



**VITOR OLIVEIRA RODRIGUES**

**TRATAMENTO SANITÁRIO DE SEMENTES DE ALGODÃO,  
SOJA E PIMENTÃO COM O GÁS OZÔNIO**

**LAVRAS - MG  
2018**

**VITOR OLIVEIRA RODRIUES**

**TRATAMENTO SANITÁRIO DE SEMENTES DE ALGODÃO, SOJA E PIMENTÃO  
COM O GÁS OZÔNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. João Almir Oliveira  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2018**

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

Rodrigues, Vitor Oliveira.

Tratamento de sanitário de sementes de algodão, soja e pimentão com o gás ozônio / Vitor Oliveira Rodrigues. - 2018.  
103 p. : il.

Orientador(a): João Almir Oliveira.

.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.  
Bibliografia.

1. Sanidade. 2. Qualidade de sementes. 3. Vigor. I. Oliveira, João Almir. . II. Título.

**VITOR OLIVEIRA RODRIGUES**

**TRATAMENTO SANITÁRIO DE SEMENTES DE ALGODÃO, SOJA E PIMENTÃO  
COM O GÁS OZONIO**

**SANITARY TREATMENT OF COTTON SEED, SOY AND CHILI PEPPER WITH  
OZONE GAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 11 de maio de 2018

Dr. Wilfredo Milquiades Irrazabal Urruchi	IBO <sub>3</sub> A
Dr. José da Cruz Machado	UFLA
Dr. Renato Mendes Guimarães	UFLA
Dr. Everson Reis Carvalho	UFU

Dr. João Almir Oliveira  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2018**

*Aos meus pais Maria Iraci e Simeão Jr., pelo carinho e apoio.*

*A minhas irmãs Amanda e Livia, pela força e incentivo.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser minha força e proteção, e por estar sempre à frente das minhas conquistas.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Dr. João Almir Oliveira, pelos ensinamentos profissionais e pessoais, pelos conselhos, por estar sempre disposto a ajudar, além de nos motivar a correr atrás dos nossos sonhos. Sou imensamente grato a você.

Aos professores e pesquisadores do Setor de Sementes, Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho, Dr. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, Dr. Renato Mendes Guimarães, Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, pela boa vontade em ensinar e colaboração diária.

À Marli, secretária da pós-graduação da Fitotecnia, pela atenção e colaboração.

Aos bolsistas de iniciação científica Debora, Levi, Amanda e Elias pela presença constante e ajuda fundamental durante a realização do trabalho.

Aos orientados do professor João Almir pela amizade e colaboração na condução dos trabalhos.

Ao Dr. Wilfredo, sua família e todos os funcionários da empresa Ozone & Life por me receberem de braços abertos, me auxiliarem sempre que necessário, além de proporcionar a possibilidade de execução desta pesquisa.

Aos colegas do Setor de Sementes pela amizade e companheirismo.

Aos funcionários do Setor de sementes, pela amizade conquistada durante os anos.

Ao Núcleo de estudos em sementes – NESem, por acrescentar na minha formação acadêmica e pessoal.

Ao Laboratório de Patologia de sementes, seus funcionários e estudantes por todo auxílio, principalmente a Iara que me ajudou durante todo o experimento.

Aos meus pais, Simeão e Maria Iraci, pelo dom da vida e amor incondicional, além de não medirem esforços para a realização deste sonho.

Às minhas irmãs Amanda e Livia, por estarem sempre presentes em minha vida.

Aos meus amigos Ariadne e Diego por toda ajuda.

Aos Amigos Raquel, Mayara, Maria Alice, Dennis, Diego, Ariadne, Joana, Marcela, Noêmia e Corguinha que fizeram dessa caminhada mais alegre e divertida, além da convivência diária, conhecimentos trocados, angústias divididas e pela imensa amizade e carinho que fizeram essa caminhada até aqui mais fácil. Agradeço a Deus por ter colocado vocês na minha vida!

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

Muito obrigado.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.*

*(José de Alencar)*

## RESUMO

A semente é um dos principais insumos na implantação de uma lavoura, mas também pode se tornar um dos principais meios de introdução e disseminação de agentes fitopatogênicos, principalmente a longas distâncias. Os patógenos podem ser introduzidos em áreas isentas de doença ou aumentar o inóculo em áreas que já possuem o patógeno, por meio do plantio consecutivo de sementes infectadas. A busca por produtos que sejam eficientes e com menor fitotoxidez para serem utilizados no tratamento de sementes, é uma medida importante principalmente no sistema de produção orgânica. Neste contexto, teve-se como objetivo neste trabalho avaliar a eficiência do gás ozônio no controle de fungos em sementes de algodão, soja e pimentão, além da sua influência na qualidade fisiológica. Para tanto, a tese foi dividida em 4 capítulos com sementes de algodão, soja e pimentão. As sementes de algodão foram inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e submetidas ao ozônio na concentração de 25 g m<sup>-3</sup> pelos períodos de tempo de 0, 20, 40, 60 e 120 minutos; as duas cultivares de soja foram submetidas ao tratamento com o gás ozônio nas concentrações de 15 e 25 g m<sup>-3</sup> pelos períodos de tempo de 0, 20, 40, 60 e 120 minutos; já o lote de sementes de pimentão foi submetido ao tratamento com ozônio na concentração 10 e 15 g m<sup>-3</sup> nos períodos de 0, 20, 40, 60, 80 e 120 minutos. Após o tratamento das sementes com o ozônio os seguintes testes foram efetuados em todas as culturas: testes de sanidade, primeira contagem de germinação, porcentagem de germinação, emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência (IVE), estande inicial, condutividade elétrica, envelhecimento acelerado e teste de tetrazólio. Foi avaliado também a atividade de enzimas relacionadas a respiração e a deterioração de sementes. O tratamento de sementes de algodão na concentração 25 g m<sup>-3</sup> por 40 minutos foi eficiente no controle dos patógenos *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Aspergillus* e *Fusarium* e aos 60 minutos controlou o fungo *Penicillium* sem afetar a qualidade fisiológica e bioquímica das sementes. Para a cultura da soja, o tratamento sanitário com gás ozônio na concentração de 15g m<sup>-3</sup> por 20 minutos reduz a incidência dos fungos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Phomopsis* e não afeta a qualidade fisiológica e bioquímica das sementes. O gás ozônio nas concentrações 10 e 15 mg L<sup>-1</sup> a partir de 20 minutos foi eficiente no controle dos fungos *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp em sementes de pimentão

**Palavras-chave:** O<sub>3</sub>, sanidade, qualidade de sementes, vigor, *Gossypium L.*, *Glycine max*, *Capsicum annuum*

## ABSTRACT

Seed is one of the most important inputs in the implantation of a crop, but also can become one of the main ways of introduction and dissemination of phytopathogenic agents, mainly at long distances. Pathogens can be introduced into disease-free areas or increase the inoculum in areas that already have the pathogen through consecutive planting of infected seeds. The search for products that are more efficient and less phytotoxic to be used in seeds treatment it is an extremely important measure, especially in the organic production system. In this context, the aim in this work was to evaluate the efficiency of ozone gas in the control of fungi in cotton, soybean and pepper seeds, beyond evaluate the efficiency of their use in the physiological quality of seeds. Therefore, the thesis was divided in four chapters with cotton, soybean and pepper seeds. For this, the cotton seeds were inoculated with *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioids* and submitted to the ozone in the concentrations of 25 g m<sup>-3</sup> in periods of 0, 20, 40, 60 and 120 minutes; the two soybean cultivars were treated with ozone gas in concentrations of 15 and 25 g m<sup>-3</sup> in periods of 0, 20, 40, 60 and 120 minutes and the lot of pepper seeds was submitted to the treatment with ozone in the concentration of 10 e 15 g m<sup>-3</sup> in periods of 0, 20, 40, 60, 80 and 120 minutes. After the treatment of seeds with ozone, the following tests were done in all crops: sanity test, first count of germination, percentage of germination, seedling emergence, emergence speed index (ESI), initial stand, electric conductivity, accelerated aging test and tetrazolium test. Was also evaluated the activities of enzymes related to respiration and seeds deterioration. The treatment of cotton seeds in concentration of 25 g m<sup>-3</sup> for 40 minutes was efficient in the control of pathogens *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Aspegillus* and *Fusarium* and at 60 minutes controlled the fungi *Penicillium* and did not affect the physiological and biochemical quality of seeds. For soybean, the sanitary treatment in the concentration of 15g m<sup>-3</sup> for 20 minutes reduce the incidence of *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Phomopsis* fungis and did not affect the physiological and biochemical quality of seeds. The ozone gas in the concentrations of 10 and 15mg L<sup>-1</sup> from 20 minutes was efficient in the fungi control of *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp in pepper seeds.

**Key-words:** O<sub>3</sub>, sanity, seeds quality, vigor, *Gossypium L.*, *Glycine max*, *Capsicum annum*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Incidência (%) de <i>Aspergillus</i> em diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos). .....	49
Figura 2.2 - Incidência (%) de <i>Fusarium</i> em diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos).(Continua).....	49
Figura 2.3 - Incidência (%) de <i>Penicillium</i> em diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos). .....	50
Figura 2.4 - Incidência (%) de <i>Colletotrichum</i> em diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos).....	51
Figura 2.5 - Primeira contagem de germinação de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos).....	52
Figura 2.6 - Porcentagem de germinação de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos). .....	53
Figura 2.7 - Condutividade elétrica de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos) .....	54
Figura 2.8 - Porcentagem de germinação após envelhecimento acelerado de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos). .....	55
Figura 2.9 - Estande inicial de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos) .....	56
Figura 2.10 - Porcentagem de emergência de plântulas de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos) (Continua).....	56
Figura 2.11 - Índice de velocidade de emergência de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos).....	57
Figura 2.12- Porcentagem de sementes viáveis de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos).....	58
Figura 2.13 - Perfis enzimáticos de Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Malato desidrogenase (MDH) e Álcool desidrogenase (ADH) extraídas de sementes de algodão, submetidas a diferentes tempos de ozonização (minutos). .....	59
Figura 3.1 - Incidência de fungos presentes em sementes de soja, da cultivar 1, sem tratamento e tratadas com gás ozônio em duas concentrações.....	70

Figura 3.2 - Incidência de fungos presentes em sementes de soja, da cultivar 2, sem tratamento e tratadas com gás ozônio em duas concentrações.....	71
Figura 3.3 - Porcentagem de viabilidade de sementes de soja pelo teste de tetrazólio de duas cultivares (Cultivar 1 - A e Cultivar 2 - B) tratadas com gás ozônio em duas concentrações .....	73
Figura 3.4 - Valores de primeira contagem (A) e porcentagem de germinação de sementes (C) da da cultivar 1 e de primeira contagem (B) e porcentagem de germinação de sementes (D) da cultivar 2 de soja tratadas com gás ozônio em duas concentrações. (Continua).....	73
Figura 3.5 - Condutividade elétrica (A, B) e germinação após envelhecimento acelerado (C, D) de sementes de soja de duas cultivares (cultivar 1 A, C e Cultivar 2 B, D) tratadas com gás ozônio em duas concentrações (Continua).....	74
Figura 3.6 - Estande inicial, porcentagem e índice de velocidade de emergência de plântulas de sementes de soja de duas cultivares (Cultivar 1 - A, C e E; Cultivar 2 - B, D e F) tratadas com gás ozônio em duas concentrações. ....	76
Figura 3.7 - Perfis enzimáticos de Superóxido dismutase (A), Catalase (B), Malato desidrogenase (C), Peroxidase (D) e Isocitrato liase extraídas de sementes de soja, da cultivar 1, tratadas com gás ozônio em duas concentrações .....	77
Figura 3.8 - Perfis enzimáticos de Superóxido dismutase (A), Catalase (B), Malato desidrogenase (C), Peroxidase (D) e Isocitrato liase extraídas de sementes de soja, da cultivar 2, tratadas com gás ozônio em duas concentrações .....	78
Figura 4.1 - Câmara de ozonização com seus cortes e fluxo interno de ozônio.....	86
Figura 4.2 - Primeira contagem de germinação (%) (curva de tendência) de sementes de pimentão em função dos tempos (minutos) de ozonização nas duas concentrações (mg L <sup>-1</sup> ).....	91
Figura 4.3 - Condutividade elétrica (curva de tendência) de sementes de pimentão em função dos tempos (minutos) de ozonização nas duas concentrações (mg L <sup>-1</sup> )..	92
Figura 4.4 - Incidência média (%) do fungo <i>Alternaria</i> sp. em sementes de pimentão em função dos tempos (minuto) de ozonização .....	93
Figura 4.5 - Incidência média (%) do fungo <i>Penicillium</i> sp. em sementes de pimentão em função dos tempos (minutos) de ozonização.....	94
Figura 4.6 - Incidência média (%) do fungo <i>Aspergillus</i> sp. em sementes de pimentão em função dos tempos (minutos) de ozonização.....	95

Figura 4.7 - Incidência média (%) do fungo <i>Fusarium</i> sp. em sementes de pimentão em função dos tempos (minutos) de ozonização.....	97
Figura 4.8- Incidência média (%) do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. em sementes de pimentão em função dos tempos (minutos) de ozonização.....	98
Figura 4.9 - Perfis enzimáticos de Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Malato desidrogenase (MDH) e Álcool desidrogenase (ADH) extraídas de sementes de pimentão, tratadas com gás ozônio em duas concentrações e Captan® (Q)..	99

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Quadrados médios, Coeficientes de variação (CV) e significância, relativos ao índice de velocidade de emergência (IVE), emergência (Emer), germinação (Germ), primeira contagem da germinação (Prim C), condutividade elétrica (Cond. E) e tetrazólio (TZ) de sementes de pimentão submetidas a tratamento com ozônio nos diferentes tempos e concentrações. ....	90
Tabela 4.2 - Resultados em porcentagem (%) de plântulas normais na primeira contagem da germinação obtidos de sementes de pimentão nos diferentes tempos (minutos) de exposição e concentrações (mg L <sup>-1</sup> ) de ozônio. ....	90
Tabela 4.3 - Porcentagem média de incidência de <i>Alternaria</i> sp. em sementes de pimentão submetidas a tratamento em diferentes tempos e concentrações de ozônio e fungicida químico (controle).....	93
Tabela 4.4 - Porcentagem média de incidência de <i>Penicillium</i> sp. em sementes de pimentão submetidas a tratamento em diferentes tempos e concentrações de ozônio e fungicida químico (controle).....	94
Tabela 4.5 - Porcentagem média de incidência de <i>Aspergillus</i> sp. em sementes de pimentão submetidas a tratamento em diferentes tempos e concentrações de ozônio e fungicida químico (controle).....	95
Tabela 4.6 - Porcentagem média de incidência de <i>Fusarium</i> sp. em sementes de pimentão submetidas a tratamento em diferentes tempos e concentrações de ozônio e fungicida químico (controle).....	96
Tabela 4.7 - Porcentagem média de incidência de <i>Colletotrichum</i> sp. em sementes de pimentão submetidas a tratamento em diferentes tempos e concentrações de ozônio e fungicida químico (controle).....	97

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
1	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
2.1	A cultura do algodão .....	17
2.2	A cultura da soja.....	18
2.3	A cultura do pimentão .....	20
2.4	Qualidade de sementes.....	22
2.5	Tratamento de sementes no controle de patógenos.....	25
2.5.1	Tratamento biológico .....	26
2.5.2	Tratamento químico.....	28
2.5.3	Ozônio.....	29
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>33</b>
	<b>CAPÍTULO 2 TRATAMENTO DE SEMENTES DE ALGODÃO INOCULADAS COM COLLETOTRICHUM GOSSYPH VAR. CEPHALOSPORIOIDES UTILIZANDO O GÁS OZÔNIO .....</b>	<b>42</b>
1	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>44</b>
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
4	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>
	<b>CAPÍTULO 3 TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA COM GÁS OZÔNIO .....</b>	<b>64</b>
1	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>66</b>
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
4	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>79</b>
	<b>CAPÍTULO 4 USO DO OZÔNIO NO TRATAMENTO SANITÁRIO E SEU EFEITO NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DAS SEMENTES DE PIMENTÃO .....</b>	<b>82</b>
1	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>84</b>
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>85</b>
2.1	Ozonização das sementes .....	85
2.2	Avaliação da qualidade fisiológica das sementes submetidas a ozonização.....	87
2.3	Delineamento estatístico.....	88
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>
4	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>100</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>101</b>

## CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1 INTRODUÇÃO

A cultura do algodão tem sido cultivada, em todo o mundo, em mais de 30 milhões de hectares por ano e mais de 60 países distribuídos em todos os continentes, o que movimenta mais de 17 bilhões de dólares ao ano. Mundialmente na indústria algodoeira são envolvidos mais de 350 milhões de pessoas, que tiram seu sustento exercendo inúmeras atividades dentro do processo produtivo que vai desde o plantio até a colheita. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de fibra e sua produção está concentrada na região do cerrado, que corresponde a mais de 90% da produção total do país, e tem o estado do Mato Grosso como maior produtor. A cultura do algodoeiro tornou-se nos últimos anos umas das principais commodities brasileiras.

A soja é uma das seis principais commodities do Brasil e de acordo com estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) em 2018 haverá uma nova supersafra, já que a área de produção cresceu cerca de 2,5% chegando a 34,8 milhões de hectares cultivados. O Brasil é o segundo maior produtor mundial, perdendo apenas para os EUA, de toda a produção nacional cerca de 57,34% são destinados à exportação.

Já o pimentão está entre as dez hortaliças mais importantes no mercado nacional e sua produção está próxima de 290 mil toneladas de frutos em uma área de 13 mil hectares. O cultivo do pimentão se estende por todo o território brasileiro, mas os estados de São Paulo e Minas Gerais são os principais produtores. Juntos estes dois estados da região Sudeste são responsáveis por mais de 40% da produção no Brasil. Apenas o mercado interno de sementes de pimentão movimenta mais de 1,5 milhões de dólares ao ano.

A semente, como organismo vivo, é seguramente o insumo de maior importância para o setor agrícola, pois, direta ou indiretamente, é o insumo que incorpora grande parte dos avanços tecnológicos que veem sendo desenvolvidos ao longo de décadas de pesquisas. Como vetor de transferência de tecnologia a semente leva consigo características de suma importância para qualquer cultura como adaptabilidade a diferentes tipos de solo, clima e regiões, além da capacidade produtiva e resistência a inúmeras pragas e doenças. O somatório desses fatores é fundamental para o sucesso de qualquer empreendimento agrícola. Fazendo se necessário à utilização de sementes de alta qualidade física, fisiológica, genética e sanitária, uma vez que a utilização de sementes de baixa qualidade afeta diretamente a qualidade do produto final, além de poder afetar diretamente os custos de produção aplicados à lavoura.

A maioria das doenças conhecidas pode ter seus agentes etiológicos transmitidos de maneira eficaz pelas sementes de seus hospedeiros. Os danos relacionados à associação de patógenos com sementes não se limitam apenas a perda da população de plantas no campo, mas podem ocasionar perdas em todo o sistema agrícola. A semente é considerada um dos meios mais eficientes de introdução e disseminação de agentes fitopatogênicos, principalmente a longas distâncias. Através dela, os patógenos podem ser introduzidos em áreas isentas de doença, bem como ter seu inóculo aumentado, em áreas já contaminadas, através do plantio consecutivo de sementes infectadas.

É impressionante como que mesmo com o todo o avanço da agricultura ainda se ignore que a semente é o insumo mais importante para o manejo integrado de doenças e para o estabelecimento de uma agricultura sustentável. Portanto o uso de sementes de má qualidade sanitária pode ser considerado um dos maiores responsáveis por perdas intoleráveis na produção agrícola.

Um produto que vem ganhando destaque como sanitizante de diversos produtos agrícolas, é o ozônio. Por se tratar de um produto efetivo na destruição de estruturas fungicas, virais e bacterianas, e por não deixar resíduos nos produtos e nem no ambiente onde é utilizado, tendo sido considerado como potencial de utilização, também, no tratamento de sementes. Portanto o objetivo neste trabalho foi avaliar a eficiência do gás ozônio no controle de fungos em sementes de algodão, soja e pimentão bem como sua influência na qualidade fisiológica e alterações bioquímica.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A cultura do algodão

O algodão pertence ao gênero *Gossypium*, família Malvaceae, e é uma das culturas mais antigas no mundo, tanto as espécies cultivadas quanto as selvagens. São conhecidas mais de 50 espécies deste gênero, sendo cultivadas principalmente, *Gossypium arboreum*, *G. herbaceum*, *G. barbadense* e *G. hirsutum*, este último de principal destaque por ser a espécie cultivada no Brasil (BELTRÃO; AZEVEDO, 2008).

O algodão é uma planta dicotiledônea hirsuta ou glabra, anual ou perene, herbácea, arbustiva ou arbórea. As plantas do gênero *Gossypium* apresentam porte subarbusivo e de crescimento indeterminado. Tem número variável de cápsulas (capulhos), com três a cinco lóculos e 30 a 40 sementes por capulho. Apresenta em geral nectários na face inferior das folhas e na base das flores. Suas sementes são cobertas por dois tipos de células diferenciadas que constituem as fibras longas e fiáveis, as quais proporcionam à cultura grande valor comercial, e as fibras curtas chamadas também de línter (PENA, 1982).

No algodoeiro, o meristema apical origina quatro órgãos: folha, caule, raízes e flores. É propagada principalmente por meio de sementes, que são cobertas com línter, constituídas de fibras pequenas (de 8% a 12% do peso da semente). As sementes apresentam, em média teores de óleo e proteína de 30 – 35% e de 40 – 50%, respectivamente (BELTRÃO; SOUZA, 1999).

Por seus diversos usos a cultura do algodão tem uma grande importância mundial, sua fibra têxtil é muito utilizada pelo homem e se caracteriza por ser celulose na forma praticamente pura. Sua semente é rica em óleo e o bagaço pode ser utilizado para a alimentação animal (CARVALHO, 1996). A cadeia produtiva do algodoeiro abrange vários setores, fornecendo empregos desde o campo até a indústria têxtil (EMBRAPA, 2003).

Os maiores produtores da cultura são Índia, China e USA, o Brasil aparece na quinta colocação do ranking, porém na produção em sequeiro ocupa a primeira colocação. Em todo planeta sessenta e três países produzem algodão totalizando uma área aproximadamente de três milhões de hectares, nosso país ocupa a sexta colocação com 92510,00 hectares atrás ainda de Paquistão e Uzbequistão. (ABRAPA, 2017).

Uma lavoura de algodão bem estabelecida, com a população de plantas uniformemente distribuída e adequada, é o primeiro passo para obter-se sucesso na produção. A obtenção de

uma população de plantas adequada, por sua vez, está intimamente ligada à utilização de sementes de alta qualidade. A não obtenção de um bom estande pode ser resultado da presença de microrganismos e pragas, bem como a utilização de sementes de baixa qualidade (FREIRE, 2015).

Embora o algodão seja considerado uma cultura tolerante à seca o plantio de sementes em condições adversas e somado à associação de organismos patogênicos podem inviabilizar a cultura (MENESES et al., 2006, ROSENOW et al., 1983).

A obtenção de sementes de algodoeiro com qualidade sanitária aceitável requer o conhecimento a respeito da disseminação e transmissão dos patógenos que a ela podem se associar, da propagação das doenças, dos padrões de sanidade e dos procedimentos para a produção de sementes sadias (LIMA; ARAÚJO; CARVALHO; 1998).

A cultura do algodão é atacada por um grande número de fungos transmitidos via sementes que podem causar doenças de importância econômica, causando grandes prejuízos a cultura. O fungo *Colletotrichum gossypii*, agente causal da ramulose, é um dos mais importantes patógenos para esta cultura. Sua importância reside no fato que além de causar tombamento em pré e pós emergência, lesões deprimidas no colo e folhas pode causar nanismo e super brotamento, comprometendo a frutificação e produção das plantas atacadas (BARROCAS et al, 2014), podendo causar perdas de até 85% na produção (SUASSUNA; COUTINHO, 2011)

A ramulose pode manifestar-se em plantas de qualquer idade, desenvolvendo-se de preferência nos tecidos jovens. Os sintomas diretos aparecem primeiramente nas folhas novas, tanto na haste principal como nas laterais, na forma de manchas necróticas (PAIVA; ASMUS; ARAÚJO, 2001).

O uso de sementes com elevada qualidade fisiológica e sanitária, ou dentro dos padrões de tolerância estabelecidos para as principais doenças, está entre as estratégias mais eficazes para diminuir a disseminação de patógenos, bem como o uso do tratamento de sementes. A comercialização de sementes não certificadas e/ou não recomendadas de uma região ou de um estado para outro tem sido, também, um dos fatores responsáveis pela disseminação de patógenos nessa cultura (PARISI; PATRÍCIO; OLIVEIRA, 2006).

## **2.2 A cultura da soja**

A soja (*Glycine max* (L) Merrill) é originária da China, entre a região setentrional e central. A mais antiga referência na literatura está no herbário Pents'ao Kong Mu, do

imperador Shen Nung, por volta de 2.300 a.C. (FERREIRA et al., 1981). Plantas de soja que hoje cultivamos são muito diferentes dos seus ancestrais, pois eram plantas rasteiras que se desenvolviam na costa leste da Ásia, principalmente ao longo do rio Yangtze, na China. Sua evolução começou com o aparecimento de plantas oriundas de cruzamentos naturais entre duas espécies de soja selvagem que foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China (EMBRAPA, 2004).

O ciclo total pode ser dividido em fase vegetativa, que é o período da emergência da plântula até a abertura das primeiras flores, e a fase reprodutiva, denominada como o período do início da floração até a maturidade, com duração média de 75 a 200 dias, influenciada pelas condições ambientais da região e do cultivar utilizada (MÜLLER, 1981; NEUMAIER et al., 2000; BORÉM, 2009). A fase vegetativa inicia-se com a emergência das plântulas. A partir daí, com a abertura dos cotilédones inicia-se a contagem dos nós, sendo que V1 representa o primeiro nó com folhas unifolioladas abertas, V2, segundo nó com primeiro trifólio aberto, V3, terceiro nó com segundo trifólio aberto e assim sucessivamente até Vn com o último nó com trifólio aberto, antes da floração (FERREIRA, 2014).

No mundo são produzidos mais de 351 milhões de toneladas de soja, deste montante o Brasil é responsável por aproximadamente 114 milhões de toneladas o que o coloca como segundo maior produtor de soja no mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. Já no Brasil os rankings dos três estados de maior produção destacam-se o Mato Grosso com aproximadamente 30,5 milhões de toneladas, seguido pelo estado do Paraná com produção de 19,5 milhões de toneladas e finalmente o Rio Grande do Sul com 18,7 milhões de toneladas. De toda a soja produzida no Brasil 47,02 milhões de toneladas são destinadas ao consumo interno e o restante é destinado à exportação que, somando os produtos exportados (soja grão, farelo e óleo), somam um total de 25,4 bilhões de dólares. Estes valores são referentes à safra 2016/17 (EMBRAPA, 2017).

O uso de sementes com elevada qualidade fisiológica e sanitária, estão entre as estratégias mais eficazes para diminuir a disseminação de patógenos, os quais quando presentes são traduzidos pelo decréscimo na porcentagem de germinação, diminuição de estande, aumento de plântulas anormais, redução do vigor das plântulas e, conseqüentemente, queda no rendimento (BOTELHO et al., 2013; TOLEDO et al., 2009).

A semente é um dos principais meios de introdução e disseminação de agentes fitopatogênicos, principalmente a longas distâncias. Os patógenos podem ser introduzidos em áreas isentas de doença ou aumentar o inóculo em áreas que já possuem o patógeno, através do plantio consecutivo de sementes infestadas (SARTORI; REIS; CASA, 2004; VECHIATO,

et al. 1997). A infestação da semente por patógenos, pode ser aumentada ainda no campo, se nas fases de maturação e colheita da soja ocorrer alta umidade relativa associado a altas temperaturas (JUHÁSZ et al., 2013)

Para a cultura da soja, mais de 135 patógenos já foram descritos e considera-se que mais de 30 espécies podem causar danos econômicos significativos (ROY; BAIRD; ABNEY, 2000). Os mais nocivos são os fungos e nematoides, seguidos pelas bactérias, vírus e fitoplasmas (VIDIC et al., 2013). As doenças estão entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja. A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. As perdas anuais de produção em decorrência do ataque de fitopatógenos são estimadas em cerca de 15% a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% (EMBRAPA, 2013).

Os fungos mais importantes para a cultura da soja e que são transmitidos por sementes, são: *Colletotrichum truncatum*, agente causador da antracnose, *Phomopsis* spp, que causa a doença de seca-da haste e da vagem, *Fusarium* spp, responsável pela seca da vagem, *Cercospora kikuchii*, causador da mancha púrpura em sementes e crestamento foliar, *Cercospora sojina*, agente da doença mancha olho-de-rã, *Aspergillus* spp, que causa diversos danos durante o armazenamento de sementes, *Mycosphaerella uspenskajae*, causador da mancha parda ou septoriose, *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco, *Peronospora manshurica*, causador do míldio. (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

### 2.3 A cultura do pimentão

O pimentão (*Capsicum annuum*), pertence à família Solanaceae e ao gênero *Capsicum* sp. (BENTO et al., 2013; MO et al., 2015). Tem como centro de origem o México, (KRAFT et al., 2014), sendo representado por cerca de 31 espécies, das quais apenas cinco são domesticadas: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. pubescens* (DI DATO et al., 2015).

A cultura do pimentão está entre as 10 principais hortaliças do mercado brasileiro, com área cultivada anualmente em torno de 12 mil hectares (MOURA et al., 2012), é um vegetal de grande importância econômica e social no Brasil, e por seu cultivo poder ser realizado em diferentes condições edafoclimáticas, está sujeito a vários problemas de ordem fitossanitária, especialmente doenças fúngicas, que comprometem a produtividade e qualidade do produto (EMBRAPA, 2015). Seus frutos são consumidos em maior número verdes,

imaturos (70%) e maduros, vermelho ou amarelo (dependendo da cultivar), em menor escala (30%) (SEDIYAMA; VIDIGAL; JACOB, 2014). Tem produção próxima a 290 mil toneladas de fruto por ano no Brasil, sendo os principais estados produtores Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro. (MAROUELLI; SILVA, 2012)

De acordo com Nogueira (2010), tem sido observado um aumento significativo na produção de pimentão. Esse aumento pode ser comprovado com os dados do Central de Abastecimento de Minas Gerias (CEASAMINAS), que de 2013 para 2016 houve acréscimo de 3,65% na quantidade comercializada, no estado (CEASAMINAS, 2013; CEASAMINAS, 2016).

