



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**PRÉ – CONDICIONAMENTO DE SEMENTES DE MILHO EM ÁGUA COM  
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OZÔNIO  
NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS E NO CONTROLE DE  
*Fusarium* spp.**

**CHRISTIAN VITERBO MAXIMIANO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/DF**

**FEVEREIRO/2017**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**PRÉ – CONDICIONAMENTO DE SEMENTES DE MILHO EM ÁGUA COM**  
**DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OZÔNIO**  
**NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS E NO CONTROLE DE**  
*Fusarium spp.*

**CHRISTIAN VITERBO MAXIMIANO**

**ORIENTADOR: RICARDO CARMONA**  
**CO-ORIENTADORA: NARA OLIVEIRA SILVA SOUZA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**  
**EM AGRONOMIA**

**PUBLICAÇÃO: 132/2017**

**BRASÍLIA/DF**

**FEVEREIRO/2017**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**PRÉ – CONDICIONAMENTO DE SEMENTES DE MILHO EM ÁGUA COM  
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OZÔNIO  
NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS E NO CONTROLE DE  
*Fusarium* spp.**

**CHRISTIAN VITERBO MAXIMIANO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDO AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.**

**APROVADA POR:**

---

**Prof. Dr. RICARDO CARMONA (FAV/UnB)**  
**(Orientador)**

---

**Prof. Dr. ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR (FAV/UnB)**  
**(Examinador interno)**

---

**Prof. Dra. ROSANA DE CARVALHO CRISTO MARTINS (EFL/UnB)**  
**(Examinadora externa)**

**BRASÍLIA/DF, 24 de Fevereiro de 2017.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

MAXIMIANO, Christian Viterbo  
“PRÉ – CONDICIONAMENTO DE SEMENTES DE MILHO EM ÁGUA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OZÔNIO NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS E NO CONTROLE DE *Fusarium* spp”. Orientação: Ricardo Carmona, Brasília 2017. 55 p.

Dissertação de mestrado – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2017.

1. Ozônio, água, *Zea mays* L, germinação, sanidade, *Fusarium*.  
I. Carmona, R. II. Dr.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

MAXIMIANO, C.V. **Pré-condicionamento de sementes de milho em água com diferentes concentrações de ozônio no desenvolvimento inicial da plântula e no controle de *Fusarium* spp.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 55 páginas. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Christian Viterbo Maximiano

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Pré- condicionamento de sementes de milho em água com diferentes concentrações de ozônio no desenvolvimento inicial da plântula e no controle de *Fusarium* spp.

GRAU: Mestre

ANO: 2017

É concedida à Universidade de Brasília de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

-----  
Nome: Christian Viterbo Maximiano

Email: christianviter@hotmail.com

*DEUS, SENHOR DA MINHA VIDA,  
E A MINHA FAMÍLIA  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus, por me guiar e permitir que eu crescesse com as diversas dificuldades que encontrei nessa caminhada.*

*À minha amada mãe, Shirlene, que sempre iluminou minha vida com todo seu amor e carinho, sempre me incentivando e me dando forças, durante todas as escolhas que movem a minha vida.*

*Ao meu querido pai, Alfredo, que é a base de todo o meu comprometimento e determinação profissional, que sempre me apoiou e me deu força para conseguir alcançar meus sonhos.*

*À minha família, base de todo o carinho e amor que existe em mim.*

*Ao meu orientador Professor Ricardo Carmona, não somente pelos conselhos no desenvolvimento e elaboração desta dissertação, mas principalmente pela amizade, pelos conselhos e exemplos para meu desenvolvimento pessoal e profissional.*

*À minha co-orientadora Professora Nara, por conduzir os meus primeiros passos na pesquisa, pela confiança nas minhas atividades desde a época da graduação até a conclusão do curso de mestrado, pelas orientações e pela sua amizade.*

*Ao professor Ernandes, pela orientação, disponibilidade e apoio dados em diversos momentos durante o curso de mestrado.*

*Ao professor Luiz Blum, por sua disponibilidade, orientação e ensinamentos durante o curso do mestrado.*

*À professora Rosana, pelas sugestões e participação na banca examinadora.*

*À minha amiga Flívia Fernandes, pela amizade, pela colaboração e companhia durante estes dois anos;*

*Aos colegas e amigos do Curso, pela amizade, apoio, oportunidade de aprendizado e pelos momentos de descontração e alegria.*

*À CAPES, pelo apoio financeiro durante meu curso de mestrado.*

*Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, por terem contribuído com a minha formação profissional.*

*À todos que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Superfície de resposta referente à germinação das sementes de milho em função da concentração de ozônio em água e período de embebição. Brasília – DF, 2017. .... 27
- Figura 2.** Superfícies de resposta referentes ao Índice de velocidade de emergência (IVE) (Fig.2.A); Massa seca de plântulas (MS) (Fig.2.B); Comprimento de plântula (CP) (Fig.2.C) e Comprimento de radícula (CR) (Fig.2.D) em função da concentração e período de embebição. Brasília – DF, 2017. .... 29
- Figura 3.** Superfície de resposta referente à condutividade elétrica das sementes de milho em função da concentração de ozônio em água e período de embebição. Brasília – DF, 2017. .... 32

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Análise de variância dos dados de comprimento de plântula (CP); comprimento de radícula (CR); condutividade elétrica (CE); matéria seca de plântula (MS); índice de velocidade de emergência (IVE) e teste padrão de germinação (TPG) para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho submetidas ao pré - condicionamento em água ozonizada em função da concentração de ozônio e período de embebição. Brasília-DF, 2017..... 26

**Tabela 2.** Percentual médio de sementes infectadas com *Fusarium* spp. em sementes expostas a água contendo diferentes concentrações de ozônio. Brasília – DF, 2017..... 34

## RESUMO

A técnica de hidratação controlada das sementes vem sendo utilizada como método de condicionamento fisiológico objetivando melhorar o desempenho destas no campo. A aeração da solução com gás ozônio constitui outra opção promissora no controle de microrganismos fitopatogênicos, sendo o gás ozônio relativamente instável e decompondo-se facilmente na forma de oxigênio molecular. O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito do pré-condicionamento de sementes de milho em água ozonizada no desenvolvimento inicial das plântulas e no controle de *Fusarium* spp. Foram realizados dois experimentos para avaliar os parâmetros de qualidade fisiológica e sanitária das sementes submetidas ao pré-condicionamento em água ozonizada. Na avaliação da qualidade fisiológica, as sementes do milho híbrido (P30F53) foram imersas em água destilada com aeração de gás ozônio na solução, sendo submetidas a quatro concentrações de gás ozônio ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $20 \text{ mg L}^{-1}$  e  $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) em cinco períodos de embebição (0, 30, 60, 90 e 120 min) em quatro repetições de 50 sementes. Após o pré-condicionamento em água ozonizada, as sementes foram submetidas aos testes de qualidade fisiológica. As avaliações de qualidade fisiológica foram: germinação (TPG); comprimento de plântula (CP) e de raiz (CR); índice de velocidade de emergência (IVE); massa seca de plântulas (MS) e condutividade elétrica (CE). Para a avaliação do efeito do ozônio no controle de *Fusarium* spp., as sementes do milho híbrido (P30F53) foram inoculadas com suspensão de conídios de *Fusarium* spp, na concentração de  $10^6$  conídios/mL. Após a inoculação, as sementes receberam as mesmas condições da etapa anterior, em quatro repetições de 25 sementes. Após este tratamento, as sementes foram submetidas ao teste de sanidade. No teste de sanidade houve testemunhas de controle com e sem inoculação; com fungicida e hipoclorito a 1%. A técnica de pré-condicionamento das sementes de milho em água ozonizada, seguido de secagem natural, reduziu a perda de solutos celulares das sementes e acarretou desenvolvimento inicial mais acentuado das plântulas de milho, medido por meio do índice de velocidade de emergência, matéria seca de plântulas, comprimento de plântula e radícula, quando comparados com a testemunha. O desenvolvimento inicial das plântulas de milho foi intensificado mediante a exposição das sementes a água, especialmente nas concentrações de  $0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de ozônio, durante o período de 60 a 90 minutos, seguido de secagem natural das sementes. No teste de sanidade, os tratamentos de pré-condicionamento das sementes em água ozonizada não apresentaram efeito para o controle de *Fusarium* spp. A testemunha controle com fungicida (carbendazim+thiram) resultou em 100% de controle da infestação do fungo *Fusarium* spp.

**PALAVRAS-CHAVE:** oxigênio triatômico, imersão, desempenho, uniformidade, sanidade, patógeno

## ABSTRACT

The technique of controlled hydration of the seeds has been used as a method of physiological conditioning aiming to improve their performance in the field. The aeration of the solution with ozone gas is another promising option in the control of phytopathogenic microorganisms, being relatively unstable and decomposing easily in the form of molecular oxygen. The objective of the present work was to verify the effect of the preconditioning of corn seeds in ozonated water in the early development of the seedlings and in the control of *Fusarium*. Two experiments were carried out to evaluate the parameters of physiological and sanitary quality of the seeds submitted to preconditioning in ozonated water. In the evaluation of the physiological quality, the seeds of hybrid maize (P30F53) were immersed in distilled water with aeration of ozone gas in the solution, being submitted to four concentrations of ozone gas (0 mg L<sup>-1</sup>, 10 mg L<sup>-1</sup>, 20 mg L<sup>-1</sup> e 30 mg L<sup>-1</sup>) and four soaking periods (0, 30, 60, 90 e 120 min) in four replicates of 50 seeds. After preconditioning in ozonated water, the seeds were submitted to physiological quality tests. The evaluations of physiological quality were: germination; length of seedlings and roots; emergency speed index; dry mass of seedlings and electrical conductivity. For the evaluation of the effect of ozone on *Fusarium* control, hybrid maize seeds (P30F53) were inoculated with *Fusarium* conidia suspension at the concentration of 10<sup>6</sup> conidia / mL. After inoculation, the seeds were given the same conditions as in the previous step, in four replicates of 25 seeds. After this treatment, the seeds were submitted to the sanity test. In the sanity test there were control witnesses with and without inoculation; with fungicide and hypochlorite 1%. The technique of preconditioning of corn seeds in ozonated water, followed by natural drying, reduced the loss of seed solutes and led to a more pronounced initial development of maize seedlings, measured by the rate of emergence, dry matter Of seedlings, seedling length and radicle, when compared with the control. The initial development of maize seedlings was enhanced by seed exposure to water, especially 0 mg L<sup>-1</sup> and 30 mg L<sup>-1</sup> of ozone, during the period of 60 to 90 minutes, followed by natural drying of the seeds. In the sanity test, pre-conditioning treatments of the seeds in ozonated water had no effect for *Fusarium* control. The control control with fungicide (carbendazim + thiram) resulted in 100% control of *Fusarium* fungus infestation.

**KEY WORDS:** Triatomic oxygen, immersion, performance, uniformity, sanity, pathog

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3.1 Produção do milho.....	4
3.2 Qualidade de sementes de milho .....	5
3.2.1 Qualidade fisiológica de sementes de milho.....	7
3.3 Fisiologia da germinação.....	8
3.3.1 Condicionamento fisiológico de sementes .....	10
3.4 Fungos em sementes de milho.....	12
3.4.1 <i>Fusarium</i> spp.....	14
3.5 Uso do gás ozônio (O <sub>3</sub> ).....	15
3.5.1 Ozônio em água .....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Sementes.....	21
4.2 Análises de qualidade fisiológica e sanitária .....	21
4.3 Obtenção do gás ozônio.....	21
4.4 Pré - condicionamento das sementes em água ozonizada.....	22
4.5 Testes de qualidade fisiológica .....	22
4.5.1 Teste padrão de germinação (TPG) .....	22
4.5.2 Comprimento de plântulas (CP) e de radículas (CR).....	23
4.5.3 Matéria seca de plântulas (MS) .....	23
4.5.4 Condutividade elétrica (CE) .....	23
4.5.5 Índice de velocidade de emergência (IVE).....	23
4.6 Avaliação da incidência do Fungo <i>Fusarium</i> spp.....	24
4.7 Análises estatísticas .....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÕES.....	36
7. RECOMENDAÇÕES.....	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38

## 1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.), em função do seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo dos grãos, é um dos cereais mais cultivados e consumidos no mundo. A produção de milho no Brasil cresce, ao longo dos anos, devido principalmente à introdução de cultivares mais produtivas, em conjunto com a utilização de práticas culturais que visam maximizar a produtividade, além do aumento da área cultivada com semeaduras de segunda época ou safrinha.

A utilização de sementes de alta qualidade constitui a base para a elevação da produtividade agrícola, de forma que o componente fisiológico da qualidade de sementes tem sido objeto de inúmeras pesquisas, em decorrência das sementes estarem sujeitas a uma série de mudanças degenerativas após a sua maturidade (FREITAS; NASCIMENTO, 2006). A qualidade fisiológica das sementes é de fundamental importância, pois desempenha funções vitais caracterizadas pela germinação, vigor e longevidade, sendo que o vigor pode ser definido como a soma de atributos que conferem à semente o potencial para germinar, emergir e resultar rapidamente em plântulas normais, em ampla diversidade de condições ambientais (MARCOS FILHO, 2005).

O condicionamento fisiológico é uma técnica de embebição controlada das sementes que permite a ativação dos processos metabólicos da germinação, evitando a emissão da raiz primária, propiciando uniformização e melhor desempenho das plantas em campo (CASTRO; HILHORST, 2004). Esse processo envolve a absorção de água pelas sementes sob condições controladas, hidratando-as e ativando o metabolismo nas fases I e II da embebição sem que ocorra a protrusão da raiz primária, quando, então, são colocadas para secar. Tem sido bastante utilizado em sementes de hortaliças, tendo-se verificado redução do tempo entre a semeadura e a emergência e uma melhoria na uniformidade da emergência das plântulas. A utilização do condicionamento fisiológico de semente vem ganhando espaço nas grandes culturas como o milho (FERREIRA, 2011) e soja (GIURIZZATO, 2008), tendo-se verificado resultados positivos no desempenho da germinação e vigor das plântulas.

A qualidade sanitária das sementes é de fundamental importância, pois sementes contaminadas podem reduzir a população de plantas e a produtividade e, também, servir como veículo de disseminação de patógenos (CASA et al., 1998). Muitos fungos veiculados pela semente de milho podem ser transmitidos às plântulas (McGEE, 1988).

No Brasil, os principais fungos patogênicos veiculados pelas sementes de milho são *Fusarium moniliforme* (Sheld.), *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc. e *F. graminearum* Schwabe (TANAKA; BALMER, 1980; GOMES et al., 1981; LUZ, 1997). Dentre os patógenos associados às sementes de milho, o *Fusarium verticillioides* é o mais comumente encontrado (REIS et al., 1995; REIS; CASA et al., 2004). A prática do uso de fungicidas para tratamento de sementes de milho tem sido ainda, a mais empregada pelos agricultores. Contudo, tecnologias novas vêm sendo adotadas no controle de fungos em grãos, como o uso do gás ozônio (ROZADO et al., 2008).

Nos últimos anos, a utilização do ozônio tem-se expandido de forma considerável, nacional ou internacionalmente, em diferentes áreas de aplicação, como no tratamento de água potável, efluentes domésticos e industriais e processos de branqueamento de celulose, entre outros. Novos segmentos de aplicações de ozônio são desenvolvidos, principalmente nas áreas de processamento de alimentos e agricultura, com aprovação da FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos, para esta finalidade (RICE; GRAHAM, 2002).

