

**CÉLIA DAS EIRAS LUDOVINA DGEDGE MELO**

**OZONIZAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO COMUM: QUALIDADE FISIOLÓGICA,  
ATIVIDADE ENZIMÁTICA, DESEMPENHO EM CAMPO E DETECÇÃO DE  
ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO  
PRÓXIMO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Ernandes Rodrigues de Alencar

Coorientadores: Lêda Rita D'Antonino Faroni  
Laércio Junio da Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

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

T

M528o  
2023

Melo, Célia das Eiras Ludovina Dgedge, 1984-  
Ozonização de sementes de feijão comum: qualidade fisiológica, atividade enzimática, desempenho em campo e detecção de alterações bioquímicas por espectroscopia no infravermelho próximo / Célia das Eiras Ludovina Dgedge Melo. – Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (78 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Ernandes Rodrigues de Alencar.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Engenharia Agrícola, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.374>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Sementes - Qualidade. 2. Ozônio. 3. Enzimas.  
4. Espectroscopia de infravermelho. I. Alencar, Ernandes Rodrigues de, 1980-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia Agrícola. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 631.521


**CÉLIA DAS EIRAS LUDOVINA DGEDGE MELO**

**OZONIZAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO COMUM: QUALIDADE FISIOLÓGICA,  
ATIVIDADE ENZIMÁTICA, DESEMPENHO EM CAMPO E DETECÇÃO DE  
ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO  
PRÓXIMO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 27 de março de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 CELIA DAS EIRAS LUDOVINA DGEDGE MELO  
Data: 05/04/2023 08:54:53-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Célia das Eiras Ludovina Dgedge Melo  
Autora

Documento assinado digitalmente  
 ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR  
Data: 21/06/2023 15:41:35-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Ernandes Rodrigues de Alencar  
Orientador

*Aos meus pais Alberto Dgedge e Ludovina  
Dgedge (in memoriam), ao meu amado  
esposo e companheiro António Melo, meus  
filhos Tony e Celton,*

Dedico!

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela família e por todas as bênçãos.

Aos meus pais, Alberto Dgedge e Ludovina Augusto Dgedge (*in memoriam*), por quem eu sou.

A meu esposo António e filhos Tony e Celton pelo suporte em todas dimensões - “*vocês são as minhas 4 pilstras*”.

Aos meus irmãos Izalina, Túlia, Felícia, Pedro, Stela, Rui e Ashley pelas risadas e força.

Ao meu orientador Professor Ernandes Rodrigues de Alencar pela sábia e dedicada orientação, “levo comigo conhecimento científico e profissional que será para toda uma vida”.

A Professora Lêda minha coorientadora por me acolher e orientar.

Aos meus colegas e companheiros do grupo do laboratório de pós-colheita da Área de Armazenamento de Produtos Agrícolas: Carollayne, Jackson, Handina, José Geraldo, Marcus, Davi, Marcia, Eugênio, Daniel, Francisco, Luane, Patrícia, Ozoma e Ejima, pelo suporte.

Ao pessoal do laboratório de Análise e Pesquisa em Sementes por me acolher e apoiar: Professor Laércio meu coorientador, Wander, Júlia e Soryana.

Ao pessoal do departamento de Agronomia: Professor Ricardo, Alessandra, Barrinha e a todos os funcionários da UEPE Prof. Diogo Alves de Mello, pelo apoio e suporte nas atividades de campo.

Ao professor Leonardo Pimentel, pelos ensinamentos que levarei para uma vida inteira.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

*“Tudo posso Naquele que me fortalece”.*

(Filipenses 4:13)

## RESUMO

MELO, Célia das Eiras Ludovina Dgedge, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2023. **Ozonização de sementes de feijão comum: qualidade fisiológica, atividade enzimática, desempenho em campo e detecção de alterações bioquímicas por espectroscopia no infravermelho próximo.** Orientador: Ernandes Rodrigues de Alencar. Coorientadores: Lêda Rita D'Antonino Faroni e Laércio Junio da Silva.

A semente é um dos fatores decisivos para obtenção de altas produtividades. Fato que torna importante a sanitização da semente, visando a obtenção de sementes de elevada qualidade fisiológica, bioquímica e sanitária. O ozônio vem sendo citado como um potente agente sanitizante e estimulador de emergência e rápido crescimento e desenvolvimento inicial. E, acrescido ao fato, o gás ozônio é inócuo e apresenta uma baixa meia vida, fato que contribui para que o uso do gás seja cada vez mais difundido. Vários estudos têm sido feitos avaliando efeito de ozônio sobre a qualidade de sementes, porém poucos ou nenhum foi encontrado, abordando efeitos do gás sobre a qualidade de sementes de feijão comum. Objetivou-se com a presente pesquisa, avaliar o efeito do ozônio sobre a qualidade de lotes de sementes de feijão. Para tal, foram conduzidos dois experimentos em campo e em laboratório. Experimento 1 - Qualidade fisiológica e atividade enzimática em sementes de feijão ozonizadas. Sementes de feijão comum apresentando 95% de germinação foram envelhecidas artificialmente, a fim de se obter quatro lotes. L0h: sementes não envelhecidas; L48h, sementes submetidas ao envelhecimento artificial por 48 h; L60h, sementes envelhecidas artificialmente por 60 h; e L72h, sementes envelhecidas por 72 h. Cada um dos quatro lotes foi exposto a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  do gás ozônio por 0 (sementes não ozonizadas), 30, 60 e 90 min, totalizando 16 combinações entre lotes e tempos de exposição ao ozônio, com quatro repetições. Foram feitas: i) análises da qualidade fisiológica por meio dos testes de germinação, condutividade elétrica e análise de crescimento de plântulas por meio do software Vigor-S; e ii) análises da atividade enzimática das enzimas CAT, SOD e POX. Os dados obtidos foram inicialmente submetidos a Análise de Variância e posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Análise Univariada). Posteriormente, realizou-se Análise Multivariada, utilizando-se Análise de Componentes Principais (ACP). Na Análise Multivariada foram consideradas somente as variáveis em que

houve efeito significativo devido a interação entre níveis de qualidade fisiológica e tempos de exposição do ozônio, ou devido aos fatores isoladamente, na Análise Univariada. Obteve-se como resultado o efeito do ozônio na qualidade fisiológica e na atividade das enzimas SOD, POX e CAT. O ozônio não afetou a qualidade fisiológica e a atividade enzimática das sementes do lote não envelhecido (L0h). O ozônio teve efeito positivo sobre as sementes do lote 2 expostas por 30 min, com incrementos no percentual de germinação, no comprimento de plântulas, nos índices de vigor e uniformidade e na atividade das enzimas CAT e POX. A exposição ao ozônio por tempo superior a 30 min de lotes de sementes de feijão comum envelhecidos artificialmente por períodos superiores a 48h não contribuiu para o aumento da qualidade das sementes. No segundo experimento, foi avaliada a qualidade fisiológica, o desempenho em campo e detecção de alterações nas sementes por meio da espectroscopia no infravermelho próximo (FT-NIR) em sementes de feijão ozonizadas. Foram utilizados 2 lotes de sementes, sementes não envelhecidas (L0h) e sementes envelhecidas artificialmente por 48 h (L48h). Os lotes de sementes de feijão foram expostos a 0 (sementes não ozonizadas), 10 e 20 mg L<sup>-1</sup> do gás ozônio por 30 min, totalizando 6 combinações entre lotes e concentrações de ozônio, com quatro repetições. Foram feitas: i) análises da qualidade fisiológica das sementes; ii) Desempenho em campo de sementes de feijão expostas ao ozônio; e iii) Detecção de alterações nas sementes expostas ao ozônio por espectroscopia no infravermelho próximo (FT-NIR). Os dados obtidos foram inicialmente submetidos a Análise de Variância e posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Análise Univariada). Posteriormente, realizou-se Análise Multivariada, utilizando-se Análise de Componentes Principais (ACP). Na Análise Multivariada, foram consideradas somente as variáveis em que houve efeito significativo devido a interação entre níveis de qualidade fisiológica e tempos de exposição do ozônio, ou devido aos fatores isoladamente, na Análise Univariada. Os espectros obtidos por meio do FT-NIR foram submetidos ao pré-processamento pelo método de Savitzky-Golay (SG), objetivando-se a redução do ruído dos espectros coletados e aprimoramento dos modelos de classificação. Na sequência, foi feita a análise de PCA com calibração de PLS-DA (análise discriminante de mínimos quadrados parciais) no software R, objetivando-se a criação de modelos de classificação. Obteve-se como resultado o efeito do ozônio sobre a qualidade de sementes de feijão comum. Os resultados da análise multivariada dos dados

fisiológicos combinados aos de desempenho em campo foram similares aos da análise multivariada dos espectros combinados aos dados fisiológicos: i) O ozônio não afetou a qualidade fisiológica das sementes do lote 0h; ii) O ozônio teve efeito positivo nas sementes do lote 48h com incrementos na germinação, emergência, na produtividade, e redução na condutividade elétrica; iii) Ozônio teve seu efeito potencializado quando se elevou a concentração de 10 para 20 mg L<sup>-1</sup>.

Palavras-chave: Enzimas. Peroxidase. Espectros.

## ABSTRACT

MELO, Célia das Eiras Ludovina Dgedge, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, March, 2023. **Ozonization of common bean seeds: physiological quality, enzyme activity, field performance and detection of biochemical changes by near infrared spectroscopy**. Adviser: Ernandes Rodrigues de Alencar. Co-advisers: Lêda Rita D'Antonino Faroni and Laércio Junio da Silva.

The seed is one of the decisive factors for obtaining high productivity. This fact makes seed sanitization important, aiming to obtain seeds of high physiological, biochemical and sanitary quality. Ozone has been cited as a potent sanitizing agent and stimulator of emergence and rapid growth and early development. Ozone gas is innocuous and has a short half-life, a fact that contributes to the widespread use of the gas. Several studies have been carried out evaluating the effect of ozone on seed quality, but few or none were found addressing the effects of the gas on the quality of common bean seeds. The objective of this research was to evaluate the effect of ozone on the quality of bean seed lots. For this, two experiments were conducted in the field and in the laboratory. Experiment 1 - Physiological quality and enzymatic activity in ozonized bean seeds. Conducted from November 2021 to November 2022, at the Post-harvest Laboratory of the Agricultural Products Storage Area, of the Agricultural Engineering Department and at the Seed Research Laboratory of the Agronomy Department, both belonging to the Federal University of Viçosa. 4 seed lots were used: not subjected to the deterioration acceleration process, they belonged to Batch 1 (B0h) and subjected to deterioration acceleration for 48 h (Batch 2 - B48h), 60 h (Batch 3 - B60h) and 72 h (Batch 4 – B72h). Each of the four bean seed lots was exposed to 10 mg L<sup>-1</sup> of ozone gas for 0 (non-ozonized seeds), 30, 60 and 90 min, totaling 16 combinations between lots and times of exposure to ozone, with four replications. The following were carried out: i) physiological quality analyzes through germination tests, electrical conductivity and growth analysis in VigorS software; and ii) analyzes of enzymatic activity by determining the content of catalase, superoxide dismutase and peroxidase enzymes. Ozone did not affect the physiological quality and enzymatic activity of seeds from batch 1. Ozone had a positive effect on seeds from batch 2 exposed for 30 min, with increases in germination percentage, seedling length, vigor and uniformity indices and in the levels of CAT and POX enzymes. Exposure to ozone for more than 30 min of

common bean seeds Batches exposed to accelerated deterioration for periods longer than 48 h has no positive effects. Experiment 2 - Physiological quality, field performance and detection of changes by near infrared spectroscopy (FT-NIR) in ozonized bean seeds. The laboratory experiment was carried out at the Post-harvest Laboratory of the Agricultural Products Storage Area, at the Agricultural Engineering Department and at the Seed Research Laboratory at the Agronomy Department, both belonging to the Federal University of Viçosa, UFV. The field experiment was conducted at the Teaching, Research and Extension Unit Professor Diogo Alves de Melo, belonging to the UFV. Two lots of seeds not subjected to the deterioration acceleration process were used, belonging to Batch 1 (B0h) and subjected to deterioration acceleration for 48 h (B48h). The bean seed lots were exposed to 0 (non-ozonized seeds), 10 and 20 mg L<sup>-1</sup> of ozone gas for 30 min, totaling 6 combinations between lots and ozone concentrations, with four replications. The following were performed: i) physiological quality analyses; ii) Field performance of bean seeds exposed to ozone; and iii) Detection of alterations in bean seeds exposed to ozone by near infrared spectroscopy (FT-NIR). The data obtained were initially submitted to Analysis of Variance and later Tukey's test, at 5% probability (Univariate Analysis). Subsequently, Multivariate Analysis was performed, using Principal Component Analysis (PCA). In the Multivariate Analysis, only the variables in which there was a significant effect due to the interaction between levels of physiological quality and ozone exposure times, or due to the factors alone, in the Univariate Analysis were considered. For statistical analyses, StatPlus 5.0 software (AnalystSoft Inc, Canada) was used. The spectra obtained through FT-NIR and the data obtained from the physiological quality analysis were submitted to pre-treatment by the Savitzky – Golay (SG) method, aiming at reducing the noise of the collected spectra and improving the classification models. Then, the PCA analysis was performed with PLS-DA calibration (partial least squares discriminant analysis) in the R software, with the aim of creating classification models. The effect of ozone on the quality of common bean seeds was obtained as a result. The results of the multivariate analysis of the physiological data combined with the field performance were similar to those of the multivariate analysis of the spectra combined with the physiological data: i) Ozone did not affect the physiological quality and the content of reserve substances of the seeds of Batch 0h; ii) Ozone had a positive effect on seeds from Batch 48h with increases in germination, emergence, productivity, content of reserve substances and reduction in electrical

conductivity; iii) Ozone had its effect potentiated when the concentration was increased from 10 to 20 mg L<sup>-1</sup>.

