI, S. *et al.* When Sustainable Nanochemistry Meets Agriculture: lignin nanocapsules for bioactive compound delivery to plantlets. **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, Itália, v. 7, n. 24, p. 19935-19942, 14 nov. 2019.
- GALA-CZEKAJ, D. *et al.* Effect of multi-walled carbon nanotubes on the germination and growth characteristics of three fodder grasses in vitro and in chernozem soil. **Journal of Elementology**, [S.L.], v. 1, n. 23, p. 21-33, 23 set. 2017. <http://dx.doi.org/10.5601/jelem.2017.22.1.1402>.
- GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V; PAKNIKAR, K. M. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 792-803, 2011.
- GOMES JUNIOR, F.G. *et al.* Evaluation of priming effects on sweet corn seeds by SVIS. **Seed Technology**, v.31, n.1, p.95-100, 2009.
- GOMEZ, S.M. & KALAMANI, A. Butter-fly Pea (*Clitoria ternatea*): A Nutritive Multipurpose Forage Legume for the Tropics- An Overview. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.2, n.6.,p. 374-379, Paquistão. 2003.
- GORCZYCA, A. *et al.* Response of Pea Seedlings on Multi-Walled Carbon Nanotubes Seed Treatments. **Avestia - International Journal of Theoretical and Applied Nanotechnology**. Polónia, n [s.n], v.[s.v], p.1-8, 2022. DOI: 10.11159/icepr22.168.

- GUPTA, J. K. CHAHAL, J. BHATIA, M. *Clitoria ternatea* (L.): Old and new aspects. **Journal of Pharmacy Research**, Índia, v. 11, n. 03, p.2610-2614, 2010.
- HATAMI, M. *et al.* Mechanisms underlying toxicity and stimulatory role of single-walled carbon nanotubes in *Hyoscyamus niger* during drought stress simulated by polyethylene glycol. **Journal of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 324, p. 306-320, fev. 2017.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.064>.
- JAMILL, N. & PA'EE, F. Antimicrobial activity from leaf, flower, stem, and root of *Clitoria ternatea* – A review. **AIP Conference Proceedings**. v.2002. n.1. p.1-6. Malásia. Ago. 2018.
- JAMILL, N. *et al.* Influences of Environmental Conditions to Phytoconstituents in *Clitoria ternatea* (Butterfly Pea Flower) – A Review. **Journal Of Science And Technology**, Malásia, v. 10, n. 2, p. 208-228, 1 fev. 2018.
- JEYARAJ, E. J.; LIM, Y.Y; CHOO, W. S. Extraction methods of butterfly pea (*Clitoria ternatea*) flower and biological activities of its phytochemicals. **Journal of Food Science and Technology**. v.58, p.2054–2067, junho, 2021.
- JOSHI, A. *et al.* Multi-walled carbon nanotubes applied through seed-priming influence early germination, root hair, growth and yield of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **J. Sci. Food Agric**. v.98, n.8, p.3148-3160, 2018.
- JOSON. M.T.; RAMIREZ D. A. Cytology of *Clitoria ternatea* L. **Philippine Agriculturist**v.74, n.1, p.121–132, 1991.
- KATOCH, Shabnam *et al.* Nanopriming technology for improving crop plants under stressful conditions: concept and methods. **Nano-Enabled Agrochemicals In Agriculture**, Índia, v. 9, p. 159-174, 2022. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-91009-5.00009-4>.
- KHAN, N.; BANO, A.M.D.; BABAR, A. Impacts of plant growth promoters and plant growth regulators on rainfed agriculture. **PLOS ONE**, v.15, n.5, p.e0232926, 2020.
- KHODAKOVSKAYA, M. *et al.* Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. **ACS Nano**. v.3, n.10, p.1-21, 2009.
- KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2014. 768p.
- KONG, F., DU, J., ZHANG, Y., & ZHANG, J. Zinc nanoparticles improve seed germination and seedling growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 63(5), 1491-1497, 2015.
- KUMAR, S. *et al.* Nanovehicles for Plant Modifications towards Pest- and Disease-Resistance Traits. **Trends In Plant Science**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 198-212, fev. 2020.
- LAHIANI, M.H. *et al.* Assessment of effects of the long-term exposure of agricultural crops to carbono nanotubes. **J. Agric. Food Chem**. v.66, n.26, p.6654-6662, 2018.
- LEE, R. X. *et al.* Adventitious root cultures of *Clitoria ternatea* L. and its potential as a memory enhancer alternative. **Plant Biotechnology Reports**, Malásia, v. 15, n. 2, p. 163-176, abr. 2021.