A planta pode atingir de 50-80 cm de altura e apresentar característica arbustiva, regularmente cultivada como planta anual, predominantemente autógama, no entanto, a presença de insetos polinizadores pode elevar a taxa de cruzamento (FILGUEIRA, 2003). Ainda segundo Filgueira (2003), a planta em condições de temperaturas relativamente elevadas apresenta melhor desenvolvimento e maior produtividade. As diferentes condições de manejo têm grande influência no ciclo da cultura, o florescimento, normalmente, tem seu início em torno de 60 dias após a sementeira, a partir de 30 a 40 dias os frutos, verdes, podem ser colhidos. Por sua vez, a colheita dos frutos maduros inicia-se por entre 120 a 150 dias após a sementeira.

Esta cultura é propagada via sementes, que pode ser usada tanto no plantio direto quanto na produção de mudas, por isso é de fundamental importância o controle de qualidade das sementes uma vez que os olericultores estão cada vez mais exigentes quanto a qualidade das sementes adquiridas (KIKUTI et al., 2005). A qualidade das sementes pode influenciar na produção de mudas e nos estádios subsequentes das plantas no campo. Mudas com crescimento desuniforme e/ou debilitadas poderão originar plantas com ciclo mais longo, gerando desuniformidade na maturação dos frutos (KIKUTI; MARCOS FILHO, 2007). Portanto a utilização de sementes de alta qualidade física fisiológica e sanitária é um dos aspectos mais importantes para se alcançar o sucesso da lavoura.

As sementes apresentam aspecto reniforme, coloração amarelo-acinzentada e cerca de 3 a 5 mm de diâmetro. Seu embrião é localizado internamente sob forma de espiral. Além disso apresentam endosperma bem definido e não amiláceo. (GROOT; KARSSSEN, 1987; WATKIS et al., 1985).

Para as culturas do pimentão, berinjela, jiló e demais solanáceas, dentre os patógenos que podem se associar as suas sementes e afetar a qualidade sanitária destas, destacam-se a *Alternaria solani*, *Sclerotinia sclerotium*, *Verticillium* sp., *Colletotrichum capsici*, *Fusarium*

sp., *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Verticillium* sp., *Xantomonas vesicatoria*, Tabacco mosaic vírus (TMV), Tomato mosaic vírus (ToMV), Pepper mild mottle tobamovirus (PMMoV –PMMV) (BRUNES, 2013).

Nessa circunstância, é de significativa importância a sanidade de sementes, uma vez que determinados microrganismos, transmitidos por elas, podem contribuir-se em fator altamente negativo no estabelecimento inicial de um cultivo, além de danos das plantas durante as fases vegetativas/reprodutivas e, conseqüente redução da produção (SINCVAIN; NEERGRAAD citado por CHAGAS, 2014).

#### 2.4 Qualidade de sementes

Quando se objetiva alta produtividade, é essencial, dentre as técnicas de cultivo usuais, a utilização de sementes de elevada qualidade (EMBRAPA, 2000). Sendo esta, a soma de diversos atributos que contribuem para obtenção de plântulas de maior vigor, que apresentam rápida emergência no campo, além de proporcionar florescimento e crescimento mais uniforme das plantas, viabilizando garantia de produção em termos quantitativos e qualitativos (BRACCINI et al., 2003).

Os atributos que afetam a qualidade são de ordem genética, física, fisiológica e sanitária. A pureza genética é o fator que confere a certeza que somente características selecionadas pelo melhorista irão estar presentes no lote de sementes e com isso originar um produto com qualidade e quantidade esperadas. A qualidade física envolve a pureza e o estado físico da semente. Sendo a pureza física descrita pela proporção de componentes físicos presentes no lote de sementes, dentre eles as substâncias inertes, outras espécies de sementes cultivadas, sementes silvestres, e o estado físico também envolve o teor de água, cor, tamanho, densidade, aparência externa, injúrias mecânicas e causadas por insetos. A qualidade sanitária das sementes está relacionada à presença e o índice de ocorrência de fungos, bactérias, vírus, nematoides, e insetos que podem provocar danos ou doenças diretamente às sementes, ou que uma vez transmitidos por ela, venham a causar doenças e redução na qualidade e produtividade das lavouras. A qualidade fisiológica está ligada aos fatores fisiológicos das sementes que interferem diretamente na expressão do seu potencial, caracterizados pela sua germinação, seu vigor e sua longevidade (POPINIGS, 1985; PESKE; VILLELA; MENEGHELO, 2012).

As sementes estão sujeitas à perda de qualidade, desde a maturidade fisiológica até o momento de sua utilização na semeadura, devido às variações químicas e fisiológicas. Muitas

vezes essa deterioração manifesta-se no decorrer do tempo, tendo difícil diagnóstico na fase inicial, ocasionando reflexos negativos no vigor (GARCIA et al., 2004). A perda da qualidade das sementes e a velocidade com que isso ocorre após a maturidade fisiológica varia em função da espécie, da cultivar e das condições em que as sementes se encontram no campo, após a colheita e durante as operações de beneficiamento e armazenamento (MORAES, 2000).

As informações fornecidas pelos testes fisiológicos de sementes podem ajudar na tomada de decisões, tais como, em qual região do país o determinado lote terá melhor desempenho, se o lote deverá ser descartado ou ainda se determinado lote pode ser armazenado, entre outras (MCDONALD et al., 2003).

O teste de germinação é utilizado em laboratórios para avaliar o potencial fisiológico das sementes, sendo conduzido em condições favoráveis de temperatura, umidade e luminosidade, o que permite ao lote expressar o potencial máximo de produzir plântulas normais (BRASIL, 2009). Segundo Coimbra et al. (2009), o teste de germinação é, isoladamente, pouco eficiente em detectar diferenças na qualidade fisiológica entre lotes de sementes. Por esta razão, têm sido aplicados testes de vigor com o objetivo de identificar possíveis diferenças no potencial fisiológico de lotes que apresentam porcentagem de germinação semelhante, fornecendo informações complementares às obtidas no teste de germinação (CASTRO, 2011).

Vários testes têm sido recomendados para a avaliação do vigor de sementes, destacando-se os de envelhecimento acelerado, tetrazólio, condutividade elétrica, crescimento de plântulas, classificação do vigor de plântulas (VIEIRA; BITTENCOURT; PANOBIANCO, 2003).

Uma das alternativas para o estudo da qualidade das sementes é a análise de grupos de isoenzimas, pois, permite identificar os pontos iniciais em que ocorrem os danos, bem como fornecer informações seguras sobre as reais causas de eventos deteriorativos e as suas consequências (CAMARGO, 2003).

Uma das consequências do processo deteriorativo é a formação de radicais livres, que são um grupo de átomos com elétrons não pareados, sendo, portanto, bastantes reativos e capazes de destruir grandes polímeros como os lipídios de membrana. Os principais agentes oxidantes gerados são hidroxilas ( $\text{OH}^\cdot$ ), superóxidos ( $\text{O}_2^\cdot$ ) e os peróxidos de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Uma vez presente na célula, estes podem iniciar reações oxidativas em cadeias, altamente prejudiciais, especialmente com ácidos graxos poliinsaturados, originando hidroperóxidos de lipídios (COOLBEAR, 1995; DESAI et al., 1997).

As superóxidos dismutase (SOD) são grupos de enzimas cuja função é catalisar a reação de dismutação de radicais superóxidos livres ( $O_2^-$ ) produzidos em diferentes locais na célula, para oxigênio molecular ( $O_2$ ) e peróxidos de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (SCANDÁLIOS, 1993), cujo composto é muito menos reativo. Porém, o acúmulo de peróxido na célula também é tóxico, podendo levá-la à morte, principalmente na presença do ferro (EATON, 1991).

A catalase (CAT) é uma enzima tetramérica, presente nos peroxissomas das células, e tem função de consumir peróxidos de hidrogênio produzidos em condições de estresse sendo, portanto, capaz de realizar a desintoxicação de  $O_2$  e  $H_2O_2$ , quebrando os peróxidos de hidrogênio em oxigênio molecular e água, sem a produção de radicais livres (MALLICK; MOHN, 2000).

Segundo Ferreira et al. (2013), existem estudos que demonstram a correlação entre a perda da viabilidade das sementes e a queda na atividade da enzima esterase (EST), pois, essa enzima está envolvida em reações de hidrólise de ésteres. Esse grupo hidrolítico libera ácido graxo dos lipídios, os quais são usados na oxidação, como fonte de energia para eventos germinativos. Enquanto muitos desses lipídios são provenientes de lipossomos, alguns são constituintes de membrana, cuja degradação aumenta com a deterioração.

Já a enzima malato desidrogenase (MDH) apresenta importantes funções fisiológicas dentro da célula, como enzimas do ciclo de Krebs, além de atuar como papel central na maioria das rotas bioquímicas da célula. Essas enzimas são encontradas em associações a uma grande quantidade de organelas subcelulares, apresentando diferenças na regulação da atividade em vários sítios (SCANDALIOS, 1974). A enzima MDH exibe poucas mudanças qualitativas durante o curso de desenvolvimento de um organismo. Por se tratar de uma enzima importante na respiração, o aumento do número e/ou da intensidade da coloração de bandas em sementes submetidas a períodos longos de armazenamento, pode ser em função do aumento da respiração, o que ocorre em sementes que se encontram em processo de deterioração avançado, uma vez que enzimas envolvidas na respiração podem ser ativadas em sementes de qualidade reduzida (SHATTERS et al., 1994).

A enzima álcool desidrogenase (ADH) está relacionada à respiração anaeróbica, promovendo redução do acetaldeído a etanol (BUCHANAN, GRUISSSEN; JONES, 2000). O acetaldeído acelera a deterioração das sementes, portanto, com o aumento da atividade da enzima ADH as sementes ficam mais protegidas contra a ação deletéria deste composto, constituindo uma ferramenta de grande valor no diagnóstico da qualidade de sementes (ZHANG et al. 1994).

A enzima isocitrato-liase (ICL) participa do ciclo do glioxilato, pertencente ao metabolismo de lipídios (ZORATO et al., 2007). Em sementes de soja, as enzimas isocitrato-liase são chave na regulação do ciclo do glioxilato e estão diretamente envolvidas no metabolismo de lipídios armazenados nas sementes oleaginosas, e no desenvolvimento das atividades nos glioxissomos. As atividades dessa enzima aumentam durante a germinação das sementes, obtendo-se valores máximos quando ocorre o máximo da proporção de lipídios degradados e na síntese de sacarose (BEWLEY; BLACK, 1994). No ciclo do glioxilato, os lipídios insolúveis das sementes se transformam em açúcares solúveis, sacarose, os quais são facilmente deslocados para as regiões meristemáticas, radiculares e apicais (CIONI; PINZAUTI; VANNI, 1981).

## **2.5 Tratamento de sementes no controle de patógenos**

O tratamento de sementes é uma técnica aplicada em diversas culturas para uma variedade de objetivos, sendo a principal utilização como uma forma de garantia e proteção de sementes contra o ataque de patógenos durante o armazenamento e a germinação e, conseqüentemente, garantir o estabelecimento do cultivo. Deste modo, o tratamento de sementes tem chamado atenção como uma forma de agregar valor à sementes, favorecer o desenvolvimento das plantas e conseqüentemente a produtividade das culturas (TAYLOR; HARMAN, 1990; BENNETT; FRITZ; CALLAN, 1992).

Contudo, tem-se evidenciado nos últimos anos que, mesmo com a adoção de todas as práticas de manejo, a lavoura pode não apresentar um bom estabelecimento inicial, resultando em estande menor de plantas e, se a cultivar não apresentar boa plasticidade, a produtividade poderá ser reduzida. Isso se deve ao aumento do ataque de patógenos às sementes antes da emergência das plântulas, muitas vezes condicionado aos fatores adversos do ambiente que, a semente, por si só, pode não se sobressair e sucumbir ao ataque de fungos e pragas de solo (GOULART, 2005).

Deve-se considerar, também, que não apenas os microrganismos de solo são danosos. As sementes podem trazer consigo patógenos aderidos externamente, no tegumento, ou estar infectadas, acabando por contaminar áreas isentas, sendo aquelas consideradas o principal veículo de transporte e, conseqüentemente, de contaminação de áreas antes livres de determinado patógeno. Além da disseminação, esses fungos intrínsecos podem levar as sementes à morte antes mesmo da sua emergência ou causar estabelecimento desuniforme da lavoura (CONCEIÇÃO, 2013).

De modo geral, o tratamento de sementes é a aplicação de processos e substâncias que preservam ou aperfeiçoam o desempenho das sementes, permitindo a máxima expressão de seu potencial genético quando cultivadas. Dentre os produtos geralmente aplicados se incluem os defensivos agrícolas (fungicidas, inseticidas e nematicidas), os produtos biológicos (*Trichoderma, bacillus*) e inoculantes (*Rhizobium* fixadoras de nitrogênio), os bioestimulantes (reguladores vegetais) e os micronutrientes. (MENTEN; MORAES, 2010).

Os principais métodos de tratamento químico realizados em sementes no pré-plantio são o recobrimento de sementes e a peletização (TAYLOR; HARMAN, 1990). O recobrimento de sementes, em uma definição geral, consiste na adição de produtos sobre a superfície da semente. No entanto, diferentemente da peletização, esta adição não causa alteração no tamanho ou forma da semente.

Os produtos utilizados podem estar no estado sólido (pó), porém os mais comumente empregados são líquidos, em seu estado puro ou pela dissolução dos mesmos em polímeros com a função de espalhar e aderir o produto sobre a superfície da semente (TAYLOR; HARMAN, 1990). Apesar da utilização de inseticidas e fungicidas, outros produtos também podem ser acrescidos como nutrientes, reguladores vegetais, osmorreguladores, etc. (BENNETT; FRITZ; CALLAN, 1992).

### **2.5.1 Tratamento biológico**

Para atender à procura, cada vez maior, de produtos e alimentos livres de resíduos deixados pelas aplicações de agrotóxicos, o controle biológico de pragas e doenças constitui-se uma importante alternativa. O Brasil e outros países, que tem na agricultura a base de sua economia, necessitam do aumento na produção e oferta de alimentos mais saudáveis, onde o controle biológico deve ser indispensável para se obter um sistema sustentável de produção integrada (LOPES, 2009). Além disso, os fungicidas biológicos são atraentes para a agricultura comercial porque atingem alguns nichos onde o controle químico não é capaz de atuar. Os pesticidas químicos perdem a ação regulatória devido à resistência das pragas, são substituídos ou têm seu uso diminuído em ambientes onde se deseja manter as comunidades microbianas do solo (HARMAN, 2000). Entretanto, apenas a substituição de um produto químico por um biológico não é a situação adequada, mas, é sim, caminhar para o desenvolvimento de sistemas de cultivo mais sustentáveis e, portanto, menos dependente do uso de agrotóxicos (MORANDI; BETTIOL, 2009).

O emprego de microrganismos para o controle de fitopatógenos pode ser direto, quando esses são utilizados vivos; ou indireto, através da aplicação de seus metabólitos. Em ambos os casos necessita-se obter produtos que mantenham as características dos microrganismos ou de seus metabólitos. Dessa forma, esses produtos precisam ser adequadamente formulados para facilitar a comercialização, o transporte, a aplicação e o armazenamento, sem que ocorram grandes alterações em suas características.

Produtos formulados a partir de *Bacillus subtilis* vêm sendo utilizados, desde 1983, nos EUA para o tratamento de sementes de amendoim, entre outras culturas, contra vários fitopatógenos (WELLER, 1988).

Alguns estudos têm mostrado a eficiência do uso de *B. subtilis* como agente de biocontrole e, ou, promotor de crescimento em plantas (ONGENA et al., 2008). A capacidade de ocupar eficientemente nichos distintos e apresentar uma notória versatilidade fisiológica, o faz bactéria impar para estudos futuros. Atualmente os bioprodutos a base de *Bacillus subtilis* mostram-se efetivos na redução de enfermidades no campo, além de menos agressivos ao meio ambiente (LANNA FILHO et al. 2010).

Utiliza-se *B. subtilis* comercialmente para o biocontrole de enfermidades de plantas, assim como para aumentar a produtividade de algumas culturas (NGUGIA et al., 2005; YAO et al., 2006).

O efeito *in situ* pela exposição de células vivas de *B. subtilis* pode ocasionar a promoção de crescimento e/ou o biocontrole, neste último podendo ser de natureza direta ou indireta. O antagonismo direto exercido contra fitopatógenos tem o envolvimento dos conhecidos mecanismos de antibiose, como a síntese de substâncias antimicrobianas, a competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis. (ONGENA et al., 2007; LEELASUPHAKUL et al., 2008).

Bactérias antagônicas como o *B. subtilis*, de modo geral agem significativamente por antibiose e, ocasionalmente, por parasitismo e competição. Os microrganismos que agem por antibiose, geralmente têm amplo espectro de ação, de forma que na inibição dos fungos a produção de substâncias tóxicas é mais efetiva do que qualquer outro mecanismo de ação envolvido (KUPPER; GIMENES-FERNANDES; GOES, 2003).

A aplicação de trichoderma pode ser feita nas sementes, no substrato, no sulco de plantio ou em matérias orgânicas que serão incorporadas antes do transplante das mudas (LUCON, 2009). Independente da forma de aplicação há a necessidade de usar produtos biológicos como uma alternativa para a redução do uso de produtos químicos. Conforme Luz (2001), os bioprotetores apresentam-se como uma tecnologia alternativa para o controle de

fitopatógenos, pois os bioagentes, em especial espécies de *Trichoderma*, poderão ter um importante impacto na redução do uso excessivo de fungicidas, no desenvolvimento da agricultura sustentável e na proteção do meio ambiente, reduzindo, dessa forma, de acordo com Morandi e Bettiol (2009) diversos problemas, como contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais, além de intoxicação de agricultores, desequilíbrios biológicos, redução da biodiversidade, dentre outros.

Algumas linhagens de *Trichoderma* são utilizadas no controle de fitopatógenos e na promoção de crescimento vegetal devido a sua versatilidade de ação, como parasitismo, antibiose e competição, além de atuarem como indutores de resistência das plantas contra doenças. Essas características tornam *Trichoderma* um dos fungos mais pesquisados em condições de laboratório, casa de vegetação, no Brasil, estufa em Portugal, e campo (DELGADO et al., 2007; FILHO et al., 2008; LOUZADA et al., 2009; HOYOS-CARVAJAL; ORDUZ; BISSETT, 2009).

A aplicação de *Trichoderma* tem proporcionado aumentos significativos na percentagem e na precocidade de germinação, no peso seco e na altura de plantas, além de estimular o desenvolvimento das raízes laterais (MELO, 1996; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009). Eles são capazes de atuar como bioestimulantes do crescimento radicular, promovendo o desenvolvimento de raízes através de fito hormônios e assim, melhorar a assimilação de nutrientes, aumentando a resistência diante de fatores bióticos não favoráveis, além de degradar fontes de nutrientes que serão importantes para o desenvolvimento do vegetal (HARMAN, 2000; HARMAN et al., 2004).

### **2.5.2 Tratamento químico**

Como uma forma de minimizar o impacto negativo que porventura possa ocorrer em detrimento de microrganismos e insetos-pragas ao estabelecimento adequado da lavoura, devido à redução da germinação e vigor das sementes, é que foi desenvolvida a modalidade de tratamento de sementes. Ressalta-se, também, que essa tecnologia contribui para o adequado desenvolvimento inicial da lavoura em condições adversas do ambiente, somado, é claro, à utilização de sementes de alta qualidade. Com o uso de defensivos via tratamento desementes, o controle de insetos-praga e patógenos que atacam a soja é realizado desde o início do ciclo, sendo essa uma prática amplamente adotada pelos agricultores, devido à sua eficiência (CECCON et al., 2004).

Atualmente, uma nova modalidade tem sido utilizada visando acompanhar a modernização da agricultura. Os tipos dessas tratadoras podem ser defluxo contínuo ou de batelada. Nas tratadoras de batelada a semente é colocada dentro de uma câmara giratória, que enquanto gira, o produto é pulverizado de um local central e distribuído sobre a semente que está girando. O resultado é uma carga precisa da semente com o líquido do tratamento (PLATZEN, 2010).

Entre os benefícios do tratamento industrial de sementes destacam-se o baixo risco de operação e menor exposição do operador, maior longevidade de armazenamento, assegurando maior germinação e expressão do potencial produtivo e utilização de polímeros que protegem a tecnologia e o germoplasma (GOULART, 2005).

Além da aplicação de fungicidas, inseticidas e micronutrientes às sementes, via tratamento industrial, em virtude da crescente preocupação com o meio ambiente e com a segurança dos funcionários durante o processo de manipulação das sementes há, no momento, um aumento na demanda por tecnologias adicionais, dentre às quais o uso de recobrimento de sementes com polímeros em associação ao tratamento químico. Esses produtos, provenientes da indústria farmacêutica, fazem com que haja maior retenção dos produtos fitossanitários às sementes, garantindo que fungicidas, inseticidas e micronutrientes apresentem maior eficiência, por estarem mais firmemente aderidos às sementes, além de liberar menor quantidade de resíduos de produtos na manipulação das sementes durante a semeadura da lavoura, reduzindo a exposição dos funcionários aos defensivos, sendo um forte argumento para o uso desse tipo de produto (TAYLOR et al., 1998).

Os fungicidas podem ser considerados como de contato (protetores) e sistêmicos, e os mais recomendados, normalmente, são comercializados em formulação que contem princípios ativos com esses dois modos de ação. Entre os produtos comerciais disponíveis atualmente, os mais utilizados têm como princípio ativo carbendazin+thiram, carboxim+thiram, fludioxonil+mefenoxan (GOULART, 2010).

### **2.5.3 Ozônio**

O ozônio apesar de ainda não ser consolidado como um tipo de tratamento de sementes, apresenta um enorme potencial para esta finalidade.

O ozônio foi descoberto em 1839 por Schönbein enquanto estudava a decomposição eletrolítica da água (LAPOLLI et al., 2003), no entanto há relatos sobre o gás desde 1785, quando o físico holandês, Van Marum, observou que a descarga elétrica em ar resultava em

um odor irritante bastante característico (RIDEAL, 1920). Posteriormente Hunt concluiu, em 1848, que o ozônio era a forma alotrópica do oxigênio (VIDAL, 2003; RUSSEL; HUGO; AVLIFEE, 1999), contudo uma década depois foi confirmada sua composição triatômica. Werner Von Siemens identificou, em 1857, que o ozônio poderia ser gerado a partir de descargas elétricas em meio gasoso. Já em 1889, o químico francês Marius Poul Otto, começou os estudos do gás como agente germicida na Universidade de Sorbone, Paris (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991).

No ano de 1982, o gás ozônio foi considerado uma substância GRAS (“General Recognized As Safe”) pela FDA (Food and Drug Administration) passando a ser reconhecido como um produto seguro para tratamento de água, com isso uma série de outras aplicações comerciais foram desenvolvidas, incluindo tratamento de águas residuais e desinfecção de água de piscina (GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIN, 2004; RUSSEL; HUGO; AVLIFEE, 1999). A partir da década de 90, houve um crescente interesse no uso do ozônio no processamento de alimentos, decorrente de os Estados Unidos afirmarem o gás como substância GRAS (GRAHAM, 1997).

De acordo com Dalsasso (1999), no Brasil, o uso do ozônio teve início em 1983 quando algumas estações de tratamento de água buscavam novas alternativas para substituir os métodos convencionais de pré-cloração e de pré-aeração de águas superficiais. No ano de 1985, indústrias como Pirelli e Cutrale, instauraram o processo de tratamento de água em suas estações por meio da pré-ozonização. Nesse mesmo período, indústrias de engarrafamento de água mineral também iniciaram o controle bacteriológico utilizando o ozônio.

Quanto às propriedades físicas e químicas o ozônio, é um gás que se encontra na forma triatômica do oxigênio ( $O_3$ ), tem solubilidade parcial em água e é extremamente instável (DI BERNARDO; DANTAS, 2005). O gás tem odor penetrante podendo ser facilmente detectável em concentrações muito baixas (0,01 a 0,05 mg L<sup>-1</sup>) (LAPOLLI et al. 2003). Lapolli et al. (2003) e Rice et al. (1981) afirmam ainda, que o ozônio possui elevado potencial de oxidação se comparado a outros agentes oxidantes (2,07 mV), sendo ele o segundo mais poderoso agente oxidativo, ficando atrás apenas do flúor (3,06 mV).

Decorrente de sua relativa insolubilidade em solução aquosa, o ozônio apresenta meia-vida que varia de 20 a 30 minutos em água destilada a 20°C (VIDAL, 2003; KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001), contudo alguns autores encontraram uma meia-vida de 165 minutos (DI BERNARDO; DANTAS, 2005; VIDAL, 2003; KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001). Em fase gasosa, o ozônio é mais estável, sua meia-vida no ar atmosférico, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, é da ordem de 12h após sua geração em

temperaturas baixas. (DI BERNARDO; DANTAS, 2005; VIDAL, 2003; RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; GRAHAM, 1997; WICKRAMANAYAKE, 1991; RICE et al., 1981).

A auto decomposição do ozônio é rápida, converte-se em oxigênio e não há resíduos nos produtos tratados (NAITO; TAKAHARA, 2006; GIORDANO, 2009). Observa-se, ainda, que o ozônio não reduz as características nutritivas dos cereais e que não são formados metabólicos prejudiciais à saúde de seres humanos e animais (KIM; YOUSEF; KHADRE, 2003; MENDEZ et al., 2003; YOUNG; ZHU; ZHOU, 2006).

Usualmente a produção comercial do ozônio é realizada por meio de descargas elétricas, comumente chamado de processo corona (RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; USEPA, 1999). No processo corona o ozônio é gerado pela passagem de ar ou oxigênio puro entre dois eletrodos submetidos a uma elevada diferença de potencial (aproximadamente 1000V). No momento que a molécula de oxigênio possui energia suficiente para se dissociar, começam a ocorrer colisões e conseqüentemente a formação do ozônio. (USEPA, 1999). O ozônio produzido com seu alto poder oxidativo, tem grande eficiência na inativação de bactérias, bolores, leveduras, vírus, protozoários, inclusive formas esporuladas e cistos de protozoários, que são mais resistentes (SOUZA, 2006; LAPOLLI et al., 2003; USEPA, 1999).

De acordo com Silveira (2004) e Hunt e Mariñas (1999), o ozônio atua primeiramente na membrana celular. Sua ação antimicrobiana é decorrente da oxidação de glicolípídeos, glicoproteínas e aminoácidos da parede celular, alterando a permeabilidade e causando sua rápida lise. O ozônio provoca também um colapso da atividade enzimática celular, pois ataca grupos sulfidrilas de enzimas (SILVEIRA, 2004; HUNT; MARIÑAS, 1999).

Alguns trabalhos estão sendo realizados para comprovar a eficácia do gás na eliminação de inóculos de fungos também em sementes, diminuindo assim a utilização de fungicidas químicos.

White et al. (2013) observou que o uso do ozônio nas concentrações medianas - 500 e 1000 ppm - foi mais eficaz na redução da presença de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Mucor* em sementes de milho com alta umidade e que as infecções por *Penicillium* diminuíram com concentrações de ozônio de 1000 e 15.000 ppm, já para eliminar *Rhizopus* foi necessária uma concentração de ozônio de 15.000 ppm.

Usando o ozônio nas concentrações 10, 20 e 40mg L<sup>-1</sup> em sementes de arroz Beber-Rodrigues et al. (2015) observou extensa redução da carga total dos fungos *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e leveduras apesar de demonstrarem resistência na concentração de gás O<sub>3</sub> de 10mg L<sup>-1</sup>, de modo que os gêneros de fungos mais sensíveis foram *Acremonium* e

*Alternaria*. Entretanto as concentrações 20 e 40mg L<sup>-1</sup> apresentaram maiores reduções para todos os fungos.

Ramos (2015) estudou métodos de otimizar o uso do processo de ozonização da desinfecção de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth., *Enterolobium gummiferum* (Mart.) e *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. Para isso foi aplicado quatro tratamentos: testemunha; álcool 50% e hipoclorito de sódio 1%, por 1 minuto; água destilada na presença do gás ozônio por uma hora; ozônio (gás) por uma hora. Os tratamentos de desinfecção das sementes das três espécies mais eficientes foram com água ozonizada por uma hora, seguido do tratamento de álcool 50% e hipoclorito 1% por um minuto

Para avaliar a ação do ozônio na sanitização de sementes de girassol Rodrigues et al. (2015) submeteu as sementes a ambiente rico em ozônio pelos períodos de 20 minutos, 60 minutos, 120 minutos e sem ozonização (controle) na concentração de concentração de 1741 ppm de ozônio e concluiu que o tratamento de sementes de girassol com ozônio na concentração de 1741 ppmv (0,24 g/h), por 60 minutos, reduziu a população fúngica de *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. sem afetar o seu potencial fisiológico.

Também com o objetivo de avaliar o ozônio como agente fungicida e seu efeito na qualidade do arroz, Santos (2016), aplicou ozônio na concentração de 10,13 mg L<sup>-1</sup>, em fluxo contínuo de 1,0 L/min, por cinco períodos de exposição (12, 24, 36, 48 e 60 h). A partir dos testes realizações concluiu-se que houve o efeito fungicida do gás ozônio em grãos de arroz a partir de 13 h de exposição das sementes ao ozônio.

Objetivando avaliar a eficácia do gás ozônio na desinfecção, Ribeiro (2016), tratou grãos de milho com 13,5 mg L<sup>-1</sup> de O<sub>3</sub> com fluxo de 1,0 L min<sup>-1</sup>, por períodos de exposição de 12, 24, 26, 48 e 60 horas. O autor concluiu que nas condições adotadas, os resultados indicaram que o ozônio se mostrou eficiente fungicida de grãos de milho sem alterar a qualidade físico-químicas dos mesmos.