Keywords: Enzymes. Peroxidase. Spectra.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	14
REFERÊNCIAS .....	18
Capítulo 1: Qualidade fisiológica e atividade enzimática em sementes de feijão ozonizadas .....	21
1. INTRODUÇÃO .....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
2.1.1 Características do material genético .....	25
2.1.2 Geração do gás ozônio e tratamento das sementes .....	25
2.2 Análise da qualidade fisiológica das sementes de feijão ozonizadas .....	26
2.2.1 Teste de Germinação (GER) .....	26
2.2.2 Condutividade elétrica (CE) .....	27
2.2.3 Comprimento das plântulas (CP), índice de vigor (IV) e índice de uniformidade (IU) .....	27
2.3 Análise da atividade enzimática nas sementes de feijão ozonizadas .....	28
2.4 Análise estatística .....	29
3. RESULTADOS .....	30
3.1. Análise Univariada .....	30
3.1.1 Qualidade fisiológica das sementes de feijão ozonizadas .....	30
3.1.2 Atividade enzimática nas sementes de feijão ozonizadas .....	33
3.2 Análise multivariada .....	34
4. DISCUSSÃO .....	37
5. CONCLUSÕES .....	41
REFERÊNCIAS .....	42
Capítulo 2: Qualidade fisiológica, desempenho em campo e espectroscopia no infravermelho próximo (FT-NIR) em sementes de feijão ozonizadas .....	46
1. INTRODUÇÃO .....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	52
2.1 Obtenção dos lotes de sementes de feijão e tratamento com ozônio .....	52
2.2 Qualidade fisiológica das sementes de feijão ozonizadas .....	53
2.2.1 Teste de germinação (GER) .....	53
2.2.2 Teste de condutividade elétrica (CE) .....	53
2.2.3 Comprimento de plântulas (CP), índice de vigor (IV) e índice de uniformidade (IU) .....	53
2.3 Desempenho em campo de sementes de feijão expostas ao ozônio .....	54
2.3.1 Condições edafoclimáticas .....	54

2.3.3. Variáveis analisadas em campo .....	55
2.4 Espectroscopia no infravermelho próximo (FT-NIR) .....	56
2.5 Análise estatística.....	57
3. RESULTADOS .....	59
3.1 Análise Univariada.....	59
3.2 Análise multivariada.....	62
4. DISCUSSÃO .....	69
5. CONCLUSÕES .....	73
REFERÊNCIAS.....	74
CONCLUSÃO GERAL .....	78

## INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é majoritariamente produzido pelos pequenos produtores (WANDER; DA SILVA; FERREIRA, 2021). E, neste setor, a prática da agricultura é caracterizada, em geral, pelo baixo nível tecnológico, o que resulta em baixos índices de produtividade e de qualidade do produto. Segundo a Conab (2022), a produtividade média da cultura para as safras 20/21 e 21/22 ficou em torno de 1,0 t ha<sup>-1</sup>, com possibilidade de atingir até 3 t ha<sup>-1</sup> (MEIRELLES et al., 2021). A semente é um dos fatores tecnológicos que mais impacta nos níveis de produtividade. Pois, sendo a semente a estrutura independente responsável pela próxima geração de plantas, sua qualidade fisiológica, genética e sanitária principalmente deve ser preservada, objetivando a manutenção do germoplasma, melhoramento da diversidade de espécies e da capacidade de produção (SHARIFIFAR; NAZARI; ASGHARI, 2015). No entanto, são frequentes perdas de qualidade em consequência da estrutura de armazenamento incipiente em nível da agricultura pouco tecnificada, resultando na infestação por pragas, doenças, fungos. (TOLEDO et al., 2007; ZUCARELI et al., 2015).

Nos últimos anos, é crescente a demanda por sementes sadias, objetivando-se atingir o máximo rendimento. Além disso, é crescente o aumento da preocupação com a sustentabilidade ambiental e com a necessidade de otimizar o uso das áreas utilizadas para a prática da agricultura. Dessa forma, assim como é importante o aumento da produção de alimentos, para suprir a demanda devido ao crescimento exponencial da população mundial, é fundamental a preservação da biodiversidade dos ecossistemas. Portanto, torna-se crucial o uso de tecnologias que contribuam para a manutenção da qualidade das sementes. Nesse cenário, o ozônio vem sendo mencionado como sendo um poderoso sanitizante, em consequência do seu alto potencial de oxidação, aliado ao fato do gás possuir baixa meia-vida sob condições ambientais, torna-o ambientalmente sustentável (TIWARI et al., 2010; PANDISELVAM & THIRUPATHI, 2015). Estudos relatam uma vida média do ozônio entre 6,78 - 50 min (TIWARI et al., 2010; PANDISELVAM & THIRUPATHI, 2015; PANDISELVAM; THIRUPATHI; MEENATCHI, 2015; PANDISELVAM et al., 2017; PANDISELVAM et al., 2020; SILVA et al., 2022), decompondo-se rapidamente em molécula de oxigênio. A instabilidade do gás faz com que a sua produção seja *in-situ*, dispensando a necessidade de armazenamento e descarte do gás ou de subprodutos (TIWARI et al.,

2010; PANDISELVAM & THIRUPATHI, 2015). De alto poder reativo e oxidativo, o ozônio é um poderoso sanitizante, sendo usado no controle dos diversos grupos de microrganismos, tais como fungos, bactérias e vírus (TIWARI et al., 2010; PANDISELVAM & THIRUPATHI, 2015; PANDISELVAM; THIRUPATHI; MEENATCHI, 2015; PANDISELVAM et al., 2017; PANDISELVAM et al., 2020; GAD et al., 2021; SILVA et al., 2022). O alto poder reativo é atribuído a configuração estrutural da sua molécula, podendo agir como agente eletrófilo e nucleófilo, a depender do excesso ou déficit de elétrons em um de seus orbitais (ALENCAR et al., 2011).

Há na literatura relatos nos quais são apresentados resultados referentes ao efeito do ozônio na qualidade de sementes, tais como milho (MAXIMIANO et al., 2018; MONTEIRO et al., 2021; ROSA et al., 2021), quinoa (ALENCAR et al., 2021) e lentilha (SOUZA et al., 2021). Esses autores relataram efeitos positivos do ozônio na qualidade das sementes, tais como aumento do percentual de germinação e do comprimento de plântulas e redução da condutividade elétrica. Porém, é importante ampliar o conhecimento dos efeitos do gás sobre a qualidade fisiológica, bioquímica e desempenho agrônômico das diferentes sementes. Até o presente momento, a maioria das pesquisas foram realizadas com milho.

O estudo da qualidade fisiológica das sementes pode incluir testes de germinação, de condutividade elétrica e análise de crescimento de plântulas por meio de imagens. O teste de germinação, feito através da primeira e última contagem de plântulas normais, expressa o potencial máximo do lote. O teste de condutividade revela sobre a integridade dos tecidos da semente, sendo que maiores valores de condutividade elétrica estão relacionados a maiores danos e, conseqüentemente, maior quantidade de exsudatos, que podem ser íons de potássio, sódio, magnésio, entre outros (VIEIRA; MARCOS FILHO, 2020). Por outro lado, menores valores de condutividade elétrica estão relacionados a maior integridade das membranas (VIEIRA; MARCOS FILHO, 2020).

A análise de crescimento, feita a partir da obtenção de imagens por meio de escâner e processamento de imagens por meio de software como é o caso do *Vigor-S*, consiste em um teste de germinação e posterior contagem de germinação, determinação do comprimento das plântulas e dos índices de vigor (MEDEIROS; PEREIRA, 2018) de uniformidade e crescimento (SAKO et al., 2001; CASTAN et al., 2018). A análise bioquímica é também de extrema importância, pois alterações na qualidade das sementes, na sua maioria, são associadas à mudanças na atividade

respiratória e metabolismo de reservas, à alterações na atividade enzimática e síntese de proteínas, ao acúmulo de substâncias tóxicas, aos danos à integridade do DNA e aos sistemas de membranas, à peroxidação de lipídios e à lixiviação de solutos (MANSOURI-FAR et al., 2015).

Dentre as enzimas que estão diretamente relacionadas à qualidade das sementes, tem-se peroxidase (POX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase do ácido ascórbico (APX) (JESUS et al., 2021c; DE ARAÚJO et al., 2021). A atividade das enzimas SOD, POX, APX e CAT está relacionada à capacidade de eliminação das espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são resultado das reações de oxi-redução e fazem parte do metabolismo normal das plantas (DECROS et al., 2018). Elas incluem o ânion superóxido-  $O_2^{\bullet-}$ , radical hidropoxila-  $HO_2^{\bullet}$ , radical alcóxil-  $RO^{\bullet}$ , radical hidroxila-  $\bullet OH$  e moléculas não radicais como peróxido de hidrogênio-  $H_2O_2$  e oxigênio singlete-  $^1O_2$  (MEHLA et al., 2017; HASANUZZAMAN et al., 2017; HASANUZZAMAN et al., 2021; JESUS et al., 2021a). O incremento das EROs promove o estresse oxidativo, que causa peroxidação lipídica, danifica ácidos nucleicos e proteínas e altera o metabolismo de carboidratos, resultando em disfunção celular e morte (HEBERLE et al., 2019; HASANUZZAMAN et al., 2020; DE ARAÚJO et al., 2021; JESUS et al., 2021a; JESUS et al., 2021b; JESUS et al., 2021c).

Para evitar o desequilíbrio entre a produção e eliminação das EROs, torna-se essencial a manutenção do equilíbrio entre a produção das EROs e síntese e atividade de enzimas do complexo antioxidante. Há autores que indicaram que o uso de ozônio em sementes estimulou a reestruturação de algumas proteínas responsáveis pela eliminação de EROs e um equilíbrio entre a síntese e eliminação de proteínas processo designado “protein turnover” (SOUZA et al., 2020).

A análise das sementes também pode ser feita por espectroscopia no infravermelho próximo (FT-NIR), que é uma técnica promissora (HUANG et al., 2016; HE et al., 2019; XAVIER et al., 2019; WANG et al., 2020), não destrutiva e totalmente segura para o operador, que vem sendo testada. A técnica se baseia na absorção de radiação eletromagnética em comprimentos de onda na faixa de 780 – 2500 nm de espectro eletromagnético da luz e permite observar os fenômenos de transferência de energia eletromagnética da radiação NIR para os sistemas vibracionais mecânicos atômicos, principalmente em moléculas orgânicas que apresentam os grupos funcionais C – H, N – H, O – H e S – H (PASQUINI, 2018). Essa técnica permite ainda

a classificação fisiológica de lotes de sementes. Vários estudos têm comprovado a eficiência do uso de NIR na análise da qualidade fisiológica de sementes (XAVIER et al., 2019; SOUZA et al., 2020; WANG et al., 2020; DA SILVA MEDEIROS et al., 2022; ANDRIAZZI; ROCHA; CUSTÓDIO, 2023).

Diante do exposto, torna-se essencial ampliar o conhecimento sobre a dinâmica fisiológica e bioquímica nas sementes ozonizadas, inclusive considerando o desempenho em campo. Considera-se ainda que não há relatos sobre o efeito do ozônio na qualidade de sementes de feijão e a maioria dos trabalhos já realizados com sementes de outras culturas são restritos à descrição das alterações dos parâmetros de qualidade fisiológica, sem a indicação do mecanismo de ação do ozônio. Diante do exposto, os objetivos do presente estudo são: i) determinar o efeito do gás ozônio em sementes de feijão com diferentes níveis de qualidade fisiológica e possível relação com a atividade das enzimas antioxidantes nas sementes; e ii) determinar o desempenho em campo e detectar possíveis alterações nas sementes por meio da espectroscopia no infravermelho próximo em sementes de feijão ozonizadas.

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, E. R. et al. Decomposition kinetics of gaseous ozone in peanuts. **Engenharia Agrícola**, v. 31, p. 930-939, 2011.
- ANDRIAZZI, R. C. Determination of the physiological quality of corn seeds by infrared equipment. **Journal of Seed Science**, v. 45, 2023.
- ARAÚJO, N. et al. Balance between oxidative stress and the antioxidant system is associated with the level of cold tolerance in sweet potato roots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 172, p. 111359, 2021.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 395p.
- CASTAN, D. O. C.; GOMES-JUNIOR, F. G.; MARCOS-FILHO, J. Vigor-S, a new system for evaluating the physiological potential of maize seeds. **Scientia Agrícola**, v. 75, p. 167-172, 2018.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. 2022. **Acompanhamento Da Safra Brasileira De Grãos**.
- DA SILVA, M. et al. Assessment oil composition and species discrimination of Brassicas seeds based on hyperspectral imaging and portable near infrared (NIR) spectroscopy tools and chemometrics. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 107, p. 104403, 2022.
- DECROS, G. et al. Get the balance right: ROS homeostasis and redox signaling in fruit. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1091, 2019.
- GAD, H. A. et al. Efficacy of ozone for *Callosobruchus maculatus* and *Callosobruchus chinensis* control in cowpea seeds and its impact on seed quality. **Journal of Stored Products Research**, v. 92, p. 101786, 2021.
- HASANUZZAMAN, M. et al. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 681, 2020.
- HASANUZZAMAN, M. et al. Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, p. 384, 2019.
- HE, X. et al. Rapid and nondestructive measurement of rice seed vitality of different years using near-infrared hyperspectral imaging. **Molecules**, v. 24, n. 12, p. 2227, 2019.
- HEBERLE, E. et al. Qualidade fisiológica e atividade enzimática de sementes de milho durante o armazenamento. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 3, p. 657-665, 2019.

HUANG, M. et al. Maize seed variety classification using the integration of spectral and image features combined with feature transformation based on hyperspectral imaging. **Applied Sciences**, v. 6, n. 6, p. 183, 2016.

