



AFONSO RICARDO DE SOUZA

**NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE MÚLTIPLA NO
CRESCIMENTO *IN VITRO* DE GIRASSOL ORNAMENTAL**

**LAVRAS-MG
2023**

AFONSO RICARDO DE SOUZA

**NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE MÚLTIPLA NO CRESCIMENTO *IN*
VITRO DE GIRASSOL ORNAMENTAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de doutor.

Prof. Renato Paiva, PhD
Orientador
Prof. Dra. Michele Valquíria dos Reis
Coorientador

**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).

de Souza, Afonso Ricardo.

Nanotubos de carbono de parede múltipla no desenvolvimento
in vitro de girassol ornamental / Afonso Ricardo de Souza. - 2023.
116 p.

Orientador(a): Renato Paiva.

Coorientador(a): Michele Valquíria dos Reis.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Nanotecnologia. 2. Germinação *in vitro*. 3. Nanotubos de
carbono. I. Paiva, Renato. II. dos Reis, Michele Valquíria. III.
Título.

AFONSO RICARDO DE SOUZA

**NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE MÚLTIPLA NO CRESCIMENTO
IN VITRO DE GIRASSOL ORNAMENTAL**

**MULTIWALLED CARBON NANOTUBES ON ORNAMENTAL SUNFLOWER
IN VITRO GROWTH**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia vegetal, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de doutorado.

Aprovada em 14 de julho de 2023.

Prof. Dra. Ana Hortência Fonseca Castro UFSJ

Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira UFLA

Prof. Dr. Luciano Coutinho Silva UFPB

Prof. Dra. Raírys Cravo Herrera UFPA

Prof. Renato Paiva, PhD
Orientador

Prof. Dra. Michele Valquíria dos Reis
Coorientador

**LAVRAS-MG
2023**

À minha família, especialmente às minhas avós e aos meus avôs que sempre me reergueram com amor.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente o Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia, pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de doutorado. À CAPES, CNPq, FAPEMIG e EMBRAPA pelo apoio financeiro ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas.

Este trabalho só foi possível pelo esforço conjunto de vários servidores de diferentes áreas. Saibam que serei sempre grato por isso!

Ao professor Renato Paiva, pela orientação.

À professora Michele Valquíria dos Reis pela coorientação.

A todos do Setor de Fisiologia e do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal e, especialmente, aos membros do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, pela amizade, companheirismo, pelos cafés, desabafos e incontáveis horas de bancada. A todos os colegas de NEPAFLOR e do Setor de Floricultura e Paisagismo do Departamento de Agricultura.

A todos que não requerem menção neste trabalho, porque minha gratidão já habita em seus corações.

Gratidão!

*“Não se acende uma candeia para colocar sob o alqueire,
mas a colocam sobre um candeeiro, a fim de que ela
clareie todos aqueles que estão na casa” (Mt, 5:15)*

RESUMO

Diversos nanomateriais são estudados com relação ao seu potencial de afetar o desenvolvimento vegetal de forma positiva ou negativa. Dentre eles, os nanotubos de carbono são reportados na literatura exercendo o papel de reguladores de crescimento ou de agente tóxicos para as plantas. Essa dualidade suscita a necessidade de se conhecer mais os efeitos fisiológicos oriundos dessa interação, em diferentes espécies e com diferentes formas de exposição. Sobretudo em situação de estresses abióticos, como de déficit hídrico, haja vista as previsões apontarem para alterações na distribuição e disponibilidade de água para agricultura. Dessa forma, esse trabalho objetiva avaliar a toxicidade de nanotubos de carbono de parede múltipla em girassol ornamental, no processo de germinação e no desenvolvimento inicial das plantas. O meio de cultivo *in vitro* foi suplementado com nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico (NTC) e as sementes foram inoculadas para se desenvolverem por sete dias. A germinação inicial não é afetada pelos NTC, apesar de existir uma promoção das enzimas do sistema antioxidante (SOD, CAT, APX e POX) até 96h após a inoculação. As plântulas produzidas apresentaram maior crescimento e acúmulo de matéria fresca na parte aérea e sistema radicular com a exposição aos NTC, indicando que estes são promotores do desenvolvimento inicial em girassol ornamental. Os nanomateriais também foram testados em condições de déficit hídrico induzido *in vitro*, pela adição de PEG 6000 ao meio de cultivo (10%). Nesse caso, também não houve diferença na germinação de sementes, porém a presença de NTC mitigou os efeitos negativos da falta de disponibilidade de água no crescimento da parte aérea e do sistema radicular. Houve modulação da atividade enzimática antioxidante, com maior atividade da SOD e CAT na parte aérea e APX no sistema radicular, na presença de NTC. Além disso, foi observado o acúmulo de solutos osmoticamente ativos com o estresse induzido *in vitro*, principalmente prolina na parte aérea e açúcares solúveis no sistema radicular, na presença de NTC. Com isso, é possível concluir que os nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico afetam positivamente o desenvolvimento inicial de girassol ornamental e ainda tem o potencial de serem agentes mitigadores de estresses abióticos durante o estabelecimento de plântulas.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Déficit hídrico. Toxicologia vegetal. Estresse abiótico.

ABSTRACT

Different nanomaterials are studied regarding their potential to affect plant development in a positive or negative way. Amongst them, carbon nanotubes are reported in literature to play the role of growth regulators or toxic agents for plants. This duality raises the need to learn more about the physiological effects from this interaction, in different species and with different forms of exposure. Especially in situations of abiotic stress, such as water deficit, given that forecasts point to changes in the distribution and availability of water for agriculture. Thus, this work aims to evaluate the toxicity of multi-walled carbon nanotubes in ornamental sunflower, in the germination process and in the initial plant development. The *in vitro* culture medium was supplemented with carboxylic acid functionalized multi-walled carbon nanotubes (CNT) and seeds were inoculated to develop for seven days. Initial germination was not affected by CNT, although there is a promotion of antioxidant system enzymes (SOD, CAT, APX and POX) up to 96 hours after inoculation. The seedlings produced showed greater growth and accumulation of fresh matter in the shoot and root system with exposure to CNT, indicating that these are promoters of initial development in ornamental sunflower. The nanomaterials were also tested under water deficit conditions induced *in vitro*, by adding PEG 6000 to the culture medium (10%). In this case, there was also no difference in seed germination, but the presence of CNT mitigated the negative effects of low water availability on shoot and root system growth. There was a modulation of the antioxidant enzymatic activity, with higher shoot activity of SOD and CAT, as well as APX in root system in the presence of CNT. Furthermore, the accumulation of osmotically active solutes was observed with the stress induced *in vitro*, mainly proline in the shoot and soluble sugars in the root system, after CNT exposure. In conclusion, it is possible to state that carboxylic acid-functionalized multi-walled carbon nanotubes positively affect the initial development of ornamental sunflower and still have the potential to mitigate abiotic stresses during seedling establishment.

Keywords: Nanotechnology. Water deficit. plant toxicology. Abiotic stress.

SUMÁRIO

1.	CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1	Introdução	13
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
1.1.1	Nanotecnologia	14
1.1.2	Déficit hídrico.....	36
1.1.3	Germinação de sementes	38
	REFERÊNCIAS	41
2.	CAPÍTULO 2: NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE MÚLTIPLA NO DESENVOLVIMENTO INICIAL <i>in vitro</i> DE GIRASSOL ORNAMENTAL, CONSIDERAÇÕES SOBRE O SISTEMA ANTIOXIDANTE	52
2.1	Introdução	54
2.2	Material e métodos	55
2.2.1	Local de execução e material vegetal:	55
2.2.2	Nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico	55
2.2.3	Germinação e desenvolvimento inicial <i>in vitro</i> com NTC no meio de cultivo:	55
2.2.4	Análises bioquímicas	56
2.2.5	Análise estatística	59
2.3	Resultados.....	59
2.4	Discussão	68
2.4.1	Germinação de sementes	68
2.4.2	Crescimento <i>in vitro</i>	70
2.4.3	Análises bioquímicas da germinação.....	72
2.4.1	Análises bioquímicas das plântulas	74
2.5	Conclusão	75
	Referências	76
3.	CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO INICIAL DE GIRASSOL ORNAMENTAL SOB DÉFICIT HÍDRICO <i>in vitro</i> COM ADIÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE MÚLTIPLA AO MEIO DE CULTIVO.....	81
3.1	INTRODUÇÃO.....	83
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	84

3.2.1	Local de execução e material vegetal:	84
3.2.2	Nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico	84
3.2.3	Germinação e desenvolvimento inicial <i>in vitro</i> sob déficit hídrico com NTC no meio de cultivo:	85
3.2.4	Análises bioquímicas	85
3.2.5	Análise estatística	89
3.3	RESULTADOS	89
3.3.1	Desenvolvimento <i>in vitro</i> sob déficit hídrico	89
3.3.2	Análises bioquímicas do sistema antioxidante na parte aérea e sistema radicular	92
3.3.3	Análises bioquímicas não-enzimáticas na parte aérea e sistema radicular.....	96
3.3.4	Análise de componentes principais (PCA).....	101
3.4	DISCUSSÃO	103
3.4.1	Crescimento <i>in vitro</i> sob déficit hídrico	103
3.4.2	Sistema antioxidante enzimático	105
3.4.3	Quantificação de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e prolina.....	107
3.5	Conclusão	109
	Referências	111

1. CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Introdução

A nanotecnologia apresenta potencial para impactar positivamente o setor agrícola, minimizando problemas adversos, contribuindo para segurança alimentar e produtividade, enquanto promove equidade social e econômica (FRACETO *et al.*, 2016). Apesar da aplicação em plantas ainda estar no início do desenvolvimento, diferentes práticas agronômicas podem ser beneficiadas pela nanotecnologia. Como o controle de pragas e patógenos, a elaboração de sistemas de entrega inteligente de agroquímicos (KAH *et al.*, 2018), novos meios de manipulação genética no melhoramento de espécies, novas formas de marcação, imageamento e detecção em plantas (KAH *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2016), na disponibilização de fertilizantes (AACHARYA; CHHIPA, 2020), ou ainda atuando como moduladores de crescimento e desenvolvimento vegetal (PATEL *et al.*, 2019).

Ao entrarem em contato com as plantas, alguns nanomateriais podem promover aumentos na produtividade, por mecanismos ainda não elucidados, mas que afetam o tempo de florescimento e o acúmulo de matéria fresca/seca nas plantas (JOSHI *et al.*, 2020). Na floricultura, a associação de nanotubos de carbono permitiu maior vida de vaso em hastes florais, sendo uma área promissora para aplicação de nanotecnologia (AHMADI-MAJD *et al.*, 2021, 2022). Ou ainda, a capacidade de adsorção de compostos orgânicos e metais pesados pelos nanotubos de carbono renderia melhoras na descontaminação de áreas poluídas (SONG *et al.*, 2017), evidenciando a gama de possibilidades de uso para um mesmo material, em diferentes áreas.

É nesse sentido que a nanotecnologia oferece à agricultura soluções que tem o potencial de trazerem mais sustentabilidade para o campo (ARORA *et al.*, 2022). Essas aplicações enquadram a nanotecnologia como importante a nível global, para mitigar gargalos das práticas convencionais. Entretanto, como os materiais ainda são relativamente novos, fica imposta uma dicotomia entre o apelo pela produção mais tecnológica, versus a segurança de trabalhadores e do meio ambiente com a exposição a essas substâncias com efeitos ainda desconhecidos na totalidade (BEHL *et al.*, 2022)

Dessa forma, apesar de promissores, os nanomateriais em contato com plantas tem o potencial de prejudicar o crescimento e desenvolvimento vegetal de diferentes espécies. A elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio, danos em membranas e no aparelho fotossintético, alterações na expressão gênica, diminuição de parâmetros de crescimento,

inibição do desenvolvimento radicular e mudanças na aquisição de nutrientes e água são exemplos de possíveis efeitos negativos (USMAN *et al.*, 2020).

Isso porque, mesmo com diferentes composições, os nanomateriais são absorvidos pelas plantas por diferentes vias. Tanto na parte aérea, através da cutícula, estômatos, hidatódios, lenticelas ou lesões, bem como pelo sistema radicular, no ápice, nas raízes laterais, nos pelos radiculares, ou em rupturas na epiderme da raiz. Mais ainda, a exposição dos tegumentos da semente ou das camadas protetoras de grãos-de-pólen também permitem a entrada de nanomateriais para o interior das células, gerando efeitos indesejáveis, ou promovendo o desenvolvimento vegetal (PATEL *et al.*, 2020; VERMA *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2016).

Com o que foi apresentado, fica a importância de continuamente se estudar o impacto da exposição de plantas de diferentes espécies aos nanomateriais. Sobretudo tendo em vista o cenário de alterações climáticas globais e o crescimento contínuo da população, que pressupõe a necessidade de aumento e melhora na produção de alimentos (FAO, 2018). Outro desafio presente e futuro é melhorar o uso da água na agricultura, haja vista ser imprescindível para o desenvolvimento vegetal, porém o mal uso pode agravar situações sociais de risco, principalmente em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil (MOHOR; MENDIONDO, 2017).

É nesse sentido que diferentes caminhos são percorridos, visando mitigar os efeitos da falta de água, como melhoramento genético e seleção, indução de resistência e novas técnicas de cultivo empregando, por exemplo, as nanopartículas (SELEIMAN *et al.*, 2021). Os nanotubos de carbono, por exemplo, podem aumentar a expressão de canais de água (aquaporinas), o que pode resultar em um melhor controle do status hídrico da planta. Portanto, poderiam influenciar na resistência de plantas ao déficit hídrico (MARTÍNEZ-BALLESTA *et al.*, 2016; MARTINEZ-BALLESTA *et al.*, 2020; VERMA *et al.*, 2019), porém são poucos os registros na literatura em que nanotubos de carbono são testados em situações de estresse hídrico em plantas.

Portanto existe a necessidade de compreensão ampla dos efeitos de nanomateriais em plantas. Mais ainda, inserir essa nova tecnologia em situações adversas de crescimento pode gerar novas informações a respeito das perspectivas de uso de nanotecnologia na agricultura.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia representou e representa um importante salto para praticamente todas as áreas do conhecimento (PATEL *et al.*, 2020). Atualmente a presença de nanomateriais atinge diretamente a população, sendo encontrados em partes eletrônicas e ópticas de equipamentos, na medicina e em diversos produtos de uso cotidiano (AACHARYA; CHHIPA, 2020). Uma substância é definida como nanomaterial quando apresenta pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica, de 1-100nm (BOVERHOF *et al.*, 2015). A mudança de escala gera novas funções e propriedades baseadas tanto nas peculiaridades geométricas quanto de tamanho, as quais diferem química, física e biologicamente de quando se encontram em nível atômico ou micrométrico (NANOFORUM, 2006; USMAN *et al.*, 2020).

Como nas demais áreas, na agricultura não seria diferente, e inúmeros são as possibilidades de aplicação de nanomateriais para colaborar com um cenário futuro de segurança alimentar (ARORA *et al.*, 2022; USMAN *et al.*, 2020). Como exemplos do uso de nanomateriais que apresentam soluções inteligentes para a produção de alimentos, existem os nanofertilizantes, feitos a partir de nanopartículas de macro e micronutrientes, podendo ou não estar encapsulados em outros nanomateriais (HAMAD *et al.*, 2020). Ganhos de 20-30% são estimados com o uso de ingredientes ativos de fertilizantes na escala nanométrica, o que poderia se configurar como uma economia significativa no uso de produtos químicos na agricultura, diminuindo o impacto ambiental, mas ainda sustentando uma produção satisfatória (KAH *et al.*, 2018).

Além dos agroquímicos, a aplicação da nanotecnologia se estende também para outras áreas, como no uso de nanofiltros, biorremediadores de contaminantes, desinfetantes e marcadores da qualidade da água (DASGUPTA; RANJAN, 2017; MADHURA *et al.*, 2019; MAKGABUTLANE *et al.*, 2021; NEME *et al.*, 2021). Também existe o desenvolvimento de sensores que interagem com eletrônicos para agricultura de precisão ou ainda embalagens mais protetoras para alimentos, que aumentam a vida de prateleira (HAMAD *et al.*, 2020).

Os exemplos apresentados não encerram toda a diversidade do uso de nanotecnologia na agricultura. O cultivo *in vitro* com suplementação do meio de cultivo com nanomateriais e nanopartículas pode ser um aliado no conhecimento de seus efeitos dose-específicos e como interagem com plantas (MAHMOUD *et al.*, 2020; OLOUMI; MOUSAVI; NEJAD, 2018; TIMOTEO *et al.*, 2019a, 2019b). Dessa forma, permanece uma constante na literatura a necessidade de se descobrir, avaliar, compreender e expandir o uso de nanomateriais na agricultura (HAMAD *et al.*, 2020; USMAN *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2016).

1.2.1.1 Nanotubos de carbono

Uma categoria de nanomateriais que se destaca na interação com organismos vegetais são aqueles baseados em estruturas de carbono. Nesta classe estão presentes o fulereno, óxido de grafeno, nanopontos, nanofibras, nanochifres e os nanotubos de parede simples ou múltipla (PATEL *et al.*, 2019). Diferente de outras partículas com elementos metálicos (prata, titânio, zinco), os nanomateriais de carbono são vistos como alternativas ecologicamente viáveis para aplicação na agricultura (AACHARYA; CHHIPA, 2020).

As interações entre nanomateriais de carbono, sobretudo os nanotubos de carbono, já foram avaliadas em diversas espécies e estão revisadas na Tabela 1, de 2007 até o presente. Os exemplos com plantas cultivadas são vários, como *Arabidopsis thaliana* (FAN *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2020a), *Oryza sativa* (HAO *et al.*, 2018; JOSHI *et al.*, 2020), *Hordeum vulgare* (LAHIANI *et al.*, 2018), culturas de células de *Nicotiana tabacum* (LAHIANI *et al.*, 2016), *Oncimum basilicum* (GOHARI *et al.*, 2020), *Zea mays* (LAHIANI *et al.*, 2018), *Cucumis sativus* (KIM *et al.*, 2019), *Salvia verticillata* (RAHMANI; RADJABIAN; SOLTANI, 2020), *Glycine max* (LAHIANI *et al.*, 2018), *Solanum nigrum* (CHEN *et al.*, 2021), *Sorghum bicolor* (PANDEY *et al.*, 2018), *Solanum lycopersicum*, (GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2019; KHODAKOVSKAYA *et al.*, 2009; LAHIANI *et al.*, 2016; MCGEHEE *et al.*, 2017), *Triticum aestivum* (CHANG *et al.*, 2020).

Em alguns casos na literatura, os nanomateriais de carbono não produzem efeitos perceptíveis nas plantas, nas concentrações e formas de aplicação utilizadas (CANO *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2018). Por outro lado, os efeitos fisiológicos positivos observados variam do aumento da taxa de absorção fotossintética (LAHIANI *et al.*, 2018), aumento no crescimento de plantas (GOHARI *et al.*, 2020; LAHIANI *et al.*, 2015; ZHAI *et al.*, 2015), aumento da produção de compostos secundários de interesse econômico (RAHMANI; RADJABIAN; SOLTANI, 2020), calogênese (LAHIANI *et al.*, 2016). Bem como na modulação da toxicidade de herbicidas e metais pesados (CHEN *et al.*, 2021; FAN *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2017) e alívio dos sintomas de déficit hídrico (KIM *et al.*, 2019), aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante (GOHARI *et al.*, 2020; HAO *et al.*, 2018), além da promoção do crescimento e desenvolvimento vegetal (HAO *et al.*, 2018; MATHEW; TIWARI; TRIPATHI, 2021; ZHAO *et al.*, 2020a), da germinação de sementes e/ou desenvolvimento inicial de plântulas (HAO *et al.*, 2018; LAHIANI *et al.*, 2015, 2016) e incrementos na produtividade vegetal (HAO *et al.*, 2018; MCGEHEE *et al.*, 2017).

Entretanto, em uma relação dose-dependente, o acúmulo de nanomateriais de carbono afeta negativamente as plantas, gerando estresse oxidativo, pelo aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (BEGUM; IKHTIARI; FUGETSU, 2011; SHEN et al., 2010; RAHMANI; RADJABIAN; SOLTANI, 2020; VELIKOVA et al., 2021), diminuição da assimilação fotossintética e aumento do *quenching* não-fotoquímico (VELIKOVA et al., 2021), alteração em rotas metabólicas com o aumento de compostos indesejáveis (MCGEHEE et al., 2017). Essas alterações fisiológicas podem levar à redução na germinação (HATAMI, 2017) ou ainda à diminuição do crescimento de partes vegetativas e/ou acúmulo de matéria seca (CHANG et al., 2020; CHEN et al., 2021; GOHARI et al., 2020; GORKA et al., 2016; HAO et al., 2018; HATAMI, 2017). A absorção de nanomateriais de carbono por plantas também gera preocupação no que diz respeito à exposição de consumidores, posto que esses compostos são absorvidos e tem a capacidade de serem translocados e armazenados (CANO et al., 2016; MCGEHEE et al., 2017).

A diversidade de materiais (Tabela 1), a variação nas doses testadas (2,5 – 2000 mg/L), na forma e tempo de exposição (hidroponia, meio de cultivo *in vitro*, solo, dias, semanas) e na interpretação dos dados obtidos na literatura torna complexo o entendimento pleno da relação entre nanomateriais de carbono e vegetais (JORDAN; SINGH; CAÑAS-CARRELL, 2018). Os nanotubos de carbono já foram tratados recentemente como reguladores de crescimento de plantas (LAHIANI et al., 2018; PANDEY et al., 2018; PATEL et al., 2019), pela gama de efeitos no crescimento e desenvolvimento que são elicitados na sua presença. Apesar disso, já é conhecido que diversas espécies não são sensíveis a estes materiais (JORDAN; SINGH; CAÑAS-CARRELL, 2018), o que torna a classificação limitada.

Esse fato não descarta a possibilidade de uso de nanomateriais de carbono como ferramentas para se pensar em incrementos de produção (PATEL et al., 2020), haja vista melhorarem, por exemplo a absorção de nutrientes minerais (TIWARI et al., 2014) ou aumentarem o número de flores e frutos produzidos (ABDEL-AZIZ; HASANEEN; HELAL, 2022; JOSHI et al., 2018a; KHODAKOVSKAYA et al., 2009; ZHAO et al., 2019), ou até se destacam como veículos para incorporação de material genético de interesse, para futuros trabalhos de genômica funcional (SCHWARTZ et al., 2020).

Apesar desses benefícios que já foram confirmados para uma variedade de espécies, pouco foi explorado no que diz respeito às respostas induzidas por nanomateriais de carbono em plantas sob estresses abióticos. Alguns registros de efeitos positivos são encontrados na

interação entre óxido de grafeno e nanotubos de carbono com estresse salino em milho e switchgrass. A presença de óxido de grafeno e nanotubos de carbono aliviou os sintomas da presença de NaCl no meio de cultivo, independente da dose ou tipo de nanomateriais testados (PANDEY *et al.*, 2018).

Da mesma forma, o tratamento com nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados aliviou os sintomas da presença de NaCl em plantas de manjeriço, controlando níveis de carotenoides e a atividade de enzimas do sistema antioxidante (SOD, CAT, APX)(GOHARI *et al.*, 2020). A diminuição dos efeitos do déficit hídrico também foi observada em plantas de pepino, crescidas em solo contendo doses naturais mínimas de nanotubos de carbono de parede múltipla (KIM *et al.*, 2019). Tanto caracteres agronômicos, como a coloração das folhas, quanto aspectos fisiológicos e moleculares, como atividade enzimática antioxidante, abertura estomática e expressão de genes envolvidos com ácido abscísico foram avaliados e todos os parâmetros indicam um efeito positivo da presença dos nanomateriais em contato com as plantas em situação de estresse.

Com o que foi apresentado acima, é possível perceber que os efeitos de nanomateriais de carbono em plantas ainda permanece como um campo de pesquisa aberto para ser elucidado, sobretudo em situações de estresse. Se o entendimento pleno dessa relação em condições ideais de cultivo ainda não foi totalmente desvendado, as particularidades inerentes ao crescimento e desenvolvimento de vegetais em condições adversas certamente podem contribuir para a forma como serão usados os nanomateriais de carbono na agricultura.

Tabela 1 – Levantamento dos efeitos de nanotubos de carbono de parede múltipla em plantas de 2007 até o presente.

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Brassica napus</i> (canola), <i>Raphanus sativus</i> (rabanete), <i>Lolium perenne</i> (ryegrass), <i>Latuca sativa</i> (alface), <i>Zea mays</i> (milho) e <i>Cucumis sativus</i> (pepino)	10-20nm x 1-2µm	2000mg/L	Embebição em solução contendo NTC por 2h	Sem diferença na germinação de sementes e no alongamento radicular	(LIN; XING, 2007)
<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate)	Indisponível	10, 20 40mg/L	Sementes cultivadas em meio MS contendo NTC	Aumento na velocidade e porcentagem de germinação; Aumento na %água absorvida pela semente em 48h; Detecção Raman nas sementes; Aumento no PF total e CPA; sem alterações na raiz	(KHODAKOVSK AYA et al., 2009)
<i>Oryza sativa</i> (arroz)	40-70 nm - 5- 40nm x 0,5-2µm	20, 40, 80, 400 e 800mg/L	Germinação e desenvolvimento de plântulas em placas de Petri contendo solução de matéria orgânica natural suplementada com NTC, seguido pelo desenvolvimento das plantas em solo sem NTC, até a produção de sementes;	NTC indetectáveis nos tecidos vegetais por ER e FITIR; Detecção do acúmulo de NTC na epiderme da raiz por MEV; Atraso no tempo de florescimento das plantas em pelo menos 1 mês, redução no estabelecimento de sementes e no peso de 100 sementes (400mg/L);	(LIN <i>et al.</i> , 2009b)
<i>Cucurbita pepo</i> cv Costata Romanesco (abobrinha)	Indisponível	1000 mg/L + SDS 0,2%	Solução de Hoagland contendo NTC em placa de Petri ou hidroponia	Sem diferença na germinação de sementes; Redução no incremento de massa das plantas em hidroponia (efeito acumulado com o dispersante dodecyl sulfato de sódio (0,2%))	(STAMPOULIS; SINHA; WHITE, 2009)

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Oryza sativa</i> (arroz) - suspensão celular	10-30nm x 5-15µm	20 e 40mg/L	Meio MS suplementado NTC	Diminuição da viabilidade celular de maneira dose-dependente ao longo do tempo; Aumento de espécies reativas de oxigênio (fluorescência com DCFH-DA)	(TAN; LIN; FUGETSU, 2009)
<i>Arabidopsis thaliana</i> (ecótipo Columbia) - suspensão celular	9,5nm x 1,5µm	10, 60, 100 e 600mg/L	Meio JPL suplementado NTC	Diminuição da viabilidade celular de maneira dose-dependente ao longo do tempo; Inibição da atividade da SOD e diminuição da clorofila com NTC em aglomerados pequenos;	(LIN <i>et al.</i> , 2009a)
<i>Brassica juncea</i> (mostarda), <i>Phaseolus mungo</i>	110-170nm x 5-9µm	10, 20 e 40mg/L	Germinação em placas contendo solução aquosa com NTC	Sem diferença na germinação de sementes; Aumento no PF total, comprimento de raízes e inibição dos pelos radiculares para <i>B. juncea</i> apenas;	(GHODAKE <i>et al.</i> , 2010)
<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate)	10-35nm x 6µm	50, 100 e 200mg/L	Meio MS suplementado com NTC	Aumento PS total; Detecção dos NTC nas folhas e raízes; Alterações na expressão de diferentes genes (aquaporinas, <i>heat shock protein</i> , estresse, transporte, ciclo celular p.e.)	(KHODAKOVSKAYA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Lepidium sativum</i> (agrião-de-jardim), <i>Sorghum saccharatum</i> (sorgo), <i>Cucumis sativus</i> (pepino), <i>Raphanus sativus</i> (rabanete), <i>Solanum lycopersicon</i> (tomate)	10 ou 40-60nm x comprimento não disponível; área 357 ou 73m ² /g	0,01%, 0,1% and 0,5% (w/w) com o resíduo de esgoto	Cultivo em placa com solo contendo resíduos de esgotos municipais e industriais suplementados com NTC	Inibição da germinação e do crescimento radicular depende especificamente do tipo de resíduo, do diâmetro dos NTC, da concentração e da espécie;	(OLESZCZUK; JOŚKO; XING, 2011)
<i>Brassica juncea</i> (mostarda)	20-30nm x?	2300, 6900, 23000 e 46000 mg/L	Germinação em placas de Petri com soluções contendo NTC; Embebição em solução contendo NTC por 4h seguida pela secagem da semente (<i>priming</i>)	% germinação e índice de germinação, PS total, comprimento das plântulas, crescimento relativo de raiz, conteúdo de água variaram (aumento/redução) de forma dose-dependente; Detecção dos NTC na PA e R por FTIR; Diminuição do extravasamento de eletrólitos e de carboidratos nas sementes com NTC (provável correlação com as aquaporinas)	(MONDAL <i>et al.</i> , 2011)

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Catharanthus roseus</i> (vinca) - suspensão celular	20-30nm x 0,05-0,5µm	0,01, 0,02, 0,04, 0,06 e 0,08mg/L	Células em suspensão receberam diferentes doses de NTC e permaneceram expostas por 3h;	Aumento do sinal de fluorescência nas células com o aumento da concentração de NTC; Verificação da passagem passiva e livre de NTC pela membrana plasmática independente da via de endossomos; Verificação da entrada de NTC sozinhos, enquanto aglomerados permaneceram fora da célula; Vacúolo, plastídios e núcleo são organelas que absorveram preferencialmente os NTC;	(SERAG <i>et al.</i> , 2011)
<i>Cicer arietinum</i> (grão-de-bico)	10-30nm x 400nm;	20 e 40mg/L	Germinação em placas contendo solução aquosa com NTC	Aumento no CPA e CR, nº galhos, nº raízes; Aumento na absorção de água; Visualização dos NTC dentro da planta, especialmente do xilema por diferentes técnicas de detecção; Proposição da hipótese que os NTC se alinham dentro do xilema (membrana tubular) e aumentam a capilaridade dos vasos e transporte de água;	(TRIPATHI; SONKAR; SARKAR, 2011)
<i>Amaranthus tricolor</i> (espinafre vermelho)	11nm x 100-300µm	125, 250, 500 e 1000mg/L	Embebição <i>overnight</i> em solução de NTC e germinação em placas de Petri; Cultivo hidropônico com solução de Hoagland suplementada com NTC	Redução do crescimento de plântulas de forma dose-dependente; Diminuição do CPA, CR, PF total, nº de folhas, área foliar e formação de pelos radiculares de forma dose-dependente; Detecção de EROs por métodos histológicos e danos celulares por MET nas plantas expostas; Aumento do extravasamento de eletrólitos na folha; Atenuação de parâmetros de toxicidade com tratamento de ácido ascórbico	(BEGUM; FUGETSU, 2012)
<i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco cv Havana) - calos	20nm x 0,5-1µm	0,1, 5, 100 e 500mg/L	Meio MS suplementado com NTC	Detecção dos NTC por ER e MET; Aumento do PF e PS; Aumento na expressão de genes relacionados ao ciclo celular, extensinas e aquaporinas;	(KHODAKOVSKAYA <i>et al.</i> , 2012)

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Lactuca sativa</i> (alface), <i>Oryza sativa</i> (arroz), <i>Cucumis sativus</i> (pepino), <i>Amaranthus tricolor</i> (espinafre vermelho), <i>Abelmoschus esculentus</i> (quiabo), <i>Capsicum</i> <i>annuum</i> (pimenta), <i>Glycine max</i> (soja)	13nm x 1µm	20, 200, 1000 e 2000 mg/L	Cultivo hidropônico com solução de Hoagland suplementada com NTC	Toxicidade (inibição do crescimento e do acúmulo de MF) dos NTC foi detectada em algumas espécies (espinafre vermelho, arroz e pepino) e não apareceu em outras (soja, quiabo e pimenta); Promoção do PF radicular em alface nas doses 20 e 200mg/L e toxicidade em doses maiores; Proposição que os efeitos de toxicidade ou não acontecem por diferenças no tamanho da semente e estrutura do xilema das diferentes espécies;	(BEGUM <i>et al.</i> , 2012)
<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate cv micro-tom)	Indisponível	40mg/L; 5 tipos diferentes de NTC	Meio MS suplementado com NTC	Maior porcentagem de germinação e PF total com NTC dispersos e funcionalizados com ácido carboxílico; Maior expressão de aquaporinas em todos os tipos de NTC;	(VILLAGARCI A <i>et al.</i> , 2012)
<i>Medicago sativa</i> (alfafa)	30-50nm x 10- 20µm	0-0,8ug de NTC injetados na raiz das plantas; 1000 e 10000mg/kg solo	Injeção direta de solução de NTC na raiz das plantas; Cultivo em solo misturado com as doses de NTC;	Primeiro relato da técnica de detecção de NTC em raízes com aquecimento por microondas;	(IRIN <i>et al.</i> , 2012)
<i>Medicago sativa</i> (alfafa); <i>Triticum aestivum</i> (trigo)	12,8±3,8nm x? área 191,9 m ² /g	40-2560mg/L	Germinação em placas e crescimento de plântulas em frascos contendo água suplementado com NTC;	Aumento da % germinação de sementes de trigo apenas nas 2 maiores doses; Aumento do CR para as duas espécies; Detecção por SR nos tecidos radiculares;	(MIRALLES <i>et</i> <i>al.</i> , 2012)
<i>Triticum aestivum</i> (trigo, cv. Courtaud); <i>Brassica</i> <i>napus</i> (canola)	41,2nm x 2,65±1,55µm; área 42m ² /g	10, 50, 100mg/L	Plântulas alocadas em tubos contendo solução de Hoagland suplementada com NTC (hidroponia)	Sem diferenças na germinação, CR, PF total, evapotranspiração, pigmentos fotossintéticos, conteúdo de H ₂ O ₂ e MDA nas folhas; Detecção de NTC marcados com C14 nas folhas das plântulas de forma dose-dependente; Influência do agente dispersor (goma arábica) na área foliar, PS foliar e assimilação de NTC;	(LARUE <i>et al.</i> , 2012)

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	6-13nm x 2,5-20µm	10, 20, 40, 80, 160mg/L	Embebição das sementes por 5h em solução contendo NTC seguido de germinação em placa de Petri com os mesmos tratamentos;	Aumento do comprimento relativo, da taxa de crescimento e do alongamento celular da raiz (>20mg/L); Aumento relativo do PF; Detecção de NTC na raiz por MET; Aumento relativo na atividade enzimática de desidrogenase na raiz (absorção de nutrientes e água)	(WANG <i>et al.</i> , 2012)
Simulação computacional de membranas plasmáticas em bicamadas	Diâmetro e comprimento variável de acordo com o NTC	-	-	NTC pequenos podem entrar livremente entre a bicamada lipídica; NTC mais longos provavelmente devem causar perturbações na membrana plasmática pelo tamanho e orientação dentro da mesma; NTC funcionalizados poderiam ser adsorvidos às membranas, de diferentes maneiras; agregados de NTC em solução interagem menos com membranas e poderiam distorcer as camadas durante a absorção;	(BAOUKINA; MONTICELLI; TIELEMAN, 2013)
<i>Cucurbita pepo</i> (pepino cv. Costata Romanesco), <i>Zea mays</i> (milho Golden Jubilee Hybrid), <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate cv Brandywine), <i>Glycine max</i> (soja)	13-18nm x 10-30µm	500, 1000 e 5000mg/kg solo	NTC em pó adicionados ao solo contaminado com pesticidas; Irrigação das plantas com solução de Hoagland	Efeito dos NTC variou de forma espécies e dose-específica; pepino e tomate não tiveram alteração no PFtotal, milho apresentou aumento na maior dose, soja redução nas duas maiores doses; Presença de NTC reduziu o acúmulo de pesticidas pelas espécies testadas de forma espécie e dose-específica (provavelmente pela capacidade de adsorção dos NTC)	(DE LA TORRE-ROCHE <i>et al.</i> , 2013)
<i>Lactuca sativa</i> (alface)	13nm x 1µm	125, 250, 500 e 1000mg/L	Germinação em placas de Petri e cultivo hidropônico com solução de Hoagland suplementada com NTC;	Redução na germinação a partir de 250mg/L; Redução no CR, PFR, área foliar e PF folhas; Detecção de morte celular e H ₂ O ₂ nas folhas e raízes por métodos histológicos e microscopia eletrônica;	(IKHTIARI <i>et al.</i> , 2013)