Ainda são poucos os trabalhos que comprovam a eficiência do ozônio na eliminação de patógenos em sementes e seus efeitos sobre a qualidade das sementes, sendo necessário a realização de pesquisas para solidificar o uso do ozônio no tratamento de sementes.

## REFERÊNCIAS

- ABRAPA, Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2017 Disponível em: <<http://www.abrapa.com.br/Paginas/dados/algodao-no-mundo.aspx>> Acesso em: 02 jan. 2018.
- BARROCAS, E.N., et al. Desempenho de sementes de algodão submetidas à deficiência hídrica e presença de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Bioscience Journal**, v.30, n.2, p.421-428, 2014
- BEBER-RODRIGUES, M. **Efeito do gás ozônio na qualidade micotoxicológica de arroz (*Oryza sativa* L.) em casca durante a armazenagem**. 2013. 123p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.2013
- BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P. **O Agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 2, 2008.
- BELTRÃO, N. E. M.; SOUZA, J. G.. Fitologia do Algodoeiro herbáceo (sistemática, organografia e anatomia). In Beltrão, N. E. M. (ed). **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de Tecnologia. V. 1, p. 55 – 86, 1999.
- BENNETT, M.A.; FRITZ, V.A.; CALLAN, N.W. Impact of seed treatments on crop stand establishment. **Horticulture Technology**, Alexandria, v. 2, n. 3, p. 345–349, 1992.
- BENTO, C. S. et al. Inheritance of resistance to Pepper yellow mosaic virus in *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p. 1074-1082, 2013.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445p.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 5. ed. Viçosa: UFV, 2009.
- BOTELHO, L. S. et al. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 153-160, ago. 2013.
- BRACCINI, A. L. et al. Qualidade fisiológica e sanitária das sementes de quinze cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) colhidas na época normal e após o retardamento da colheita. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 25, no. 2, p. 449-457, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.
- BRUNES, R.R. **Relações entre a qualidade fisiológica de sementes de pimentão e a variabilidade na produção de frutos**. 2013.120p. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

- BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W., JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Maryland: American society of Plant physiologists, 2000.
- CAMARGO, R. **Armazenamento de sementes de milho doce**. 2003. 81 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2003.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4 ed. Jaboticabal, FUNEP, 2000.
- CARVALHO, P. P. **Manual do Algodoeiro**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 1996.
- CIONI, M.; PINZAUTI, G.; VANNI, P. Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.70, n.1, p.1-26, 1981.
- CASTRO, M. B. de. **Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho por meio da atividade respiratória**. 2011. 67 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- COIMBRA, R.A. et al. Testes de vigor utilizados na avaliação da qualidade fisiológica de lotes de sementes de milho-doce (sh2). **Ciência Rural**, v.39, n.9, p.2402-2408, 2009.
- COOLBEAR P (Mechanisms of seed deterioration. In AS Basra, ed, Seed Quality: Basic Mechanisms and Agricultural Implications. **Food Product Press**, New York, pp 223–277. 1995.
- CEASAMINAS. Centro de Abastecimento de Minas Gerais. **Procedência de Produtos em Kg**. 2013.
- CEASAMINAS. Centro de Abastecimento de Minas Gerais. **Procedência de Produtos em Kg**. 2016.
- CECCON, G. et al. Efeito de inseticidas na semeadura sobre pragas iniciais e produtividade de milho safrinha em plantio direto. **Bragantia**, v.63, p.227-237, 2004.
- CHAGAS, M. da F. **Qualidade de sementes de soja utilizadas no estado de Mato Grosso, obtidas na abrangência do circuito tecnológico APROSOJA, na safra 2013/2014**. 2014. 99 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- CONCEIÇÃO, G. M. **Tratamento químico de sementes de soja: qualidade fisiológica, sanitária e potencial de armazenamento**. 2013. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2013.
- CONTRERAS-CORNEJO. et al. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. **Plant Physiology**, 149, 3: 1579–1592. 2009.

DALSASSO, R. L. **Pré-ozonização de águas contendo agrotóxico, seguida de filtração direta**. 1999. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1999.

DELGADO, G.V. et al. Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. in vitro. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 12 p. 2007.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. D. B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. São Carlos: Rima. v. 2005.

DI DATO, F. et al. Genetic diversity and assessment of markers linked to resistance and pungency genes in Capsicum germplasm. **Euphytica**, Wageningen, v. 204, n. 1, p. 103-119, 2015.

EATON, T. W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiry. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Paul. v. 118, n. 1, p. 3-4, 1991

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil**, Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265p. – (Sistemas de Produção)

EMBRAPA. **Guia prático para identificação de doenças na produção integrada de pimentão**. Brasília, 2015.

EMBRAPA. **Cultura do Algodoeiro no Cerrado**. Importância econômica. 2003 Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/aAlgodaoCerrado/index.htm>>. Acesso em: 02 jan. 2018.

EMBRAPA. **Recomendações técnicas para a cultura da soja no Paraná 2000/01**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2000.

EMBRAPA. **Soja em números (safra 2016/2017)**. 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 01 fev. 2018.

EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja: Região Central do Brasil**. EMBRAPA Soja. 2004. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>. Acesso em: 25 jun. 2017.

FERREIRA, L. P., et al. **Moléstias e seu controle**. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Ed.). A soja no Brasil. Campinas: IAC, 1981. p. 603- 627.

FERREIRA, V. F. et al. Quality of maize seeds harvested and husked at high moisture levels. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 3, p. 276-277, 2013

FILGUEIRA, F.A.R. **Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló**. Viçosa, MG: UFV, 2003.

FILHO, M.R. et al. Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético in vitro e colonização endofítica de mudas de eucalipto. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, 226. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.2008.

FREIRE, E.C. **Produção de sementes de Algodão**. In: Freire, E.C. (Ed.). Algodão no Cerrado do Brasil. Brasília: ABRAPA, 2015. cap 23, p. 843-872.

GARCIA, D.C. et al. A secagem de sementes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.2, p.603-608, mar./abr. 2004.

GIORDANO, B. N. E. **Efeito do ozônio sobre a micoflora e aflatoxinas durante a armazenagem de castanha-do-Brasil com casca (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2009.

GOULART, A. C. P. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste. 2005.

GOULART, A. C. P. Hora de tratar. **Revista Cultivar**. Ano XII, n. 135, p. 22-25, 2010.

GRAHAM, D. M. Use of ozone for food processing. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n. 6, p. 72-75, 1997.

GROOT, S. P. C.; KARSSSEN, C. M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. **Planta**, Berlin, v. 171, p. 525–531, 1987.

GUZEL-SEYDİM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDİM, A. C. Use of ozone in the food industry. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, San Diego, v. 37, n. 4, p. 453-460, 2004.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, 84, 4: 376–393.2000.

HARMAN, G.E. et al. Interactions between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Plant Physiology*, 94, 2: 146-153.2004.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S. E BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, 51: 409–416.2009.

HUNT, N. K., AND B. J. MARIÑAS. Kinetics of *Escherichia coli* inactivation with ozone: chemical and inactivation kinetics. **Water Res.** vol. 33, p. 2633-2641. 1999.

JUHÁSZ, A. C. P. et al. **Desafios fitossanitários para a produção de soja**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 34, n. 276, p. 66-75, set./out. 2013.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**, Malden, v. 66, n. 9, p. 1242-1252, 2001.

KIKUTI, A.L.P.; MENTEN, J.O.M.; MORAES, M.H.D. E OLIVEIRA, S.R.S. Interferência da assepsia em sementes de pimentão submetidas ao teste de envelhecimento acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina. vol. 27, n. 2, p. 44-49. 2005.

KIKUTI, A. L. P.; MARCOS FILHO, J. Potencial fisiológico de sementes de couve-flor e desempenho das plantas em campo. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 29, n. 1, p. 107-113, 2007.

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; KHADRE, MA. **Ozone and its current and future application in the food industry**. In: TAYLOR, S.L. (Ed.). *Advances in food and nutrition research*. New York: Academic Press, 2003. v. 45, p. 167-218.

KRAFT, K. H. et al. Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 111, n. 17, p. 1-6, 2014.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n.3, p. 251-257, 2003.

LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R. **Ozone in water treatment: application and engineering**. Chelsea: AWWARF and Lewis Publishers, 1991.

LANNA FILHO, Roberto; FERRO. et al. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, 2010.

LAPOLLI, F. R. et al. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In: GONÇALVES, R. F. (Coord.). **Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquíicultura e hidropônica**. Vitória: PROSAB, p. 169-208.2003.

LEELASUPHAKUL, W. et al. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.48, p.113-121, 2008.

LIMA, E.F.; ARAÚJO, A.E.; CARVALHO, L.P. Produção de sementes de algodoeiro com controle da qualidade sanitária. In: Seminário Estadual do Algodão, 4. Encontro Mato Grosso 2000, 1. 1998, Cuiabá. **Anais...** Rondonópolis: EMBRAPA, Fundação MT, EMPAER-MT, 1998. p. 91-101.

LUCON, C.M.M. Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp (em linha).2009. **Infobibos, Informações Tecnológicas**. Acesso em 07/04/2018. Disponível em: < [http://www.infobibos.com/Artigos/2009\\_1/trichoderma/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/trichoderma/index.htm) >.

LOPES, R.B. **A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil**. In: Bettiol, W. e Morandi, M.A.B. (Ed.) - *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p. 15–28.2009.

- LOUZADA, G.A.S. et al. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes ecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota neotropica**, vol. 9, n. 3 p.145–149.2009.
- LUZ, W.C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, vol.26, n. 1 p.16-20.2001.
- MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, p.183-193, 2000
- MARQUELLI, W.A.; SILVA, W. L. C. **Irrigação na cultura do pimentão**, Brasília DF: EMBRAPA, 2012. p.1 (Circular Técnica, 101).
- MCDONALD, M.B. Computer imaging to improve seed quality determinations. In: Digital imaging and spectral techniques: application to precision agriculture and crop physiology. **ASA Special Publication**, n.66, p.15-27, 2003.
- MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 4: 261–295.1996.
- MENDEZ, F. et al. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and performance. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, n. 1, p. 33-44, 2003.
- MENESES, C. H. S. G.; LIMA, L. H. G. de M.; LIMA, M. M. de A.; M. S. VIDAL. Aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao déficit hídrico. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande v. 10, n. 1/2, p. 1039-1072, 2006.
- MENTEN, J.O.; MORAES, M.H.D. Tratamento de sementes: histórico, tipos, características e benefícios. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 52–53, 2010.
- MO, H. et al. Horticultural and chemical quality characterization of accessions selected from four species of *Capsicum*. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, New York, v. 56, n. 1, p. 54-66, 2015.
- MORAES, M.L.B de. **Comportamento da pressão estática e da frente de secagem em uma coluna de sementes de arroz**. 2000. 50p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de sementes) –Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.2000.
- MORANDI, M.A.B. E BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas no Brasil**. In: Bettiol, W; Morandi, M.A.B. (Ed.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p.07-14. 2009.
- MOURA, M. F. et al. Análise comparativa da região codificadora para a proteína capsidial de isolados de Pep TMV e PVY coletados em pimentão. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 38, p. 93-96, 2012.
- MÜLLER, L. **Taxonomia e morfologia**. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Eds.). A soja no Brasil. Campinas: IAC, 1981. p. 73-104.

- NAITO, S., TAKAHARA, H. Ozone contribution in food industry in Japan. **Ozone: Science & Engineering**, v.28, 425-9.2006.
- NEUMAIER, N., et al. **Estádios de desenvolvimento da cultura da soja**. In: BONATO, E. R. (Ed.). Estresses em soja. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2000. p. 21-44.
- NGUGIA, H.K. et al. Effect of flower-applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. **Biological Control**, v.33, p.32-38, 2005.
- NOGUEIRA, D. W. **Seleção assistida por marcadores moleculares e capacidade combinatória de linhagens de pimentão com resistência múltipla a doenças**. 2010. 81p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- ONGENA M. et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environment Microbiology**. 2007;
- ONGENA M, JACQUES P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 115–125, 2008.
- PAIVA, F. A.; ASMUS, G. L.; ARAÚJO, A. E. **Doenças** In: EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. Algodão: tecnologia de produção. Dourados, 2001. p. 245 – 272.
- PARISI, J. J. D.; PATRÍCIO, F. R. A.; OLIVEIRA, H.F. Método do rolo de papel toalha modificado para detecção de *Sclerotinia Sclerotiorum* em sementes de feijão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 3, p 288 – 290, 2006.
- PENA, J.C.V. Melhoramento do algodoeiro anual. **Informe agropecuário**. v.8, n92, p. 10 – 12, 1982.
- PESKE, S.T.; VILLELA, F.A.; MENEGHELLO, G.E. **Sementes: Fundamentos Científicos e Tecnológicos**. 3.ed. Pelotas: Editora Universitária/ UFPel, 573p. 2012.
- PLATZEN, H. Tratadoras de sementes. **Seed News**, vol.14, n.6, 16-17, 2010.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2. ed. Brasília: Agiplan, 1985.
- RAMOS, K. M. O. **Caracterização da qualidade fisiológica e otimização do processo de ozonização em sementes de leguminosas arbóreas do Cerrado**. 2015. 146p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) Universidade de Brasília, Brasília. 2015.
- RIBEIRO, D. F. **Ozônio como agente fungicida e de degradação de micotoxinas em híbridos de milho**, 2016, 47p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.
- RICE, R. G. et al. **Uses of ozone in drinking water treatment**. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 73, n. 1, p. 44-47, 1981.
- RIDEAL, E. K. **Ozone**. University of Illinois. London: Constable and Co., 1920.

RODRIGUES, V. O. et al. Treating sunflower seeds subjected to ozonization. **Journal of Seed Science**, v.37, n.3, p.202-210, 2015.

ROSENOW, D. T. et al. Drought tolerant sorghum and cotton germplasm. **Agricultural Water Management**, v. 7, p. 207-222, 1983.

ROY, K. W.; BAIRD, R. E.; ABNEY, T. S. A review of soybean (*Glycine max*) seed, pod, and flower mycofloras in North America, with methods and a key for identification of selected fungi. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 150, n. 1, p. 15-27, 2000.

RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B.; AVLIFFE, G. A. J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1999.

SANTOS, R. R. et al . Ozone as fungicide in rice grains. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, Campina Grande , v. 20, n. 3, p. 230-235, Mar. 2016.

SARTORI, A. F; REIS, E. M. & CASA, R. T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília v. 29, n.4, p. 456- 458, 2004.

SCANDALIOS, J. G. Isoenzymes in development and differentiation. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 25, p. 255-258, 1974.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**. v. 101, p. 7-12 1993.

SEDIYAMA, M. A. N.; VIDIGAL, S. M.; JACOB, L. L. Nutrição e produtividade de plantas de pimentão colorido, adubadas com biofertilizante de suíno. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 6, p. 588-594, 2014.

SHATTERS, R. G. JR. et al . Soybean seed deterioration and response to priming: Changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. **Seed Science**. Res.v. 4 p. 33-41. 1994

SILVEIRA, I. C. T. **Cloro e ozônio aplicados a desinfecção de efluente hospitalar tratado em contadores biológicos rotatórios, com avaliação de efeitos tóxicos em *Daphnia similis***. 2004. Tese (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) - Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2004.

SOUZA, J. B. **Avaliação de métodos para desinfecção de água, empregando cloro, ácido peracético, ozônio e o processo de desinfecção combinado ozônio/cloro**. 2006. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, São Carlos. 2006.

SUASSUNA, N.D.; COUTINHO, W.M. **Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro**. In: FREIRE, E. C. Algodão no Cerrado do Brasil. 2.ed. Brasília: ABRAPA. 2011. p.567-612.

TAYLOR, A.G.; HARMAN, G.E. Concepts and technologies of selected seed treatments. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, n. 1, p. 321–339, 1990.

TAYLOR, A.G. et al. Seed enhancements. **Seed Science Research**. 1998.

TOLEDO, M. Z. et al. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 2, p. 122-133, abr./jun. 2009

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Water Treatment Manual: Disinfection**. 2011. Disponível em: [http://www.epa.gov/OGWDW/mdbp/alternative\\_disinfectants\\_guidance.pdf](http://www.epa.gov/OGWDW/mdbp/alternative_disinfectants_guidance.pdf)>. Acesso em: 30 maio 2018.

VIDAL, F. J. R. **Proceso de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización**. Madrid : Ediciones Díaz de Santos. 253 p.2003.

VIDIC, M. et al. Review of soybean resistance to pathogens. **Field and Vegetable Crops Research**, Sérvia, v. 50, n. 2, p. 52- 61, 2013.

VIEIRA, R.D.; BITTENCOURT, S.R.M.; PANOBIANCO, M. Seed vigour - an important component of seed quality in Brazil. **ISTA - Seed Testing International**, n. 126, p. 21-22, 2003.

VECHIATO, A.H. et al. Antracnose do feijoeiro: correlação entre severidade em vagens e a incidência do patógeno nas sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.159-170, jun. 1997.

WELLER, D.M. Biological control of rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p.379-407, 1988.

WHITE, S. D. et al. Mycoflora of high moisture maize treated with ozone. **Journal of Stored Products Research**, v. 55, p. 84-89, 2013.

WICKRAMANAYAKE, G. B. Disinfection and sterilization by ozone. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection and sterilization and preservation**. 4. ed. Philadelphia: Lea and Febiyer, 1991. p. 182-190.

YAO, A. et al. Effect of FZB 24® *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.39, p.323-328, 2006.

YOUNG, J.C.; ZHU, H.; ZHOU, T. Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 417-424, 2006.

ZHANG, M. et al. Mechanism of seed deterioration in relation to the compounds involved by dry seeds themselves. **Seed Science**. Res., v. 4, n. 1, p.49-56, mar. 1994.

ZORATO, M. F. et al. Sementes esverdeadas em soja: testes alternativos para determinar a sua qualidade. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2007.

## **CAPÍTULO 2**

### **TRATAMENTO DE SEMENTES DE ALGODÃO INOCULADAS COM *COLLETOTRICHUM GOSSYPHII* VAR. *CEPHALOSPORIOIDES* UTILIZANDO O GÁS OZÔNIO**

## RESUMO

As sementes são consideradas veículo de tecnologia, por isso, torna-se imprescindível o constante investimento em melhorias nos processos de produção, sendo um dos aspectos de grande importância o tratamento de semente. Isso porque as sementes são um dos meios mais eficientes de disseminação de pragas e doenças nas culturas, capazes de contaminar áreas até então desprovidas de tais patógenos. Uma das técnicas que vem se mostrando promissora no controle de fungos em sementes, é o uso do gás ozônio, que tem como vantagem não ser prejudiciais ao meio ambiente e de reduzir a emissão de resíduos químicos, pelo aumento do uso de fumigantes pesticidas empregados no manejo de sementes, além disso, seria uma técnica viável para o controle de patógenos em sementes utilizadas na implantação de campos para produção orgânica. Desta forma objetivou – se avaliar o efeito do gás ozônio no controle do patógeno *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* inoculados em sementes de algodão, bem como seu efeito sobre a qualidade fisiológica das sementes. Utilizou-se sementes de algodão da variedade FM 975 WS, inoculadas com o fungo por períodos de 48h e 72h, sendo realizada uma diluição de sementes inoculadas em sementes não inoculadas para obtenção de 4 lotes com diferentes níveis de inóculo, sendo eles, 25% de sementes inoculadas por 48h e 75% de sementes não inoculadas; 50% de sementes inoculadas por 48h e 50% de sementes não inoculadas; 25% de sementes inoculadas por 72h e 75% de sementes não inoculadas; 50% de sementes inoculadas por 72h e 50% de sementes não inoculadas. Foram realizados os testes de germinação, primeira contagem, emergência, estande inicial para a avaliação da qualidade fisiológica e o Blotter Test para a qualidade sanitária. O tratamento de sementes de algodão na concentração 25 g/m<sup>3</sup> por 40 minutos foi eficiente no controle dos patógenos *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Aspegillus* e *Fusarium* e aos 60 minutos controlou o fungo *Penicillium* e não afetou a qualidade fisiológica e bioquímica das sementes.

**Palavras - chaves:** Qualidade fisiológica, *Colletotrichum gossypii*, ramulose, ozônio.

## 1 INTRODUÇÃO

O algodão, pertencente à família Malvaceae, gênero *Gossypium* L. e espécie *Gossypium hirsutum*, é uma planta dicotiledônea hirsuta ou glabra, anual ou perene, herbácea, arbustiva ou arbórea. Tem como principal meio de propagação, as sementes, recobertas por fibras pequenas chamadas línter, e que representam 8 a 12% do peso total da semente. Além disso, são ditas oleaginosas, com teores de óleo variando de 30 a 35% (BELTRÃO; SOUZA, 1999).

Nos últimos anos houve um aumento significativo tanto em produtividade como na produção da cultura do algodoeiro, resultado dos avanços genéticos e das adequações dos sistemas de produção, o que tem permitido a viabilidade econômica dessa cultura, sendo seu cultivo, concentrado principalmente nas regiões da Bahia e Mato Grosso, que apresentam participações de 22,61% e 66% na produção da cultura (CONAB, 2017). No entanto, as condições edafoclimáticas e o sistema de cultivo com base em extensas áreas com poucas cultivares plantadas, muitas delas suscetíveis a mais de uma doença, agravam as doenças endêmicas na região, muitas dessas antes consideradas pouco expressivas, além de possibilitar surtos epidêmicos de novas doenças (SUASSUNA et al., 2006).

Em um programa de controle de qualidade de sementes, exige-se a utilização de procedimentos que incorporem avanços tecnológicos dirigidos à eficiência de manejo, entre eles o uso de técnicas físicas, bioquímicas e moleculares capazes de gerar informações adicionais à análise de sementes e ao controle de qualidade. Uma semente de qualidade deve atender aos quatro atributos, são eles: físicos, fisiológicos, genéticos e sanitários (GOULART et al., 2008).

A utilização de sementes com elevada qualidade sanitária e fisiológica é uma das estratégias mais eficazes em diminuir a disseminação nos patógenos. Para isso a obtenção de sementes de algodoeiro com boa qualidade sanitária exige o conhecimento a respeito de transmissão e disseminação dos patógenos que podem ser associados à cultura.

A cultura do algodão esta suscetível ao ataque de vários fungos transmitidos via sementes e que causam doenças de grande importância econômica, gerando prejuízos a toda lavoura. A ramulose uma das principais doenças causada pelo fungo *Colletotrichum gossypi* var. *cephalosporioides*, um patógeno importante para a cultura, pois causa o tombamento tanto na pré quanto na pós emergência, lesões nas folhas, nanismo e o super brotamento que compromete toda a produção da planta, ocasionando perdas de mais de 80% (SILVA-MANN et al. 2005; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; CHITARRA; BARBOSA, 2014).

Dentre as alternativas utilizadas para diminuir a incidência de fungos em sementes e possibilitar uma emergência em campo, mais uniforme, está o tratamento sanitário de sementes. Pesquisas que busquem tratamentos mais eficientes, de melhor custo benefício, e que não causem danos às sementes (MENTEN; MORAES, 2010), vêm ganhando destaque, entre eles, o tratamento com o gás ozônio.

O ozônio é um forte agente oxidante que pode ser gerado no local de trabalho, surgindo como alternativa na prevenção e controle na contaminação de insetos e fungos em sementes e grãos armazenados. Evita a necessidade de manipulação, armazenamento ou eliminação dos recipientes de produtos químicos, possui vida curta pois degrada - se rapidamente em oxigênio (SOUZA, 2006; LAPOLLI et al., 2003).

Para avaliar a ação do ozônio na sanitização de sementes de girassol Rodrigues et al. (2015) submeteu as sementes a ambiente rico em ozônio pelos períodos de 20 minutos, 60 minutos, 120 minutos e sem ozonização (controle) na concentração de concentração de 1741 ppm de ozônio e concluiu que o tratamento de sementes de girassol com ozônio na concentração de 1741 ppmv (0,24 g h<sup>-1</sup>), por 60 minutos, reduziu a população fúngica de *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp sem afetar o seu potencial fisiológico.

Também com o objetivo de avaliar o ozônio como agente fungicida e seu efeito na qualidade do arroz, Santos et al. (2016), aplicou ozônio na concentração de 10,13 mg L<sup>-1</sup>, em fluxo contínuo de 1,0 L min<sup>-1</sup>, por cinco períodos de exposição (12, 24, 36, 48 e 60 h). A partir dos testes realizações concluiu-se que houve o efeito fungicida do gás ozônio em grãos de arroz a partir de 13 h de exposição das sementes ao ozônio.

Objetivando avaliar a eficácia do gás ozônio na desinfecção, Ribeiro (2016), tratou grãos de milho com 13,5 mg L<sup>-1</sup> de O<sub>3</sub> com fluxo de 1,0 L min<sup>-1</sup>, por períodos de exposição de 12, 24, 26, 48 e 60 horas. O autor concluiu que nas condições adotadas, os resultados indicaram que o ozônio se mostrou eficiente fungicida de grãos de milho sem alterar a qualidade físico-químicas dos mesmos.

Baseado nos potenciais benefícios que o tratamento com o gás ozônio tem sobre à qualidade das sementes, o objetivo com presente trabalho foi avaliar a eficiência desse gás como agente controlador do fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, causador da ramulose, em sementes de algodão e seus efeitos na qualidade fisiológica e bioquímica das sementes.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Patologia de Sementes e no Laboratório de Análises de Sementes localizados na Universidade Federal de Lavras – UFLA. As sementes foram tratadas com o gás ozônio na empresa Ozone&Life situada na cidade de São José dos Campos – SP.

As sementes utilizadas foram da cultivar FM975 WS, da safra 2016, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* por períodos de 48h e 72h. Sobre o substrato BDA foram colocados cinco discos da cultura do patógeno *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e em seguida incubado em câmara com temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 h durante três dias. Após o desenvolvimento do micélio do fungo e tomada de toda a placa, as sementes foram colocadas sobre as colônias, em uma camada simples, sendo mantidas por diferentes períodos de exposição. Após o período de incubação (48h e 72 h) as sementes foram retiradas e secadas, separadamente em temperatura ambiente pelo tempo de 72h. (SOUSA et al., 2008).

Após o procedimento de inoculação foi realizada uma mistura de sementes inoculadas com sementes não inoculadas para obtenção de quatro diferentes amostras, sendo eles uma mistura de: 25% de sementes inoculadas por 48h e 75% de sementes não inoculadas (amostra 1); 50% de sementes inoculadas por 48h e 50% de sementes não inoculadas (amostra 2); 25% de sementes inoculadas por 72h e 75% de sementes não inoculadas (amostra 3); 50% de sementes inoculadas por 72h e 50% de sementes não inoculadas (amostra 4).

Para avaliar e determinar a eficiência do ozônio como um método de desinfecção e desinfestação das sementes de algodão, os seguintes tratamentos foram estabelecidos: controle (sem ozonização) e as demais ozonizações nos tempos de 20, 40, 60 e 120 minutos na concentração de 25g m<sup>-3</sup>.

O ozônio foi obtido por meio da central geradora de ozônio da empresa Ozone & Life (gerador de ozônio e o modelo O & 35.0 rm), este gerador produz ozônio por descargas elétricas no ar atmosférico rico em O<sub>2</sub> (ar ou O<sub>2</sub> puro) pelo processo denominado Corona.

As sementes foram colocadas em uma câmara de fluxo contínuo, feita com tubo de PVC que apresentam uma válvula em cada extremidade do reator segundo descrito por Rodrigues et al., (2015). Após submeter as sementes ao ozônio, foram realizados testes de vigor, de viabilidade análises de atividade enzimática para avaliar os possíveis efeitos do ozônio sobre a qualidade fisiológica das amostras.

Para o teste de germinação, foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento em cada uma das amostras, semeadas em papel germitest, umedecido com 2,5 vezes o peso seco do substrato. Os rolos foram mantidos em germinador a 25°C, com a primeira contagem realizada no 4º dia após a semeadura e a última contagem realizada no 12º dia. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009b).

O teste de envelhecimento acelerado foi realizado com quatro repetições de 50 sementes por tratamento para cada lote. As sementes foram colocadas sobre uma tela de alumínio, encaixada a um gerbox. Em cada gerbox foram adicionados 40 ml de água destilada. Em seguida, os gerboxes foram mantidos em BOD a 41°C por 72h (MARCOS-FILHO, 2015). Após esse período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação com avaliação 4 dias após a semeadura. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais, seguindo os critérios já estabelecidos nas Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009b).

No teste de condutividade elétrica foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento para cada uma das quatro amostras. As sementes foram pesadas e embebidas por 24h em recipientes contendo 75 ml de água deionizada, a uma temperatura de 25°C. Os resultados foram determinados com o auxílio de um condutivímetro e os resultados foram expressos em  $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$  de sementes, de acordo com a metodologia de Marcos-Filho (2015).

Para avaliar emergência de plântulas a semeadura foi realizada em bandejas plásticas e preenchidas com substrato areia e solo na proporção de 2:1. Foram usadas quatro repetições de sementes para cada tratamento. O substrato foi umedecido com um volume de água correspondente a 70% da capacidade de retenção. As bandejas foram colocadas em câmaras de crescimento vegetal na temperatura de 25 °C com o fotoperíodo de 12h. A partir do momento que ocorreu a emergência da primeira plântula, foram feitas avaliações diárias, contabilizando o número de plântulas emergidas até a estabilização. O estande inicial foi avaliado aos 7 dias após a semeadura. Foram consideradas a porcentagem de plântulas normais aos 14 dias, bem como o índice de velocidade de emergência (IVE), determinado segundo fórmula proposta por Maguire (1962).