JESUS, C. D. B. et al., Envelhecimento de sementes: natural e artificial. In: FERNANDEZ; JESUS; SANTOS. *Ricinus communis* L.: **sementes, envelhecimento e estresse oxidativo**. Salvador: UFBA, p 39-45, 2021a.

JESUS, C. D. B. et al., Estresse oxidativo e mecanismo de desintoxicação. In: FERNANDEZ; JESUS; SANTOS. *Ricinus communis* L.: **sementes, envelhecimento e estresse oxidativo**. Salvador: UFBA, p. 47-54, 2021b.

JESUS, C. D. B. et al., Enzimas Antioxidantes. In: FERNANDEZ; JESUS; SANTOS. *Ricinus communis* L.: **sementes, envelhecimento e estresse oxidativo**. Salvador: UFBA, p 65-74, 2021c.

MANSOURI-FAR, C. et al. Antioxidant enzyme activity and germination characteristics of different maize hybrid seeds during aging. **Environmental and Experimental Biology**, v. 13, n. 4, p. 177-182, 2015.

MAXIMIANO, C. V. et al. Physiological and sanitary quality of maize seeds preconditioned in ozonated water. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 22, p 360-365, 2018.

MEDEIROS, A. D.; PEREIRA, M. D. SAPL®: a free software for determining the physiological potential in soybean seeds. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 48, p. 222–228, 2018;

MONTEIRO, N. O. C. et al. Ozonized water in the preconditioning of corn seeds: physiological quality and field performance. **Ozone: Science & Engineering**, v. 43, n. 5, p. 436-450, 2021.

MEHLA, N. et al. An introduction to antioxidants and their roles in plant stress tolerance. In: **Reactive oxygen species and antioxidant Systems in Plants: role and regulation under abiotic stress**. Springer, Singapore, 2017. p. 1-23.

PANDISELVAM, R. et al. Application and kinetics of ozone in food preservation. **Ozone: Science & Engineering**, v. 39, n. 2, p. 115-126, 2017.

PANDISELVAM, R. et al. Ozone as a novel emerging technology for the dissipation of pesticide residues in foods—a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 97, p. 38-54, 2020.

PANDISELVAM, R.; THIRUPATHI, V. Reaction kinetics of Ozone gas in green gram (*Vigna radiate*). **Ozone: Science & Engineering**, v. 37, n. 4, p. 309-315, 2015.

PANDISELVAM, R.; THIRUPATHI, V.; MEENATCHI, R. Decay rate kinetics of ozone gas in rice grains. **Ozone: Science & Engineering**, v. 37, n. 5, p. 450-455, 2015.

PASQUINI, C. Princípios Da Espectroscopia No Infravermelho Próximo. In: TIBOLA, C. S.; MEDEIROS, E. P.; SIMEONE, M. L. F.; OLIVEIRA, M. A. **Espectroscopia no Infravermelho Próximo para Avaliar Indicadores de Qualidade Tecnológica e Contaminantes em Grãos**, Brasília, DF: Embrapa, 2018. p. 13-30.

ROSA, C. C. et al. Physiological Quality of Corn Seeds Treated with Gaseous Ozone. **Ozone: Science & Engineering**, v. 44, n. 1, p. 117-126, 2022.

SAKO, Y. et al. System for automated seed vigor assessment. **Seed Science and Technology**, v. 29, p. 625-636, 2001.

SHARIFIFAR, A.; NAZARI, M.; ASGHARI, H. R. Effect of ultrasonic waves on seed germination of *Atriplex lentiformis*, *Cuminum cyminum*, and *Zygophyllum eurypterum*. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 3, p. 102-104, 2015.

SOUZA, P. R. F. et al. Effect of ozone exposure on water uptake and germination of lentil (*Lens culinaris*) seeds. **Ozone: Science & Engineering**, v. 43, n. 1, p. 48-59, 2020.

SUDHAKAR, N. et al. Assessing influence of ozone in tomato seed dormancy alleviation. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2, n. 03, p. 443, 2011.

TIWARI, B. K. et al. Application of ozone in grain processing. **Journal of cereal science**, v. 51, n. 3, p. 248-255, 2010.

TOLEDO, M. Z. et al. Efeitos do ambiente de armazenamento na qualidade de sementes de sorgo-Sudão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 44-52, 2007.

VIEIRA, R. D.; MARCOS FILHO, J. Teste de condutividade elétrica. **Vigor de sementes: conceitos e testes**, p. 601: il, 2020.

WANDER, A. E.; DA SILVA, O. F.; FERREIRA, C. M. O arroz e o feijão no Brasil e no mundo. In: FERREIRA, C. M.; BARRIGOSI, J. A. F. **Arroz e feijão**, Brasília, DF: Embrapa 2021, p. 81-100.

WANG, Y. et al. Feasibility analysis of NIR for detecting sweet corn seeds vigor. **Journal of Cereal Science**, v. 93, p. 102977, 2020.

XAVIER, J. B. et al. Morphological, chemical and physiological characterization of *Amaranthus spp.* Seeds. **Journal of Seed Science**, v. 41, p. 478-487, 2019.

ZUCARELI, C. et al. Qualidade fisiológica de sementes de feijão carioca armazenadas em diferentes ambientes. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, v. 19, p. 803-809, 2015.

## **Capítulo 1: Qualidade fisiológica e atividade enzimática em sementes de feijão ozonizadas**

**RESUMO:** Objetivou-se com o presente estudo, determinar o efeito do gás ozônio em sementes de feijão com diferentes níveis de qualidade fisiológica e a possível relação com a atividade enzimática. Foram utilizadas sementes com 12,5 % de teor de água e 95% de germinação. As sementes não submetidas ao processo de envelhecimento artificial pertenceram ao Lote 1 (L1). As demais amostras de sementes foram submetidas ao processo de envelhecimento artificial na BOD a temperatura de 42 °C por 48h (Lote 48h- L48h), 60 h (Lote 60h - L60h) e 72 h (Lote 72h- L72h). Cada um dos quatro lotes de sementes de feijão foi exposto ao gás ozônio por 0 (T0) (sementes não ozonizadas), 30 (T30), 60 (T60) e 90 min (T90). No processo de ozonização adotou-se vazão volumétrica de 1,0 L min<sup>-1</sup> e concentração de entrada do gás de 10 mg L<sup>-1</sup>. Foi feita a avaliação da qualidade fisiológica (teste de germinação, condutividade elétrica, comprimento de plântulas e índices de vigor e uniformidade e da atividade enzimática (catalase, superóxido dismutase e peroxidase). Foi realizada Análise de Variância e posteriormente teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Posteriormente, realizou-se Análise Multivariada, utilizando-se Análise de Componentes Principais (ACP). Em sementes não envelhecidas com percentual de germinação inicial de 95%, o ozônio não teve efeito significativo sobre a qualidade fisiológica e atividade enzimática. O ozônio foi capaz de ocasionar efeitos positivos em sementes envelhecidas por 48 h. Houve aumento do percentual de germinação, do comprimento de plântulas e dos níveis de catalase e peroxidase. Em sementes expostas ao envelhecimento artificial por mais de 48 h e ao ozônio por mais de 30 min, a ozonização não foi capaz de induzir a recuperação da qualidade fisiológica de sementes.

**Palavras-chave:** Superóxido Dismutase. Catalase. Espécies Reativas de Oxigênio.

**ABSTRACT:** The objective of this study was to determine the effect of ozone gas on bean seeds with different levels of physiological quality and the possible relationship with enzymatic activity. Seeds with 12.5% water content and 95% germination were used. The seeds not submitted to the artificial aging process belonged to Batch 0h (B0h). The other seed samples were submitted to the artificial aging process in the BOD at a temperature of 42 °C for 48h (Batch 48h-B48h), 60 h (Batch 60h - B60h) and 72 h (Batch 72h-B72h). Each of the four bean seed lots was exposed to ozone gas for 0 (T0) (non-ozonized seeds), 30 (T30), 60 (T60) and 90 min (T90). of 1.0 L min<sup>-1</sup> and gas inlet concentration of 10 mg L<sup>-1</sup>. The physiological quality was evaluated (germination test, electrical conductivity, seedling length and vigor and uniformity indices and enzymatic activity (catalase, superoxide dismutase and peroxidase). A Variance Analysis was performed and later Tukey's test, at 5% probability. Subsequently, Multivariate Analysis was performed, using Principal Component Analysis (PCA). In non-aged seeds with an initial germination percentage of 95%, ozone had no significant effect on physiological quality and enzymatic activity. Ozone was able to cause positive effects in seeds aged for 48 h. There was an increase in germination percentage, seedling length and catalase and peroxidase levels. In seeds exposed to artificial aging for more than 48 h and to ozone for more than 30 min, ozonation was not able to induce the recovery of the physiological quality of seeds.

**Keywords:** Superoxide Dismutase. Catalase. Reactive Oxygen Species.

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão é a principal fonte de proteína do norte ao sul do Brasil. Portanto, a obtenção de altas produtividades é de extrema importância para a segurança alimentar no país (BORÉM; CARNEIRO, 2015). No processo produtivo, a semente configura fator decisivo qualitativa e quantitativamente (DELARMELENO-FERRARESI; VILLELA; AUMONDE, 2014). Os atributos qualitativos da semente estão associados à fisiologia, à sanidade, ao metabolismo, dentre outros. Sob condições de armazenamento inadequado, as sementes são suscetíveis à proliferação de fungos e de bactérias, além de ataque de insetos-praga, implicando-se em perdas qualitativas e quantitativas (TOLEDO et al., 2007; ZUCARELI et al., 2015).

As perdas de natureza fisiológica estão relacionadas à diminuição no percentual de germinação, ao aumento nos níveis de condutividade elétrica e ao baixo vigor das plântulas (SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2005; NAKADA et al., 2011). As perdas por alteração no metabolismo estão associadas à alteração da capacidade de indução dos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (ARAÚJO et al., 2021, JESUS et al., 2021b; JESUS et al., 2021c). Ressalta-se que o sistema antioxidante enzimático das plantas compreende algumas enzimas como: peroxidase (POX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidase do ácido ascórbico (APX) (ARAÚJO et al., 2021; JESUS et al., 2021c), monodesidroascorbato redutase (MDHAR), desidroascorbato redutase (DHAR), glutatona redutase (GR) (JESUS et al., 2021c).

A perda de qualidade fisiológica das sementes pode ocorrer como consequência da perda de integridade das membranas e desencadeamento de estresse oxidativo, devido ao aumento da síntese das espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs, que incluem o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), os quais fazem parte do metabolismo normal das plantas, quando produzidas em baixas concentrações. Porém, o aumento na síntese das EROs promove modificações na estrutura das enzimas e degradação do sistema de síntese de novas proteínas. Portanto, se por um lado as EROS são responsáveis pela degradação das enzimas, as enzimas antioxidantes são responsáveis por evitar o acúmulo das EROS (HEBERLE et al., 2019; HASANUZZAMAN et al., 2020; ARAÚJO et al., 2021; JESUS et al., 2021b; JESUS et al., 2021c).

Diante do exposto, a adoção de tecnologias que promovam o aumento na síntese e atividade das enzimas do sistema antioxidante, evitando-se o acúmulo das EROS e, conseqüentemente, reversão dos danos da integridade celular, configura ferramenta imprescindível na melhoria da produção e produtividade do feijão. Uma tecnologia que vem sendo adotada no tratamento de sementes é a ozonização. O ozônio é um gás que se destaca pelo seu elevado potencial de oxidação (2,07 mV) (LAPOLLI et al., 2003). Há relatos na literatura, nos quais os autores apresentaram resultados referentes ao efeito da ozonização na qualidade fisiológica de sementes, tais como milho e quinoa (VIOLLEAU et al., 2008; ALENCAR et al., 2021; MONTEIRO et al., 2021; ROSA et al., 2021).

O ozônio, aplicado em condições adequadas, é capaz de estimular a germinação e emergência e de reverter os danos sobre a integridade das sementes de milho (MAXIMIANO et al., 2018; MONTEIRO et al., 2021; ROSA et al., 2021). Entretanto, faz-se necessário elucidar o mecanismo de ação do ozônio nas sementes, uma vez que a maioria dos trabalhos já realizados são restritos ao efeito do ozônio na qualidade fisiológica das sementes. É possível que o efeito benéfico do ozônio esteja associado ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes nas sementes, hipótese que precisa ser testada. Salienta-se ainda que não há relatos na literatura referente ao efeito do ozônio em sementes de feijão.

Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo, determinar o efeito do gás ozônio em sementes de feijão com diferentes níveis de qualidade fisiológica e possível relação com a atividade das enzimas antioxidantes nas sementes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período de novembro de 2021 a novembro de 2022, no Laboratório de Pós-colheita da Área de Armazenamento de Produtos Agrícolas, do Departamento de Engenharia Agrícola, e no Laboratório de Pesquisa de Sementes do Departamento de Agronomia, ambos pertencentes à Universidade Federal de Viçosa.

### 2.1 Processo de ozonização das sementes de feijão

#### 2.1.1 Características do material genético

No presente estudo, foram utilizadas sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar “BRSMG Marte”, com 12,5% de teor de água e 95% de germinação. Para a obtenção das sementes com os diferentes níveis de qualidade fisiológica, adotou-se o método de envelhecimento artificial, adaptando-se o teste de envelhecimento acelerado (Marcos Filho, 1999). As sementes não submetidas ao processo de envelhecimento artificial pertenceram ao Lote 0h (L0h). As demais amostras de sementes foram distribuídas sobre tela de aço inoxidável acopladas à metade superior de caixa *gerbox*, contendo ao fundo 40 mL de água destilada e mantidas em BOD a 42 °C por 48h (Lote 48h - L48h), 60 h (Lote 60h - L60h) e 72 h (Lote 72 h - L72 h).