O ozônio (O<sub>3</sub>) é um poderoso agente oxidante que pode ser gerado no local, através de um processo de descarga elétrica (KIM et al., 1999). Desta forma, sua utilização se torna atraente no controle de insetos e fungos em grãos armazenados, pelo fato de descartar a necessidade de manipulação, armazenamento ou eliminação dos recipientes de produtos químicos e, ainda, em virtude de possuir uma meia vida curta e de seu produto de degradação ser o oxigênio (KELLS et al., 2001; MENDEZ et al., 2003).

O ozônio dissolvido em água constitui outra opção promissora no controle de microrganismos, sendo relativamente instável e decompondo-se facilmente na forma do oxigênio molecular (KHADRE et al., 2001). A água ozonizada é utilizada para desinfestação e desinfecção de alimentos e superfícies, possuindo uma eficácia de desinfecção maior contra bactérias, quistos de protozoários, vírus, fungos e esporos de fungos em relação ao hipoclorito (MENDEZ et al., 2003). Portanto, o uso da água ozonizada tem se mostrado uma alternativa em substituição aos agentes químicos tradicionais, apresentando alta eficiência a baixas concentrações, em um período curto de contato e sem formação de produtos tóxicos, pois é altamente reativo e não deixa resíduos na semente.

O uso de novas tecnologias, como o pré-condicionamento, pode facilitar o ganho em uma série de características importantes para o estabelecimento das plântulas,

melhorando assim as etapas iniciais da planta para a produção de suas sementes e conjuntamente com o gás ozônio, pode trazer grandes benefícios em relação ao controle de fitopatogénos como o *Fusarium* que causam grandes prejuízos no estabelecimento inicial das culturas.

Contudo, faz-se necessário um estudo direcionado para verificar o efeito do pré-condicionamento de sementes de milho em água ozonizada no desenvolvimento inicial de plântulas e no controle de *Fusarium* spp.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito da água ozonizada no desenvolvimento inicial de plântulas e no controle de *Fusarium* spp. em sementes de milho.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Avaliar o efeito da exposição de sementes de milho por diferentes períodos em água com distintas concentrações de ozônio na percentagem de germinação;
- 2) Verificar o efeito da exposição de sementes de milho por diferentes períodos em água com distintas concentrações de ozônio no desenvolvimento inicial de plântulas;
- 3) Analisar o efeito da exposição de sementes de milho por diferentes períodos em água com distintas concentrações de ozônio na condutividade elétrica do soluto;
- 4) Testar o efeito da exposição de sementes de milho por diferentes períodos em água com distintas concentrações de ozônio no controle de *Fusarium* spp.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Produção do milho**

No cenário atual, o milho é o cereal mais produzido no mundo, sendo esperada uma produção de 1.011,07 bilhão de toneladas para a safra 2016/17, sendo que a produção mundial se concentra basicamente em três países produtores: EUA, China e Brasil; e que sozinhos esses países representam 65,62% da produção mundial de milho. O Brasil se encontra na terceira posição no ranking de produtores, com uma expectativa de produção de 82 milhões de toneladas para a safra 2016/17 (USDA, 2016).

Apesar da expansão do consumo de milho nas últimas safras, com uma demanda mundial contínua e crescente, a produção de milho manteve um crescimento superior na escala de produção. A partir da safra 2010/11 até a safra 2014/15, houve um aumento nos estoques finais mundiais, em que grande parte se concentra na China, que é o principal propulsor dos aumentos nos estoques nas safras 2011/12 e 2012/13; e para a safra 15/16 é esperado que os estoques chineses representem 46,58% dos estoques mundiais. Atualmente, devido à contínua e crescente demanda mundial, e também à ocorrência da redução do volume mundial produzido na safra 2015/16, espera-se um cenário de convergência entre produção e consumo mundial da safra 2016/17, o que não acontecia desde a safra 2012/13, quando houve a quebra de safra nos EUA, e a produção mundial reduziu consideravelmente (USDA, 2016).

Atualmente o maior importador de milho é o Japão, com expectativa de 15 milhões de toneladas importadas na safra 2016/17, onde devido às condições de relevo e clima, impossibilitam a produção deste cereal no país, tendo que importar todo milho consumido (USDA, 2016). O mercado de exportação de milho é praticamente dominado por quatro países: EUA, Brasil, Ucrânia e Argentina. Estes países responderam por 83,28% das exportações mundiais na safra 2015/16. Os dois primeiros se caracterizam por serem grandes produtores e também consumirem boa parte da sua produção. A Ucrânia e a Argentina destinam mais de 60% da sua produção para o mercado externo, demonstrando assim grande dependência das exportações para escoarem seu milho (USDA, 2016).

No Brasil, o milho é cultivado em praticamente todo o território nacional, havendo registro de produção de milho em 97% dos municípios brasileiros entre 2004 e 2008 (IBGE, 2010). Na safra 2009/2010 foram plantados 12,94 milhões de hectares,

resultando numa produção estimada de 51,3 milhões de toneladas. Na safra de 2012/13 o milho foi o cereal mais produzido no país com cerca de 81 milhões de toneladas (CONAB, 2010). O Brasil possui uma alta diversidade em termos de sistemas de produção considerados, ocorrendo desde propriedades com plantios de subsistência que utilizam técnicas rudimentares, até propriedades altamente tecnificadas, que visam à exploração comercial da produção (MONTEIRO et al., 1996). Esta diversidade ocorre em função das características edafoclimáticas, sendo que as principais épocas de plantio variam de acordo com a região geográfica. Os fatores climáticos que exercem maior influência sobre a cultura do milho são a radiação solar, a precipitação e a temperatura, que interferem diretamente nas atividades fisiológicas da planta e, conseqüentemente, na produção de grãos e matéria seca (LANDAU et al., 2009).

Na maior parte do território nacional, a safra principal (safra “verão”) é plantada em setembro/outubro, ocorrendo a colheita em dezembro/janeiro. Após a cultura de verão (entre janeiro e abril), em algumas regiões do país é semeado o milho de sequeiro, denominado milho “safrinha”. Apesar da produção de milho ocorrer em praticamente todos os municípios brasileiros, existem áreas de maior concentração da atividade, situadas, na sua maioria, entre os paralelos 10 e 30° Sul. Nas regiões Sul e Sudeste predominam o plantio da safra de verão, e na região Centro-Oeste, o plantio de milho na época de safrinha (SANS; GUIMARÃES, 2009).

A produção do milho brasileiro, ainda possui sérios problemas de logística, sendo que o grande entrave está nas distâncias dos centros produtores de milho até os portos, e das condições ruins das rodovias. O principal meio de transporte utilizado no Brasil é o rodoviário, sendo considerado também o mais oneroso, o que diminui a competitividade brasileira se comparada aos principais países exportadores de milho (CNT, 2015).

### **3.2 Qualidade de sementes de milho**

A semente é um dos principais insumos da agricultura, sendo a qualidade um dos fatores primordiais para o estabelecimento de qualquer cultura (FREITAS; NASCIMENTO, 2006). O sucesso da produção de sementes está intrinsecamente ligado à sua qualidade, expressão ampla, que abrange outros conceitos, como a “qualidade fisiológica”, “qualidade física”, “qualidade genética” que por si só e isoladamente não são capazes de determinar o desempenho de um lote. A expressão “qualidade de

sementes” é a mais adequada, pois engloba o valor de um lote de sementes como um todo, atendendo o principal objetivo de sua utilização (MARCOS FILHO, 2005).

Segundo Popinigis (1985), os quatro atributos essenciais para a qualidade de sementes são:

**a) Atributos genéticos:** Estão relacionados com a pureza varietal, homogeneidade, potencial de produtividade, resistência a patógenos e pragas, precocidade, atributos morfológicos da planta, entre outros.

**b) Atributos físicos:** os principais atributos da qualidade física das sementes incluem pureza física, umidade, danificações mecânicas, peso volumétrico, massa de 1000 sementes e aparência.

**c) Atributos fisiológicos:** é a capacidade da semente de desempenhar funções vitais, caracterizada pela sua germinação, vigor e longevidade.

**d) Atributos sanitários:** é definido como a associação de patógenos (fungos, bactérias, vírus e nematóides) com as sementes, que podem implicar em redução do rendimento e comprometimento da qualidade das mesmas.

A qualidade da semente é traduzida exatamente pelo somatório de seus atributos, que culminam no surgimento do cultivo ideal, onde a qualidade tem destaque por influenciar diretamente na produtividade agrícola, visto que é responsável pela maximização da ação dos insumos e das técnicas de manejo, influenciando diretamente no sucesso da lavoura e contribuindo significativamente para que os altos níveis de produtividade sejam alcançados (MARCOS FILHO, 2005). A qualidade das sementes pode ser facilmente observada na uniformidade do estande da cultura; no material sadio que não é veículo de transmissão de patógenos; no alto vigor, capaz de superar as mais diversas condições adversas e na capacidade de manter a sua vitalidade por um determinado período de tempo, isto é, a sua longevidade (POPINIGIS, 1977).

### **3.2.1 Qualidade fisiológica de sementes de milho**

A qualidade fisiológica da semente é avaliada por duas características fundamentais: germinação e vigor (SOUZA et al., 2005). Os atributos fisiológicos são influenciados pelas características genéticas herdadas de seus progenitores, sendo estes fatores afetados pelas condições ambientais, métodos de colheita, secagem, processamento, tratamento, armazenamento e embalagem (ANDRADE et al., 2001).

Os testes para avaliação da qualidade fisiológica das sementes são realizados em laboratórios, principalmente pelo teste de germinação; no entanto, este é conduzido em condições favoráveis de temperatura, umidade e de luz, permitindo ao lote expressar o seu potencial máximo, sendo, portanto, pouco eficiente para indicar o desempenho no campo (MARCOS FILHO, 2005).

Segundo Perry (1981), as sementes que estão sujeitas às condições adversas do campo, como excesso ou déficit hídrico, obstrução mecânica imposta por compactação da camada de solo que as cobre e ao ataque de microrganismos e insetos, apresentam menor porcentagem de emergência das plântulas em campo, às vezes, sendo menor do que a porcentagem de germinação obtida com o teste de germinação. Observa-se que as condições adotadas em laboratório não são obrigatoriamente encontradas em campo, causando discrepâncias com relação aos resultados obtidos.

Com a constatação de que o teste de germinação era inadequado para estimar a emergência das plântulas em campo, sob condições adversas de ambiente, houve o desenvolvimento de conceitos de vigor e, conseqüentemente, de novos testes para aprimorar a eficiência da avaliação da qualidade fisiológica das sementes (SANTOS et al., 2003). Segundo o Comitê de Vigor Internacional de Analista de Sementes (ISTA) o vigor da semente é a soma de todas as propriedades da semente as quais determinam o nível de atividade e o desempenho da semente, ou do lote de sementes durante a germinação e a emergência de plântulas. As sementes que possuem um bom desempenho são classificadas como vigorosas e as que apresentam baixo desempenho são chamadas de sementes de baixo vigor (MARCOS FILHO, 2011).

Na fase de plântula a influência do vigor da semente é marcante sobre todos os aspectos do processo germinativo, desde a própria possibilidade de ocorrência da germinação até outras características, como a uniformidade, a velocidade, o tempo total de germinação, o tamanho e o peso das plântulas (SCHUCH et al., 1999; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Os testes de vigor são utilizados para diferenciar os níveis de vigor entre as sementes, distinguindo-as também entre seus lotes. Estes testes são classificados em métodos diretos e métodos indiretos. Os diretos seriam os métodos que procuram simular as condições (às vezes adversas) que ocorrem no campo e os indiretos procuram avaliar atributos que indiretamente se relacionam com vigor (físicos, biológicos, fisiológicos) das sementes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

Diversos testes de vigor estão sendo executados, procurando comparar, com precisão, o comportamento de lotes de sementes em laboratório e no campo, por exemplo, o teste de frio para milho (CÍCERO; VIEIRA, 1994), o teste de envelhecimento acelerado para soja (VIEIRA et al., 1994) e o teste de condutividade elétrica para ervilha (CALIARI; MARCOS FILHO, 1990; BLANDON; BIDDLE, 1992).

Um teste, isoladamente, é incapaz, seja ele, germinativo, fisiológico ou bioquímico, de avaliar um lote de sementes, mesmo para uma única espécie, sob todas as condições. Portanto, as pesquisas com testes de vigor devem considerar as variáveis e suposições envolvidas em cada teste (OLIVEIRA et al., 2009).

A utilização de sementes que apresentem um elevado potencial fisiológico (vigor e germinação) traz vários benefícios para o agricultor, como uma melhor germinação do lote, sendo esta rápida e uniforme, plântulas que suportam uma gama variada de adversidades ambientais, tais como, estresses hídricos e apresenta uma maturidade mais uniforme da colheita, o que traz um enorme benefício por ocasião da colheita, evitando que se realize uma colheita desuniforme (MARCOS FILHO, 1999).

### **3.3 Fisiologia da germinação**

O processo germinativo das sementes consiste na reativação do crescimento do embrião por meio de uma seqüência ordenada de eventos metabólicos, resultando na ruptura do tegumento pela radícula. O início desse processo se dá pela absorção de água pelas sementes e termina com o alongamento do eixo embrionário (BEWLEY; BLACK, 1994).

A embebição é um processo de fundamental importância para a germinação das sementes, pois permite a retomada da atividade metabólica, contribuindo para os processos de mobilização e assimilação de reservas e crescimento subsequente (MARCOS FILHO, 2005). A velocidade de embebição depende das características de

cada espécie, dentre essas, da composição química e da permeabilidade do tegumento (BEWLEY; BLACK, 1994).

No campo da fisiologia da germinação de sementes as três etapas principais durante a germinação das sementes seriam a **embebição**, o **processo bioquímico preparatório** e a **emergência** da plântula. As três etapas também poderiam ser identificadas como: **Reativação**, que envolve a embebição, a ativação da respiração e as demais etapas do metabolismo; **Indução do crescimento**, fase de repouso, como preparo para o crescimento; e **Crescimento**, protusão da raiz primária (BEWLEY; BLACK, 1994).

A maioria das sementes possui o padrão inicial de germinação trifásico, ou seja, ao se monitorar o conteúdo de água de sementes secas submetidas à embebição em água, se observa um padrão trifásico de absorção de água e hidratação das sementes sob condições ideais de suprimento de água (BEWLEY; BLACK, 1994). Na **Fase I**, denominada embebição, que é um processo dirigido pelo gradiente de potencial hídrico entre a semente e seu ambiente, ocorre uma rápida entrada de água, em função da grande diferença de potencial entre as sementes e o substrato, independentemente do estado fisiológico das sementes (BEWLEY; BLACK, 1994; FERREIRA; BORGUETTI, 2004; MARCOS FILHO, 2005).

Na **Fase II**, conhecida como intervalo ou fase de preparação e ativação do metabolismo, a velocidade de absorção de água se torna mais lenta, tendendo para o equilíbrio entre os potenciais; ocorrendo diversas reações metabólicas preparatórias à emergência da raiz primária. Nesta fase, as células no interior das sementes não podem mais absorver água porque não podem mais se expandir e o potencial hídrico das sementes é nulo. Durante a Fase II, são ativados os processos metabólicos requeridos para o crescimento do embrião e para a conclusão do processo germinativo e as sementes também tendem a se manter tolerantes a desidratação ou a dessecação (FERREIRA; BORGHETTI, 2004; MARCOS FILHO, 2005).