- LIMA, J.M.E. *et al.* Técnicas de análise de imagem para caracterização da qualidade de sementes de paricarana (*Bowdichia virgilioides* Kunth). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.28, v.3, p.1202-1216, 2018.
- LUZ, P. B. *et al.* Utilização de análise de imagem para avaliação da qualidade de sementes de *Passiflora cincinnata* (maracujá-do-mato). **Multitemas**, [S.L.], p. 123-139, 4 abr. 2022. <http://dx.doi.org/10.20435/multi.v26i64.3191>.
- MAHAKHAM, W. *et al.* Nanopriming technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 8263, 15 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08669-5>
- MAKASANA, J. Effect of seed treatment on germination and flavonoids diversity in accessions of butterfly pea (*Clitoria ternatea*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**. v.86, n.12, p.37-42, 2016.
- MAKASANA, J.; DHOLAKIYA, B.;GAJBHIYE, N.A.; RAJU, S. Extractive determination of bioactive flavonoids from butterfly pea (*Clitoria ternatea* Linn.)**Research on Chemical Intermediates**. v.43, n.1, p.783-799, 2017.
- MANUAL GROUND EYE® . **Tbit Tecnologia e Sistemas**, Lavras. 2016.88p.
- MARTINEZ-BALLESTA, M. C. *et al.* Discerning the mechanism of the multiwalled carbon nanotubes effect on root cell water and nutrient transport. **Plant Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 146, p. 23-30, jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.008>.
- MARTINS, S.S *et al.* Morfofisiologia da cunhã cultivada sob estresse salino. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Bahia, v.13, n.1, p.13-24, 2012.
- MARY, S.K. *et al.* Development of starch based intelligent films by incorporating anthocyanins of butterfly pea flower and TiO₂ and their applicability as freshness sensors for prawns during storage. **Rsc Advances**, Índia, v. 10, n. 65, p. 39822-39830, 2020.
- MASCIANGIOLI, ET.; ZHANG, W.X. Environmental technologies at the nanoscale. **Environmental Science and Technology**, v.37, n.5,p.102-108, 2003.
- MATHEW, S. *et al.* Interaction of carbon nanotubes with plant system: a review. **Carbon Letters**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 167-176, 12 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s42823-020-00195-1>.
- MISHRA, D.K.. *et al.* Seed germination studies in medicinal plants of commercial value. **In: IUFRO International Conference, Proceedings of the International Conference on “Multipurpose trees in the Tropics: Assessment, Growth and Management**. Índia, v. [s.v], n. [s.n], pp.382-386, 2004.
- MONDO, V. H.V. *et al.* Avaliação de danos mecânicos em sementes de feijão por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 27-35, 2009.
- MONTEIRO, J. A. V.; ARAUJO, J.S.P. **Potencial do feijão-borboleta (*Clitoria ternatea* L.) para jardins comestíveis**. Resumo -1º Encontro da Regional Sudeste de floricultura e plantas ornamentais. 2020. Congresso online, UFLA Universidade Federal de Lavras. p.8.
- MORRIS, J. B. Characterization of butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) accessions for morphology, phenology, reproduction and potential nutraceutical, pharmaceutical trait

utilization. **Genetic Resources and Crop Evolution**, [s.l.] v. 56, n. 3, p. 421–427, 25 maio 2009.

MUKHERJEE, P.K. *et al.* The Ayurvedic Medicine *Clitoria ternatea*: from Traditional Use to Scientific Assessment. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120. n.3, p.291–301, 2008.