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate cv micro-tom)	25nm x?	50 e 200mg/L	Germinação e desenvolvimento inicial em meio MS suplementado com NTC; Crescimento das plantas em substrato, com irrigação semanal nas mesmas doses de NTC da germinação em cada tratamento;	Aumento pequeno na altura de plantas e aumento expressivo no número de flores e frutos formados; sem alteração no número de folhas, número de sementes/fruto e tamanho dos frutos; Detecção de NTC nas flores por ER;	(KHODAKOVSKAYA <i>et al.</i> , 2013)
<i>Glycine max</i> (soja, S42-T4), <i>Hordeum vulgare</i> (cevada, Robusta), <i>Zea mays</i> (milho, N79Z 300GT)	15-40nm x?	50, 100 e 200mg/L (MS); 25, 50 e 100mg/L (spray)	Meio MS suplementado com NTC; Sementes recobertas com NTC por spray de ar;	Aumento na porcentagem e velocidade da germinação de forma genótipo e dose-específica, independentemente do método de exposição; Aumento no CR em soja, CPA e CF em milho (meio MS + NTC); Detecção de NTC nas sementes (spray); Aumento na expressão de aquaporinas nas espécies avaliadas (spray);	(LAHIANI <i>et al.</i> , 2013)
<i>Daucus carota</i> (cenoura)	6-9nm x 5µm	50, 100, 200 mg/L; 200mg/L	Folhas colocadas em solução aquosa contendo NTC por 5h;	Murcha das folhas após exposição aos NTC; Aumento na expressão da proteína chaperona de forma dose-dependente nas folhas (DcHsp17.7 - <i>heat shock protein</i>);	(PARK; KO; AHN, 2014)
<i>Zea mays</i> (milho doce)	6-9nm x 5µm	5, 10, 20, 40 e 60mg/L	Germinação em placas com ágar suplementado com NTC;	Aumento no conteúdo de água na raiz; Aumento no PF e PS total de forma dose-dependente; Variação (aumento/diminuição) na absorção de nutrientes de forma dose-dependente; Aumento da presença de poros na região da emergência do embrião (MEV);	(TIWARI <i>et al.</i> , 2014)
<i>Brassica juncea</i> (mostarda)	10nm x?	1 e 10mg/L + diferentes tipos de contaminantes	Plantas cultivadas em solo, irrigadas 2x por semana com solução contendo NTC e diferentes tipos de contaminantes (total 16 dias)	Aumento na absorção de todos os contaminantes testados, de forma dose-dependente com a presença de NTC; Detecção de NTC na raiz e folhas por ER e MET, respectivamente;	(CHEN <i>et al.</i> , 2015)

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Zea mays</i> (milho); <i>Glycine max</i> (soja)	20-30 nm x 0,05-2µm	10, 20 e 50 mg/L	Plântulas alocadas em frascos contendo solução de Hoagland (0,1) suplementada com NTC (hidroponia)	Aumento do acúmulo de biomassa e transpiração para milho, sobretudo com NTC funcionalizados com ácido carboxílico, resultados dose-dependente (aumento); Inibição da transpiração e acúmulo de biomassa em soja, em todos os tipos de NTC avaliados; Detecção dos NTC nas células da raiz e parte aérea, de ambas espécies (MET); Diferenciação no transporte, seletividade celular e alocação dos NTC com cargas e tamanhos diferentes, entre as duas espécies testadas;	(ZHAI <i>et al.</i> , 2015)
<i>Zea mays</i> (milho); <i>Glycine max</i> (soja)	20-30 nm x 0,05-2µm	10, 20 e 50 mg/L	Plântulas alocadas em frascos contendo solução de Hoagland (0,1) suplementada com NTC (hidroponia)	Aumento do acúmulo de biomassa e transpiração para milho, sobretudo com NTC funcionalizados com ácido carboxílico, resultados dose-dependente (aumento); Inibição da transpiração e acúmulo de biomassa em soja, em todos os tipos de NTC avaliados; Detecção dos NTC nas células da raiz e parte aérea, de ambas espécies (MET); Diferenciação no transporte, seletividade celular e alocação dos NTC com cargas e tamanhos diferentes, entre as duas espécies testadas;	(ZHAI <i>et al.</i> , 2015)
<i>Satureja khuzestanica</i> (segurelha) - calos	5-15nm x 50µm	25, 50, 100, 250 e 500 mg/L	Calogênese <i>in vitro</i> com meio B5 suplementado com NTC	Indução de calos, PF e PS e taxa de crescimento dos calos, conteúdo de fenóis e flavonoides, conteúdo de ácido rosimárico e caféico variaram (aumento/diminuição) de forma dose-dependente (max 100mg/L); Coloração dos calos variou de forma dose-dependente; Aumento do conteúdo de H ₂ O ₂ apenas nas maiores doses, assim como aumento na atividade da PPO, PAL e POX; Aumento da atividade do sistema antioxidante (teste DPPH e betacaroteno) de forma dose-dependente (max 100mg/L)	(GHORBANPOUR ; HADIAN, 2015)

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Allium cepa</i> (cebola)	-	5 e 10mg/L	Raízes dos bulbos em contato com solução contendo NTC por 24h;	Detecção dos NTC por MEV; Deformações nas estruturas da raiz (MET); Danos radiculares e geração de EROs evidenciados por técnicas histológicas; Aumento nas aberrações cromossomais, presença de micronúcleos, danos no DNA e metilação do DNA;	(GHOSH <i>et al.</i> , 2015)
<i>Daucus carota</i> (cenoura)	6-9nm x 5µm	10, 100, 200, 500, 1000 e 2000 mg/L (germinação); 1, 5, 10, 50, 100 e 200 mg/L (cresc. Plântula)	Germinação em placas contendo solução aquosa com NTC	Sem diferenças na germinação e no desenvolvimento das plântulas, ligeira redução na maior dose; Diminuição da estabilidade proteica (baixa nas <i>heat shock proteins</i> , 50mg/L); Aumento no conteúdo total de clorofila; Redução do conteúdo de H ₂ O ₂ nas folhas;	(PARK; AHN, 2016)
<i>Brassica oleracea</i> (brócolis)	6-9nm x 0,1-0,5µm	10, 20, 40 e 60 mg/L; Estresse salino com NaCl 100mM	Cultivo em hidroponia com solução de Hoagland suplementada com NTC;	Aumento do PFtotal a 10mg/L e diminuição nas demais doses; Alívio dos sintomas de estresse salino (PFtotal, condutância estomática, absorção de CO ₂ , condutância hidráulica da raiz e potencial hídrico da folha); Variação na absorção de íons na PA e R; Alteração na composição de lipídeos na membrana plasmática da raiz; Detecção dos NTC apenas nas células da raiz (MET); Aumento na expressão de aquaporinas na raiz;	(MARTÍNEZ-BALLESTA <i>et al.</i> , 2016)
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate cv micro-tom); <i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco) - calos	NTC longo: 13-18nm x 1-12µm; NTC curto: 7nm x 0,5-2µm	50 e 100mg/L	Calos e sementes cultivados em meio MS suplementado com NTC;	Aumento no PF e PS dos calos de forma independente do tipo de NTC e dose; Aumento na velocidade de % germinação de sementes, de forma dependente da dose e tipo de material; Aumento no CR de plantas expostas a NTC longos, dose-independente; Aumento no CPA, PFFPA e PFR nos dois tipos e doses testadas; Aumento no PS raiz exposta a NTC curtos; Detecção de NTC curtos por ER e NTC longos por MET no endosperma das sementes de tomate; Aumento da expressão de aquaporinas (NTC helicoidais)	(LAHIANI <i>et al.</i> , 2016)

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Vicia faba</i>	8-15nm x 50µm; Área específica: 233m ² /g	2,5, 5 e 10 mg/L	Cultivo em hidroponia com solução de Hoagland suplementada com NTC; com ou sem a presença de metais pesados (Pb e Cd)	Aumento na absorção de sódio nas folhas, pela presença de NTC; Aumento da absorção de Pb e Cd com adição de NTC em solução; Aumento na detecção de EROs (colorimetria) e do dano em proteínas (Western blot); Aumento na atividade de SOD e CAT, com aumento da dose; Modulação da atividade da APX (aumento/redução) de forma dose-dependente; Redução da atividade da POD com aumento das doses; Contaminação afetou de forma diferencial as enzimas antioxidantes na presença de NTC; Detecção de danos em organelas de células da folha (cloroplasto, núcleo e mitocôndrias; MET);	(WANG <i>et al.</i> , 2014)
<i>Oryza sativa</i> (arroz)	20-40nm x 10-30µm; Área específica 110m ² /g	5 e 20mg/L	Sementes cultivadas em solução de Hoagland suplementada com ágar (0,8%) e NTC; Exposição por 7 dias, seguido de 14 dias sem exposição	Aumento no CR e CRLateral até os 7d de exposição aos NTC, sendo igualados ao controle nos 14 dias que seguiram; Aumento na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento radicular e na acetilação do DNA; Detecção dos NTC no interior de celular (MET);	(YAN <i>et al.</i> , 2016)
<i>Phaseolus radiatus</i> (feijão mungu); <i>Raphanus satius</i> (rabanete)	10-20 nm/ 35-50nm / >50nm x?	0,5%, 1% e 1,5% (v/v)	Germinação e desenvolvimento em placas contendo NTC incorporados ao solo (v/v) e adição dos contaminantes fenantrene e cádmio	Capacidade de adsorção de contaminantes pelos NTC, menores diâmetros internos favorecem o processo; sem efeito negativo dos NTC sozinhos nas espécies avaliadas; Redução dos efeitos de toxicidade dos contaminantes pela adição de NTC no solo (inibição do alongamento da raiz e do acúmulo de biomassa);	(SONG <i>et al.</i> , 2017)

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Cucurbita pepo</i> (abobrinha)	3-5nm x 50µm, área específica: 233 m ² /g	125, 250, 500 e 1000mg/L	Meio MS suplementado com NTC; Uso de PEG6000 (15%) para indução de déficit hídrico <i>in vitro</i>	Aumento da absorção de água pela semente com 125mg/L com ou sem EH; Maior % germinação com 500mg/L em condição normal, sob DH o controle superou as doses testadas, com redução de forma dose-dependente, o mesmo ocorreu com o tempo médio de germinação, que aumentou com os NTC no meio de cultivo; Redução progressiva de forma dose-dependente no CR, CPA e Pftotal, nas duas condições testadas; Aumento no conteúdo de H ₂ O ₂ , MDA e extravasamento de eletrólitos de forma progressiva e dose-dependente, nas duas condições testadas; Aumento na atividade da SOD e CAT nas folhas com 250 e 500mg/L, com e sem DH, respectivamente; Aumento atividade da POD com 250mg/L, com e sem DH; Todas enzimas tiveram redução na atividade a 1000mg/L;	(HATAMI, 2017)
<i>Arabidopsis thaliana</i> ; <i>Oryza sativa</i> (arroz); <i>Zea mays</i> (milho); <i>Glycine max</i> (soja)	36,5±12,7nm x 0,35µm; área específica 111m ² /g	2,25mg/L	Cultivo em hidroponia com solução de Hoagland suplementada com NTC (24h); Avaliação de moléculas orgânicas aromáticas tóxicas (SPAOMs) na solução	Deteção (radiação) dos NTC nos tecidos vegetais das espécies avaliadas, sendo a raiz o principal local de detecção; Redução da absorção de NTC com adição de compostos tóxicos na solução; sem impactos no conteúdo de clorofila, antocianinas e transpiração; Alterações no conteúdo de proteínas e nas atividades de SOD, CAT e APX variaram de acordo com a espécie e presença de contaminantes, positiva e negativamente;	(ZHAO <i>et al.</i> , 2017)
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate cv micro-tom)	13-18nm x 1-12µm	50mg/L (10 + 20 + 20mg/L a cada semana)	Cultivo em hidroponia com solução suplementada com NTC; Coleta apenas dos frutos produzidos para análise;	Exposição aos NTC aumentou o número de frutos/planta, bem como o PF e PS dos frutos; Deteção dos NTC nos frutos (<i>microwave induced heat</i> - MIH), mesmo em quantidades pequenas; Mudança no perfil metabólico dos frutos expostos a NTC, com variações de aumento ou diminuição de compostos; A principal classe afetada pela presença dos NTC é dos compostos secundários, de diferentes vias;	(MCGEHEE <i>et al.</i> , 2017)

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Oryza sativa</i> (arroz)	20-40nm x 10-30µm; Área específica 110m ² /g	5 e 20mg/L	Sementes cultivadas em solução de Hoagland suplementada com ágar (0,8%) e NTC;	Aumento no CPA (apenas 20mg/L) e PFPA após 7d; Aumento drástico no CRA das plântulas no segundo dia e da semente no sétimo dia de cultivo, sendo normalizado nos demais; Aumento nos teores de clorofila a e b e na taxa fotossintética (20mg/L); Aumento na expressão de genes relacionados ao crescimento das plântulas; sem detecção de NTC nas folhas tratadas (MET); Aumento nos níveis de GA e redução do ABA aos 7d; Aumento no conteúdo de O ²⁻ e H ₂ O ₂ , aumento na atividade da SOD e POD;	(ZHANG <i>et al.</i> , 2017)
<i>Oryza sativa</i> (arroz)	20-30nm x?	50 e 500 mg/kg de solo	Plantas cultivadas em solo suplementado com NTC;	Redução no CPA e CR de forma dose-independente, sem alterações no PSPA e PSR; Diminuição da espessura da raiz e do número de células no córtex, além do encolhimento e deformação das mesmas; Aumento de 3 isoenzimas da SOD na raiz (Mn1, Mn2 e Fe), aumento da atividade apenas com 500mg/kg; Variação (aumento/diminuição) na presença das 3 isoenzimas da POD (1, 2 e 3) de forma dose-dependente, sendo mais afetada a POD3 (redução), aumento da atividade apenas com 500mg/kg; Aumento de giberelina (GA4), citocinina (isopentenil adenina, iPA), auxina (AIA) e brassinolide nas raízes, GA4 e iPA na parte aérea, de forma dose-independente; Sem alteração na massa microbiana no solo, porém variaram as comunidades de bactérias no solo;	(HAO <i>et al.</i> , 2018)

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Avena sativa</i> (aveia)	10±1nm x 3-6µm	70, 80 e 90 mg/L	Embebição de sementes em soluções de NTC por 6h; Cultivo em placa de Petri e solo	Detecção dos NTC no exterior e interior das sementes tratadas (fluorescência); Aumento da espessura de vasos do xilema na PA e R (MET e ML); Aumento na velocidade inicial da germinação (até 3 dias); Aumento no número de pelos radiculares; Aumento no CPA e CR nas plântulas germinadas em laboratório e nas plantas cultivadas em vaso; Aumento no Pftotal, PFPA e PFR, comprimento da espiga, número e peso de espiguetas, número de grãos/planta, peso de 100 grãos, peso de grãos/planta; Aumento no conteúdo relativo de água, teores de clorofila, atividade do PSII, condutância e densidade estomática; Aumento no número de células na epiderme, córtex do caule, bainha Kranz; Sem danos aparentes ao DNA das plantas; Ausência de toxicidade pela exposição de células humanas à farinha produzida pelas plantas cultivadas em vaso;	(JOSHI <i>et al.</i> , 2018b)
<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	13-14nm x?	70, 80 e 90 mg/L	Priming de sementes (embebição sem secagem); Cultivo em placas de Petri ou no solo;	Para sementes cultivadas em placas, houve aumento na velocidade de germinação de sementes, no CPA e CR das plântulas, na densidade e comprimento dos pelos radiculares, no conteúdo relativo de água nas folhas e na densidade estomática; Para sementes cultivadas em solo, aumento no CPA e CR, PStotal, PSPA e PSR; Aumento no peso e comprimento das espigas, no número de espiguetas e peso dos grãos; Aumento no comprimento das células do mesofilo, dos elementos de vaso do xilema e do tecido floemático, bem como da epiderme e da bainha Kranz em torno dos feixes vasculares; Detecção dos NTC na folha, próximos aos feixes vasculares (fluorescência), nos extratos de PA e R das plântulas (MET) e nos tecidos radiculares (MEV); Variação (aumento/diminuição) da absorção de nutrientes minerais (detecção por raio-X); Ausência de danos ao DNA das plantas tratadas;	(JOSHI <i>et al.</i> , 2018a)
<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	150-200nm x >20µm	500mg/L	Germinação de sementes em placas de Petri, sobre algodão que recebeu soluções de NTC com ou sem tetraidrofurano (THF);	Sem alteração na germinação (análise visual), no ganho de massa e CPA das plântulas;	(LEE <i>et al.</i> , 2018)

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Glycine max</i> (soja), <i>Zea mays</i> (milho), <i>Hordeum vulgare</i> (cevada)	15-40nm x? μ m	50mg/L (10 + 20 + 20mg/L a cada semana)	Cultivo em hidroponia com solução nutritiva suplementada com NTC;	Respostas diferentes para cada espécie; Aumento CPA, comprimento das folhas e assimilação de CO ₂ em milho; Aumento do PF das folhas e assimilação de CO ₂ em soja; Aumento do CPA em cevada; Detecção dos NTC nas três espécies e em todos os tecidos avaliados, incluindo sementes geradas durante o período de exposição;	(LAHIANI <i>et al.</i> , 2018)
<i>Arabidopsis thaliana</i> (ecótipo Columbia)	30-40nm x? μ m	50mg/L, com e sem metil viologênio (paraquat; 0,82mg/L)	Cultivo em hidroponia com solução nutritiva suplementada com NTC;	Sem diferenças no PFTotal, CR, teores de clorofila e antocianina das plantas; Aumento expressivo no número de raízes laterais e área radicular, diminuição do PFR; Aumento no rendimento quântico do PSII, transporte relativo de elétrons e quenching fotoquímico; Diminuição de atividade da SOD, manutenção da atividade da CAT, dos teores de GSH, MDA e radical superóxido; Redução dos efeitos da toxidez de paraquat no crescimento e na atividade antioxidante; Alterações no perfil de proteínas expressas nas plantas expostas aos NTC e paraquat;	(FAN <i>et al.</i> , 2018)
<i>Brassica napus</i> (canola), <i>Helianthus annuus</i> (girassol), <i>Cannabis sativa</i> (cânhamo)	30nm x 100nm; Área específica: 200m ² /g	10 e 50mg/L + doses de cádmio e chumbo	Sementes germinadas colocadas em placas de Petri com soluções de NTC, com ou sem metais pesados (Pb e Cd);	Aumento do CPA, CR e conteúdo de clorofila das plântulas; alívio dos sintomas de contaminação por chumbo e cádmio no crescimento;	(OLOUMI; MOUSAVI; NEJAD, 2018)
<i>Sorghum bicolor</i> (sorgo), <i>Panicum virgatum</i> (switchgrass)	Indisponível	50 e 200 mg/L; 50, 100, 200, 500 e 100mg/L + 100mM NaCl	Meio MS suplementado com NTC (e grafeno, com ou sem estresse salino); Plantas cultivadas em solo, irrigação semanal (3 vezes) com solução de NTC;	Aumento na porcentagem e velocidade de germinação, de forma genótipo e dose-independente; Aumento do CPA, sem alteração no CR, nas duas espécies; sem efeito no acúmulo de biomassa para plantas cultivadas em solo irrigadas com NTC; Alívio da toxidez por NaCl no meio na germinação, CPA e CR, além dos NTC afetarem drasticamente a expressão de aquaporinas na PA e R, nas duas espécies de forma dose-independente (max a 200mg/L); Detecção de NTC na matéria seca das plantas cultivadas em solo (MIHT);	(PANDEY <i>et al.</i> , 2018)

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Momordica charantia</i> (melão amargo)	Indisponível	50, 100 e 200mg/L	Embebição em solução contendo NTC por 48h, seguido de tratamento com plasma (60 e 120s); Plantas cultivadas em vaso, irrigadas com solução contendo NTC (2x por semana);	Aumento no CPA, CR, PFtotal e PStotal (NTC com e sem tratamento com plasma, máx. 200mg/L); Aumento do comprimento foliar com NTC + plasma; Aumento no número de diâmetro de células de metaxilema na raiz; Detecção dos NTC em células da folha e raiz (MEV); Aumento no número de flores formadas e redução no tempo de formação do primeiro fruto;	(SEDDIGHINIA <i>et al.</i> , 2019)
<i>Gossypium hirsutum</i> (algodão), <i>Catharanthus roseus</i> (vinca)	13-18nm x 1-12µm	Crescimento normal: 50 e 200mg/L; Estresse salino: 50, 100, 200, 500 e 1000mg/L	Meio MS suplementado com NTC, com ou sem estresse salino (NaCl); Crescimento em vaso, com irrigação semanal com solução de NTC (4 semanas), com ou sem estresse salino/ com ou sem déficit hídrico (suspensão de irrigação)	Aumento na porcentagem e velocidade da germinação das duas espécies, de forma dose específica; Aumento no CPA, CR, PFPA e PFR nas duas espécies <i>in vitro</i> ; Aumento no número de flores formadas em <i>Catharanthus</i> e redução do tempo de florescimento para ambas espécies; Alívio dos sintomas de estresse salino na % e velocidade de germinação de forma dose-específica (máx. 500mg/L), bem como no CPA e CR de plantas <i>in vitro</i> ; Aumento do número de flores, folhas e redução do tempo de florescimento de <i>Catharanthus</i> em vaso sob estresse salino, aumento do rendimento de fibras em plantas de algodão sob estresse salino (acima do controle positivo); Alívio dos sintomas de DH por até 7 dias, comparado ao controle; Detecção de NTC nas folhas e flores de <i>Catharanthus</i> (MIH)	(PANDEY <i>et al.</i> , 2019)

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Oryza sativa</i> (arroz)	14-35nm x 3-6µm	70, 80 e 90 mg/L	Embebição de sementes em soluções de NTC por 6h; Cultivo em placa de Petri e solo	Maior vel. Germinação; aumento no CPA, CR e CRA das folhas das plântulas; Aumento no CPA, CR, PFPA e PFR das plantas cultivadas em vaso, bem como do comprimento e peso da panícula, comprimento, número e peso de espiguetas; Aumento no número de grãos por planta e peso dos grãos; Aumento no comprimento das células do córtex do caule, vasos de xilema e bainha Kranz; Sem alterações no extravasamento de eletrólitos nas folhas, aumento nos teores de clorofila, na atividade do PSII, condutância estomática e índice estomático; Detecção de NTC nas raízes e parte aérea (fluorescência, MET, MEV, FITIR); Aumento na absorção de nutrientes (C, O, N, P e K); Sem danos visíveis ao DNA das plantas expostas aos NTC; Ausência de toxicidade do extrato de arroz das semente produzidas pelas sementes tratadas à linhagens de celular humanas <i>in vitro</i> ; Sem alterações na qualidade da composição dos grãos produzidos pelas sementes tratadas;	(JOSHI <i>et al.</i> , 2020)
<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	8nm x?	1, 2,5, 5, 10, 20 e 40mg/L	Plantas cultivadas em hidroponia, com solução suplementada com NTC e/ou cádmio (7 dias)	Redução no PSPA e PSR com exposição aos NTC; Aumento dos efeitos da toxidez por cádmio, com redução do PSPA, PSR, CR, área e diâmetro de raiz e número de pelos radiculares a partir de 10mg/L; NTC aumentam o conteúdo de cádmio na parte aérea e raízes (20mg/L); Aumento no conteúdo de citocromo P450 e glutathione transferase, redução no conteúdo de tubulina na parte aérea e raiz, com efeito combinado com cádmio (10mg/L); Danos celulares presentes nas plantas expostas aos NTC, na parte aérea e raiz, alteração no formato de cloroplastos, plasmólise celular, sendo agravado pela coexposição ao cádmio;	(CHANG <i>et al.</i> , 2020)

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Salvia verticillata</i> (sálvia-lilás)	20-30nm x? Área específica: 110m ² /g	50, 100, 250, 500, 1000	Aplicação foliar de soluções contendo NTC em plantas cultivadas em vasos;	Detecção dos NTC nas folhas expostas (ER e MET); Aumento no conteúdo de H ₂ O ₂ , MDA e prolina a partir de 100mg/L; Aumento no conteúdo foliar de proteínas, atividade da SOD, POD e CAT (50mg/L); Redução nos teores de clorofila a, b e carotenoides (a partir de 100mg/L); Alterações (aumento/redução) de fenóis e flavonoides totais de forma dose-dependente; Aumento na atividade da PAL e RAS apenas com 50mg/L e decréscimo nas demais doses, aumento progressivo da atividade da TAT com aumento das doses, que culminaram no aumento no conteúdo de ácido rosímárico nas folhas;	(RAHMANI; RADJABIAN; SOLTANI, 2020)
<i>Ocimum basilicum</i> (manjeriço)	Indisponível	25, 50, 100mg/L	Cultivo de plantas em semi-hidroponia irrigadas com solução de Hoagland (25%) suplementada com NTC após indução de estresse salino (NaCl)	Detecção dos NTC nas folhas (epifluorescência); Alterações (aumento/redução) no CPA, NF, PF e PS foliar, teores de clorofila a, b e carotenoides, máxima eficiência fotoquímica, rendimento fotoquímico do PSII, fluorescência da clorofila e extravasamento de eletrólitos na folha, sendo máximo com 50mg/L e reduzido com 100mg/L, alívio dos efeitos de redução pelo estresse salino nos parâmetros avaliados com a dose 50mg/L; Aumento dos compostos fenólicos de forma dose-dependente (máx. 100mg/L), mantido mesmo sob estresse salino; Aumento progressivo na atividade da CAT, APX e POD com exposição aos NTC na ausência de estresse, modulação da atividade (aumento/redução) com aumento na dose de NaCl; Variação na composição do óleo essencial produzido de acordo com a dose de NTC e a intensidade do estresse salino;	(GOHARI et al., 2020)

Espécie	Medidas	Dose	Forma de exposição	Resultados observados	Referência
<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate); <i>Cucumis sativus</i> (pepino); <i>Brassica napus</i> (nabo); <i>Zea mays</i> (milho)	2,05nm x 1-100µm; Área específica 985 m ² /g	100 mg/kg solo	Cultivo de plantas em solo “contaminado” com NTC;	Sem alterações na taxa de germinação, número de folhas, PFR e PF total e conteúdo de água na raiz das quatro espécies estudadas; Redução no CPA apenas em milho; Redução no PFPA em canola e pepino, aumento do PFPA em milho; sem alteração nos teores de flavonoides e taninos nas quatro espécies; Aumento nos teores de clorofila em folhas de pepino;	(LINÉ <i>et al.</i> , 2021)
<i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão)	20,33nm x?	0,5g de NTC em 8kg de solo (75mg/kg) ou 20 ug/L para aspersão	Cultivo em solo arenoso com NTC; ou exposição foliar via <i>spray</i>	Aumento no CR. CPA, PF total, PS total, conteúdo de água e área foliar, independente da forma de exposição aos NTC; Redução do EE; Aumento na produtividade; Redução do biociclo em até 20% do tempo; Aumento na atividade da SOD. CAT, APX, POX e POD em folhas;	(ABDEL-AZIZ; HASANEEN; HELAL, 2022)

Legenda: APX: peroxidase do ascorbato; CPA/CR: comprimento da parte aérea / raiz; CAT: catalase; DH: déficit hídrico; EE: extravasamento de eletrólitos; ER: espectroscopia Raman; EROs: espécies reativas de oxigênio; FTIR: Espectroscopia por infravermelho transformado de Fourier; MET: microscopia eletrônica de transmissão; MEV: microscopia eletrônica de varredura; MF: matéria fresca; MIH: Indução de calor por microondas; ML: microscopia de luz; NTC: nanotubos de carbono; PAL: fenilalanina amônia-liase; PFPA/PFR: peso fresco da parte aérea/ raiz; PPO: polifenol oxidase; POX: peroxidase; PSPA/R: peso seco da parte aérea/ raiz; SOD: dismutase do superóxido;

Fonte: Do autor (2023).

1.2.2 Déficit hídrico

O cenário futuro de irregularidades na distribuição hídrica é uma constante fonte de preocupação por parte da comunidade acadêmica e da sociedade em geral. Sobretudo em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, os impactos causados pela alteração na disponibilidade de água podem agravar situações sociais de risco (MOHOR; MENDIONDO, 2017). Um aumento na eficiência do uso da água na agricultura de apenas 10% até 2050 (0,3% ao ano) pode sozinho promover um alívio na pressão do abastecimento urbano em 78% dos grandes centros urbanos (FLÖRKE; SCHNEIDER; MCDONALD, 2018). Esse número evidencia a importância agrícola na promoção de segurança na distribuição hídrica para grande parte destas populações, as quais possuem alta demanda, porém não se inserem em sistemas que normalmente repõem ou conservam água, como é o caso do ambiente rural (BIJL *et al.*, 2018).

Visando a otimização do uso da água, os sistemas irrigados constituem uma importante ferramenta, apontada com frequência pela facilidade de controle e ajuste do gasto hídrico, em função da necessidade das plantas (PARKASH; SINGH, 2020). Entretanto, 80% de toda a área cultivada no mundo ainda depende do regime de chuvas para produção agrícola, o que coloca em riscos a produção agrícola em todo globo (FAO, 2018). Por esse motivo, informações sobre o efeito do déficit hídrico em plantas não param de ser geradas, para as mais diversas espécies de plantas cultivadas (PARKASH; SINGH, 2020)

A falta de água influencia negativamente genótipos susceptíveis ao déficit hídrico em níveis muito específicos de severidade dentro da mesma espécie. As perdas em produtividade variam de ordem, por exemplo 52% de redução em amendoim (ZURWELLER *et al.*, 2018), 70% em trigo (DING *et al.*, 2018) e 50% em girassol (DARBANI *et al.*, 2020). Este é parâmetro usado como fator de segurança na escolha do que plantar, onde plantar e colabora com programas de melhoramento genético. (ESCALANTE *et al.*, 2020; LAMACQUE *et al.*, 2020; MASOOD M; HA, 2020; ZURWELLER *et al.*, 2018).

Apesar da produtividade ser um parâmetro importante, sobretudo do ponto de vista econômico, as alterações causadas pelo déficit hídrico são perceptíveis em diversos níveis de organização vegetal, como transcriptômico (ESCALANTE *et al.*, 2020), subcelular (DALAL; TRIPATHY, 2018), ou na arquitetura da planta (SAH *et al.*, 2020) e acúmulo de matéria seca (ZHAO *et al.*, 2020). Com o impacto no contínuo solo-planta-atmosfera, alterações na condutância estomática, transpiração e assimilação de carbono podem ser rapidamente perceptíveis (XUE *et al.*, 2021).

O que normalmente acontece são respostas fisiológicas geradas pelo excesso de espécies reativas de oxigênio oriundas do aumento do quenching não-fotoquímico, ou seja, do emparelhamento fotossintético (MARTHANDAN *et al.*). Estas respostas são compartilhadas por diversas espécies, conhecidamente o aumento no conteúdo de peróxido de hidrogênio, danos de membrana quantificáveis pelos níveis de malondialdeído, aumento na transcrição, quantidade e atividade de enzimas do sistema antioxidante, como catalase, peroxidase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, síntese e acúmulo de moléculas osmorreguladoras, como prolina e açúcares (SUN *et al.*, 2020).

Mesmo com respostas comuns aos mais diversos grupos vegetais, o momento em que acontece o déficit hídrico é central à análise de seus efeitos. Se por um lado a falta de água afeta negativamente o desenvolvimento vegetal e a produtividade quando incide no momento do florescimento (ÇOLAK *et al.*, 2020; DARBANI *et al.*, 2020; REJETH *et al.*, 2020), sementes submetidas ao déficit hídrico podem ser incapazes de completar o processo germinativo, ou seja, o vegetal sequer inicia seu desenvolvimento (SAUX *et al.*, 2020; YOUSEFI *et al.*, 2020).

À exceção dos parâmetros de fotossíntese, o processo germinativo compartilha efeitos fisiológicos de déficit hídrico semelhantes a uma planta adulta. Notadamente o aumento de espécies reativas de oxigênio ($O^{\cdot -}$, H_2O_2), dessa vez originadas principalmente na atividade respiratória de mitocôndrias. Por consequência, ocorre aumento na peroxidação de lipídeos de membrana, promoção da atividade de enzimas do sistema antioxidante (SOD, CAT, GR) (POUR-ABOUGHADAREH *et al.*, 2020; SAUX *et al.*, 2020). Como efeito posterior dos danos fisiológicos causados durante a embebição, a porcentagem e velocidade de germinação podem diminuir. Além disso, nas plântulas também são perceptíveis, alterações nos teores de clorofila e carotenoides, redução do alongamento e peso fresco da parte aérea e/ou sistema radicular e alteração no número de raízes (PAWAR *et al.*, 2020; POUR-ABOUGHADAREH *et al.*, 2020; YOUSEFI *et al.*, 2020).

Para mitigar os efeitos da falta de água, diversas estratégias podem ser utilizadas. Desde aquelas a médio-longo prazo, como a seleção e cruzamento de materiais genéticos resistentes, ou ainda a indução de resistência através de técnicas de condicionamento e proteção. Exemplos conhecidos são o uso de reguladores de crescimento, aplicação de osmoprotetores, silício, selênio e potássio, plantio com hidrogéis, priming de sementes, inoculação de microrganismos no solo que auxiliam o desenvolvimento vegetal, emprego de nanopartículas e transformação genética (SELEIMAN *et al.*, 2021). Nesse sentido, avaliar o

impacto da falta de água nas plantas através do cultivo *in vitro* com adição de osmorreguladores no meio de cultivo, se apresenta como uma maneira economicamente viável e rápida de investigação (MALEKI *et al.*, 2019). O uso do polietilenoglicol, por exemplo, é uma forma de redução do potencial hídrico da solução considerada principalmente para screening em plântulas ou em estudos de genotipagem de larga escala (TURNER, 2019). Seu uso já está amplamente reportado na literatura para avaliação da germinação e desenvolvimento inicial de plântulas tanto *in vitro* quanto *ex vitro* (POUR-ABOUGHADAREH *et al.*, 2020; YOUSEFI *et al.*, 2020)

Sendo assim, apesar da exposição de semente aos nanotubos de carbono ter um efeito positivo conhecido na promoção de germinação de sementes (RATNIKOVA *et al.*, 2015), ainda não se encontram na literatura registros sobre o efeito no desenvolvimento inicial de plântulas, sobretudo sob condições de estresses abióticos, como o déficit hídrico. A nanotecnologia é um campo aberto para estudos e aplicações agronômicas (JORDAN; SINGH; CAÑAS-CARRELL, 2018; MOHAMED *et al.*, 2018) e seria importante avaliar os efeitos fisiológicos de seu uso durante a germinação de sementes em condições de déficit hídrico.

1.2.3 Germinação de sementes

O processo germinativo eficiente é importante para a agricultura. Tanto o estabelecimento, quanto o desenvolvimento inicial das plântulas dependem de germinação e emergência rápidas e uniformes. Para sementes ortodoxas, geralmente se divide em três fases, sendo a primeira (fase I) de hidratação, relacionada à entrada de água nos tecidos. Em seguida, na fase II ocorre a reativação do metabolismo e reparos celulares, que permitirão a retomada do crescimento na fase III, relacionado com o alongamento celular que leva à protrusão da radícula (LUTTS *et al.*, 2016).

Para que a germinação ocorra, é necessário que a semente interaja com os sinais ambientais que chegam, como a temperatura média, alternância de temperaturas, fotoperíodo, oxigênio e a disponibilidade de água, por exemplo (FINCH-SAVAGE; FOOTITT, 2017). Até que esses sinais ativem efetivamente a germinação, a semente lida com aspectos de conservação de sua viabilidade e, conseqüentemente, longevidade. O sistema de proteção pode se desenvolver desde a planta mãe, mas também se fortalece após a dispersão, com a síntese de proteínas chaperonas, vitrificação do citoplasma, acúmulo de açúcares não-redutores. Além disso, o reparo de danos ao DNA e atividade de enzimas antioxidantes,

também permitem o controle dos danos sofridos ao longo do tempo, até certo limite que é intrínseco a cada espécie (SANO *et al.*, 2016).