A **Fase III** da embebição é marcada novamente por um aumento no conteúdo de água na semente, que acontece devido à absorção associada com a iniciação do crescimento do embrião. Na Fase III, com o metabolismo ativado e em função da produção de substâncias osmoticamente ativas, ocorre uma redução no potencial hídrico das sementes, resultando em rápida absorção de água do meio. A iniciação da emergência ou protusão da radícula geralmente marca um ponto sem retorno para a

semente, que se encontra comprometida com a germinação e com o desenvolvimento da plântula (BEWLEY; BLACK, 1994; FERREIRA; BORGUETTI, 2004).

Vários estudos estão sendo realizados com o intuito de reduzir o tempo necessário entre a semente e a emergência das plântulas, e um dos procedimentos mais promissores é o tratamento pré-semeadura, envolvendo a iniciação do metabolismo de germinação das sementes, por meio do controle da absorção de água pela semente, sem, no entanto, permitir a protusão da radícula (KIKUTI et al., 2005; NASCIMENTO, 2005; GIURIZZATO, 2008; FERREIRA, 2011).

### **3.3.1 Condicionamento fisiológico de sementes**

O condicionamento fisiológico de sementes é uma técnica que vem sendo utilizada para promover suprimento de água às sementes, para que as mesmas possam iniciar as primeiras etapas do processo de germinativo (fases I e II) sem, contudo iniciar a protrusão da raiz. Como consequência, há a reorganização das membranas celulares e reparação dos tecidos da semente (ARTOLA et al., 2003).

No processo de condicionamento fisiológico, pode ocorrer danos irreversíveis as sementes, se as mesmas ultrapassarem a fase II do processo de embebição (TOSELLI; CASENAVE, 2003). Assim, se o processo de hidratação for incompleto, ou seja, ocorrer até a fase II, de tal modo que permita a atividade de alguns metabólitos e de mecanismos de reparação, pode ser utilizado para uniformizar a germinação das sementes.

A eficiência da técnica de hidratação implica que a absorção de água seja lenta para que não haja danos às membranas. Segundo Marcos Filho (2005) várias técnicas de condicionamento de sementes têm sido empregadas, como:

- Embebição em atmosfera úmida: promove a embebição por meio da exposição das sementes à atmosfera saturada com vapor d'água.
- Condicionamento mátrico: fornece água para as sementes por meio de substrato inerte umedecido.
- Imersão em água ou hidrocondicionamento: fornecimento de água diretamente às sementes.

- Condicionamento osmótico: controla a absorção da água pelas sementes pela adição de agente osmótico (PEG, NaCl, KNO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>) na água de embebição.

Portanto, tratamentos de pré-semeadura como o condicionamento fisiológico das sementes, que induzem a iniciação metabólica mediante a hidratação das sementes, têm surgido com a finalidade de elevar a taxa e a velocidade de germinação, produzir uniformidade na emergência e elevar a capacidade das plântulas em resistir aos efeitos adversos do ambiente (VARIER et al., 2010). Essa técnica tem sido estudada com sucesso em diversas culturas, particularmente em hortaliças, como alface (NASCIMENTO; CANTLIFFE et al., 1998), beterraba (COSTA; VILLELA, 2006), cebola (CASEIRO et al., 2004), cenoura (BALBINOT; LOPEZ, 2006) e tomate e pimentão (VENKATASUBRAMANIAN; UMARANI, 2007).

Na literatura existem relatos de trabalhos em que a técnica do hidrocondicionamento de sementes promoveu aumento significativo na qualidade fisiológica dos lotes condicionados e não apenas na uniformização da qualidade dos mesmos. Artola et al. (2003) propôs uma solução para o problema do estabelecimento das plântulas de *Ornithopus compressus*, através do envigoreamento de suas sementes utilizando a técnica do priming em água ou hydropriming. Foram encontradas diferenças significativas no teste de vigor, comprovando que o hydropriming promoveu uma melhora no vigor das sementes de *Ornithopus compressus*, com o lote de melhor vigor emergindo primeiro. Houve também uma melhora acentuada na uniformidade dos lotes, especialmente no lote de menor vigor.

Perez e Negreiros (2001) avaliaram o efeito do pré-condicionamento na qualidade fisiológica de *Peltophorum dubium* em condições de estresse. O ensaio consistiu de quatro tratamentos onde o primeiro não recebeu pré-condicionamento, o segundo recebeu condicionamento em água destilada continuamente aerada por 24 horas a 20 °C e o terceiro e o quarto receberam pré-condicionamento em soluções de KNO<sub>3</sub> a 0,5 M e 1,0 M continuamente aeradas por 24 horas a 20 °C, respectivamente. Os autores concluíram que o condicionamento em água melhorou a qualidade fisiológica das sementes de canafístula enquanto o osmocondicionamento com KNO<sub>3</sub> a 0,5M e 1,0 M reduziu a viabilidade e o vigor das sementes. As sementes condicionadas em água e armazenadas por 45 dias apresentaram maiores valores de germinação e de velocidade de germinação em condições de estresse salino.

Em trabalhos realizados por Giurizzato et al. (2008) com sementes de soja e por Marcos Filho e Kikuti (2008) em sementes de couve-flor, observou-se aumento da expressão do vigor pela velocidade de germinação e de emergência de plântulas, indicando vantagem do tratamento por hidrocondicionamento de sementes.

### **3.4 Fungos em sementes de milho**

As doenças do milho ocorrem praticamente em todos os locais onde o cereal é cultivado e são responsáveis pela baixa produtividade e qualidade das sementes (REIS et al., 2004; PEREIRA et al., 2005). Os fungos são os principais patógenos da cultura, podendo parasitar todos os órgãos da planta (WHITE, 1999). Dentre os principais fungos patogênicos destacam-se os associados às sementes, responsáveis pela deterioração de sementes, podridão radicular, podridões da base do colmo e de espigas, onde as sementes infectadas representam o principal veículo de disseminação e sobrevivência dos patógenos garantindo a continuidade do ciclo biológico do patógeno (REIS; CASA, 1998).

A transmissão de um patógeno pela semente pode ser influenciada por uma série de fatores, como: espécie cultivada, condições ambientais, práticas culturais, sobrevivência do inóculo, vigor da semente, microflora do solo e da semente e outros. Estes fatores podem reduzir ou incrementar a passagem do patógeno para os órgãos foliares ou radiculares da planta, refletindo, assim, na epidemiologia da doença (REIS; CASA, 1998).

No solo, os fungos encontram condições ideais para atacar as sementes de milho, principalmente, quando a semeadura é realizada em condições desfavoráveis, isto é, em solo frio e úmido, onde há impedimento da germinação ou redução da velocidade de emergência, propiciando uma maior exposição ao ataque dos fungos (PINTO, 1993).

Os principais fungos que infestam ou infectam as sementes de milho são *Colletotrichum graminicola*, *Stenocarpella maydis*, *Stenocarpella macrospora*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides*, sendo associados à semente e transmitidos às plântulas (REIS et al., 1995; PINTO, 1996; REIS; CASA, 1996; CASA et al., 2004). Destes, o fungo *Fusarium verticillioides* é o patógeno mais detectado e disseminado nas sementes de milho no Brasil, sendo o mais estudado em relação à transmissão para plântulas e para a planta adulta (SARTORI et al., 2004). Este patógeno causa podridões radiculares, podridões da base do colmo e da espiga (BALMER, 1980).

As sementes representam o principal meio de disseminação dos patógenos, podendo ser levadas a longas distâncias (lavouras, municípios, estados, países, continentes) devido à comercialização, além de favorecer a introdução em lavouras de primeiro ano de cultivo e em áreas de rotação de culturas (REIS; CASA, 2007). A associação dos patógenos às sementes garante o acesso direto do patógeno a fonte nutricional por ocasião da germinação e emergência. Os fungos associados à semente podem deteriorar a semente interferindo na população de plantas e também serem transmitidos da semente à plântula ou planta jovem colonizando órgãos radiculares e aéreos (McGEE, 1988; CASA et al., 2006).

A semente deteriorada acarreta interferência na população de plantas emersas, sendo um dos fatores que afetam a produtividade do milho (FANCELI; DOURADO NETO, 2003). A redução no número de plantas no campo é percebida após a emergência, devido à ocorrência de podridão das sementes e a morte de plântulas, ocorridas antes ou depois da emergência (PEREIRA et al., 2005).

A podridão da semente é consequência da morte do embrião antes mesmo de germinar, devido a infecções severas causadas principalmente por fungos. Em outra situação, há germinação de sementes com posterior morte da plântula (CASA et al., 2006).

Dentre os organismos comumente associados ao apodrecimento de sementes de milho e morte de plântulas em pré ou pós emergência estão os fungos *Fusarium verticillioides*, *Helminthosporium maydis*, *Colletotrichum graminicola*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* Destes o fungo *F. verticillioides* é o mais comumente encontrado associado ao apodrecimento de sementes na cultura do milho, interferindo na qualidade fisiológica da semente e prejudicando o estande da lavoura (GOULART; FIALHO, 1994; BALMER, 1980).

Os fatores que interferem na viabilidade do inóculo na semente e que podem afetar a população de plantas são: a profundidade de semeadura, as condições de umidade e temperatura do solo, dano mecânico na semente e sistemas de monocultura ou rotação (REIS et al., 2004).

O armazenamento das sementes para fins agrícolas geralmente é utilizado para a manutenção de estoques no período da entressafra ou para a provisão de quantidades suficientes para atender a demanda de comercialização. No entanto, as mesmas condições de armazenamento que permitem a manutenção da viabilidade das sementes,

podem também favorecer a sobrevivência de muitos patógenos importantes para a cultura.

Os fungos presentes nas sementes armazenadas são tradicionalmente divididos em dois grupos: de campo e de armazenamento. Os primeiros invadem as sementes ainda no campo, requerendo para o seu crescimento, umidade relativa em torno de 90-95%. O tempo de sobrevivência desses fungos nas sementes está diretamente relacionado com as condições de ambiente do armazém (LAL; KAPOOR, 1979; BERJAK, 1987; MERONUCK, 1987). Os fungos de armazenamento, representado pelos fungos *Aspergillus spp* e *Penicillium spp*, por sua vez, estão presentes nas sementes recém-colhidas, geralmente em porcentagens muito baixas. São capazes de sobreviver em ambiente com baixa umidade, proliferando em sucessão aos fungos de campo e causando a deterioração das sementes (BERJAK, 1987; WETZEL, 1987; CARVALHO; NAKAGAWA, 1988).

As medidas de controle de doenças causadas por fungos associados às sementes de milho são baseadas no uso de sementes saudáveis e no tratamento de sementes com fungicidas (REIS et al., 2004; PEREIRA et al., 2005). O tratamento de sementes com fungicidas é o principal método utilizado na prevenção de doenças fúngicas associadas a sementes, tendo como objetivos reduzir ou eliminar o inóculo de fitopatógenos presentes na semente, protegendo-as durante a germinação de fungos habitantes do solo, garantindo a germinação das sementes e a emergência das plântulas em condições adversas de semeadura e evitando a transmissão dos fungos da semente para planta (LASCA, 1986; PEREIRA, 1986; CASA et al., 1995; PINTO, 1998).

#### **3.4.1 *Fusarium spp.***

O *Fusarium* é um dos mais importantes gêneros de fungos existentes, englobando diversas espécies, desde as saprófitas até aquelas patogênicas, capazes de causar doenças e sérios danos em plantas. O gênero possui ampla distribuição geográfica, com representativa ocorrência em todas as regiões do mundo (LACAZ, 1998).

A classificação taxonômica é definida atualmente como pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales, Família Nectriaceae, Gênero *Fusarium* (HOOG et al., 2000).

As culturas de *Fusarium spp.* se caracterizam pelo crescimento rápido da colônia, com micélio aveludado a levemente cotonoso, opacos ou levemente brilhantes. Incubado a 25°C por sete a dez dias, o fungo pode apresentar pigmentação do micélio que varia de cor rosa, púrpura, cinza ou amarela (GUARRO, J.; GENÉ, J., 1992.; HOOG et al., 2000). O meio de cultivo mais utilizado para a determinação das espécies é o Batata Dextrose Ágar (BDA) (LACAZ, 1998).

A característica micromorfológica principal deste gênero é a forma de foice de seus conídios. Eles emergem de células conidiogênicas (fiálides) e podem apresentar-se isoladamente ou agrupados em massas crescendo diretamente do micélio (NELSON et al., 1994).

Algumas espécies do gênero *Fusarium* têm sido associadas a doenças do milho, como *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides*, que estão presentes em todos os estádios de desenvolvimento do milho (SARTORI et al., 2004), podendo infectar sementes e plântulas. Desta forma, estes patógenos são economicamente importantes para a cultura, podendo causar perdas substanciais em produtividade e na qualidade de sementes (BRODERS et al., 2007).

Esses fungos podem sobreviver no solo por meio de estruturas de resistência e, ainda, em estruturas internas das sementes, como o embrião. A diagnose preventiva, antes da semeadura, assim como o tratamento químico de sementes, são medidas que auxiliam no combate a doenças ocasionadas por *Fusarium spp.* (COSTA et al., 2003).

O gás ozônio surge como uma alternativa para o controle de *Fusarium spp.*, possuindo ação fungicida, atuando principalmente como método preventivo no processo de disseminação e infecção do fungo pelas sementes, devido ao seu elevado potencial oxidante (KIM ., 1999).

### **3.5 Uso do gás ozônio (O<sub>3</sub>)**

O gás ozônio (O<sub>3</sub>), ou oxigênio triatômico, é uma molécula instável formada pela adição de um átomo de oxigênio à molécula diatômica de oxigênio (O<sub>2</sub>), que pode ser produzido naturalmente como resultado de relâmpagos ou radiação ultravioleta (KIM et al., 1999). Comercialmente a forma mais utilizada na geração de ozônio é a de descarga elétrica no gás oxigênio (GLAZE et al., 1987; BALAKRISHNAN et al., 2002; HARRISSON, 2000), sendo um dos primeiros equipamentos destinados à produção de

ozônio, baseado no efeito corona, desenvolvido por Siemens, em 1857, na Alemanha (RUBIN, 2003).

O sistema Corona produz sinteticamente o ozônio, onde o processo consiste na passagem de fluxo de ar atmosférico ou enriquecido com até 92% de oxigênio molecular ( $O_2$ ), no interior do equipamento. A tensão elétrica deve ser controlada (~10.000 V) para que a energia gerada por essa descarga seja suficiente para romper a molécula de oxigênio, resultando em dois átomos de oxigênio livre (FALCÃO, 2009).

O ozônio é um gás incolor de odor pungente, instável e parcialmente solúvel em água, que se destaca por seu elevado poder oxidante. É um forte agente desinfetante com ação sobre uma grande variedade de organismos patogênicos, incluindo bactérias, bolores, leveduras, vírus, protozoários, inclusive formas esporuladas e cistos de protozoários, que são mais resistentes, além de componentes do envoltório celular, esporos fúngicos ou capsídeos virais, em concentrações relativamente baixas e em reduzido tempo de contato, apresentado uma eficiência germicida que excede ao cloro (SILVA et al., 2006; PRESTES, 2007; KHADRE et al., 2001; KIM et al., 1999).