#### 2.1.2 Geração do gás ozônio e tratamento das sementes

Na Figura 1 é apresentado o esquema para ozonização das sementes de feijão. O gás foi obtido usando um gerador de ozônio (Modelo M10, myOZONE, Jaguariúna, São Paulo, Brasil), acoplado a concentrador de oxigênio (Modelo EverFlo, Philips Respironics, Murrysville, Pensilvânia, EUA) (Figuras 1a e 1b). Adotou-se vazão volumétrica de 1,0 L min<sup>-1</sup> e concentração de entrada do gás de 10 mg L<sup>-1</sup>. Para quantificação da concentração do ozônio, adotou-se o método iodométrico com titulação indireta (Eaton et al., 2000).

Para o tratamento das sementes de feijão com ozônio, utilizou-se o protótipo de PVC, de 0,17 m de altura e 0,20 m de diâmetro, dotado de conexões para entrada

e saída do gás (Figuras 1c e 1e). O protótipo possuía um *plenum*, formado a partir da disposição de tela metálica a 0,05 m da base, o que favorecia a melhor distribuição do gás. As amostras de 120 g de sementes de cada lote foram acondicionadas previamente em sacos de organza. O ozônio residual era degradado, utilizando-se um destruidor térmico (Figura 1d). Cada um dos quatro lotes de sementes de feijão foi exposto ao gás ozônio por 0 (sementes não ozonizadas), 30, 60 e 90 min, totalizando 16 combinações entre lotes e tempos de exposição ao ozônio, com quatro repetições.

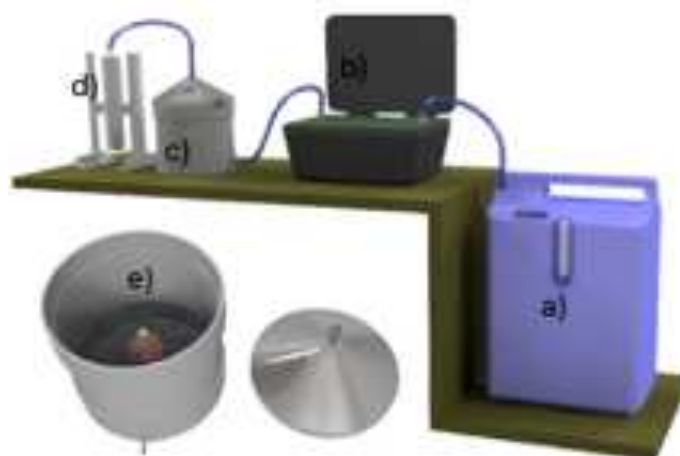


Figura 1. Esquema experimental para ozonização das sementes de feijão. a) concentrador de oxigênio; b) gerador de ozônio; c) Câmara de ozonização; d) destruidor de ozônio; e) amostra de sementes de feijão. Fonte: Autora (2022).

## 2.2 Análise da qualidade fisiológica das sementes de feijão ozonizadas

### 2.2.1 Teste de Germinação (GER)

As sementes foram semeadas em papel *germitest* umedecido com volume de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco e mantidas em germinador a 25 °C e fotoperíodo de 8 h. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento. A germinação (GER) foi determinada pelo somatório do número de plântulas normais no 5º e 8º dia após a semeadura, sendo os resultados expressos em porcentagem, conforme descrito em BRASIL (2009).

### 2.2.2 Condutividade elétrica (CE)

Quatro repetições de 50 sementes foram pesadas e colocadas em copos plásticos contendo 75 mL de água destilada. O material foi mantido em BOD a 25 °C, durante 24 h (KRZYZANOWSKI et al., 2020). Após esse período, foi determinada a condutividade elétrica da solução, por meio de um condutivímetro modelo DM 31 Digimed®. Os resultados obtidos foram expressos em  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ .

### 2.2.3 Comprimento das plântulas (CP), índice de vigor (IV) e índice de uniformidade (IU)

Foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes para cada tratamento (Figura 2a), semeadas em papel *germitest* umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos de papel foram mantidos em germinador a 25 °C, por três dias. Após esse período, as plântulas foram escaneadas e mensurado o comprimento de raiz e da parte aérea utilizando o Software Vigor-S® (Figura 2b). Os dados de comprimento foram utilizados para o cálculo do índice de uniformidade (IU) (CASTAN et al., 2018; SAKO et al., 2001) e índice de vigor (IV) (MEDEIROS; PEREIRA, 2018).

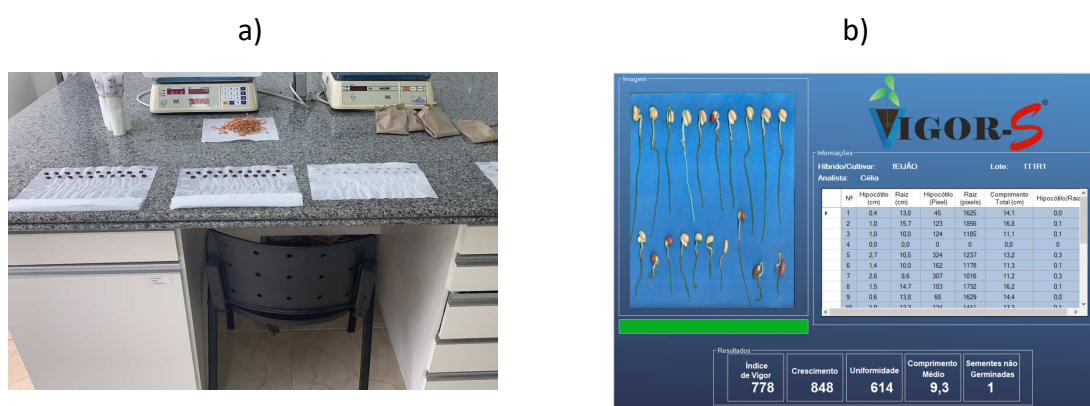


Figura 2. Análise de imagem de sementes de feijão. a) montagem do teste de crescimento de plântulas; b) Tela do software Vigor-S®. Fonte: Autora (2022).

### 2.3 Análise da atividade enzimática nas sementes de feijão ozonizadas

Na avaliação da atividade enzimática das sementes de feijão foram analisadas as seguintes enzimas do sistema antioxidante: Catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e Peroxidase (POX). Inicialmente, foi determinada a curva padrão de proteína. Para isso, foram utilizados 1  $\mu\text{L}$  de extrato de amostra de sementes de feijão liofilizado e moído, 1 mL de reagente de Bradford e 999,00  $\mu\text{L}$  de água destilada (BRADFORD, 1976). Em seguida, efetuou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 595 nm.

A determinação da atividade da CAT foi realizada de acordo com o método descrito por Havir; McHale (1987). Foram colocados em uma cubeta de quartzo 100  $\mu\text{L}$  de meio de reação contendo fosfato de potássio 50 mM a pH 7,0,  $\text{H}_2\text{O}_2$  12,5 mM e 100  $\mu\text{L}$  do extrato da amostra. Após a homogeneização, foi efetuada a leitura do decréscimo da absorbância durante 1 min a 240 nm. A atividade da CAT foi expressa por  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, considerando-se 36  $\text{M}^{-1}$  de coeficiente de extinção molar para  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

A determinação da atividade da SOD foi realizada de acordo com o método de fotoinibição do “nitro blue tetrazolim” (NBT), conforme descrito por Beauchamp; Fridovich (1971). O meio de reação consistiu de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, metionina 13 mM, “nitro blue tetrazolium” (NBT) 75 mM, EDTA 0,1mM e riboflavina 2 mM. Ao meio de reação foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de extrato da amostra e levados a luz na câmara de reação por um período de 5 min. Na sequência, foi feita a leitura da absorbância a 590 nm. A atividade da SOD foi expressa em  $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, considerando-se que 1 U de SOD é capaz de inibir 50% da foto inibição do NBT.

A POX foi determinada conforme descrito por Kar & Mishra (1976). O meio de reação consistiu de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, “pyrogallol 20 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ao meio de reação foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de extrato da amostra. Realizou-se leitura da absorbância por 1 min, a 420 nm. A atividade da POX foi expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, considerando-se o coeficiente de extinção molar 2,47  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  para a purpurogalina.

## 2.4 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em Delineamento Inteiramente Casualizado, em fatorial 4x4, sendo quatro níveis de qualidade fisiológica das sementes (L0h, L48h, L60h e L72h) e quatro tempos de exposição do ozônio (0, 30, 60 e 90 min), com quatro repetições. Inicialmente foi realizada Análise de Variância e posteriormente teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Análise Univariada). Posteriormente, realizou-se Análise Multivariada, utilizando-se Análise de Componentes Principais (ACP). Na Análise Multivariada foram consideradas somente as variáveis em que houve efeito significativo devido a interação entre níveis de qualidade fisiológica e tempos de exposição do ozônio, ou devido aos fatores isoladamente, na Análise Univariada. Nas análises estatísticas, utilizou-se o software StatPlus 5.0 (AnalystSoft Inc, Canada).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Análise Univariada

##### 3.1.1 Qualidade fisiológica das sementes de feijão ozonizadas

De acordo com a Análise de Variância, houve interação significativa em decorrência da interação entre níveis de qualidade fisiológica (L) e tempos de ozonização (TO), na concentração de entrada de 10 mg L<sup>-1</sup>, para as variáveis Germinação (GER, FLxTO<sub>9,48</sub> = 3,22; *P* = 0,004), condutividade elétrica (CE, FLxTO<sub>9,48</sub> = 6,72; *P* < 0,0001), comprimento de plântulas (CP, FLxTO<sub>9,48</sub> = 8,48; *P* < 0,0001), índice de vigor (IV, FLxTO<sub>9,48</sub> = 33,80; *P* < 0,0001) e índice de uniformidade (IU, FLxTO<sub>9,48</sub> = 24,88; *P* < 0,0001) (Tabela 1).

Contatou-se que os lotes de sementes apresentaram níveis de qualidade fisiológica distintos (Tabela 1). O L72h (72 h de envelhecimento artificial) foi aquele que apresentou menores valores de germinação, comprimento de plântulas, índice de vigor e índice de uniformidade, e maiores valores de condutividade elétrica. Salienta-se que os L48h (48 h de envelhecimento artificial), L60h (60 h de envelhecimento artificial) e L72h apresentaram germinação inferior a 80%, que é o mínimo necessário para comercialização das sementes.

No que se refere ao efeito do ozônio na qualidade fisiológica das sementes, verificou-se, que em geral o ozônio provocou alterações desejáveis ou indesejáveis, dependendo do tempo de exposição ao gás (Tabela 1). Com relação ao L0h, tempos de exposição de até 90 min, na concentração de entrada de 10 mg L<sup>-1</sup>, não ocasionaram alteração significativa (*P*>0,05) quando se analisaram as variáveis germinação e condutividade elétrica (Tabela 1). Entretanto, o maior comprimento de plântula (CP) foi obtido quando se adotou o tempo de exposição de 30 min, sendo equivalente a ≈ 1,15 vezes ao valor obtido nas sementes não ozonizadas (0 min). Por outro lado, quando se adotou o tempo de exposição de 90 min, houve redução do CP, sendo o valor equivalente a ≈ 0,89 vezes aquele obtido nas sementes não ozonizadas. Similarmente, observou-se incremento dos índices de vigor (IV) e de uniformidade (IU) quando as sementes foram ozonizadas por 30 min e decréscimo para tempo de ozonização de 90 min.

Tabela 1. Porcentagem de germinação (GER), condutividade elétrica (CE), comprimento de plântulas (CP), índice de vigor (IV) e índice de uniformidade (IU) em diferentes lotes de sementes de feijão submetidos a ozonização na concentração de entrada de 10 mg L<sup>-1</sup>, por até 90 min

Tempo de exposição ao ozônio (min)	Tempo de envelhecimento (horas)			
	0 (L0h)	48 (L48h)	60 (L60h)	72 (L72h)
<b>GER (%)</b>				
0 (T0)	98,5 ± 1,9 aA	75,0 ± 7,4 bB	64,7 ± 8,1 bcB	55,3 ± 10,1 cB
30 (T30)	95,0 ± 4,7 aA	87,3 ± 3,0 abA	77,5 ± 4,4 bA	79,0 ± 2,0 bA
60 (T60)	90,0 ± 5,7 aA	76,3 ± 9,3 bB	71,0 ± 2,0 bAB	66,0 ± 5,4 bB
90 (T90)	93,5 ± 4,1 aA	77,0 ± 6,6 bAB	74,0 ± 5,9 bAB	62,5 ± 5,7 cB
<b>CE (μS cm<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>)</b>				
0 (T0)	27,0 ± 1,1 cA	42,5 ± 2,9 bA	43,4 ± 0,6 bA	59,1 ± 2,0 aA
30 (T30)	23,3 ± 2,7 cA	39,1 ± 5,5 bA	46,4 ± 2,8 aA	34,7 ± 5,4 bC
60 (T60)	21,5 ± 2,3 cA	36,4 ± 1,9 bA	50,3 ± 7,4 aA	46,4 ± 9,9 aB
90 (T90)	21,2 ± 0,8 bA	42,3 ± 3,6 aA	44,0 ± 4,3 aA	49,4 ± 3,2 aB
<b>CP (cm)</b>				
0 (T0)	9,1 ± 0,3 aB	8,5 ± 0,3 aA	4,7 ± 1,2 bAB	3,8 ± 0,2 bA
30 (T30)	10,5 ± 0,3 aA	8,9 ± 0,2 bA	5,3 ± 0,6 cA	2,5 ± 0,1 dB
60 (T60)	9,7 ± 0,6 aAB	8,3 ± 0,3 bA	4,8 ± 0,2 cAB	3,5 ± 0,3 dA
90 (T90)	8,1 ± 0,2 aC	6,2 ± 0,2 bB	4,0 ± 0,4 cB	3,8 ± 0,1 cA
<b>IV</b>				
0 (T0)	742,5 ± 46,3 aBC	701,2 ± 2,3 aA	342,0 ± 132,4 bB	370,4 ± 18,8 bA
30 (T30)	845,2 ± 29,8 aA	725,4 ± 17,3 bA	481,9 ± 55,8 cA	233,9 ± 6,8 dB
60 (T60)	794,3 ± 35,5 aAB	610,9 ± 7,4 bB	423,9 ± 18,0 cA	263,5 ± 47,0 dB
90 (T90)	696,3 ± 0,0 aC	409,2 ± 7,4 bcC	480,3 ± 15,3 bA	340,1 ± 4,2 cA
<b>IU</b>				
0 (T0)	610,7 ± 59,4 aB	534,1 ± 1,6 bB	545,7 ± 34,6 bC	454,2 ± 18,8 cB
30 (T30)	690,8 ± 22,9 aA	538,7 ± 5,4 bB	692,8 ± 65,0 aA	453,5 ± 17,0 cB
60 (T60)	676,0 ± 20,9 aA	465,8 ± 0,0 bC	640,2 ± 8,0 aB	415,6 ± 28,1 cB
90 (T90)	613,5 ± 0,0 aB	612,64 ± 16,0 aA	428,3 ± 21,9 cD	507,6 ± 12,9 bA

As médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. L- lote envelhecido artificialmente por 0, 48, 60 e 72 horas; T- tempo de exposição ao ozônio 0, 30, 60 e 90 min.