O teste de sanidade foi realizado com duas folhas de papel filtro, colocadas em placas de petri com 15 cm de diâmetro e uma camada de ágar – ágar a 1%. Para cada um dos tratamentos foram utilizados oito repetições de 25 sementes cada, para os quatro amostras. Os papéis de filtro usados na execução do teste, foram umedecidos com água destilada mais 2,4 – D. As placas de petri com as sementes ficaram incubadas sob lâmpadas de luz fluorescente branca e fotoperíodo de 12 h por um período de 7 dias à temperatura de 20°C (BRASIL, 2009

b). Após completarem o período de incubação, as sementes foram analisadas individualmente com o auxílio de lupa estereoscópica para a quantificação e identificação dos fungos. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes infectadas.

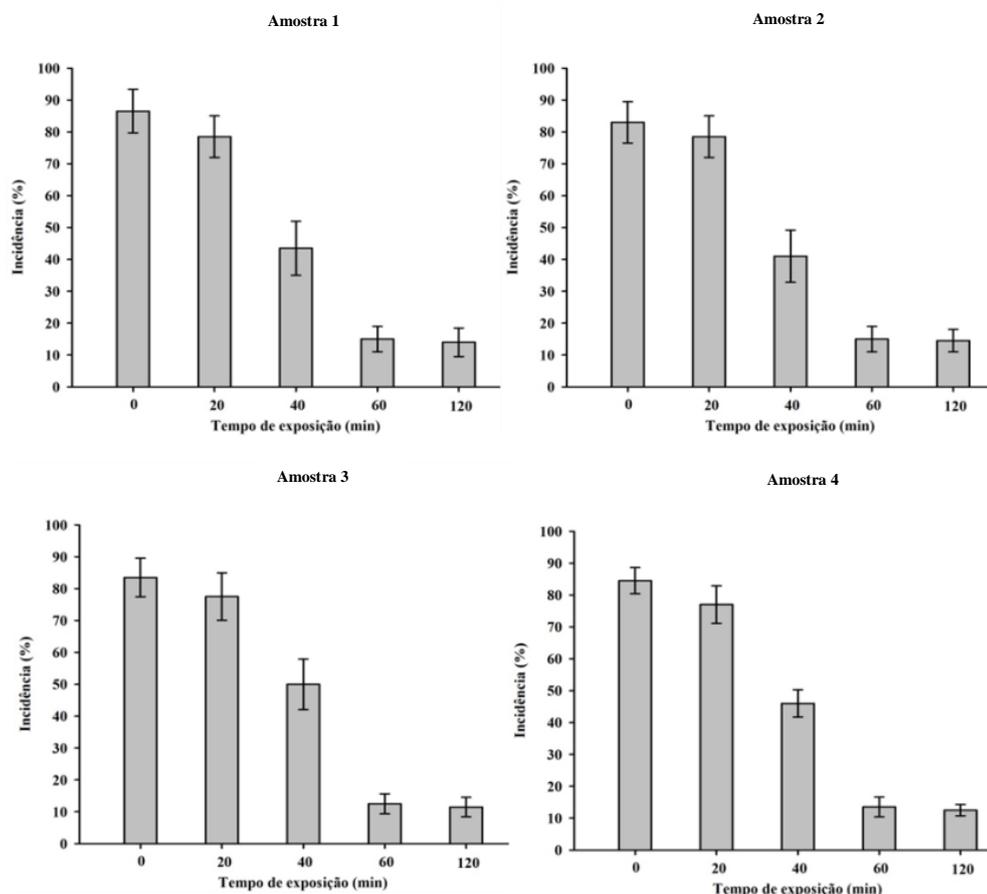
Para a análise isoenzimática 50 gramas de sementes foram maceradas com antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) em nitrogênio líquido. Foram pesadas subamostras de 100 mg do material macerado e acrescido de 250 µL do tampão de extração (Tris HCl 0,2M pH 8,0 + 0,1% de β-mercaptoetanol). O material foi colocado em geladeira (4 °C) por 12 h e depois centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos a 4 °C. A eletroforese em géis de poliacrilamida foi desenvolvida em sistema descontínuo (4,5% gel de concentração e 7,5% gel de separação). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Para proceder a corrida eletroforética, foram aplicados nas canaletas dos géis 50 µL do sobrenadante de cada amostra e a corrida realizada a 4 °C por quatro horas a uma voltagem constante de 150 V. Ao término da corrida, os géis foram revelados para as enzimas e Álcool desidrogenase (ADH), Malato desidrogenase (MDH), Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), Peroxidase (PO) e Isocitrato liase (ISO), conforme protocolos contidos em Alfenas (2006).

O experimento foi executado em esquema fatorial 5x4, sendo cinco tempos de exposição ao gás ozônio para 4 amostras de sementes. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições de 50 sementes. Os dados foram submetidos às análises de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott – Knott, a 5% de probabilidade.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nos resultados da porcentagem de incidência do patógeno *Aspergillus* (figura 2.1) não houve diferença significativa entre as sementes não tratadas e as sementes expostas ao ozônio por 20 minutos. No entanto a incidência do fungo cai drasticamente a partir aos 40 minutos de exposição ao ozônio e reduz ainda mais quando nos períodos de 60 e 120 minutos.

Figura 2.1 - Incidência (%) de *Aspergillus* em diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos).



Fonte: Do autor (2018)

Savi; Piacentini; Scussel (2015) concluíram que o tratamento com gás ozônio foi efetivo para eliminação de *Aspergillus* em sementes de trigo.

A incidência do fungo *Fusarium sp.* (figura 2.2) para as amostras 1, 2 e 4 reduziu a partir dos 20 minutos de exposição ao ozônio, apenas para a amostra 3 essa redução ocorreu a partir dos 40 minutos de tratamento das sementes.

Figura 2.2 - Incidência (%) de *Fusarium* em diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos). (Continua)

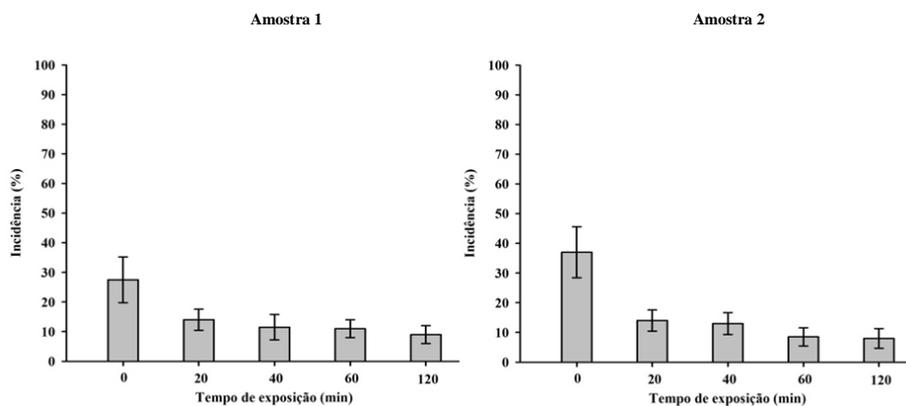
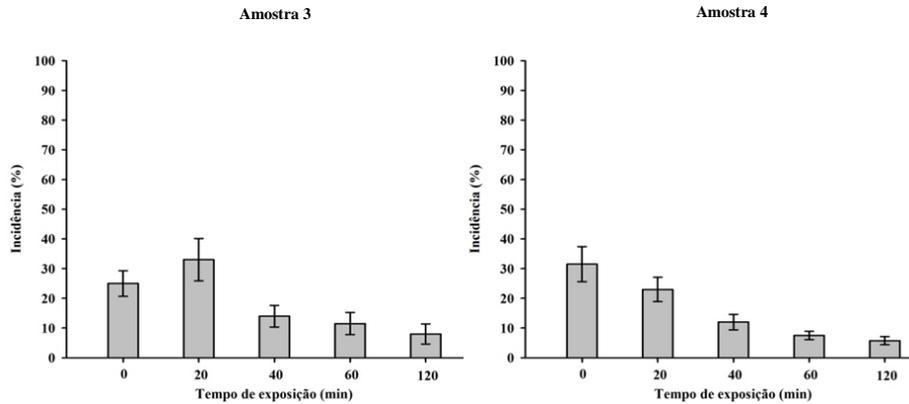


Figura 2.2 - Incidência (%) de Fusarium em diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos). (Conclusão)

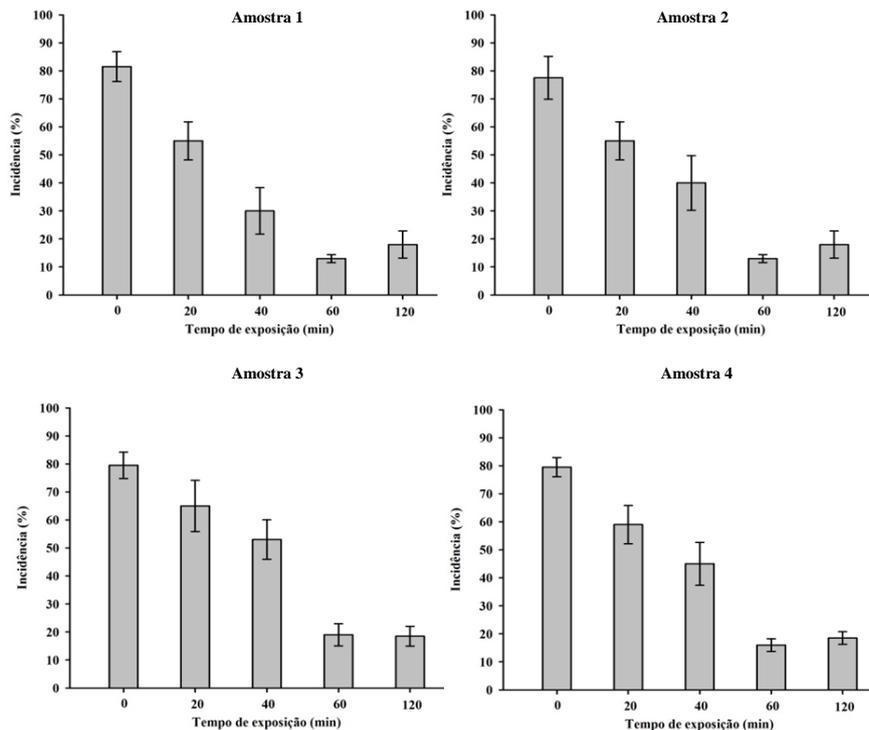


Fonte: Do autor (2018)

Para o patógeno *Penicillium sp.* (figura 2.3) foi observado uma redução gradativa da incidência a partir dos 20 minutos de tratamento das sementes para as 4 amostras, entretanto não foi observado diferença de redução de inoculo entre os tempos 60 e 120 de exposição ao ozônio.

Ozkan; Smilanick e Karabulut (2011) também confirmou que o efeito inibitório do ozônio na germinação de esporos de *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* e *Botrytis cinerea* em uvas foi maior com aumento da concentração de ozônio e tempo de exposição.

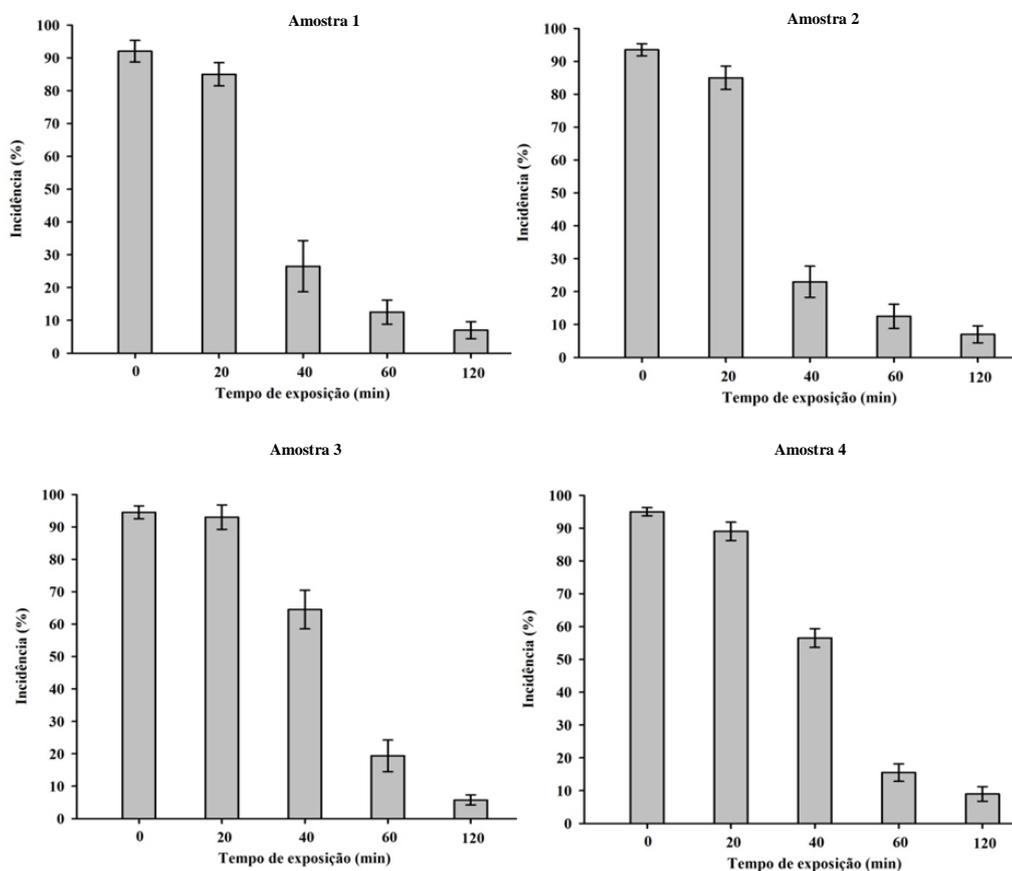
Figura 2.3 - Incidência (%) de Penicillium em diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos).



Fonte: Do autor (2018)

Para o patógeno alvo dos estudos, o *Colletotrichum gossypii* var. *Cephalosporioides*, (Figura 2.4) não houve diferença significativa entre as sementes não tratadas e as sementes tratadas com ozônio pelo período de 20 minutos. No entanto, percebe-se que com o aumento do tempo de exposição das sementes inoculadas para 40 minutos houve uma redução significativa da incidência do patógeno e quando expostas aos períodos de 60 e 120 minutos a redução observada foi ainda maior chegando a 80% de redução da incidência para as 4 amostras.

Figura 2.4 - Incidência (%) de *Colletotrichum* em diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos).

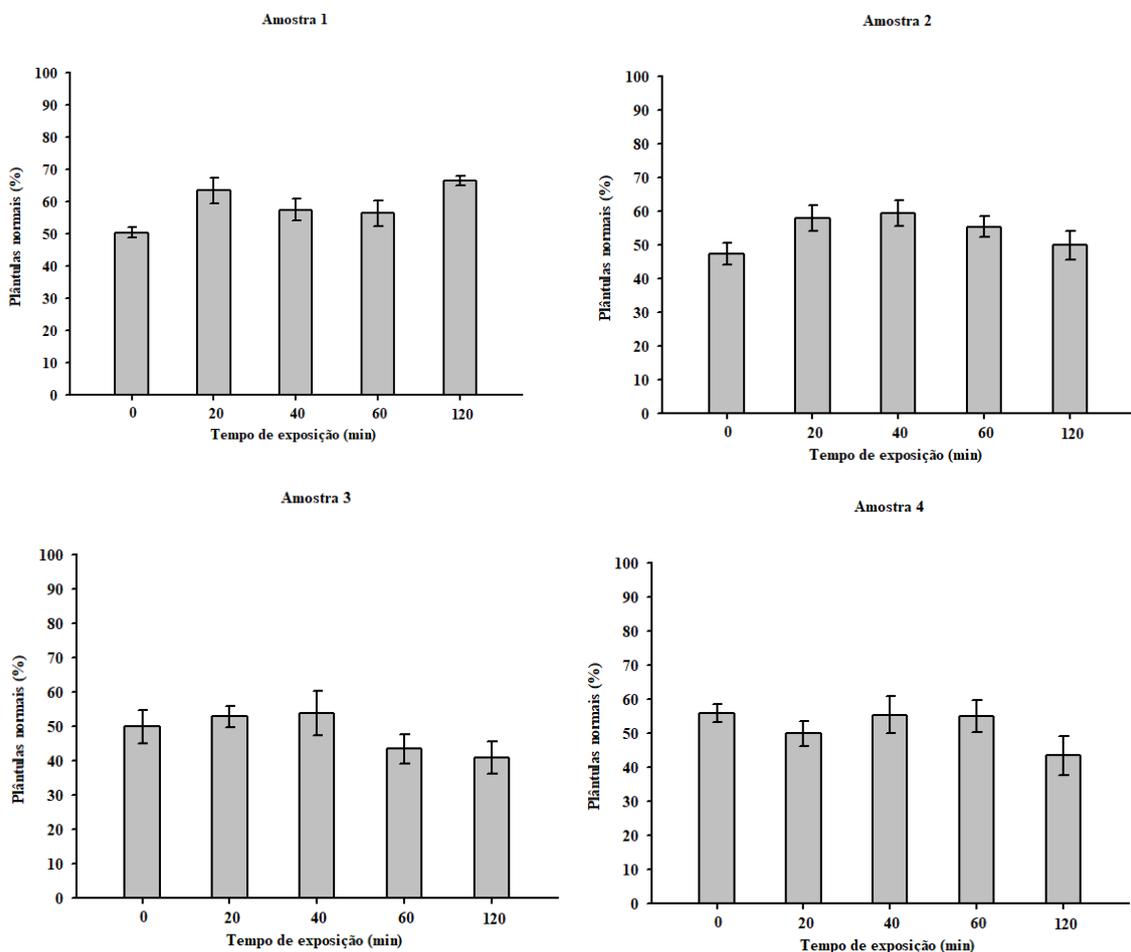


Fonte: Do autor (2018).

Isso pode ser explicado pois, o ozônio possui atividade fungitóxica e fungistática, podendo ser considerado uma alternativa adequada para o controle de patógenos e, sendo esse resultado, diretamente relacionado a concentração e tempo de exposição ao ozônio (ONG, et al., 2012). Esses resultados corroboram aos encontrados por Tzortzakís; Singleton e Barnes, (2008) que concluíram que o ozônio tem efeito altamente inibitório para a produção de esporos e crescimento de micélios de *Colletotrichum*.

Pelos resultados dos testes fisiológicos, na primeira contagem de germinação (FIGURA 2.5) para as amostras 1 e 2 observa-se um aumento da porcentagem de plântulas normais a partir dos 20 minutos de exposição ao ozônio. Já para as amostras 3 e 4 não houve diferença entre os tratamentos. A resposta mais positiva para o tratamento das sementes do lote 1 e 2 pode ser explicado por estas amostras permaneceram menos tempo, 48 horas, em contato com o inóculo e por isso ter favorecido a eliminação do patógeno durante o tratamento das sementes.

Figura 2.5 - Primeira contagem de germinação de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos).

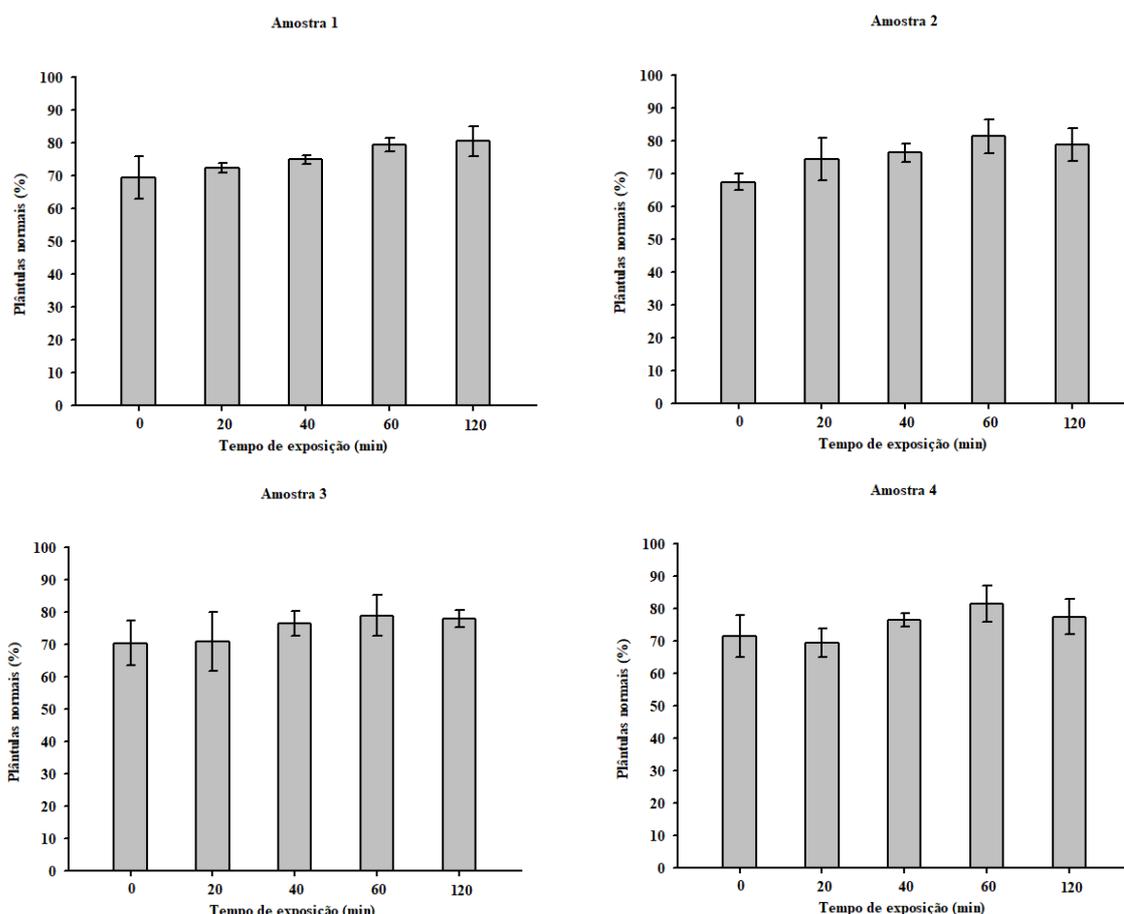


Fonte: Do autor (2018)

Para a germinação (Figura 2.6) não houve diferença significativa entre os tratamentos para nenhum das amostras, entretanto pode-se observar um discreto aumento da porcentagem de plântulas normais aos 60 minutos de exposição ao ozônio quando comparado com as sementes que não foram tratadas, uma vez que a germinação que estava em torno de 70% teve

um incremento de aproximadamente 10% para todas as amostras. Foi observado também que as amostras que não receberam o tratamento com ozônio tiveram maior número de plântulas anormais infectadas.

Figura 2.6 - Porcentagem de germinação de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos).

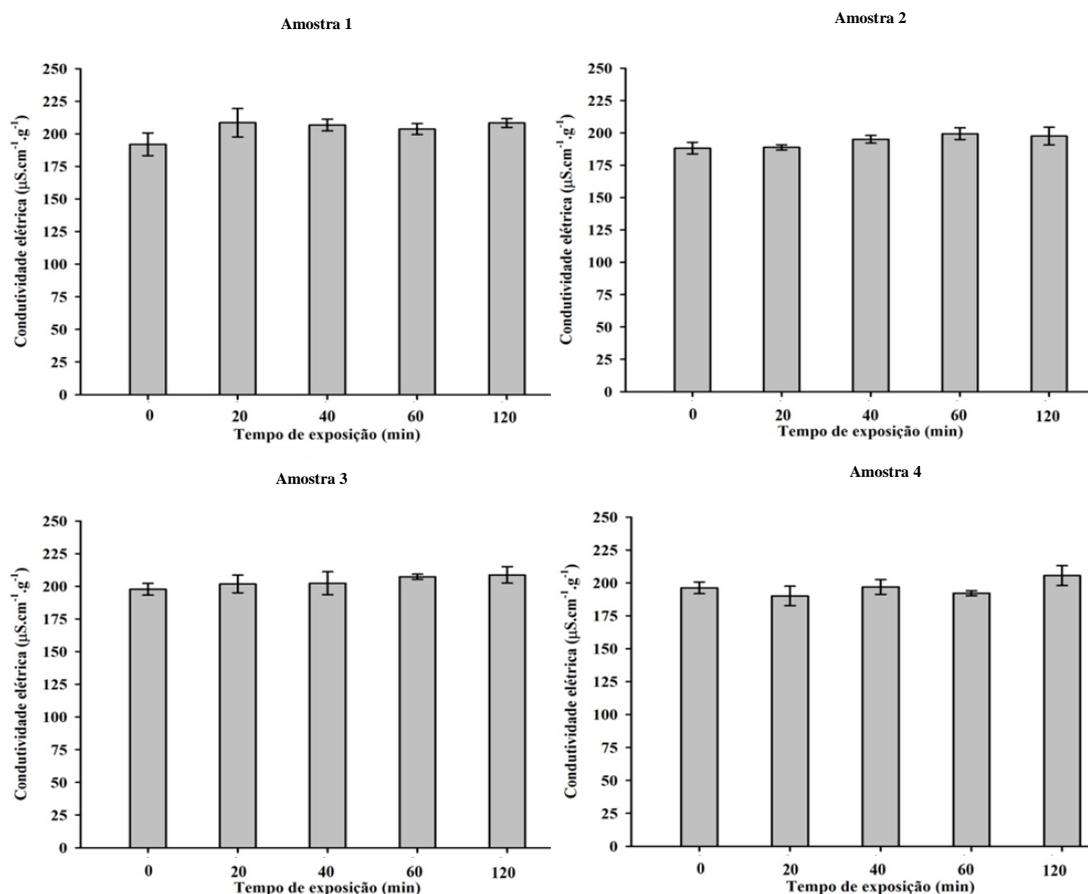


Fonte: Do autor (2018).

Savi et al. (2014), avaliando sementes de trigo concluiu que, a aplicação do ozônio por até 120 minutos não reduziu a porcentagem de germinação das sementes, demonstrando que este não foi danoso a qualidade fisiológica. O mesmo foi observado por Trinetta et al. (2011) trabalhando com tomate, melão e alface, que observaram que o tratamento com ozônio não reduziu a porcentagem de germinação das sementes.

Para condutividade elétrica das sementes (figura 2.7) não houve diferença significativa entre os tratamentos para nenhum das amostras, podendo-se inferir que o ozônio não causou danos à membrana das sementes de algodão.

Figura 2.7 - Condutividade elétrica de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos)

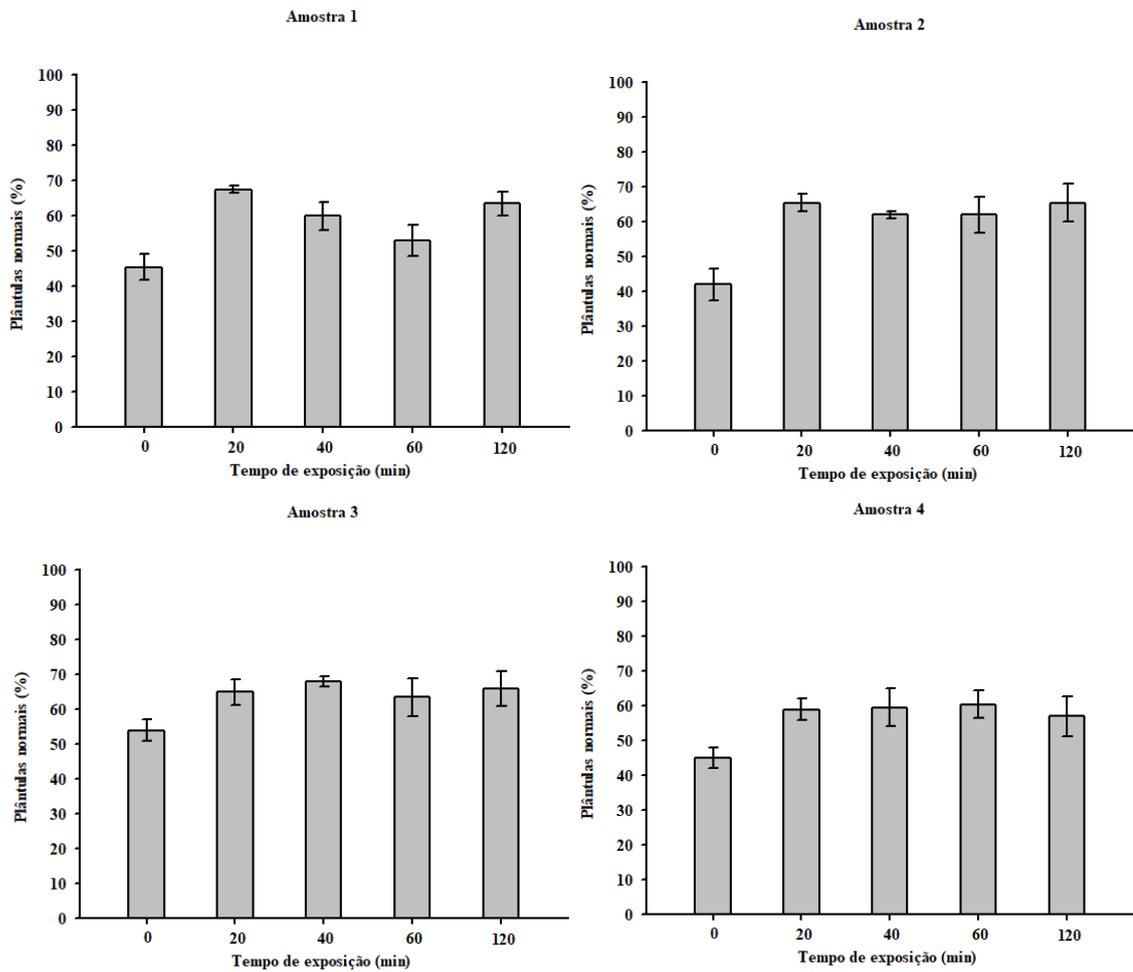


Fonte: Do autor (2018).

Quando as sementes começam a se deteriorar, um dos primeiros eventos que ocorrem é a perda da integridade do sistema de membranas, o que eleva os resultados de condutividade elétrica. Por estes resultados, pode-se perceber que o tratamento de sementes utilizando-se o gás ozônio, não levou a diminuição da permeabilidade das membranas, não afetando o vigor das sementes.