A redução ou a inativação da população microbiana devido à ozonização depende da concentração de ozônio, do tempo de aplicação e do microrganismo envolvido (KIM, 1999). O gás ozônio afeta os microrganismos a partir da oxidação progressiva de componentes celulares vitais. O ozônio atua inicialmente na membrana celular, sendo a superfície da célula microbiana o primeiro alvo a ser atingido. Sua ação antimicrobiana é decorrente da oxidação de glicolipídeos, glicoproteínas e aminoácidos da parede celular, alterando a permeabilidade e causando sua rápida lise. O ozônio ataca também grupos sulfidríla de enzimas, ocasionando o colapso da atividade enzimática celular. Além disso, sua ação sobre o material nuclear dos microrganismos altera as bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucléicos, como ocorre com alguns vírus, onde o ozônio destrói seu RNA além de alterar as cadeias polipeptídicas do cápsideoprotéico (SILVEIRA, 2004; HUNT; MARINAS, 1999). Diversos estudos já demonstraram que o ozônio gasoso reduz a população fúngica e a atividade biológica de uma variedade de micotoxinas, correspondendo a um método eficaz para a desinfestação e desinfecção de grãos e sementes (MENDEZ et al., 2003; MCDONOUGH et al., 2011; TIWARI et al., 2010; WHITE et al., 2010).

Os fungos são contaminantes comuns em alimentos e são responsáveis por perdas financeiras, industriais e comerciais (SERRA et al., 2003). A ozonização é bastante efetiva contra fungos e micotoxinas, porém os fungos tendem a ser mais

resistentes que as bactérias na forma vegetativa (RUSSEL et al., 1999; KIM et al., 1999). Segundo Wickramanayake (1991), os fungos são facilmente atingidos pela ação do ozônio e em menor período de tempo do que bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus spp.* As concentrações de 0,6 a 1,5 ppm de ozônio têm ação contra o crescimento de bolores em ovos conservados a 0,6 °C e 90% de umidade relativa (KIM et al., 1999).

Segundo Ciccarese et al. (2007), usando ozônio (3% por peso) em três períodos de exposição (1, 1,5 e 3 minutos) para desinfecção de sementes de trigo, ervilha e cevada, verificaram que o maior período de exposição foi mais eficiente na desinfecção de sementes sem influenciar na germinação. Em experimentos feitos por El-Desouky et al. (2012) com *Triticuma estivum*, testaram-se duas concentrações de ozônio (20 e 40 ppm) e quatro períodos de exposição (5, 10, 15 e 20 min), verificando-se que a concentração de 40 ppm durante 20 minutos foi eficiente no controle de *Aspergillus flavus* em grãos de trigo.

Abdel-Wahhab et al. (2011) estudaram o efeito do gás ozônio no controle de fungos e aflatoxinas em amendoim. Foram usadas as concentrações de 20 ppm por 5 minutos, 40 ppm por 10 minutos e 50 ppm por 5 minutos. A exposição ao O<sub>3</sub> gasoso foi eficaz para reduzir a contagem total de fungos e conseguiu eliminar *A. flavus* nas amostras. A concentração de 40 ppm por 10 minutos conseguiu degradar aflatoxina em sementes de amendoim e alcançar o padrão exigido na Legislação Egípcia. Ainda trabalhando com amendoim, Sahab et al. (2013) verificaram que a exposição a 40 ppm de O<sub>3</sub> durante 10 minutos degrada significativamente aflatoxinas, não interferindo no teor de gorduras e proteínas, podendo ser utilizado eficazmente para a descontaminação de sementes de amendoim contaminados com aflatoxinas.

Violleau et al. (2007), trabalhando com sementes de milho, realizaram o tratamento com oxigênio puro ([O<sub>3</sub>] = 0 g / m<sup>3</sup>) e ozônio ([O<sub>3</sub>] = 20 g / m<sup>3</sup>) durante 6, 8 e 20,5 minutos. Avaliaram-se comprimento de plântula e raiz, após 3, 4 e 5 dias. Observou-se que as sementes tratadas com ozônio apresentaram maiores médias e teve um início mais rápido de germinação e com comprimento maior de raiz. No entanto, um tempo maior de exposição ao ozônio reduziu a taxa de germinação.

Savi et al. (2014) verificaram, em sementes de trigo, que o gás O<sub>3</sub> foi eficiente no controle de fungos e proporcionou a degradação de micotoxinas, principalmente após 120 minutos, com concentração de 60 mmol / mol, sem causar alterações físicas e

bioquímicas em grãos de trigo. Só afetou a germinação do trigo após 180 min de exposição, reduzindo a capacidade de germinação para 12,5%.

Luo et al. (2014) estudaram o efeito do tratamento de ozônio sobre a degradação de aflatoxina B1 (AFB1) na cultura do milho sob diferentes teores de umidade. A toxicidade dos produtos de degradação tratadas com ozônio no milho contaminado também foi avaliada utilizando células de carcinoma hepatocelular humano como modelo. Concluiu-se que a ozonização pode degradar rapidamente e de forma eficaz a aflatoxina B1 no milho e diminuiu a toxicidade; e, portanto, a ozonização pode ser um método eficaz, rápido e seguro no controle de aflatoxina em milho, bem como sua toxicidade.

Marique et al. (2012) utilizaram ozônio no tratamento de sementes de *Triticuma estivum* L. contaminadas com fungos *Fusarium* spp e *Alternaria* spp. A contagem visual das colônias não permitiu uma avaliação clara do efeito da desinfecção por ozônio. Utilizaram também análise de imagem para a contagem das colônias, a qual mostrou maior eficiência. O gás ozônio demonstrou eficiência no controle de fungos, principalmente de *Fusarium* spp.

Beber-Rodrigues (2013) testou o uso do gás ozônio no controle de fungos em grãos de arroz armazenado e verificou uma redução na quantidade total de fungos; contudo, os gêneros *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e leveduras demonstraram resistência às concentrações de gás O<sub>3</sub> aplicado, e que os fungos mais sensíveis foram *Acremonium* e *Alternaria*.

Tendo em vista a importância da contaminação das sementes por fungos e as crescentes perdas ocorridas no campo, devido às doenças fúngicas, tem-se buscado alternativas para controlar o desenvolvimento dos microrganismos. Neste cenário o ozônio surge como uma alternativa para o controle de fungos, devido ao seu elevado potencial oxidativo. (ALENCAR, 2009).

### **3.5.1 Ozônio em água**

O ozônio dissolvido em água constitui outra opção promissora no controle de microrganismos, sendo parcialmente solúvel em água, relativamente instável e decompondo-se facilmente na forma de oxigênio molecular, onde, como a maioria dos outros gases, aumenta a sua solubilidade à medida que a temperatura decresce ou a mistura é pressurizada (lei de Henry). Por esta razão, as concentrações de ozônio

dissolvido geralmente não ultrapassam cinco ppm, uma vez que os tratamentos são efetuados sob condição atmosférica e temperatura próxima a ambiente (FALCÃO, 2009) . A taxa de solubilização do ozônio depende do tamanho das bolhas do gás que borbulham na água, pois quanto menores as bolhas formadas, maior a superfície de contato. O tamanho mais adequado deve variar entre um e três mm de diâmetro. A taxa de fluxo de ozônio e o tempo de contato também afetam a transferência do gás para a água. A agitação da amostra incrementa o contato e a solubilização (KHADRE et al., 2001).

O ozônio dissolvido em água é utilizado para desinfecção de alimentos e superfícies, possuindo uma eficácia de desinfecção maior contra bactérias, quistos de protozoários, vírus, fungos e esporos de fungos em relação ao hipoclorito. Estes atributos fazem do ozônio uma boa escolha, quando a água processada é reciclada ou reutilizada, evitando desperdícios do recurso hídrico (KECHINSKI, 2007).

A geração do ozônio deve ser feita no local de aplicação devido a sua elevada instabilidade. Em meio aquoso o ozônio se decompõe espontaneamente por um mecanismo complexo que envolve a formação de radicais livres de hidroxila, com meia vida, em água destilada, variando entre 20 a 25 min a 20 °C, decompondo-se novamente em oxigênio molecular sem deixar resíduos nos produtos alimentícios ou no ambiente após o tratamento (O'DONNELL et al., 2012). A aplicação da água ozonizada se justifica para produtos que necessitam de uma etapa de lavagem durante o processo, visto que o ozônio cumpre esta dupla função de limpeza e sanitização (KECHINSKI, 2007). O ozônio em água apresenta maior estabilidade e eficácia relativa em faixas de pH próximas a neutralidade, tendo sido indicado como substituto dos hipocloritos no tratamento de produtos hortícolas em diversos países.

Em experimentos feitos por Hsieh et al. (1998), o uso do ozônio saturado em água inibiu a germinação dos esporos de fungos em sementes de gramínea, sendo necessário 10, 13 e 30 min, respectivamente para eliminar os conídios de *Bipolaris australiensis*, *Curvularia pallescens* e *Exserohilum rostratum*. A aplicação de água ozonizada foi mais eficiente no controle dos fungos em relação à aplicação dos fungicidas convencionais testados no experimento. O vigor de crescimento de mudas foi aparentemente melhor a partir de sementes tratadas com água ozonizada.

Segundo Alexandre et al. (2012), a utilização de água ozonizada na concentração de 0,3 ppm para sanitização de morangos foi um dos tratamentos mais eficientes no controle do crescimento da contaminação microbiana, com melhor retenção de cor em

morangos armazenados durante 14 dias, a 4 °C. Morangos tratados com ozônio apresentaram menor perda de firmeza durante o armazenamento refrigerado, quando comparados aos tratamentos de ultrassom e radiação UV-C, enquanto que os parâmetros pH, antocianinas totais e ácido ascórbico diminuíram significativamente em comparação com escores iniciais, limitando a comercialização no final do armazenamento.

Em experimentos feitos por Alencar et al. (2013), observou-se redução de *Colletotrichum musae* em bananas cv Nanicão, cujo tratamento com ozônio aquoso foi mais eficiente que o gasoso, não só na redução do fungo como na preservação das características pós-colheita e sensoriais dos frutos analisados.

Trabalhos realizados com trigo, envolvendo aplicação de gás ozônio em mistura com ar atmosférico ou com oxigênio puro (WU et al., 2006), em fumigação ou aplicado à água, em processo de lavagem dos grãos (IBANOGLU, 2002), demonstraram eficiência na desinfestação fúngica e bacteriana deste cereal (IBANOGLU, 2001, 2002; MENDEZ et al., 2003).

Embora vários estudos tenham sido realizados utilizando o gás ozônio como agente sanificante e microbicida, poucas informações foram disponibilizadas em relação ao seu potencial redutor de populações microbianas em milho armazenado.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Sementes**

Os experimentos foram conduzidos com sementes de milho do híbrido, P 30F53, fornecidas pela empresa Pioneer, sem nenhum tipo de tratamento químico. A cultivar é um híbrido simples, que foi desenvolvido pela Pioneer nos Estados Unidos em conjunto com a Dow AgroSciences e tem a tecnologia do gene Herculex®I, também pode ser classificado como milho Bt, uma vez que apresenta a proteína Cry1F, que é derivada da bactéria *Bacillus thuringiensis*. O híbrido apresenta as seguintes características: elevado potencial produtivo, precocidade, elevada resposta ao manejo e elevada estabilidade às diversas condições climáticas.

### **4.2 Análises de qualidade fisiológica e sanitária**

As análises foram realizadas no Laboratório de Processamento de Produtos Agrícolas e no Laboratório de Tecnologia de Sementes da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV) e no Laboratório de Micologia (Departamento de Fitopatologia - IB), da Universidade de Brasília (UnB), Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, Distrito Federal. A avaliação de campo foi realizada na Fazenda Água Limpa (UnB), Área rural da Vargem Bonita – DF.

### **4.3 Obtenção do gás ozônio**

O gás ozônio foi obtido por meio de um gerador de ozônio baseado no método de Descarga por Barreira Dielétrica. Este tipo de descarga é produzido ao aplicar uma alta tensão entre dois eletrodos paralelos, tendo entre eles um dielétrico (vidro) e um espaço livre por onde flui o ar seco. Neste espaço livre é produzida uma descarga em forma de filamentos, em que são gerados elétrons com energia suficiente para produzir a quebra das moléculas de oxigênio, formando o ozônio (O<sub>3</sub>). No processo de geração do ozônio, foi utilizado como insumo o oxigênio (O<sub>2</sub>) com grau de pureza de aproximadamente 90%, isento de umidade, obtido do concentrador de oxigênio acoplado ao gerador de ozônio.

A concentração de ozônio foi determinada pelo método iodométrico, descrito por Clesceri et al. (2000), que consistiu no borbulhamento do ozônio em 50 mL de solução de iodeto de potássio (KI) 1 N, com produção de Iodo (I<sub>2</sub>). Para garantir o

deslocamento da reação para a produção de  $I_2$ , foi necessário acidificar o meio com 2,5 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 1 N. A solução foi titulada com tiosulfato de sódio ( $Na_2S_2O_3$ ) 0,01 N, com uso de solução de amido 1% como indicador.

O gás ozônio foi borbulhado nas sementes com água, conforme descrito a seguir, denominando-se como água ozonizada.

#### **4.4 Pré - condicionamento das sementes em água ozonizada**

As sementes de milho com teor de umidade inicial de 13% b.u. foram colocadas em potes de vidro, que possuíam as seguintes dimensões (diâmetro= 9,05 cm; altura=16,82 cm; gargalo= 74 mm e volume útil= 830 ml). Foram utilizadas 140 gramas de sementes de milho, imersas em 300 ml de água destilada. Nas tampas de cada pote, foram instaladas conexões para injeção e exaustão do gás, respectivamente.

Foram adotadas quatro concentrações do gás ozônio: 0, 10, 20 e 30  $mg L^{-1}$ , com fluxo de  $1,0 L min^{-1}$ , para exposição das sementes em cinco períodos de embebição: 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. O mesmo procedimento foi adotado para a concentração de 0  $mg L^{-1}$  de ozônio, que consistiu na injeção de ar atmosférico com auxílio de um compressor de ar. Após estes tratamentos as sementes ficaram secando em temperatura ambiente ( $25^{\circ}C$ ), com umidade relativa do ar em torno de 48%, durante 24 horas, e logo em seguida, foram expostas aos testes de qualidade fisiológica.

#### **4.5 Testes de qualidade fisiológica**

##### **4.5.1 Teste padrão de germinação (TPG)**

Foram realizadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento, colocadas para germinar em substrato papel germitest na forma de rolo. O papel foi umedecido com água destilada na quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco, e destinado ao germinador regulado para  $25^{\circ}C$ , por sete dias, seguindo os critérios descritos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Ao final do teste, realizou-se uma única contagem, computando o número de plântulas normais. Os resultados foram expressos em porcentagem.