No que se refere ao L48h, a aplicação do ozônio gasoso, na concentração de entrada de 10 mg L<sup>-1</sup>, ocasionou incremento na germinação, quando adotado tempo de exposição de 30 min (Tabela 1 e Figura 3). As sementes ozonizadas por 30 min apresentaram germinação de aproximadamente 1,16 vezes aquele obtido nas sementes não ozonizadas, obtendo-se valores superiores a 80%. No L48h, a variável condutividade elétrica não foi influenciada pelo tempo de exposição ao ozônio. Quanto às variáveis comprimento de plântula e índice de vigor, destacam-se expressivas reduções quando adotado o tempo de exposição de 90 min. Nessa condição, os valores de comprimento de plântula e índice de vigor foram equivalentes a 0,73 e 0,58 vezes aqueles obtidos nas sementes não ozonizadas, respectivamente.

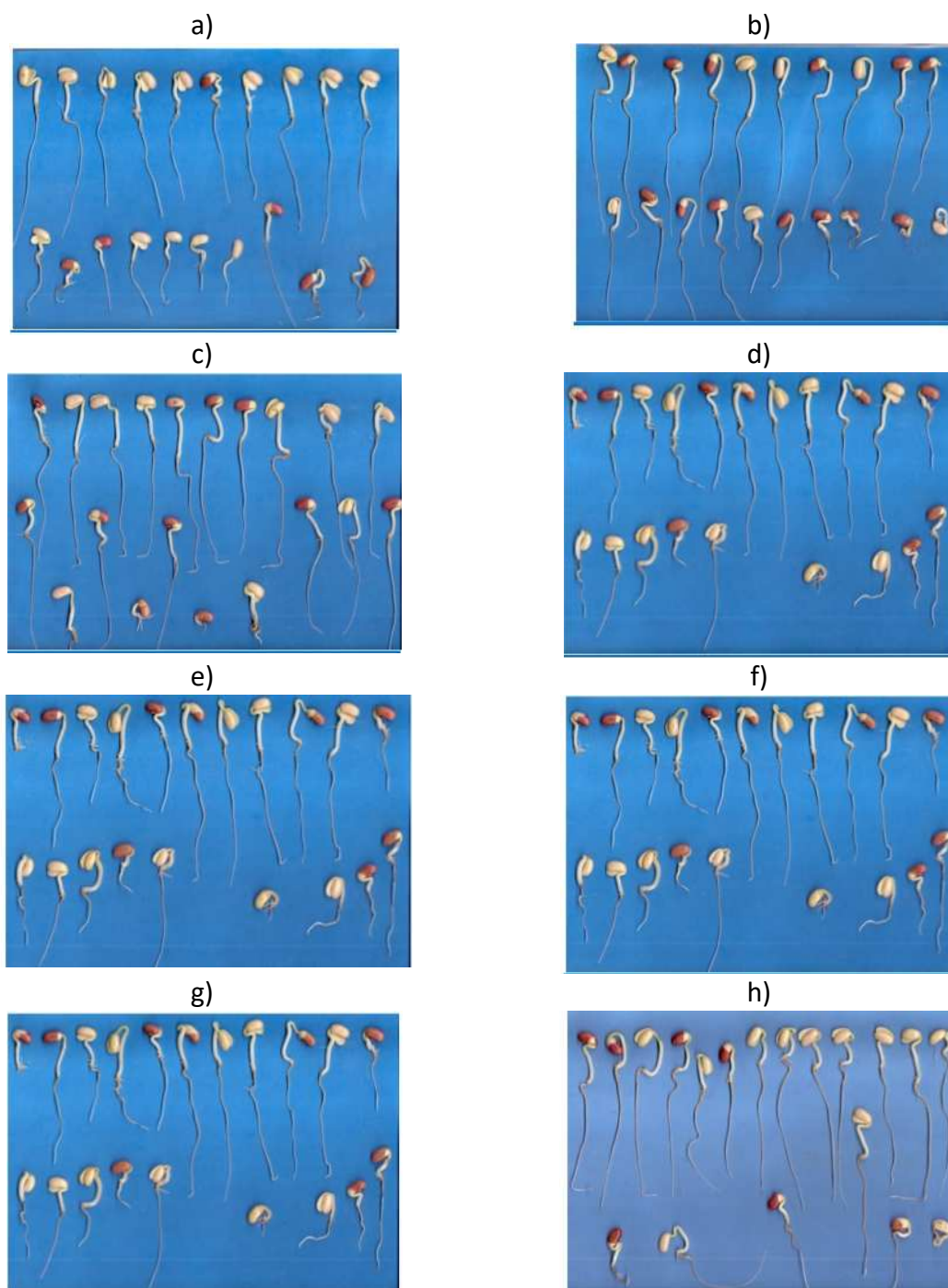


Figura 3. Imagens de plântulas de feijão oriundas de sementes submetidas ao processo de ozonização. a) sementes não envelhecidas e não ozonizadas (L0hT0); b) sementes não envelhecidas e ozonizadas por 30 min (L0hT30); c) sementes não envelhecidas e ozonizadas por 60 min (L0hT60) d) sementes não envelhecidas e ozonizadas por 90 min (L0hT90); e) sementes envelhecidas por 48 h, sem exposição ao ozônio (L48hT0) f) sementes envelhecidas por 48 h e ozonizadas por 30 min (L48hT30) g) sementes envelhecidas por 48 h e ozonizadas por 60 min (L48hT60) h) sementes envelhecidas por 48 h e ozonizadas por 90 min (L48hT90). Concentração de entrada do ozônio de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

No que tange aos L60h e L72h, de forma análoga ao L48h, houve incremento da germinação, quando adotado tempo de ozonização de 30 min, na concentração de entrada de 10 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 1). Nessa condição, obtiveram-se percentuais de germinação equivalentes a 1,20 vezes (L60h) e 1,43 vezes (L72h), nos Lotes 60h e 72h, respectivamente, em comparação com as sementes não ozonizadas. Destaca-se que, apesar do incremento na germinação, os valores médios permaneceram inferiores a 80%. Quanto à condutividade elétrica, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) no L60h em decorrência dos diferentes tempos de ozonização.

Por outro lado, o ozônio ocasionou redução da condutividade elétrica nas sementes do L72h, obtendo-se menor valor ( $34,7 \pm 5,4 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ ), no tempo de exposição de 30 min. Com relação ao comprimento de plântula no L60h, destaca-se o valor obtido quando se adotou o tempo de exposição de 30 min ( $5,3 \pm 0,6$  cm). Todavia, no L72h, o menor valor de comprimento de plântula ( $2,5 \pm 0,1$  cm) foi observado no tempo de ozonização de 30 min. Salienta-se que apesar da aplicação do ozônio, por 30 min, ter ocasionado aumento da germinação no L72h, o valor médio de comprimento de plântula foi inferior aos obtidos nos demais tempos de exposição. Analogamente, observou-se menor índice de vigor nas sementes do L72h ozonizadas por 30 min.

### 3.1.2 Atividade enzimática nas sementes de feijão ozonizadas

No que se refere à atividade enzimática nas sementes de feijão, obteve-se variação significativa devido a interação entre níveis de qualidade fisiológica (L) e tempos de ozonização (TO) para catalase (CAT,  $\text{FL} \times \text{TO}_{9,48} = 2,51$ ;  $P = 0,019$ ) e peroxidase ( $\text{FL} \times \text{TO}_{9,48} = 5,88$ ;  $P < 0,0001$ ). Entretanto, não houve efeito significativo para a superóxido dismutase, quando se consideraram a interação entre níveis de qualidade fisiológica e tempos de ozonização (SOD,  $\text{FL} \times \text{TO}_{9,48} = 1,07$ ;  $P = 0,4030$ ), assim como para L ( $\text{FL}_{3,48} = 2,80$ ;  $P = 0,0560$ ) e TO ( $\text{FL}_{3,48} = 1,09$ ;  $P = 0,3620$ ), isoladamente.

No que se refere à catalase (Tabela 2), enquanto no L0h e no L60h não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ), quando se comparou os valores obtidos para os diferentes tempos de ozonização, no L48h destacou-se o incremento obtido para o tempo de exposição de 30 min. Nessa condição, o valor obtido foi de 1,97 vezes aquele obtido nas sementes não ozonizadas. Em contrapartida, no L72h, a menor

atividade da enzima catalase foi verificada nas sementes ozonizadas por 30 min, sendo equivalente a 0,23 vezes o valor obtido nas sementes não ozonizadas. A tendência observada para a atividade das peroxidases no L48h foi similar ao da catalase, em que o maior valor foi obtido para o tempo de exposição de 30 min, sendo equivalente a 1,56 vezes ao das sementes não ozonizadas (Tabela 2). Quanto ao L0h, destaca-se que houve redução da atividade das peroxidases quando se adotou tempo de exposição de 90 min. No L72h, a maior atividade das peroxidases foi obtida para tempo de exposição de 60 min ( $1,33 \pm 0,44 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína). Com relação à superóxido dismutase, os teores médios permaneceram entre 0,24 e  $0,37 \text{ U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

Tabela 2. Atividade das enzimas catalase (CAT); e peroxidases (POX) em sementes de feijão ozonizadas na concentração de entrada de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , por até 90 min

Tempo de exposição ao ozônio (min)	Tempo de envelhecimento (horas)			
	0 (L0h)	48 (L48h)	60 (L60h)	72 (L72h)
<b>CAT (<math>\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}</math> de proteína)</b>				
0 (T0)	$398,40 \pm 119,7 \text{ aA}$	$303,70 \pm 140,7 \text{ aB}$	$402,60 \pm 65,8 \text{ aA}$	$369,80 \pm 100,4 \text{ aA}$
30 (T30)	$361,10 \pm 83,5 \text{ aA}$	$597,70 \pm 128,4 \text{ aA}$	$390,20 \pm 217,7 \text{ aA}$	$86,30 \pm 50,3 \text{ bB}$
60 (T60)	$409,24 \pm 92,8 \text{ aA}$	$505,24 \pm 148,3 \text{ aAB}$	$398,29 \pm 106,3 \text{ abA}$	$180,58 \pm 70,0 \text{ bAB}$
90 (T90)	$482,60 \pm 94,4 \text{ aA}$	$408,80 \pm 236,1 \text{ abAB}$	$342,60 \pm 185,0 \text{ abA}$	$202,10 \pm 116,8 \text{ bAB}$
<b>POX (<math>\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}</math> de proteína)</b>				
0 (T0)	$2,80 \pm 0,62 \text{ aA}$	$1,80 \pm 0,15 \text{ bA}$	$1,02 \pm 1,20 \text{ cA}$	$0,43 \pm 0,20 \text{ cA}$
30 (T30)	$2,85 \pm 1,00 \text{ aA}$	$2,80 \pm 0,30 \text{ aB}$	$0,87 \pm 0,30 \text{ bA}$	$0,40 \pm 0,13 \text{ bA}$
60 (T60)	$2,12 \pm 0,90 \text{ aAB}$	$1,20 \pm 0,35 \text{ bA}$	$0,45 \pm 0,20 \text{ cA}$	$1,33 \pm 0,44 \text{ bB}$
90 (T90)	$1,70 \pm 0,21 \text{ aB}$	$1,20 \pm 0,25 \text{ abA}$	$0,64 \pm 0,18 \text{ bA}$	$0,52 \pm 0,11 \text{ bA}$

As médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. L- lote envelhecido artificialmente por 0, 48, 60 e 72 horas; T- tempo de exposição ao ozônio 0, 30, 60 e 90 min

### 3.2 Análise multivariada

Na análise multivariada foram consideradas somente as variáveis cujo os efeitos da interação entre níveis de qualidade fisiológica e tempos de exposição ao ozônio ou dos fatores isoladamente foram significativos, de acordo com a análise de variância a 5% de probabilidade. Dessa forma, as variáveis consideradas foram germinação (GER), condutividade elétrica (CE), índice de vigor (IV), índice de uniformidade (IU), comprimento de plântulas (CP) e a atividade das enzimas catalase

(CAT) e peroxidase (POX). De acordo com a Análise de Componentes Principais, verificou-se que a soma das componentes principais PC1 e PC2 foi igual a 82,2% (Figura 4).