Quanto aos dados de plântulas normais após o envelhecimento acelerado (Figura 2.8) as sementes que receberam o tratamento com o ozônio apresentaram quantidade superior de plântulas normais quando comparadas com as sementes não tratadas. O teste de envelhecimento acelerado cria um ambiente com alta umidade e alta temperatura relativa, fator este que favorece o desenvolvimento de fungos durante o teste. Nas sementes que não receberam o tratamento com ozônio após o teste de envelhecimento foi observado a presença de colônias fúngicas, fato este que pode ter acarretado um menor número de plântulas normais ao final da avaliação do teste.

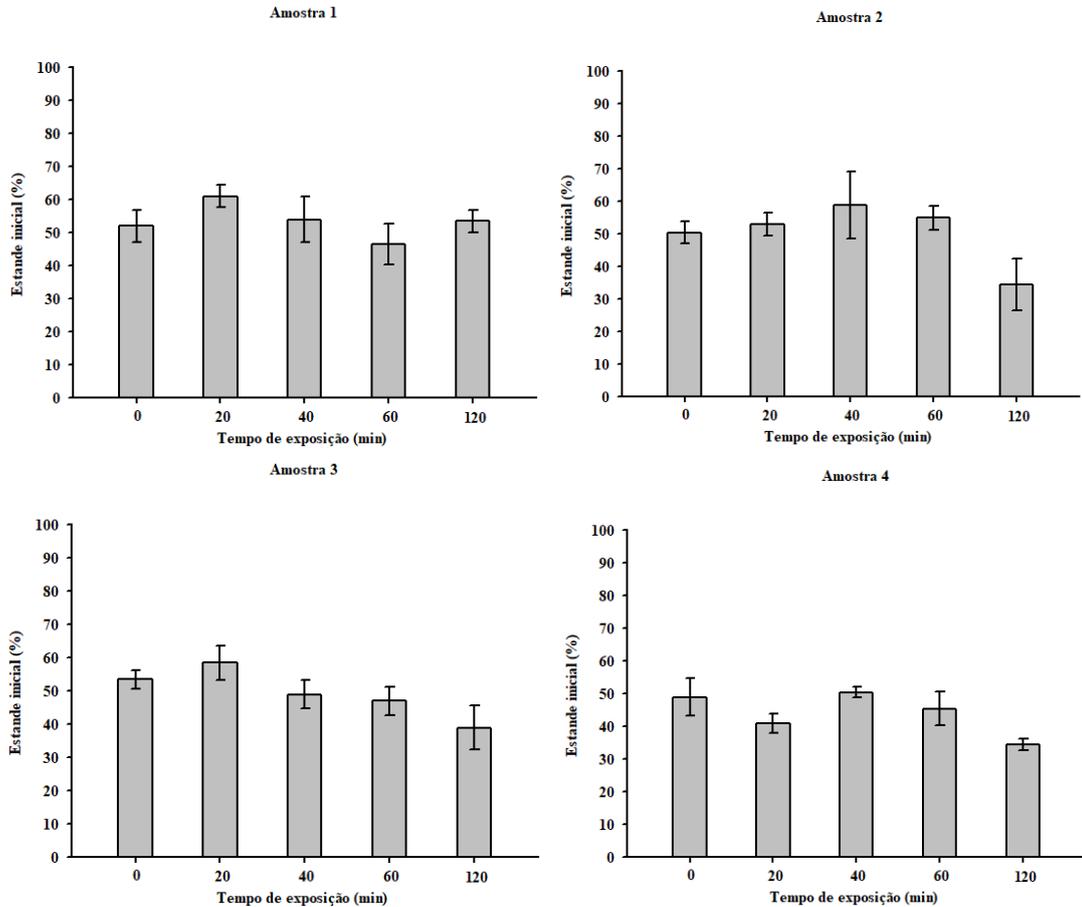
Figura 2.8 - Porcentagem de germinação após envelhecimento acelerado de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos).



Fonte: Do autor (2018)

O estande inicial das plântulas de algodão (Figura 2.9) não diferiram para as amostras 1 e 3, no entanto para as amostras 2 e 4 houve uma redução no estande inicial apenas para o tempo de 120 minutos de exposição ao ozônio. Alguns tratamentos de sementes são capazes de retardar o desenvolvimento inicial das plântulas, entretanto não apresentam diferenças no estande final como observado na figura 2.10.

Figura 2.9 - Estande inicial de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos)



Fonte: Do autor (2018)

De acordo com os dados de emergência de plântulas não houve diferença significativa entre as sementes tratadas e não tratadas com o ozônio bem como para o índice de velocidade de emergência (figura 2.10 e 2.11).

Figura 2.10 - Porcentagem de emergência de plântulas de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos) (Continua).

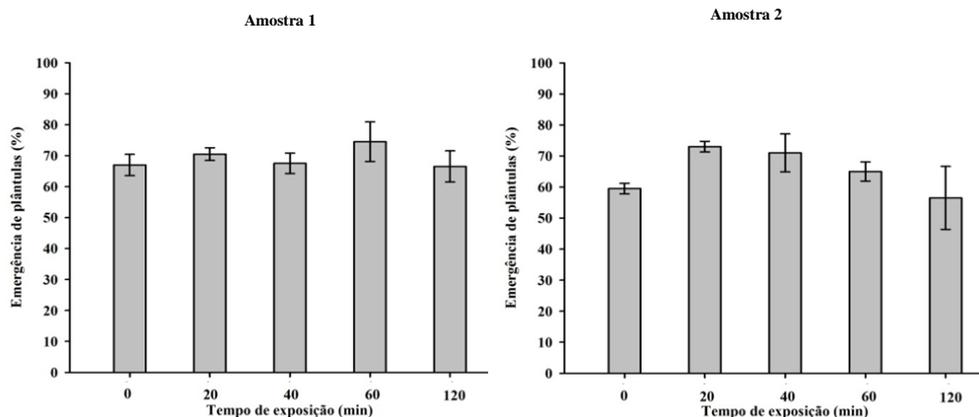
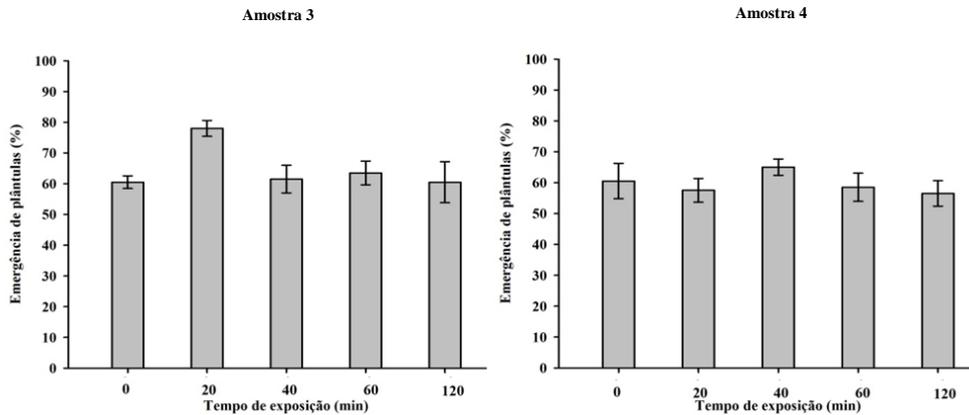


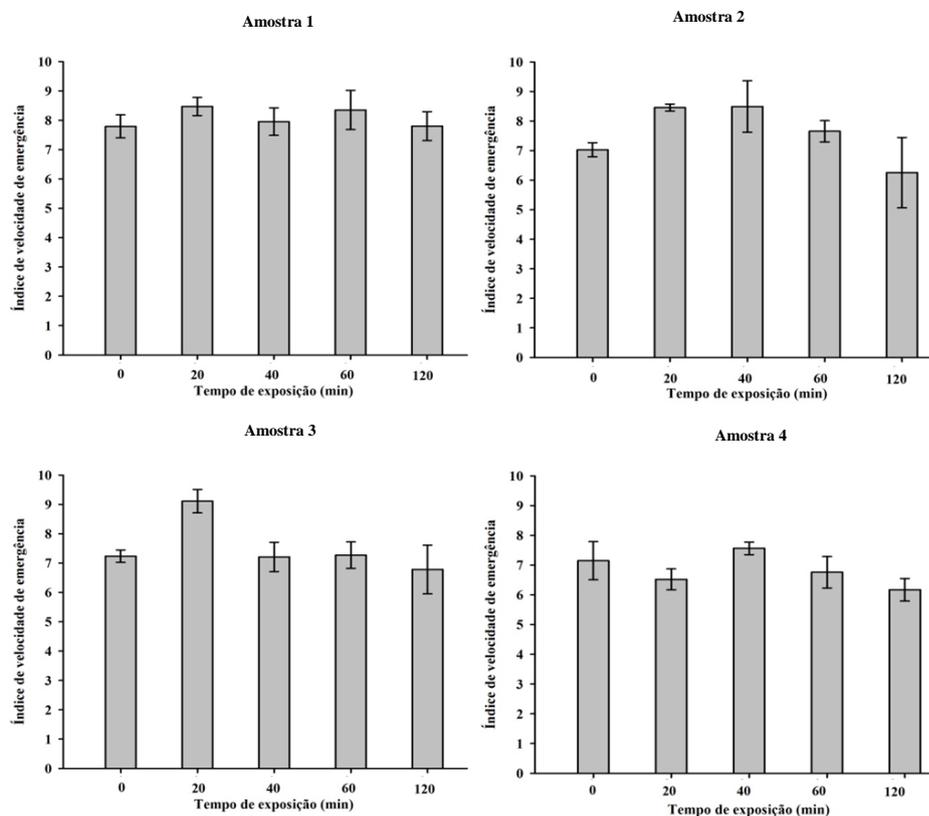
Figura 2.10 - Porcentagem de emergência de plântulas de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos) (Conclusão).



Fonte: Do autor (2018)

O maior IVE é um indicativo de maior vigor da semente, o que resultará em uma emergência mais rápida e uniforme em nível de campo. Desta forma, pode-se inferir a ausência de efeitos danosos no tratamento com ozônio para o vigor das sementes de algodão, o que garante em nível de campo bom estabelecimento da cultura (DAN et al., 2012).

Figura 2.11 - Índice de velocidade de emergência de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos)

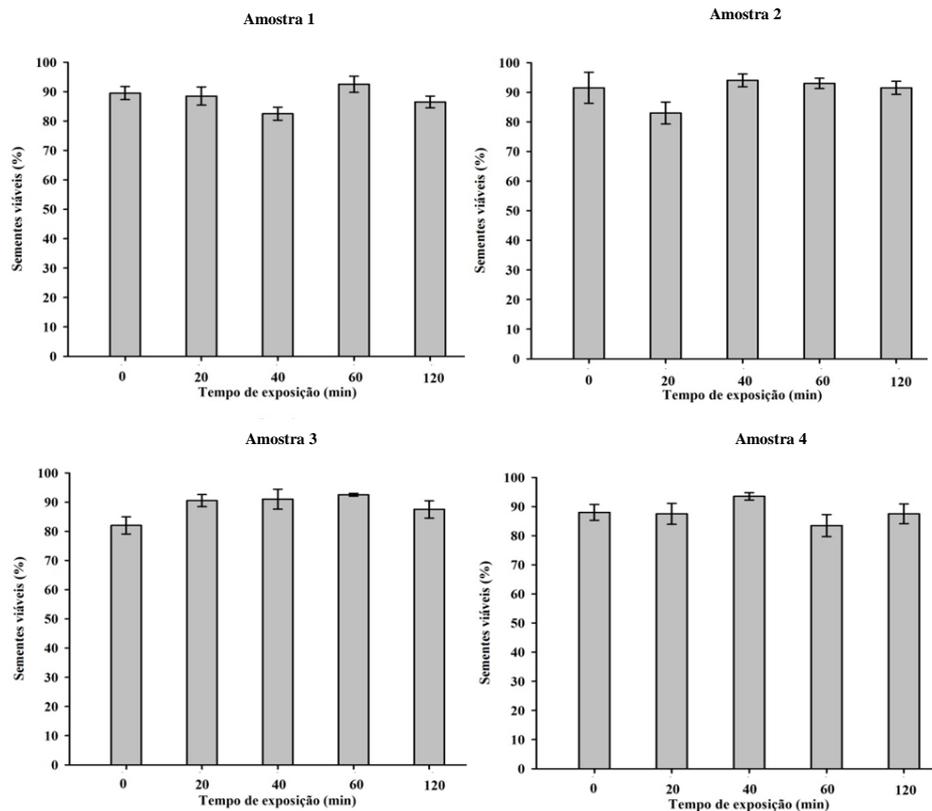


Fonte: Do autor (2018).

Por meio do teste de tetrazólio (figura 2.12) nota-se que não houve diferença significativa entre as sementes tratadas e não tratadas com ozônio, denotando que o ozônio não afeta a viabilidade das sementes durante o tratamento.

Esse fato é positivo, uma vez que, uma das características desejáveis no tratamento de sementes é que o produto utilizado não afete a sua viabilidade (MACHADO, 2000).

Figura 2.12- Porcentagem de sementes viáveis de diferentes amostras de sementes de algodão submetidos a diferentes tempos de ozonização (minutos).



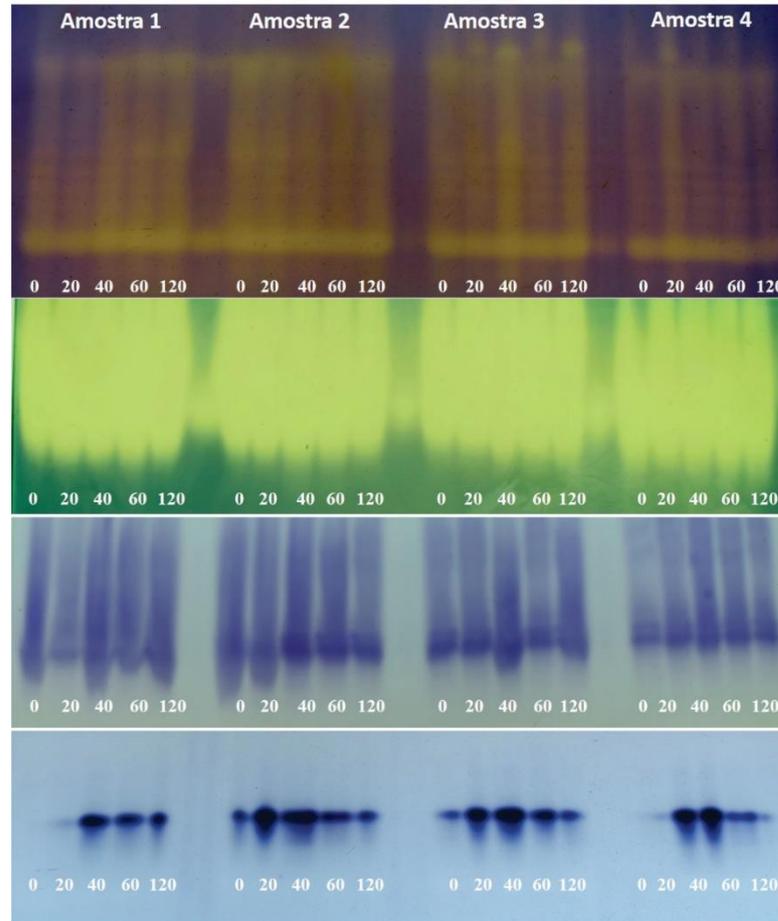
Fonte: Do autor (2018)

Pelos resultados obtidos por meio das análises enzimáticas verifica-se que não ocorreram alterações causadas por oxidações provenientes da utilização do gás ozônio, independentemente dos tempos testados, uma vez que ocorreram poucas mudanças nos perfis enzimáticos extraídos das sementes para as enzimas Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Malato desidrogenase (MDH) e Álcool desidrogenase (Figura 2.13).

A enzima superóxido dismutase (SOD), catalisa a dismutação do radical superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$  e a catalase (CAT) pode quebrar  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (CARNEIRO et al., 2011), sendo uma defesa primária importante contra os radicais livres gerados sob condições de estresse. Assim, quando há um aumento da expressão da CAT, este ocorre para eliminar a

acumulação de  $H_2O_2$  resultante da peroxidação lipídica em sementes (EYIDOGAN; OZ, 2007).

Figura 2.13 - Perfis enzimáticos de Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Malato desidrogenase (MDH) e Álcool desidrogenase (ADH) extraídas de sementes de algodão, submetidas a diferentes tempos de ozonização (minutos).



Fonte: Do autor (2018)

A enzima Malato desidrogenase (MDH) está ligada à geração de energia para processos metabólicos importantes, como a germinação (TAIZ; ZEIGER, 2009). Assim, mudanças importantes nesta enzima estão associadas a um processo de decomposição das sementes, devido à redução da atividade respiratória, resultando na degradação e inativação de outras enzimas (COPELAND; MCDONALD, 2001)

Pelos resultados observados na figura 2.13 para as enzimas SOD, CAT e MDH não há diferença na atividade enzimática das sementes tratadas com ozônio, quando comparadas as sementes sem tratamento, comprovando mais uma vez que o tratamento com ozônio não afetou a qualidade fisiológica das sementes.

A enzima álcool desidrogenase (ADH) (FIGURA 2.13) apresentou perfil distinto para as amostra estudadas, na primeira e quarta amostra na ausência do ozônio não houve atividade desta enzima, já no período de 20 minutos uma atividade discreta pode ser observada e no período de 40 minutos ocorre a maior expressão desta enzima, posteriormente é observado uma redução para os tempos de 60 e 120 minutos, já pra amostra 2 a enzima esteve presente em todos os tempos avaliados com menor atividade nos tempos de 0, 60 e 120 minutos e maior expressão nos tempos de 20 e 40, o mesmo ocorreu na amostra 3. A ADH não apresentou correlação com os dados fisiológicos observados neste trabalho.

#### 4 CONCLUSÕES

O ozônio reduz a incidência dos patógenos *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Aspegillus* e *Fusarium* a partir de 40 minutos de utilização na concentração de 25 g m<sup>-3</sup>.

O ozônio reduz a incidência de *Penicillium* a partir de 60 minutos de utilização na concentração de 25 g m<sup>-3</sup>.

O uso do ozônio não causou efeitos negativos à qualidade fisiológica e bioquímica das sementes de algodão, independentemente do tempo de exposição.

## REFERENCIAS

- ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa: Editora UFV, 2006. 627p.
- BELTRÃO, N. E. M.; SOUZA, J. G.. Fitologia do Algodoeiro herbáceo (sistemática, organografia e anatomia). In Beltrão, N. E. M. (ed). **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de Tecnologia. v. 1, p. 55 – 86, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 200 p. 2009a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 399 p. 2009b.
- CARNEIRO, M.M.L.C. et al. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.4, p.752-761, 2011
- CHITARRA, L. G.; BARBOSA, C. A. S., **Avaliação da Severidade e Controle Químico da Mancha de Ramulária (Ramularia areola) do Algodoeiro em Cultivo Adensado no Oeste da Bahia**. Campina Grande: Embrapa, 2012. 77p.
- CONAB. Acompanhamento safra bras. grãos, v. 5 Safra 2017/18 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-120, 2017.
- COPELAND, L. O.; MCDONALD, M. B. **Principles of seed Science and technology**. 4th ed. New York: Chapman and Hall, 2001. 467p
- DAN, L G. M. et al. Tratamento de sementes com inseticida e a qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 1, p. 45-51, 2011.
- EYIDOGAN, F.; OZ, M. T. Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings. **Acta Physiology Plant**, v. 29, p.485-493, 2007.
- GOULART, D. et al. Avanços na Análise de Sementes. **Seed News**, Pelotas, v. 12, n. 1, p. 12, 2008.
- LAPOLLI, F. R. et al. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In. GONÇALVES, R. F. (Coord.). **Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidropônica**. Vitória: PROSAB, p. 169-208.2003.
- MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: Editora UFLA, 2000, 138 p.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. 2. ed. Londrina: ABRATES, 2015. 659 p.

MENTEN, J. O.; MORAES, M. H. D. Tratamento de sementes: histórico, tipos, características e benefícios. **Informativo ABRATES**, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 52–53, 2010.

ONG, M. K. et al. Effect of gaseous ozone on papaya anthracnose. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 11, p. 2996-3005, 2013.

OZKAN, R.; SMILANICK, J. L.; KARABULUT, O. A. Toxicity of ozone gas to conidia of *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, and *Botrytis cinerea* and control of gray mold on table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 60, n. 1, p. 47-51, 2011.

RODRIGUES, V. O. et al. Treating sunflower seeds subjected to ozonization. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 37, n. 3, p. 202 - 210, 2015

SAVI, G. D.; PIACENTINI, K. C.; SCUSSEL, V. M. Ozone treatment efficiency in *Aspergillus* and *Penicillium* growth inhibition and mycotoxin degradation of stored wheat grains (*Triticum aestivum* L.). **Journal of food processing and preservation**, v. 39, n. 6, p. 940-948, 2015.

SAVI, G. D. et al. Ozone treatment efficiency on *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) quality and germination. **Journal of Stored Products Research**, Bridawe, v. 59, p. 245-253, 2014.

SILVA-MANN, R et al. AFLP markers differentiate *Colletotrichum gossypii* and *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v. 30, n. 2 p. 169-172, 2005.

SOUZA, J. B. **Avaliação de métodos para desinfecção de água, empregando cloro, ácido peracético, ozônio e o processo de desinfecção combinado ozônio/cloro**. 2006. 176 p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

SOUSA, Marcella V. et al. Methods of inoculation and effects of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton seeds. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 1, p. 41-48, 2008.

SUASSUNA N. D. et al. **Manejo de doenças do algodoeiro**, Campina Grande: Embrapa, 2006. (Circular técnica)

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719p.

TRINETTA, et al. A comparative study on the effectiveness of chlorine dioxide gas, ozone gas and e-beam irradiation treatments for inactivation of pathogens inoculated onto tomato, cantaloupe and lettuce seeds, **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 203-206, 2011

TZORTZAKIS, N.; SINGLETON, I.; BARNES, J. Deployment of low-level ozone enrichment for the preservation of chilled fresh produce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, n. 2, p. 261-270, 2007.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gossypii* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v 73, n. 1, p. 115-180, 2012.

### **CAPÍTULO 3**

## **TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA COM GÁS OZÔNIO**

## RESUMO

Amplamente utilizado, o tratamento químico de sementes pode causar perda da qualidade fisiológica devido à fitotoxidez que os princípios ativos podem causar. Nesse contexto, destaca-se o gás ozônio ( $O_3$ ) como eficiente agente desinfetante, porém seu uso no controle de patógenos e seus efeitos sobre a qualidade fisiológica de sementes ainda são escassos. Neste contexto, teve-se como objetivo avaliar a eficácia do gás ozônio como agente controlador de fitopatógenos e o reflexo sobre a qualidade fisiológica de sementes de soja. Para isso, sementes de duas cultivares de soja foram tratadas com gás ozônio em duas concentrações (15 e 25  $g\ m^{-3}$ ) em cinco tempos de exposição (0, 20, 40, 60 e 120 minutos). Após os tratamentos, a qualidade das sementes foi avaliada pelos testes de sanidade, tetrazólio, primeira contagem de germinação, porcentagem de germinação, estande inicial, porcentagem de emergência, índice de velocidade de emergência, condutividade elétrica, envelhecimento acelerado e atividade enzimática. Foram encontrados seis gêneros de fungos nas sementes de sojas avaliadas, sendo: *Phomopsis sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Cercospora kikuchi* e *Alternaria sp.* Concluiu-se que o tratamento sanitário com gás ozônio na concentração de 15  $g\ m^{-3}$  por 20 minutos reduz a incidência dos fungos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Phomopsis* e não afeta a qualidade fisiológica e bioquímica de sementes de soja.

**Palavras-chaves:** *Glycine max* (L.) Merrill, sanidade, qualidade fisiológica.

## 1 INTRODUÇÃO

Devido a importância que a cultura da soja adquiriu para a economia brasileira, cada vez mais busca-se cultivares com maiores produtividades. No entanto, cultivos intensivos têm gerado uma maior pressão de seleção de pragas e doenças, o que torna imprescindível a utilização de sementes tratadas, principalmente para garantir a sobrevivência das plantas no início do ciclo, uma vez que as sementes caracterizam-se como fontes de inóculos na disseminação de doenças, principalmente à longas distâncias, causados na sua maioria por fungos.

A ocorrência de fungos em sementes de soja tem sido relatada em diversos países onde a cultura é explorada. Alguns destacam-se como de importância econômica como as espécies *Phomopsis spp.*, *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium spp.*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cercospora kikuchii*, *Aspergillus spp.* e *Rhizoctonia solani*. Além desses, outros de importância secundária são detectados com bastante frequência, a exemplo de *Penicillium spp.*, *Alternaria spp.*, *Chaetomium spp.*, *Cladosporium spp.*, *Curvularia spp.*, *Epicoccum spp.*, *Rhizopus spp.* e *Nigrospora spp.*, entre outros; e seu controle basicamente é feito com fungicidas, via tratamento químico das sementes (LEE et al., 2015; FERREIRA et al., 2016; CONCEIÇÃO et al., 2016; ZAMBIAZZI et al., 2017).

Amplamente utilizado, o tratamento químico de sementes pode causar perda da qualidade fisiológica, dependendo do princípio ativo e da dose do produto utilizado, principalmente ao longo do armazenamento, o que leva a busca por tratamentos alternativos que sejam eficientes e com menor fitotoxidez. Assim processos desinfestantes como medida preventiva podem reduzir o uso de produtos químicos em sementes de soja armazenada.

Neste contexto, destaca-se o gás ozônio (O<sub>3</sub>), que possui comprovada aplicabilidade na desinfestação de ambientes hospitalares, alimentos e utensílios, devido a sua elevada capacidade de oxidação (KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001), o gás também é usado como desinfestante para microrganismos e vírus, remoção de odor e sabor, cor e decomposição de matéria orgânica (CATALDO, 2008; KARACA; VELIOGLU, 2009; KARACA; VELIOGLU; NAS, 2010); em adição possui vantagem ecológica, por descartar a necessidade de manipulação, armazenamento ou eliminação dos recipientes dos produtos químicos e por gerar oxigênio como produto de sua degradação, além de poder ser produzido no local de tratamento (KEELS et al., 2001; MENDEZ et al., 2003).

Como agente fungicida, sua eficácia foi efetivamente comprovada ao controlar o crescimento de vários fungos em ensaios de laboratório com alimentos, como cevada, trigo,

figos e castanha do Pará (KOTTAPALLI; WOLF-HALL; SCHWARZ, 2005; WU; DOAN; CUENCA, 2006; ZORLUGENÇ et al., 2008; SCUSSEL et al., 2011) e por reduzir a contaminação de micotoxinas em amendoim, figos e castanha do Pará, e em ensaios de campo com milho contaminado artificialmente (ZORLUGENÇ et al., 2008; MCDONOUGH et al., 2011; SCUSSEL et al., 2011).

Porém, o gás ozônio não é universalmente benéfico, pois pode promover alterações em constituintes químicos em alimentos, grãos e sementes pela oxidação e degradação de amidos, lipídios, modificações de proteínas, descoloração de grãos e perda de poder germinativo em sementes podem ocorrer devido ao uso excessivo do gás (TIWARI et al., 2010).

Apesar de eficaz, ainda são escassos trabalhos que comprovem sua eficiência no tratamento de sementes, destacando-se os realizados em sementes de girassol por Rodrigues et al. (2015) e milho (WHITE et al., 2010; WHITE et al., 2013, MYLONA et al., 2014). Desse modo, faz-se necessário a realização de testes para verificar a eficácia do gás ozônio no controle de fitopatógenos em outras espécies bem como as alterações que podem ocorrer sobre a qualidade fisiológica das sementes.

Neste contexto, teve-se como objetivo avaliar a eficiência do gás ozônio como agente controlador de fitopatógenos e seu efeito na qualidade fisiológica de sementes de soja.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizadas sementes de duas cultivares de soja (Soja RR e Soja Intacta RR2 PRO) cedidas pela empresa Syngenta<sup>®</sup> as quais foram produzidas em Uberlândia-MG, e tratadas com gás ozônio na empresa Ozone & Life<sup>®</sup> em São José dos Campos-SP

Utilizando-se do equipamento gerador de ozônio, modelo O&L 35.0 rm, as sementes foram dispostas em uma câmara de fluxo contínuo e submetidas a cinco tempos de exposição e duas concentrações, como métodos de desinfestação. Após os tratamentos a qualidade fisiológica das sementes foi avaliada pelos seguintes testes e determinações:

Teste de sanidade: foi realizada por meio do método de papel de filtro (Blotter-Test). Para isto, foram avaliadas 200 sementes distribuídas em oito repetições, as quais acondicionadas em placas de Petri, contendo três folhas de papel germitest previamente umedecidas com uma solução de 2,4 diclorofenoxiacetato de potássio (2,4-D) a 5 ppm e agar-agar (1%). A seguir as placas foram incubadas por sete dias à 20 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Para avaliar a incidência de fungos a avaliação foi realizada, em cada semente,

anotando-se todos os fungos encontrados, sendo a identificação realizada por meio de microscópio estereoscópico (BRASIL, 2009a).

Teste de germinação: 200 sementes de cada tratamento, em quatro repetições foram semeadas em papel germitest, umedecido com 2,5 vezes o peso seco do substrato e confeccionados na forma de rolos e mantidos em germinador a 25 °C. A primeira contagem foi realizada no 5º dia após a semeadura e a última contagem no 8º dia. Os resultados foram expressos em porcentagem (BRASIL, 2009b).

Teste de tetrazólio: 200 sementes de cada tratamento foram pré-umedecidas entre papel úmido por 16h a 25 °C. Para a coloração foi utilizada a solução do sal 2-3-5-trifenilcloreto de tetrazólio a 0,075%, onde as sementes permaneceram embebida por 3h a 40 °C, na ausência de luz. Ao final do período de coloração, a solução foi descartada e as sementes foram lavadas em água corrente e mantidas submersas até o final da avaliação para evitar o ressecamento. O resultado do teste de tetrazólio foi obtido pela porcentagem média de sementes viáveis e vigorosas (FRANÇA NETO; KRYZANOWSKI; SILVA, 1998)

Envelhecimento acelerado: 200 sementes de cada tratamento foram dispostas sobre uma tela de alumínio fixada a um gerbox. Em cada gerbox foram colocados 40 mL de água e em seguida mantidos em BOD a 41 °C por 48 horas (MARCOS FILHO, 2015). Após esse período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação com avaliação realizada no 5º dia após a semeadura, conforme metodologia descrita para o teste de germinação.