Para além do caráter biológico, a semente é um dos elementos fundamentais para a agricultura, no estabelecimento de pastagens, florestas plantadas, produção de grãos, frutas e hortaliças. Nesse sentido, a qualidade de sementes está diretamente ligada à uniformidade do desenvolvimento, produtividade e qualidade do produto colhido. Justamente por isso novas tecnologias surgem para avaliação da qualidade fisiológica de sementes, como espectroscopia Raman, de infravermelho próximo, imagens de termografia e de raio-X (MARCOS FILHO, 2015; XIA *et al.*, 2019). Além daquelas já bem estabelecidas, como o teste de tetrazólio, eletroforese de proteínas, teste de condutividade elétrica, que servem como parâmetros oficiais ou não de inferência do vigor de um lote de sementes (MARCOS FILHO, 2015).

Em conjunto com a avaliação do vigor, novas técnicas de recobrimento da semente antes do plantio surgiram como sistemas de entrega, que visam melhorar a performance da semente no campo. A diversidade de produtos é grande, como bioestimulantes, nutrientes e microorganismos inoculantes. Da mesma forma, as camadas inertes podem ser de diferentes compostos, como polímeros, sílica e argilas, que facilitam o plantio, fixação dos ingredientes ativos e a proteção da semente (AFZAL *et al.*, 2020). Também no campo experimental, não cessam de surgir novas propostas para melhorar a germinação de sementes. Tratamentos com pulsos elétricos, ultrassom, ozônio, campo magnético, água eletrolisada e plasma são exemplos de frentes de pesquisa que comprovadamente melhoram a germinação e crescimento inicial de algumas espécies, podendo operar mudanças hormonais e fisiológicas, bem como causar alterações de superfície e permeabilidade (RIFNA; RATISH RAMANAN; MAHENDRAN, 2019).

É nesse sentido que a pesquisa com nanomaterias de carbono se apresenta como outra possível fonte de melhorias no processo germinativo e no desenvolvimento de plantas cultivadas. Os nanotubos de carbono, por exemplo, se apresentam como moduladores do crescimento e promotores de mudanças fisiológicas em diversas espécies cultivadas (PATEL *et al.*, 2019), como trigo (JOSHI *et al.*, 2018a), arroz (JOSHI *et al.*, 2020), milho e soja (ZHAI *et al.*, 2015), sorgo (PANDEY *et al.*, 2018), tomate (LAHIANI *et al.*, 2016), entre outras espécies (MATHEW; TIWARI; TRIPATHI, 2021). Apesar de seu efeito positivo bem estabelecido, os nanotubos de carbono podem também ser fitotóxicos, causando a diminuição da germinação e de parâmetros de crescimento, normalmente em padrões dose-dependente (HATAMI, 2017; SZÖLLÖSI *et al.*, 2020; VERMA *et al.*, 2019).

Dessa forma, avaliar o efeito da exposição aos nanotubos de carbono em plantas de diferentes espécies pode contribuir para a compreensão de seus efeitos benéficos ou tóxicos. Visando contribuir para a viabilização ou não do uso destes materiais como promotores do crescimento e desenvolvimento vegetal.

REFERÊNCIAS

- AACHARYA, R.; CHHIPA, H. Nanocarbon fertilizers: Implications of carbon nanomaterials in sustainable agriculture production. **Carbon Nanomaterials for Agri-food and Environmental Applications**, p. 297–321, 2020.
- ABDEL-AZIZ, H. M. M.; HASANEEN, M. N. A.; HELAL, S. H. Effect of Multi-walled Carbon Nanotubes, Urea, and Peat Moss on Growth and Yield of Bean Plants Cultivated in Sandy Soil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 1173–1187, 2022.
- AFZAL, I.; JAVED, T.; AMIRKHANI, M.; TAYLOR, A. G. Modern Seed Technology: Seed Coating Delivery Systems for Enhancing Seed and Crop Performance. **Agriculture**, v. 10, n. 11, p. 526, 2020.
- AHMADI-MAJD, M.; MOUSAVI-FARD, S.; REZAEI NEJAD, A.; FANOURLAKIS, D. Carbon nanotubes in the holding solution stimulate flower opening and prolong vase life in carnation. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 9, n. 1, p. 1–22, 2022.
- AHMADI-MAJD, M.; REZAEI NEJAD, A.; MOUSAVI-FARD, S.; FANOURLAKIS, D. Postharvest application of single, multi-walled carbon nanotubes and nanographene oxide improves rose keeping quality. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 346–360, 2021.
- ARORA, S.; MURMU, G.; MUKHERJEE, K.; SAHA, S.; MAITY, D. A comprehensive overview of nanotechnology in sustainable agriculture. **Journal of Biotechnology**, v. 355, p. 21–41, 2022.
- BAOUKINA, S.; MONTICELLI, L.; TIELEMAN, D. P. Interaction of pristine and functionalized carbon nanotubes with lipid membranes. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 40, p. 12113–12123, 2013.
- BEGUM, P.; FUGETSU, B. Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes on red spinach (*Amaranthus tricolor* L) and the role of ascorbic acid as an antioxidant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 243, p. 212–222, 2012.
- BEGUM, P.; IKHTIARI, R.; FUGETSU, B. Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce. **Carbon**, v. 49, n. 12, p. 3907–3919, 2011.
- BEGUM, P.; IKHTIARI, R.; FUGETSU, B.; MATSUOKA, M.; AKASAKA, T.; WATARI, F. Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes assessed by selected plant species in the seedling stage. **Applied Surface Science**, v. 262, p. 120–124, 2012.
- BEHL, T.; KAUR, I.; SEHGAL, A.; SINGH, S.; SHARMA, N.; BHATIA, S.; AL-HARRASI, A.; BUNGAU, S. The dichotomy of nanotechnology as the cutting edge of agriculture: Nano-farming as an asset versus nanotoxicity. **Chemosphere**, v. 288, p. 132533, 2022.
- BIJL, D. L.; BIEMANS, H.; BOGAART, P. W.; DEKKER, S. C.; DOELMAN, J. C.; STEHFEST, E.; VUUREN, D. P. van. A global analysis of future water deficit based on different allocation mechanisms. **Water Resources Research**, v. 54, n. 8, p. 5803–5824, 2018
- BOVERHOF, D. R.; BRAMANTE, C. M.; BUTALA, J. H.; CLANCY, S. F.; LAFRANCONI, W. M.; WEST, J.; GORDON, S. C. Comparative assessment of

nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 137–150, 2015.

CANO, A. M.; KOHL, K.; DELEON, S.; PAYTON, P.; IRIN, F.; SAED, M.; SHAH, S. A.; GREEN, M. J.; CAÑAS-CARRELL, J. E. Determination of uptake, accumulation, and stress effects in corn (*Zea mays* L.) grown in single-wall carbon nanotube contaminated soil. **Chemosphere**, v. 152, p. 117–122, 2016.

CHANG, X.; SONG, Z.; XU, Y.; GAO, M. Effects of carbon nanotubes on growth of wheat seedlings and Cd uptake. **Chemosphere**, v. 240, 2020.

CHEN, G.; QIU, J.; LIU, Y.; JIANG, R.; CAI, S.; LIU, Y.; ZHU, F.; ZENG, F.; LUAN, T.; OUYANG, G. Carbon nanotubes act as contaminant carriers and translocate within plants. **Scientific Reports 2015 5:1**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2015.

CHEN, X.; WANG, J.; HAYAT, K.; ZHANG, D.; ZHOU, P. Small structures with big impact: multi-walled carbon nanotubes enhanced remediation efficiency in hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. under cadmium and arsenic stress. **Chemosphere**, v. 276, p. 130130, 2021.

ÇOLAK, Y. B.; YAZAR, A.; ALGHORY, A.; TEKIN, S. Evaluation of crop water stress index and leaf water potential for differentially irrigated quinoa with surface and subsurface drip systems. **Irrigation Science**, v. 39, n. 1, p. 81–100, 2020.

SHEN, CX, ZHANG, QF, LI, J. Induction of programmed cell death in *Arabidopsis* and rice by single-wall carbon nanotubes. **American journal of botany**, v. 97, n. 10, p. 1602–1609, 2010.

DALAL, V. K.; TRIPATHY, B. C. Water-stress induced downsizing of light-harvesting antenna complex protects developing rice seedlings from photo-oxidative damage. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2018.

DARBANI, S. P.; MEHRABI, A. A.; POURDAD, S. S.; MALEKI, A.; FARSHADFAR, M. Evaluation of reaction of sunflower genotypes in terms of yield and yield components under water stress conditions. **Environmental Stresses in Crop Sciences**, v. 4, p. 1063–1076, 2020.

DASGUPTA, N.; RANJAN, S. Applications of nanotechnology in agriculture and water quality management. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, n. 4, p. 591–605, 2017.

DE LA TORRE-ROCHE, R.; HAWTHORNE, J.; DENG, Y.; XING, B.; CAI, W.; NEWMAN, L. A.; WANG, Q.; MA, X.; HAMDY, H.; WHITE, J. C. Multiwalled carbon nanotubes and C60 fullerenes differentially impact the accumulation of weathered pesticides in four agricultural plants. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 21, p. 12539–12547, 2013.

DING, J.; HUANG, Z.; ZHU, M.; LI, C.; ZHU, X.; GUO, W. Does cyclic water stress damage wheat yield more than a single stress? **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, 2018.

ESCALANTE, M.; VIGLIOCCO, A.; MOSCHEN, S.; FERNÁNDEZ, P.; HEINZ, R.; GARCIA-GARCIA, F.; DI RIENZO, J. A.; ANDRADE, A.; ALEMANO, S. Transcriptomic analysis reveals a differential gene expression profile between two sunflower inbred lines with different ability to tolerate water stress. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 38, n. 2, p. 222–237, 2020.

FAN, X.; XU, J.; LAVOIE, M.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; ZHU, Y.; LU, T.; FU, Z.; ZHU, T.; QIAN, H. Multiwall carbon nanotubes modulate paraquat toxicity in *Arabidopsis thaliana*. **Environmental Pollution**, v. 233, p. 633–641, 2018.

FAO. **The Future of Food and Agriculture: Alternative Pathways to 2050**. [s.l.: s.n.], 2018.

FINCH-SAVAGE, W. E.; FOOTITT, S. Seed dormancy cycling and the regulation of dormancy mechanisms to time germination in variable field environments. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 4, p. 843–856, 2017.

FLÖRKE, M.; SCHNEIDER, C.; MCDONALD, R. I. Water competition between cities and agriculture driven by climate change and urban growth. **Nature Sustainability**, v. 1, n. 1, p. 51–58, 2018.

FRACETO, L. F.; GRILLO, R.; DE MEDEIROS, G. A.; SCOGNAMIGLIO, V.; REA, G.; BARTOLUCCI, C. Nanotechnology in agriculture: Which innovation potential does it have? **Frontiers in Environmental Science**, v. 4, n. MAR, 2016.

GHODAKE, G.; SEO, Y. D.; PARK, D.; LEE, D. S. Phytotoxicity of carbon nanotubes assessed by *Brassica juncea* and *Phaseolus mungo*. **Journal of Nanoelectronics and Optoelectronics**, v. 5, n. 2, p. 157–160, 2010.

GHORBANPOUR, M.; HADIAN, J. Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown *in vitro*. **Carbon**, v. 94, p. 749–759, 2015.

GHOSH, M.; BHADRA, S.; ADEGOKE, A.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. MWCNT uptake in *Allium cepa* root cells induces cytotoxic and genotoxic responses and results in DNA hyper-methylation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 774, p. 49–58, 2015.

GOHARI, G.; SAFAI, F.; PANAHIRAD, S.; AKBARI, A.; RASOULI, F.; DADPOUR, M. R.; FOTOPOULOS, V. Modified multiwall carbon nanotubes display either phytotoxic or growth promoting and stress protecting activity in *Ocimum basilicum* L. in a concentration-dependent manner. **Chemosphere**, v. 249, p. 126171, 2020.

GONZÁLEZ-GARCÍA, Y.; LÓPEZ-VARGAS, E. R.; CADENAS-PLIEGO, G.; BENAVIDES-MENDOZA, A.; GONZÁLEZ-MORALES, S.; ROBLEDO-OLIVO, A.; ALPUCHE-SOLÍS, Á. G.; JUÁREZ-MALDONADO, A. Impact of carbon nanomaterials on the antioxidant system of tomato seedlings. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 5858, 2019.

GORKA, D. E.; JEGER, J. L.; ZHANG, H.; MA, Y.; COLMAN, B. P.; BERNHARDT, E. S.; LIU, J. Phytotoxicity of soluble graphitic nanofibers to model plant species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 12, p. 2941–2947, 2016.

HAMAD, H. T.; AL-SHARIFY, Z. T.; AL-NAJJAR, S. Z.; GADOOA, Z. A. A review on nanotechnology and its applications on fluid flow in agriculture and water recourses. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 870, n. 1, p. 012038, 2020.

HAO, Y.; MA, C.; ZHANG, Z.; SONG, Y.; CAO, W.; GUO, J.; ZHOU, G.; RUI, Y.; LIU, L.; XING, B. Carbon nanomaterials alter plant physiology and soil bacterial community composition in a rice-soil-bacterial ecosystem. **Environmental Pollution**, v. 232, p. 123–136, 2018.

- HATAMI, M. Toxicity assessment of multi-walled carbon nanotubes on *Cucurbita pepo* L. under well-watered and water-stressed conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 274–283, 2017.
- IKHTIARI, R.; BEGUM, P.; WATARI, F.; FUGETSU, B. Toxic effect of multiwalled carbon nanotubes on lettuce (*Lactuca sativa*). **Nano Biomedicine**, v. 5, n. 1, p. 18–24, 2013.
- IRIN, F.; SHRESTHA, B.; CAÑAS, J. E.; SAED, M. A.; GREEN, M. J. Detection of carbon nanotubes in biological samples through microwave-induced heating. **Carbon**, v. 50, n. 12, p. 4441–4449, 2012.
- JORDAN, J. T.; SINGH, K. P.; CAÑAS-CARRELL, J. E. Carbon-based nanomaterials elicit changes in physiology, gene expression, and epigenetics in exposed plants: A review. **Current Opinion in Environmental Science and Health**, v. 6, p. 29–35, 2018.
- JOSHI, A.; KAUR, S.; DHARAMVIR, K.; NAYYAR, H.; VERMA, G. Multi-walled carbon nanotubes applied through seed-priming influence early germination, root hair, growth and yield of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 8, p. 3148–3160, 2018a.
- JOSHI, A.; KAUR, S.; SINGH, P.; DHARAMVIR, K.; NAYYAR, H.; VERMA, G. Tracking multi-walled carbon nanotubes inside oat (*Avena sativa* L.) plants and assessing their effect on growth, yield, and mammalian (human) cell viability. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 8, n. 6, p. 1399–1414, 2018b.
- JOSHI, A.; SHARMA, L.; KAUR, S.; DHARAMVIR, K.; NAYYAR, H.; VERMA, G. Plant nanobionic effect of multi-walled carbon nanotubes on growth, anatomy, yield and grain composition of rice. **BioNanoScience**, v. 10, n. 2, p. 430–445, 2020.
- KAH, M.; KOOKANA, R. S.; GOGOS, A.; BUCHELI, T. D. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. **Nature Nanotechnology**, v. 13, n. 8, p. 677–684, 2018.
- KHODAKOVSKAYA, M.; DERVISHI, E.; MAHMOOD, M.; XU, Y.; LI, Z.; WATANABE, F.; BIRIS, A. S. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. **ACS Nano**, v. 3, n. 10, p. 3221–3227, 2009.
- KHODAKOVSKAYA, M. V.; DE SILVA, K.; BIRIS, A. S.; DERVISHI, E.; VILLAGARCIA, H. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. **ACS Nano**, v. 6, n. 3, p. 2128–2135, 2012.
- KHODAKOVSKAYA, M. V.; DE SILVA, K.; NEDOSEKIN, D. A.; DERVISHI, E.; BIRIS, A. S.; SHASHKOV, E. V.; GALANZHA, E. I.; ZHAROV, V. P. Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 3, p. 1028–1033, 2011.
- KHODAKOVSKAYA, M. V.; KIM, B. S.; KIM, J. N.; ALIMOHAMMADI, M.; DERVISHI, E.; MUSTAFA, T.; CERNIGLA, C. E. Carbon nanotubes as plant growth regulators: effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. **Small**, v. 9, n. 1, p. 115–123, 2013.
- KIM, T. Y.; LEE, S.-H.; KU, H.; LEE, S.-Y. Enhancement of drought tolerance in cucumber plants by natural carbon materials. **Plants**, v. 8, n. 11, p. 446, 2019.

- LAHIANI, M. H.; CHEN, J.; IRIN, F.; PURETZKY, A. A.; GREEN, M. J.; KHODAKOVSKAYA, M. V. Interaction of carbon nanohorns with plants: Uptake and biological effects. **Carbon**, v. 81, n. 1, p. 607–619, 2015.
- LAHIANI, M. H.; DERVISHI, E.; CHEN, J.; NIMA, Z.; GAUME, A.; BIRIS, A. S.; KHODAKOVSKAYA, M. V. Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 5, n. 16, p. 7965–7973, 2013.
- LAHIANI, M. H.; DERVISHI, E.; IVANOV, I.; CHEN, J.; KHODAKOVSKAYA, M. Comparative study of plant responses to carbon-based nanomaterials with different morphologies. **Nanotechnology**, v. 27, n. 26, p. 265102, 2016.
- LAHIANI, M. H.; NIMA, Z. A.; VILLAGARCIA, H.; BIRIS, A. S.; KHODAKOVSKAYA, M. V. Assessment of effects of the long-term exposure of agricultural crops to carbon nanotubes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 26, p. 6654–6662, 2018.
- LAMACQUE, L.; CHARRIER, G.; FARNESE, F. dos S.; LEMAIRE, B.; AMÉGLIO, T.; HERBETTE, S. Drought-induced mortality: branch diameter variation reveals a point of no recovery in lavender species. **Plant Physiology**, v. 183, n. 4, p. 1638–1649, 2020.
- LARUE, C.; PINAULT, M.; CZARNY, B.; GEORGIN, D.; JAILLARD, D.; BENDIAB, N.; MAYNE-L'HERMITE, M.; TARAN, F.; DIVE, V.; CARRIÈRE, M. Quantitative evaluation of multi-walled carbon nanotube uptake in wheat and rapeseed. **Journal of Hazardous Materials**, v. 227–228, p. 155–163, 2012.
- LEE, S. M.; RAJA, P. M. v.; ESQUENAZI, G. L.; BARRON, A. R. Effect of raw and purified carbon nanotubes and iron oxide nanoparticles on the growth of wheatgrass prepared from the cotyledons of common wheat (*Triticum aestivum*). **Environmental Science: Nano**, v. 5, n. 1, p. 103–114, 2018.
- LIN, C.; FUGETSU, B.; SU, Y.; WATARI, F. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, n. 2–3, p. 578–583, 30 out. 2009a.
- LIN, D.; XING, B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. **Environmental Pollution**, v. 150, n. 2, p. 243–250, 2007.
- LIN, S.; REPERT, J.; HU, Q.; HUDSON, J. S.; REID, M. L.; RATNIKOVA, T. A.; RAO, A. M.; LUO, H.; KE, P. C. Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants. **Small**, v. 5, n. 10, p. 1128–1132, 2009b.
- LINÉ, C.; MANENT, F.; WOLINSKI, A.; FLAHAUT, E.; LARUE, C. Comparative study of response of four crop species exposed to carbon nanotube contamination in soil. **Chemosphere**, v. 274, p. 129854, 2021.
- LUTTS, S.; BENINCASA, P.; WOJTYLA, L.; S, S. K.; PACE, R.; LECHOWSKA, K.; QUINET, M.; MALGORZATA GARNCZARSKA. Seed priming: new comprehensive approaches for an old empirical technique. **New Challenges in Seed Biology - Basic and Translational Research Driving Seed Technology**, 2016.
- MADHURA, L.; SINGH, S.; KANCHI, S.; SABELA, M.; BISETTY, K.; INAMUDDIN. Nanotechnology-based water quality management for wastewater treatment. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 1, p. 65–121, 2019.

- MAHMOUD, L. M.; DUTT, M.; SHALAN, A. M.; EL-KADY, M. E.; EL-BORAY, M. S.; SHABANA, Y. M.; GROSSER, J. W. Silicon nanoparticles mitigate oxidative stress of *in vitro*-derived banana (*Musa acuminata* ‘Grand Nain’) under simulated water deficit or salinity stress. **South African Journal of Botany**, v. 132, p. 155–163, 2020.
- MAKGABUTLANE, B.; NTHUNYA, L. N.; MAUBANE-NKADIMENG, M. S.; MHLANGA, S. D. Green synthesis of carbon nanotubes to address the water-energy-food nexus: A critical review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 1, p. 104736, 2021.
- MALEKI, M.; GHORBANPOUR, M.; NIKABADI, S.; WANI, S. H. *In vitro* screening of crop plants for abiotic stress tolerance. **Recent Approaches in Omics for Plant Resilience to Climate Change**, p. 75–91, 2019.
- MARCOS FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 4, p. 363–374, 2015.
- MARTHANDAN, V.; GEETHA, R.; KUMUTHA, K.; RENGANATHAN, G.; KARTHIKEYAN, A.; RAMALINGAM, J. Molecular sciences seed priming: a feasible strategy to enhance drought tolerance in crop plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8258, 2020.
- MARTINEZ-BALLESTA, M. C.; CHELBI, N.; LOPEZ-ZAPLANA, A.; CARVAJAL, M. Discerning the mechanism of the multiwalled carbon nanotubes effect on root cell water and nutrient transport. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 146, p. 23–30, 2020.
- MARTÍNEZ-BALLESTA, M. C.; ZAPATA, L.; CHALBI, N.; CARVAJAL, M. Multiwalled carbon nanotubes enter broccoli cells enhancing growth and water uptake of plants exposed to salinity. **Journal of Nanobiotechnology** 2016 14:1, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2016.
- MASOOD M; HA, S. Screening of maize (*Zea mays* L.) inbred lines under water deficit conditions. **Biological and Clinical Sciences Research Journal**, p. 7, 2020.
- MATHEW, S.; TIWARI, D. K.; TRIPATHI, D. Interaction of carbon nanotubes with plant system: a review. **Carbon Letters**, v. 31, n. 2, p. 167–176, 2021.
- MCGEHEE, D. L.; LAHIANI, M. H.; IRIN, F.; GREEN, M. J.; KHODAKOVSKAYA, M. V. Multiwalled carbon nanotubes dramatically affect the fruit metabolome of exposed tomato plants. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 38, p. 32430–32435, 2017.
- MIRALLES, P.; JOHNSON, E.; CHURCH, T. L.; HARRIS, A. T. Multiwalled carbon nanotubes in alfalfa and wheat: Toxicology and uptake. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 9, n. 77, p. 3514–3527, 2012.
- MOHAMED, M. A.; HASHIM, A. F.; ALGHUTHAYMI, M. A.; ABD-ELSALAM, K. A. Nano-carbon: plant growth promotion and protection. *Em*: ABD-ELSALAM, K.; PRASAD, R. **Nanobiotechnology Applications in Plant Protection**. [s.l.] Springer, 2018. p. 155–188.
- MOHOR, G. S.; MENDIONDO, E. M. Economic indicators of hydrologic drought insurance under water demand and climate change scenarios in a Brazilian context. **Ecological Economics**, v. 140, p. 66–78, 2017.
- MONDAL, A.; BASU, R.; DAS, S.; NANDY, P. Beneficial role of carbon nanotubes on mustard plant growth: An agricultural prospect. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 10, p. 4519–4528, 2011.

NANOFORUM. **Nanoforum report: Nanotechnology in agriculture and food.** Disponible en: <ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/nanotechnology/docs/nanotechnology_in_agriculture_and_food.pdf.>.

NEME, K.; NAFADY, A.; UDDIN, S.; TOLA, Y. B. Application of nanotechnology in agriculture, postharvest loss reduction and food processing: food security implication and challenges. **Heliyon**, v. 7, n. 12, p. e08539, 2021.

OLESZCZUK, P.; JOŚKO, I.; XING, B. The toxicity to plants of the sewage sludges containing multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 1, p. 436–442, 2011.

OLOUMI, H.; MOUSAVI, E. A.; NEJAD, R. M. Multi-wall carbon nanotubes effects on plant seedlings growth and cadmium/lead uptake *in vitro*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 65, n. 2, p. 260–268, 2018.

PANDEY, K.; ANAS, M.; HICKS, V. K.; GREEN, M. J.; KHODAKOVSKAYA, M. V. Improvement of commercially valuable traits of industrial crops by application of carbon-based nanomaterials. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 19358, 2019.

PANDEY, K.; LAHIANI, M. H.; HICKS, V. K.; KEITH HUDSON, M.; GREEN, M. J.; KHODAKOVSKAYA, M. Effects of carbon-based nanomaterials on seed germination, biomass accumulation and salt stress response of bioenergy crops. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2018.

PARK, H.; KO, E.; AHN, Y. J. Small heat shock proteins can confer tolerance to nanomaterial-induced toxicity. **HortScience**, v. 49, n. 8, p. 1116–1121, 2014.

PARK, S.; AHN, Y. J. Multi-walled carbon nanotubes and silver nanoparticles differentially affect seed germination, chlorophyll content, and hydrogen peroxide accumulation in carrot (*Daucus carota* L.). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 257–262, 2016.

PARKASH, V.; SINGH, S. A review on potential plant-based water stress indicators for vegetable crops. **Sustainability**, v. 12, n. 10, p. 3945, 2020.

PATEL, A.; TIWARI, S.; PARIHAR, P.; SINGH, R.; PRASAD, S. M. Carbon nanotubes as plant growth regulators: Impacts on growth, reproductive system, and soil microbial community. *Em*: TRIPATHI, D.; AHMAD, P.; SHARMA, S.; CHAUHAN, D.; DUBEY, N. **Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 23–42.

PATEL, D. K.; KIM, H.-B.; DUTTA, S. D.; GANGULY, K.; LIM, K.-T. Carbon nanotubes-based nanomaterials and their agricultural and biotechnological applications. **Materials**, v. 13, n. 7, p. 1679, 2020.

PAWAR, K. R.; WAGH, S. G.; SONUNE, P. P.; SOLUNKE, S. R.; SOLANKE, S. B.; RATHOD, S. G.; HARKE, S. N. Analysis of water stress in different varieties of maize (*Zea mays* L.) At the early seedling stage. **Biotechnology Journal International**, p. 15–24, 2020.

POUR-ABOUGHADAREH, A.; ETMINAN, A.; ABDELRAHMAN, M.; SIDDIQUE, K. H. M.; TRAN, L.-S. P. Assessment of biochemical and physiological parameters of durum wheat genotypes at the seedling stage during polyethylene glycol-induced water stress. **Plant Growth Regulation 2020 92:1**, v. 92, n. 1, p. 81–93, 2020.

- RAHMANI, N.; RADJABIAN, T.; SOLTANI, B. M. Impacts of foliar exposure to multi-walled carbon nanotubes on physiological and molecular traits of *Salvia verticillata* L., as a medicinal plant. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 150, p. 27–38, 2020.
- RATNIKOVA, T. A.; PODILA, R.; RAO, A. M.; TAYLOR, A. G. Tomato seed coat permeability to selected carbon nanomaterials and enhancement of germination and seedling growth. **Scientific World Journal**, v. 2015, p. 419215, 2015.
- REJETH, R.; MANIKANTA, Ch. L. N.; BEENA, R.; STEPHEN, R.; MANJU, R. V.; VIJI, M. M. Water stress mediated root trait dynamics and identification of microsatellite markers associated with root traits in rice (*Oryza sativa* L.). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 26, n. 6, p. 1225–1236, 2020.
- RIFNA, E. J.; RATISH RAMANAN, K.; MAHENDRAN, R. Emerging technology applications for improving seed germination. **Trends in Food Science & Technology**, v. 86, p. 95–108, 2019.
- SAH, R. P.; CHAKRABORTY, M.; PRASAD, K.; PANDIT, M.; TUDU, V. K.; CHAKRAVARTY, M. K.; NARAYAN, S. C.; RANA, M.; MOHARANA, D. Impact of water deficit stress in maize: Phenology and yield components. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.
- SANO, N.; RAJJOU, L.; NORTH, H. M.; DEBEAUJON, I.; MARION-POLL, A.; SEO, M. Staying alive: molecular aspects of seed longevity. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 4, p. 660–674, 2016.
- SAUX, M.; PONNAIAH, M.; LANGLADE, N.; ZANCHETTA, C.; BALLIAU, T.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; BAILLY, C. A multiscale approach reveals regulatory players of water stress responses in seeds during germination. **Plant, Cell & Environment**, v. 43, n. 5, p. 1300–1313, 2020.
- SCHWARTZ, S. H.; HENDRIX, B.; HOFFER, P.; SANDERS, R. A.; ZHENG, W. Carbon dots for efficient siRNA delivery and gene silencing in plants. **Plant Physiology**, v. 184, p. 647–657, 2020.
- SEDDIGHINIA, F. S.; IRANBAKHSH, A.; ORAGHI ARDEBILI, Z.; NEJAD SATARI, T.; SOLEIMANPOUR, S. Seed priming with cold plasma and multi-walled carbon nanotubes modified growth, tissue differentiation, anatomy, and yield in bitter melon (*Momordica charantia*). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 1, p. 87–98, 2019.
- SELEIMAN, M. F.; AL-SUHAIBANI, N.; ALI, N.; AKMAL, M.; ALOTAIBI, M.; REFAY, Y.; DINDAROGLU, T.; ABDUL-WAJID, H. H.; BATTAGLIA, M. L. Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 259, 2021.
- SERAG, M. F.; KAJI, N.; GAILLARD, C.; OKAMOTO, Y.; TERASAKA, K.; JABASINI, M.; TOKESHI, M.; MIZUKAMI, H.; BIANCO, A.; BABA, Y. Trafficking and subcellular localization of multiwalled carbon nanotubes in plant cells. **ACS Nano**, v. 5, n. 1, p. 493–499, 2011.
- SONG, B.; ZENG, G.; GONG, J.; ZHANG, P.; DENG, J.; DENG, C.; YAN, J.; XU, P.; LAI, C.; ZHANG, C.; CHENG, M. Effect of multi-walled carbon nanotubes on phytotoxicity of sediments contaminated by phenanthrene and cadmium. **Chemosphere**, v. 172, p. 449–458, 2017.

- STAMPOULIS, D.; SINHA, S.; WHITE, J. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. **Environmental Science and Technology**, v. 43, p. 9473–9479, 2009.
- SUN, Y.; WANG, C.; CHEN, H. Y. H.; RUAN, H. Response of plants to water stress: a meta-analysis. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. 978, 2020.
- SZŐLLŐSI, R.; MOLNÁR, Á.; KONDAK, S.; KOLBERT, Z. Dual effect of nanomaterials on germination and seedling growth: stimulation vs. Phytotoxicity. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1745, 2020.
- TAN, X. ming; LIN, C.; FUGETSU, B. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells. **Carbon**, v. 47, n. 15, p. 3479–3487, 2009.
- TIMOTEO, C. de O.; PAIVA, R.; DOS REIS, M. V.; CLARO, P. I. C.; DA SILVA, D. P. C.; MARCONCINI, J. M.; DE OLIVEIRA, J. E. Silver nanoparticles in the micropropagation of *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, n. 2, p. 359–368, 2019a.
- TIMOTEO, C. de O.; PAIVA, R.; DOS REIS, M. V.; CLARO, P. I. C.; FERRAZ, L. M.; MARCONCINI, J. M.; DE OLIVEIRA, J. E. *In vitro* growth of *Physalis peruviana* L. affected by silver nanoparticles. **3 Biotech**, v. 9, n. 4, p. 1–9, 2019b.
- TIWARI, D. K.; DASGUPTA-SCHUBERT, N; VILLASEÑ OR CENDEJAS, L M; VILLEGAS, J; CARRETO MONTOYA, L; BORJAS GARCÍA, S E. Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (*Zea mays*) and implications for nanoagriculture. **Applied Nanosciences**, v. 4, p. 577–591, 2014.
- TRIPATHI, S.; SONKAR, S. K.; SARKAR, S. Growth stimulation of gram (*Cicer arietinum*) plant by water soluble carbon nanotubes. **Nanoscale**, v. 3, n. 3, p. 1176–1181, 2011.
- TURNER, N. C. Imposing and maintaining soil water deficits in drought studies in pots. **Plant and Soil**, v. 439, n. 1–2, p. 45–55, 2019.
- USMAN, M.; FAROOQ, M.; WAKEEL, A.; NAWAZ, A.; CHEEMA, S. A.; REHMAN, H. ur; ASHRAF, I.; SANAUULLAH, M. Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. **Science of the Total Environment**, v. 721, p. 137778, 2020.
- VELIKOVA, V.; PETROVA, N.; KOVÁCS, L.; PETROVA, A.; KOLEVA, D.; TSONEV, T.; TANEVA, S.; PETROV, P.; KRUMOVA, S. Single-walled carbon nanotubes modify leaf micromorphology, chloroplast ultrastructure and photosynthetic activity of pea plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4878, 2021.
- VERMA, S. K.; DAS, A. K.; GANTAIT, S.; KUMAR, V.; GUREL, E. Applications of carbon nanomaterials in the plant system: A perspective view on the pros and cons. **Science of the Total Environment**, v. 667, p. 485–499, 2019.
- VILLAGARCIA, H.; DERVISHI, E.; DE SILVA, K.; BIRIS, A. S.; KHODAKOVSKAYA, M. V. Surface chemistry of carbon nanotubes impacts the growth and expression of water channel protein in tomato plants. **Small**, v. 8, n. 15, p. 2328–2334, 2012.
- WANG, C.; LIU, H.; CHEN, J.; TIAN, Y.; SHI, J.; LI, D.; GUO, C.; MA, Q. Carboxylated multi-walled carbon nanotubes aggravated biochemical and subcellular damages in leaves of

broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings under combined stress of lead and cadmium. **Journal of Hazardous Materials**, v. 274, p. 404–412, 2014.

WANG, P.; LOMBI, E.; ZHAO, F.-J.; KOPITTKE, P. M. Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 8, p. 699–712, 2016.

WANG, X.; HAN, H.; LIU, X.; GU, X.; CHEN, K.; LU, D. Multi-walled carbon nanotubes can enhance root elongation of wheat (*Triticum aestivum*) plants. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 6, p. 1–10, 2012.

XIA, Y.; XU, Y.; LI, J.; ZHANG, C.; FAN, S. Recent advances in emerging techniques for non-destructive detection of seed viability: A review. **Artificial Intelligence in Agriculture**, v. 1, p. 35–47, 2019.

XUE, F.; LIU, W.; CAO, H.; SONG, L.; JI, S.; TONG, L.; DING, R. Stomatal conductance of tomato leaves is regulated by both abscisic acid and leaf water potential under combined water and salt stress. **Physiologia Plantarum**, 2021.

YAN, S.; ZHANG, H.; HUANG, Y.; TAN, J.; WANG, P.; WANG, Y.; HOU, H.; HUANG, J.; LI, L. Single-wall and multi-wall carbon nanotubes promote rice root growth by eliciting the similar molecular pathways and epigenetic regulation. **IET Nanobiotechnology**, v. 10, n. 4, p. 222–229, 2016.

YOUSEFI, A. R.; RASHIDI, S.; MORADI, P.; MASTINU, A. Germination and seedling growth responses of *Zygophyllum fabago*, *Salsola kali*, and *Atriplex canescens* to PEG-induced drought stress. **Environments**, v. 7, n. 12, p. 107, 2020.

ZHAI, G.; GUTOWSKI, S. M.; WALTERS, K. S.; YAN, B.; SCHNOOR, J. L. Charge, size, and cellular selectivity for multiwall carbon nanotubes by maize and soybean. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 12, p. 7380–7390, 2015.