NASCIMENTO, A. R. *et al.* Identificação de doenças em plantas por meio do biospeckle. **Ciência Rural**, v. 45, n. 11, p. 1836-1840, 2015.

NASCIMENTO, J. V. *et al.* Phenolic Compunds and antioxidant capacity of the *Clitoria ternatea* L. flower extracts. **Research, Society and Development**, Paraná, v. 10, n. 11, p. e21810111945, 2021.

NASCIMENTO, W. M., *et al.* Uso de nanotubos de carbono para incremento da germinação e vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 23, n.11, p.774-779, 2019. DOI : 10.1590/1807-1929/agriambi.v23n11p774-779

NILE, S.H. *et al.* Nano-priming as emerging seed priming technology for sustainable agriculture—recent developments and future perspectives. **Journal Of Nanobiotechnology**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 1-31, 3 jun. 2022.

NITHIANANTHAM, K. *et al.* Evaluation of hepatoprotective effect of methanolic extract of *Clitoria ternatea* (Linn.) flower against acetaminophen-induced liver damage. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 4, p. 314–319, ago. 2013.

OGUIS, G. K. *et al.* Butterfly Pea (*Clitoria ternatea*), a Cyclotide-Bearing Plant With Applications in Agriculture and Medicine. **Frontiers In Plant Science**, Finlândia, v. 10, n. 1, p. 1-23, 28 maio 2019.

OLIVEIRA, A. F. *et al.* Biospeckle laser: princípios, aplicações e perspectivas. **Química Nova**, v. 41, n. 9, p. 1206-1213, 2018.

PAIVA, P.D. de O. *et al.* How Scarification, GA3 and Graphene Oxide Influence the In Vitro Establishment and Development of *Strelitzia*. **Plants**, [S.L.], v. 12, n. 11, p. 2142, 29 maio 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants12112142>.

PASUKAMONSET, P. *et al.* Physicochemical, antioxidant and sensory characteristics of sponge cakes fortified with *Clitoria ternatea* extract. **Journal Of Food Science And Technology**, Índia, v. 55, n. 8, p. 2881-2889, 23 maio 2018.

PEREIRA, A. do E. S. *et al.* Nanotechnology Potential in Seed Priming for Sustainable Agriculture. **Nanomaterials**, MDPI, São Paulo, v.11, n.2, p.267, nov. 2021.

PÉREZ-DE-LUQUE, A. Interaction of Nanomaterials with Plants: What Do We Need for Real Applications in Agriculture? **Frontier in environmental science**. Londrina. v.5, n.12, p.1-7, Abril, 2017.

PILEHVAR, B. *et al.* Effects of Seed Nano-priming with Multiwall Carbon Nanotubes (MWCNT) on seed germination and seedlings growth parameters of mountain ash (*Sorbus luristanica* Bornm.). **Research Institute Of Forests And Rangelands Of Iran**, Irã, v. 26, n. 2, p. 202-214, jun. 2018

PINLAY-GANCHOZO, R.A. *et al.* Chemical and biological scarification in the emergence and growth of *Clitoria ternatea*. **Rev. Centro Agrícola**, Equador, v.48, n.3, p.53-59, 2021.