É possível observar a direção dos vetores na Figura 4a, tendo-se a ordenação no espaço de cada uma das variáveis consideradas. As variáveis CAT, POX, CP, IU e IV estão localizadas no primeiro quadrante, CE no segundo quadrante e GER no quarto quadrante. Na Tabela 3, verifica-se que as variáveis GER, CP, POX, IU e IV foram as que mais contribuíram positivamente para a componente principal 1 (PC1), com *loadings* ou coeficientes da equação iguais a 0,92, 0,94, 0,91 e 0,97, respectivamente. Por outro lado, a variável CE contribuiu negativamente para a CP1, com coeficiente de -0,81. Com relação à componente principal 2 (PC2), a variável que mais contribuiu positivamente foi a CAT com coeficiente de 0,75 (Tabela 3).

Tabela 3 - Equações dos componentes 1 (PC 1) e 2 (PC 2) da Análise de Componentes Principais (PCA) das sementes de feijão com diferentes níveis de qualidade fisiológica, expostas ao ozônio por 0, 30, 60 e 90 minutos a vazão de 1 L min<sup>-1</sup> e concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>

Componentes	Equações
PC1	PC1 = 0,92GER - 0,81CE + 0,94IV + 0,64IU + 0,97CP + 0,57CAT + 0,91POX
PC2	PC2 = - 0,27GER + 0,43CE + 0,04IV + 0,12IU + 0,08CP + 0,75CAT - 0,03POX

GER - germinação; CE- condutividade elétrica; IV- índice de vigor; IU- índice de uniformidade; CP- comprimento de plântulas; CAT- catalase; POX- peroxidase.

A partir da análise da projeção das componentes principais CP1 e CP2 (Figura 5b), destaca-se que as sementes do lote não submetido ao envelhecimento artificial (L0hT0, L0hT30, L0hT60 e L0hT90), independentemente do tempo de ozonização, estão localizadas no quarto quadrante, ou seja, apresentaram maiores valores de germinação. Por outro lado, o L48hT30 (sementes submetidas ao envelhecimento artificial por 48 h e ozonizadas por 30 min) está localizado no primeiro quadrante, próximo ao vetor da enzima catalase e relativamente distante dos demais tratamentos. Os tratamentos localizados nos quadrantes 1 e 4 são os que maior qualidade fisiológica apresentaram.

Os tratamentos referentes às sementes do L60h (L60hT0, L60hT30, L60hT60 e L60hT90), independentemente do tempo de ozonização, estão localizados no segundo quadrante, assim como o tratamento L72hT0 (submetidas ao

envelhecimento acelerado por 72 h e não ozonizadas). Quanto às sementes submetidas a envelhecimento por 72 e ozonizadas por 30 min (L72hT30), 60 min (L72hT60) e 90 min (L72hT90), salienta-se que estão dispostas no terceiro quadrante. Os tratamentos dispostos nos quadrantes 2 e 3 foram os que menor qualidade fisiológica apresentaram.

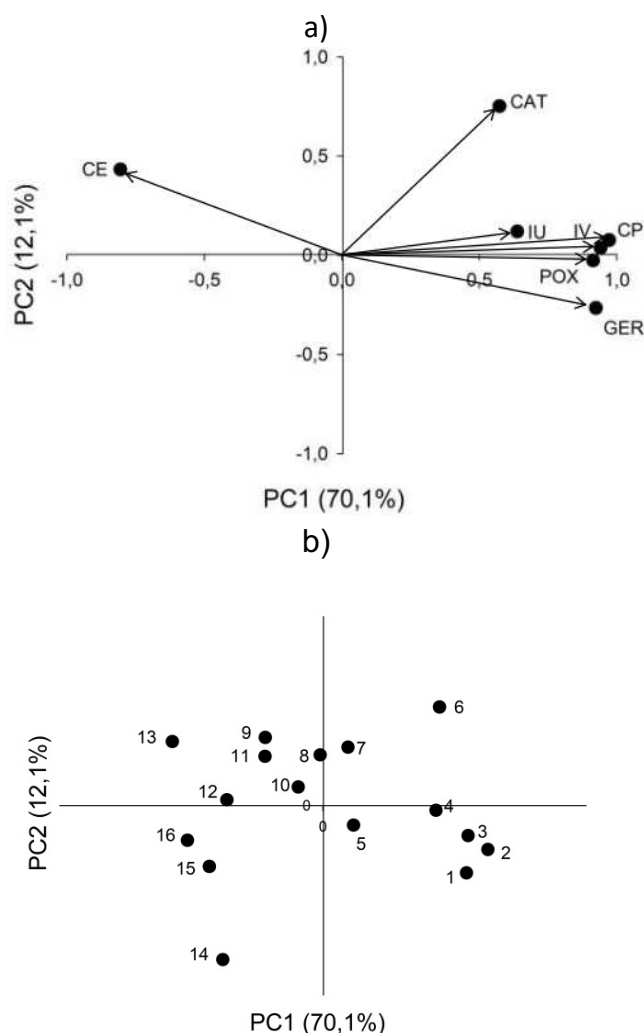


Figura 4. Biplot da análise de componentes principais (PCA). a- Análise de PCA das variáveis; b- Análise de PCA individual. 1- L0hT0; 2- L0hT30; 3- L0hT60; 4- L0hT90; 5- L48hT0; 6- L48hT30; 7-L48hT60; 8- L48hT90; 9- L60hT0; 10- L60hT30; 11- L60hT60; 12- L60hT90; 13- L72hT0; 14- L72hT30; 15- L72hT60; 16- L60hT90. CE- Condutividade elétrica; GER- % germinação; CP- comprimento de plântulas; IV- índice de vigor; IU- índice de uniformidade; POX- peroxidase; CAT- catalase. L- tempo de exposição ao envelhecimento artificial em horas; T- tempo de exposição ao gás ozônio; Concentração de entrada do ozônio de 10 mg L<sup>-1</sup>.

#### 4. DISCUSSÃO

O ozônio é um gás que se destaca pelo seu elevado potencial oxidativo e tem sido testado no tratamento de sementes (MAXIMIANO et al., 2018; MONTEIRO et al., 2021; ROSA et al., 2022). No presente estudo, avaliou-se o efeito do ozônio gasoso na qualidade fisiológica e na atividade enzimática em sementes de feijão com diferentes níveis de qualidade fisiológica.

Dentre os lotes de sementes utilizados no presente estudo, somente o L0h, (sementes não submetidas ao envelhecimento artificial) apresentava inicialmente percentual de germinação superior a 80%, limite exigido para comercialização de sementes de feijão no Brasil (BRASIL, 2013). Nesse lote, a aplicação do ozônio não ocasionou aumento significativo da germinação ( $P>0,05$ ) (Tabela 1). Por outro lado, o ozônio provocou aumento expressivo na germinação das sementes do L48h (envelhecimento artificial por 48h), quando se adotou tempo de ozonização de 30 min (concentração de entrada do gás de 10 mg/L). Nessa condição, também houve aumento significativo ( $P<0,05$ ) no comprimento das plântulas (CP) (Tabela 1). Resultados similares foram obtidos por Rosa et al. (2022), quando ozonizaram sementes de milho por 30 min, na concentração de entrada de 10 mg/L. Esses autores verificaram incrementos de aproximadamente 1,8 e 1,2 vezes na germinação e no comprimento de plântula nas sementes tratadas em relação às não ozonizadas.

Os resultados referentes ao percentual de germinação sugerem ter ocorrido reversão dos danos nas sementes. Entretanto, esse efeito do ozônio foi dependente do tempo de ozonização e da qualidade fisiológica inicial das sementes. É importante mencionar que o aumento do período de ozonização, para o L48h, não ocasionou variação significativa da germinação ( $P>0,05$ ). Dessa forma, a exposição ao ozônio por 30 min tem impacto positivo na germinação de sementes (RIFNA; RAMANAN; MAHENDRAN, 2019; MONTEIRO et al., 2021). Entretanto, esse efeito não foi expressivo nas sementes submetidas ao envelhecimento acelerado por período superior a 48 h. De acordo com Binotti et al. (2008), sementes expostas ao envelhecimento artificial por até 48h ainda apresentam capacidade de reorganizar e reparar danos nas membranas. Isso justifica os resultados de germinação obtidos nos L60h (envelhecimento artificial por 60 h) e L72h (envelhecimento artificial por 72 h). Nesses lotes, a ozonização por 30 min não ocasionou aumento da germinação, de tal forma a atingir o percentual de germinação de 80% (BRASIL, 2013).

No que se refere à condutividade elétrica (CE), verificou-se aumento nos valores médios à medida que se elevou o tempo de envelhecimento acelerado. Todavia, o ozônio somente ocasionou redução nos valores médios de condutividade elétrica nas sementes do L72h. Salienta-se que maiores valores de condutividade elétrica indicam maior quantidade de aminoácidos, de açúcares, de íons de potássio e de fósforo no exsudato (BINOTTI et al., 2008). É importante mencionar que o vetor da condutividade elétrica, na variável multivariada (Figura 4a), está localizado no terceiro quadrante, oposto aos das variáveis germinação, comprimento de plântula (CP) e índices de vigor (IV) e de uniformidade (IU). Resultado similar foi obtido por Monteiro et al. (2021), que utilizaram água ozonizada para tratar sementes de milho.

Com relação ao índice de vigor (IV) (Tabela 1), os resultados indicaram que as sementes não submetidas ao envelhecimento artificial (Lote 0h), expostas ou não ao ozônio, podem ser classificadas como de vigor excepcional ou de alto vigor, considerando-se a escala de classificação proposta pela *The Ohio State University, USA*, para o software SVIS®. De acordo com essa escala, sementes com índices entre 800 e 1000 são de vigor excepcional, de 600 a 799 são de alto vigor, de 400 a 599 são de bom vigor e de 200 a 399 são de baixo vigor (Marcos-Filho et al., 2009). As sementes do L48h permaneceram como de alto vigor, exceto quando adotado tempo de exposição de 90 min, em que as sementes podem ser classificadas como de bom vigor. Quanto ao L60h as sementes não ozonizadas foram de baixo vigor, enquanto as ozonizadas por 30 min, 60 min e 90 min foram classificadas como de bom vigor. Finalmente, as sementes do L72h, independentemente do tempo de ozonização, permaneceram com baixo vigor.

O fato de o ozônio não ter afetado os níveis da enzima catalase no L0h, independentemente do tempo de exposição ao ozônio (Tabela 2), sugere que na ausência de estresse oxidativo lotes de elevada qualidade fisiológica apresentam um equilíbrio entre a atividade da enzima e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (DEL LONGO et al., 1993; GUO et al., 2006; DE ARAÚJO et al., 2021). Dessa forma, a ozonização, nas condições adotadas no presente estudo, não ocasionou aumento dos níveis de catalase nas sementes de feijão de elevada qualidade fisiológica. No L48h o estresse oxidativo causado pelo envelhecimento artificial, resultou provavelmente no desbalanço entre a atividade da CAT e a eliminação das EROs.

Nesse contexto, o aumento mais expressivo do nível de catalase foi observado nas sementes do L48h e ozonizadas por 30 min. Destaca-se que nessa condição foi verificado expressivo aumento na germinação e no comprimento de plântulas (Tabela 1). Além disso, o vetor da catalase (Figura 4a) e as sementes do L48h e ozonizadas por 30 min (6- L48hT30) (Figura 4b) estão localizadas no primeiro quadrante. Então, sugere-se que o ozônio ocasionou aumento na atividade da catalase e, conseqüentemente, redução nas EROs. O incremento na atividade da catalase pode ter resultado na redução eficiente e eficaz de  $H_2O_2$ , transformando-o em  $H_2O$  (GUO et al., 2006; MEHLA et al., 2017; JESUS et al., 2020b; HASANUZZAMAN et al., 2020). Em tempos de envelhecimento superiores a 48 h, o ozônio não foi capaz de provocar incremento na atividade da catalase. Possivelmente, nessas condições de envelhecimento artificial ocorreram danos irreversíveis nas membranas das células e nas proteínas, resultando em modificações nos aminoácidos, quebra de cadeia peptídica, aumento da degradação proteolítica e inativação enzimática (MEHLA et al., 2017; JESUS et al., 2020a; JESUS et al., 2020b).

No L0h, a exposição ao ozônio não afetou significativamente a atividade das enzimas peroxidases (POX), à exceção da exposição por 90 min (Tabela 2). À semelhança da catalase, a peroxidase é responsável pela eliminação de  $H_2O_2$ . A peroxidase é sinalizadora de estresse oxidativo e, portanto, inicialmente há aumento dos níveis dessa enzima. Com a intensificação do estresse, os níveis da peroxidase decrescem e ocorre incremento na catalase (MEHLA et al., 2017; JESUS et al., 2020c). No L48h, pode-se verificar que a exposição ao ozônio por 30 min ocasionou aumento da atividade das peroxidases, assim como da catalase, implicando em, provavelmente, na redução dos níveis de  $H_2O_2$  (NAKANO; ASADA, 1981).

No presente estudo, foi possível observar que o ozônio é capaz de induzir alterações positivas nas sementes de feijão, submetidas a envelhecimento artificial por até 48 h, quando adotada concentração de entrada de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  e tempo de exposição de 30 min. Nessa condição, verificou-se incremento da germinação e do comprimento de plântulas. Foi possível associar essas alterações na qualidade fisiológica à atividade enzimática nas sementes, uma vez que houve aumento dos níveis de catalase e de peroxidase. Trabalhos posteriores são necessários no intuito de determinar se essas alterações na qualidade fisiológica de sementes de feijão verificadas em laboratório são expressas também em campo. Além disso, é importante determinar o efeito de concentrações mais elevadas na qualidade das

sementes de feijão e adotar outras técnicas para elucidar o mecanismo de ação do ozônio, como espectroscopia no infravermelho próximo (NIR).