Emergência de plântulas: a semeadura foi realizada em substrato areia e solo na proporção 2:1 e mantido em bandejas plásticas. O umedecimento do substrato foi efetuado com um volume de água correspondente a 70% da capacidade de retenção do substrato. Após a semeadura as bandejas foram dispostas em câmara de crescimento à temperatura de 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. A contagem foi realizada diariamente, após a primeira plântula emergida, até o completo estabelecimento das plântulas para obtenção do índice de velocidade de emergência (IVE), adaptando-se fórmula proposta por Maguire (1962), e para a porcentagem de emergência foi computado o número de plântulas normais aos 15 dias após a semeadura.

Condutividade elétrica de massa: quatro repetições foram pesadas e em seguida colocadas em copos plásticos contendo 75 mL de água deionizada. Após 24 horas de embebição a 25 °C, a condutividade elétrica foi determinada com auxílio de um condutivímetro e o resultados expressos em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , de acordo com Vieira et al. (2002).

Análise isoenzimática: 50 gramas de sementes foram maceradas com antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) em nitrogênio líquido. Foram pesadas subamostras de 100 mg do

material macerado e acrescido de 250  $\mu\text{L}$  do tampão de extração (Tris HCl 0,2M pH 8,0 + 0,1% de  $\beta$ -mercaptoetanol). O material foi colocado em geladeira (4 °C) por 12 h e depois centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos a 4 °C. A eletroforese em géis de poliacrilamida foi desenvolvida em sistema descontinuo (4,5% gel de concentração e 7,5% gel de separação). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Para proceder a corrida eletroforética, foram aplicados nas canaletas dos géis 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra e a corrida realizada a 4 °C por quatro horas a uma voltagem constante de 150 V. Ao término da corrida, os géis foram revelados para as enzimas Malato desidrogenase (MDH), Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), Peroxidase (PO) e Isocitrato liase (ISO), conforme protocolos contidos em Alfenas (2006).

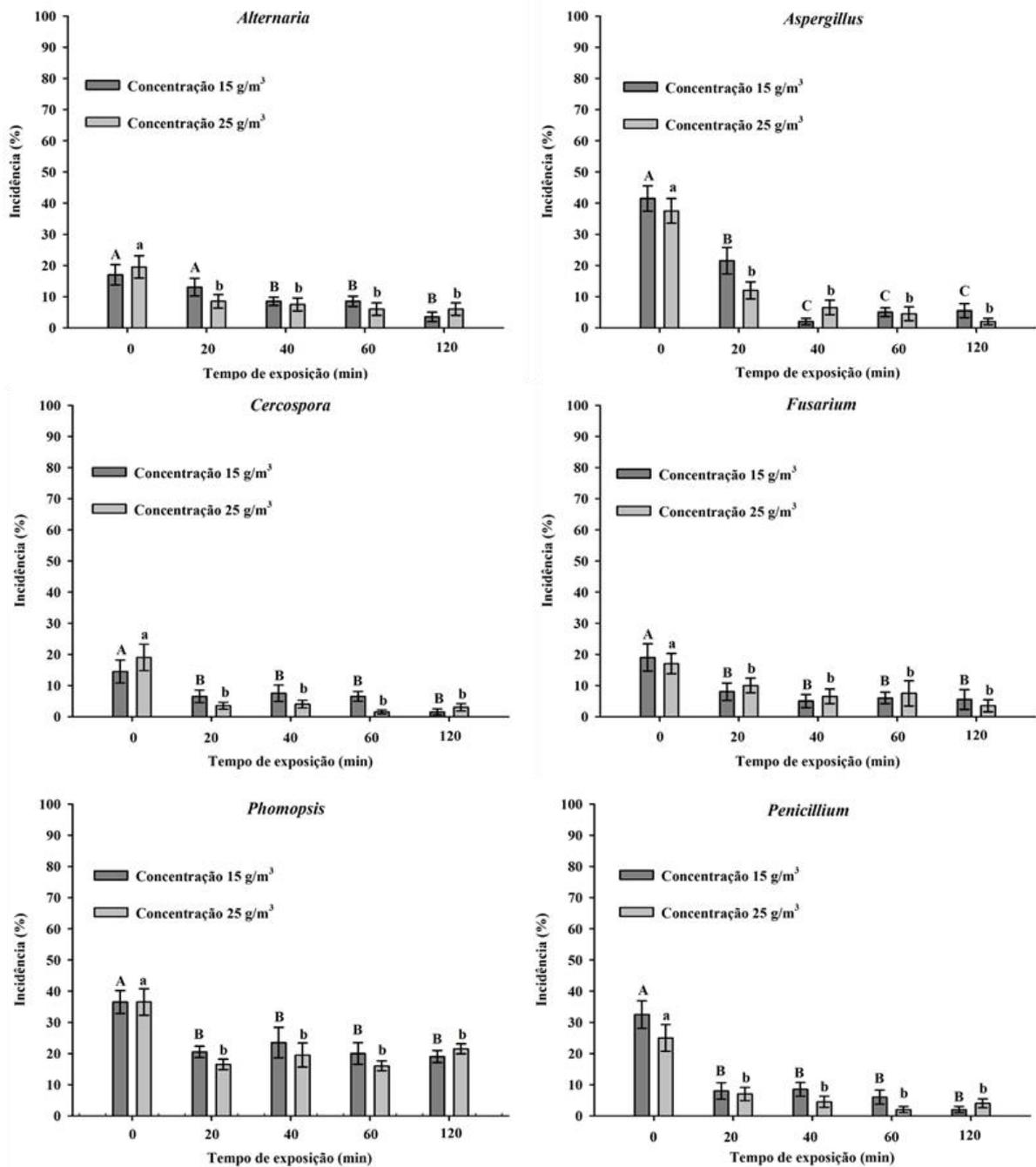
Procedimento estatístico: os resultados de cada cultivar foram analisados separadamente adotando-se fatorial 5x2 em um delineamento inteiramente casualizado, sendo cinco tempos de exposição (0, 20, 40, 60 e 120 minutos) e duas concentrações de gás ozônio (15 e 25  $\text{g m}^{-3}$ ) com quatro repetições de 50 sementes. Os dados foram submetidos às análises de variância.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De forma semelhante, para as duas cultivares, o gás ozônio, independente da concentração e do tempo de exposição, reduziu a incidência de patógenos nas sementes de soja em relação as não tratadas, porém sem eliminá-los. Após análise sanitária, observou-se a presença de seis espécies de fungos, identificados como: *Phomopsis sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Cercospora kikuchi* e *Alternaria sp.*

Para a cultivar 1, três espécies de fungos encontravam-se em maior quantidade nas sementes não tratadas, sendo os fungos *Phomopsis sp.*, *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.* que apresentaram maior incidência, em torno de 35%, esse valor foi reduzido pela ação do ozônio para valores abaixo de 10%, exceto para *Phomopsis sp.*, que apesar de ser reduzido permaneceu com valores superiores de incidência (19%), em relação aos demais patógenos. Os demais, *Fusarium sp.*, *Cercospora kikuchi* e *Alternaria sp.*, com média de incidência em torno de 20% também foram reduzidos para valores inferiores a 10%, independente da concentração de ozônio utilizada (Figura 3.1).

Figura 3.1 - Incidência de fungos presentes em sementes de soja, da cultivar 1, sem tratamento e tratadas com gás ozônio em duas concentrações

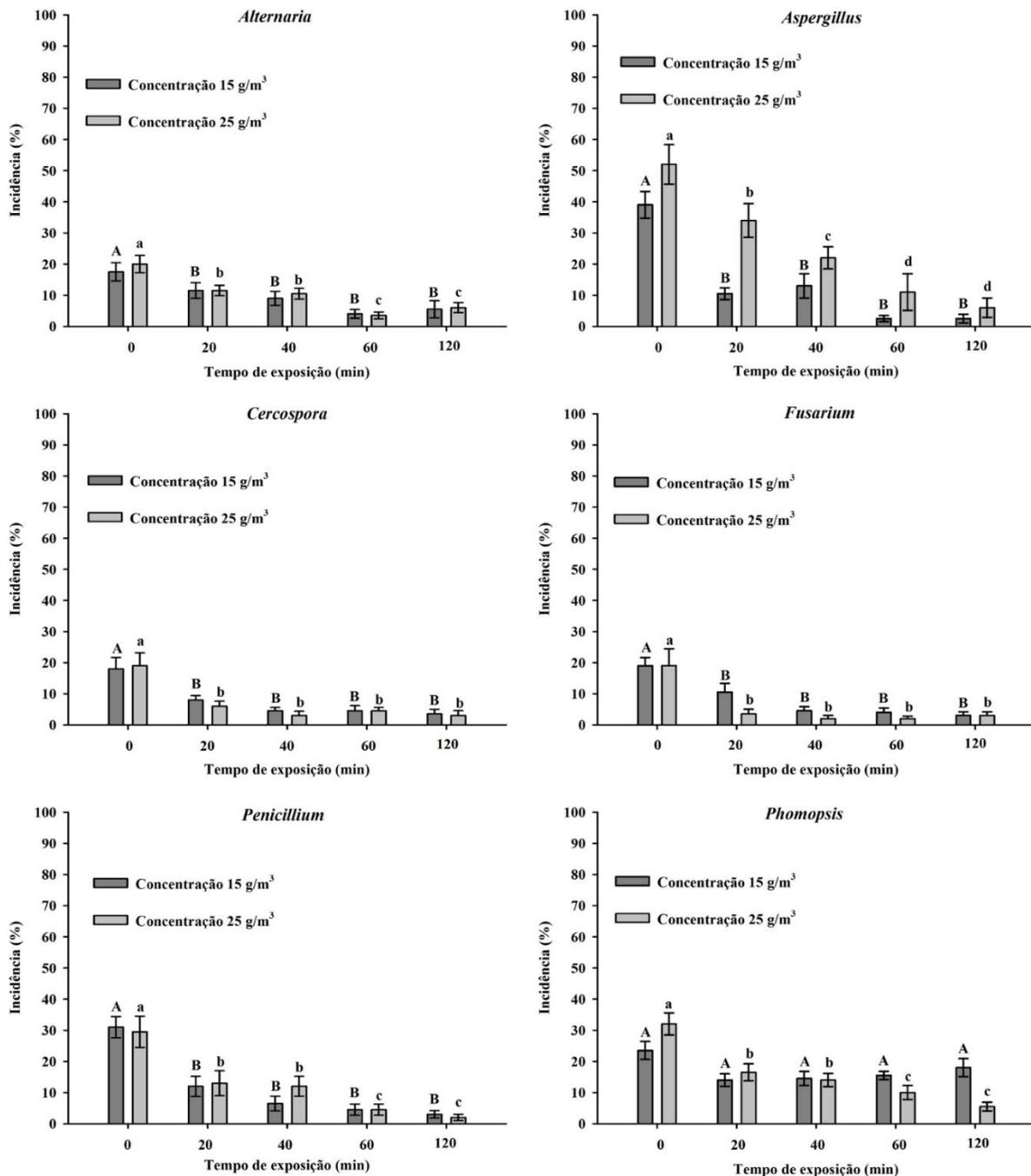


\*letras maiúsculas diferenciam a concentração 15g m<sup>-3</sup> e letras minúsculas diferenciam a concentração 25g m<sup>-3</sup> a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott  
 Fonte: Do autor (2018)

Comportamento semelhante foi observado para as sementes da segunda cultivar, que tiveram maiores incidências para os fungos *Phomopsis sp.* (32%), *Penicillium sp.* (31%) e

*Aspergillus sp.* (39%), que foram reduzidos pela ação do ozônio, independente da concentração utilizada (Figura 3.2).

Figura 3.2 - Incidência de fungos presentes em sementes de soja, da cultivar 2, sem tratamento e tratadas com gás ozônio em duas concentrações



\*letras maiúsculas diferenciam a concentração 15g m<sup>-3</sup> e letras minúsculas diferenciam a concentração 25g m<sup>-3</sup> a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

Fonte: Do autor (2018)

O tratamento das sementes com gás ozônio foi promissor, por possuir a capacidade de reduzir a incidência de fungos nas sementes de soja das cultivares avaliadas, porém não foi

capaz de eliminar totalmente a presença dos patógenos, a técnica foi vantajosa devido ao ganho ecológico proporcionado pela utilização do ozônio, que reduz a necessidade de tratamento químico.

Diferentes autores utilizando tratamentos com fungicida em sementes de soja observaram que os produtos não eliminam completamente a presença de microrganismos nas sementes, como os resultados observados por Pereira et al. (2011), Conceição et al. (2014), Conceição et al. (2016) e Ferreira et al. (2016), cuja eficiência de diferentes tratamentos com fungicidas assemelha-se ao obtido nesse estudo com a utilização do gás ozônio.

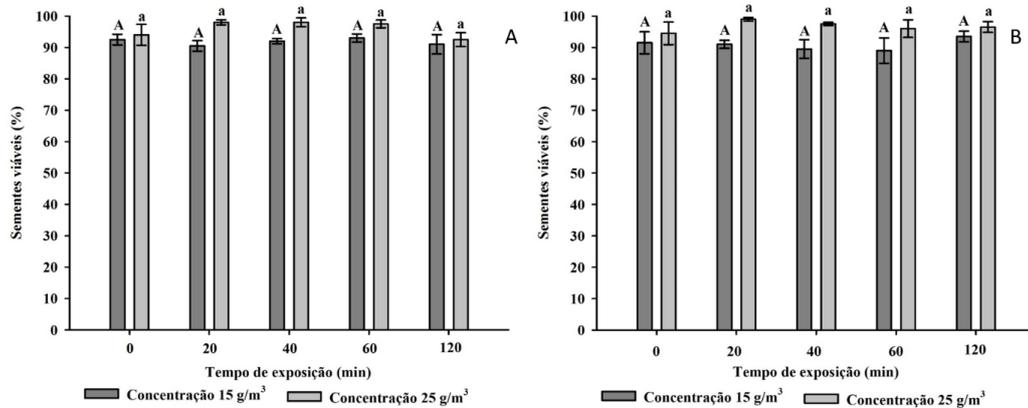
Observada a eficiência dos diferentes fungicidas na melhoria da qualidade sanitária de sementes, alguns autores associam a ação desses produtos à possíveis perdas na qualidade fisiológica das sementes, resultando em redução na germinação, dificultam a sobrevivência e causam anormalidades de plântulas, como redução do mesocótilo, fissuras foliares, folhas retorcidas e grossas; caracterizando o efeito fitotóxico dos produtos testados, principalmente quando armazenadas (LUDWIG et al., 2011; ABATI et al., 2014; FERREIRA et al., 2016).

Diferente do que foi observado pelos autores, ao avaliar diferentes tratamentos químicos com produtos fungicidas, o gás ozônio não afetou negativamente a qualidade fisiológica das sementes de soja das cultivares avaliadas, independentemente do tempo de exposição e concentração utilizados, ou seja, não foi observado efeito fitotóxico, sendo vantajoso quando comparado aos produtos químicos.

A ausência de efeito negativo sobre a qualidade fisiológica das sementes de soja pode ser observada pelos resultados obtidos nos diferentes testes aos quais as sementes, das duas cultivares, foram submetidas. Do contrário, observou-se uma discreta melhoria na qualidade fisiológica das sementes, possivelmente devido a redução dos patógenos presentes nas sementes.

Com relação ao teste de tetrazólio, o gás ozônio não afetou a viabilidade das sementes de soja das duas cultivares avaliadas, com resultados semelhantes aos observados para as sementes sem tratamento (Figura 3.3).

Figura 3.3 - Porcentagem de viabilidade de sementes de soja pelo teste de tetrazólio de duas cultivares (Cultivar 1 - A e Cultivar 2 - B) tratadas com gás ozônio em duas concentrações



\*letras maiúsculas diferenciam a concentração 15g m<sup>-3</sup> e letras minúsculas diferenciam a concentração 25g m<sup>-3</sup> a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

Fonte: Do autor (2018).

Para as cultivares de soja, observou-se que o tratamento das sementes com ozônio não afetou o vigor das sementes, dado os resultados de primeira contagem de germinação, que mantiveram uma média de 80% de germinação, valor em média dez pontos percentuais superior ao observado para as sementes sem tratamento (0 minutos), tanto para a cultivar 1 (Figura 3.4A) como para a cultivar 2 (Figura 3.4B) ao longo de 120 minutos de exposição.

Figura 3.4 - Valores de primeira contagem (A) e porcentagem de germinação de sementes (C) da cultivar 1 e de primeira contagem (B) e porcentagem de germinação de sementes (D) da cultivar 2 de soja tratadas com gás ozônio em duas concentrações. (Continua)

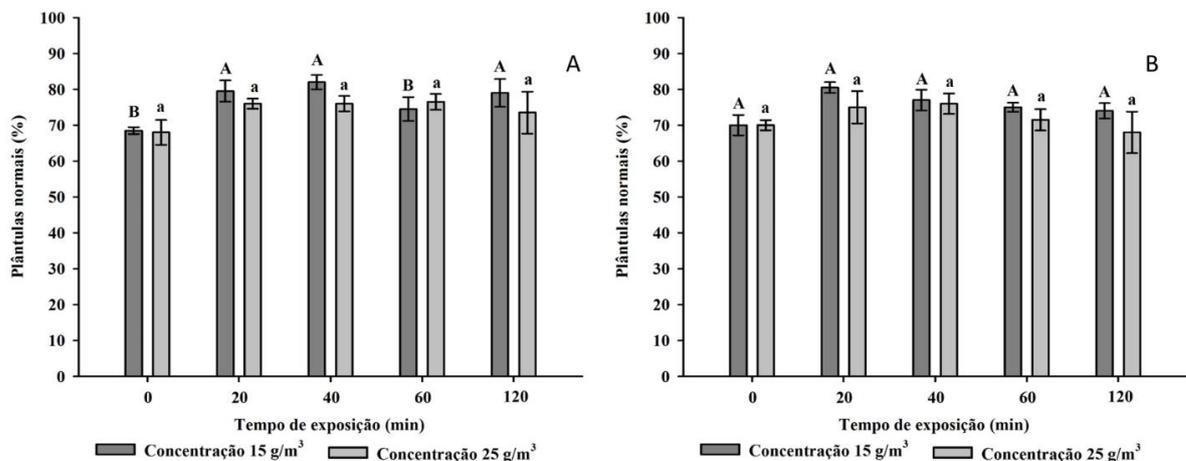
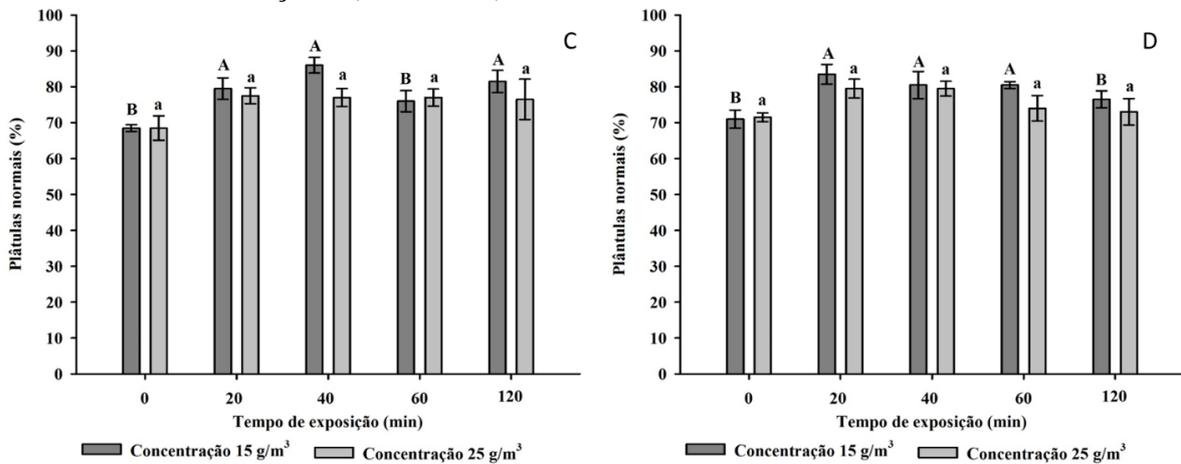


Figura 3.4 - Valores de primeira contagem (A) e porcentagem de germinação de sementes (C) da cultivar 1 e de primeira contagem (B) e porcentagem de germinação de sementes (D) da cultivar 2 de soja tratadas com gás ozônio em duas concentrações. (Conclusão)



\*letras maiúsculas diferenciam a concentração 15g m<sup>-3</sup> e letras minúsculas diferenciam a concentração 25g m<sup>-3</sup> a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

Fonte: Do autor (2018)

Ainda com relação ao vigor das sementes, os resultados obtidos nos testes de condutividade elétrica e germinação após envelhecimento acelerado das sementes, reforçam o que foi observado para germinação das sementes de soja das duas cultivares avaliadas.

Apesar de apresentar maiores valores de condutividade elétrica, a cultivar 1 (Figura 3.5A) não teve seus valores alterados em função dos tratamentos de exposição e concentração de ozônio, o mesmo foi observado para as sementes da cultivar 2 (Figura 3.5B).

Figura 3.5 - Condutividade elétrica (A, B) e germinação após envelhecimento acelerado (C, D) de sementes de soja de duas cultivares (cultivar 1 A, C e Cultivar 2 B, D) tratadas com gás ozônio em duas concentrações (Continua)

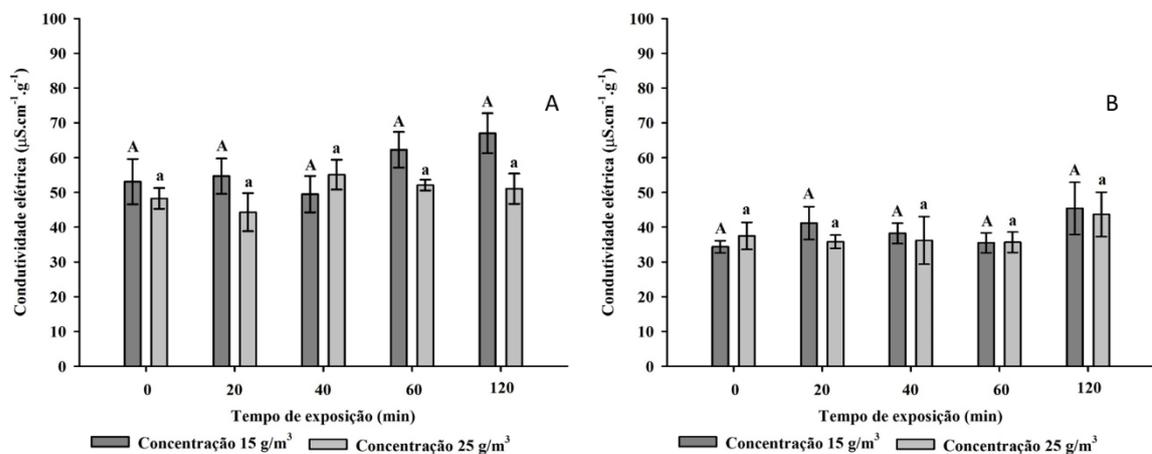
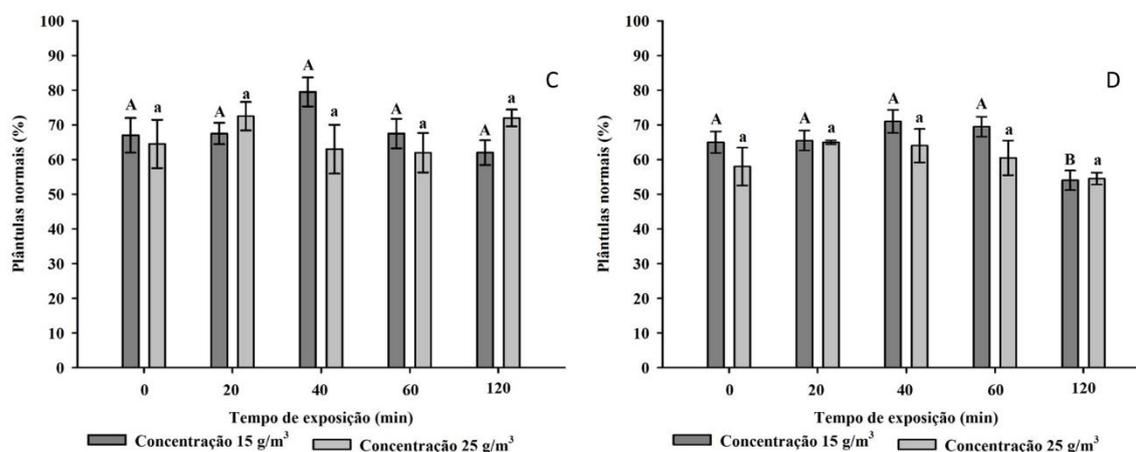


Figura 3.5 - Condutividade elétrica (A, B) e germinação após envelhecimento acelerado (C, D) de sementes de soja de duas cultivares (cultivar 1 A, C e Cultivar 2 B, D) tratadas com gás ozônio em duas concentrações. (Conclusão)



\*letras maiúsculas diferenciam a concentração 15g m<sup>-3</sup> e letras minúsculas diferenciam a concentração 25g m<sup>-3</sup> a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

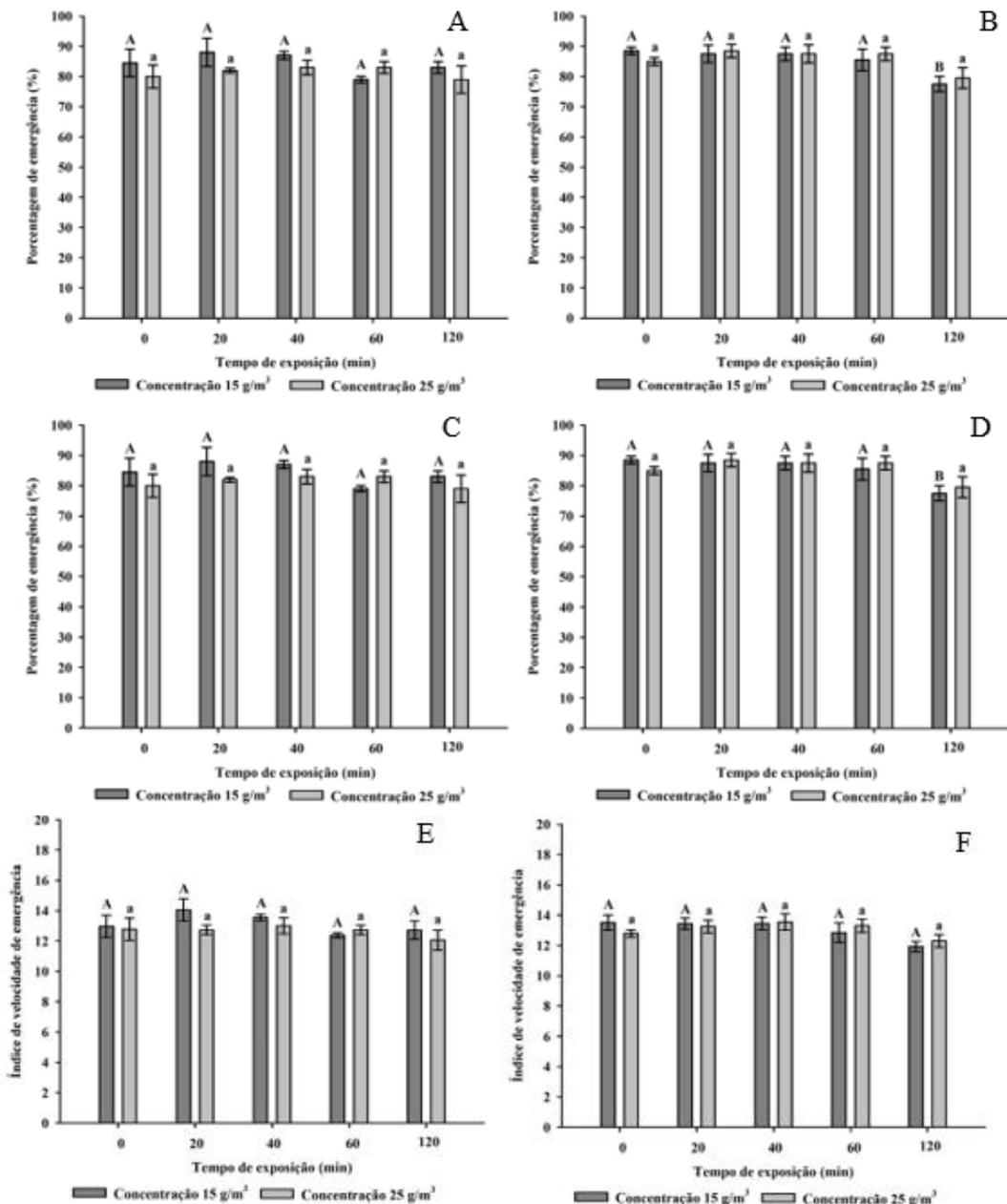
Fonte: Do autor (2018)

O mesmo comportamento foi observado para a germinação das sementes submetidas ao envelhecimento acelerado, cujos valores de germinação foram pouco alterados em função do tratamento com ozônio, independentemente do tempo e da concentração utilizados, tanto para a cultivar 1 (Figura 3.5C) como para a cultivar 2 (Figura 3.5D).

Pelos resultados obtidos infere-se que o gás ozônio, considerado possuir alto poder de oxidação (KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001; KARACA; VELIOGLU; NAS, 2010), principal motivo para ser usado em processos desinfestantes (CATALDO, 2008; KARACA; VELIOGLU, 2009; KARACA; VELIOGLU; NAS, 2010), não influenciou a qualidade fisiológica das sementes de soja, uma vez que processos oxidativos são considerados um dos principais redutores de qualidade fisiológica em sementes oleaginosas, como a soja, devido a formação de radicais livres causados por oxidação nos tecidos celulares e componentes de reserva como lipídeos, que são mais susceptíveis à esses efeitos (OLIVEIRA et al. 2016).