- RAHIMI, D. et al. Increasing drought resistance of *Alnus subcordata* C.A. Mey. seeds using a nano priming technique with multi-walled carbon nanotubes. **Journal Of Forest Science**, [S.L.], v. 62, n. 6, p. 269-278, 30 jun. 2016.
- RAI, K.S. et al. *Clitoria ternatea* root extract enhances acetylcholine content in rat hippocampus. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 73, n. 7-8, p. 685-689, dez. 2002.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0367-326x\(02\)00249-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0367-326x(02)00249-6).
- RALIYA, R. et al. Enhancing the Mobilization of Native Phosphorus in the Mung Bean Rhizosphere Using ZnO Nanoparticles Synthesized by Soil Fungi. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 64, n. 16, p. 3111-3118, 14 abr. 2016.
- RAMESH, K., et al. Physiology of *Clitoria ternatea* (Linn.) Seeds: Germination and Growth Responses to Different Temperatures and Moistures. **International Journal of Agriculture, Biology and Medical Sciences**, vol. 9, n° 3, pp. 499-503, 2017.
- RAMLI, M. E. et al. Influence of amylose content on phenolics fortification of different rice varieties with butterfly pea (*Clitoria ternatea*) flower extract through parboiling. **LWT: Food Science and Technology**. Malásia, v.147, p.1-10, 2021.
- RASTOGI, A. et al. Phytotoxic effect of silver nanoparticles in *Triticum aestivum*: Improper regulation of photosystem I activity as the reason for oxidate damage in the chloroplast. **Inter. Jour. for Photosynthesis Resea.** [s.l.], v.57, n.1, p.209-216, 2019.
- RATNIKOVA, T.A. et al. Tomato seed coat permeability to selected carbono nanomaterials and enhancement of fermentation and seedling growth. **The scientific world Journal**, [s.l.] v. 2015, n. 419215, 2015.
- SALLEH, N.A.M.; PA'EE, F.; Effect of various immersion time and water temperature on seed germination of *Clitoria ternatea* and *Momordica charantia*. **Tropical Agricultural Science**. Malásia, v.44, n.4, p.745-753, 2021.
- SARHAN, A. A., & Ahmed, M. A. Effect of silver nanoparticles on soybean (*Glycine max* L.) seed germination. **International Journal of Agriculture and Biology**, 18(6), 1297-1303, 2016.
- SHAKIBA, S. et al. Emerging investigator series: polymeric nanocarriers for agricultural applications. **Environmental Science: Nano**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 37-67, 2020.
- SHELAR, A. et al. Recent Advances in Nano-Enabled Seed Treatment Strategies for Sustainable Agriculture: challenges, risk assessment, and future perspectives. **Nano-Micro Letters**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-13, 16 fev. 2023.
- SHOBHARANI, M.; SUNDARESWARAN, S. Effect of different dormancy breaking treatments on seed germination and seedling growth in Shankhpushpi (*Clitoria ternatea* L.) **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. [s.l.] v.7, n.4, p.1353-1355, Índia, 2018.
- SHUKLA, A., VERMA, S. K., & SINGH, B. Seed germination and seedling growth of *Clitoria ternatea* (L.) under water stress. **3 Biotech**, 8(4), 243, 2018.
- SHUKLA, J. K., & VERMA, S. Studies on storage behaviour of *Clitoria ternatea* seeds. **Journal of Food Science and Technology**, v.49, n.5, 590-595, 2012.
<https://doi.org/10.1007/s13197-011-0340-y>.

SILVA, A. G. da *et al.* Influência da cor do tegumento e da temperatura na germinação e vigor de sementes de *Crotalaria ochroleuca* L. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 49-55, 17 jun. 2016.

SILVA, J. A. *et al.* Estudo da qualidade de alimentos por meio da técnica de biospeckle. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 3, p. 345-350, 2016.

SILVA, P. de C. *et al.* Development of bionanocomposites of pectin and nanoemulsions of carnauba wax and neem oil pectin/carnauba wax/neem oil composites. **Polymer Composites**, [S.L.], v. 41, n. 3, p. 858-870, 5 nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pc.25416>.

SILVA, P. de C. *et al.* Physical-Mechanical and Antifungal Properties of Pectin Nanocomposites / Neem Oil Nanoemulsion for Seed Coating. **Food Biophysics**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 456-466, 27 jun. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s11483-019-09592-0>.

SILVA, P. de C. *et al.* Production and efficacy of neem nanoemulsion in the control of *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* in soybean seeds. **European Journal Of Plant Pathology**, [S.L.], v. 155, n. 4, p. 1105-1116, 2 set. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-019-01838-4>.

SINGH, N. K. *et al.* Anti-allergy and anti-tussive activity of *Clitoria ternatea* L. in experimental animals. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 224, p. 15-26, out. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.026>.

SINGH, P. *et al.* Development of an intelligent laser biospeckle system for early detection and classification of soybean seeds infected with seed-borne fungal pathogen (*Colletotrichum truncatum*). **Biosystems Engineering**, Índia, v. 212, p. 442-457, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2021.11.002>.