## 5. CONCLUSÕES

Nas condições do estudo, foi possível concluir que:

- A ozonização (10 mg L<sup>-1</sup> por 30 min) de sementes de feijão, envelhecidas por 48 h é capaz de ocasionar efeitos positivos, tais como aumento do percentual germinação, do comprimento de plântulas e da atividade das enzimas catalase e peroxidase.
- O ozônio não é capaz de induzir recuperação da qualidade fisiológica de sementes submetidas a envelhecimento artificial por período superior a 48 h.
- De modo geral, a exposição de sementes de feijão ao ozônio por tempo superior a 30 minutos, na concentração de entrada do gás de 10 mg L<sup>-1</sup>, não implica em efeitos positivos na qualidade fisiológica e atividade enzimática.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, N. O. et al. Balance between oxidative stress and the antioxidant system is associated with the level of cold tolerance in sweet potato roots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 172, p. 111359, 2021.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.
- BINOTTI, F. F. S. et al. Efeito do período de envelhecimento acelerado no teste de condutividade elétrica e na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, p. 247-254, 2008.
- BORÉM, A.; CARNEIRO J. E. A Cultura. In: Feijão do plantio à colheita ed. Carneiro, J. E.; Paula, T. J. Editora UFV, Viçosa - MG, pp 9-15 (2015).
- Bradford, M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 72, p 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 395 p, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa no 45**, de 17 de setembro de 2013. Diário Oficial da União, 2013.
- CASTAN, D. O. C.; GOMES-JUNIOR, F. G.; MARCOS-FILHO, J. Vigor-S, a new system for evaluating the physiological potential of maize seeds. **Scientia Agrícola**, v. 75, p. 167-172, 2018.
- DEL LONGO, Olga T. et al. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and cell physiology**, v. 34, n. 7, p. 1023-1028, 1993.
- DELARMELINO-FERRARESI, L. M.; VILLELA, F. A.; AUMONDE, T. Z. Desempenho fisiológico e composição química de sementes de soja. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 1, p. 14-18, 2014.
- GOMES J. F. G.; CHAMMA, H. M. C. P.; CICERO, S. M. Automated image analysis of seedlings for vigor evaluation of common bean seeds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 36, p. 195-200, 2014.
- GUO, Z. et al. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 11-12, p. 828-836, 2006.

HASANUZZAMAN, M. et al. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 681, 2020.

HEBERLE, E. et al. Qualidade fisiológica e atividade enzimática de sementes de milho durante o armazenamento. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 3, p. 657-665, 2019.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). **Handbook of vigour test methods**. 3° ed. Zürich: ISTA, 117p, 1995.

JESUS, C. D. B. et al., Envelhecimento de sementes: natural e artificial. In: FERNANDEZ; JESUS; SANTOS. **Ricinus communis L.: sementes, envelhecimento e estresse oxidativo**. Salvador: UFBA, p 39-45, 2021a.

JESUS, C. D. B. et al., Enzimas Antioxidantes. In: FERNANDEZ; JESUS; SANTOS. **Ricinus communis L.: sementes, envelhecimento e estresse oxidativo**. Salvador: UFBA, p 65-74, 2021c.

JESUS, C. D. B. et al., Estresse oxidativo e mecanismo de desintoxicação. In: FERNANDEZ; JESUS; SANTOS. **Ricinus communis L.: sementes, envelhecimento e estresse oxidativo**. Salvador: UFBA, p47-54, 2021b.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant physiology**, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.

Krzyzanowski, F.C; Vieira, R.D; França-Neto, J.B and Marcos-Filho, J. (2020). **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes [Seed Vigour: Concepts and Tests]**, 2nd Edition, ABRATES, Londrina, Brazil.

LAPOLLI, F. R. et al. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. Desinfecção de efluentes Sanitários. Tradução. Rio de Janeiro: ABES, 2003. . . Acesso em: 08 mar. 2023.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, p 1-2, 1999.

MAXIMIANO, C. V. et al. Physiological and sanitary quality of maize seeds preconditioned in ozonated water. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 22, p 360-365, 2018.

MEDEIROS, A. D.; PEREIRA, M. D. SAPL®: a free software for determining the physiological potential in soybean seeds. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 48, p 222–228, 2018.

MEHLA, N. et al. An introduction to antioxidants and their roles in plant stress tolerance. **Reactive oxygen species and antioxidant systems in plants: role and regulation under abiotic stress**, p. 1-23, 2017.

MEIRELLES, F. C. et al. Upland rice intercropped with green manures and its impact on the succession with common bean. **The Journal of Agricultural Science**, v. 159, n. 9-10, p. 658-667, 2021.

MONTEIRO, N. O. C. et al. Ozonized water in the preconditioning of corn seeds: physiological quality and field performance. **Ozone: Science & Engineering**, v. 43, n. 5, p. 436-450, 2021.

NAKADA, P. G. et al. Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de pepino nos diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 1, p. 113-122, 2011.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and cell physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

R CORE TEAM., 2020. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 01 de jan. 2022.

REGO, C. H. Q. et al. Assessing the vigor of cowpea seeds using the Vigor-S software. **Journal of Seed Science**, v. 43, 2021.

RIFNA, E. J.; RAMANAN, K. R.; MAHENDRAN, R. Emerging technology applications for improving seed germination. **Trends in Food Science & Technology**, v. 86, p. 95-108, 2019.

RODRIGUES, M.; GOMES-JUNIOR, F. G.; MARCOS-FILHO, J. Vigor-S: system for automated analysis of soybean seed vigor. **Journal of Seed Science**, v. 42, 2020.

ROSA, C. C. et al. Physiological Quality of Corn Seeds Treated with Gaseous Ozone. **Ozone: Science & Engineering**, v. 44, n. 1, p. 117-126, 2022.

SAKO, Y. et al. A system for automated seed vigor assessment. **Seed Science and Technology**, v. 29, p. 625-636, 2001.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 104-114, 2005.

SILVA, L. J.; MEDEIROS, A. D.; OLIVEIRA, A. M. S. Seedcalc, a new automated R software tool for germination and seedling length data processing. **Journal of Seed Science**, v. 41, p. 250-257, 2019.

TOLEDO, M. Z. et al. Efeitos do ambiente de armazenamento na qualidade de sementes de sorgo-sudão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 44-52, 2007.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 164p, 1994.

VIOLLEAU, Frederic et al. Effect of oxidative treatment on corn seed germination kinetics. **Ozone: Science and Engineering**, v. 30, n. 6, p. 418-422, 2008.

ZUCARELI, C. et al. Qualidade fisiológica de sementes de feijão carioca armazenadas em diferentes ambientes. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, v. 19, p. 803-809, 2015.

## **Capítulo 2: Qualidade fisiológica, desempenho em campo e espectroscopia no infravermelho próximo (FT-NIR) em sementes de feijão ozonizadas**

Resumo: O presente trabalho objetivou avaliar a qualidade fisiológica, o desempenho em campo e detectar possíveis alterações bioquímicas por espectroscopia no infravermelho próximo em sementes de feijão ozonizadas. Foram utilizados dois lotes de sementes de feijão: i) lote de sementes não submetidas ao envelhecimento artificial (L0h) e ii) lote de sementes submetidas ao envelhecimento artificial por 48h (L48h). Cada um dos lotes de sementes foi exposto ao gás ozônio nas concentrações de entrada de 0 (C0), 10 mg L<sup>-1</sup> (C10) e 20 mg L<sup>-1</sup> (C20), por 30 min. Foi avaliada a qualidade fisiológica das sementes (germinação, condutividade elétrica e crescimento de plântulas) e desempenho em campo (altura de plantas (cm), diâmetro do caule (mm), número de plantas e de vagens e a produtividade). Avaliou-se ainda alterações nas sementes expostas ou não ao ozônio por meio de espectroscopia no infravermelho próximo. Adotou-se Delineamento Inteiramente Casualizado e o Delineamento em Blocos ao Acaso nos experimentos de laboratório e campo, respectivamente. Foi realizada Análise de Variância e posteriormente teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Análise Univariada). Posteriormente, realizou-se Análise Multivariada, utilizando-se Análise de Componentes Principais (PCA). Os espectros obtidos por meio do FT-NIR foram submetidos ao pré-processamento pelo método de Savitzky-Golay (SG), sendo em seguida utilizados para a obtenção de um modelo utilizando-se a PLS-DA (análise discriminante de mínimos quadrados parciais). O ozônio não teve efeitos significativos nas sementes do lote não envelhecido, quando se avaliou o desempenho das sementes em laboratório e em campo. Contudo, foi observado aumento no potencial fisiológico das sementes envelhecidas em função da aplicação do ozônio, com aumento nos valores de germinação e nos índices de crescimento das plântulas e redução nos valores de condutividade elétrica. O efeito positivo do ozônio em sementes envelhecidas por 48 h foi comprovado também quando se avaliou o desempenho em campo, sendo obtido maior produtividade nas sementes ozonizadas com a concentração de 20 mg L<sup>-1</sup>. Analisando-se os espectros de FT-NIR foi possível separar as sementes ozonizadas das não ozonizadas, independente do envelhecimento ou não das sementes, o que indica a ocorrência de alterações bioquímicas provocadas pelo tratamento. Elevando-se a concentração de ozônio de 10 para 20 mg L<sup>-1</sup> foi possível potencializar os efeitos do gás.

Palavras-chave: IVE. PCA. Vigor-S. PLS-DA.

**ABSTRACT:** This study aimed to evaluate the physiological quality, field performance and detect possible biochemical alterations by near infrared spectroscopy in ozonized bean seeds. Two bean seed lots were used: i) seed lot not submitted to artificial aging (L0h) and ii) seed lot submitted to artificial aging for 48h (L48h). Each of the seed lots was exposed to ozone gas at the input concentrations of 0 (C0), 10 mg L<sup>-1</sup> (C10) and 20 mg L<sup>-1</sup> (C20), for 30 min. Seed physiological quality (germination, electrical conductivity and seedling growth) and field performance (plant height (cm), stem diameter (mm), number of plants and pods and productivity) were evaluated. Changes in seeds exposed or not to ozone were also evaluated by means of near infrared spectroscopy. A Completely Random Design and a Random Block Design were adopted in the laboratory and field experiments, respectively. Analysis of Variance was performed and later Tukey's test, at 5% probability (Univariate Analysis). Subsequently, Multivariate Analysis was performed using Principal Component Analysis (PCA). The spectra obtained through FT-NIR were submitted to pre-processing by the Savitzky-Golay (SG) method, and then used to obtain a model using PLS-DA (partial least squares discriminant analysis) . Ozone had no significant effects on seeds from the non-aged batch, when seed performance was evaluated in the laboratory and in the field. However, an increase in the physiological potential of aged seeds due to the application of ozone was observed, with an increase in germination values and seedling growth rates and a reduction in electrical conductivity values. The positive effect of ozone on seeds aged for 48 h was also proven when evaluating field performance, with higher productivity being obtained in ozonized seeds with a concentration of 20 mg L<sup>-1</sup>. Analyzing the FT-NIR spectra, it was possible to separate the ozonized seeds from the non-ozonized ones, regardless of whether or not the seeds had aged, which indicates the occurrence of biochemical alterations caused by the treatment. By increasing the ozone concentration from 10 to 20 mg L<sup>-1</sup> it was possible to potentiate the effects of the gas.

**Keywords:** ESI. PCA. VigorS. PLS-DA.

## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população previsto para 2050 impõe a necessidade de aumento na produção de alimentos, em especial no que se refere às culturas agrícolas. Neste contexto, as sementes se destacam como um dos fatores de produção preponderante neste processo (SMITH e RAO, 2021). É fundamental o uso de sementes de boa qualidade fisiológica, genética, sanitária e física e sua interação com outros fatores de produção, tais como adubação, irrigação (BINOTTI et al., 2008; MARCOS -FILHO, 2015; ZUCARELI et al., 2015). Esse conjunto de fatores possibilita o incremento da produção e produtividade e, conseqüente, garantia da segurança alimentar (ZUCARELI et al., 2015). Sob condições ótimas, tem-se maior porcentagem de emergência, plantas com desenvolvimento uniforme, maior tolerância a pragas, doenças e plantas daninhas, associados ao aumento nos índices de produtividade e produto de ótima qualidade (BINOTTI et al., 2008; ZUCARELI et al., 2015).

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) se destaca por ser a leguminosa mais importante no consumo humano, em especial para pequenos agricultores em regiões tropicais (SMITH e RAO, 2021). É importante mencionar que o feijão é considerado uma fonte crítica de proteínas na dieta, além de fonte boa fonte de carboidratos, minerais e vitaminas (YEKEN, ET AL., 2018; SMITH e RAO, 2021). Nesse contexto, tem-se que o feijão é um alimento essencial aos brasileiros, sendo fundamental a sua disponibilidade à população, devido a sua fácil inserção à dieta (LOVATO et al., 2018). O Brasil é o maior produtor mundial do feijão (BORÉM; CARNEIRO, 2015), com produtividade de aproximadamente 1,0 t ha<sup>-1</sup>, com potencial para atingir até 3 t ha<sup>-1</sup> (BORÉM; CARNEIRO, 2015; CONAB, 2022), sendo a germinação e o vigor das sementes fatores determinantes. Salienta-se que no Brasil foi estabelecido o percentual mínimo de 80% de germinação para semente comercial de feijão (BRASIL, 2013).

Entretanto, perdas relacionadas à qualidade fisiológica das sementes podem ocorrer em campo e durante o armazenamento, associadas ao desenvolvimento de patógenos e perda de integridade das membranas celulares (BINOTTI et al., 2008; ZUCARELI et al., 2015). Dessa forma, é importante que sejam estudados métodos de tratamentos, que sejam eficientes auxiliar no reparo desses possíveis danos. Binotti et al. (2008) analisaram a qualidade fisiológica de sementes de feijão submetidas a diferentes tempos de envelhecimento artificial e indicaram que sob envelhecimento

artificial 48 h as sementes ainda apresentavam capacidade de reorganizar e reparar danos nas membranas.