Semelhante ao observado para as outras variáveis avaliadas, o tratamento com gás ozônio nas sementes de soja das duas cultivares também não afetou a velocidade e a emergência de plântulas, mantendo o vigor das sementes em níveis semelhantes independente do tempo de exposição e das concentrações utilizadas (Figura 3.6).

Figura 3.6 - Estande inicial, porcentagem e índice de velocidade de emergência de plântulas de sementes de soja de duas cultivares (Cultivar 1 - A, C e E; Cultivar 2 - B, D e F) tratadas com gás ozônio em duas concentrações.



\*letras maiúsculas diferenciam a concentração 15g/m<sup>3</sup> e letras minúsculas diferenciam a concentração 25g/m<sup>3</sup> a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

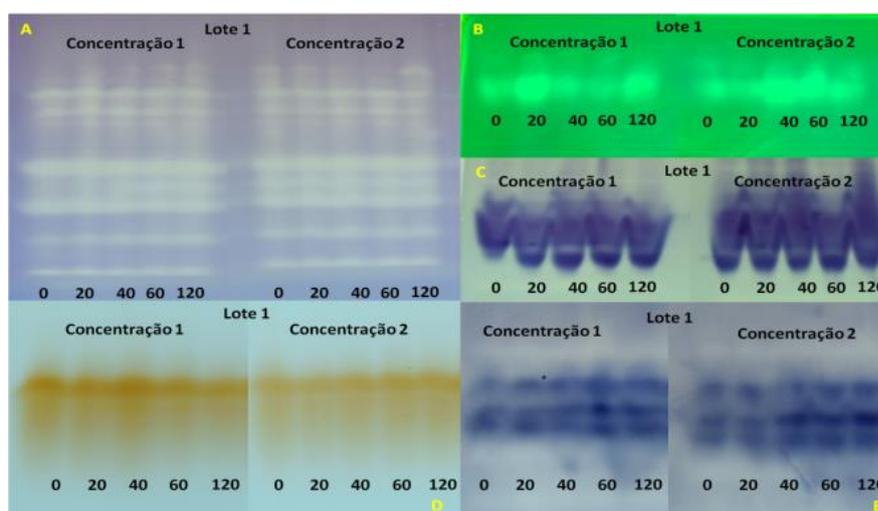
Fonte: Do autor (2018)

Sabe-se que o ataque de patógenos em sementes afeta o estabelecimento das plântulas em campo e, diferente disto, foi observado uma baixa incidência de fungos presentes nas sementes após o tratamento com gás ozônio, o qual também não afetou a velocidade e a porcentagem de emergência de plântulas das duas cultivares de sojas avaliadas.

Prova de que não ocorreram alterações causadas por oxidações, provocadas pelo gás ozônio, independentemente do tempo de exposição e das concentrações utilizadas, foi dada por poucas mudanças nos perfis enzimáticos extraídos das sementes, tanto de enzimas ligadas a remoção de radicais livres, a exemplo de Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD) e Peroxidase (PO), envolvidas em processos respiratórios (Malato desidrogenase - MDH) e mobilização de reservas (Isocitrato liase - ISO).

Para a cultivar 1, houve apenas uma discreta mudança no perfil enzimático da enzima Catalase, tanto quando tratada por 20 minutos na menor concentração, quanto a partir de 40 minutos na maior concentração de gás ozônio (Figura 3.7B), para as demais, não foram observadas mudanças perceptíveis nos perfis enzimáticos

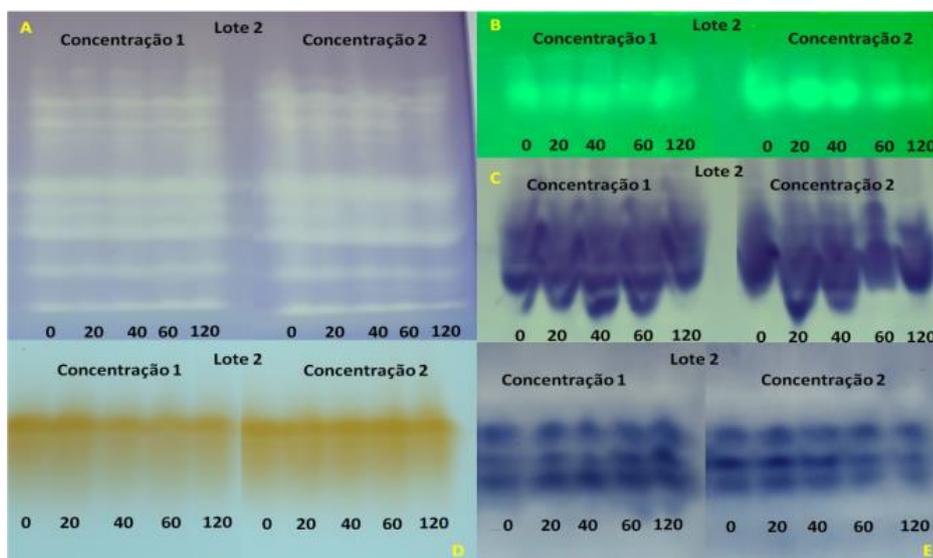
Figura 3.7 - Perfis enzimáticos de Superóxido dismutase (A), Catalase (B), Malato desidrogenase (C), Peroxidase (D) e Isocitrato liase extraídas de sementes de soja, da cultivar 1, tratadas com gás ozônio em duas concentrações



Fonte: Do autor (2018)

De forma semelhante ao observado para a cultivar 1, a segunda cultivar apresentou uma mudança no perfil da enzima Catalase quando tratada na maior concentração de gás ozônio ( $25 \text{ g m}^{-3}$ ), sendo observada maior atividade nas sementes sem tratamento (0 minutos) e tratadas com por 20 e 40 minutos (Figura 3.8B), para as demais enzimas também não foram observadas mudanças perceptíveis nos perfis enzimáticos.

Figura 3.8 - Perfis enzimáticos de Superóxido dismutase (A), Catalase (B), Malato desidrogenase (C), Peroxidase (D) e Isocitrato liase extraídas de sementes de soja, da cultivar 2, tratadas com gás ozônio em duas concentrações



Fonte: Do autor (2018)

#### 4 CONCLUSÕES

O tratamento sanitário com gás ozônio na concentração de  $15\text{ g m}^{-3}$  por 20 minutos reduz a incidência dos fungos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Phomopsis* em sementes de soja.

O ozônio até  $25\text{ g m}^{-3}$  não afeta a qualidade fisiológica em exposições por períodos de até 60 minutos, para a cultivar 2, e até 120 minutos para a cultivar 1.

O uso do ozônio não causou efeito negativo a qualidade bioquímica das sementes de soja.

## REFERENCIAS

- ABATI, J. et al. Treatment with fungicides and insecticides on the physiological quality and health of wheat seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 4, p. 392-398, 2014.
- ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa: Editora UFV, 2006. 627p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 200 p. 2009a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 399 p. 2009b.
- CATALDO, F. Ozone decomposition of patulin and a mycotoxin and food contaminant. **Ozone: Science & Engineering**, v. 30, n. 3, p. 197-201, 2008.
- CONCEIÇÃO, G. M. et al. Desempenho de plântulas e produtividade de soja submetida a diferentes tratamentos químicos nas sementes. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, p. 1711-1720, 2014.
- CONCEIÇÃO, G. M. et al.. Physiological and sanitary quality of soybean seeds under different chemical treatments during storage **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 11, p. 1020-1024, 2016.
- FERREIRA, T. F. et al. Quality of soybean seeds treated with fungicides and insecticides before and after storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 278-286, 2016.
- FRANÇA NETO, J. B.; KRYZANOWSKI, F. C.; SILVA, W. R. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: Embrapa CNPSo, 1998. 72p. (Documentos, 116).
- KARACA, H., VELIOGLU, Y. S., NAS, S. Mycotoxins: contamination of dried fruits and degradation by ozone. **Toxin Reviews**, v. 29, n. 2, p. 51-59, 2010.
- KARACA, H., VELIOGLU, Y.S. Effects of some metals and chelating agents on patulin degradation by ozone. **Ozone: Science & Engineering**, v. 31, n. 3, p. 224-231, 2009.
- KEELS, S. A. et al. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v.37, n. 4, p. 371-382, 2001.
- KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**, Malden, v. 66, n. 9, p. 1242-1252, 2001.
- KOTTAPALLI, B.; WOLF-HALL, C. E.; SCHWARZ, P. Evaluation of gaseous ozone and hydrogen peroxide treatments for reducing *Fusarium* survival in malting barley. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 6, p. 1236-1240, 2005.

- LEE, J. H. et al. Changes occurring in compositions and antioxidant properties of healthy soybean seeds [*Glycine max* (L.) Merr.] and soybean seeds diseased by *Phomopsis longicolla* and *Cercospora kikuchii* fungal pathogens. **Food Chemistry**, v. 185, p. 205 - 211, 2015.
- LUDWIG, P. M. et al. Qualidade de sementes de soja armazenadas após recobrimento com aminoácido, polímero, fungicida e inseticida. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 395-406, 2011.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.
- MARCOS-FILHO, J. M. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015. 660 p.
- MCDONOUGH, M. X. et al. Ozone application in a modified screw conveyor to treat grain for insect pests, fungal contaminants, and mycotoxins. **Journal of Stored Products Research**, v. 47, n. 3, p. 249-254, 2011.
- MENDEZ, F. et al. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and performance. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, n. 1, p. 33-44, 2003.
- MYLONA, K. et al. Efficacy of gaseous ozone treatment on spore germination, growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* *in vitro* and *in situ* in maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 59, p. 178-184, 2014.
- OLIVEIRA, A. S. et al. Biochemical changes in fiber naturally colored cottonseeds during storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 38, n. 2, p. 101-109, 2016.
- PEREIRA, C. E. et al. Tratamento fungicida e peliculização de sementes de soja submetidas ao armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 158-164, 2011.
- RODRIGUES, V. O. et al. Treating sunflower seeds subjected to ozonization. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 37, n. 3, p. 202 - 210, 2015
- SCUSSEL, V. M. et al. Effect of oxygen-reducing atmospheres on the safety of packaged shelled Brazil nuts during storage. **International Journal of Analytical Chemistry**. v. 2011, p. 1-9, 2011.
- TIWARI, B. K. et al. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 3, p. 248–255, 2010.
- VIEIRA, R. D.. Condutividade elétrica e o teor de água inicial das sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 19, p. 1333-1338, 2002.
- WHITE, S. D. et al. Controlling deterioration of high moisture maize with ozone treatment. **Journal of Stored Products Research**, v. 46, n. 1, p. 7-12, 2010.
- WHITE, S. D. et al. Mycoflora of high moisture maize treated with ozone. **Journal of Stored Products Research**, v. 55, p. 84-89, 2013.

WU, J.; DOAN, H.; CUENCA, M. A. Investigation of gaseous ozone as an anti-fungal fumigant for stored wheat. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 7, p. 1288–1293, 2006.

ZAMBIAZZI, E. V. et al. Desempenho agronômico e qualidade sanitária de sementes de soja em resposta à adubação potássica. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 3, p. 543-553, 2017.

ZORLUGENC, B. et al. The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B1 in dried figs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3593-3597, 2008.

## **CAPÍTULO 4**

### **USO DO OZÔNIO NO TRATAMENTO SANITÁRIO E SEU EFEITO NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DAS SEMENTES DE PIMENTÃO**

## RESUMO

A presença de patógenos em um sistema de produção pode ser responsável por grandes perdas no processo produtivo e a maioria destes patógenos podem ser transmitidos via sementes. Nesse sentido, faz-se necessário o tratamento de sementes para eliminação do inóculo inicial e garantia de sementes com alta germinação e vigor. Neste trabalho objetivou-se avaliar sementes de pimentão (*Capsicum annuum*) tratadas com gás ozônio em diferentes concentrações e tempos de exposição a fim de verificar a eficiência deste método na eliminação de fungos e seus efeitos sobre a qualidade fisiológica e bioquímica. O delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 repetições em esquema fatorial (6x2) envolvendo 6 diferentes tempos (0, 20, 40, 60, 80, e 120 minutos) e duas concentrações (10 e 15 g/m<sup>3</sup>), para o teste de sanidade o esquema fatorial contou com um tratamento adicional com fungicida químico Captan®, sendo seu esquema fatorial de (6x2) + 1. Para avaliação dos tratamentos realizou-se os teste de germinação, primeira contagem da germinação, tetrazólio, condutividade elétrica, índice de velocidade de emergência, emergência, além do teste de sanidade das sementes. Os tratamentos que receberam o ozônio tiveram o mesmo desempenho que o fungicida químico Captan® no controle de inóculos dos fungos *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp em sementes de pimentão. O gás ozônio nas concentrações 10 e 15mg L<sup>-1</sup> a partir de 20 minutos foi eficiente no controle dos fungos *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp em sementes de pimentão

**Palavras-chave:** Sanidade, qualidade de sementes, O<sub>3</sub>, *Capsicum annuum* L

## 1 INTRODUÇÃO

O pimentão (*Capsicum annuum* L.), pertencente à família das solanáceas é uma cultura de grande importância para o setor agrícola brasileiro e uma das dez hortaliças mais importantes, sendo que em 2016 foram comercializados 19,12 toneladas do fruto somente no estado de Minas Gerais (CEASAMINAS, 2016). Dentre os vários fatores que garantem a população adequada de plantas na lavoura de pimentão, ou de qualquer outra cultura, está a utilização de sementes de boa qualidade.

Assim, o tratamento de sementes é uma tecnologia que, associada ao melhoramento genético de plantas e à biotecnologia, permite alta produtividade da cultura e satisfação do produtor em atender às demandas do mercado. Essa tecnologia é uma ferramenta que auxilia no controle de patógenos. A presença de patógenos em um sistema de produção agrícola pode ser responsável por grandes perdas no processo produtivo e a maioria destes patógenos podem ser transmitidos via sementes.

O tratamento de sementes é importante, pois os patógenos transmitidos podem servir de inóculo inicial para o desenvolvimento progressivo da doença no campo, infectar áreas isentas, promover baixa germinação e baixo vigor. Podem ainda, provocar morte em pré-emergência, podridão radicular, tombamento de mudas, manchas necróticas em folhas e caules, deformações como hipertrofias e subdesenvolvimento, descoloração de tecidos e infecções latentes (NEERGAARD, 1979; LAZAROTTO et al., 2012).

O controle de patógenos em sementes é realizado basicamente pelo emprego de produtos químicos, que geram altos custos e riscos ambientais e toxicológicos. (LIMA et al., 1999; COUTINHO; ARAÚJO; MAGALHÃES, 1999; CAMPANHOLA E BETTIOL, 2003). Devido a preocupações ambientais de adotar produtos não nocivos ao meio ambiente e de reduzir a emissão de resíduos químicos, os novos regulamentos e legislações alimentares vêm dificultando o seu uso. Este fator reduz a variedade de fumigantes disponíveis para o combate de fungos e, ainda, por consequência do uso repetido dos poucos agentes fumigantes regulamentados, há o aumento da resistência dos organismos alvo a estes compostos (KELLS et al., 2001; TIWARI et al., 2010; BEBER-RODRIGUES, 2013).

Neste contexto, a utilização do ozônio torna-se uma alternativa no controle de fungos em sementes por descartar a necessidade de manipulação, armazenamento ou eliminação dos recipientes de produtos químicos e, ainda, por seu produto de degradação ser o oxigênio (O<sub>2</sub>), não deixando nenhum resíduo de produto indesejável no ambiente (KEELS et al., 2001;

MENDEZ et al., 2003), fato este que o torna interessante para uso na agricultura orgânica, uma vez que este não deixa resíduos nos produtos em que foi aplicado.

Tendo em vista a carência de informação no uso do ozônio como agente sanitizante em sementes, objetivou-se nessa pesquisa testar diferentes concentrações do gás ozônio e tempos de exposição, no controle de patógenos presentes em sementes de pimentão bem como seu efeito sobre a qualidade fisiológica e bioquímica das mesmas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

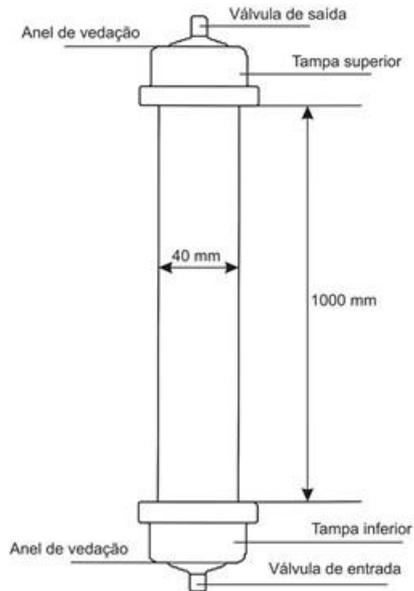
O experimento foi conduzido no Laboratório de Análises de Sementes do Departamento de Agricultura e no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras-MG. Para a realização dos testes foi utilizado um lote de sementes de pimentão da cultivar Ikeda fornecido pela Empresa HORTIAGRO. O tratamento das sementes com o gás ozônio foi realizado na empresa Ozone & Life, em São José dos Campos-SP. No tratamento químico das sementes, com objetivo de contrastar com os tratamentos com ozônio, foi usado o fungicida Captan®, em dose recomendada de 200g do produto comercial para 100 kg de sementes.

### **2.1 Ozonização das sementes**

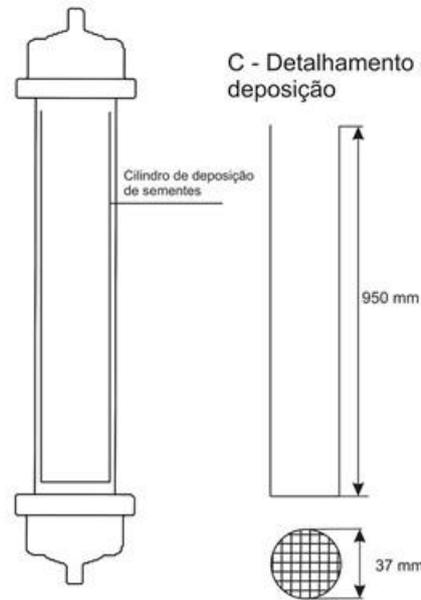
As sementes de pimentão foram expostas a um ambiente com ozônio, utilizando duas concentrações, 10 e 15mg L<sup>-1</sup>, em seis períodos diferentes, 0, 20, 40, 60, 80 e 120 minutos. O ozônio foi obtido por meio da central geradora de ozônio da empresa Ozone & Life (Gerador de ozônio – Modelo O&L35.0 rm), que produz o ozônio por descargas elétricas em atmosfera rica em O<sub>2</sub> (ar ou O<sub>2</sub> puro) pelo processo corona. As sementes foram dispostas em uma câmara de fluxo contínuo (Reator), confeccionada com tubo de PVC adaptados e que apresentam uma válvula em cada extremidade do reator (Figura 4.1), criado por Rodrigues et al. 2015.

Figura 4.1 - Câmara de ozonização com seus cortes e fluxo interno de ozônio.

A - Componentes externos da câmara de ozonização

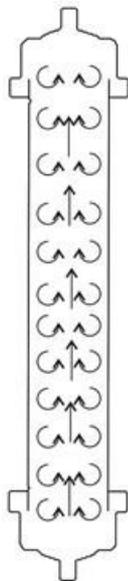


B - Corte 1. Vista interna da Câmara com o cilindro de deposição

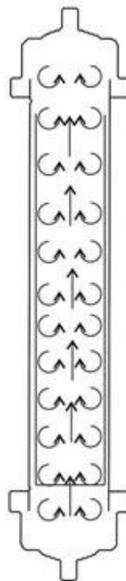


C - Detalhamento do cilindro de deposição

D - Corte 2. Fluxo em vórtex do Ozônio no interior da Câmara



F - Corte 3. Fluxo em vórtex do Ozônio no interior da Câmara (com identificação do cilindro de deposição)



Fonte: Rodrigues, et al (2015).

## 2.2 Avaliação da qualidade fisiológica das sementes submetidas a ozonização

Para estudo dos diferentes tratamentos foram realizados os seguintes testes e determinações:

Teste de germinação: realizado utilizando-se quatro repetições com 50 sementes cada, colocadas sobre papel mata borrão umedecido com água na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel seco e dentro de caixas “gerbox”. As caixas foram acondicionadas em BOD à temperatura alternada de 20-30°C. A contagem de plântulas normais foi realizada aos 14 dias após a semeadura. (BRASIL, 2009b). A primeira contagem de germinação consistiu no registro da porcentagem de plântulas normais observadas aos 7 dias após a semeadura.

Teste de emergência de plântulas: conduzido com quatro repetições de 50 sementes, colocadas em caixas plásticas contendo terra e areia na proporção 2:1. O substrato foi esterilizado e umedecido com água destilada e as caixas mantidas na sala de crescimento a 25 °C com fotoperíodo constante. As avaliações foram realizadas aos quatro dias (estande inicial) e dez dias (estande final), avaliando-se o número de plântulas emergidas. Os resultados foram expressos em porcentagem. Para o índice de velocidade de emergência (IVE) foi computado, diariamente, o número de plântulas emersas a partir do início da emergência, e o cálculo realizado conforme Maguire (1962).

Teste de sanidade: realizado pelo método de papel filtro em caixas “gerbox” com uma camada fina de ágar-ágar a 1,0%. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes, totalizando 200 sementes por tratamento. Os papéis foram umedecidos em água destilada com 2,4D. As caixas “gerbox” com as sementes foram incubadas sob Lâmpada de luz fluorescente branca e fotoperíodo de 12 horas, pelo período de sete dias, à temperatura de 20°C (BRASIL, 2009b). Ao se completar o período de incubação, as sementes foram analisadas individualmente com auxílio de lupa estereoscópica e microscópio óptico para identificação e quantificação dos fungos. Posteriormente obteve-se as porcentagens de sementes infectadas avaliando-se a incidência de fungos.

Teste de condutividade elétrica: foram pesadas quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento, que foram imersas em 25 ml de água deionizada (condutividade < 2,0 0  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) por 24 horas à temperatura constante de 20°C. Após o período de condicionamento, a condutividade elétrica da solução foi medida por meio de leitura em condutivímetro, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$  de sementes (VIEIRA et al., 1994).

Teste de tetrazólio: as sementes foram pré-umedecidas em quatro repetições de 1g cada, colocadas em pote de filme fotográfico com 20ml de água para embeber por um período

de 2 horas em BOD a 45°C. Após esse período foi realizado um corte longitudinal em 50 sementes de cada repetição, dividindo em duas metades sem separá-las e imersas em 15 ml de solução de tetrazólio a 0,075% e colocadas na BOD a 45°C por duas horas (GAGLIARDI; MARCOS FILHO, 2011). Em seguida as sementes foram lavadas, e avaliadas individualmente com auxílio de lupa articulada de mesa com iluminação, classificadas em viveis e inviáveis.

Análise isoenzimática: 2 gramas de sementes foram maceradas com antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) em nitrogênio líquido. Foram pesadas subamostras de 100 mg do material macerado e acrescido de 250 µL do tampão de extração (Tris HCl 0,2M pH 8,0 + 0,1% de β-mercaptoetanol). O material foi colocado em geladeira (4 °C) por 12 h e depois centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos a 4 °C. A eletroforese em géis de poliacrilamida foi desenvolvida em sistema descontínuo (4,5% gel de concentração e 7,5% gel de separação). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Para proceder a corrida eletroforética, foram aplicados nas canaletas dos géis 50 µL do sobrenadante de cada amostra e a corrida realizada a 4 °C por quatro horas a uma voltagem constante de 150 V. Ao término da corrida, os géis foram revelados para as enzimas Álcool desidrogenase (ADH), Malato desidrogenase (MDH), Catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) conforme protocolos contidos em Alfenas (2006).

### **2.3 Delineamento estatístico**

Os resultados referentes aos testes de germinação, primeira contagem, emergência, estande final e índice de velocidade de emergência, condutividade elétrica e tetrazólio, foram analisados segundo delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 repetições em esquema fatorial (6x2) envolvendo 6 diferentes tempos (0, 20, 40, 60, 80, e 120 minutos) e duas concentrações (10 e 15 mg L<sup>-1</sup>), para o teste de sanidade o esquema fatorial contou com um tratamento adicional com fungicida químico Captan®, sendo seu esquema fatorial de (6x2) + 1. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (1974) e aplicados regressão ao nível de 5% de probabilidade, para contrastar os tratamentos que utilizaram ozônio com o tratamento químico (controle) foi aplicado o teste *Dunnnett* à 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando o fator concentração de ozônio no tratamento das sementes de pimentão, de acordo com os resultados da análise de variância, o teste de primeira contagem da germinação foi o único que apresentou diferenças significativas. Quando analisado o tempo de ozonização, pôde ser observado diferenças significativas nos testes de primeira contagem da germinação e de condutividade elétrica. Ao analisar a interação entre os dois fatores, tempo e concentração de  $O_3$ , observa-se que apenas nos resultados do teste de primeira contagem da germinação que houve efeito significativo (Tabela 4.1). Sendo que para todos os demais testes fisiológicos não houve efeito da concentração de ozônio, nem do tempo de exposição das sementes ao gás e tampouco pela interação entre eles.

Reis (2015) avaliando a qualidade fisiologia de sementes de milho tratadas com ozônio, encontrou resultados semelhantes quanto ao índice de velocidade de emergência (IVE), em sua avaliação não houve diferença entre os tratamentos analisados, com exceção da concentração de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  e tempo de exposição de duas horas, onde foi observado o maior IVE. Quanto ao teste de emergência não foi observado diferença significativa entre as concentrações usadas ( $10 \text{ mg L}^{-1}$  e  $20 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Rodrigues et al. (2015), avaliando o efeito do tratamento de sementes de girassol com ozônio verificaram que os períodos de ozonização utilizados (0, 20, 60, 120 minutos) não afetaram a porcentagem de emergência.

Brandani (2014), ao tratar sementes de soja usando duas concentrações de ozônio ( $10$  e  $20 \text{ mg L}^{-1}$ ), em diferentes tempos (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 horas), não observou diferenças significativas entre as concentrações, por meio do teste de germinação. Já Violleau et al., (2007), quando trataram sementes de milho com ozônio, observaram uma redução na taxa de germinação à medida que se aumento do tempo de exposição de 6 para 20,5 minutos.

Tabela 4.1 - Quadrados médios, Coeficientes de variação (CV) e significância, relativos ao índice de velocidade de emergência (IVE), emergência (Emer), germinação (Germ), primeira contagem da germinação (Prim C), condutividade elétrica (Cond. E) e tetrazólio (TZ) de sementes de pimentão submetidas a tratamento com ozônio nos diferentes tempos e concentrações.

FV	GL	Quadrados Médios					
		IVE	Emer.	Germ.	Prim.C	Cond. E	Tz
Concentração (C)	1	0,4294 <sup>NS</sup>	133,33 <sup>NS</sup>	12 <sup>NS</sup>	243,00*	588,84 <sup>NS</sup>	1,33 <sup>NS</sup>
Tempo (T)	5	0,5694 <sup>NS</sup>	119,40 <sup>NS</sup>	16,0 <sup>NS</sup>	3680,73*	3726,12*	9,33 <sup>NS</sup>
TxC	5	0,4635 <sup>NS</sup>	216,33 <sup>NS</sup>	23,8 <sup>NS</sup>	150,40*	41,97 <sup>NS</sup>	10,33 <sup>NS</sup>
Erro	36	0,32	108,67	40,94	48,88*	220,1576	7,44
CV(%)		17,27	12,34	7,29	38,49	4,63	2,87

\* significativo à 5% de probabilidade, <sup>NS</sup> não significativo.

Fonte: Do autor (2018).

Na tabela 4.2 estão apresentados resultados das porcentagens de plântulas normais obtidas aos sete dias do teste de germinação. De acordo esses dados, nota-se que não houve diferença significativa, no fator concentração, nas sementes expostas ao ozônio por um período maior de tempo, 60, 80 e 120 minutos. No entanto, nos tempos de 20 e 40 minutos e concentração de 10mg L<sup>-1</sup> pode ser observado uma menor contagem de plântulas normais se comparado à de concentração de 15mg L<sup>-1</sup> nos respectivos tempos.

Tabela 4.2 - Resultados em porcentagem (%) de plântulas normais na primeira contagem da germinação obtidos de sementes de pimentão nos diferentes tempos (minutos) de exposição e concentrações (mg L<sup>-1</sup>) de ozônio.

PRIMEIRA CONTAGEM DA GERMINAÇÃO						
Concentrações (mg L <sup>-1</sup> )	Tempo de Exposição (minuto)					
	0	20	40	60	80	120
10	56a	20b	13b	3a	3a	3a
15	56a	38a	25a	4a	1a	0a
CV (%)	38,49					

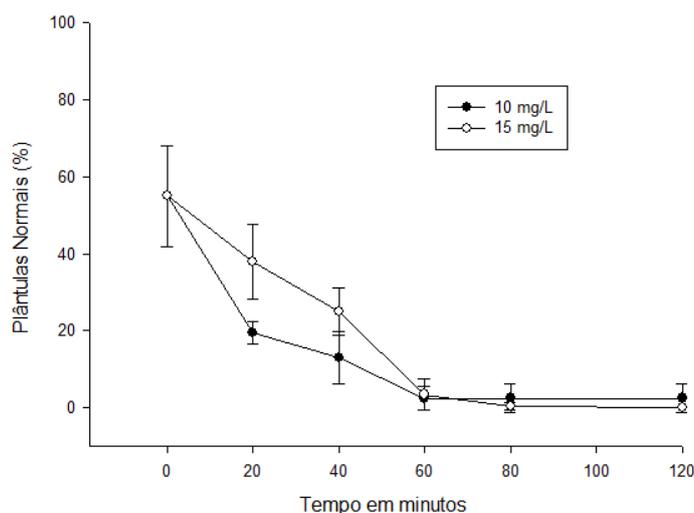
Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott (1974), à 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2018).