ZHANG, H.; YUE, M.; ZHENG, X.; XIE, C.; ZHOU, H.; LI, L. Physiological effects of single- and multi-walled carbon nanotubes on rice seedlings. **IEEE Transactions on Nanobioscience**, v. 16, n. 7, p. 563–570, 2017.

ZHAO, G.; ZHAO, Y.; LOU, W.; ABDALMEGEED, D.; GUAN, R.; SHEN, W. Multi-walled carbon nanotubes can promote *Brassica napus* L. and *Arabidopsis thaliana* L. root hair development through nitric oxide and ethylene pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 9109, 2020a.

ZHAO, Q.; MA, C.; WHITE, J. C.; DHANKHER, O. P.; ZHANG, X.; ZHANG, S.; XING, B. Quantitative evaluation of multi-wall carbon nanotube uptake by terrestrial plants. **Carbon**, v. 114, p. 661–670, 2017.

ZHAO, W.; LIU, L.; SHEN, Q.; YANG, J.; HAN, X.; TIAN, F.; WU, J. Effects of water stress on photosynthesis, yield, and water use efficiency in winter wheat. **Water**, v. 12, n. 8, p. 2127, 2020b.

ZHAO, Y.; ZHAO, P.; LUO, J.; TIAN, L.; TIAN, Z. Effects of liquid nano-carbon biological fertilizer on physiological characters and yield of chinese cabbage. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 13, n. 2, p. 221–224, 2019.

ZURWELLER, B. A.; XAVIER, A.; TILLMAN, B. L.; MAHAN, J. R.; PAYTON, P. R.; PUPPALA, N.; ROWLAND, D. L. Pod yield performance and stability of peanut genotypes

under differing soil water and regional conditions. **Journal of Crop Improvement**, v. 32, n. 4, p. 532–551, 2018.

2. CAPÍTULO 2: NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE MÚLTIPLA NO DESENVOLVIMENTO INICIAL *in vitro* DE GIRASSOL ORNAMENTAL, CONSIDERAÇÕES SOBRE O SISTEMA ANTIOXIDANTE

RESUMO

A relação entre nanotecnologia e agricultura requer cada vez mais investimento em pesquisa, para compreensão geral dos efeitos de nanomateriais em plantas. Os nanotubos de carbono podem ser agentes promotores do crescimento vegetal, porém foram estudados em um número limitado de espécies, com condições de exposição e doses variáveis. Além disso, os efeitos no metabolismo são quase desconhecidos, sendo necessário explorar essa interação nanotubos-plantas sob a ótica da fisiologia antioxidante e em fases importantes do desenvolvimento vegetal, como o estabelecimento de plântulas. Nesse sentido, este trabalho propôs avaliar o desenvolvimento inicial de girassol ornamental cultivado *in vitro*, com meio suplementado com nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico (NTC). A presença de NTC no meio promove o acúmulo de matéria fresca da parte aérea e do sistema radicular das plântulas, bem como maior alongamento do hipocótilo. Não existe diferença quantitativa no processo germinativo, porém ocorre aumento na atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, peroxidase do ascorbato e peroxidase), gerando redução no conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos tecidos vegetais. Já nas plântulas estabelecidas, a maior atividade enzimática não reduz os marcadores bioquímicos de estresse, mas ainda assim não se tem diferença no extravasamento de eletrólitos e conteúdo relativo de água, além de se ter maior crescimento dos indivíduos expostos ao meio com NTC. Dessa forma, fica claro que os nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico modulam o metabolismo antioxidante durante a germinação e desenvolvimento inicial de girassol ornamental, resultando em maior crescimento e acúmulo de massa fresca nas plântulas formadas. Isto evidencia o potencial destes materiais como reguladores positivos do crescimento, permitindo aplicações futuras que poderão ser desenvolvidas.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Nanomateriais de carbono. Plantas ornamentais. Sistema antioxidante.

ABSTRACT

The relationship between nanotechnology and agriculture requires increasing investment in research to gain a better understanding of the effects of nanomaterials on plants. Carbon nanotubes can act as plant growth promoters, although they have been studied in only a limited number of species with varying exposure conditions and doses. Moreover, their effects on plant metabolism are largely unknown, necessitating exploration of this nanotube-plant interaction from the perspective of antioxidant physiology, particularly during crucial stages of plant development such as seedling establishment. With this in mind, this study aimed to evaluate the initial development of ornamental sunflower grown *in vitro*, with a medium supplemented with multi-walled carbon nanotubes functionalized with carboxylic acid (CNTs). The presence of CNTs in the medium promoted increased fresh biomass accumulation in both the aerial part and the root system of the seedlings, as well as greater hypocotyl elongation. There was no quantitative difference in the germination process, but there was an increase in the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, and peroxidase), leading to a reduction in hydrogen peroxide (H₂O₂) content in plant tissues. In established seedlings, the higher enzymatic activity did not reduce biochemical stress markers, yet there was no difference in electrolyte leakage and relative water content. Additionally, the individuals exposed to the medium with CNTs exhibited greater growth. Therefore, it is evident that carboxylic acid-functionalized multi-walled carbon nanotubes modulate the antioxidant metabolism during germination and the initial development of ornamental sunflower, resulting in increased growth and fresh biomass accumulation in the formed seedlings. This highlights the potential of these materials as positive growth regulators, paving the way for future applications that can be developed.

Key words: Nanotechnology. Carbon nanomaterials. Ornamental plants. Antioxidant system.

2.1 Introdução

Uma categoria de nanomateriais que se destaca na interação com organismos vegetais são aqueles baseados em estruturas de carbono. Nessa classe estão presentes o fulereno, óxido de grafeno, nanopontos, nanofibras e os nanotubos de carbono de paredes simples ou múltiplas (PATEL *et al.*, 2019). Os nanotubos de carbono são alótropos de carbono com estrutura cilíndrica nanoestruturada (ZHAO *et al.*, 2017) e, diferente de outras partículas com elementos metálicos (prata, titânio, zinco), são vistos como alternativas ecologicamente melhores para aplicação na agricultura (AACHARYA; CHHIPA, 2019).

A ação dos nanotubos de carbono de parede múltipla (NTC) em contato com plantas é reportada em diversos casos como promotora do crescimento (JOSHI *et al.*, 2020; PANDEY *et al.*, 2019; SEDDIGHINIA *et al.*, 2019). Além disso, é reportado um aumento na atividade de enzimas do sistema antioxidante, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) (ABDEL-AZIZ; HASANEEN; HELAL, 2022; GOHARI *et al.*, 2020; RAHMANI; RADJABIAN; SOLTANI, 2020). Bem como o alívio nos sintomas de estresses abióticos, como excesso de salinidade (PANDEY *et al.*, 2018), contaminação por metais pesados (OLOUMI; MOUSAVI; NEJAD, 2018) ou déficit hídrico (PANDEY *et al.*, 2019).

Existe uma diversidade de nanotubos de carbono de parede múltipla (NTC) no que concerne o comprimento e número de camadas (paredes internas), bem como nos tipos de impurezas presentes (íons) ou modificações na superfície (funcionalização) (MATHEW; TIWARI; TRIPATHI, 2021). Para além dessa variação nas dimensões e propriedades físico-químicas, existe uma gama de formas de exposição de plantas aos NTC. Por exemplo, a suplementação com nanotubos no meio MS para cultivo *in vitro* (HATAMI, 2017; JORDAN; SINGH; CAÑAS-CARRELL, 2018; PANDEY *et al.*, 2019). Da mesma forma, mudam as doses utilizadas em diferentes trabalhos, abrangendo desde 5 a 500mg/L, para múltiplas espécies estudadas (MATHEW; TIWARI; TRIPATHI, 2021).

A literatura indica, portanto, que existe uma dependência no genótipo, concentração e condição de tratamento empregadas em cada caso. Dessa forma, a conjunção de fatores ideais para se pensar em uma recomendação de uso em escala industrial ou agrônômica ainda precisam ser experimentalmente verificados (SZÖLLÖSI *et al.*, 2020). Nesse sentido, o estudo com espécies não-alimentícias favorece a compreensão dos efeitos de NTC em plantas, bem como aproximam do uso em larga escala. Da mesma forma, a absorção em tecidos que não são consumidos, como as flores, distancia esses materiais da cadeia alimentar humana,

diminuindo riscos associados à transferência de NTC, apesar de não excluir por completo seu risco (PANDEY *et al.*, 2019).

Além disso, o cultivo *in vitro* é conhecidamente uma forma de controle ambiental das condições de desenvolvimento vegetal (FORTINI *et al.*, 2021). A regulação de luz, carboidratos e até o uso de reguladores de crescimento permitem o direcionamento do crescimento para estudos básicos e aplicados (CAVALLARO *et al.*, 2022). Justamente por isso, a suplementação do meio de cultivo com nanomateriais e nanopartículas pode ser um aliado no conhecimento de seus efeitos concentração-específicos e como interagem com plantas (MAHMOUD *et al.*, 2020; OLOUMI; MOUSAVI; NEJAD, 2018; TIMOTEO *et al.*, 2019b, 2019a).

Pelo que foi apresentado, fica clara a necessidade de aumentar ainda mais a compreensão dos efeitos dos NTC em plantas, bem como da facilidade e menor risco da exposição de espécies não-alimentícias a estes nanomateriais. Portanto, esse trabalho se propôs a avaliar o efeito da presença de NTC no meio de cultivo *in vitro* na germinação e no desenvolvimento inicial de *Helianthus annuus* ornamental em termos de crescimento e atividade de enzimas do sistema antioxidante.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Local de execução e material vegetal:

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, no setor de Fisiologia Vegetal do Instituto de Ciências Naturais da Universidade Federal de Lavras. As sementes de *Helianthus annuus* híbrido Vincent's Choice foram adquiridas da empresa Sakata.

2.2.2 Nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico

Foram adquiridos nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico (NTC) da empresa Sigma Aldrich. Os nanotubos foram dispersos em solução de água destilada com auxílio de ultrassom de ponteira. Foram realizados três ciclos de 15 minutos com 50% de potência do equipamento. A solução estoque na concentração de 1000mg/L foi diluída para obtenção da concentração desejada para cada experimento. A solução foi estocada no escuro, a 8°C.

2.2.3 Germinação e desenvolvimento inicial *in vitro* com NTC no meio de cultivo:

Diferentes concentrações de nanotubos de carbono (0, 5, 25, 50, 100 mg/L) foram utilizadas para preparação de meio MS com 50% da concentração de sais (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 15g/L de sacarose, 2,5g/L de Phytigel e esterilizado quimicamente com 1ml/l de Dioxiplus® (ClO₂ 6%). O pH foi ajustado para 5.8 antes do aquecimento para ativação do Phytigel. O meio foi separado em duas partes, se retirando 10% do volume final, para adição da solução com NTC. A solução com os sais e suplementos foi aquecida até fervura e foi deixada até que chegasse a 55 °C, para só então ser adicionado o restante do volume com os nanotubos e o meio vertido nos tubos de ensaio, visando evitar o aquecimento dos nanomateriais.

As sementes de girassol foram desinfestadas por 1 minuto em álcool 70%, em seguida colocadas em hipoclorito de sódio (6%) por 10 minutos e lavadas três vezes com água destilada. Foi inoculada uma semente por tubo de ensaio e a cada cinco tubos de ensaio foi considerada uma repetição, num total de dez repetições por concentração de nanotubos de carbono. Os tubos foram alocados em sala de crescimento com temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 16h. Diariamente os tubos foram trocados de lugar para minimizar os efeitos de alterações de luminosidade e/ou temperatura dentro da sala de crescimento.

Durante sete dias, foi avaliada a germinação das sementes. Ao final de sete dias, as plântulas foram retiradas dos tubos, foi avaliado o número de plântulas normais e anormais. As plântulas normais foram fotografadas, para medição do comprimento do hipocótilo e comprimento máximo da raiz principal, com o programa ImageJ. Foi aferido o peso fresco do sistema radicular e da parte aérea.

2.2.4 Análises bioquímicas

Após determinação do efeito dos NTC no crescimento inicial das plântulas, o experimento foi repetido com os padrões de experimentação mencionados acima, com exceção dos tratamentos, os quais foram reduzidos apenas ao grupo controle (sem NTC) e com a presença de NTC no meio de cultivo. As avaliações de crescimento também seguirão o padrão já mencionado.

As análises bioquímicas foram divididas em dois experimentos, no primeiro onde foram comparados os tempos de germinação e estabelecimento inicial da plântula (24, 48 e 96h após inoculação), consistindo em um fatorial duplo (2x3) de concentrações de NTC no meio e tempos de desenvolvimento. No segundo experimento, após 168h de inoculação, onde foram feitas análises enzimáticas da parte aérea e do sistema radicular das plântulas, sendo um fatorial simples apenas com as concentrações de nanotubos de carbono. Em ambos

experimentos, foram feitas dez repetições por tratamento, sendo cada repetição uma amostra coletada, de semente em germinação, plântula em estabelecimento ou plântula.

Para o primeiro experimento, se procedeu a coleta do material diretamente dos tubos com sementes inoculadas e, para o segundo, uma vez aferido o peso fresco da parte aérea e do sistema radicular, foram coletadas amostras de 0,2 g de material vegetal, de cada tratamento, imediatamente colocadas em nitrogênio líquido. Estas foram transferidas para um ultra freezer -80°C onde ficarão armazenadas.

O extrato enzimático foi obtido pela maceração do material em NL. Foram adicionados 1,5 ml do tampão de extração contendo: 1,47 ml de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 15 µl de EDTA 0,1M (pH 7,0), 6 µl de DDT 0,5 M, ácido ascórbico 0,001 M e 22 mg de PVPP. O extrato foi centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e imediatamente se procederá à quantificação de proteínas nas amostras (Bradford), bem como as análises de atividade da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase (POX) (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.2.4.1 Quantificação de peróxido de hidrogênio

O material vegetal coletado, de cada concentração dos tratamentos feitos nos dois experimentos foi macerado em nitrogênio líquido (NL), homogeneizadas em 1,5 ml de TCA e centrifugadas, a 12.000 g por 15 minutos, a 4° C.

A partir do sobrenadante coletado, o H₂O₂ foi determinado medindo-se a absorbância a 390 nm em um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, 500 µl do extrato e 1 ml de iodeto de potássio (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

2.2.4.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por (BUEGE; AUST, 1978). Amostras de 0,2 g de brotações foram maceradas em NL acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizadas em 1,5 ml ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos.

Alíquotas (250 µL) do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação 0,5% (m/v) de TBA e 10% (m/v) de TCA, incubando-se, a 95 °C por 30 minutos A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm para detecção de malondialdeído (MDA), um produto secundário de baixa massa molecular do processo de peroxidação formado a partir do TBA.

A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600}) / (\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico=1). A peroxidação foi expressa em nmol de MDA g^{-1} de matéria fresca.

2.2.4.3 Quantificação de proteínas totais (método Bradford)

A quantificação de proteínas totais na amostra foi feita baseada em uma curva de calibração do reagente de Bradford com concentrações de soro de albumina bovina, feita a leitura a 595 nm. Para as amostras, foi usada uma alíquota de 6 μl adicionado 294 μl do reagente de Bradford para a leitura.

Após o cálculo de determinação com a curva, as proteínas na amostra foram expressas em mg prot/ gMF (BRADFORD, 1976).

2.2.4.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade desta enzima foi avaliada pela capacidade de inibição da fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A 10 μl do extrato enzimático foram adicionados 180 μl do meio de incubação: 100 μl de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), 21 μl de água destilada, 40 μl de metionina 14 mM, 3 μl de EDTA 0,1 μM , 15 μl de nitrobluetetrazólio 75 μM e 2 μl de riboflavina 2 μM .

As amostras foram iluminadas com lâmpada fluorescente de 20 W (o controle foi feito sem a adição do extrato). Após 10 minutos, as amostras foram lidas em 560 nm e o cálculo da atividade enzimática foi feito com a seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com o extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / A_{560} \text{ controle sem enzima}$.

Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

2.2.4.5 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi avaliada utilizando uma alíquota de 5 μl do extrato enzimático onde foi adicionado 167 μl de meio de incubação contendo: 90 μl de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 75 μl de água destilada e 9 μl de peróxido de hidrogênio 12,5 Mm, incubados a 35°C, de acordo com (HAVIR; MCHALE, 1987). A cada 15 segundos, durante três minutos, foram avaliados o decaimento da absorbância, a 240 nm, pelo consumo do peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar foi de $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.2.4.6 Atividade da peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da enzima APX foi determinada utilizando uma alíquota de 9 μl do extrato enzimático onde foi adicionado 171 μl de meio de incubação contendo: 90 μl de fosfato de

potássio 200 mM (pH 7,0), 63µl de água destilada e 9 µl de ácido ascórbico 10 Mm e 9 µl de peróxido de hidrogênio 2 mM (NAKANO; ASADA, 1981). A cada 15 segundos, durante três minutos, foi avaliada a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm onde foi determinado o coeficiente de extinção molar $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.2.4.7 Atividade da peroxidase (POX)

A atividade da enzima POX foi determinada usando o guaiacol como substrato (FANG; KAO, 2000). Na reação foram adicionados 8 µl do extrato enzimático, 100 µl de tampão fosfato de sódio pH 6,0 50mM, 33 µl de guaiacol 0,13% e 26 µl de água destilada e 33 µl de H₂O₂ 0,15%. A cinética da reação foi acompanhada a 470nm e a atividade foi calculada usando o coeficiente de extração (26,6 mM⁻¹cm⁻¹) para o tetraguaiacol.

Uma unidade da POX foi definida como 1 µmol de tetraguaiacol produzido por minuto.

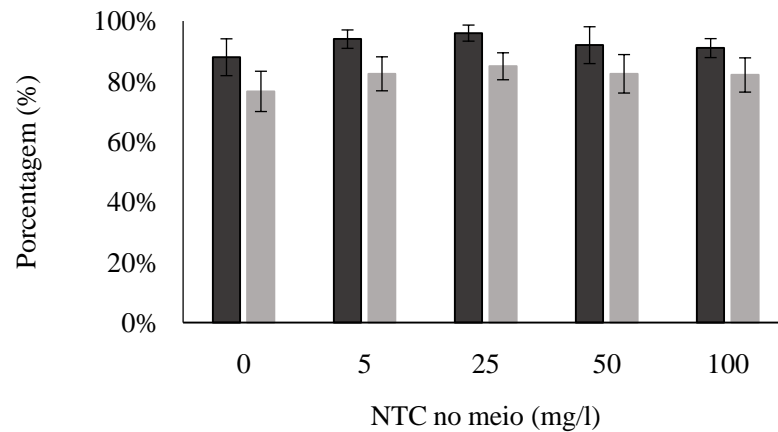
2.2.5 Análise estatística

Os dados coletados em cada um dos experimentos foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida foram submetidos à análise de variância. Caso houvesse diferença significativa entre os tratamentos, foram submetidos ao teste de Scott-Knott (5%). Os dados foram avaliados no software RStudio, com auxílio do pacote agricolae (MENDIBURU, 2021).

2.3 Resultados

A presença de NTC não alterou a porcentagem de germinação de sementes, sendo em média 92%, tampouco o número de plântulas normais (82%) de *Helianthus annuus*, nas condições de cultivo *in vitro* testadas. Mesmo com a contagem de germinação aos 7 dias, todas as sementes viáveis completaram o processo germinativo em apenas 2 dias.

Figura 1 – Germinação e porcentagem de plântulas normais de girassol ornamental cv. Vincent's Choice *in vitro* NTC no meio de cultivo.



Legenda: Barras pretas: porcentagem de germinação de sementes 7 dias após inoculação.

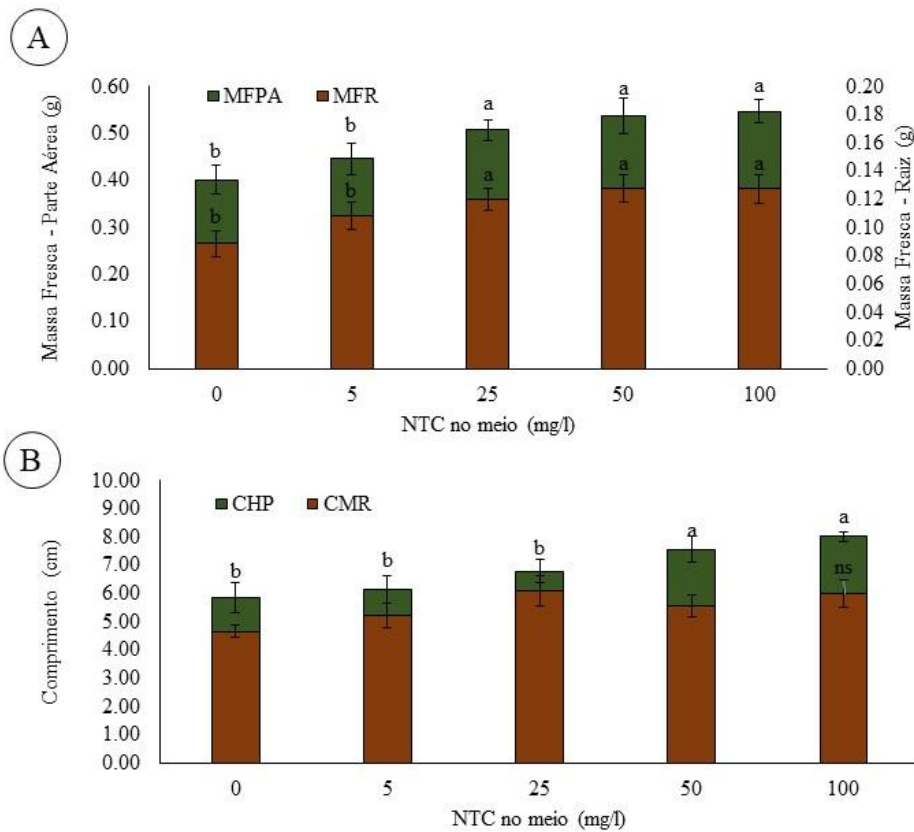
Barras cinzas: porcentagem de plântulas normais.

Fonte: Do autor (2023).

Com relação ao crescimento das plântulas ao final de sete dias (Figura 2A), a presença de NTC no meio de cultivo favoreceu o aumento do comprimento do hipocótilo, nas concentrações de 50 e 100mg/L, com valores próximos a 8cm. As plântulas do controle apresentaram em média 6cm. Já para o comprimento máximo da raiz, não houve diferença significativa no comprimento, com valores entre 5 e 6cm.

Para o peso fresco (Figura 2B), a presença dos NTC *in vitro* a partir de 25mg/L favoreceu aumento do peso fresco da parte aérea para 0,5-0,55g, contra 0,4-0,45 das concentrações 0 e 5mg/L. O peso fresco do sistema radicular seguiu a mesma tendência de aumento a partir de 25mg/L de NTC no meio, com valores próximos a 0,13g, enquanto o controle apresentou 0,09g.

Figura 2 – Crescimento de plântulas de girassol ornamental cv. Vincent's Choice *in vitro* com NTC no meio de cultivo.



Legenda: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

Fonte: Do autor (2023).

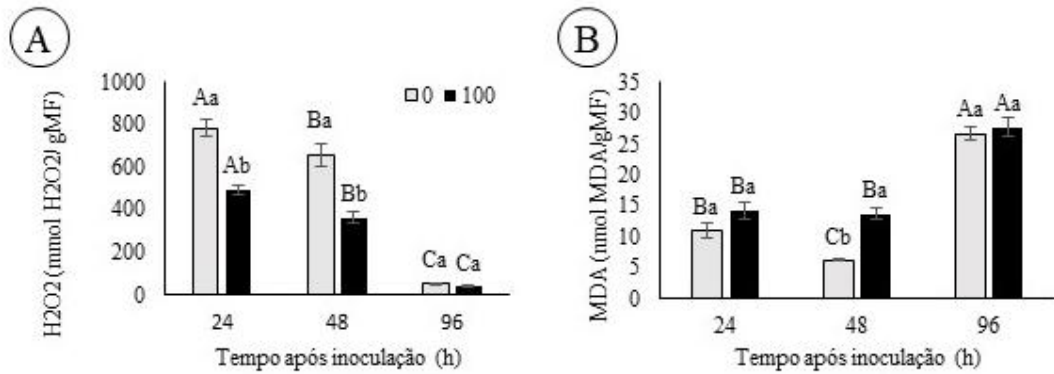
Baseado nos resultados de crescimento, como o maior comprimento de hipocótilo ocorreu a partir de 50mg/L de NTC no meio de cultivo e os maiores pesos frescos ocorreram a partir de 25mg/L, foram escolhidas as concentrações de 0 e 100mg/L para as análises enzimáticas, objetivando observar maiores contrastes na atividade enzimática com a maior presença dos nanotubos no meio de cultivo. O padrão de maior crescimento da parte aérea e maior PF se manteve quando sementes se desenvolveram em meio contendo NTC.

Com relação à quantificação de peróxido de hidrogênio, é possível observar um padrão de redução ao longo do tempo nas sementes germinando, independente da presença de NTC no meio de cultivo (Fig. 3a). Com 24h após a inoculação são observados os maiores valores, que coincidem com o início da germinação para as sementes. Também é possível observar que as sementes sem contato com NTC apresentam valores superiores de H_2O_2 até 48h após a inoculação, se igualando depois de 96h.

A peroxidação lipídica durante o processo germinativo apresenta um padrão de aumento no conteúdo de MDA ao longo do tempo (Fig. 3b), em oposição ao H_2O_2 . É

observada diferença resultante da presença de NTC no meio apenas às 48h após inoculação, havendo redução na peroxidação lipídica nas sementes sem NTC no meio.

Figura 3 – Quantificação de peróxido de hidrogênio e malondialdeído em sementes de girassol ornamental cv. Vincent's Choice *in vitro* com NTC no meio de cultivo.

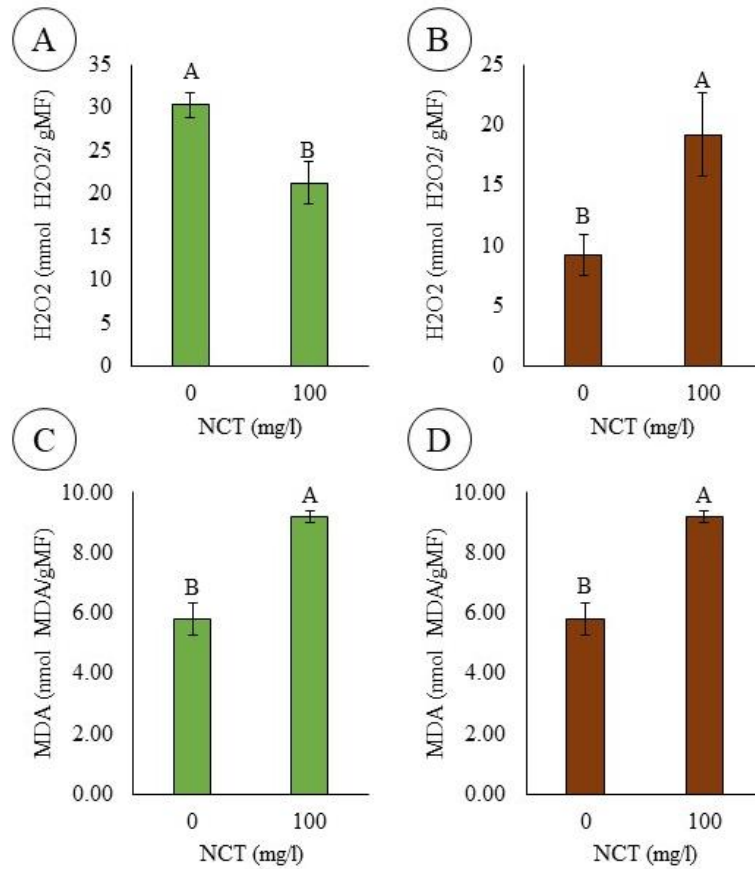


Legenda: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma dose de NTC no meio não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%) Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si para o mesmo tempo após a inoculação pelo teste de Tukey (5%).

Fonte: Do autor (2023).

Ao final das 168h de desenvolvimento, se observa maiores teores de H₂O₂ na parte aérea de plântulas sem contato com NTC e no sistema radicular das plântulas que cresceram com NTC (Fig. 4a e 4b). Quantitativamente, a diferença está em uma escala menor, quando comparada ao processo germinativo. Em relação à peroxidação lipídica, a presença de NTC no meio gerou maiores quantidades de MDA nas duas partes da plântula avaliadas (Fig. 4c e 4d).

Figura 4 – Quantificação de peróxido de hidrogênio e malondialdeído em sementes de girassol ornamental cv. Vincent's Choice *in vitro* com NTC no meio de cultivo.

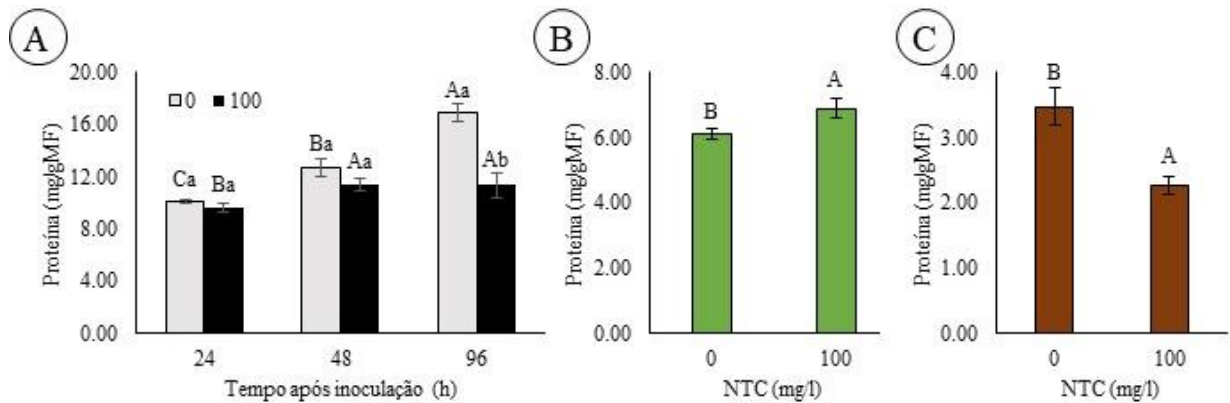


Legenda: Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

Fonte: Do autor (2023).

O teor de proteínas durante o processo germinativo aumentou ao longo do tempo (Fig. 5a), o que é esperado pelo processo de remobilização de reservas e retomada do desenvolvimento do embrião, porém não se observa diferença com a presença de NTC no meio de cultivo até 48h. Com 96h há um aumento no teor de proteínas dos indivíduos sem NTC, sendo que, para este grupo, o teor de proteínas aumenta durante todos os tempos de avaliação, diferente das sementes em contato com NTC, que mantém os mesmos teores de proteína após 48h de inoculação. Já para as plântulas obtidas, os teores de proteína são maiores na parte aérea daquelas que se desenvolveram com NTC no meio de cultivo, mas foram maiores no sistema radicular das plântulas sem NTC (Fig. 5b e 5c).

Figura 5 – Quantificação de proteínas em sementes em desenvolvimento e plântulas de girassol ornamental cv. Vincent's Choice in vitro com NTC no meio de cultivo.

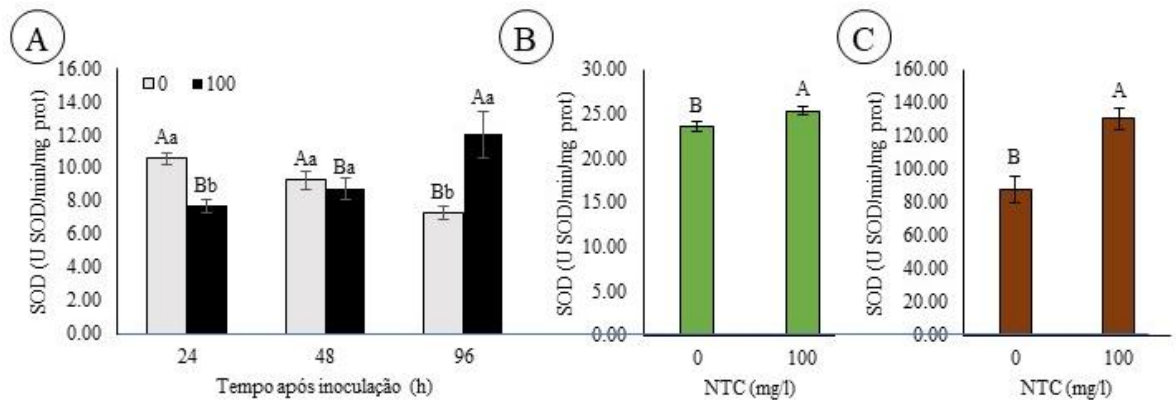


Legenda: A: quantificação de proteínas na semente durante o processo germinativo. B: quantificação de proteínas na parte aérea das plântulas. C: quantificação de proteínas no sistema radicular das plântulas. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma dose de NTC no meio não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%) Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si para o mesmo tempo após a inoculação pelo teste de Tukey (5%).

Fonte: Do autor (2023).

Para atividade da superóxido dismutase (SOD) com a presença de NTC no meio de cultivo se observa um padrão antagônico ao grupo controle durante a germinação de sementes (Fig. 6a). Enquanto este apresenta um decréscimo na atividade da SOD ao longo do tempo, aquele mostra um aumento constante ao longo do tempo. Com 24h após a inoculação, a atividade é menor nas sementes em contato com NTC e se nota um aumento que perdura nas plântulas formadas ao final do período de avaliação (Fig. 6b e 6c). Estas apresentam maior atividade da SOD tanto na parte aérea, quanto no sistema radicular, quando comparadas ao controle, sem NTC. Também é possível observar um aumento significativo da atividade no sistema radicular, principalmente das plântulas em contato com NTC.

Figura 6 – Atividade da superóxido dismutase em sementes em desenvolvimento e plântulas de girassol ornamental cv. Vincent's Choice in vitro com NTC no meio de cultivo

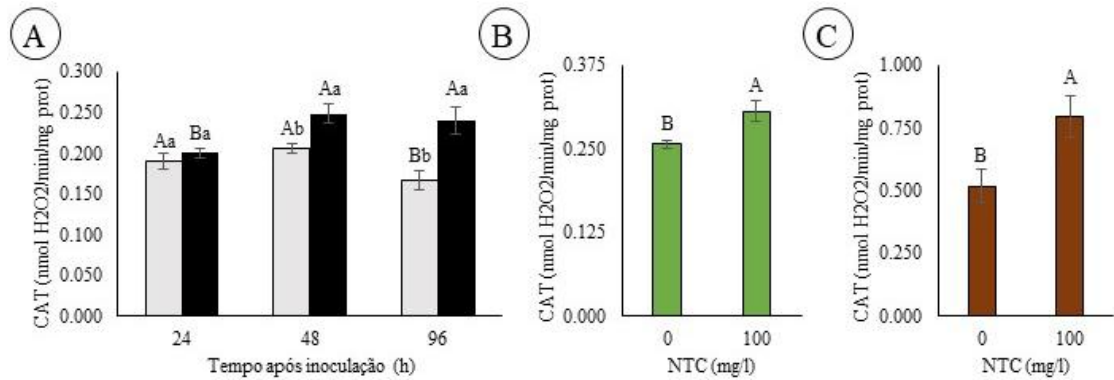


Legenda: A: atividade da SOD na semente durante o processo germinativo. B: atividade da SOD na parte aérea das plântulas. C: atividade da SOD no sistema radicular das plântulas. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma dose de NTC no meio não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%) Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si para o mesmo tempo após a inoculação pelo teste de Tukey (5%).

Fonte: Do autor (2023)

Assim como a SOD, a atividade da catalase (CAT) também apresentou padrões diferentes com relação à presença de NTC no meio de cultivo. Enquanto sementes sem NTC apresentaram uma queda na atividade da CAT às 96h após a inoculação, as sementes com NTC apresentaram aumento na atividade após 48h (Fig. 7a). A atividade da CAT é semelhante para as duas condições de crescimento apenas nas primeiras 24h, sendo superior com a presença a NTC a partir de então. A maior atividade da CAT nos tratamentos com NTC se mantém nas plântulas, nas duas partes analisadas (Fig. 7b e 7c). Novamente de forma análoga à SOD, existe uma atividade mais intensa no sistema radicular das plântulas.