#### **4.5.2 Comprimento de plântulas (CP) e de radículas (CR)**

A medição foi realizada nas plântulas normais provenientes do teste de germinação, após sete dias da instalação do mesmo. Para efetuação das medições foi utilizada uma régua fixada na mesa por fita crepe (leitura em cm). As medições manuais das plântulas foram realizadas para determinar o **comprimento de plântula (CP)**: medição realizada do coleóptilo até a ponta da maior raiz e de **comprimento de radícula (CR)**: medição realizada pela maior radícula (VIEIRA; CARVALHO, 1994);

#### **4.5.3 Matéria seca de plântulas (MS)**

Foram avaliadas as plântulas normais, obtidas a partir dos testes de germinação, excluindo destas o endosperma restante. As repetições de cada tratamento foram acondicionadas em sacos de papel, identificadas, e levadas à estufa com circulação de ar forçado, mantida à temperatura de 80°C por um período de 24 horas (NAKAGAWA, 1994). Após este período, cada repetição teve a massa avaliada em balança com precisão de 0,001g, e os resultados médios expressos em miligramas.

#### **4.5.4 Condutividade elétrica (CE)**

Foram utilizadas duas repetições de 50 sementes para cada tratamento, previamente pesadas (0,001) colocadas para embeber em copos plásticos (200 mL) contendo 75 mL de água deionizada e mantidas a 25°C por 24 horas (VIEIRA; CARVALHO, 1994). Decorrido o período de embebição, foi feita a leitura da condutividade elétrica, utilizando um condutivímetro DIGIMED, modelo CD 21, com eletrodo de constante 1.0, sendo os resultados finais expressos em  $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}/\text{g}$ .

#### **4.5.5 Índice de velocidade de emergência (IVE)**

A semeadura foi realizada manualmente, empregando-se quatro repetições de 50 sementes por tratamento. As sementes foram semeadas em sulco com 2,0 m de comprimento, aproximadamente 4,0 cm de profundidade e o espaçamento entre linhas foi de 0,5 metros, sendo irrigadas diariamente. Foram realizadas anotações diárias referentes ao número de plântulas que emergiam do solo. Ao final do teste, com os dados diários do número de plântulas emergidas, calculou-se o índice de velocidade de emergência empregando-se a fórmula proposta por Maguire (1962):

$I.V.E. = (G_1/N_1) + (G_2/N_2) + \dots + (G_n/N_n)$ , em que:

I.V.E = índice de velocidade de emergência;

G = número de plântulas normais computadas nas contagens;

N = número de dias da semeadura à 1ª, 2ª... enésima avaliação.

#### **4.6 Avaliação da incidência do Fungo *Fusarium* spp.**

Os fungos do gênero *Fusarium* foram isolados de sementes de milho do híbrido P30F53, fornecidas pela empresa Pioneer. As sementes que apresentaram sintomas e crescimento fúngico típico de *Fusarium* spp foram transferidas para placas de Petri contendo o meio de cultura BDA, onde posteriormente se procedeu a obtenção de cultura monospórica. Por meio de preparo de lâminas, o isolado de *Fusarium* spp foi identificado com base em sua morfologia típica, que se resume na produção de longas cadeias de microconídios produzidas em monofialides (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Para a multiplicação do inóculo, foi utilizado o meio de cultura BDA e o fungo foi incubado à temperatura ambiente (20-30°C), com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Após esse período foi adicionado 10 mL de água destilada estéril a cada placa, obtendo uma suspensão de conídios, do isolado, que foi ajustada para a concentração de  $10^6$  conídios/ml, que foi utilizado para a inoculação das sementes.

As sementes, inicialmente, foram previamente desinfestadas em hipoclorito de sódio a 1% por um minuto, sendo imersas na suspensão de conídios por 10 minutos e, posteriormente, foram colocadas para secar durante o período de 24 horas. (MICHEL; RADCLIFFE, 1995). Após este período, as sementes inoculadas foram expostas ao tratamento de ozônio dissolvido em água, sendo expostas a quatro concentrações de gás ozônio,  $0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $20 \text{ mg L}^{-1}$  e  $30 \text{ mg L}^{-1}$  e quatro períodos de exposição de 30; 60; 90 e 120 minutos.

No teste de sanidade foram analisadas 100 sementes por tratamento, em que as sementes com desinfestação superficial e inoculadas com *Fusarium* spp. foram distribuídas em quatro repetições de 25 sementes por tratamento. No teste de sanidade houve testemunhas controle (**sementes com e sem inoculação; fungicida Derosal Plus e hipoclorito 1%, por 1 minuto**).

O teste de sanidade das sementes foi realizado pelo método de papel de filtro com congelamento das sementes (LIMONARD, 1966). As sementes foram colocadas

em caixas de acrílico tipo “gerbox” (11 x 11 x 3,5 cm), sobre duas folhas de papel de filtro, previamente embebidas com água destilada, e levadas para câmara de incubação por 24 horas a  $20 \pm 2$  °C, regime luminoso de 12 horas de luz branca e 12 horas de escuro. Após esse período, foram mantidas a -20 °C (freezer) por 24 horas e, a seguir, transferidas para câmara de incubação por mais cinco dias. Após o período de incubação foram realizadas análises visuais para verificar a presença ou ausência de colônias de fungos em desenvolvimento. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes infectadas (LUCCA FILHO, 1987).

#### 4.7 Análises estatísticas

O experimento referente à qualidade fisiológica das sementes foi instalado em esquema fatorial 4x5, com 4 concentrações de ozônio em água e 5 períodos de embebição, totalizando 20 tratamentos. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. As análises estatísticas foram realizadas no programa Assistat 7.5 (SILVA; AZEVEDO, 2009). Após a análise de variância e verificada a significância do teste F para as interações em todas as características avaliadas, foi realizado o ajuste de superfícies de resposta destas características, em função da concentração e do período de embebição.

A análise de regressão linear foi realizada utilizando-se como variáveis dependentes: a germinação (GE), o comprimento de plântula (CP), o comprimento de radícula (CR), o índice de velocidade de emergência no campo (IVE), a massa seca das plântulas (CP) e a condutividade elétrica (CE); e como variáveis independentes: concentração do ozônio ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e o período de embebição das sementes em minutos. Para estimar as superfícies de resposta, o critério adotado para a escolha do modelo de melhor ajuste foi com base na significância dos coeficientes de regressão, no coeficiente de determinação ( $R^2$ ), na análise do resíduo e no fenômeno biológico. O modelo utilizado foi:  $f = y_0 + a*x + b*y + c*x^2 + d*y^2$ , em que  $f$  = variável dependente,  $x$  = período de embebição das sementes e  $y$  = concentração do ozônio. O *software* SigmaPlot versão 10.0 foi utilizado para a representação gráfica dos dados.

O experimento referente à qualidade sanitária das sementes foi instalado em esquema fatorial 4x4, com 4 concentrações de ozônio em água e 4 períodos de embebição, totalizando 16 tratamentos, com 4 testemunhas adicionais. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. As análises estatísticas foram feitas no programa Assistat 7.5 (SILVA; AZEVEDO, 2009). Os tratamentos

foram comparados por análise de variância (Anova), seguida de teste Tukey sempre que foram detectadas diferenças significativas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de variância para os testes de avaliação da qualidade fisiológica, verificou-se que as variáveis analisadas foram influenciadas pela interação entre concentração do ozônio e período de embebição das sementes, conforme a Tabela 1. Os coeficientes de variação encontrados ficaram abaixo de 12% (Tabela 1), o que demonstra confiança nos resultados obtidos, que estão dentro dos valores encontrados na literatura em experimentos de avaliação de qualidade fisiológica em milho (BORBA et al., 1995; RODRIGUES, 2007; PERES, 2010).

Tabela 1. Análise de variância dos dados de comprimento de plântula (CP); comprimento de radícula (CR); condutividade elétrica (CE); matéria seca de plântula (MS); índice de velocidade de emergência (IVE) e teste padrão de germinação (TPG) para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho submetidas ao pré - condicionamento em água ozonizada em função da concentração de ozônio e período de embebição. Brasília-DF, 2017.

FV	Quadrado Médio					
	CP	CR	CE	MS	IVE	TPG
Concentração	91,93**	36,40**	12,94**	47,89**	2,38**	8,54 <sup>ns</sup>
Período de embebição	125,30**	56,24**	156,10**	529,34**	4,52**	12,10 <sup>ns</sup>
Interação	15,12**	5,85*	10,62**	65,48**	0,58**	16,78**
Erro	2,30	2,72	0,38	5,11	0,082	5,32
CV	5,86	11,38	2,43	4,24	4,39	2,41
Média	25,93	14,50	25,24	53,36	6,52	95,81

\*\*Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. \*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

<sup>ns</sup>Não significativo pelo teste F.

## 5.1 Teste padrão de germinação (TPG)

Na Figura 1, observa-se o percentual de germinação das sementes de milho submetidas ou não ao processo de ozonização, em diferentes combinações de concentração do ozônio e períodos de embebição em água. Pode-se observar neste trabalho que a testemunha e os tratamentos de pré – condicionamento em água ozonizada apresentaram porcentagens de germinação acima do padrão exigido para a comercialização da espécie que é 85% (BRASIL, 2013), não havendo incremento substancial no potencial germinativo destas sementes. Esse resultado concorda com Marcos Filho e Kikuti (2008) em sementes de couve - flor, Gurgel Júnior et al. (2009) com sementes de pepino e Giurizzato et al. (2008) com sementes de soja, onde não encontraram diferenças significativas para porcentagem de germinação utilizando tratamentos de pré-condicionamento fisiológico em sementes (hidrocondicionamento).

$$\text{TPG} = 97,279 - 0,043\text{Co} + 0,001\text{Pe} - 0,0004\text{Co}^2 - 8,432\text{Pe}^2$$

$$R^2=0,14$$

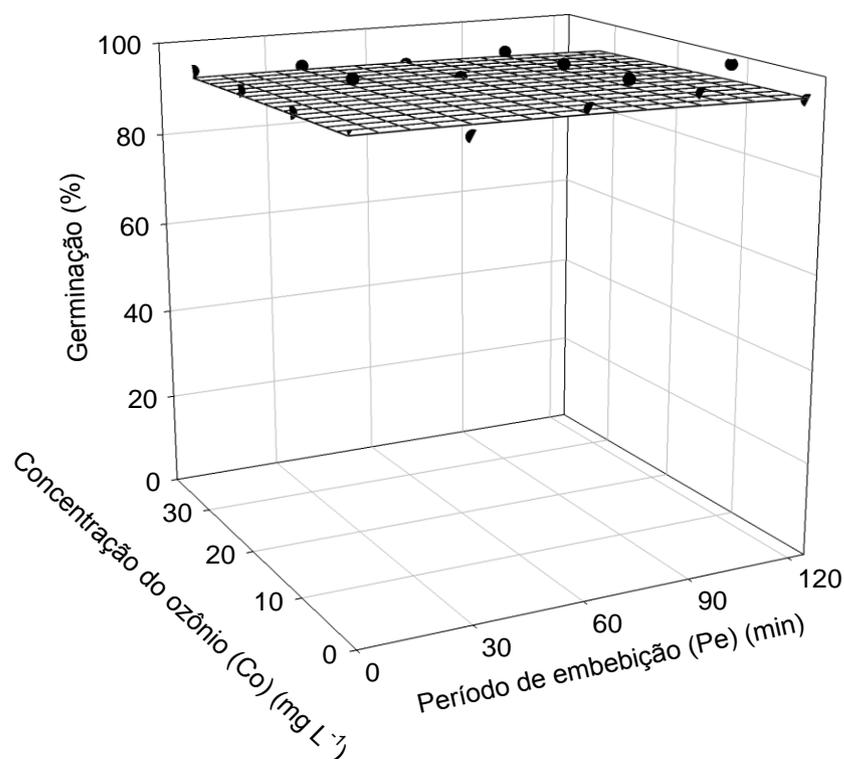


Figura 1. Superfície de resposta referente à germinação das sementes de milho em função da concentração de ozônio em água e período de embebição. Brasília – DF, 2017.

## 5.2 Desenvolvimento inicial das plântulas

Nos testes de qualidade fisiológica referentes ao desenvolvimento inicial de plântulas (índice de velocidade de emergência, matéria seca de plântulas, comprimento de plântula e radícula) observou-se um efeito significativo da interação concentração e período de embebição ( $p \leq 0,01$ ); e no comprimento radícula observou-se um efeito significativo com  $p \leq 0,05$  (Tabela 1).

O pré-condicionamento das sementes de milho em água ozonizada, seguido de secagem natural, acarretou desenvolvimento inicial mais acentuado das plântulas de milho, medido por meio do índice de velocidade de emergência, matéria seca de plântulas, comprimento de plântula e no comprimento de radícula, quando comparados com a testemunha (Figura 2). As plântulas de milho apresentaram o maior desempenho no desenvolvimento inicial nas concentrações  $0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de ozônio nos períodos de embebição de 75 minutos para índice de velocidade de emergência (IVE); 63 minutos para matéria seca de plântulas (MS); 90 minutos para comprimento de plântulas (CP) e 62 minutos para comprimento de radícula (CR). Estes valores, referentes aos pontos máximos de desenvolvimento das plântulas foram obtidos a partir da derivação da equação de regressão dos respectivos gráficos abaixo (Figura 2).

Venkatasubramanian e Umarani (2007), pesquisando diferentes tipos de condicionamento, demonstraram que o condicionamento fisiológico ideal varia de espécie para espécie, onde trabalhando com sementes de tomate os resultados mais adequados foram obtidos com “hidropriming” por 48 horas. Schwember e Bradford (2010) obtiveram valores de germinação de 96% e 100% para sementes de alface hidrocondicionadas em água destilada por 6 horas e osmocondicionadas por 24 horas, respectivamente. Carvalho et al. (2000) observaram que sementes de sorgo hidratadas por um período de 10 horas apresentaram melhor desempenho na velocidade de emergência e no estabelecimento das plântulas.

Em vista dos resultado obtidos, pode-se levantar a hipótese da existência de mecanismos de reparo nas sementes pré-condicionadas em água ozonizada, que podem contribuir para a reestruturação do sistema de membranas e para a reorganização dos componentes estruturais das células, sendo estas evidências de uma possível reversibilidade da deterioração das sementes.