De acordo com a Figura 4.2, pode-se notar uma diminuição significativa nos valores obtidos na primeira contagem da germinação de acordo com que se aumentou o tempo de exposição das sementes ao gás O<sub>3</sub>, isso pode ser observado nas duas concentrações utilizadas. Os melhores resultados foram encontrados no tratamento testemunha. Em contrapartida,

Rodrigues et al., (2015) ao estudarem três lotes de sementes de girassol tratadas com gás ozônio em diferentes tempos de exposição (0, 20, 60 e 120 minutos), não observaram a mesma tendência de redução na contagem de plântulas normais no mesmo teste, no entanto os melhores valores foram obtidos no tempo de 60 minutos.

Figura 4.2 - Primeira contagem de germinação (%) (curva de tendência) de sementes de pimentão em função dos tempos (minutos) de ozonização nas duas concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ).



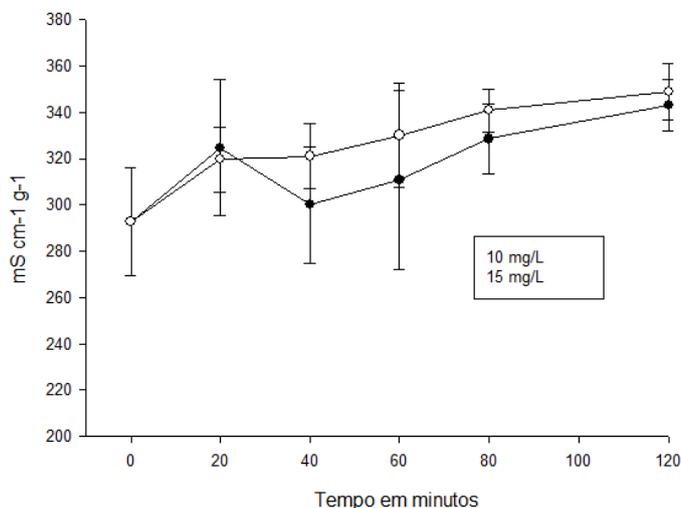
Fonte: Do autor (2018).

É possível observar também, no teste de primeira contagem, uma interação significativa entre os dois fatores (Tabela 4.1), concentração de ozônio e tempo de exposição.

Na Figura 4.3 nota-se que houve um progressivo aumento da condutividade elétrica com o aumento do tempo de exposição independente da concentração utilizada. Isso demonstra que o ozônio afetou a integridade das membranas nas sementes. O teste de condutividade se baseia na hipótese de que, com o processo de deterioração corre um aumento da lixiviação dos constituintes celulares das sementes quando embebidas em água, devido à perda da integridade dos sistemas de membranas celulares (HEPBURN; POWELL; MATTHEWS, 1984; BRANDÃO JUNIOR, 1996).

Resultados de condutividade elétrica semelhantes foram observados em arroz tratados com ozônio, onde foi descrito que com o aumento no período de exposição, houve um aumento na condutividade elétrica, e que a partir de 56,31 horas, os valores permaneceram constantes (Santos et al., 2016). Silva (2011), também observou um aumento dos valores de condutividade elétrica em grãos de trigo ozonizados, na concentração de  $2,14 \text{ mg L}^{-1}$ , nos períodos de exposição de 20, 40 e 60 horas.

Figura 4.3 - Condutividade elétrica (curva de tendência) de sementes de pimentão em função dos tempos (minutos) de ozonização nas duas concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ )



Fonte: Do autor (2018).

No teste de tetrazólio não houve diferença significativa na porcentagem de sementes viáveis entre as duas concentrações tampouco dentro dos tempos trabalhados. As sementes se mantiveram com elevados valores de viabilidade em todos os tratamentos.

Conseqüentemente, observando-se os resultados encontrados para viabilidade a partir do teste de tetrazólio, a ozonização das sementes não interfere nessa característica. Resultados semelhantes foram obtidos por Luz (2014), ao analisar o uso do ozônio no controle de gorgulho do milho e seu efeito na qualidade das sementes de *Zea mays*. Rodrigues et al., (2015), estudando o efeito do ozônio em sementes de girassol, observou que todos os lotes analisados não diferiram estatisticamente dentro dos tempos de ozonização.

Pelos resultados do teste de sanidade para o fungo *Alternaria* sp. apresentados na Tabela 4.3, nota-se que todos tratamentos, exceto a testemunha (tempo zero) foram suficientes para que a porcentagem de incidência do fungo não se diferisse estatisticamente quando contrastados com o tratamento químico.

Na Tabela 4.3 e Figura 4.4 pode-se observar uma diminuição considerável da incidência do fungo *Alternaria* sp. nos tratamentos que receberam ozônio, mesmo na menor concentração e tempo utilizados. Comportamento distinto foi observado por Rodrigues et al., (2015), onde sementes de girassol expostas ao ozônio por 20 minutos não tiveram diferença significativa na incidência de *Alternaria* sp. quando comparada à testemunha. Beber-Rodrigues et al., (2013) testando o ozônio no tratamento de grãos de arroz, verificou uma

redução da carga total de fungos, sendo que o patógeno *Alternaria* sp. foi um dos mais sensíveis ao gás O<sub>3</sub>.

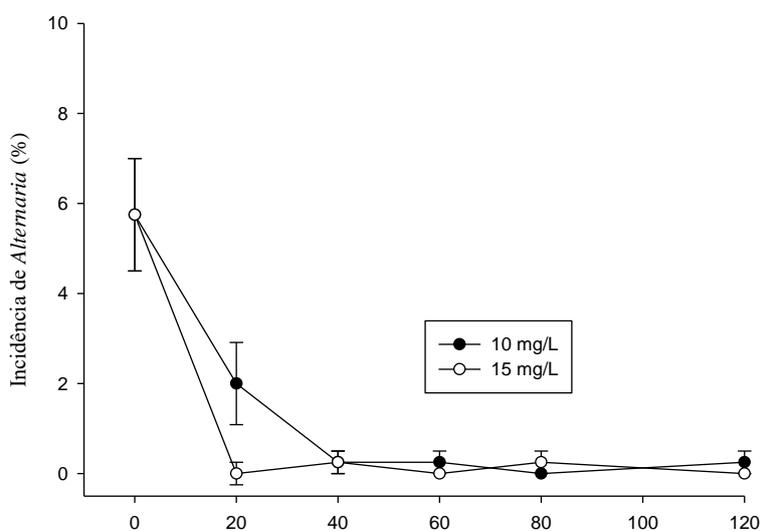
Tabela 4.3 - Porcentagem média de incidência de *Alternaria* sp. em sementes de pimentão submetidas a tratamento em diferentes tempos e concentrações de ozônio e fungicida químico (controle).

Concentrações (mg L <sup>-1</sup> )	Tempo de Ozonização (minuto)					
	0	20	40	60	80	120
	Incidência de <i>Alternaria</i> (%)					
10	23 $\gamma$	5	1	1	0	1
15	23 $\gamma$	0	1	0	1	0
Controle	0					

Médias diferem do controle, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de *Dunnnett*.

Fonte: Do autor (2018).

Figura 4.4 - Incidência média (%) do fungo *Alternaria* sp. em sementes de pimentão em função dos tempos (minuto) de ozonização



Fonte: Do autor (2018)

Na Tabela 4.4 e Figura 4.5, pode-se observar uma redução de 91,66% na incidência de *Penicillium* sp. quando as sementes foram expostas por 20 minutos as concentrações de 10 e 15 mg L<sup>-1</sup>, os demais tratamentos não diferiram estatisticamente desse. Todos os tratamentos em que as sementes tiveram contato com o gás O<sub>3</sub> não diferiram estatisticamente do controle com químico.

Beber-Rodrigues (2013) relatou redução significativa na incidência de *Penicillium* sp. em arroz em casca submetidos ao tratamento com O<sub>3</sub>. No trabalho de Brito Júnior, (2013) foi constatado uma redução 98,0% no índice de ocorrência de *Penicillium* sp. em grãos de milho,

quando estes foram expostos ao ozônio em água a uma concentração de  $2,14 \text{ mg L}^{-1}$ , por um período de 50 horas.

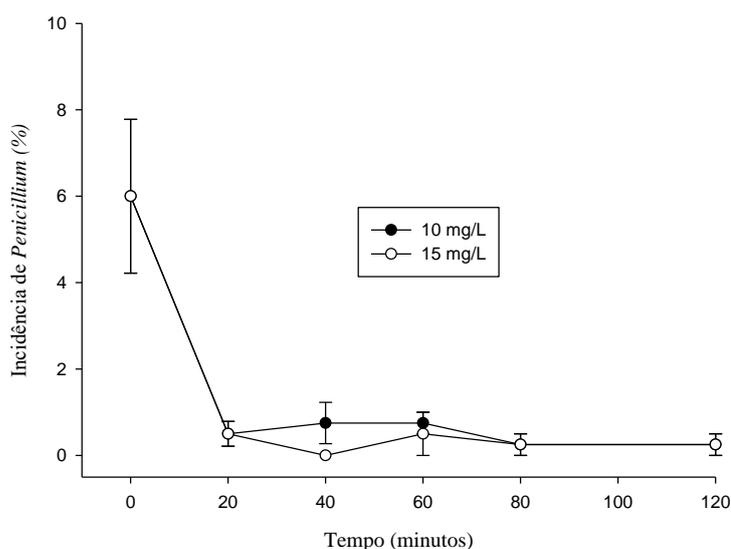
Tabela 4.4 - Porcentagem média de incidência de *Penicillium* sp. em sementes de pimentão submetidas a tratamento em diferentes tempos e concentrações de ozônio e fungicida químico (controle).

Concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Tempo de Ozonização (minuto)					
	0	20	40	60	80	120
	Incidência de <i>Penicillium</i> (%)					
10	24 $\gamma$	2	3	3	1	1
15	24 $\gamma$	2	0	2	1	1
Controle	0					

Médias diferem do controle, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de *Dunnett*.

Fonte: Do autor (2018).

Figura 4.5 - Incidência média (%) do fungo *Penicillium* sp. em sementes de pimentão em função dos tempos (minutos) de ozonização



Fonte: Do autor (2018)

Foi verificado também que a incidência do fungo *Aspergillus* sp. apresentou redução significativa (Tabela 4.5 e Figura 4.6) a partir do tempo de exposição de 20 minutos nas duas concentrações ( $10$  e  $15 \text{ mg L}^{-1}$ ), quando comparada à testemunha (tempo zero). Os valores obtidos nos tratamentos com ozônio independente do tempo e da concentração diferiram da testemunha sem tratamento onde houve 37% de sementes contaminadas pelo *Aspergillus* e não diferiram do tratamento químico.

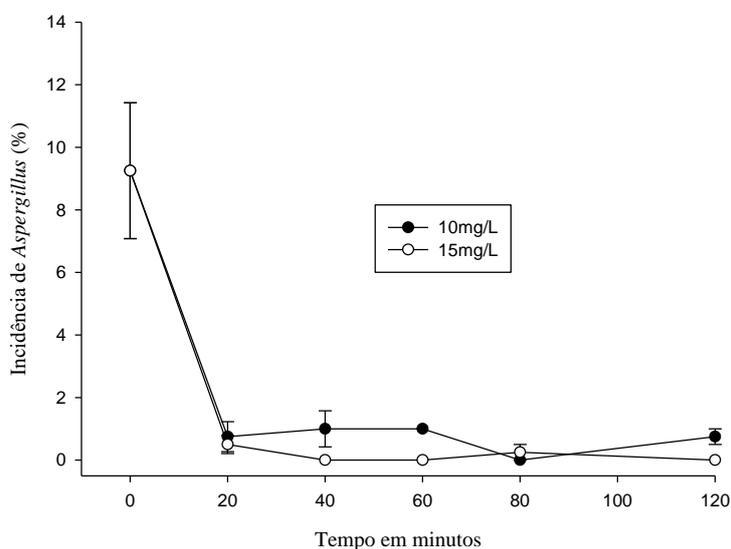
Tabela 4.5 - Porcentagem média de incidência de *Aspergillus* sp. em sementes de pimentão submetidas a tratamento em diferentes tempos e concentrações de ozônio e fungicida químico (controle).

Concentrações (mg L <sup>-1</sup> )	Tempo de Ozonização (minuto)					
	0	20	40	60	80	120
	Incidência de <i>Aspergillus</i> (%)					
10	37 $\gamma$	3	0	4	0	3
15	37 $\gamma$	2	0	0	1	0
Controle	0					

Médias diferem do controle, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de *Dunnnett*.

Fonte: Do autor (2018).

Figura 4.6 - Incidência média (%) do fungo *Aspergillus* sp. em sementes de pimentão em função dos tempos (minutos) de ozonização.



Fonte: Do autor (2018).

Vários autores (CICCARESE et al. 2007; SILVA; VENÂNCIO, 2008; ALENCAR et al. 2012) observaram reduções semelhantes e significativas, de até 100%, na incidência de *Aspergillus* sp. em sementes tratadas com O<sub>3</sub>. Alencar et al. (2014) atribui ao alto poder oxidativo do gás ozônio a significativa redução na contagem de fungos totais e de *Aspergillus lavuse* e *Aspergillus parasiticus* nos grãos de amendoim.

Segundo Souza et al. (2011) o *Aspergillus* sp. além de ser um fungo de armazenamento, é responsável pela podridão de semente no solo, se essas estiverem em solo com baixa disponibilidade hídrica.

De acordo com os resultados da Tabela 4.6 e Figura 4.7, referente aos fungos do gênero *Fusarium* sp., observa-se um comportamento semelhantes aos demais fungos ou seja houve alto índice de contaminação por este gênero (27%) nas sementes sem nenhum tipo de

tratamento, enquanto que aquelas que foram tratadas com ozônio independente da concentração e do tempo foram eficientes e tiveram a mesma eficácia de controle do tratamento químico.

É possível observar uma diminuição de 88,88% na incidência de *Fusarium* sp. nos tratamentos de tempos 20 e 40 minutos na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>, chegando a 100% (40 e 80 minutos na concentração de 15 mg L<sup>-1</sup>).

Em concordância com os resultados do presente trabalho, Marique, Allard e Spanoghe (2012) utilizando o ozônio para tratar sementes de *Triticum aestivum* L. contaminadas com *Fusarium* sp. e *Alternaria* sp., constataram controle eficiente dos fungos, principalmente *Fusarium* sp.

Savi et al. (2014), em seu trabalho com *Triticum aestivum* L., observou que o uso do gás ozônio foi eficaz no controle do fungo *Fusarium graminearum*, principalmente após 120 minutos de exposição, com concentração de 60 mmol/mol, sem causar alterações físicas e bioquímicas nos grãos.

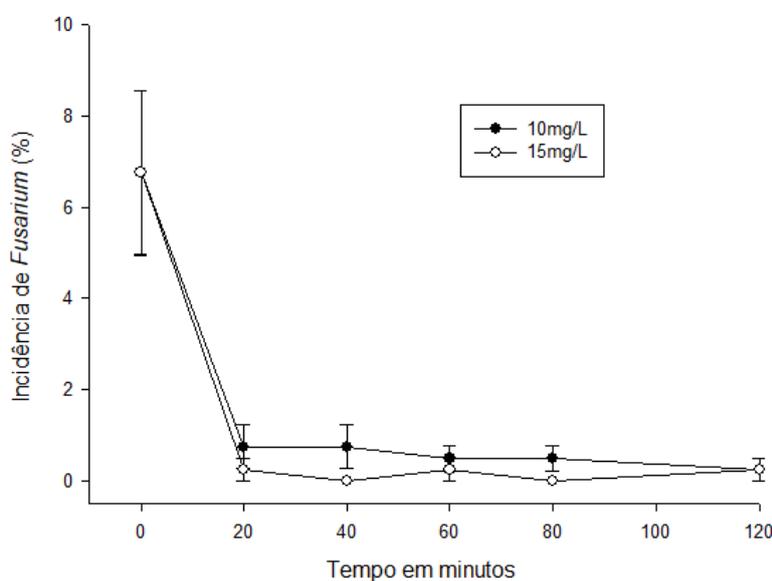
Tabela 4.6 - Porcentagem média de incidência de *Fusarium* sp. em sementes de pimentão submetidas a tratamento em diferentes tempos e concentrações de ozônio e fungicida químico (controle).

Concentrações (mg L <sup>-1</sup> )	Tempo de Ozonização (minuto)					
	0	20	40	60	80	120
	Incidência de <i>Fusarium</i> (%)					
10	27 $\gamma$	3	3	2	2	1
15	27 $\gamma$	1	0	1	0	1
Controle	0					

Médias diferem do controle, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de *Dunnnett*.

Fonte: Do autor (2018).

Figura 4.7 - Incidência média (%) do fungo *Fusarium* sp. em sementes de pimentão em função dos tempos (minutos) de ozonização



Fonte: Do autor (2018).

Na Tabela 4.7 e Figura 4.8, observa-se uma redução de 100% na incidência do fungo *Colletotrichum* sp. em todos os tratamentos quando comparados à testemunha (tempo zero de exposição ao ozônio). Nota-se ainda pelos resultados que os tratamentos com ozônio não se diferenciaram do tratamento químico (controle).

De acordo com Henning, (2005), a presença de *Colletotrichum* sp., bem como *Phomopsis* sp., *Fusarium* sp., e *Aspergillus* sp., afetam negativamente a qualidade fisiológica da semente, a qualidade da lavoura e dos ambientes de armazenamento. Resultados semelhantes no controle do fungo *Colletotrichum* sp. também foi constatada por Alencar et al. (2013) ao tratar bananas cv. Nanicão com ozônio em água.

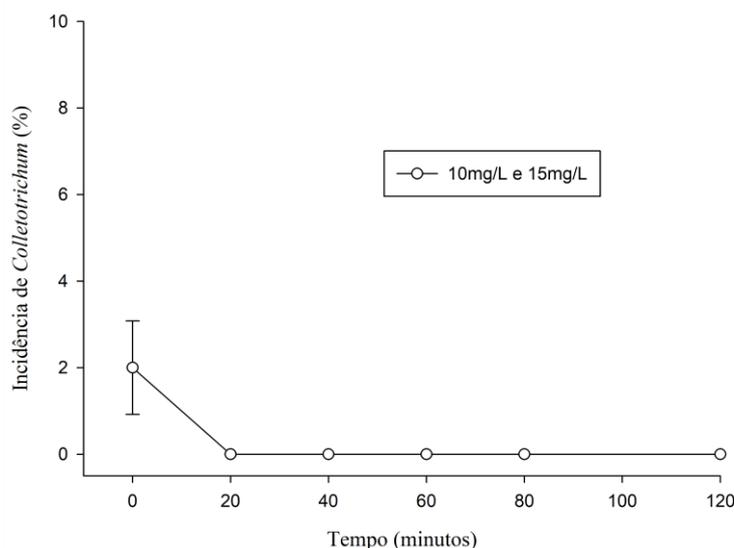
Tabela 4.7 - Porcentagem média de incidência de *Colletotrichum* sp. em sementes de pimentão submetidas a tratamento em diferentes tempos e concentrações de ozônio e fungicida químico (controle).

Concentrações (mg L <sup>-1</sup> )	Tempo de Ozonização (minuto)					
	0	20	40	60	80	120
	Incidência de <i>Colletotrichum</i> (%)					
10	8γ	0	0	0	0	0
15	8γ	0	0	0	0	0
Controle	0					

Médias diferem do controle, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de *Dunnnett*.

Fonte: Do autor (2018).

Figura 4.8- Incidência média (%) do fungo *Colletotrichum* sp. em sementes de pimentão em função dos tempos (minutos) de ozonização



Fonte: Do autor (2018).

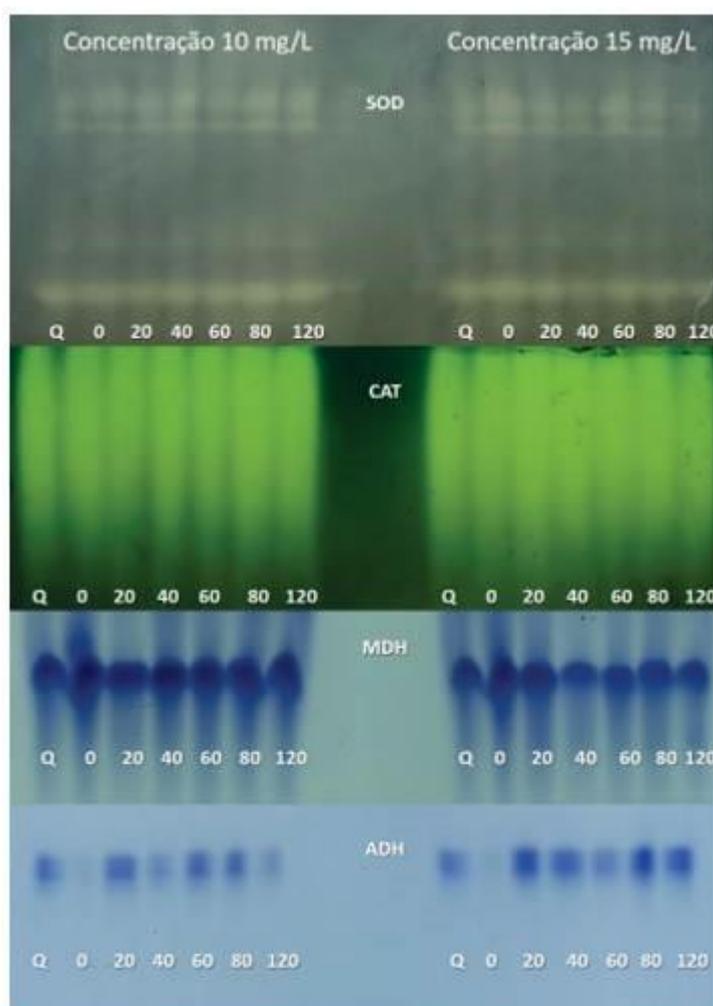
No presente trabalho pode-se ser detectado a presença dos patógenos *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. e *Colletotrichum* sp., como apresentado anteriormente. O tratamento químico eliminou totalmente os fungos detectados, e o tratamento com ozônio mesmo na menor concentração de 10mg L<sup>-1</sup> e no menor tempo de exposição que foi de 20 minutos, mostrou-se eficiente quanto ao tratamento químico.

Brandani (2014), estudando o efeito do gás ozônio no controle de fungos em sementes de soja, notou uma melhoria na qualidade sanitária das sementes analisadas quando tratadas com solução de ozônio de concentração 20 mg L<sup>-1</sup> e período de exposição de 1,5 horas. Em trabalho realizado com grãos de arroz, Santos et al., (2016), concluiu que a ozonização na concentração de 10,13 mg L<sup>-1</sup> com tempo de exposição de 60 horas foi capaz de reduzir em aproximadamente 100% o índice de ocorrência de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.. Antony-Babu e Singleton, (2009) verificaram ainda que a inibição dos fungos tratados com gás ozônio se destacou mesmo em organismos que foram expostos a níveis bastante baixos (0,2 μmol mol<sup>-1</sup>) de O<sub>3</sub> por curto período de tempo (10 minutos), sendo capaz de degradar tanto micélio quanto esporos de fungos estudados.

Para a atividade enzimática da SOD, CAT e MDH (Figura 4.9) não houve diferença entre os tratamentos testados, podendo inferir-se que tanto o ozônio quanto o produto comercial (Captan®) utilizado não afetaram negativamente as sementes. Corroborando com

os resultados obtidos por meio dos testes de germinação, índice de velocidade de emergência, emergência tetrazólio.

Figura 4.9 - Perfis enzimáticos de Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Malato desidrogenase (MDH) e Álcool desidrogenase (ADH) extraídas de sementes de pimentão, tratadas com gás ozônio em duas concentrações e Captan® (Q).



Fonte: Do autor (2018).

Para a ADH observa-se que os tratamentos com o ozônio e o produto químico comercial apresentaram maior atividade da enzima quando comparados com o tempo 0 de exposição ao ozônio, isso significa que os tratamentos a qual as sementes foram submetidas favoreceu a anaerobiose ativando assim a enzima álcool desidrogenase. Veiga et al. (2010) relata que esta enzima é de grande importância uma vez que converte o acetaldeído em etanol que é um composto menos tóxico e assim reduz a velocidade dos processos de deterioração

das sementes. Portanto, quanto maior a atividade da ADH menor será os efeitos deletérios do acetaldeído nas sementes (CARVALHO et al., 2014).

#### 4 CONCLUSÕES

O tratamento com ozônio nas concentrações e tempos que foram utilizados não interfere na qualidade fisiológica e bioquímica das sementes.

O gás ozônio nas concentrações 10 e 15 mg L<sup>-1</sup> a partir de 20 minutos foi eficiente no controle dos fungos *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp em sementes de pimentão

## REFERENCIAS

- ALENCAR E. R. et al. Postharvest quality of ozonized "nanicão" cv. Bananas. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 1, p. 107-114, 2013.
- ALENCAR, E. R et al. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 4, p. 899–905, 2012.
- ALENCAR, R. E. et al. Eficácia do ozônio no controle de fungos em amendoim. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, 43, 2014, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBEA, 2014. p. 1-6.
- ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa: Editora UFV, 2006. 627p.
- ANTONY-BABU, S.; SINGLETON, I. Effect of ozone on spore germination, spore production and biomass production in two *Aspergillus* species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 413-422, 2009.
- BEBER-RODRIGUES, M. **Efeito do gás ozônio na qualidade micotoxicológica de arroz (*Oryza sativa* L.) em casca durante a armazenagem**. 2013. 123p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- BRANDANI, E. B. **Efeito do gás ozônio no controle de fungos e na qualidade fisiológica em sementes de soja**. 2014. 49p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- BRANDÃO JUNIOR, D. E. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas na avaliação da qualidade de sementes de milho**. 1996. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 200 p. 2009a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 399 p. 2009b.
- BRITO JÚNIOR, J. G. **Ozônio como agente fungicida e seu efeito na qualidade dos grãos de milho**. 2013, 56p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.
- CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. 279p
- CARVALHO, E. R. et al. Alterações isoenzimáticas em sementes de cultivares de soja em diferentes condições de armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 1, p. 967-976, 2014.

CEASAMINAS. Centro de Abastecimento de Minas Gerais. **Procedência de Produtos em Kg**. 2016.

CICCARESE, F. et al. Seed disinfestation by ozone treatments. In: IOA Conference and Exhibition, 2007, Valência - Espanha. **Proceedings...** Valência: International Ozone Association, 2007.

COUTINHO, W. M.; ARAÚJO, E.; MAGALHÃES, F. H. L. Efeito de extratos de plantas anacardiáceas e dos fungicidas químicos Benomyl e Captan sobre a microflora e qualidade fisiológica de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 560-568, 1999.

GAGLIARDI, B; MARCOS - FILHO, J. Assessment of the physiological potential of bell pepper seeds and relationship with seedling emergence. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 162-170, 2011.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes**: noções gerais. 2.ed. Londrina: Embrapa Soja, 2005.(Documentos, 264).

HEPBURN, H. A.; POWELL, A. A.; MATTHEWS, S. Problems associated with the routine application of electrical conductivity measurements of individual seeds in the germination testing of peas and soybeans. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 12, n. 3, p. 403-13, 1984.

KEELS, S. A. et al. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v.37, n. 4, p. 371-382, 2001.

LAZAROTTO, M. et al. Sanidade, transmissão e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrela fissilis* procedentes da região Sul do Brasil; **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 493-503, 2012.

LIMA, H. F. et al. Avaliação de produtos alternativos no controle de pragas e na qualidade fisiológica de sementes de feijão macassar armazenadas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 3, n. 1, p. 49-53, 1999.

LUZ, C. E. A. **Sinergia entre o controle químico e a atmosfera modificada com ozônio para o manejo do gorgulho do milho**. 2014, 35p. Monografia (Graduação em Agronomia) Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MARIQUE, T.; ALLARD, O.; SPANOGHE, M. Use of self-organizing map to analyze images of fungi colonies grown from *Triticum aestivum* seeds disinfected by ozone treatment. **International Journal of Microbiology**. v. 2012, 5 p. 2012.

MENDEZ, F. et al. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and performance. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, n. 1, p. 33-44, 2003.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Mac Millan Press, 1979.

REIS, M. I. C. C. dos. **Avaliação da qualidade fisiológica em sementes de milho tratadas com ozônio**. 2015, 47p. Monografia (Graduação em Agronomia) Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

RICE, R. G.; ROBSON, C. M.; MILLER, G. W.; HILL, A. B. Uses of ozone in drinking water treatment. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 73, n. 1, p. 44 - 47, 1981.

RODRIGUES, V. O. et al. Treating sunflower seeds subjected to ozonization. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 37, n. 3, p. 202 - 210, 2015

SANTOS, R. R. et al . Ozone as fungicide in rice grains. **Revista brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.**, Campina Grande , v. 20, n. 3, p. 230-235, 2016.

SAVI, G. D. et al. Ozone treatment efficiency on *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) quality and germination. **Journal of Stored Products Research**, Bridawe, v. 59, p. 245-253, 2014.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. "A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance." **Biometrics**, p. 507-512, 1974

SILVA, O. F.; VENÂNCIO, A. Supressão de *Aspergillus* produtores de aflatoxinas e ácido ciclopiazonico por ozônio. **Revista de Ciências da Vida**, Seropédica, v. 28, p. 198-200, 2008.

SILVA, T. A. **Processo de ozonização dos grãos de trigo**: Cinética de reação e efeito na qualidade destes e da farinha. 2011. 118p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

SOUZA, T. P. et al. Incidência de fungos associados a sementes de soja transgênica variedade BRS valiosa RR. **Agroecossistemas**, v. 3, n. 1, p.52-56, 2011.

TIWARI, B. K. et al. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 3, p. 248–255, 2010.

VEIGA, A. D. et al. Influência do potássio e da calagem na composição química, qualidade fisiológica e na atividade enzimática de sementes de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p.953-960, 2010

VIEIRA, R. D. Teste de condutividade elétrica. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994, p.103-132

VIOLLEAU, F. et al. Increase of corn seeds germination by oxygen and ozone treatment. In: **IOA Conference and Exhibition**, Valencia, p. 29-31, 2007.