Figura 7 – Atividade da catalase (CAT) em sementes em desenvolvimento e plântulas de girassol ornamental cv. Vincent's Choice in vitro com NTC no meio de cultivo.



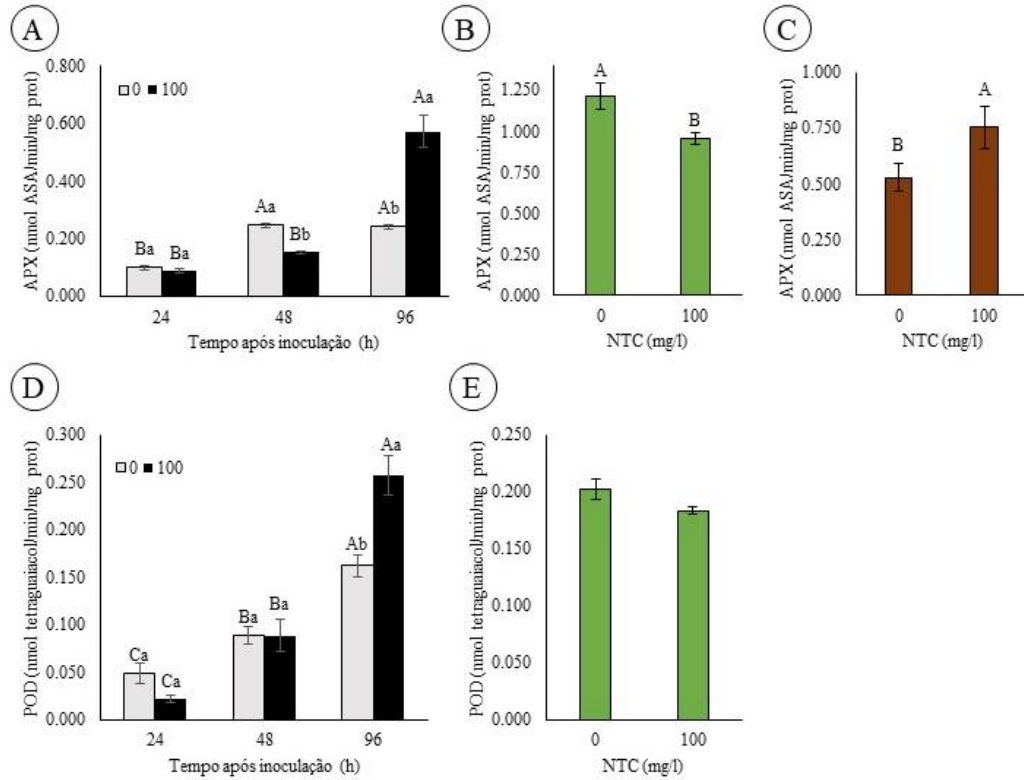
Legenda: A: atividade da CAT na semente durante o processo germinativo. B: atividade da CAT na parte aérea das plântulas. C: atividade da CAT no sistema radicular das plântulas. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma dose de NTC no meio não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%) Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si para o mesmo tempo após a inoculação pelo teste de Tukey (5%).

Fonte: Do autor (2023).

A ascorbato peroxidase (APX) apresenta aumento na sua atividade ao longo do processo germinativo, porém de forma diferencial para as duas condições de crescimento avaliadas (Fig. 8a). Às 24h após inoculação a atividade é semelhante, porém, às 48h se nota um aumento nas sementes sem NTC, que se mantém até 96h. Por outro lado, para sementes com 100mg/L de NTC mantém a mesma atividade até 48h e subitamente aumentam a atividade em três vezes após 96h. Já nas plântulas formadas (Fig. 8b e 8c), a APX apresenta maior atividade na parte aérea sem a presença de NTC, ao passo que é maior na raiz de plântulas que se desenvolveram com os nanotubos. Somente a APX apresentou maior atividade na parte aérea das plântulas, ao contrário da SOD e CAT, com maior atividade no sistema radicular.

Por fim, a peroxidase (POX) apresentou aumento na sua atividade durante o período de germinação, independente do tratamento (Fig. 8d). Até 48h após inoculação não há diferença entre as condições de crescimento e, somente ao final das 96h, as sementes que se desenvolveram na presença de NTC mostram aumento na atividade da POX, com relação às outras. Nas plântulas desenvolvidas, não há diferença estatística entre os tratamentos na parte aérea (Figura 8E) e nas raízes não foi detectada atividade da enzima.

Figura 8 – Atividade ascorbato peroxidase (APx) e peroxidase (POX) em sementes em desenvolvimento e plântulas de girassol ornamental cv. Vincent's Choice in vitro com NTC no meio de cultivo.

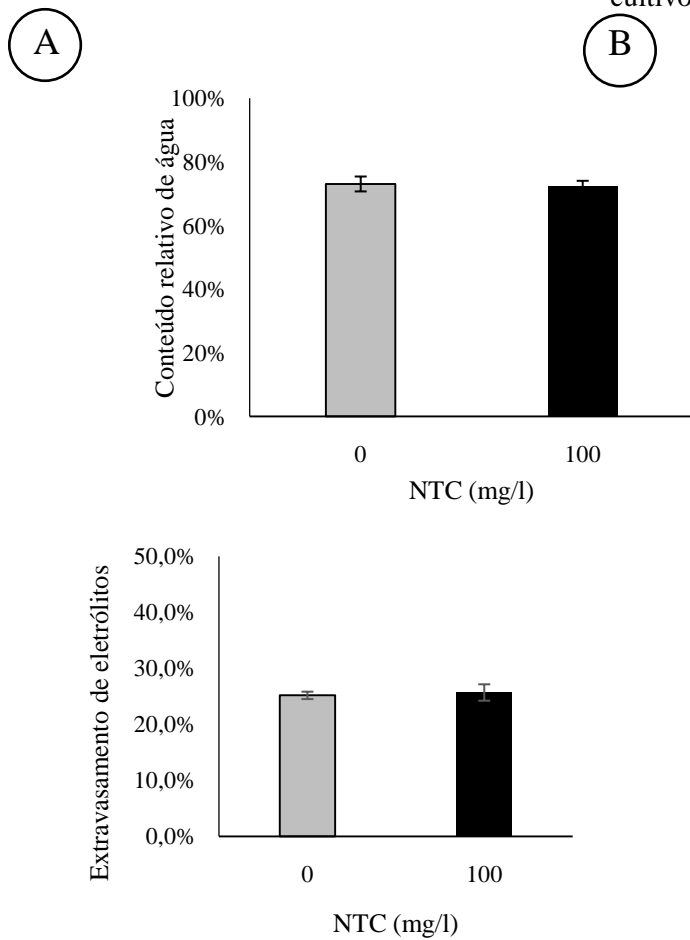


Legenda: A e D: atividade da APX e POX, respectivamente, na semente durante o processo germinativo. B e E: atividade da APX e POX, respectivamente, na parte aérea das plântulas. C: atividade da APX no sistema radicular das plântulas. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma dose de NTC no meio não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%) Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si para o mesmo tempo após a inoculação pelo teste de Tukey (5%).

Fonte: Do autor (2023).

A análise de conteúdo relativo de água da parte aérea (Fig. 9a) indica que não existem diferenças significativas entre o tratamento com NTC no meio de cultivo e maior ou menor absorção de água nas plântulas de girassol ornamental. Da mesma forma, o extravasamento de eletrólitos na radícula (Fig. 9b) indica que não houveram danos significativos na estrutura celular das radículas em desenvolvimento no meio contendo NTC.

Figura 9 – Conteúdo relativo de água da parte aérea (CRA) e extravasamento de eletrólitos em radículas de plântulas de girassol ornamental cv. Vincent's Choice *in vitro* com NTC no meio de cultivo.



Fonte: Do autor (2023).

2.4 Discussão

2.4.1 Germinação de sementes

Este trabalho investigou os efeitos do meio de cultivo *in vitro* suplementado com nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico na germinação e no desenvolvimento inicial de plântulas de *Helianthus annuus* (Fig. 1). A funcionalização com terminações polares normalmente facilita a dispersão em água dos nanotubos de carbono de parede múltipla, os quais são naturalmente apolares (Serag et al., 2011; Villagarcia et al., 2012). Esse tipo de nanomaterial já foi estudado em alguns trabalhos de interação com espécies cultivadas. Entretanto, não há um padrão definido de forma e tempo de exposição, doses testadas e como é feita a avaliação dos efeitos gerados pela

presença de NTC (CHEN *et al.*, 2015; GOHARI *et al.*, 2020; HAMDI *et al.*, 2014; JOSHI *et al.*, 2018a, 2018b, 2020; LAHIANI *et al.*, 2016; PANDEY *et al.*, 2019; RAHMANI; RADJABIAN; SOLTANI, 2020; SEDDIGHINIA *et al.*, 2019; VILLAGARCIA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014, 2012; ZHAI *et al.*, 2015)

Mesmo com a exposição de sementes ao meio de cultivo *in vitro* suplementado com NTC, não houve alteração perceptível no processo germinativo em termos de porcentagem de germinação e número de plântulas normais. A germinação de girassol costuma se manter em porcentagens altas, mesmo sob estresses abióticos, sendo considerada uma espécie tolerante a condições como salinidade (LI *et al.*, 2020), déficit hídrico (TOSCANO *et al.*, 2017) e altas temperaturas (CATIEMPO *et al.*, 2021). No caso dos NTCs, as doses testadas são reportadas na literatura como suficientes para promover a germinação *in vitro* de espécies cultivadas, como *Hordeum vulgare*, *Panicum virgatum* (PANDEY *et al.*, 2018) e *Solanum lycopersicum* (VILLAGARCIA *et al.*, 2012). Por outro lado, nos trabalhos iniciais com NTC de parede múltipla, mesmo 1000mg/L fornecidos para sementes de *Cucurbita pepo*, não afetam o processo germinativo (STAMPOULIS; SINHA; WHITE, 2009). Mesmo um espectro abrangente de doses (10-2000mg/L) também não alterou o processo germinativo de cenoura (PARK; AHN, 2016). E mais ainda, em doses reduzidas (10-160mg/L) não foram percebidas diferenças na germinação de *Triticum aestivum* (WANG *et al.*, 2012).

Por outro lado, existem relatos iniciais da diminuição da porcentagem de germinação, por um efeito de toxicidade dos NTC em *Zea mays*, *Lactuca sativa*, *cucurbita pepo* e *Raphanus sativus*, na dose de 2000 mg/L (LIN; XING, 2007), consideravelmente maior (20 vezes) que as avaliadas neste trabalho. É frequente que a forma de exposição das sementes ser via papel de germinação com adição de solução contendo NTC ou pelas sementes sendo embebidas em solução com NTC por diferentes tempos. Nesses casos, a interação NTC-semente gerou os resultados como os citados acima, porém, certamente difere do desenvolvimento da semente *in vitro* com meio contendo NTC, por possíveis interações entre NTC e o papel. Além da variação nas formas de exposição, como em cada trabalho existe um protocolo diferente de síntese e dispersão dos NTC de parede múltipla, são produzidos materiais com dimensões diferentes em termos de diâmetro, comprimento, funcionalização e, conseqüentemente, solubilidade em água. Seria interessante uma avaliação da correlação entre essas características e os efeitos observados, haja vista diferentes morfologias de nanomateriais a base de carbono produzirem diferentes resultados (GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2019; JORDAN; SINGH; CAÑAS-CARRELL, 2018; LAHIANI *et al.*, 2016; PANDEY

et al., 2018, 2019; REZAEI CHERATI *et al.*, 2021) Já foi constatado que a própria diversidade de tamanhos dos NTC de parede múltipla poderia influenciar nas respostas encontradas (BAOUKINA; MONTICELLI; TIELEMAN, 2013; SONG *et al.*, 2017).

A dualidade entre fitotoxicidade e promoção do desenvolvimento vegetal já foi relatada para outras nanopartículas (Szöllösi *et al.*, 2020), da mesma forma, essa relação já foi revisada para os NTC (SAFDAR *et al.*, 2022; SAMADI *et al.*, 2020) . A causa fisiológica da melhoria da germinação ainda não está determinada, acredita-se que os NTC poderiam facilmente penetrar a semente através do tegumento (KHODAKOVSKAYA *et al.*, 2009) e, uma vez absorvido, seriam elicitores da transcrição e síntese de aquaporinas. Por essa via, atuariam aumentando a absorção de água pela semente, aumento na transcrição e tradução dos genes de PIP1, PIP2 e TIP1. Porém, apenas Pandey *et al.*, (2018) e Lahiani *et al.*, (2016) avaliaram esta expressão em sementes, ao passo que outros trabalhos se baseiam nas avaliações feitas em protoplastos (KHODAKOVSKAYA *et al.*, 2012; MARTÍNEZ-BALLESTA *et al.*, 2016; MARTINEZ-BALLESTA *et al.*, 2020) ou em tecidos vegetativos (KHODAKOVSKAYA *et al.*, 2011; PANDEY *et al.*, 2019; REZAEI CHERATI *et al.*, 2021; VILLAGARCIA *et al.*, 2012).

Nessa mesma corrente, já foi proposta a teoria de que os nanotubos de carbono seriam capazes de se alinhar verticalmente no interior dos elementos de vasos do xilema, aumentando de forma significativa a capilaridade desses vasos e, conseqüentemente, o transporte de água (TRIPATHI; SONKAR; SARKAR, 2011). O aumento da condutividade hidráulica na raiz já foi observado em plantas de *Brassica oleracea*, corroborando com essa teoria de aumento no transporte de água, mas não necessariamente ligado às aquaporinas e sem relação com o processo germinativo (MARTÍNEZ-BALLESTA *et al.*, 2016). A maior absorção de água resultaria no aumento da velocidade e porcentagem de germinação de sementes. Porém, análises da atividade das enzimas relacionadas à germinação, como as de remobilização de reserva e do metabolismo respiratório ainda não foram reportadas. Desse modo, a compreensão real da contribuição dos NTC para esse processo permanece em aberto.

2.4.2 Crescimento *in vitro*

Em termos da promoção de parâmetros de crescimento se encontram relatos disponíveis na literatura, pela exposição de sementes aos nanotubos de carbono de parede múltipla. Como exemplos se tem o *Gossypium hirsutum* (PANDEY *et al.*, 2019), *Phaseolus vulgaris* (ABDEL-AZIZ; HASANEEN; HELAL, 2022), *Solanum nigrum* (CHEN *et al.*, 2021), *Oryza sativa* (JOSHI *et al.*, 2020), *Brassica rapa* (ZHAO *et al.*, 2020), *Solanum*

lycopersicum (GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2019), *Triticum aestivum* (JOSHI *et al.*, 2018a), *Hordeum vulgare*, *Glycine max* e *Zea mays* (LAHIANI *et al.*, 2018). Existe uma variação considerável nas metodologias de exposição, sendo usada germinação em placas de Petri (JOSHI *et al.*, 2018a, 2020), ou em substratos (ABDEL-AZIZ; HASANEEN; HELAL, 2022; CHEN *et al.*, 2021; GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2019), mas também o desenvolvimento em hidroponia (LAHIANI *et al.*, 2018) ou *in vitro* (PANDEY *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2020).

Considerando uma mesma espécie, formas de exposição diferentes podem gerar resultados contrastantes. É o caso da exposição de plântulas de milho em hidroponia contendo NTC na solução (LAHIANI *et al.*, 2018) e o desenvolvimento de plantas em solo contendo NTC (LINÉ *et al.*, 2021). No primeiro, existe uma promoção do crescimento em altura das plantas cultivadas em hidroponia (30mg/L), durante 3 semanas. Já no segundo, há uma redução do mesmo parâmetro com 100mg/kg de substrato. Portanto, a forma de se avaliar o efeito dos NTC está relacionada com as respostas de crescimento encontradas.

No caso das plântulas de girassol *in vitro* (Fig. 2a e 2b), a limitação da quantidade de meio de cultivo e espaço no tubo disponíveis para o crescimento radicular, podem ter sido fatores que influenciaram a manutenção do mesmo tamanho de raiz em todos os tratamentos, apesar de existir uma diferença no peso fresco da mesma, para doses de NTC acima de 25mg/L. Assim, mesmo que alguns autores classifiquem esses materiais como reguladores de crescimento de plantas (Mathew; Tiwari; Tripathi, 2020; Patel *et al.*, 2019), a forma de avaliação parece exercer um papel importante nos efeitos que foram observados nas plantas.

As plântulas estabelecidas apresentaram maior crescimento da parte aérea, o que corrobora com diversos estudos, usando variadas formas de exposição em diferentes espécies. Por exemplo, o uso de hidroponia com adição de NTC à solução nutritiva para desenvolvimento de plantas de *Glycine max*, *Zea mays* e *Hordeum vulgare* (LAHIANI *et al.*, 2018), *Oncimum basilicum* (GOHARI *et al.*, 2020) e *Oryza sativa* (ZHANG *et al.*, 2017). Mais ainda, a aplicação de NTC no solo para cultivo de *Phaseolus vulgaris* (ABDEL-AZIZ; HASANEEN; HELAL, 2022), *Solanum nigrum* (CHEN *et al.*, 2021) e *Zea mays* (LINÉ *et al.*, 2021); ou, por fim, o uso de meio MS suplementado com NTC para crescimento *in vitro* em *Lycopersicon esculentum* (KHODAKOVSKAYA *et al.*, 2013; LAHIANI *et al.*, 2016), *Gossypium hirsutum* e *Catharanthus roseus* (PANDEY *et al.*, 2019), *Sorghum bicolor* e *Panicum virgatum* (PANDEY *et al.*, 2018).

A gama de trabalhos com espécies e maneiras de exposição, poderia levar à hipótese de que os NTC são, de fato, promotores do crescimento. Todavia há que se salientar a

ausência de uma dose ideal que seja genótipo-independente, haja vista, para *Oryza sativa*, por exemplo, mais um trabalho mostra a inibição do crescimento, com uso de NTC em hidroponia de 20 a 2000mg/L ((BEGUM *et al.*, 2012) ou em solo com 50 e 500mg/L (HAO *et al.*, 2018). Com isso, fica evidente que persiste a necessidade de uma compreensão maior e mais sólida dos efeitos de NTC em plantas, seja visando aplicações agronômicas ou como fonte de conhecimento básico da fisiologia da interação nanomateriais-vegetais (JORDAN; SINGH; CAÑAS-CARRELL, 2018; MATHEW; TIWARI; TRIPATHI, 2021).

2.4.3 Análises bioquímicas da germinação

A avaliação bioquímica do efeito dos NTC nas plantas está presente em alguns trabalhos, principalmente nos últimos anos (ABDEL-AZIZ; HASANEEN; HELAL, 2022; CHEN *et al.*, 2021; FAN *et al.*, 2018; GOHARI *et al.*, 2020; GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2019; HAO *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2022; RAHMANI; RADJABIAN; SOLTANI, 2020; ZHANG *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2017). Existe variação nos efeitos observados, sendo que, para determinadas espécies, formas de exposição e doses existe aumento nos conteúdos de H₂O₂, O²⁻ e MDA, por exemplo (CHEN *et al.*, 2021; GHORBANPOUR; HADIAN, 2015; HATAMI, 2017; RAHMANI; RADJABIAN; SOLTANI, 2020; ZHAO *et al.*, 2017). Por outro lado, a redução dos mesmos marcadores bioquímicos também está reportada na literatura (FAN *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2022; PARK; AHN, 2016). No presente trabalho é observada uma queda nos níveis de H₂O₂ durante as primeiras 48 do processo germinativo (Fig. 3a), que coincidem com a protrusão e alongamento inicial da radícula. A mesma redução está presente na parte aérea das plântulas formadas na presença de NTC, mas, por outro lado, há um aumento do conteúdo de H₂O₂ no sistema radicular, mesmo que numericamente pequeno (Fig. 3b e 3c). O conteúdo de MDA na presença de NTC varia apenas às 48h durante a germinação, sendo estatisticamente semelhante nos outros tempos de avaliação (Fig. 4a). Porém, foi observado aumento de aproximadamente 30% na peroxidação lipídica para as plântulas como um todo (Fig. 4b e 4c).

A alteração nos marcadores bioquímicos não foi suficientemente danosa ou promotora da germinação ou do desenvolvimento radicular. Por outro lado, mesmo com maiores teores de espécies reativas de oxigênio, observa-se um aumento no comprimento e peso fresco da parte aérea. Esse efeito no crescimento é amplamente relatado na literatura, porém, as causas do aumento do tamanho ligado à exposição aos NTC ainda não foram elucidadas. Recentemente, foi detectado aumento na expressão de AUX1 e PIN1 em plantas de *Arabidopsis* cultivadas em meio MS (ZHAO *et al.*, 2020), bem como aumento no conteúdo de

AIA em plantas de arroz cultivadas em solo (HAO *et al.*, 2018), ambos os casos com suplementação de NTC, o que poderia sugerir a alteração no metabolismo de auxinas nas plantas expostas influenciando o alongamento celular, produzindo os efeitos de crescimento observados para plântulas de girassol ornamental.

Para além dos marcadores bioquímicos, as enzimas do sistema antioxidante (SOD, CAT, APX, POX) também apresentam variação, com relação à presença de NTC (ABDEL-AZIZ; HASANEEN; HELAL, 2022; CHEN *et al.*, 2021; GOHARI *et al.*, 2020; GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2019; HATAMI, 2017; LI *et al.*, 2022; RAHMANI; RADJABIAN; SOLTANI, 2020; WANG *et al.*, 2014). Existem, em alguns casos, uma modulação na atividade enzimática, de forma dose-dependente. Por exemplo, ao se expor folhas de *Salvia verticillata* aos nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico nas doses 0, 50, 100, 250, 500 e 1000mg/L observaram aumento progressivo na atividade da SOD, CAT e POX (RAHMANI; RADJABIAN; SOLTANI, 2020). Com a suplementação do meio MS com NTC não funcionalizados (0, 125, 250, 500 e 1000mg/L) para cultivo *in vitro* de *Cucurbita pepo*, perceberam que existe variação (aumento/diminuição) na atividade de SOD e CAT de forma dose-independente, não existindo um padrão para atividade dessas enzimas (HATAMI, 2017).

No presente trabalho, todas as enzimas avaliadas apresentam promoção da atividade durante o processo germinativo com a exposição aos NTC (Fig. 6-8). A SOD, APX e POX apresentam maior diferença entre 24 e 96h após a inoculação, com aumento de aproximadamente 1,5, 6 e 10 vezes, período que coincide com o estabelecimento inicial das plântulas. Essa alteração na atividade antioxidante explicaria a redução do conteúdo de H₂O₂ observado nas primeiras 48h do período germinativo, quando ocorre a protrusão e alongamento inicial da radícula.

Como as sementes de girassol ornamental germinam prontamente após embebição, as espécies reativas de oxigênio, como o O²⁻ e H₂O₂, não teriam função de sinalizar para a quebra de dormência. Porém, o H₂O₂ tem papel fundamental na carbonilação de enzimas glicolíticas e na síntese de giberelina, favorecendo a remobilização de reservas para o desenvolvimento do embrião (BAILLY, 2019; CONSIDINE; FOYER, 2021; DIAZ-VIVANCOS; BARBA-ESPÍN; HERNÁNDEZ, 2013). A sinalização por ROS também atua na síntese de proteínas necessárias para o estabelecimento da plântula, porém somente as sementes do grupo controle apresentam esse aumento evidente no conteúdo de proteínas, sendo menor no grupo com NTC.

Dessa forma, por mais que não tenha sido observada diferença na germinação, em termos de porcentagem, é plausível supor que a remobilização de reservas induzida pela presença de nanotubos no meio de cultivo possa ter sido responsável pelo maior crescimento da parte aérea e acúmulo de matéria fresca nas plântulas. Mais ainda, os NTC já foram reportados como promotores da absorção de minerais, atuando de forma sinérgica para o desenvolvimento vegetal (JOSHI *et al.*, 2020; TIWARI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2012).

2.4.4 Análises bioquímicas das plântulas

Em termos dos marcadores bioquímicos avaliados durante o estabelecimento inicial das plântulas de girassol, se observou maior conteúdo de H_2O_2 e MDA na parte aérea (Fig. 4), mesmo com aumento na atividade de SOD e CAT nesse órgão (Fig. 6 e fig. 7). Essa mesma tendência já foi observada (CHEN *et al.*, 2021; RAHMANI; RADJABIAN; SOLTANI, 2020), bem como o aumento no conteúdo de proteínas (Fig. 5). A aparente contradição entre aumento no conteúdo de espécies reativas de oxigênio aliado ao maior dano de membranas e uma promoção do sistema antioxidante na presença de NTC ainda não foi elucidada.

Com relação aos efeitos negativos da exposição aos nanotubos, estes seriam capazes de atravessar membranas celulares e serem acumulados em diferentes compartimentos e tipos celulares, dependendo de sua carga e tamanho (ZHAI *et al.*, 2015). Essas perfurações estariam associadas ao maior dano celular e maiores níveis de EROs nos casos de toxidez, sobretudo associados a doses maiores ou iguais a 1000mg/L em diversas espécies estudadas (GOHARI *et al.*, 2020; RAHMANI; RADJABIAN; SOLTANI, 2020; SZÖLLÖSI *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2020).

Diferentemente do a parte aérea, o sistema radicular não sofreu alterações de crescimento na presença de NTC. Porém, se observou aumento de nos teores de H_2O_2 e MDA (Fig. 4b e 4d), bem como redução no conteúdo de proteínas (Fig. 5c). Nas raízes também possível constatar que as enzimas do sistema antioxidante têm uma atividade superior nas plântulas com NTC. A SOD e CAT mostram atividade bastante superior numericamente (Fig. 6c e 7c), em relação à parte aérea, sobretudo na presença de NTC e, apesar de não ter sido realizada comparação estatística entre os órgãos vegetais, é possível imaginar que essa resposta esteja ligada à maior pressão na geração de espécies reativas de oxigênio e maior dano celular na presença dos nanotubos, apesar da atividade da CAT e APX, enzimas que transformam H_2O_2 em H_2O . Como a atividade da SOD também é alta, corrobora com o aumento de EROs órgãos, haja vista ela catalisar a reação que transforma O^{2-} em H_2O_2 .

Assim, por mais que houvesse maior atividade do sistema oxidante, a geração de espécies reativas de oxigênio na raiz é percebida, porém não foi prejudicial ao desenvolvimento desse órgão, comparado ao controle. Mais ainda, o dano celular na superfície da raiz causado por NTC provavelmente causaria aumento no extravasamento de eletrólitos, o que não foi constatado neste trabalho. Dessa forma, poderia se levantar a hipótese de que o desenvolvimento *in vitro* é uma condição estressante por si só para as plântulas, que encontram limitação física para o desenvolvimento da radícula. Ou ainda, a maior atividade destas enzimas do sistema antioxidante poderia indicar diferenças na morfogênese da raiz, que não foi vista durante o período avaliado, mas que poderia se expressar com o passar do tempo no desenvolvimento das plantas, haja vista NTC atuarem inibindo (GHOSH *et al.*, 2015; LIN; XING, 2007) ou promovendo o desenvolvimento radicular (LAHIANI *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2020) em diferentes espécies, dependendo da forma de exposição e concentração de NTC.

2.5 Conclusão

Com o que foi apresentado, se pode concluir que os NTC não afetam quantitativamente o processo de germinação de girassol ornamental, mas promovem alterações bioquímicas perceptíveis, ao nível de EROs e da atividade das enzimas do sistema antioxidante.

Houve maior crescimento da parte aérea das plântulas formadas, bem como maior acúmulo de matéria fresca como um todo. A presença de NTC promoveu a atividade do sistema antioxidante nos órgãos estudados, mesmo com aumento de EROs e MDA nas raízes.

Sendo assim, foi possível aumentar o conhecimento dos efeitos da interação NTC-plantas em mais uma espécie sob condições controladas *in vitro*. E ainda, avaliações da exposição de girassol ornamental por mais tempo ou em diferentes formas de exposição podem contribuir para solidificar a compreensão desses efeitos ou permitir que novas interações sejam descobertas.

REFERÊNCIAS

- AACHARYA, R.; CHHIPA, H. **Nanocarbon fertilizers: Implications of carbon nanomaterials in sustainable agriculture production**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. 297–321 p.
- ABDEL-AZIZ, H. M. M.; HASANEEN, M. N. A.; HELAL, S. H. Effect of multi-walled carbon nanotubes, urea, and peat moss on growth and yield of bean plants cultivated in sandy soil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 1173–1187, 2022.
- BAILLY, C. The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. **Biochemical Journal**, v. 476, n. 20, p. 3019–3032, 2019.
- BAOUKINA, S.; MONTICELLI, L.; TIELEMAN, D. P. Interaction of pristine and functionalized carbon nanotubes with lipid membranes. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 40, p. 12113–12123, 2013.
- BEGUM, P.; IKHTIARI, R.; FUGETSU, B.; MATSUOKA, M.; AKASAKA, T.; WATARI, F. Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes assessed by selected plant species in the seedling stage. **Applied Surface Science**, v. 262, p. 120–124, 2012.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, v. 116, p. 651–658, 1998.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BUEGE, J.; AUST, S. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 52, p. 302–310, 1978.
- CATIEMPO, R. L.; PHOTCHANACHAI, S.; BAYOGAN, E. R. V.; VICHITSOONTHONKUL, T. Possible role of nonenzymatic antioxidants in hydroprimed sunflower seeds under heat stress. **Crop Science**, v. 61, n. 2, p. 1328–1339, 2021.
- CAVALLARO, V.; PELLEGRINO, A.; MULEO, R.; FORGIONE, I. Light and plant growth regulators on *in vitro* proliferation. **Plants**, v. 11, n. 7, p. 844, 2022.
- CHEN, G.; QIU, J.; LIU, Y.; JIANG, R.; CAI, S.; LIU, Y.; ZHU, F.; ZENG, F.; LUAN, T.; OUYANG, G. Carbon nanotubes act as contaminant carriers and translocate within plants. **Scientific Reports 2015 5:1**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2015.
- CHEN, X.; WANG, J.; HAYAT, K.; ZHANG, D.; ZHOU, P. Small structures with big impact: multi-walled carbon nanotubes enhanced remediation efficiency in *hyperaccumulator Solanum nigrum* L. under cadmium and arsenic stress. **Chemosphere**, v. 276, p. 130130, 2021.
- CONSIDINE, M. J.; FOYER, C. H. Oxygen and reactive oxygen species-dependent regulation of plant growth and development. **Plant Physiology**, v. 186, n. 1, p. 79–92, 2021.
- DIAZ-VIVANCOS, P.; BARBA-ESPÍN, G.; HERNÁNDEZ, J. A. Elucidating hormonal/ROS networks during seed germination: insights and perspectives. **Plant Cell Reports 2013 32:10**, v. 32, n. 10, p. 1491–1502, 2013.
- FAN, X.; XU, J.; LAVOIE, M.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; ZHU, Y.; LU, T.; FU, Z.; ZHU, T.; QIAN, H. Multiwall carbon nanotubes modulate paraquat toxicity in *Arabidopsis thaliana*. **Environmental Pollution**, v. 233, p. 633–641, 2018.
- FANG, W. C.; KAO, C. H. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. **Plant Science**, v. 158, n. 1–2, p. 71–76, 2000.

FORTINI, E. A.; BATISTA, D. S.; MAMEDES-RODRIGUES, T. C.; FELIPE, S. H. S.; CORREIA, L. N. F.; CHAGAS, K.; SILVA, P. O.; ROCHA, D. I.; OTONI, W. C. Gas exchange rates and sucrose concentrations affect plant growth and production of flavonoids in *Vernonia condensata* grown *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 144, n. 3, p. 593–605, 2021.

GHORBANPOUR, M.; HADIAN, J. Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown *in vitro*. **Carbon**, v. 94, p. 749–759, 2015.

GHOSH, M.; BHADRA, S.; ADEGOKE, A.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. MWCNT uptake in *Allium cepa* root cells induces cytotoxic and genotoxic responses and results in DNA hyper-methylation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 774, p. 49–58, 2015.

GIANNOPOLITIS, C.; RIES, S. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309–314, 1977.

GOHARI, G.; SAFAI, F.; PANAHIRAD, S.; AKBARI, A.; RASOULI, F.; DADPOUR, M. R.; FOTOPOULOS, V. Modified multiwall carbon nanotubes display either phytotoxic or growth promoting and stress protecting activity in *Ocimum basilicum* L. in a concentration-dependent manner. **Chemosphere**, v. 249, p. 126171, 2020.

GONZÁLEZ-GARCÍA, Y.; LÓPEZ-VARGAS, E. R.; CADENAS-PLIEGO, G.; BENAVIDES-MENDOZA, A.; GONZÁLEZ-MORALES, S.; ROBLEDO-OLIVO, A.; ALPUCHE-SOLÍS, Á. G.; JUÁREZ-MALDONADO, A. Impact of carbon nanomaterials on the antioxidant system of tomato seedlings. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 5858, 2019.

HAMDI, H.; DE LA TORRE-ROCHE, R.; HAWTHORNE, J.; WHITE, J. C. Impact of non-functionalized and amino-functionalized multiwall carbon nanotubes on pesticide uptake by lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Nanotoxicology**, v. 9, n. 2, p. 172–180, 2014.

HAO, Y.; MA, C.; ZHANG, Z.; SONG, Y.; CAO, W.; GUO, J.; ZHOU, G.; RUI, Y.; LIU, L.; XING, B. Carbon nanomaterials alter plant physiology and soil bacterial community composition in a rice-soil-bacterial ecosystem. **Environmental Pollution**, v. 232, p. 123–136, 2018.

HATAMI, M. Toxicity assessment of multi-walled carbon nanotubes on *Cucurbita pepo* L. under well-watered and water-stressed conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 274–283, 2017.

HAVIR, E.; MCHALE, N. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450–455, 1987.

JORDAN, J. T.; SINGH, K. P.; CAÑAS-CARRELL, J. E. Carbon-based nanomaterials elicit changes in physiology, gene expression, and epigenetics in exposed plants: A review. **Current Opinion in Environmental Science and Health**, v. 6, p. 29–35, 2018.

JOSHI, A.; KAUR, S.; DHARAMVIR, K.; NAYYAR, H.; VERMA, G. Multi-walled carbon nanotubes applied through seed-priming influence early germination, root hair, growth and yield of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 8, p. 3148–3160, 2018a.

JOSHI, A.; KAUR, S.; SINGH, P.; DHARAMVIR, K.; NAYYAR, H.; VERMA, G. Tracking multi-walled carbon nanotubes inside oat (*Avena sativa* L.) plants and assessing their effect on growth, yield, and mammalian (human) cell viability. **Applied Nanoscience**, v. 8, n. 6, p. 1399–1414, 2018b.

JOSHI, A.; SHARMA, L.; KAUR, S.; DHARAMVIR, K.; NAYYAR, H.; VERMA, G. Plant nanobionic effect of multi-walled carbon nanotubes on growth, anatomy, yield and grain composition of rice. **BioNanoScience**, v. 10, n. 2, p. 430–445, 2020.