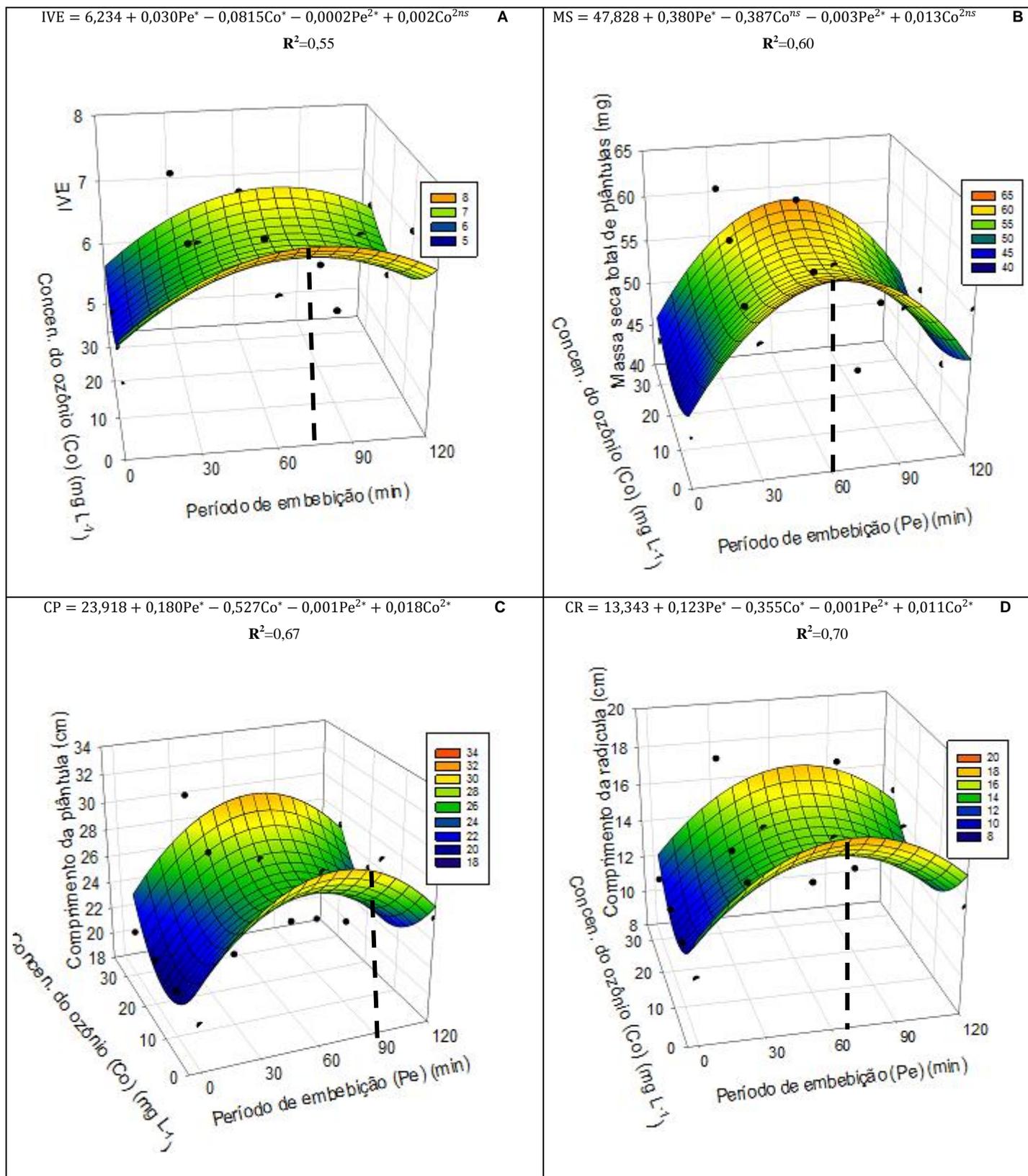


Figura 2. Superfícies de resposta referentes ao Índice de velocidade de emergência (IVE) (Fig.2.A); Massa seca de plântulas (MS) (Fig.2.B); Comprimento de plântula (CP) (Fig.2.C) e Comprimento de radícula (CR) (Fig.2.D) em função da concentração e período de embebição. Brasília – DF, 2017.

Segundo Kermodé (1995), a retomada do metabolismo durante o processo germinativo começa em alguns minutos após o contato da semente seca com a água. Isto acontece devido ao fato de que as enzimas e metabólitos exibem suas funções somente após a hidratação (VOET; VOET, 2004). Desta forma, a retomada metabólica se utiliza da estrutura e dos componentes enzimáticos pré-existentes nas sementes, que foram conservados durante o período de quiescência (BEWLEY et al., 2000).

O pré-condicionamento em água, seguido de secagem natural, pode ter induzido a iniciação metabólica pela hidratação das sementes, acarretando uma melhora no desempenho inicial das plântulas nas características de velocidade de emergência, acúmulo de biomassa, crescimento de plântula e radícula (Figura 2). O fato das sementes pré – condicionadas em água apresentarem plântulas com maior desenvolvimento inicial, pode ser devido à hidratação das sementes que ocorreu durante o condicionamento, seguido de secagem, em níveis que não permitem, para a maioria das espécies, o início da divisão e expansão celular, mas que induzem uma prolongada capacidade de síntese de proteínas, o que proporcionou um balanço metabólico mais favorável, gerando incrementos não na germinação, mas no crescimento das plântulas e no acúmulo de biomassa (TRIGO, 1999; GURUSINGHE et al. 2002). Egli e Tekrony (1997) ressaltam em seu trabalho que durante a embebição da semente, os tecidos de reserva, que até então se apresentavam secos, passam a ser desdobrados e a semente inicia um processo de acúmulo de solutos.

Segundo Bewley e Black (1994) e Kermodé (1997), a habilidade da semente em sintetizar mRNAs para a produção de proteínas é retida durante o estágio em que a semente está seca. Quando ocorre o processo de re-hidratação das sementes, somente os genes responsáveis pela germinação e pós-germinação é que serão transcritos em RNAs e traduzidos em novas proteínas. A síntese de proteínas é iniciada usando, em primeiro lugar, os mRNAs pré-existentes acumulados durante o desenvolvimento e a maturação das sementes, e posteriormente, trocando-os pelos novos mRNAs, recentemente sintetizados durante a embebição (CASTRO; HILHORST, 2004).

Embora os efeitos do pré-condicionamento das sementes de milho em água tenham sido observados apenas na fase inicial de desenvolvimento da cultura, tais ganhos podem ser positivos e essenciais para o estabelecimento das plantas em campo, sendo uma alternativa para sincronizar o desenvolvimento do milho doce que possui elevados teores de açúcares solúveis e reduzidos teores de amido no endosperma, associados à presença de pericarpo tenro, o que contribui para que apresentem rápida

perda de viabilidade, acarretando em desuniformidade na germinação das sementes e na emergência de plântulas (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2006).

No caso de sementes de gramíneas há quantidade limitada de estudos e informações a respeito do pré - condicionamento fisiológico, sendo os mais comuns para as de braquiárias (BONOME et al., 2010), sorgo (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; OLIVEIRA; GOMES-FILHO, 2010) e cevada (ABDULRAHMANI et al., 2007).

As injeção de ar atmosférico e de ozônio, principalmente na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> foi um fator importante, que pode ter favorecido no desenvolvimento inicial das plântulas, quando se analisaram os diferentes parâmetros de qualidade fisiológica (Figura 2). Para Parera e Cantliffe (1994), a resposta à aeração durante o condicionamento varia conforme a espécie, sendo que o período ideal de duração do tratamento pode ser modificado quando se utiliza um sistema de aeração.

Bujalski e Nienow (1991) estudaram três métodos para o condicionamento fisiológico em sementes de cebola (papel de filtro com solução de PEG, hidratação em colunas aeradas e hidratação em sistemas aerados e com agitador) e verificaram que, a presença de ar (principalmente de ar enriquecido, 75% de O<sub>2</sub> e 25% N<sub>2</sub>) contribuiu para maiores reduções no tempo médio para germinação de 50% das sementes, independente do equipamento utilizado. Para o condicionamento osmótico de sementes de *Brachiaria brizantha*, Bonome et al. (2010) constataram que as soluções aeradas de PEG 6000, KNO<sub>3</sub> e da mistura PEG 6000 + KNO<sub>3</sub>, por um período de 12 horas, promoveram aumento na velocidade de protrusão radicular e no vigor das plântulas, em relação à testemunha.

Demir e Oztokat (2003), trabalhando com condicionamento de sementes de melão, obtiveram acréscimos no tamanho da raiz primária de plântulas de melão com o tempo de condicionamento de 35 dias. Estes autores ressaltaram que soluções aeradas facilitam o condicionamento por períodos mais longos. Pereira et al. (2008), trabalhando com condicionamento de sementes de cenoura, observaram que independente do potencial osmótico da solução, no período mais longo de condicionamento (oito dias) os efeitos da aeração foram mais pronunciados, havendo incremento no comprimento da raiz primária das plântulas em relação à testemunha.

### 5.3 Condutividade elétrica (CE)

Para a condutividade elétrica observou-se efeito significativo da interação concentração e período de embebição ( $p \leq 0,01$ ) (Tabela 1). Na Figura 3, observa-se que a testemunha apresentou valores mais elevados de condutividade elétrica, em torno de  $30 (\mu\text{S} / \text{cm}^{-1} / \text{g}^{-1})$ , o que revela que o efeito da hidratação sobre as membranas celulares pode ser benéfico quando avaliado sob esse parâmetro, pois quanto menor o resultado da condutividade elétrica, mais organizadas encontram-se as membranas celulares, não permitindo a passagem de solutos do meio interno das sementes para o meio externo, onde se encontra a solução de embebição das sementes.

$$CE = 30,068 + 0,141Co^{ns} - 0,171Pe^* - 0,006Co^{2ns} + 0,001Pe^{2*}$$
$$R^2=0,78$$

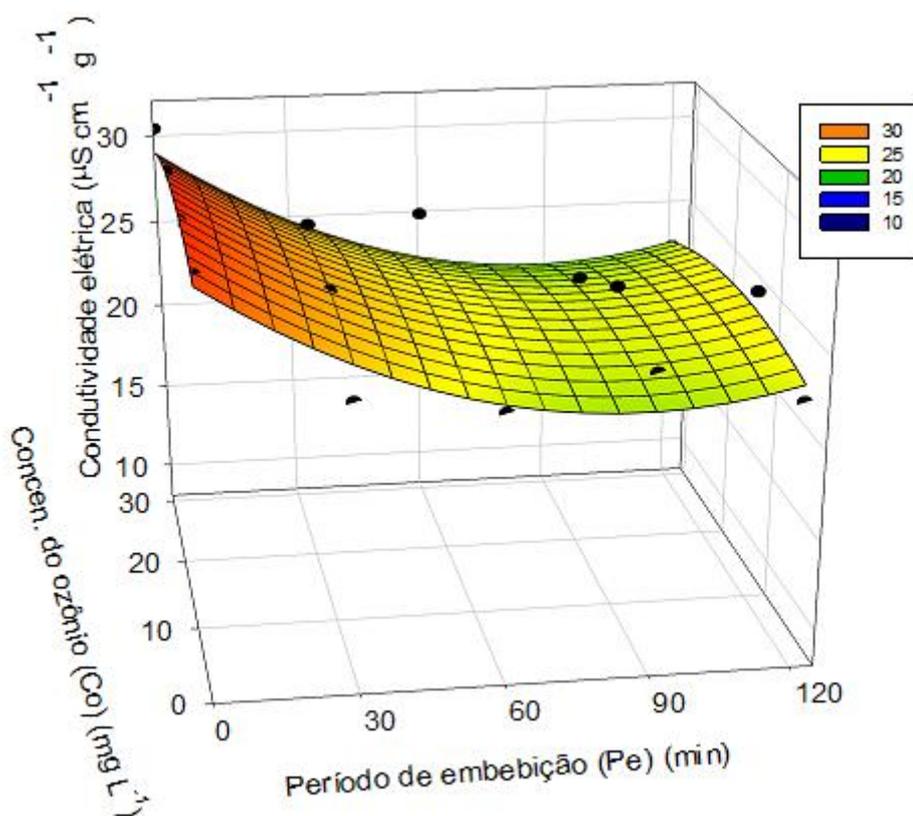


Figura 3. Superfície de resposta referente à condutividade elétrica das sementes de milho em função da concentração de ozônio em água e período de embebição. Brasília – DF, 2017.

Como o tratamento testemunha no presente trabalho apresentou valores mais elevados que as sementes pré - condicionadas em água, pode-se supor que as sementes sem tratamento apresentaram maior desorganização de suas membranas e, conseqüentemente, a liberação de constituintes para o meio externo que seriam essenciais para a germinação (Figura 3). Assim, pode-se levantar a hipótese de que o tratamento de pré – condicionamento das sementes em água ozonizada, seguido de secagem natural, pode ter favorecido a ativação de mecanismos de reparo das membranas nas sementes, fazendo com que estas se encontrassem mais organizadas em relação às sem pré-condicionamento, dificultando a lixiviação de solutos para o meio externo.

Segundo Taiz e Zeiger (2004) a membrana é a primeira estrutura celular a sofrer ação pela embebição de água, sendo esta estrutura dependente da presença de água para manter a orientação hidrofóbica / hidrofílica. Em outros trabalhos foram relatados os benefícios do pré-condicionamento das sementes sobre a qualidade fisiológica, como de Giurizzato et al. (2008), onde as sementes de soja submetidas ao pré-condicionamento, apresentaram uma menor lixiviação de eletrólitos, comparadas às sementes sem condicionamento, confirmando dados obtidos por Vasquez (1995) e Beckert et al. (2000).

#### **5.4 Qualidade sanitária de sementes de milho (*Fusarium* spp.)**

Na Tabela 2, quando se compara os diferentes tratamentos, observa-se que a menor incidência de infecção de *Fusarium* spp. foi observada no tratamento com fungicida (0,01%). O tratamento com hipoclorito diferiu em relação aos outros tratamentos, obtendo uma incidência de infecção de *Fusarium* spp. em torno de 70%. As testemunhas com e sem inoculação e os tratamentos com ozônio obtiveram os piores valores, apresentando 100% das sementes infectadas por *Fusarium* spp.

O tratamento das sementes com o fungicida da marca comercial Derosal plus, que possui o principio ativo carbendazim+thiram, foi eficiente no controle do *Fusarium* spp. associado às sementes (Tabela 2), já que houve uma redução média nas sementes tratadas de quase 100% para *Fusarium* spp. Em diversos trabalhos tem-se comprovado a eficiência de fungicidas como: captan, thiram, carbendazin+thiram, carbendazin, carboxin+thiram, thiabendazole+thiram e tolylfluanid no controle de patógenos

associados às sementes de milho e soja (PINTO, 1998; PINTO, 2000; LASCA et al., 2005; GIANASI et al., 2000; GOULART, 2001).

Tabela 2. Percentual médio de sementes infectadas com *Fusarium* spp. em sementes expostas a água contendo diferentes concentrações de ozônio. Brasília – DF, 2017

Tratamentos	Inoculação	Concentração de Ozônio (mg.L <sup>-1</sup> )	Período de exposição (min)	Incidência de <i>Fusarium</i> (%)
Fungicida	sim	-	-	0,01 c
Hipoclorito	sim	-	-	70,00 b
Testemunha	não	0	0	100,00 a
Testemunha	sim	0	0	100,00 a
Água + Ar	sim	0	30	100,00 a
Água + Ar	sim	0	60	100,00 a
Água + Ar	sim	0	90	100,00 a
Água + Ar	sim	0	120	100,00 a
Água + Ozônio	sim	10	30	100,00 a
Água + Ozônio	sim	10	60	100,00 a
Água + Ozônio	sim	10	90	100,00 a
Água + Ozônio	sim	10	120	100,00 a
Água + Ozônio	sim	20	30	100,00 a
Água + Ozônio	sim	20	60	100,00 a
Água + Ozônio	sim	20	90	100,00 a
Água + Ozônio	sim	20	120	100,00 a
Água + Ozônio	sim	30	30	100,00 a
Água + Ozônio	sim	30	60	100,00 a
Água + Ozônio	sim	30	90	100,00 a
Água + Ozônio	sim	30	120	100,00 a

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O tratamento com hipoclorito a 1% por 1 minuto obteve pouca eficiência no controle do patógeno, controlando 30% do inóculo de *Fusarium* spp. presente nas sementes de milho (Tabela 2). Araujo et al (2004) demonstraram que independente do período de embebição em hipoclorito de sódio, com o emprego deste produto, a 5 e 10%, com 0,5 e 1,0% de cloro ativo e pH 11,62, foi constatado menor ocorrência de fungos em sementes de amendoim.