SITI AZIMA, A.M., NORIHAM, A., MANSHOOR, N. Phenolics, antioxidants and color properties of aqueous pigmented plant extracts: *Ardisia colorata* var. *elliptica*, *Clitoria ternatea*, *Garcinia mangostana* and *Syzygium cumini*. **Journal of Functional Foods**. [s.l.] v.38, p. 232–241, 2017.

SOUZA, J. A. *et al.* Avaliação da germinação e vigor de sementes de tomate por meio do biospeckle. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 42, n. 2, p. 301-309, 2020.

STAMPOULIS, D. *et al.* Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. **Environment Science Technology**. v. 43, n. 24, p. 9473-9479, 2009. DOI: 10.1021/es901695c

SUÁREZ, H. *et al.* Caracterización morfoagronómica y evaluación del contenido proteínico en dos genotipos de *Clitoria ternatea* L. cultivados en un sistema de espalderas. **Pastos y Forrajes**. Venezuela. v.35, n.4, p. 365-380. 2012.

TARANALLI, A.D. *et al.* Influence of *Clitoria Ternatea* Extracts on Memory and Central Cholinergic Activity in Rats. **Pharmaceutical Biology**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 51-56, jan. 2000. [http://dx.doi.org/10.1076/1388-0209\(200001\)3811-bft051](http://dx.doi.org/10.1076/1388-0209(200001)3811-bft051)

TIMOTEO, C. de O. *et al.* In vitro growth of *Physalis peruviana* L. affected by silver nanoparticles. **3 Biotech**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 145, 21 mar. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-019-1674-z>.

TIMOTEO, C. de O. *et al.* Silver nanoparticles in the micropropagation of *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 137, 359–368 (2019).

<https://doi.org/10.1007/s11240-019-01576-9>

TURNOS, L.J.N. Pod maturity and seed germination of blue ternate (*Clitoria ternatea* L.). **Asian Journal of Fundamental and Applied Sciences**. Filipinas, v.2, n.3, p. 1-7, 2021.

VENORA, G. *et al.* Identification of Sicilian landraces and Canadian cultivars of lentil using an image analysis system. **Food Research International, Barking**, v. 40, p. 161-166, jan. 2007.

VERMA, S. K., & SINGH, B. Seed germination, growth and yield of *Clitoria ternatea* under different sowing methods. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, 39(4), 126-131, 2017.

VILLANUEVA AVALOS, J. F. *et al.* Agrotecnia y utilización de *Clitoria ternatea* en sistemas de producción de carne y leche. **Rev.Técnica Pecuaria en México**, México, v. 42, n. 1, p. 79-96, 2004.

YADAV, S., KAUL, S., & PANDEY, A. Dormancy breaking techniques in *Clitoria ternatea*: A review. **Journal of Forest Research**, 31(4), 455-465, 2020.

YANG, Z. *et al.* Insights into the mechanism of multi-walled carbon nanotubes phytotoxicity in Arabidopsis through transcriptome and m6A methylome analysis. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 787, p. 147510, set. 2021. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147510>.

YOUNIS *et al.* Advancements of nanotechnologies in crop promotion and soil fertility: benefits, life cycle assessment, and legislation policies. **Renew. Sustain. Energy Rev.** v.152, n.111686, p. 1-34, 2021.

YUAN, Z. *et al.* Novel impacts of functionalized multi-walled carbon nanotubes in plants: promotion of nodulation and nitrogenase activity in the rhizobiumlegume system. **Nanoscale**, [s.l.]. v.9. p. 9921–9937. 2017.

ZHANG, K. *et al.* Effects of biochar nanoparticles on seed germination and seedling growth. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 256, n. 113409, p. 1-15, jan. 2020.

ZHANG, X., Liu, Y., Wei, D., & He, J. Enhancement of wheat (*Triticum aestivum* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.), and maize (*Zea mays* L.) seed germination by iron and copper nanoparticles. **Frontiers in Plant Science**, 8, 1175, 2017.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01175>