- KHODAKOVSKAYA, M.; DERVISHI, E.; MAHMOOD, M.; XU, Y.; LI, Z.; WATANABE, F.; BIRIS, A. S. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. **ACS Nano**, v. 3, n. 10, p. 3221–3227, 2009.
- KHODAKOVSKAYA, M. V.; DE SILVA, K.; BIRIS, A. S.; DERVISHI, E.; VILLAGARCIA, H. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. **ACS Nano**, v. 6, n. 3, p. 2128–2135, 2012.
- KHODAKOVSKAYA, M. v.; DE SILVA, K.; NEDOSEKIN, D. A.; DERVISHI, E.; BIRIS, A. S.; SHASHKOV, E. v.; GALANZHA, E. I.; ZHAROV, V. P. Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 3, p. 1028–1033, 2011.
- KHODAKOVSKAYA, M. V.; KIM, B. S.; KIM, J. N.; ALIMOHAMMADI, M.; DERVISHI, E.; MUSTAFA, T.; CERNIGLA, C. E. Carbon nanotubes as plant growth regulators: effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. **Small**, v. 9, n. 1, p. 115–123, 2013.
- LAHIANI, M. H.; DERVISHI, E.; IVANOV, I.; CHEN, J.; KHODAKOVSKAYA, M. Comparative study of plant responses to carbon-based nanomaterials with different morphologies. **Nanotechnology**, v. 27, n. 26, 2016.
- LAHIANI, M. H.; NIMA, Z. A.; VILLAGARCIA, H.; BIRIS, A. S.; KHODAKOVSKAYA, M. V. Assessment of effects of the long-term exposure of agricultural crops to carbon nanotubes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 26, p. 6654–6662, 2018.
- LI, W.; ZHANG, H.; ZENG, Y.; XIANG, L.; LEI, Z.; HUANG, Q.; LI, T.; SHEN, F.; CHENG, Q. A salt tolerance evaluation method for sunflower (*Helianthus annuus* L.) At the seed germination stage. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.
- LI, Y.; LIU, M.; YANG, X.; ZHANG, Y.; HUI, H.; ZHANG, D.; SHU, J. Multi-walled carbon nanotubes enhanced the antioxidative system and alleviated salt stress in grape seedlings. **Scientia Horticulturae**, v. 293, p. 110698, 2022.
- LIN, D.; XING, B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. **Environmental Pollution**, v. 150, n. 2, p. 243–250, 2007.
- LINÉ, C.; MANENT, F.; WOLINSKI, A.; FLAHAUT, E.; LARUE, C. Comparative study of response of four crop species exposed to carbon nanotube contamination in soil. **Chemosphere**, v. 274, p. 129854, 2021.
- MAHMOUD, L. M.; DUTT, M.; SHALAN, A. M.; EL-KADY, M. E.; EL-BORAY, M. S.; SHABANA, Y. M.; GROSSER, J. W. Silicon nanoparticles mitigate oxidative stress of *in vitro*-derived banana (*Musa acuminata* ‘Grand Nain’) under simulated water deficit or salinity stress. **South African Journal of Botany**, v. 132, p. 155–163, 2020.
- MARTINEZ-BALLESTA, M. C.; CHELBI, N.; LOPEZ-ZAPLANA, A.; CARVAJAL, M. Discerning the mechanism of the multiwalled carbon nanotubes effect on root cell water and nutrient transport. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 146, p. 23–30, 2020.
- MARTÍNEZ-BALLESTA, M. C.; ZAPATA, L.; CHALBI, N.; CARVAJAL, M. Multiwalled carbon nanotubes enter broccoli cells enhancing growth and water uptake of plants exposed to salinity. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2016.
- MATHEW, S.; TIWARI, D. K.; TRIPATHI, D. Interaction of carbon nanotubes with plant system: a review. **Carbon Letters**, v. 31, n. 2, p. 167–176, 2021.
- MENDIBURU, F. **agricolae: Statistical Procedures for Agricultural ResearchR package version 1.3-5**2021. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>>.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 867–880, 1981.
- OLOUMI, H.; MOUSAVI, E. A.; NEJAD, R. M. Multi-wall carbon nanotubes effects on plant seedlings growth and cadmium/lead uptake *in vitro*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 65, n. 2, p. 260–268, 2018.
- PANDEY, K.; ANAS, M.; HICKS, V. K.; GREEN, M. J.; KHODAKOVSKAYA, M. V. Improvement of commercially valuable traits of industrial crops by application of carbon-based nanomaterials. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 19358, 2019.
- PANDEY, K.; LAHIANI, M. H.; HICKS, V. K.; KEITH HUDSON, M.; GREEN, M. J.; KHODAKOVSKAYA, M. Effects of carbon-based nanomaterials on seed germination, biomass accumulation and salt stress response of bioenergy crops. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, 2018.
- PARK, S.; AHN, Y. J. Multi-walled carbon nanotubes and silver nanoparticles differentially affect seed germination, chlorophyll content, and hydrogen peroxide accumulation in carrot (*Daucus carota* L.). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 257–262, 2016.
- PATEL, A.; TIWARI, S.; PARIHAR, P.; SINGH, R.; PRASAD, S. M. Carbon nanotubes as plant growth regulators: Impacts on growth, reproductive system, and soil microbial community. *Em: TRIPATHI, D.; AHMAD, P.; SHARMA, S.; CHAUHAN, D.; DUBEY, N. Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms*. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 23–42.
- RAHMANI, N.; RADJABIAN, T.; SOLTANI, B. M. Impacts of foliar exposure to multi-walled carbon nanotubes on physiological and molecular traits of *Salvia verticillata* L., as a medicinal plant. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 150, p. 27–38, 2020.
- REZAEI CHERATI, S.; SHANMUGAM, S.; PANDEY, K.; KHODAKOVSKAYA, M. V. Whole-transcriptome responses to environmental stresses in agricultural crops treated with carbon-based nanomaterials. **ACS Applied Bio Materials**, v. 4, n. 5, p. 4292–4301, 2021.
- SAFDAR, M.; KIM, W.; PARK, S.; GWON, Y.; KIM, Y. O.; KIM, J. Engineering plants with carbon nanotubes: a sustainable agriculture approach. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, p. 275–305, 2022.
- SAMADI, S.; SAHARKHIZ, M. J.; AZIZI, M.; SAMIEI, L.; GHORBANPOUR, M. Multi-walled carbon nanotubes stimulate growth, redox reactions and biosynthesis of antioxidant metabolites in *Thymus daenensis celak in vitro*. **Chemosphere**, v. 249, 2020.
- SEDDIGHINIA, F. S.; IRANBAKSH, A.; ORAGHI ARDEBILI, Z.; NEJAD SATARI, T.; SOLEIMANPOUR, S. Seed priming with cold plasma and multi-walled carbon nanotubes modified growth, tissue differentiation, anatomy, and yield in bitter melon (*Momordica charantia*). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 1, p. 87–98, 2019.
- SERAG, M. F.; KAJI, N.; GAILLARD, C.; OKAMOTO, Y.; TERASAKA, K.; JABASINI, M.; TOKESHI, M.; MIZUKAMI, H.; BIANCO, A.; BABA, Y. Trafficking and subcellular localization of multiwalled carbon nanotubes in plant cells. **ACS Nano**, v. 5, n. 1, p. 493–499, 2011.
- SONG, B.; ZENG, G.; GONG, J.; ZHANG, P.; DENG, J.; DENG, C.; YAN, J.; XU, P.; LAI, C.; ZHANG, C.; CHENG, M. Effect of multi-walled carbon nanotubes on phytotoxicity of sediments contaminated by phenanthrene and cadmium. **Chemosphere**, v. 172, p. 449–458, 2017.
- STAMPOULIS, D.; SINHA, S.; WHITE, J. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. **Environmental Science and Technology**, v. 43, p. 9473–9479, 2009.

- SZŐLLŐSI, R.; MOLNÁR, Á.; KONDAK, S.; KOLBERT, Z. Dual effect of nanomaterials on germination and seedling growth: stimulation vs. phytotoxicity. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1745, 2020.
- TIMOTEO, C. de O.; PAIVA, R.; DOS REIS, M. V.; CLARO, P. I. C.; DA SILVA, D. P. C.; MARCONCINI, J. M.; DE OLIVEIRA, J. E. Silver nanoparticles in the micropropagation of *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, n. 2, p. 359–368, 2019a.
- TIMOTEO, C. de O.; PAIVA, R.; DOS REIS, M. V.; CLARO, P. I. C.; FERRAZ, L. M.; MARCONCINI, J. M.; DE OLIVEIRA, J. E. *In vitro* growth of *Physalis peruviana* L. affected by silver nanoparticles. **3 Biotech**, v. 9, n. 4, p. 1–9, 2019b.
- TIWARI, D. K.; DASGUPTA-SCHUBERT, N.; VILLASEÑOR CENDEJAS, L. M.; VILLEGAS, J.; CARRETO MONTOYA, L.; BORJAS GARCÍA, S. E. Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (*Zea mays*) and implications for nanoagriculture. **Applied Nanosciences**, v. 4, p. 577–591, 2014.
- TOSCANO, S.; ROMANO, D.; TRIBULATO, A.; PATANÈ, C. Effects of drought stress on seed germination of ornamental sunflowers. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 8, p. 1–12, 2017.
- TRIPATHI, S.; SONKAR, S. K.; SARKAR, S. Growth stimulation of gram (*Cicer arietinum*) plant by water soluble carbon nanotubes. **Nanoscale**, v. 3, n. 3, p. 1176–1181, 2011.
- VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, p. 59–66, 2000.
- VILLAGARCIA, H.; DERVISHI, E.; DE SILVA, K.; BIRIS, A. S.; KHODAKOVSKAYA, M. V. Surface chemistry of carbon nanotubes impacts the growth and expression of water channel protein in tomato plants. **Small**, v. 8, n. 15, p. 2328–2334, 2012.
- WANG, C.; LIU, H.; CHEN, J.; TIAN, Y.; SHI, J.; LI, D.; GUO, C.; MA, Q. Carboxylated multi-walled carbon nanotubes aggravated biochemical and subcellular damages in leaves of broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings under combined stress of lead and cadmium. **Journal of Hazardous Materials**, v. 274, p. 404–412, 2014.
- WANG, X.; HAN, H.; LIU, X.; GU, X.; CHEN, K.; LU, D. Multi-walled carbon nanotubes can enhance root elongation of wheat (*Triticum aestivum*) plants. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 6, p. 1–10, 2012.
- ZHAI, G.; GUTOWSKI, S. M.; WALTERS, K. S.; YAN, B.; SCHNOOR, J. L. Charge, size, and cellular selectivity for multiwall carbon nanotubes by maize and soybean. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 12, p. 7380–7390, 2015.
- ZHANG, H.; YUE, M.; ZHENG, X.; XIE, C.; ZHOU, H.; LI, L. Physiological effects of single- and multi-walled carbon nanotubes on rice seedlings. **IEEE Transactions on Nanobioscience**, v. 16, n. 7, p. 563–570, 2017.
- ZHAO, G.; ZHAO, Y.; LOU, W.; ABDALMEGEED, D.; GUAN, R.; SHEN, W. Multi-walled carbon nanotubes can promote *Brassica napus* L. and *Arabidopsis thaliana* L. root hair development through nitric oxide and ethylene pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 9109, 2020.
- ZHAO, Q.; MA, C.; WHITE, J. C.; DHANKHER, O. P.; ZHANG, X.; ZHANG, S.; XING, B. Quantitative evaluation of multi-wall carbon nanotube uptake by terrestrial plants. **Carbon**, v. 114, p. 661–670, 2017.

3. CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO INICIAL DE GIRASSOL ORNAMENTAL SOB DÉFICIT HÍDRICO *in vitro* COM ADIÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE MÚLTIPLA AO MEIO DE CULTIVO

RESUMO

Os desafios à agricultura moderna impulsionam a busca por alternativas para proteção de plantas, garantindo segurança alimentar e uma produtividade sustentável. Nessa perspectiva a nanotecnologia surge como uma aliada, gerando novos materiais que poderão ser usados no campo para a produção. Os nanotubos de carbono são apontados como promissores no crescimento de plantas, entretanto, seu uso em condições de crescimento adversas foi pouco estudado. Sendo assim, este trabalho se propõe a avaliar o desenvolvimento inicial de girassol ornamental *in vitro* sob déficit hídrico, com meio de cultivo suplementado com polietilenoglicol 6000 (10%) e nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico (NTC). A adição de PEG6000 ao meio não afetou o processo germinativo, porém existe um emparelhamento do crescimento, sobretudo da parte aérea. A adição de NTC colabora para maior crescimento da parte aérea e foi suficiente para manter o comprimento máximo da raiz, apesar da redução de matéria fresca de ambas. O estresse *in vitro* também ocasionou redução na atividade das enzimas do sistema antioxidante (SOD, CAT, APX e POX), mesmo com a presença dos nanomateriais. Entretanto, o acúmulo de osmólitos ativos, induzido pela presença de NTC no meio, principalmente prolina na parte aérea e açúcares solúveis totais na raiz, colaborou para mitigar os efeitos negativos da adição de PEG6000. Essa adaptação fisiológica ainda não havia sido avaliada, com relação à exposição de plantas aos NTC. Portanto, os NTC também desempenham a função de reguladores do crescimento vegetal em situação de déficit hídrico induzido *in vitro*, abrindo mais os horizontes de aplicação futura desses materiais na agricultura.

Palavras-chave: Nanomateriais de carbono. Estresse abiótico. Déficit hídrico. Germinação *in vitro*. Osmólitos ativos.

ABSTRACT

The challenges to modern agriculture drive the search for alternatives in plant protection, ensuring food security and sustainable productivity. In this perspective, nanotechnology appears as an ally, generating new materials to be used in the field. Carbon nanotubes are promising plant regulators, however, their use in adverse growth conditions has been little studied. Therefore, this work aims to evaluate the initial development of ornamental sunflower *in vitro* under water deficit, with culture medium supplemented with polyethylene glycol 6000 (10%) and carboxylic acid functionalized multi-walled carbon nanotubes (CNT). The addition of PEG6000 to the medium did not affect germination process, but there is a growth pairing, especially in the aerial part. The addition of CNT contributes to greater shoot growth and was sufficient to maintain the maximum root length, despite the reduction of fresh matter in both parts. *In vitro* stress also caused a reduction in antioxidant system enzymes activity (SOD, CAT, APX and POX), even in the presence of nanomaterials. However, active osmolytes accumulation induced by the presence of CNT in the medium, mainly proline in the shoot and total soluble sugars in the root, helped to mitigate the negative effects of PEG6000 addition. This physiological adaptation had not yet been evaluated, with regard to plants CNT exposure. Therefore, CNT also play a role of plant growth regulators in *in vitro* induced water deficit, opening horizons for the future application of such materials in agriculture.

Key words: Carbon nanomaterials. Abiotic stress. Water deficit. *In vitro* germination. Active osmolytes.

3.1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia se apresenta como uma alternativa para incrementos de produtividade em termos quantitativos e qualitativos, mantendo o foco na sustentabilidade da agricultura (BEHL *et al.*, 2022). São diversas possibilidades de aplicação como proteção de culturas com nanodefensivos, nutrição vegetal controlada com nanofertilizantes e agricultura de precisão com nanosensores (ARORA *et al.*, 2022). Por definição, um nanomaterial é uma estrutura com pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica, de 1 a 100 nm, tendo origem natural ou sintética (BOVERHOF *et al.*, 2015).

Nessa categoria estão os nanomateriais de carbono, os quais apresentam funções variadas em contato com plantas em desenvolvimento (MATHEW; TIWARI; TRIPATHI, 2021). Seu uso já foi avaliado em diversas espécies, como *Arabidopsis thaliana* (KE *et al.*, 2021), *Oryza sativa* (JOSHI *et al.*, 2020), *Phaseolus vulgaris* (ABDEL-AZIZ; HASANEEN; HELAL, 2022), *Vitis deciduous* (LI *et al.*, 2022) e *Zea mays* (LINÉ *et al.*, 2021), evidenciando o potencial de regulação positiva do crescimento vegetal e da produtividade. Mesmo assim, esses materiais ainda suscitam dúvidas quanto à seguridade em contato com trabalhadores e consumidores finais (MAKGABUTLANE *et al.*, 2021; NEME *et al.*, 2021), podendo ser mais facilmente utilizados em espécies energéticas ou ornamentais, por exemplo, onde o risco humano é reduzido (PANDEY *et al.*, 2019).

Além de serem promissores no crescimento, a presença de nanotubos de carbono (NTC), especificamente, já foi estudada como forma de promoção da maior absorção de pesticidas e metais pesados pelas plantas. Exemplos de exposição a cádmio, arsênio (CHANG *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2021), chumbo (OLOUMI; MOUSAVI; NEJAD, 2018), glifosato (KE *et al.*, 2021) e paraquat (FAN *et al.*, 2018). A exposição aos estresses abióticos, como os citados, mas também o estresse salino (LI *et al.*, 2022; PANDEY *et al.*, 2018), coloca os NTC como candidatos a mitigadores de condições adversas para as plantas, bem como colaboradores para biorremediação. Entretanto, se os estudos em condições ideais de cultivo ainda não avançaram para uma conclusão sobre o uso de nanotubos de carbono, a avaliação em situações de estresse foi ainda menos explorada.

Ambientes desafiadores para o cultivo de plantas surgem cada vez mais, sobretudo no que diz respeito à limitação da disponibilidade de água (MAKGABUTLANE *et al.*, 2021; MOHOR; MENDIONDO, 2017). Nesse sentido, as possibilidades de mitigar efeitos negativos às plantas é interessante, para promoção da seguridade alimentar e energética da população em geral (USMAN *et al.*, 2020). É então que a nanotecnologia se sobressai, como uma aliada na geração de novas alternativas de cultivo e proteção dos vegetais (ARORA *et*

al., 2022; BEHL *et al.*, 2022; NEME *et al.*, 2021) frente às mudanças climáticas que vem ocorrendo com cada vez mais frequência.

Como aliada à nanotecnologia, a prospecção *in vitro* de efeitos abióticos no desenvolvimento vegetal, pode ser considerada uma forma de avaliação e geração de conhecimento, com precisão e controle das condições de crescimento. (DUBROVNA, 2017; ESPINOSA-LEAL *et al.*, 2022; LATEF; AHMAD, 2015; MAHMOUD *et al.*, 2020). Nesse caso, a forma de cultivo torna o estudo mais rápido e econômico (MALEKI *et al.*, 2019), facilitando trabalhos futuros em casas de vegetação ou no campo, pelas informações geradas em laboratório.

Baseado no que foi apresentado, é possível observar a necessidade de compreensão dos efeitos dos nanomateriais no biociclo vegetal, principalmente com estresses abióticos. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo a avaliação do desenvolvimento inicial de plântulas de *Helianthus annuus* cv Vincent's choice *in vitro* sob déficit hídrico, com adição de nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico ao meio de cultivo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local de execução e material vegetal:

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, no setor de Fisiologia Vegetal do Instituto de Ciências Naturais da Universidade Federal de Lavras. As sementes de *Helianthus annuus* híbrido Vincent's Choice foram adquiridas da empresa Sakata.

3.2.2 Nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico

Foram adquiridos nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico (NTC) da empresa Sigma Aldrich. Os nanotubos foram dispersos em solução de água destilada com auxílio de ultrassom de ponteira. Foram realizados três ciclos de 5 minutos com 50% de potência do equipamento.

A solução estoque permaneceu na concentração de 1000mg/L. Em cada experimento foi diluída para obtenção da concentração desejada. Esta se manteve estocada no escuro, a 8°C.

3.2.3 Germinação e desenvolvimento inicial *in vitro* sob déficit hídrico com NTC no meio de cultivo:

O meio MS com 50% da concentração de sais (MURASHIGE; SKOOG, 1962), foi suplementado com duas concentrações de NTC (0 e 100mg/L), além de 15g.l⁻¹ de sacarose, 2,5g.l⁻¹ de Phytigel e esterilizado quimicamente com 1ml.l⁻¹ de Dioxiplus® (ClO₂ 6%).

Além dos nanotubos de carbono, foi adicionado ao meio de cultivo 100g.l⁻¹ de PEG 6000, para se induzir o déficit hídrico. O experimento consistiu em um fatorial duplo com duas condições hídricas e as concentrações de nanotubos de carbono.

As sementes de girassol foram desinfestadas por 1 minuto em álcool 70%, em seguida colocadas em hipoclorito de sódio (6%) por 10 minutos e lavadas três vezes com água destilada. Foi inoculada uma semente por tubo de ensaio e a cada cinco tubos de ensaio foi considerada uma repetição, num total de dez repetições por tratamento. Os tubos foram alocados em sala de crescimento com temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 16h. Diariamente os tubos foram trocados de lugar para minimizar os efeitos de alterações de luminosidade e/ou temperatura dentro da sala de crescimento.

Ao final de 7 dias foi avaliado o número de plântulas normais e anormais. As plântulas normais foram fotografadas, para medição do comprimento do hipocótilo e comprimento máximo da raiz principal, com o programa ImageJ. Também foi aferido o peso fresco do sistema radicular e da parte aérea, bem como coletadas amostras de 0,2g para análises bioquímicas (conteúdo de peróxido, peroxidação lipídica, conteúdo de prolina, açúcares solúveis totais, açúcares redutores, clorofila a e b, carotenoides, atividade de SOD, CAT, APX e POX). Estas foram imediatamente submersas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

3.2.4 Análises bioquímicas

Para as análises bioquímicas foram feitas dez repetições por tratamento, por análise, sendo cada repetição uma amostra coletada, de plântula, separada em parte aérea (hipocótilo, cotilédone e primeiro par de folha) ou sistema radicular. O extrato enzimático foi obtido pela maceração do material em NL. Foram adicionados 1,5 ml do tampão de extração contendo: 1,47 ml de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 15 µl de EDTA 0,1M (pH 7,0), 6 µl de DDT 0,5 M, ácido ascórbico 0,001 M e 22 mg de PVPP.

O extrato foi centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante coletado e imediatamente se procedeu à quantificação de proteínas nas amostras (Bradford), bem como as análises de atividade da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do

ascorbato (APX) e peroxidase (POX) (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.4.1 Quantificação de proteínas totais (método Bradford)

A quantificação de proteínas totais na amostra foi feita baseada em uma curva de calibração do reagente de Bradford com concentrações de soro de albumina bovina, feita a leitura a 595 nm. Para as amostras, foi usada uma alíquota de 6 µl adicionado 294 µl do reagente de Bradford para a leitura.

Após o cálculo de determinação com a curva, as proteínas na amostra são expressas em mg prot/ gMF (BRADFORD, 1976).

3.2.4.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

As atividades desta enzima foram avaliadas pela capacidade de inibição da fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A 10 µl do extrato enzimático foram adicionados 180 µl do meio de incubação: 100 µl de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), 21 µl de água destilada, 40 µl de metionina 14 mM, 3 µl de EDTA 0,1 µM, 15 µl de nitrobluetetrazólio 75 µM e 2 µl de riboflavina 2 µM.

As amostras foram iluminadas com lâmpada fluorescente de 20 W (o controle feito sem a adição do extrato, apenas água destilada). Após 10 minutos, as amostras foram lidas em 560 nm e o cálculo da atividade enzimática foi feito com a seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com o extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / A_{560} \text{ controle sem enzima}$.

Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

3.2.4.3 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi avaliada utilizando uma alíquota de 5 µl do extrato enzimático onde foram adicionados 167 µl de meio de incubação contendo: 90 µl de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 75 µl de água destilada e 9 µl de peróxido de hidrogênio 12,5 Mm, incubados a 35°C, de acordo com (HAVIR; MCHALE, 1987). A cada 15 segundos, durante três minutos, foi avaliado o decaimento da absorbância, a 240 nm, pelo consumo do peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar é de 36 mM⁻¹ cm⁻¹.

3.2.4.4 Atividade da peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da enzima APX foi determinada utilizando uma alíquota de 9 µl do extrato enzimático onde foi adicionado 171 µl de meio de incubação contendo: 90 µl de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 63 µl de água destilada e 9 µl de ácido ascórbico 10 Mm e 9 µl de

peróxido de hidrogênio 2 mM (NAKANO; ASADA, 1981). A cada 15 segundos, durante três minutos, foi avaliada a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm onde se determinou o coeficiente de extinção molar $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.2.4.5 Atividade da peroxidase (POX)

A atividade da enzima POX foi determinada usando o guaiacol como substrato (FANG; KAO, 2000). Na reação foram adicionados 8 μl do extrato enzimático, 100 μl de tampão fosfato de sódio pH 6,0 50mM, 33 μl de guaiacol 0,13% e 26 μl de água destilada e 33 μl de H_2O_2 0,15%. A cinética da reação foi acompanhada a 470nm e a atividade foi calculada usando o coeficiente de extração $26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para o tetraguaiacol.

Uma unidade da POX foi definida como 1 μmol de tetraguaiacol produzido por minuto.

3.2.4.6 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O material vegetal coletado foi macerado em nitrogênio líquido (NL), homogeneizado em 1,5 ml de TCA (10%, p/v) e centrifugado, a 12.000 g por 15 minutos, a 4° C.

A partir do sobrenadante coletado, o H_2O_2 foi determinado medindo-se a absorbância a 390 nm em um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, 500 μl do extrato e 1 ml de iodeto de potássio. A quantificação é feita baseada em uma curva de calibração dos reagentes, feita com concentrações crescentes de H_2O_2 (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

3.2.4.7 Peroxidação lipídica (MDA)

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por (BUEGE; AUST, 1978). Amostras foram maceradas em NL acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizadas em 1,5 ml ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos.

Alíquotas (250 μL) do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação 0,5% (m/v) de TBA e 10% (m/v) de TCA, incubando-se, a 95 °C por 30 minutos A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O malondialdeído (MDA), produto secundário de baixa massa molecular do processo de peroxidação formado a partir do TBA.

A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[\text{MDA}] = (\text{A}_{535} - \text{A}_{600}) / (\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico=1). A peroxidação expressa em nmol de MDA g^{-1} de matéria fresca.

3.2.4.8 Quantificação de pigmentos, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e prolina

Essas análises seguiram a metodologia de extração seriada em concentrações crescentes de álcool etílico (50, 80 e 100%) proposta por López-Hidalgo et al. (2021) com modificações para cada uma das análises. Na amostra macerada foram acrescentados 350 µl de álcool por vez, homogeneizados em vórtex, seguido de centrifugação a 10000g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e se procederam as outras extrações, com suspensão do pellet em álcool, totalizando um volume de extrato de 1050 µl.

Para quantificação dos pigmentos fotossintéticos, em 50 µl do extrato foram acrescentados 300 µl de álcool 100%. A leitura foi feita em 646,8, 663,2 e 470 nm. Os cálculos de µg do pigmento/ gMF seguirão as equações:

$$\text{Clorofila a: } 12,25 \times A_{663,2} - 2,79 \times A_{646,8}$$

$$\text{Clorofila b: } 21,5 \times A_{646,8} - 5,10 \times A_{663,2}$$

$$\text{Carotenoides: } (1000 \times A_{470} - 1,82 \times C_a - 85,02 \times C_b) / 198$$

Para quantificação de açúcares solúveis totais (AST) foi utilizado o método da antrona (ARMSTRONG *et al.*, 1954). Uma curva de calibração do reagente foi feita usando concentrações de glicose, para leitura a 620 nm. Nas amostras, foi feito o mix de reação em tubos de ensaio de vidro, com 10 µl do extrato, 490 µl de H₂O destilada e 1000 µl de antrona. O conjunto foi levado ao banho-maria a 100°C por 3 minutos e imediatamente resfriado em gelo. A seguir procedeu a leitura, com um total de 350 µl da reação em microplacas.

Para quantificação de açúcares redutores (AR) foi utilizado o método do ácido dinitrosalicílico – DNS (MILLER, 1959). Uma curva de calibração foi feita com concentrações de glicose, para leitura a 540 nm. Nas amostras, foi feito o mix de reação em tubos de ensaio de vidro, com 100 µl do extrato, 200 µl de solução de DNS e 1,7 ml de H₂O destilada. O conjunto foi levado ao banho-maria a 100°C por 5 minutos e imediatamente resfriado em gelo. A seguir procedeu a leitura, com um total de 350 µl da reação em microplacas.

Para quantificação de prolina foi feita com solução de ninhidrina (BATES; WALDREN; TEARE, 1973). Uma curva de calibração foi feita com concentrações de prolina, para leitura a 520 nm. Nas amostras, foi feito o mix de reação em tubos de ensaio de vidro, com 50 µl do extrato, 450 µl de H₂O destilada e 1 ml da solução de ninhidrina e ácido acético. O conjunto foi levado ao banho-maria a 100°C por 60 minutos, os tubos vedados com

plástico filme para evitar evaporação do ácido acético, sendo imediatamente resfriado em gelo. A seguir procedeu a leitura, com um total de 350 µl da reação em microplacas.

3.2.5 Análise estatística

Os dados coletados em cada um dos experimentos foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida submetidos à análise de variância.

Nos casos de diferença significativa entre os tratamentos, foram submetidos ao teste de Tukey (5%). Os dados foram avaliados no software RStudio, com auxílio do pacote agricolae (MENDIBURU, 2021).

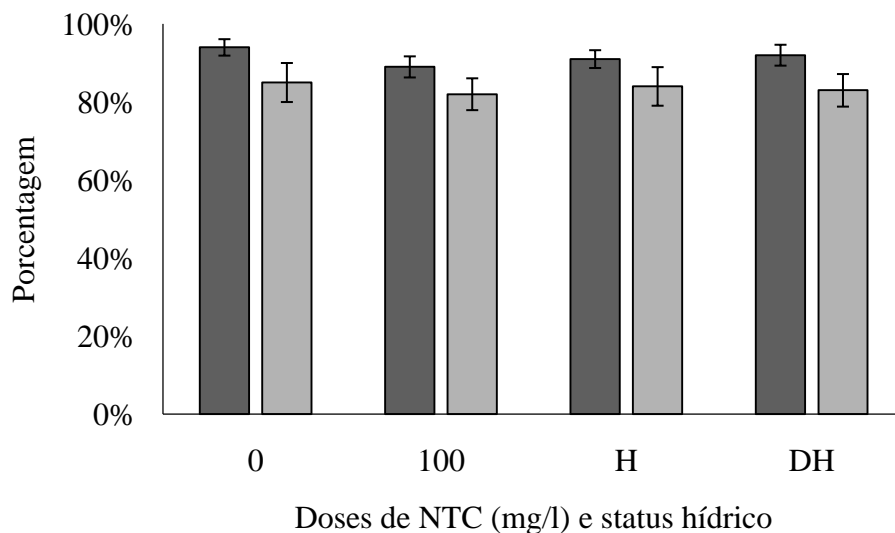
Para análise de componentes principais (PCA) também foi usado o software RStudio, especificamente os pacotes “PCAmixdata”, “factoextra”, “cluster”, “ggplot2”, “FactorMineR” e “corrplot” (R CORE TEAM, 2023).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Desenvolvimento *in vitro* sob déficit hídrico

A exposição das sementes aos nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico, na presença ou ausência de déficit hídrico induzido no meio de cultivo, não alterou o processo germinativo (Figura 1). Ao final de três dias, em sementes viáveis, já havia ocorrido a protrusão da radícula. Nas condições avaliadas, a porcentagem de germinação se manteve por volta de 90%, enquanto a porcentagem de plântulas normais formadas ao final dos sete dias de avaliação se manteve em torno de 85%.

Figura 1 – Germinação e porcentagem de plântulas normais de girassol ornamental cv. Vincent’s Choice *in vitro* com NTC no meio de cultivo, com e sem déficit hídrico.



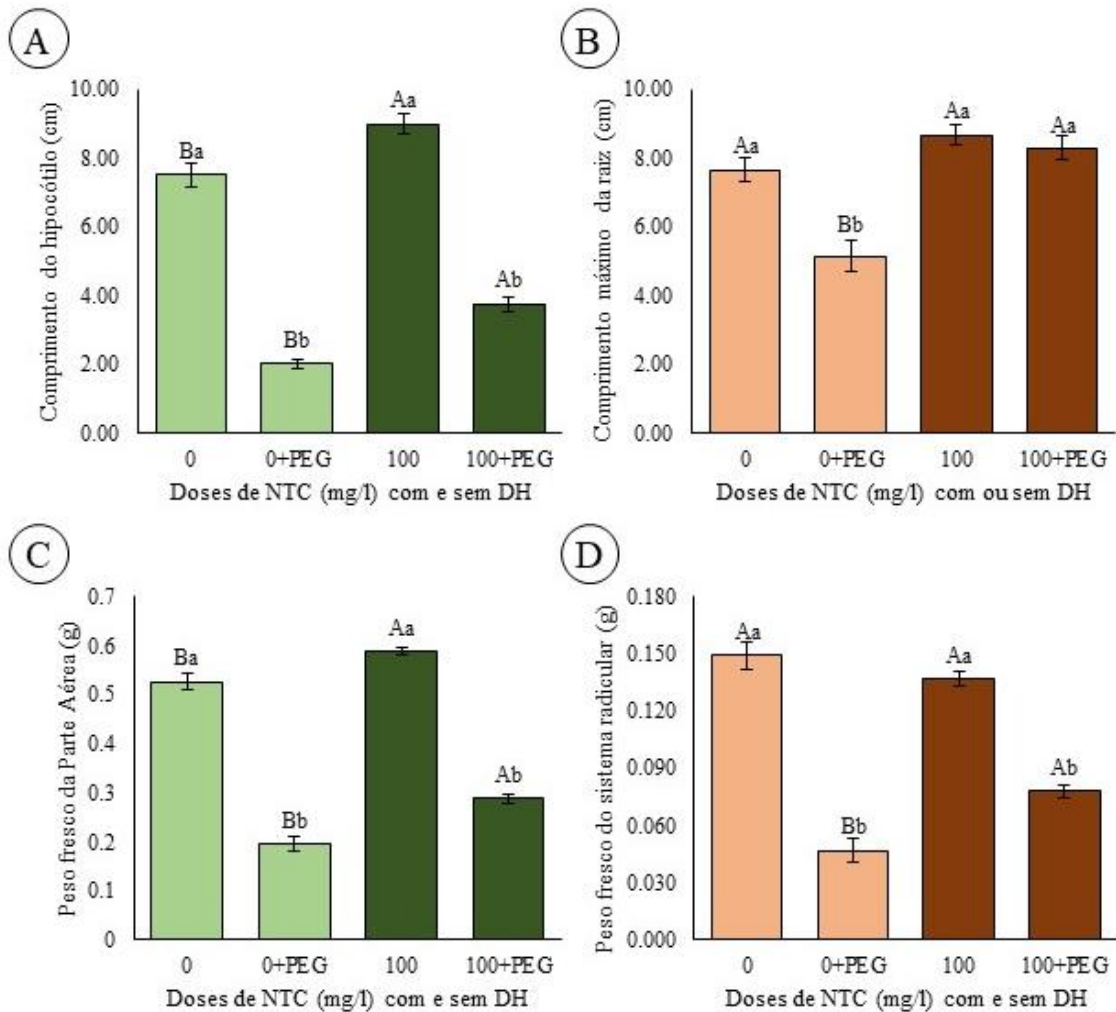
Legenda: Barras pretas: porcentagem de germinação de sementes 7 dias após inoculação.
Barras cinzas: porcentagem de plântulas normais.

Fonte: Do autor (2023).

Ao final dos sete dias de desenvolvimento *in vitro* as plântulas formadas foram avaliadas com relação ao crescimento e os quatro parâmetros apresentaram interação estatisticamente significativa entre a presença de NTC no meio de cultivo e a indução de déficit hídrico com o uso de PEG6000 (Figura 2). Para a parte aérea, houve um padrão de resposta semelhante entre o comprimento do hipocótilo e o peso fresco da parte aérea (Figura 2A e B). Na condição hídrica normal, o meio de cultivo suplementado com NTC deu origem a plantas com hipocótilos ligeiramente maiores (8,6cm) e com mais matéria fresca (0,57g), comparado ao meio sem nanomateriais (7,5cm e 0,52g, respectivamente). Sementes inoculadas em meio contendo PEG6000 tiveram o desenvolvimento prejudicado no tempo de avaliação, apresentando menor comprimento de parte aérea e peso fresco no meio sem NTC (2cm e 0,19g), bem como naquele suplementado (3,7cm e 0,27g). Entretanto, quando NTC estão presentes, mesmo com DH existe maior alongamento do hipocótilo e aumento no peso fresco, indicando um alívio da pressão exercida pelo meio de cultivo.

O sistema radicular, em condição hídrica normal, não apresentou diferença no desenvolvimento, apesar da presença de NTC ter induzido maior crescimento da raiz (8,4cm), não houve diferença estatística com o controle (7,9cm). Para o peso fresco do sistema radicular a semelhança entre meios de cultivo se mantém, com 0,14 e 0,13g, com e sem NTC no meio, respectivamente, indicando um efeito de alongamento por parte dos nanotubos, em detrimento do acúmulo de matéria fresca. Por outro lado, a indução de DH *in vitro* afetou de forma diferente as plântulas. No meio com NTC o comprimento máximo da raiz (8,4cm) e o peso fresco (0,07g) são superiores ao controle (5,3cm e 0,04g), além disso o comprimento é igual à condição hídrica normal, indicando novamente a contribuição positiva de NTC no desenvolvimento.

Figura 2 – Crescimento de plântulas girassol ornamental cv. Vincent’s Choice *in vitro* com NTC no meio de cultivo, com e sem déficit hídrico.