Os tratamentos das sementes pré – condicionadas em água ozonizada não foram eficientes no controle do fungo *Fusarium* spp., apresentando 100 % de contaminação do fungo nas sementes de milho (Tabela 2). O fato das sementes pré–condicionadas em água ozonizada apresentarem infecção do fungo *Fusarium* spp em 100% pode ser devido ao processo de embebição que ocorreu durante o pré-condicionamento das sementes, favorecendo o aumento da umidade das sementes, que propiciou uma condição favorável para a germinação dos esporos de *Fusarium* spp presentes na superfície das sementes. Segundo Agrios (1997) a umidade é indispensável para a germinação da maioria dos esporos fúngicos e para a penetração do tubo germinativo no hospedeiro, além de aumentar a suscetibilidade a certos patógenos, afetando a incidência e a severidade da doença. Vários estudos demonstram que o gás ozônio aplicado diretamente nas sementes reduz a população fúngica e a atividade biológica de uma variedade de micotoxinas, correspondendo a um método eficaz para a desinfestação e desinfecção de grãos e sementes ( LUO et al., 2014; SAVI et al., 2014; SAHAB et al., 2013; CICCARESE et al., 2007; MCDONOUGH et al., 2011; TIWARI et al., 2010; WHITE et al., 2010;).

Para as espécies florestais nativas do cerrado *Dimorphandra mollis*, *Enterolobium gummiferum* e *Stryphnodendron adstringens*, a utilização de sementes inteiras associadas ao tempo de ozonização de duas horas promoveram maior germinação e vigor das sementes; e ainda, o tratamento com água ozonizada por uma hora foi o mais eficiente na desinfecção das sementes das três espécies, comparado com álcool 50% e hipoclorito 1% por um minuto (RAMOS, 2015). Para *Aegiphila sellowiana*, a concentração de 17 ppm por 30 minutos em água destilada na presença de gás ozônio e recomendada para superação da dormência imposta pelo tegumento, bem como para melhoria da qualidade sanitária de suas sementes (FERREIRA, 2016)

## 6. CONCLUSÕES

A embebição das sementes de milho em água com concentração de até  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de ozônio, por um período de até 120 minutos, seguido de secagem natural, não afeta a germinação quando ela já é naturalmente elevada.

O desenvolvimento inicial das plântulas de milho é intensificado mediante a exposição das sementes a água, especialmente nas concentrações de  $0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de ozônio, durante um período de 60 a 90 minutos, seguido de secagem natural das sementes.

A exposição das sementes de milho a água ozonizada durante um período de até 120 minutos, seguido de secagem natural, reduz a perda de solutos celulares.

A exposição das sementes de milho em água com concentração de até  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de ozônio, por até 120 minutos, seguido de secagem natural, não é eficiente no controle do fungo *Fusarium* spp.

## 7. RECOMENDAÇÕES

Nesta pesquisa, o pré-condicionamento de sementes de milho em água ozonizada, seguido de secagem natural, foi uma ferramenta eficiente na melhora do desempenho do desenvolvimento inicial das plântulas de milho, mas esse benefício pode ser perdido rapidamente dependendo do tipo de secagem e armazenamento utilizados.

Alguns métodos de secagem podem favorecer a manutenção dos efeitos do condicionamento, mesmo após a redução do teor de água para níveis compatíveis com o armazenamento.

Quanto ao armazenamento, existem técnicas que proporcionam que a qualidade fisiológica de sementes condicionadas seja mantida. Entretanto, para sementes de milho, há poucas informações relacionadas à secagem e ao armazenamento após o pré-condicionamento fisiológico das sementes.

Portanto, é interessante que sejam estudadas metodologias de secagem após o pré-condicionamento de sementes de milho em água ozonizada, em função dos efeitos benéficos permitidos por esta técnica, e da essencialidade da secagem após o pré-condicionamento em água para cultivos comerciais.

Nesta pesquisa, a exposição de sementes de milho por diferentes períodos em água com distintas concentrações de ozônio não foi eficiente no controle de *Fusarium* spp. Portanto, é interessante que sejam estudadas metodologias para verificar a eficiência do tratamento de pré-condicionamento de sementes de milho em água ozonizada, visando à proteção das sementes contra outros fungos veiculados pelas sementes de milho que podem ser transmitidos às plântulas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WAHHAB, M.A.; SEHAB, A.F.; HASSANIEN, F.R.; EL-NEMR, Sh., E., AMRA, H.A.; ABDEL-ALIM, H.A. Efficacy of ozone to reduce fungal spoilage and aflatoxin contamination in peanuts. **International Journal of Nuts and Related Sciences**, v.2, n.4, p. 01-14, 2011.

ABDULRAHMANI, B.; GHASSEMI-GOLEZANI, K.; VALIZADEH, M.; FEIZI, V.A.S.L. Seed priming and seedling establishment of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.5, p.179-184, 2007.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 4th ed. San Diego. Academic Press. 1997.

ALENCAR E. R.; FARONI, L. R. D. A.; PINTO, M. S.; COSTA, A. R.; SILVA, T. A. Postharvest quality of ozonized “nanicão” cv. Bananas. **Revista Ciência Agrônômica**, v.44, p.107-114, 2013.

ALENCAR, E.R. **Processo de Ozonização de Amendoim (*Arachis hypogea* L.): cinética de decomposição, efeito fungicida e detoxificante de aflatoxinas e aspectos qualitativos**. 2009. 106 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

ALEXANDRE, E. M. C.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C. L. M. Efficacy of nonthermal technologies and sanitizer solutions on microbial load reduction and quality retention of strawberries. **Journal Food Engineering**, v.108, p.417-426, 2012.

ANDRADE, RV.; AUZZA, S.A.Z.; ANDREOLI, C.; MARTINS NETTO, D.A & OLIVEIRA, A.C. Qualidade fisiológica das sementes do milho híbrido simples HS 200 em relação ao tamanho, **Ciencia e Agrotecnologia**, v.25, n.3, p 576-582, 2001.

ARAUJO, A. E. S.; CASTRO, A.P.G.; ROSSETTO, C.A.V. Avaliação de metodologia para detecção de fungos em sementes de amendoim. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 2, p.45-54, 2004.

ARTOLA, A.; CARRILO-CASTAÑEDA, G.; GARCIA DE LOS SANTOS, G. Hydropriming: a strategy to increase *Lotus corniculatus* L. seed vigour. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.31, n.2, p.455-463, 2003.

BALAKRISHNAN, P. A., ARUNAGIRIA, A., RAO, P. G. "Ozone Generation by Silent Electric Discharge and its Application in Tertiary Treatment of Tannery Effluent" **Journal of Electrostatics**, v. 56, p. 77-86, 2002.

BALBINOT E; LOPES HM. Efeitos do condicionamento fisiológico e da secagem na germinação e no vigor de sementes de cenoura. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, p. 01-08, 2006.

BALMER, E. Doenças do milho. In: GALLI, F. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 371-379, 1980.

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, SC.

BECKERT, O.P. et al. Absorção de água e potencial fisiológico em sementes de soja de diferentes tamanhos. **Sci. Agric.**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 671-675, 2000.

BERJAK, P. Stored seeds: the problems caused by microorganisms. In: ADVANCED INTERNATIONAL COURSE ON SEED PATHOLOGY, Passo Fundo, 1987. **Proceedings**. Passo Fundo: EMBRAPA; ABRATES, p.93-112, 1987.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. *Seeds, physiology of development and germination*. 2ed. **New York**: Plenum Press, p.445, 1994.

BEWLEY, J.D.; HEMPEL, F.D.; McCORMICK, S.; ZAMBRYSKI, P. Reproductive Development. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Phytologist, Rockeville. p. 988-1043, 2000.

BLADON, F.L.B.; BIDDLE, A.J. A three-years study of laboratory germination, electrical conductivity and field emergence in combining peas. **Seed Abstracts**, v.15, n.8, p.17, 1992.

BONOME, L.T.S. et al. Efeito do condicionamento osmótico em sementes de *Brachiaria brizantha* cv. 'Marandu'. **Ciência e Agrotecnologia**, 2006. Available from: . Accessed: Sept. 09, v.30, n.3, p.422-428, 2010.

BORBA, C.S.; ANDRADE, R.V.; AZEVEDO, J.T.; ANDREOLI, C.; PURCINO, A.A.C. Germinação de sementes de diversos genótipos de milho tropical (*Zea mays* L.) em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 17, n. 2, p.141-144, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa** Nº 45, de 17 de setembro de 2013. Diário Oficial da União, DF, 20 set. 2013. p. 25, Seção 1.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, p.395, 2009.

BRODERS, K. D. et al. Evaluation of *Fusarium graminearum* associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 3, p. 1155-1160, 2007.

BUJALSKI, W.; NIENOW, A. W. Large-scale osmotic priming of onion seeds: a comparison of different strategies for oxygenation. **Scientia Horticulturae**, v.46, p.13-24, 1991.

Cabi Bioscience Database (<http://www.indexfungorum.org>).

CALIARI, M. F.; MARCOS FILHO, J. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de ervilha (*Pisum sativum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.12, n.3, p.52 – 75, 1990.

CARVALHO, L.F.; MEDEIROS FILHO, S.; ROSSETTI, A.G.; TEÓFILO, E.M. Condicionamento osmótico em sementes de sorgo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, n.1, p.185-192, 2000.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, p.424, 1988.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: Funep, p.588, 2000.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, p.590, 2012.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; MEDEIROS, C.A.; MOURA, F.B. Efeito do tratamento de sementes de milho com fungicidas na proteção contra fungos do solo, no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, n.4, p.633-638, 1995.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Fungos associados à semente de milho produzida nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.3, p.370-373, 1998.

CASA, R.T., MOREIRA, E.N., WILLE, L.A., SANSIGOLO, A., MIRANDA, F., BOGO, A. & ALEXANDRE, F. Eficácia do tratamento de sementes de milho com fungicidas comercializadas em Santa Catarina e Rio Grande do Sul na safra de 2003/04. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, p. 29-209, 2004.

CASA, R.T., REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do Gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.427-439. 2006.

CASEIRO R; BENNETT MA; MARCOS FILHO J. Comparison of three priming techniques for onion seed differing in initial seed quality. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.32, n.2, p.365-375, 2004.

CASTRO, R.D.; HILHORST, H.W.M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. São Paulo: Artmed, p. 323, 2004.

CICCARESE, F.; SASANELLI, N.; CICCARESE, A.; ZIADI, T.; AMBRICO, A.; MANCINI, L. Seed disinfestation by ozone treatments. **IOA Conference and Exhibition Valencia**, Spain - October 29 – 31, p.4.6 – 1, 2007.

CÍCERO, S. M.; VIEIRA, R. D. Teste de frio. In: Vieira, R. D.; Carvalho, N. M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP: 151 – 164, 1994.

CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Denver: Water Work Association, p.1220, 2000.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira**: grãos, nono levantamento, junho 2010. Brasília, 2010. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/8graos\\_6.5.10.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/8graos_6.5.10.pdf)>. Acesso em: 10 jun 2010.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DE TRANSPORTES, CNT. Diversas consultas. 2015.

COSTA, M. L. N. et al. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Uberlândia, v. 27, n. 5, p. 1023-1030, 2003.

COSTA, C.J.; VILLELA, F.A. Condicionamento osmótico de sementes de beterraba. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n.1, p. 21-29, 2006.

DEMIR, I.; OZTOKAT, C. Effect of salt priming on germination and seedling growth at low temperatures in watermelon seeds during development. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.31, n.3, p.765-770, 2003.

EGLI, D.B.; TEKRONY, D.M. Species differences in seed water status during seed maturation and germination. **Seed Science Research**, n.7, p.3-11. 1997.

EL-DESOUKY TA, SHAROB AMA, EL-DESOUKY AI, EL-MANSY HA, NAGUIB K. Effect of Ozone Gas on Degradation of Aflatoxin B1 and Aspergillus Flavus Fungal. **J Environment Analytic Toxicol** 2:128. doi:10.4172/2161-0525.1000128, 2012.

FALCÃO, H.L. **Ozonium Systems Ltda.** Divulgação da empresa, folder explicativo e imagens de produtos. Porto Alegre, 2009.

FANCELLI, A.L., DOURADO-NETO, D. População e distribuição espacial de plantas de milho. In: **Milho: Estratégias de manejo para alta produtividade**. ESALQ. Piracicaba. 2003.

FERREIRA, A.C. **Condicionamento fisiológico, fitorreguladores e qualidade de sementes de milho-doce**. iv 53 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011.

FERREIRA, J.B.C. **Avaliação da qualidade fisiológica e ozonização de sementes *Aegiphila sellowiana* Cham.** Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências florestais, 2016.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p.323, 2004.

FREITAS, R.A.; NASCIMENTO, W.M. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de lentilha. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, n.3, p.59-63, 2006.

GIANASI, L. et al. Eficiência do fungicida captan associado a outros fungicidas no tratamento químico de sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 02, p. 241-245, 2000.

GIURIZZATO, M.I.K.; ROBAINA, A.D.; GONÇALVES, M.C.; MARCHETTI, M.E. Qualidade fisiologica de sementes de soja submetidas ao hidrocondicionamento. Maringá, **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.30, n.5, p.711-717, 2008.

GLAZE, W. H., KANG, J.-W., CHAPIN, D. H. The Chemistry of Water Treatment Processes Involving Ozone, Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiatio. **Ozone Science & Engineering**, v. 9, p. 335-352, 1987.

GOMES, J., CARVALHO, A.O.R.; NAZARENO, N.R.X. Avaliação estadual de cultivares de milho. **Londrina, IAPAR, Informe de pesquisa**, 40. 1981.

GOULART, A.C.P.; FIALHO, W.F.B. Eficiência de fungicidas no controle de patógenos em sementes de milho (*Zea mays* L.). **Informativo ABRATES**, Londrina, v.4, n.3, p.55-59, 1994.

GOULART, A. C. P. Incidência e controle químico de fungos em sementes de soja em alguns municípios de Mato Grosso do Sul. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 06, p. 1457-1466, 2001.

GUARRO, J. ; GENÉ, J. *Fusarium* infections. Criteria for the identification of the responsible species. **Mycoses**, v.35, p.109-114, 1992.

GURGEL JÚNIOR, F.E.; TORRES, S.B.; OLIVEIRA, F.N.; NUNES, T.A. Condicionamento fisiológico de sementes de pepino. **Revista Caatinga**, v.22, n.4, p.163- 168, 2009.

GURUSINGUE, S.; POWELL, A.L.T; BRADFORD, K.J. Enhanced expression of BiP is associated with treatments that extend storage longevity of primed tomato seeds. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.127, p.528–534, 2002.

HARRISSON, J. F. Ozone for Point-of Use, Point-of-Entry, and Small Water System Water Treatment Applications – **A Reference Manual**, **Water Quality Association**, p.86, 2000.

HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENE J.; FIGUEIRAS, M.J. Atlas of clinical fungi. **Centraalbureau Voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira i Vigili.**, 2000.

HSIEH, S. P. Y., NINQ, S. S.; TZENG D. D. Control of turf grass seedborne pathogenic fungi by ozone. **Plant Pathol. Bull.** v.7, p.105-112, 1998.