Legenda: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%) dentro do mesmo status hídrico. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro do mesmo tratamento com NTC, pelo mesmo teste.

Fonte: Do autor (2023).

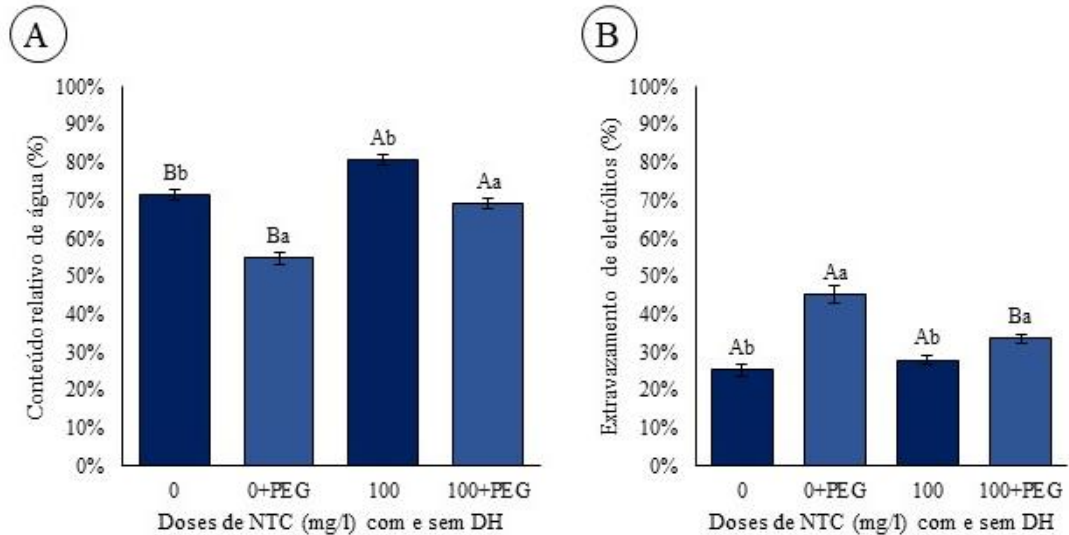
Com relação ao status hídrico da parte aérea (Figura 3A), em condições normais a presença de NTC permitiu maior conteúdo relativo de água (79,5%), comparado ao meio de cultivo não suplementado (73,1%). O mesmo padrão se mantém, porém aumenta a diferença entre os tratamentos sob déficit hídrico *in vitro*, com 67,9 e 56,5% para plantas desenvolvidas com e sem NTC, respectivamente. Como o esperado, independentemente do tipo de meio usado, a adição de PEG6000 no meio de cultivo reduziu o conteúdo relativo de água na parte aérea das plantas avaliadas.

De forma semelhante, para o extravasamento de eletrólitos no sistema radicular (Figura 3B), o déficit hídrico *in vitro* colaborou para o aumento nos valores, sendo máximo no meio sem nanotubos 44,5%. A presença de NTC reduziu o extravasamento de eletrólitos para 36%, mesmo sob estresse. Em condições hídricas normais, não houve diferença estatística entre os meios com e sem NTC, com 26,6 e 27,8%, respectivamente, indicando que a alteração em condições mais restritivas é aliviada pela presença dos nanomateriais em contato com as raízes.

3.3.2 Análises bioquímicas do sistema antioxidante na parte aérea e sistema radicular

Nos parâmetros bioquímicos avaliados (Figura 4 e Figura 5), existe modulação dos marcadores de estresse e da atividade do sistema antioxidante, nas condições experimentais impostas. Dentre as enzimas avaliadas, as atividades da SOD, CAT e POX na parte aérea apresentaram diferenças significativas na interação entre nanotubos de carbono no meio de cultivo e déficit hídrico, porém não existe um padrão único entre elas. A SOD (Figura 4A) tem maior atividade na parte aérea das plântulas em condição hídrica normal, sendo estatisticamente igual nos meios com e sem NTC, 55 e 53 U SOD/mg prot/min, respectivamente. Já sob DH, existe uma redução na atividade enzimática, porém, se mantendo superior na presença de NTC 35 U SOD/mg prot/ min, comparado ao meio controle 22 U SOD/mg prot/ min.

Figura 3 – Conteúdo relativo de água da parte aérea (CRA) e extravasamento de eletrólitos em radículas de plântulas de girassol ornamental cv. Vincent's Choice *in vitro* com



NTC no meio de cultivo, com e sem déficit hídrico.

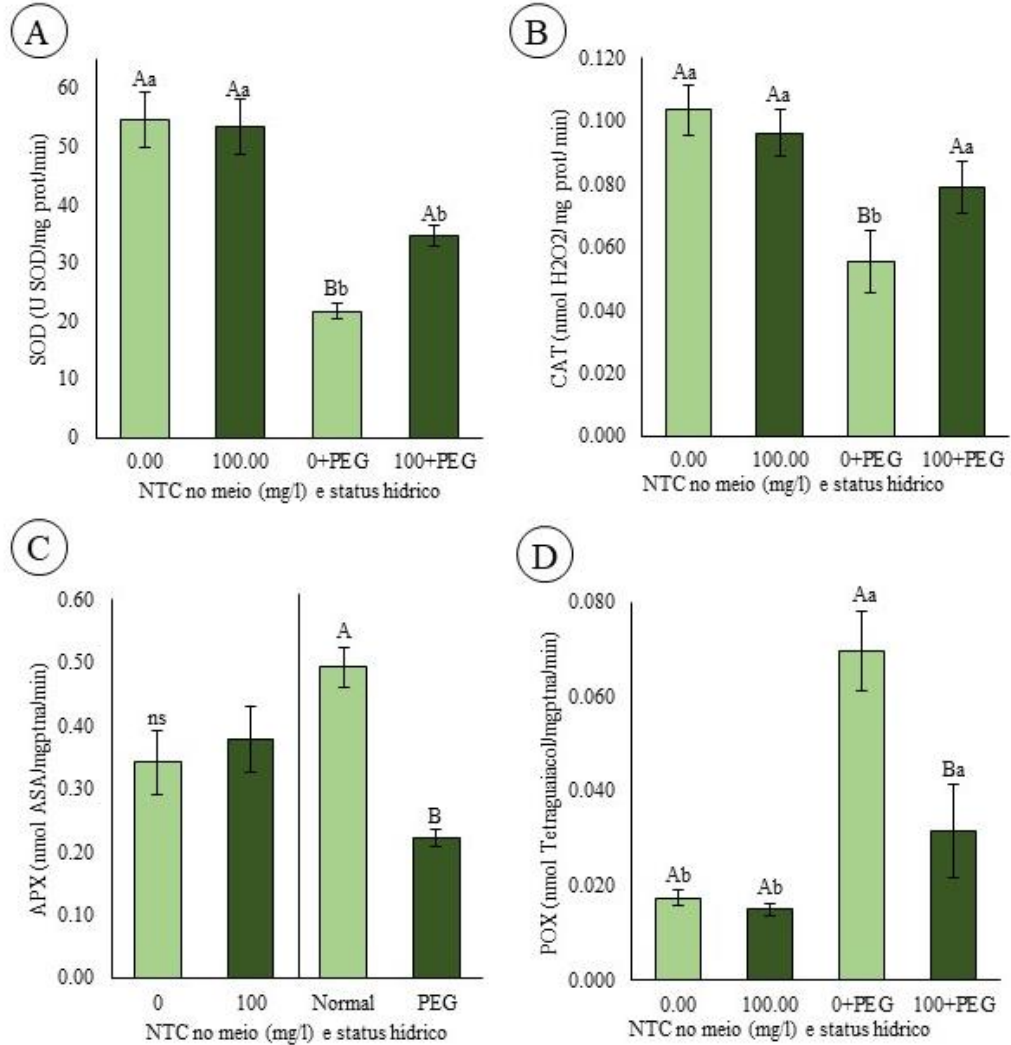
Legenda: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%) dentro do mesmo status hídrico. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro do mesmo tratamento com NTC, pelo mesmo teste.

Fonte: Do autor (2023).

A catalase (Figura 4B) também tem sua maior atividade na condição hídrica normal, sendo na ordem de 0,096-0,104 nmol H₂O₂/ mg prot/min, independente do meio de cultivo. Porém, mesmo sob DH, a adição de NTC ao meio de cultivo mantém elevada a atividade (0,079 nmol H₂O₂/mg prot/ min), não havendo, nesse caso, diferença estatística entre os status hídricos diferentes. Ocorre maior redução na atividade da CAT apenas na parte aérea das plântulas sob DH sem NTC, (0,055 nmol H₂O₂/ mg prot/ min), indicando uma modulação negativa na enzima sob estresse.

Ao contrário das enzimas anteriores, a peroxidase (Figura 4D), medida pela formação de tetraguaiacol, tem a menor atividade sob condições hídricas normais, na ordem de 0,015-0,017 nmol de tetraguaiacol/ mg prot/min. Sob DH, ocorre um aumento de 4 vezes na atividade na parte aérea das plântulas sem NTC (0,070 nmol de tetraguaiacol/ mg prot/min), comparado ao meio sem PEG6000.

Figura 4 – Atividade das enzimas do sistema antioxidante (superóxido dismutase, catalase, peroxidase do ascorbato e peroxidase) na parte aérea de plântulas de girassol ornamental cv. Vincent's Choice *in vitro* NTC no meio de cultivo, com e sem déficit hídrico.



Legenda: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%) dentro do mesmo status hídrico no desdobramento de interações, ou nos tratamentos de NTC/déficit hídrico separados. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro do mesmo tratamento com NTC, pelo mesmo teste.

Fonte: Do autor (2023).

As plântulas em contato com NTC tem atividade menor que o grupo sem, mas ainda assim superior à condição hídrica normal (0,032 nmol de tetraguaiacol/ mg prot/min). A atividade da peroxidase do ascorbato (Figura 4C) não apresentou interação significativa nos fatores avaliados, bem como para a presença de NTC no meio, sendo em média 0,36 nmol

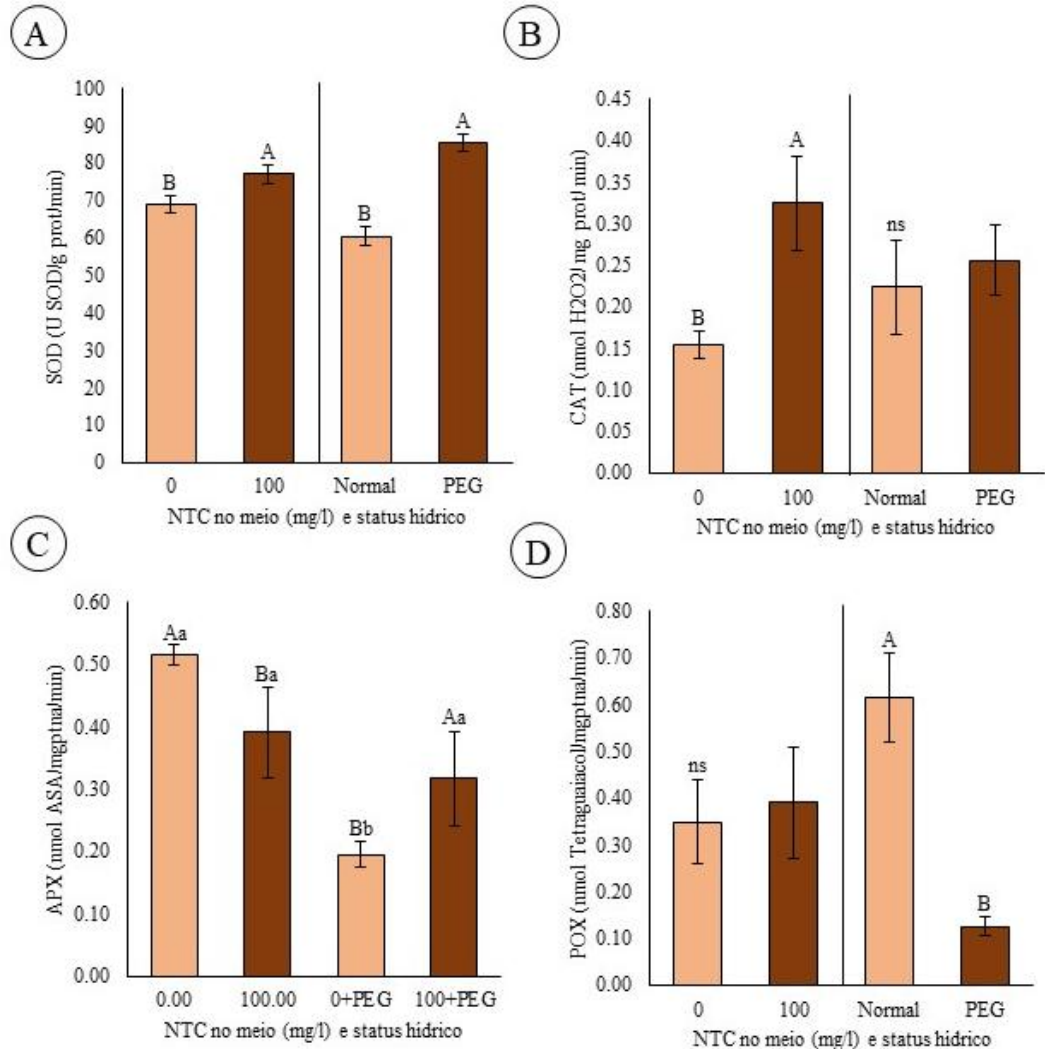
ASA/ mg prot/ min, independente da suplementação no meio de cultivo. Já o déficit hídrico induzido *in vitro* gerou alteração na atividade da APX, sendo superior na condição normal, comparada ao tratamento com DH, 0,49 e 0,22 nmol ASA/ mg prot/ min, respectivamente.

Diferente da parte aérea, no sistema radicular houve menos interação estatisticamente significativa entre os fatores avaliados na atividade do sistema antioxidante enzimático. Com relação à suplementação do meio de cultivo com nanotubos, a atividade da SOD (Figura 5A) foi maior na presença de NTC (76 U SOD/ mg prot/min) e ligeiramente menor no meio normal (69 U SOD/ mg prot/ min). Já com relação ao DH *in vitro*, o estresse induziu aumento na atividade, comparado ao controle sem PEG6000, respectivamente 85 e 60 U SOD/ mg prot/ min.

Para a catalase (figura 5B), a presença de NTC também promoveu a atividade enzimática, com aumento de pouco mais de 50% se comparados os meios, na ordem de 0,32 e 0,15 nmol de H₂O₂/ mg prot/ min com e sem nanotubos, respectivamente. Por outro lado, o estresse hídrico não alterou a atividade da catalase, tendo atividade média de 0,24 nmol H₂O₂/mg prot/min independente do status hídrico. Ao contrário da SOD e CAT, a peroxidase (Figura 5D) não tem sua atividade alterada nas raízes com a presença de nanotubos no meio de cultivo, com média de 0,37 nmol de tetraguaiacol/ mg prot/min. Já atividade nas raízes sob estresse é altamente influenciada, com uma queda de mais de 4,5 vezes com a presença de DH *in vitro*. A POX vai de 0,61 para apenas 0,13 nmol de tetraguaiacol/mg prot/ min no sistema radicular com e sem DH, respectivamente.

A peroxidase do ascorbato é a única enzima cuja atividade foi influenciada simultaneamente pela presença de NTC no meio e o déficit hídrico *in vitro* (Figura 5C). No meio normal, sem suplementação, a atividade enzimática foi a maior encontrada, na ordem de 0,52 nmol ASA/ mg prot/min. Existe uma queda para 0,39 nmol ASA/ mg prot/min no meio com nanotubos, mas quando as plântulas se desenvolvem sob DH, a atividade da APX se mantém no mesmo nível do status hídrico do controle quando os NTC estão presentes (0,32 nmol ASA/ mg prot/min). O sistema radicular das plântulas que cresceram no meio sem nanotubos tem uma queda na atividade da APX demais de 50% comparado ao controle sem DH (0,19 nmol ASA/ mg prot/min), sendo a menor encontrada.

Figura 5 – Atividade das enzimas do sistema antioxidante (superóxido dismutase, catalase, peroxidase do ascorbato e peroxidase) no sistema radicular de plântulas de girassol ornamental cv. Vincent's Choice *in vitro* NTC no meio de cultivo, com e sem déficit hídrico.



Legenda: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%) dentro do mesmo status hídrico no desdobramento de interações, ou nos tratamentos de NTC/déficit hídrico separados. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro do mesmo tratamento com NTC, pelo mesmo teste.

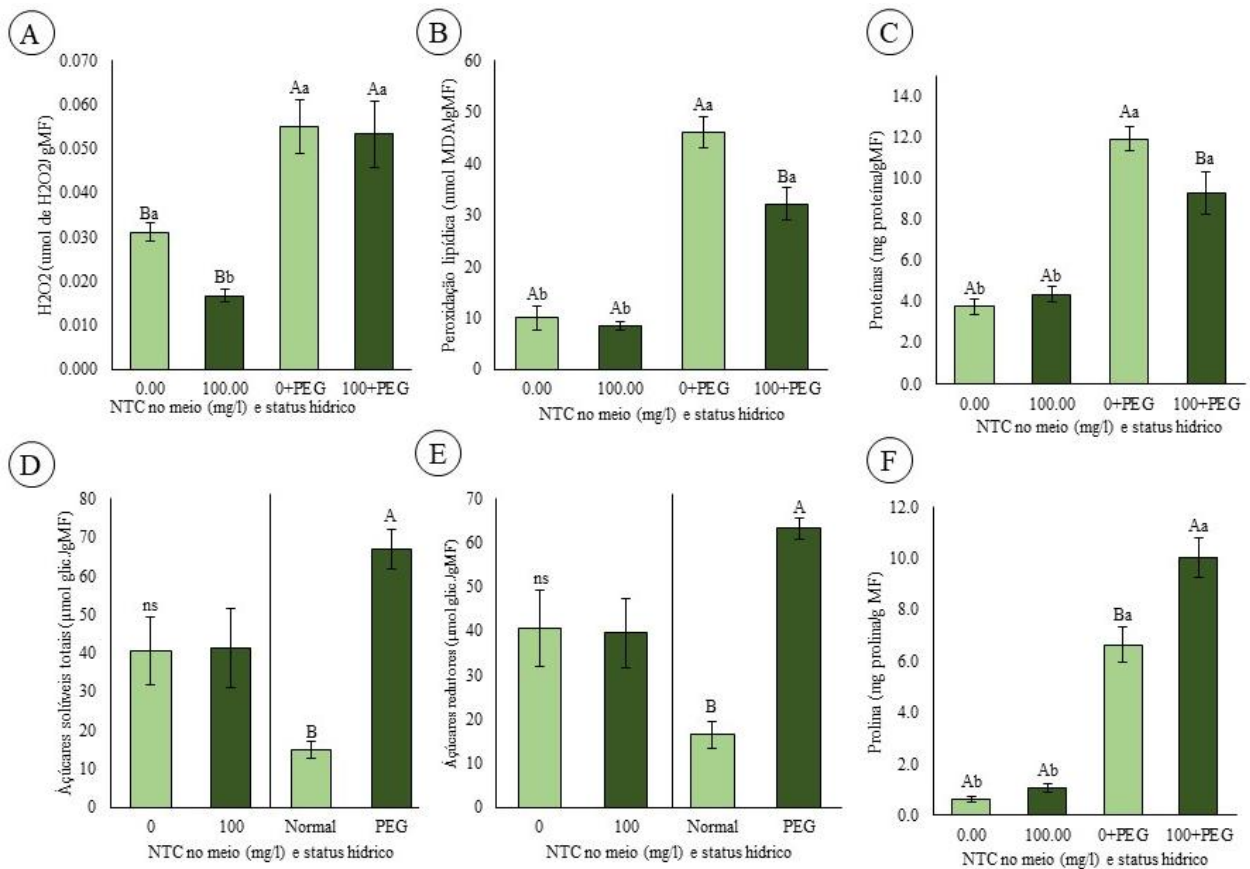
Fonte: Do autor (2023).

3.3.3 Análises bioquímicas não-enzimáticas na parte aérea e sistema radicular

Dentre os parâmetros bioquímicos não-enzimáticos avaliados, a quantificação de peróxido de hidrogênio na parte aérea (Figura 6A) mostra um aumento nos teores quando as plântulas se desenvolvem com PEG6000 no meio de cultivo, gerando valores na ordem de

0,053-0,055 $\mu\text{mol/gMF}$. Por outro lado, na ausência de estresse é observado menor teor nas plantas com NTC no meio, apresentando apenas 0,017 $\mu\text{mol/gMF}$, 60% a menos que na condição estressante, enquanto no tratamento sem nanomateriais foi detectado 0,031 $\mu\text{mol/gMF}$.

Figura 6 – Quantificação de peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica, proteínas, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e prolina na parte aérea de plântulas de girassol ornamental cv. Vincent's Choice *in vitro* com NTC no meio de cultivo, com e sem déficit hídrico



Legenda: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%) dentro do mesmo status hídrico no desdobramento de interações, ou nos tratamentos de NTC/déficit hídrico separados. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro do mesmo tratamento com NTC, pelo mesmo teste.

Fonte: Do autor (2023).

Na avaliação da peroxidação lipídica da parte aérea (Figura 6B), através da quantificação de malondialdeído formado, é possível observar um aumento de 3 a 4 vezes nos teores quando se observam as plântulas com e sem déficit hídrico. No meio sem DH, os teores

são de 8-10 nmol de MDA/gMF, sem diferenças pela presença de nanomateriais. Já sob estresse, a presença de NTC reduz em quase 30% os teores de MDA, de 46 para 32 nmol de MDA/gMF. De forma análoga à peroxidação lipídica, o conteúdo de proteínas foi superior nas plântulas sob estresse, sendo maior na ausência de NTC (11,9 mg/gMF). Com a adição de NTC no meio de cultivo sob DH, as plântulas apresentaram teores de proteína (Figura 6C) na ordem de 9,3 mg/gMF, enquanto nas condições normais ocorre diminuição desses níveis em até 60%, não havendo diferença entre os tratamentos com e sem NTC, 4,4 e 3,8 mg/gMF, respectivamente.

O acúmulo de açúcares solúveis totais e de açúcares redutores (Figura 6D e 6E) não mostra interação entre os fatores avaliados. Na condição hídrica normal não existem diferenças significativas entre os meios com e sem nanotubos, com média de 41 mg/ gMF e 40 mg/ gMF de AST e AR, respectivamente. De forma diferente, o DH induzido *in vitro* estimulou o acúmulo de AST e AR em mais de 3 vezes com relação ao meio sem PEG6000. Para os AST a diferença é de 15 para 67 mg/ gMF, enquanto para os AR é de 17 para 63 mg/ gMF, o que mostra uma forte influência do status hídrico nesses parâmetros, diferentemente da suplementação com NTC.

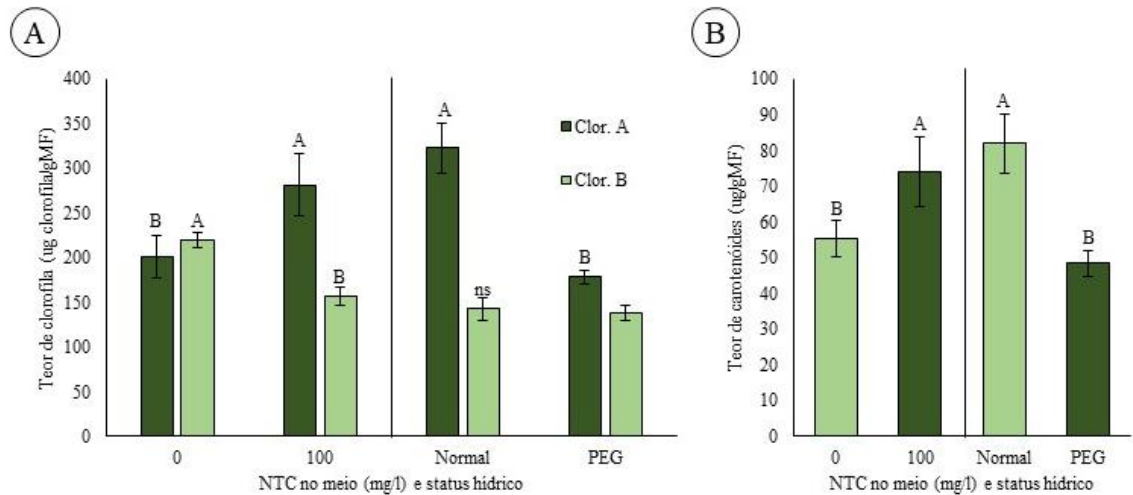
Na quantificação de prolina na parte aérea (Figura 6F) é possível observar interação significativa entre NTC e DH *in vitro*. No meio sem PEG6000 não é observada diferença entre a presença de NTC, por mais que o acúmulo seja ligeiramente superior com NTC (0,6 e 1,1 mg prolina/ gMF). Porém, quando as plântulas se desenvolveram sob DH, houve maior acúmulo de prolina na parte aérea, mas os nanotubos proporcionaram aumento de 1,5 vez nos teores de prolina, gerando valores na ordem de 10 mg prolina/gMF contra 6,6 mg prolina/ gMF nos meios com e sem NTC, respectivamente.

Para os pigmentos fotossintéticos avaliados, foi possível observar um aumento nos teores de clorofila A (Figura 7A) nos meios suplementados com NTC 281 mg clorA/ gMF, comparado aos meios sem (201 mg clorA/ gMF). Da mesma forma, o controle sem déficit hídrico permitiu maior síntese de clorofila A, 323 contra 178 mg clorA/ gMF nas plântulas sob estresse. O acúmulo de clorofila B foi diferente da A, sendo maior nas plântulas que se desenvolveram nos meios sem NTC, comparadas às outras, 220 mg clorB/ gMF nas primeiras e 157 mg clorB/ gMF nas outras. A indução de DH *in vitro* não afetou significativamente os níveis de clorofila B, com média de 141 mg clorB/ gMF independente do status hídrico.

O teor de carotenoides (Figura 7B) nas folhas seguiu um padrão semelhante ao da clorofila A. É possível observar maior concentração nas plântulas que se desenvolveram com

NTC 74 mg car/ gMF, bem como na condição hídrica normal 82 mg car/ gMF. Já as plântulas desenvolvidas sem nanotubos ou sob DH *in vitro* acumularam menos carotenoides, 55 e 48 mg car/ gMF, respectivamente.

Figura 7 – Quantificação de clorofila A, B e carotenoides na parte aérea de plântulas de girassol ornamental cv. Vincent's Choice *in vitro* com NTC no meio de cultivo, com e sem déficit hídrico:



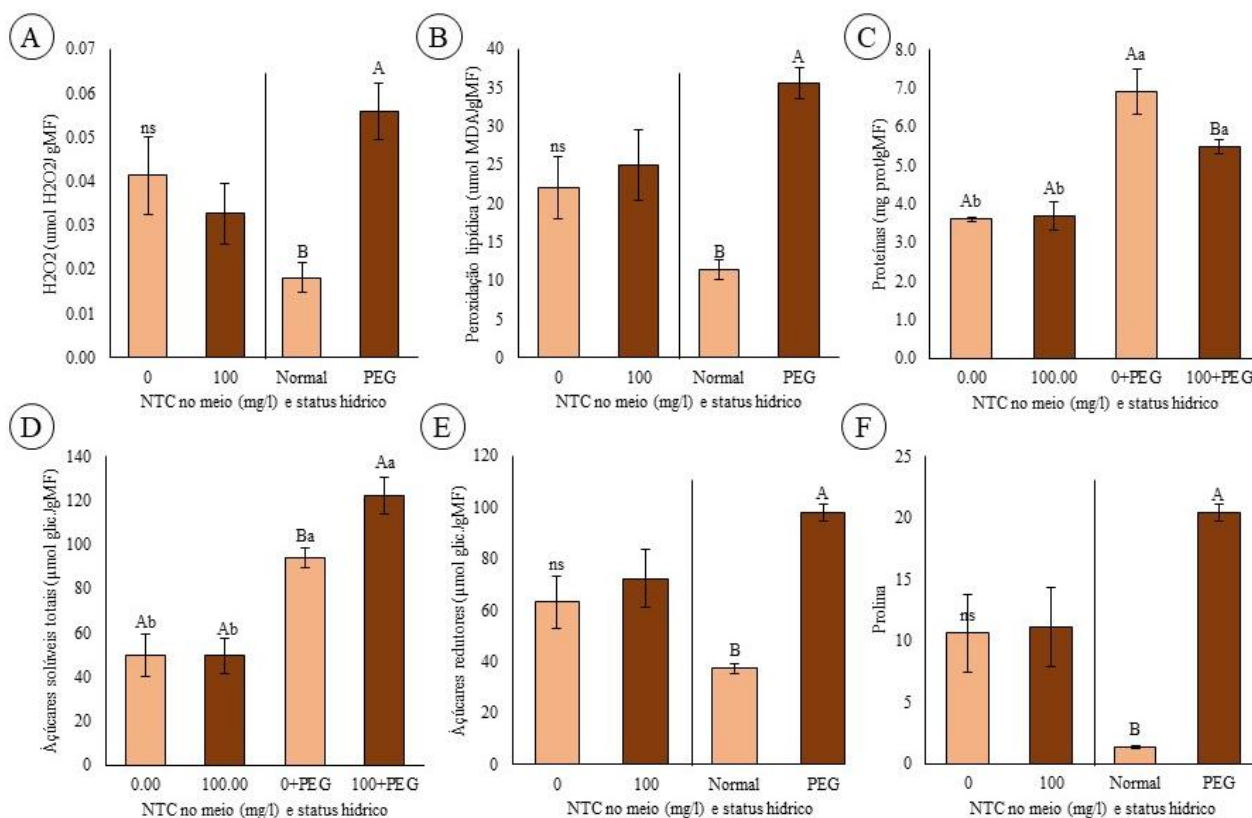
Legenda: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%) nos tratamentos de NTC e déficit hídrico.

Fonte: Do autor (2023).

No sistema radicular das plântulas, as análises bioquímicas não-enzimáticas de quantificação de H_2O_2 e peroxidação lipídica (Figura 8A e 8B) não apresentaram interação significativa dos fatores analisados. Na ausência de DH, os níveis de peróxido de hidrogênio são da ordem de 0,04 $\mu\text{mol } H_2O_2/ \text{gMF}$. Quando as raízes se desenvolvem no meio com PEG os níveis de H_2O_2 sobem de 0,02 para 0,06 $\mu\text{mol } H_2O_2/ \text{gMF}$, o que é esperado em condições estressantes. A quantificação de malondialdeído indica níveis estatisticamente iguais nos meios, independente da suplementação com NTC, com média de 23 $\mu\text{mol de MDA/ gMF}$. De forma análoga ao H_2O_2 , o DH induz aumento na peroxidação lipídica, com valores que vão de 11 $\mu\text{mol de MDA/ gMF}$ no meio controle, para 36 $\mu\text{mol MDA/ gMF}$ com PEG.

A quantificação de proteínas no sistema radicular (Figura 8C) mostra influencia simultânea dos fatores avaliados, sendo estatisticamente igual no meio sem DH, com e sem NTC (3,7 mg prot/ gMF). Quando as plantas são expostas ao estresse hídrico, ocorre aumento nos teores de proteína, sendo maior no meio sem NTC (6,9 mg prot/ gMF), comparado ao meio suplementado (5,5 mg prot/ gMF).

Figura 8 – Quantificação de peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica, proteínas, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e prolina no sistema radicular de plântulas de girassol ornamental cv. Vincent's Choice *in vitro* com NTC no meio de cultivo, com e sem déficit hídrico



Legenda: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%) dentro do mesmo status hídrico no desdobramento de interações, ou nos tratamentos de NTC/déficit hídrico separados. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro do mesmo tratamento com NTC, pelo mesmo teste.

Fonte: Do autor (2023).

Nas raízes das plântulas, ocorre acúmulo de açúcares solúveis totais de forma dependente da dose de NTC e condição hídrica (Figura 8D). Quando não há DH *in vitro*, a média do teor de AST é semelhante para os meios com e sem NTC, 49 e 50 mg AST/ gMF, respectivamente. Entretanto, com adição de PEG o sistema radicular acumula mais AST de forma geral, mas em maior quantidade na presença de NTC 122 mg/ gMF, comparado ao meio sem nanotubos (94 mg/ gMF). Para os açúcares redutores (Figura 7D), a interação entre os fatores não existe e também não há diferença entre os teores nos meios de cultivo com e sem NTC, sendo a média na ordem de 68 mg/ gMF. O DH afeta de outra maneira os teores de

AR (Figura 8E), sendo que, no meio com DH, as raízes apresentam mais AR 100 mg/ gMF, comparado ao meio normal, com 37 mg/ gMF.

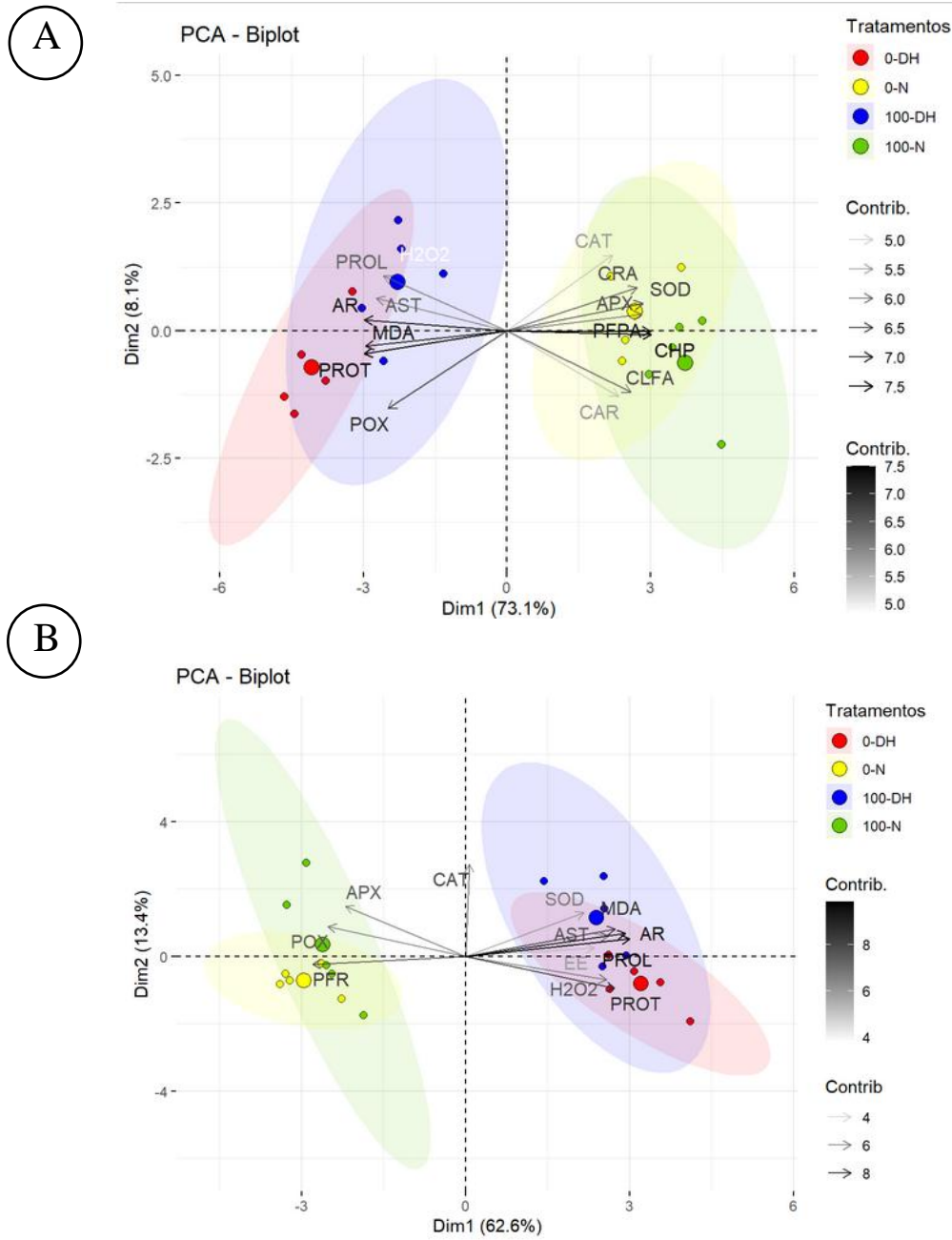
De maneira semelhante ao conteúdo de AR, o teor de prolina no sistema radicular das plântulas não é influenciado pela presença de nanotubos no meio de cultivo (Figura 8F), com média de 11 mg/ gMF. Em contrapartida, o estresse induzido *in vitro* altera os níveis de prolina aumentando a concentração do aminoácido de 1 mg/ gMF no controle, para 20 mg/ gMF nas plântulas sob DH.

3.3.4 Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) da parte aérea e do sistema radicular separou os grupos de plântulas verticalmente com relação aos tratamentos de déficit hídrico induzido *in vitro*. Na PCA da parte aérea (Figura 9A), o primeiro componente corresponde a 73,1% das variâncias e é influenciado principalmente pelo comprimento do hipocótilo e peso fresco da parte aérea, bem como a quantificação de MDA, proteínas e açúcares redutores, e, em menor peso, pelo conteúdo relativo de água, atividade da SOD, APX e pelo teor de açúcares solúveis totais. O segundo componente explica 8,1% das variâncias tem maior contribuição das atividades da catalase e peroxidase.

As plântulas dos tratamentos sem NTC estão mais agrupadas em um conjunto, enquanto as que se desenvolveram no meio suplementado estão mais dispersas, provavelmente porque as atividades enzimáticas, que contribuem para separação horizontal, são mais variáveis dentro de um mesmo tratamento, comparadas, por exemplo, com os fatores de crescimento, que são mais estáveis. As variáveis de crescimento (CHP, PFPA, CRA e pigmentos), influenciadas negativamente pelo DH, estão agrupadas ao lado direito da PCA. Justamente nestes quadrantes se posicionaram as plântulas desenvolvidas na condição estressante. Em contrapartida, as variáveis que representam respostas de defesa das plântulas aos sintomas do DH *in vitro*, como acúmulo de AR, AST, prolina, proteínas e atividade da POX, colaboram negativamente para a separação dos grupos de indivíduos. Nestes casos, permanecem próximos os meios com status hídrico normal.

Figura 9 – Análise de componentes principais da parte aérea e sistema radicular de plântulas de girassol ornamental desenvolvidas *in vitro* sob déficit hídrico com NTC no meio de cultivo, com e sem déficit hídrico.



Legenda: A – Parâmetros avaliados na parte aérea das plântulas. B – Parâmetros avaliados no sistema radicular.

Fonte: Do autor (2023).

Horizontalmente, o antagonismo entre as atividades das CAT e POX colaborou para a separação dos eixos. A primeira enzima é regulada negativamente no DH, sobretudo nas

plântulas sem NTC, por isso se correlaciona com os parâmetros de crescimento. Já a POX é promovida com o estresse, principalmente neste grupo de plântulas sem NTC, o que justifica sua proximidade com os agrupamentos dos indivíduos 0-N. Dessa forma, os quatro pontos mais representativos dos tratamentos (círculos maiores) acabaram separados um em cada quadrante, apesar de existirem sobreposições nos grupos verticalmente, com e sem DH, o efeito dos nanotubos também contribuiu para diferenciação dos indivíduos, horizontalmente.

A PCA dos parâmetros do sistema radicular tem seu componente 1 explicando 62,6% das variâncias, recebendo contribuição principalmente do conteúdo de prolina e açúcares redutores, bem como do peso fresco e teores de MDA, proteínas. Dessa forma, como os dois primeiros parâmetros se relacionam positivamente com o DH, ou seja, aumentam quando as plântulas estão sob estresse, ocorre uma inversão dos eixos quando se compara com a parte aérea. Na direita da PCA estão os indivíduos que se desenvolveram sob DH e à esquerda os controles sob status hídrico normal.

Já o componente 2 é influenciado principalmente pela atividade da catalase, com pequena contribuição da APX e SOD, explicando 13,4% das variâncias. De forma semelhante à parte aérea, os grupos de indivíduos sem nanotubos estão menos dispersos, ao contrário dos que se desenvolveram com NTC, que apresentam maior dispersão nos eixos. As variáveis extravasamento de eletrólitos, atividade da SOD, conteúdo de H₂O₂, MDA, AR, AST, prolina e proteínas estão próximas, ao lado direito da PCA, indicando correlação positiva entre elas, justamente por serem parâmetros ligados à defesa das plântulas aos sintomas de DH. As variáveis de crescimento e atividade da APX e POX se correlacionam negativamente às anteriores, afinal são regulados negativamente pelo estresse hídrico *in vitro*. A catalase, que tem importância na separação horizontal dos eixos não se correlaciona com as demais enzimas antioxidantes, provavelmente porque sua atividade não foi influenciada pelo DH, apenas pela presença de NTC no meio de cultivo.

Novamente de forma semelhante à parte aérea, a PCA do sistema radicular separou os indivíduos com relação ao estresse induzido (Figura 9B). Além disso, os quatro pontos mais representativos de cada um dos quatro tratamentos estão dispersos um em cada quadrante, indicando a importância do DH como principal fator de contraste entre eles. Entretanto, a contribuição dos NTC para diferenciar os efeitos observados nas variáveis também está presente e tem influência nos parâmetros observados.

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Crescimento *in vitro* sob déficit hídrico

Segundo o que foi levantado na literatura, este é o primeiro estudo da influência de nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico no desenvolvimento inicial de plântulas sob déficit hídrico *in vitro*. A restrição hídrica afeta negativamente os vegetais em diferentes níveis, desde o transcriptômico até a arquitetura da planta (ESCALANTE *et al.*, 2020; SAH *et al.*, 2020). Mais ainda, a imposição do estresse durante um período delicado e complexo como a germinação, pode trazer consequências por todo o ciclo de vida, mesmo que a semente consiga completar o processo germinativo (SAUX *et al.*, 2020; YOUSEFI *et al.*, 2020).

No caso de *Helianthus annuus*, diferentes estudos já avaliaram os efeitos de estresses abióticos na fase inicial do ciclo da cultura, em genótipos ornamentais ou não. Imposição de altas temperaturas (CATIEMPO *et al.*, 2021), estresse salino (JABEEN; AHMAD, 2013; LI *et al.*, 2020) e mesmo déficit hídrico (TOSCANO *et al.*, 2017) afetam negativamente a velocidade e porcentagem de germinação da espécie, o que não foi observado neste estudo, mesmo com a adição de PEG6000 ao meio de cultivo. Entretanto, um efeito de diminuição de parâmetros de crescimento está presente na totalidade dos trabalhos.

A restrição hídrica costuma reduzir o desenvolvimento vegetal, diminuindo o comprimento da planta e acúmulo de matéria fresca/seca (TOSCANO *et al.*, 2017). Entretanto, a adição de NTC ao meio de cultivo parece ter aliviado até certo ponto os efeitos da falta de disponibilidade de água, haja vista terem sido observadas poucas diferenças significativas no crescimento sob status hídrico normal. Na parte aérea das plântulas ocorre maior alongamento do hipocótilo e acúmulo de matéria fresca com adição dos nanomateriais, nas duas condições hídricas.

Já para o sistema radicular, o efeito benéfico também está presente, porém, em condição estressante, os nanotubos permitiram o desenvolvimento normal da raiz, em termos do comprimento máximo observado, se mantendo igual ao controle, porém com um peso fresco reduzido, o que indicaria uma promoção do crescimento radicular, em detrimento do acúmulo de matéria fresca, como estratégia do vegetal em mitigar os efeitos negativos do DH. A regulação do crescimento por parte dos NTC está amplamente reportada na literatura para diferentes espécies (JORDAN; SINGH; CAÑAS-CARRELL, 2018; MATHEW; TIWARI; TRIPATHI, 2021). Porém, este potencial é pouco explorado em condições limitantes, sendo mais comum serem avaliados efeitos de metais pesados ou contaminantes, em plantas sendo desenvolvidas com adição de NTC (CHANG *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2021; FAN *et al.*,

2018; KE *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2022; OLOUMI; MOUSAVI; NEJAD, 2018; PANDEY *et al.*, 2018).

A interação NTC/DH foi pouco estudada até o momento, apenas em *Catharanthus roseus*, com suspensão da irrigação das plantas (PANDEY *et al.*, 2019) e com adição de PEG ao meio de cultivo *in vitro* no desenvolvimento inicial de *Cucurbita pepo*, (HATAMI, 2017). No primeiro trabalho, a presença de NTC no solo em que as plantas foram cultivadas ajuda na retenção de umidade, mitigando efeitos negativos até 7 dias após a última irrigação. No segundo, o contato das sementes de *C. pepo* com os nanotubos já foi suficiente para promover efeitos de toxicidade na germinação e no desenvolvimento das plântulas, como redução do alongamento radicular, crescimento da parte aérea e acúmulo de peso fresco.

Os efeitos negativos foram potencializados pela interação dos nanomateriais com o estresse abiótico, reduzindo ainda mais os parâmetros citados, bem como promovendo aumento nos níveis de H₂O₂, peroxidação lipídica e extravasamento de eletrólitos. Como as formas de exposição aos NTC, bem como as espécies estudadas variam, fica evidente a necessidade de se conhecer mais os impactos desses nanomateriais no biociclo vegetal.

3.4.2 Sistema antioxidante enzimático

Para além da avaliação de crescimento, as análises bioquímicas de enzimas do sistema antioxidante das plântulas revelam uma modulação da atividade de forma específica para parte aérea e sistema radicular, além das mudanças promovidas pela suplementação do meio com NTC e indução de estresse abiótico *in vitro*. Com o status hídrico normal, não existem diferenças significativas nas atividades das enzimas avaliadas na parte aérea das plântulas, mas, sob estresse, é quando se notam diferenças.

À exceção da peroxidase, todas as enzimas sofreram algum tipo de decréscimo na atividade quando as plântulas se desenvolvem sob DH. Naquelas expostas aos NTC, a SOD e CAT tem atividade aumentada, comparado ao controle e, além disso, os níveis de atividade da CAT são os únicos estatisticamente semelhantes ao meio com status hídrico normal, indicando a manutenção da atividade com a presença de nanotubos, mesmo que a ligação entre eles ainda não seja evidente.

A peroxidase é altamente promovida nas plântulas sem NTC, sendo a principal forma de eliminação de H₂O₂ pelas enzimas analisadas neste estudo. E, por fim, a APX foi a enzima cuja atividade não teve interação entre os fatores, apresentando redução de quase 50% sob estresse. Essa modulação negativa das enzimas sob estresse está de acordo com o aumento nos níveis de H₂O₂ e MDA na parte aérea das plântulas sob estresse, mesmo que os NTC

ajudem a diminuir a peroxidação lipídica nas plântulas, o aumento destes marcadores bioquímicos evidencia o desbalanço fisiológico causado pela falta de água disponível no meio de cultivo. Disso resulta em um menor conteúdo relativo de água, levando as plântulas a um menor alongamento do hipocótilo e menor acúmulo de matéria fresca.

A regulação da atividade antioxidante enzimática pela exposição aos nanotubos de carbono está bastante relatada na literatura, para diversas espécies cultivadas e com diferentes formas de exposição. Como exemplos, a incorporação de NTC no solo aumentou atividade de SOD, CAT e POX em *Oryza sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Solanum nigrum* e *Vitis deciduous* (ABDEL-AZIZ; HASANEEN; HELAL, 2022; CHEN *et al.*, 2021; HAO *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2022). De alguma forma, existe uma promoção da atividade dessas enzimas relacionada à presença de NTC.

Mais ainda, sob condições adversas avaliadas, como o estresse salino (adição de NaCl), os nanotubos contribuíram para alívio dos sintomas em *Oncimum basilicum* e *Salvia verticillata* (GOHARI *et al.*, 2020; RAHMANI; RADJABIAN; SOLTANI, 2020). Nesses casos, existe aumento da atividade enzimática antioxidante, permitindo maior crescimento, apesar da condição abiótica limitante. No desenvolvimento *in vitro* de *Gossypium hirsutum* e *Catharanthus roseus*, a adição de NTC no meio de cultivo permitiu maior crescimento das plântulas, acima do controle, evidenciando novamente uma relação positiva de NTC no desenvolvimento vegetal.

Essas relações positivas foram espécie-independente, mas ainda assim dose-dependente. Os efeitos positivos enzimáticos e do crescimento citados são modulados pela quantidade de NTC presentes. Além disso, as particularidades de exposição variam entre os trabalhos, bem como a origem dos nanomateriais (sintetizados pela equipe ou adquiridos de uma empresa), a funcionalização, dispersão com sonicador e as medidas de comprimento e diâmetro. Medidas de carga e tamanho dos nanotubos influenciam diretamente o tipo de célula e a localização subcelular (organelas, citoplasma) em que estes serão acumulados por diferentes espécies vegetais (ZHAI *et al.*, 2015). Sendo assim, por mais que existam estudos com NTC, o consenso sobre seus efeitos no sistema enzimático e no crescimento vegetal requerem mais análises em diferentes espécies, formas de exposição e especificidades dos materiais.

No presente estudo, ficou claro pelos resultados que existe um impacto diferencial entre os órgãos vegetais. De modo diferente da parte aérea, no sistema radicular apenas a atividade da APX apresenta interação significativa entre NTC e DH *in vitro*. Em condição

hídrica normal a atividade é menor nas plântulas suplementadas com nanotubos, mas, quando da imposição de estresse, se torna superior na presença destes, evidenciando uma modulação positiva da atividade da APX que ocorre nas raízes quando existe estresse e NTC, mas que não se expressa em condições de maior disponibilidade de água. Para as outras enzimas avaliadas, os fatores contribuíram individualmente, inexistindo uma interação significativa. A atividade da SOD é ligeiramente superior presença de NTC, bem como no DH, indicando que os nanotubos possam gerar um estímulo para a sua expressão nas raízes de alguma maneira relacionado ao estresse abiótico.

A catalase não altera sua atividade no sistema radicular com indução de estresse *in vitro*, porém é superior nos meios com nanotubos. Assim, também é uma evidência da promoção de forma específica do sistema antioxidante enzimático por parte dos NTC, visto que ocorre na SOD, CAT e APX, mas não na POX. Esta última, não mostra diferenças na atividade entre os meios suplementados, porém é quase 6 vezes superior nos meios de cultivo sem estresse, indicando que esta enzima é altamente suprimida nas raízes sob estresse.

A maior atividade da superóxido dismutase no sistema radicular das plântulas que cresceram com nanotubos está de acordo com os maiores níveis de H_2O_2 encontrados, porém como não existe diferença na peroxidação lipídica com relação à suplementação do meio de cultivo, mas o comprimento máximo da raiz é superior nas plântulas com NTC, é possível acreditar que a atividade do sistema antioxidante enzimático foi suficiente para promover alongamento celular nas raízes, mitigando os efeitos negativos da falta de água disponível, permitindo que pelo menos este parâmetro se mantivesse nos níveis normais.

3.4.3 Quantificação de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e prolina

Além do sistema antioxidante enzimático, para os parâmetros bioquímicos não-enzimáticos mensurados, os teores de açúcares totais e redutores na parte aérea tem uma resposta semelhante. Os níveis são mantidos iguais com relação à suplementação do meio de cultivo com NTC, indicando que nanotubos não interferem diretamente no processo de acúmulo dessas moléculas.

Quando as plântulas se desenvolvem sob estresse hídrico é visto um acúmulo de açúcares, o que pode ser uma resposta biológica à falta de disponibilidade de água (OZTURK *et al.*, 2021). A redução do potencial hídrico celular ajuda na manutenção do turgor celular, que é fundamental para processos fisiológicos e de crescimento (GURRIERI *et al.*, 2020). Como o DH afeta o crescimento da parte aérea e se observa uma redução na atividade do

sistema antioxidante enzimático, o acúmulo de solutos colaboraria para mitigar os efeitos negativos do estresse.

Por mais que haja uma regulação negativa de algumas enzimas do sistema antioxidante com indução do estresse *in vitro* (SOD, APX e CAT no grupo sem NTC), o acúmulo de solutos osmoticamente ativos parecem ser uma via alternativa de defesa. A regulação osmótica colabora na manutenção do turgor celular e preservação da integridade intracelular (BLUM, 2017). Estes reduzem os efeitos negativos no desenvolvimento da parte aérea do desbalanço causado pela menor disponibilidade de água, que leva a um aumento nos marcadores fisiológicos de estresse e redução do crescimento e conteúdo de água.

Os teores de prolina corroboram com essa teoria, visto que esse aminoácido é conhecido como um marcador de respostas aos estresses abióticos e seu acúmulo tem correlação com a manutenção do conteúdo de água (BEGUM *et al.*, 2019). Em condição hídrica normal, os níveis são semelhantes entre os meios de cultivo com e sem NTC, porém, a indução de DH estimula o acúmulo de prolina na parte aérea. O mesmo foi observado em plantas de *H. annuus* em pré-florescimento com aplicação de trealose, onde ocorreu aumento de prolina, além da atividade antioxidante, como resposta ao DH (KOSAR *et al.*, 2021).

Além disso, a presença dos nanotubos parece promover a síntese de prolina sob estresse, por mecanismos ainda não descritos na literatura, mas que poderiam ser fonte de investigação, visando alternativas de proteção de culturas contra situações limitantes para o desenvolvimento. Nesse sentido, em *S. verticillata* a exposição foliar aos NTC a partir de 100 mg/L contribuiu para aumento nos teores de prolina (RAHMANI; RADJABIAN; SOLTANI, 2020), ou seja, existe uma relação espécie-específica para a síntese desse aminoácido.

Pelo que foi levantado na literatura, alterações nos teores de açúcares solúveis totais e redutores em sementes, plântulas e plantas expostas aos nanotubos de carbono de parede múltipla são ausentes até o momento. Outras análises indicaram alterações em compostos secundários sintetizados em frutos de *Lycopersicon esculentum* pela presença de NTC no cultivo hidropônico (MCGEHEE *et al.*, 2017), bem como aumento na produção de ácido rosimárico, compostos fenólicos e flavonoides em folhas de *Salvia verticillata* após aspersão de solução contendo NTC (RAHMANI; RADJABIAN; SOLTANI, 2020). Mas, normalmente, o que excede os pigmentos fotossintéticos, prolina, H₂O₂ e MDA, ainda são necessários mais trabalhos que elucidem quais as rotas metabólicas são elicitadas ou reprimidas pela exposição aos NTC, em condições normais e/ou adversas, para que ganhe profundidade o entendimento de como esses materiais atuam em plantas.

Também não é frequente o estudo das alterações fisiológicas que ocorrem no sistema radicular quando vegetais se desenvolvem em contato com nanotubos de carbono. A anatomia radicular foi avaliada em plantas de *Momordica charantia*, cultivadas em vaso e irrigadas com solução contendo NTC. Se constatou que nanotubos contribuem para aumento no diâmetro e no número de células de metaxilema, existindo uma relação entre diferenciação celular induzida pela presença de NTC (SEDDIGHINIA *et al.*, 2019).

Em plântulas de *Triticum aestivum* desenvolvidas em hidroponia, foram detectadas alterações celulares nas células da raiz, agravadas pela presença de cádmio como contaminante na solução (CHANG *et al.*, 2020). E, da mesma forma, o cultivo de *Oryza sativa* em solo suplementado com NTC resultou em diminuição na espessura da raiz e alterações negativas no formato de células corticais, evidenciando a interação espécie-específica e forma de exposição/resposta nos estudos com nanotubos (HAO *et al.*, 2018).

No sistema radicular é possível notar uma modulação dos açúcares solúveis sob DH, sendo maiores com a presença de NTC no meio de cultivo, de forma análoga aos teores de prolina na parte aérea. Já os teores de açúcares redutores e prolina não sofrem influência conjunta de NTC-DH nas raízes. Porém, com a adição de PEG ao meio, é possível perceber um acúmulo significativo dessas moléculas no sistema radicular das plântulas, sendo os níveis de prolina os que mais se alteram.

Como um todo nas plântulas, o acúmulo de açúcares e prolina pode ser uma estratégia fisiológica para manutenção de um potencial hídrico celular mais favorável aos processos de crescimento que serão fundamentais para o estabelecimento das plântulas. Visto que as raízes são limitadas pela quantidade de meio de cultivo e espaço de forma mais visível que a parte aérea, o desenvolvimento *in vitro* poderia ser, por si só, uma fonte de estresse. Com a limitação imposta pelo DH, essa condição estressante foi agravada além do limiar de promoção do sistema antioxidante enzimático feito pelos nanotubos de carbono. Em última instância, a osmorregulação colaborou para manutenção do alongamento celular, sem que houvessem danos maiores, o que fica visível pela redução no extravasamento de eletrólitos pelas raízes.

3.5 Conclusão

A adição de nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizados com ácido carboxílico ao meio de cultivo para desenvolvimento inicial das plântulas de *Helianthus annuus* sob déficit hídrico aliviou parcialmente os sintomas do estresse no crescimento vegetativo, da parte aérea e do sistema radicular.

Apesar de haver redução na atividade antioxidante enzimática nos órgãos vegetais com o estresse, o acúmulo de osmólitos ativos permitiu a mitigação dos efeitos negativos, principalmente a prolina e os açúcares solúveis totais. Essa adaptação fisiológica ainda não havia sido avaliada, com relação à exposição de plantas aos NTC.

Novos estudos poderão acrescentar informações a respeito dos efeitos dos NTC nos vegetais, seja em condições de crescimento *in vitro* ou com outras formas de cultivo. A avaliação do desenvolvimento em condições desafiadoras de crescimento, como déficit hídrico, poderá contribuir para uma agricultura mais sustentável no futuro, pelo emprego da nanotecnologia no campo.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-AZIZ, H. M. M.; HASANEEN, M. N. A.; HELAL, S. H. Effect of multi-walled carbon nanotubes, urea, and peat moss on growth and yield of bean plants cultivated in sandy soil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 1173–1187, 2022.
- ARMSTRONG, F. H.; FISHER, K. C.; ADLER, E.; G-UNTHER, G.; EVERETT, J. E.; BURRIS, R. H.; WILSON, P. W.; CLAYTON, J. C.; HEMS, B. A.; ROBINSON, F. A.; ANDREWS, R. D.; HUNWICKE, R. F.; CLIFTON, C. E.; CONWAY, E. J.; DOHAN, J. S.; WOODWARD, G. E.; FOLKES, B. F.; WILLIS, A. J.; YEMM, E. W.; GRUNERT, R. R.; PHILLIPS, P. H.; HAAS, E.; HARRER, C. J.; HOGNESS, T. R.; HANES, C. S.; HIRD, F. J. R.; ISHERWOOD, F. A.; KREBS, H. A.; GURIN, S.; EGGLESTON, L. V.; LIPMANN, F.; MCILWAIN, H.; ROBERTSON, R. N.; WILKINS, M. J.; WEEKS, D. C.; VIRTANEN, A. I.; CSAKY, T. Z.; RAUTANEN, N. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, n. 3, p. 508, 1954.
- ARORA, S.; MURMU, G.; MUKHERJEE, K.; SAHA, S.; MAITY, D. A comprehensive overview of nanotechnology in sustainable agriculture. **Journal of Biotechnology**, v. 355, p. 21–41, 2022.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n. 1, p. 205–207, 1973.
- BEGUM, N.; AHANGER, M. A.; SU, Y.; LEI, Y.; MUSTAFA, N. S. A.; AHMAD, P.; ZHANG, L. Improved drought tolerance by AMF inoculation in maize (*Zea mays*) involves physiological and biochemical implications. **Plants**, v. 8, n. 12, p. 579, 2019.
- BEHL, T.; KAUR, I.; SEHGAL, A.; SINGH, S.; SHARMA, N.; BHATIA, S.; AL-HARRASI, A.; BUNGAU, S. The dichotomy of nanotechnology as the cutting edge of agriculture: Nano-farming as an asset versus nanotoxicity. **Chemosphere**, v. 288, p. 132533, 2022.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, v. 116, p. 651–658, 1998.
- BLUM, A. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. **Plant, Cell & Environment**, v. 40, n. 1, p. 4–10, 2017.
- BOVERHOF, D. R.; BRAMANTE, C. M.; BUTALA, J. H.; CLANCY, S. F.; LAFRANCONI, W. M.; WEST, J.; GORDON, S. C. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 137–150, 2015.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BUEGE, J.; AUST, S. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 52, p. 302–310, 1978.
- CATIEMPO, R. L.; PHOTCHANACHAI, S.; BAYOGAN, E. R. V.; VICHITSOONTHONKUL, T. Possible role of nonenzymatic antioxidants in hydroprimed sunflower seeds under heat stress. **Crop Science**, v. 61, n. 2, p. 1328–1339, 2021.
- CHANG, X.; SONG, Z.; XU, Y.; GAO, M. Effects of carbon nanotubes on growth of wheat seedlings and Cd uptake. **Chemosphere**, v. 240, 2020.
- CHEN, X.; WANG, J.; HAYAT, K.; ZHANG, D.; ZHOU, P. Small structures with big impact: multi-walled carbon nanotubes enhanced remediation efficiency in hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. under cadmium and arsenic stress. **Chemosphere**, v. 276, p. 130130, 2021.

DUBROVNA, O. V. *In vitro* selection of wheat for resistance to abiotic stress factors. **Fiziologija rastenij i genetika**, v. 49, n. 4, p. 279–292, 2017.

ESCALANTE, M.; VIGLIOCCO, A.; MOSCHEN, S.; FERNÁNDEZ, P.; HEINZ, R.; GARCIA-GARCIA, F.; DI RIENZO, J. A.; ANDRADE, A.; ALEMANO, S. Transcriptomic analysis reveals a differential gene expression profile between two sunflower inbred lines with different ability to tolerate water stress. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 38, n. 2, p. 222–237, 2020.

ESPINOSA-LEAL, C. A.; MORA-VÁSQUEZ, S.; PUENTE-GARZA, C. A.; ALVAREZ-SOSA, D. S.; GARCÍA-LARA, S. Recent advances on the use of abiotic stress (water, UV radiation, atmospheric gases, and temperature stress) for the enhanced production of secondary metabolites on *in vitro* plant tissue culture. **Plant Growth Regulation**, v. 97, n. 1, p. 1–20, 2022.

FAN, X.; XU, J.; LAVOIE, M.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; ZHU, Y.; LU, T.; FU, Z.; ZHU, T.; QIAN, H. Multiwall carbon nanotubes modulate paraquat toxicity in *Arabidopsis thaliana*. **Environmental Pollution**, v. 233, p. 633–641, 2018.

FANG, W. C.; KAO, C. H. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. **Plant Science**, v. 158, n. 1–2, p. 71–76, 2000.

GIANNOPOLITIS, C.; RIES, S. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309–314, 1977.

GOHARI, G.; SAFAI, F.; PANAHIRAD, S.; AKBARI, A.; RASOULI, F.; DADPOUR, M. R.; FOTOPOULOS, V. Modified multiwall carbon nanotubes display either phytotoxic or growth promoting and stress protecting activity in *Ocimum basilicum* L. in a concentration-dependent manner. **Chemosphere**, v. 249, p. 126171, 2020.

GURRIERI, L.; MERICO, M.; TROST, P.; FORLANI, G.; SPARLA, F. Impact of drought on soluble sugars and free proline content in selected *Arabidopsis* mutants. **Biology**, v. 9, n. 11, p. 367, 2020.

HAO, Y.; MA, C.; ZHANG, Z.; SONG, Y.; CAO, W.; GUO, J.; ZHOU, G.; RUI, Y.; LIU, L.; XING, B. Carbon nanomaterials alter plant physiology and soil bacterial community composition in a rice-soil-bacterial ecosystem. **Environmental Pollution**, v. 232, p. 123–136, 2018.

HATAMI, M. Toxicity assessment of multi-walled carbon nanotubes on *Cucurbita pepo* L. under well-watered and water-stressed conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 274–283, 2017.

HAVIR, E.; MCHALE, N. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450–455, 1987.

JABEEN, N.; AHMAD, R. The activity of antioxidant enzymes in response to salt stress in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings raised from seed treated with chitosan. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 7, p. 1699–1705, 2013.

JORDAN, J. T.; SINGH, K. P.; CAÑAS-CARRELL, J. E. Carbon-based nanomaterials elicit changes in physiology, gene expression, and epigenetics in exposed plants: A review. **Current Opinion in Environmental Science and Health**, v. 6, p. 29–35, 2018.

JOSHI, A.; SHARMA, L.; KAUR, S.; DHARAMVIR, K.; NAYYAR, H.; VERMA, G. Plant nanobionic effect of multi-walled carbon nanotubes on growth, anatomy, yield and grain composition of rice. **BioNanoScience**, v. 10, n. 2, p. 430–445, 2020.

KE, M.; YE, Y.; ZHANG, Z.; GILLINGS, M.; QU, Q.; XU, N.; XU, L.; LU, T.; WANG, J.; QIAN, H. Synergistic effects of glyphosate and multiwall carbon nanotubes on *Arabidopsis thaliana* physiology and metabolism. **Science of The Total Environment**, v. 769, p. 145156, 2021.

- KOSAR, F.; AKRAM, N. A.; ASHRAF, M.; AHMAD, A.; ALYEMENI, M. N.; AHMAD, P. Impact of exogenously applied trehalose on leaf biochemistry, achene yield and oil composition of sunflower under drought stress. **Physiologia Plantarum**, v. 172, n. 2, p. 317–333, 2021.
- LATEF, A. A. H. A.; AHMAD, P. Legumes and breeding under abiotic stress. *Em: AZOOZ, M.; AHMAD, P. Legumes under Environmental Stress: Yield, Improvement and Adaptations*. [s.l.] John Wiley & Sons, 2015. p. 1–20.
- LI, W.; ZHANG, H.; ZENG, Y.; XIANG, L.; LEI, Z.; HUANG, Q.; LI, T.; SHEN, F.; CHENG, Q. A salt tolerance evaluation method for sunflower (*Helianthus annuus* L.) at the seed germination stage. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.
- LI, Y.; LIU, M.; YANG, X.; ZHANG, Y.; HUI, H.; ZHANG, D.; SHU, J. Multi-walled carbon nanotubes enhanced the antioxidative system and alleviated salt stress in grape seedlings. **Scientia Horticulturae**, v. 293, p. 110698, 2022.
- LINÉ, C.; MANENT, F.; WOLINSKI, A.; FLAHAUT, E.; LARUE, C. Comparative study of response of four crop species exposed to carbon nanotube contamination in soil. **Chemosphere**, v. 274, p. 129854, 2021.
- LÓPEZ-HIDALGO, C.; MEIJÓN, M.; LAMELAS, L.; VALLEDOR, L. The rainbow protocol: A sequential method for quantifying pigments, sugars, free amino acids, phenolics, flavonoids and MDA from a small amount of sample. **Plant, Cell & Environment**, v. 44, n. 6, p. 1977–1986, 2021.
- MAHMOUD, L. M.; DUTT, M.; SHALAN, A. M.; EL-KADY, M. E.; EL-BORAY, M. S.; SHABANA, Y. M.; GROSSER, J. W. Silicon nanoparticles mitigate oxidative stress of *in vitro*-derived banana (*Musa acuminata* ‘Grand Nain’) under simulated water deficit or salinity stress. **South African Journal of Botany**, v. 132, p. 155–163, 2020.
- MAKGABUTLANE, B.; NTHUNYA, L. N.; MAUBANE-NKADIMENG, M. S.; MHLANGA, S. D. Green synthesis of carbon nanotubes to address the water-energy-food nexus: A critical review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 1, p. 104736, 2021.
- MALEKI, M.; GHORBANPOUR, M.; NIKABADI, S.; WANI, S. H. *In vitro* screening of crop plants for abiotic stress tolerance. *Em: WANI, S. Recent Approaches in Omics for Plant Resilience to Climate Change*. [s.l.] Springer, 2019. p. 75–91.
- MATHEW, S.; TIWARI, D. K.; TRIPATHI, D. Interaction of carbon nanotubes with plant system: a review. **Carbon Letters**, v. 31, n. 2, p. 167–176, 2021.
- MCGEHEE, D. L.; LAHIANI, M. H.; IRIN, F.; GREEN, M. J.; KHODAKOVSKAYA, M. V. Multiwalled carbon nanotubes dramatically affect the fruit metabolome of exposed tomato plants. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 38, p. 32430–32435, 2017.
- MENDIBURU, F. **agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research R package version 1.3-52021**. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>>.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MOHOR, G. S.; MENDIONDO, E. M. Economic indicators of hydrologic drought insurance under water demand and climate change scenarios in a Brazilian context. **Ecological Economics**, v. 140, p. 66–78, 2017.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 867–880, 1981.

- NEME, K.; NAFADY, A.; UDDIN, S.; TOLA, Y. B. Application of nanotechnology in agriculture, postharvest loss reduction and food processing: food security implication and challenges. **Heliyon**, v. 7, n. 12, p. e08539, 2021.
- OLOUMI, H.; MOUSAVI, E. A.; NEJAD, R. M. Multi-wall carbon nanotubes effects on plant seedlings growth and cadmium/lead uptake *in vitro*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 65, n. 2, p. 260–268, 2018.
- OZTURK, M.; TURKYILMAZ UNAL, B.; GARCÍA-CAPARRÓS, P.; KHURSHEED, A.; GUL, A.; HASANUZZAMAN, M. Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 172, n. 2, p. 1321–1335, 2021.
- PANDEY, K.; ANAS, M.; HICKS, V. K.; GREEN, M. J.; KHODAKOVSKAYA, M. V. Improvement of commercially valuable traits of industrial crops by application of carbon-based nanomaterials. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 19358, 2019.
- PANDEY, K.; LAHIANI, M. H.; HICKS, V. K.; KEITH HUDSON, M.; GREEN, M. J.; KHODAKOVSKAYA, M. Effects of carbon-based nanomaterials on seed germination, biomass accumulation and salt stress response of bioenergy crops. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, 2018.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, 2023.
- RAHMANI, N.; RADJABIAN, T.; SOLTANI, B. M. Impacts of foliar exposure to multi-walled carbon nanotubes on physiological and molecular traits of *Salvia verticillata* L., as a medicinal plant. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 150, p. 27–38, 2020.
- SAH, R. P.; CHAKRABORTY, M.; PRASAD, K.; PANDIT, M.; TUDU, V. K.; CHAKRAVARTY, M. K.; NARAYAN, S. C.; RANA, M.; MOHARANA, D. Impact of water deficit stress in maize: Phenology and yield components. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.
- SAUX, M.; PONNAIAH, M.; LANGLADE, N.; ZANCHETTA, C.; BALLIAU, T.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; BAILLY, C. A multiscale approach reveals regulatory players of water stress responses in seeds during germination. **Plant, Cell & Environment**, v. 43, n. 5, p. 1300–1313, 2020.
- SEDDIGHINIA, F. S.; IRANBAKHSH, A.; ORAGHI ARDEBILI, Z.; NEJAD SATARI, T.; SOLEIMANPOUR, S. Seed priming with cold plasma and multi-walled carbon nanotubes modified growth, tissue differentiation, anatomy, and yield in bitter melon (*Momordica charantia*). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 1, p. 87–98, 2019.
- TOSCANO, S.; ROMANO, D.; TRIBULATO, A.; PATANÈ, C. Effects of drought stress on seed germination of ornamental sunflowers. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 8, p. 1–12, 2017.
- USMAN, M.; FAROOQ, M.; WAKEEL, A.; NAWAZ, A.; CHEEMA, S. A.; REHMAN, H. ur; ASHRAF, I.; SANAUULLAH, M. Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. **Science of the Total Environment**, v. 721, p. 137778, 2020.
- VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, p. 59–66, 2000.
- YOUSEFI, A. R.; RASHIDI, S.; MORADI, P.; MASTINU, A. Germination and seedling growth responses of *Zygophyllum fabago*, *Salsola kali* L. and *Atriplex canescens* to PEG-induced drought Stress. **Environments**, v. 7, n. 12, p. 107, 2020.
- ZHAI, G.; GUTOWSKI, S. M.; WALTERS, K. S.; YAN, B.; SCHNOOR, J. L. Charge, size, and cellular selectivity for multiwall carbon nanotubes by maize and soybean. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 12, p. 7380–7390, 2015.