HUNT, N. K.; MARIÑAS, B. J. Inactivation of Escherichia coli with ozone: chemical and inactivation kinetics. **Water Research**, v. 33, n. 11, p. 2633-2641, 1999.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática-SIDRA. **Pesquisa Agrícola Municipal, 1990 a 2008.** Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 18 maio 2010.

IBANOGLU, S. Influence of tempering with ozonated water on the selected properties of wheat flour. **Journal of Food Engineering**, v.48, p.345–350, 2001.

IBANOGLU, S. Wheat washing with ozonated water: effects on selected flour properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p.579–584, 2002.

KECHINSKI, C.P. **Avaliação do uso de ozônio sobre a conservação do mamão papaia (*Caricapapaya L.*)**. 2007. 125p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KELLS, S.A.; MASON, L.J.; MAIER, D.E.; WOLOSHUK, C.P. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v.37, p.371-383, 2001.

KERMODE, A.R. Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interactions between the embryos and the seed environment. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.) **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, p.273-332, 1995.

KERMODE, A.R. Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds. **Seed Science Research**, v.7, p.75-95. 1997.

KHADRE, M.A.; YOUSEF, A.E.; KIM, J.G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. **Journal of Food Science**, v.66, n.9, p.1242-1252, 2001.

KIKUTI, A.L.P.; KIKUTI, H.; MINAMI, K. Condicionamento fisiológico em sementes de pimentão. **Revista Ciência Agronômica**, v.36, n.2, p.243-248, 2005.

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1071-1087, 1999.

LACAZ, C.S. In: LACAZ, C.S; PORTO, C; MARTINS, J.E.C. Guia para identificação. Fungos Actinomicetos e Algas, São Paulo, **Sarvier**, 1998.

LANDAU, E. C.; SANS, L. M. A.; SANTANA, D. P. Clima e solo. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 5. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de produção, 1). Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho\\_5ed/cl\\_imaesolo.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_5ed/cl_imaesolo.htm)>. Acesso em: 10 jun. 2010.

LAL, S.P.; KAPOOR, J.N. Succession of fungi in wheat and maize during storage. **Indian Phytopathology**, v.32, p.101-104, 1979.

LASCA, C.C. Tratamento de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 2, 1986, Campinas, SP. Produção de sementes sadias: inspeção de campo e tratamento de sementes. **Anais**. Campinas, SP: Fundação Cargill, p. 93-99, 1986.

LASCA, C. C.; VECHIATO, M. H.; FANTIN, G. M.; KOHARA, E. Y. Efeito do tratamento químico de sementes de milho sobre a emergência e a produção. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 461-468, out./dez., 2005.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Blackwell Publishing Professional, Ames, IA, USA, 2006.

LIMONARD, T. A modified blotter test for seed health. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.72, n.2, p. 319-321, 1966.

LUCCA FILHO, O.A. Testes de sanidade de sementes de milho. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V. da S. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill/ABRATES, p.430-440, 1987.

LUO, X.; WANG, R.; WANG, L.; LI, Y.; BIAN, YUANYUAN, B.; CHEN, Z. Effect of ozone treatment on aflatoxin B1 and safety evaluation of ozonized corn. **Food Control**, v. 37, p. 171-76, 2014.

LUZ, W.C. da. Tratamento de sementes de milho com fungicidas. **Passo Fundo: Embrapa-CNPT, Circular Técnica**, 7. 1997.

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

MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1.1 - 1.21, 1999.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005.

MARCOS FILHO, J.; KIKUTI, J.A.D. Condicionamento fisiológico de sementes de couve-flor e desempenho das plantas em campo. **Horticultura Brasileira**, v.26, n.1, p.165-169, 2008.

MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: dimensão e perspectivas. **Seed News**, Pelotas, n.1, 2011.

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**, 2012.

MCDONOUGH, M. X.; CAMPABADAL, C. A.; MASON, L. J.; MAIER, D. E.; DENVER, A.; WOLOSHUK, C. Ozone application in a modified screw conveyor to treat grain for insect pests, fungal contaminants, and mycotoxins. **Journal of Stored Products Research**, v.47, p.249-254, 2011.

McGEE, D.C. Maize disease: a reference source for seed technologists. St. Paul: The American **Phytopathological Society**. p.150, 1988.

MENDEZ, F.; MAIER, D.E.; MASON, L.J.; WOLOSHUK, C.P. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and performance. **Journal of Stored Products Research**, v.39, p.33-44, 2003.

MERONUCK, R.A. The significance of fungi in cereal grains. **Plant Disease**, v.71, p.287-291, 1987.

MICHEL, B.E; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, v.87, p.126-130, 1995.

MONTEIRO, J. A.; CRUZ, J. C.; SANS, L. M. A.; BAHIA, F. G. T. C.; SANTANA, D. P.; GARCIA, J. C.; BAHIA FILHO, A. F. C. O zoneamento macroecológico. In: CRUZ, J. C.; MONTEIRO, J. de A.; SANTANA, D. P.; GARCIA, J. C.; BAHIA, F. G. F. T. de C.; SANS, L. M. A.; PEREIRA FILHO, I. A. P. (Ed.). **Recomendações técnicas para o cultivo do milho**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1996.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D. & CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, p.49-85, 1994.

NASCIMENTO, W.M.; CANTLIFFE, D.J.; HUBER, D.J. Endo-b-mannanase activity and seed germination of thermosensitive lettuce genotype in response to temperature and seed priming. **HortScience**, v. 33, p. 542, 1998.

NASCIMENTO, W.M. Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças visando a germinação em condições de temperaturas baixas. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.2, p.211-214, 2005.

NELSON, P.E.; DIGNANI, M.C.; ANAISSIE, E.J. Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. **Clin Microbiol Rev**, v. 7, p. 479-504, 1994.

O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; RICE, R. G. Ozone in food processing. 1.ed. **Oxford: Wiley-Blackwell**, 2012.

OLIVEIRA, A.B.; GOMES-FILHO, E. Efeito do condicionamento osmótico na germinação e vigor de sementes de sorgo com diferentes qualidades fisiológicas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3 p.25, 34, 2010.

OLIVEIRA, A.C.S. et al. Testes de vigor em sementes baseados no desempenho de plântulas. **Inter Science Place**, São Camilo, v.2, n.4, 2009.

OLIVEIRA JUNIOR, L.F.G.; DELIZA, R.; BRESSAN-SMITH, R.; PEREIRA, M.G.; CHIQUIERE, T.B. Seleção de genótipos de milho mais promissores para o consumo in natura. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.26, n.1, p. 159-165, 2006.

PARERA, C.A.; CANTLIFFE, D.J. Presowing seed priming. **Horticultural Reviews**, v.16, p.109-139, 1994.

PEREIRA, O.A.P. Tratamentos de sementes de milho. **In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 2., 1986, Campina: Fundação Cargill**, p. 145-159, 1986.

PEREIRA, O.A.P., CARVALHO, R.V.;CAMARGO, L.E.A. Doenças do milho. **In: KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A.,**

CAMARGO, L.E.A. (Eds). Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. 4ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**, vol.2. p.477-488, 2005.

PEREIRA, M. D.; SANTOS, D. C. F.; DIAS, L. A. S.; ARAUJO, E. F. Germinação e vigor de sementes de cenoura osmocondicionadas em papel umedecido e solução aerada. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 137-145, 2008.

PERES, W.R.L. **Teste de vigor em sementes de milho**. Jaboticabal, 61p. (Mestrado - UNESP), 2010.

PEREZ, S.C.J.G.A.; NEGREIROS, G.F. Efeitos do pré-condicionamento na viabilidade e no vigor de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* Spreng. Taub.) em condições de estresse. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.1, p.175-183, 2001.

PERRY, D.A. Introduction; methodology and application of vigour test; seedling growth and evaluation test. In: PERRY, D.A. **Handbook of vigor tests methods**. Zürich: International Seed Testing Association, p.3-20, 1981.

PINTO, N. F. J. A. Tratamento de sementes com fungicidas. In: PINTO, N. F. J. A. **Tecnologia para produção de sementes de milho**. Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS, p.43-47, 1993 (Circular Técnica, 19).

PINTO, N.F.J. Tratamento com fungicidas de sementes de milho. In: SOAVE, J., OLIVEIRA, M.R.M.; MENTEN, J.O.M. (Eds.) **Tratamento químico de sementes**. Anais, 4º Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, Gramado, RS, p.52-57, 1996.

PINTO, N.F.J.A. Seleção de fungicidas para o tratamento de sementes de milho (*Zea mays* L.). **Summa Phytopathologica**, v.24, n.1, p.22-25, 1998.

PINTO, N.F.J.A. Evaluation of the efficiency of the fungicide tolylfluanid and tolylfluanid+carbendazim in the treatment of corn seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.2, p.500-503, 2000.

POPINIGIS, F. Controle de qualidade de sementes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 4., 1985, Brasília. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, p.157. p.289, 1985.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: Agiplan, p. 289, 1977.

PRESTES, E. B. **Avaliação da eficiência do ozônio como sanitizante em hortaliças folhosas minimamente processadas**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RAMOS, K.M.O. **Caracterização da qualidade fisiológica e otimização do processo de ozonização em sementes de leguminosas arbóreas do cerrado**. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2015.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; BRESOLIN, A.C.R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. 2. ed. Lages: Graphel, p.144, 2004.

REIS, E.M.; CASA, R.T. **Manual de identificação e controle de doenças de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996.

REIS, E.M.; CASA, R.T. **Doenças dos cereais de inverno: diagnose, epidemiologia e controle**. 2. ed. rev. atual. Lages: Graphel, 176 p, 2007.

REIS, E.M.; DENTI, E.; TRENTO, S.M.; CASA, R.T. & SEVERO, R. Método para quantificar os danos no rendimento de grãos causados pelas podridões da base do colmo do milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 23:300. 1998.

REIS, A.C.; REIS, E.M.; CASA, R.T.; FORCELINI, C.A. Erradicação de fungos patogênicos associados a sementes de milho e proteção contra *Pythium* sp. presente no solo pelo tratamento com fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.585-590, 1995.

RICE, R.G.; GRAHAM, D.M. Recent developments in food and agricultural uses of ozone, **Annual Conference - Ozone Applications in a Changing Regulatory Environment**. North Caroline: IOA- Raleigh, p. 1-12, 2002.

RODRIGUES, A.B. **Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho de classes de tamanho misturadas para fins de semeadura fluidizada**. Jaboticabal. 45p. (Mestrado - UNESP), 2007.

ROZADO, A.F., FARONI, L.R.A., URRUCHI, W.M.I., RAUL GUEDES, R.N., PAES, J.L. Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v.12, n.3, p.282–285, 2008.

RUBIN M. B. History of Ozone. Part III. C.D. Harries and the introduction of ozone into organic chemistry. **Helv Chim Acta**, v.86, p.930-940, 2003.

RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B.; AVLIFFE, G. A. J. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 3. ed. **Oxford: Blackwell Science**, p.826, 1999.

SAHAB, A.F.; HASSANIEN, F.R.; EL-NEMR, S.E.; ABDEL-ALIM, H.A.; ABDEL-WAHHAB, M.A. Effect of ozone gaseous on aflatoxin degradation and fat and protein content in peanut seeds. **Journal of Applied Sciences Research**, 9(3): p.2170-2175, 2013.

SANS, L. M. A.; GUIMARAES, D. P. Zoneamento agrícola. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 5. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de produção, 1). Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho\\_5ed/zoneamento.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_5ed/zoneamento.htm)>. Acesso em: 10 jun. 2010.

SANTOS, C.M.R. et al. Teste de deterioração controlada para avaliação do vigor de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.25, n.2, p.28-35, 2003.

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

SAVI, G.D.; PIACENTINI, K.C.; BITTENCOURT, K.O.; SCUSSEL, V.M. Ozone treatment efficiency on *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains (*Triticuma estivum* L.) quality and germination. **Journal of Stored Products Research**, p.1-9, 2014.

SCHUCH, L.O.B., NEDEL, J.L., MAIA, M.S., ASSIS, F.N. Vigor de sementes e adubação nitrogenada em aveia-preta (*Avena strigosa* Schreb.). **Revista Brasileira de Sementes**. v.21, p.127-347, 1999.

SERRA, R.; ABRUNHOSA, L.; KOZAKIEWICZ, Z.; VENANCIO, A.; LIMA, N. Use of ozone to reduce molds in a cheese ripening room. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 12, p. 2355 - 2358, 2003.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Principal components analysis in the software assistat-statistical assistance. In: 7th World Congress on Computers in Agriculture, 2009, Reno. **Proceedings** of the 7th World Congress on Computers in Agriculture. St. Joseph: ASABE, 2009. v. CD-Rom. p.1-5.

SILVA; S; B. et al. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos **Revisões / Reviews** DOI: 10.5433/1679-0359, v.32, n. 2, p.659, 2006.

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**. Dissertação (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) - Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2004.

SOUZA, L.C.D. et al. Qualidade fisiológica de sementes de arroz da região de Matupá - MT. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.3, p.110-116, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, p.719, 2004.

TANAKA, M. A. S.; BALMER, E. Efeito da temperatura e dos microrganismos associados ao tombamento na germinação de sementes de milho (*Zea mays* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.5, n.1, p.87-93, 1980.

TIWARI, B. K.; BRENNAN, C. S.; CURRAN, T.; GALLAGHER, E.; CULLEN, P. J.; O' DONNELL, C. P. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, v.51, p.248-255, 2010.

TOSELLI, M.E.; CASENAVE, E.C. Water content and the effectiveness of hydro and osmotic priming of cotton seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.31, n.1; p.727-735, 2003.

TRIGO M.F.O.O.; TRIGO, L.F.N. Efeito do condicionamento osmótico na germinação e no vigor de sementes de berinjela. **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, n.1, p.107-113, 1999.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Disponível em:<<http://www.fas.usda.gov>>. Acesso em: 2016.

VARIER, A.; VARI, A.K.; DADLANI, M. The subcellular basis of seed priming. **Current Science**, v.99, n.4, p. 450-456, 2010.

VASQUEZ, G.H. **Condicionamento fisiológico de sementes de soja; efeitos sobre a germinação, vigor e potencial de armazenamento**. 1995. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Sementes)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1995.

VENKATASUBRAMANIAN, A.; UMARANI, R. Evaluation of seed priming methods to improve seed performance of tomato (*Lycopersicon esculentum*) eggplant (*Solanum melongena*) and chili (*Capsicum annum*). **Seed Science and Technology**, Zurich, v.35, n.2, p.487-493, 2007.

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

VIOLLEAU, F.; HADJEBA, K.; ALBET, J.; CAZALIS, R.; SUREL, O.; Increase of corn seeds germination by oxygen and ozone treatment. **IOA Conference and Exhibition**, Valencia, Spain - October 29 – 31, 2007.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**. 3rd ed. Wiley, United States of America. p. 1591, 2004.

WETZEL, M.M.V.S. Fungos de armazenamento. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.) **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, p.260-275, 1987.

WHITE, D.G. **Compendium of corn diseases**. Third Edition. The American Phytopathological Society. APS press, p.78, 1999.

WHITE, S. D.; MURPHY, P. T.; BERN, C. J.; LEEUWEN, J. van. Controlling deterioration of high- moisture maize with ozone treatment. **Journal of Stored Products Research**, p. 7–12. 2010.

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

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, p.1288–1293, 2006.