Nesse contexto, a ozonização tem sido proposta como método de sanitização e estimulante ao desenvolvimento inicial de plântulas. O ozônio é um gás que se destaca pelo seu elevado potencial oxidativo (2,07 mV) e tem sido testado para outras finalidades, além do tratamento de sementes, tais como controle de insetos (HARDIN et al., 2009; GAD et al., 2021; SILVA et al., 2022) e de microrganismos (DA COSTA et al., 2021; FERREIRA et al., 2021). No que se refere às sementes, as pesquisas já realizadas indicaram efeitos positivos em milho, como incremento da germinação e redução da condutividade elétrica (MAXIMIANO et al., 2018; MONTEIRO et al., 2021; ROSA et al., 2022). Entretanto, é necessário que seja determinada uma combinação adequada de concentração de entrada do gás e tempo de exposição para cada cultura. As pesquisas já realizadas objetivaram avaliar o efeito do ozônio em sementes de milho (VIOLLEAU et al., 2008; MAXIMIANO et al., 2018; MONTEIRO et al., 2021; ROSA et al., 2022), de trigo (LAZUKIN et al., 2018) e quinoa (ALENCAR et al., 2021). Ressalta-se que ainda não há na literatura relatos sobre o efeito do ozônio gasoso em feijão comum, no intuito de verificar o efeito do tratamento na qualidade das sementes.

É importante destacar que, em geral, as pesquisas já realizadas objetivaram avaliar o efeito do ozônio na qualidade fisiológica das sementes, considerando-se variáveis como germinação, condutividade elétrica, comprimento de plântula, dentre outras (VIOLLEAU et al., 2008; MAXIMIANO et al., 2018; ROSA et al., 2022). No entanto, o mecanismo pelo qual o ozônio atua nas sementes ainda permanece por ser elucidado.

Dessa forma, é importante a complementação dos resultados desses métodos que permitam identificar possíveis alterações nas sementes (FENG et al., 2019; WANG et al., 2020). A análise de sementes por espectroscopia do infravermelho próximo (FT-NIR) vem sendo citada como uma ferramenta inovadora e eficaz na predição da qualidade fisiológica de sementes (PLANS, M. et al., 2012; FARHADI; TIGABU; ODÉN, 2015; XAVIER et al., 2019; ANDRIAZZI; ROCHA; CUSTÓDIO, 2023). O FT-NIR se destaca pelo fato de ser um método não destrutivo, exato, rápido e exploratório, na medida que permite fazer associação entre alterações fisiológicas e alterações na dinâmica de grupos funcionais das sementes (FARHADI; TIGABU; ODÉN, 2015; PASQUIM, 2018). Assim, por meio da análise por FT-NIR, espera-se

que seja possível verificar a ocorrência de alterações na dinâmica dos grupos funcionais de sementes, como consequência do uso do ozônio.

Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a qualidade fisiológica, o desempenho em campo e detectar possíveis alterações bioquímicas por espectroscopia no infravermelho próximo em sementes de feijão ozonizadas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos experimentos em laboratório e em campo, no período de maio a novembro de 2022. O Experimento em laboratório foi realizado no Laboratório de Pós-colheita da Área de Armazenamento de Produtos Agrícolas, do Departamento de Engenharia Agrícola e no Laboratório de Pesquisa de Sementes do Departamento de Agronomia, ambos pertencentes à Universidade Federal de Viçosa, UFV. O Experimento em campo foi conduzido na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão Professor Diogo Alves de Mello, pertencente ao Departamento de Agronomia da UFV. Foram utilizadas sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar “BRSMG Marte”, com 12,5 % de teor de água.

### 2.1 Obtenção dos lotes de sementes de feijão e tratamento com ozônio

Foram utilizados dois lotes de sementes de feijão: i) lote de sementes não submetidas ao envelhecimento artificial; e ii) lote de sementes submetidas ao envelhecimento artificial. No processo de envelhecimento artificial, as sementes foram distribuídas sobre uma tela de aço inoxidável na metade superior de uma caixa plástica com dimensões: de 11 x 11 x 3,5 cm, contendo 40 mL de água e mantidas na BOD a 42 °C por 48 h.

Adotaram-se três concentrações de entrada do ozônio, sendo 0 mg L<sup>-1</sup> (sem exposição ao ozônio - controle), 10 mg L<sup>-1</sup> e 20 mg L<sup>-1</sup>. Adotou-se 20 mg L<sup>-1</sup>, no intuito de verificar o efeito de maior concentração de entrada do gás na qualidade das sementes. O gás foi obtido e o gerador calibrado e as concentrações determinadas conforme descrito em 2.1.2 do capítulo 1.

Cada um dos lotes de sementes foi exposto ao gás ozônio na concentração de 0, 10 mg L<sup>-1</sup> e 20 mg L<sup>-1</sup>, por 30 min. O tempo de 30 minutos foi definido com base em experimentos prévios. No total foram seis combinações entre lotes de sementes e concentração de entrada do ozônio, com quatro repetições. O gás ozônio foi distribuído uniformemente dentro de um cilindro feito de PVC, dimensionado com 0,17 m de altura e 0,20 m de diâmetro (Figura 1 do capítulo 1). E, em cada um dos 4 sacos de organza (10 x 20 cm) foram colocadas 200 g de sementes. Atingido o tempo de exposição de 30 min, as amostras foram retiradas do cilindro.

## 2.2 Qualidade fisiológica das sementes de feijão ozonizadas

A qualidade fisiológica das sementes de feijão foi avaliada em laboratório, considerando-se as seguintes variáveis: germinação, condutividade elétrica e análise de crescimento de plântulas.

### 2.2.1 Teste de germinação (GER)

As sementes foram colocadas sobre papel *germitest* umedecido com volume de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco e mantidas em germinador a 25 °C e fotoperíodo de 8 h. Foram utilizados quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento. A porcentagem das plântulas normais para a primeira contagem de germinação (PCG) foi determinada no 5º dia e a germinação (G) avaliada no 8º dia após a semeadura, e os resultados expressos em porcentagem conforme descrito em BRASIL (2009).

### 2.2.2 Teste de condutividade elétrica (CE)

Quatro repetições de 50 sementes foram pesadas e colocadas em recipientes contendo 75 mL de água destilada. O material foi mantido em BOD a 25 °C, por 24 horas (KRZYZANOWSKI et al., 2020). Após esse período, foi determinada a condutividade elétrica da solução, por meio de um condutivímetro modelo *DM 31 Digimed*®. Os resultados obtidos foram expressos em  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ .

### 2.2.3 Comprimento de plântulas (CP), índice de vigor (IV) e índice de uniformidade (IU)

Foram utilizadas quatro repetições de 20 sementes para cada tratamento, semeadas em papel *germitest* umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco (Figura 2a do capítulo 1). Os rolos de papel foram mantidos em germinador a 25 °C, por três dias. Após esse período, as plântulas foram escaneadas e mensurado o comprimento de raiz e da parte aérea utilizando o Software Vigor-S® (Figura 2b do capítulo 1). Os dados de comprimento foram

utilizados para o cálculo do índice de uniformidade (IU) (CASTAN et al., 2018; SAKO et al., 2001) e índice de vigor (IV) (MEDEIROS; PEREIRA, 2018).

## 2.3 Desempenho em campo de sementes de feijão expostas ao ozônio

### 2.3.1 Condições edafoclimáticas

O clima da região na qual o experimento foi realizado é classificado, segundo Köppen, como sendo do tipo Cwa, com verão mais quente e chuvoso que o inverno. Os valores para temperaturas médias diárias (máxima e mínima) e precipitação acumulada diária, durante o período de condução do experimento de campo, estão apresentados na Figura 1. O solo da região é classificado como do tipo Argissolo vermelho.

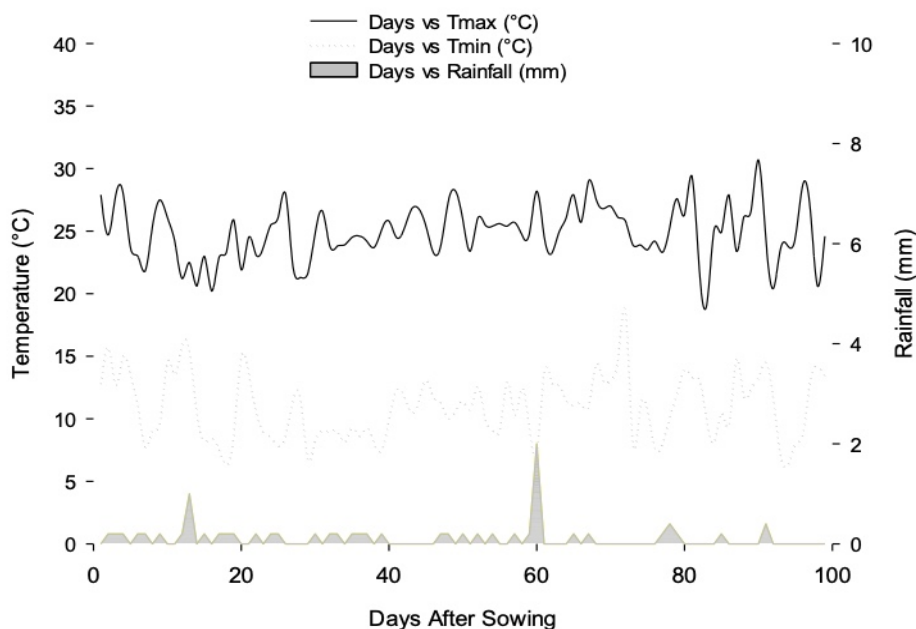


Figura 1. Temperatura máxima e mínima diária (°C) e precipitação diária acumulada (mm) durante o período de 31 maio a 06 setembro 2022 (Fonte: INMET)

### 2.3.2. Implantação do experimento em campo

A semeadura foi feita no dia 31 de maio de 2022, de forma convencional, sendo colocadas 13 sementes por metro linear. O experimento foi conduzido em DBC, com seis combinações entre lotes de sementes e concentração de entrada do ozônio e quatro repetições, perfazendo 24 parcelas. A área útil consistiu das duas linhas centrais, retirando-se as bordas (2,5 m<sup>2</sup>). A adubação de plantio foi feita com 3,5 kg de N-P-K 6-30-6, levando-se em consideração os resultados de análise de solo (Tabela 1) e as necessidades da cultura do feijão (VIEIRA et al., 2015). Após o plantio, foi feita a irrigação, prática que foi continuada com periodicidade semanal até a floração. Após este período, adotou-se intervalo de irrigação de 15 dias. O controle de plantas daninhas foi feito manualmente até a floração. A colheita foi aos 96 dias após a semeadura. As plantas foram coletadas e colocadas em ambiente natural, para os grãos secarem até 13% de teor de água.

Tabela 1. Resultados da análise química de solo.

pH	MO	P	K	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	SB	t	T	V	m	P-rem
	dag kg <sup>-1</sup>	mg dm <sup>-3</sup>		cmolc dm <sup>-3</sup>							%	mg L <sup>-1</sup>	
6,0	2,1	8,4	125	2,63	0,65	0,0	2,97	3,6	3,6	6,57	54,8	0,0	31,8

P – fósforo e K – potássio, Extrator Mehlich 1; Ca - cálcio, Mg - magnésio e Al - alumínio, Extrator KCl 1 mol/L; H + Al, Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L a pH 7,0; SB - soma de bases trocáveis; t - capacidade de troca catiônica efetiva; T - capacidade de troca catiônica a pH 7,0; V - índice de saturação por bases; m - índice de saturação por alumínio; MO - matéria orgânica; Mat. Orgânica = C.Org x 1,724 - pelo método de Walkley - Black; P-rem - fósforo remanescente.

### 2.3.3. Variáveis analisadas em campo

Em campo foram analisadas as seguintes variáveis: emergência (EMER; %), índice de velocidade de emergência (IVE), altura de plantas (APL; cm), diâmetro de caule (DCAL; cm), número de plantas (NP), número de vagens por planta (NVP) e rendimento de grãos (REND; kg ha<sup>-1</sup>). A avaliação de emergência foi feita por contagem de plantas emergidas na área útil, diariamente até a obtenção de número

constante. A partir dos dados diários de EMER, foi estimado o IVE (índice de velocidade de emergência), utilizando-se a Equação 1, proposta por Maguire (1962).

$$IVE = \left(\frac{E_1}{N_1}\right) + \left(\frac{E_2}{N_2}\right) + \dots + \left(\frac{E_n}{N_n}\right) \quad \text{[Equação 1]}$$

Onde:

$E_1$ ,  $E_2$  e  $E_n$  correspondem ao número de plântulas emergidas observadas na primeira, segunda e última contagem, respectivamente.

$N_1$ ,  $N_2$  e  $N_n$  correspondem ao número de dias decorridos da primeira, segunda e última contagem, respectivamente.

A medição da altura de plantas (cm) foi feita em 10 plantas devidamente marcadas na área útil, utilizando-se fita métrica, com medição da superfície do solo até ao ponto de inserção da primeira folha composta. O diâmetro do caule (mm) foi medido nas mesmas 10 plantas marcadas, com o auxílio do paquímetro digital. Ambas as medições foram feitas até a floração. Após a colheita das plantas na área útil, foi feita a contagem do número de plantas e vagens. A determinação do rendimento de grãos foi feita debulhando-se as vagens manualmente e pesando-se os grãos, com os resultados expressos em  $\text{kg ha}^{-1}$ .

## 2.4 Espectroscopia no infravermelho próximo (FT-NIR)

Foram utilizadas quatro amostras por tratamento e cada uma delas foi lida 6 vezes, em volume suficiente para cobrir todo o recipiente de amostras (Figura 2). A leitura dos espectros foi realizada no espectrômetro Thermo Scientific, modelo Antaris II com transformada de *Fourier*, em modo de reflectância (R). A faixa investigada foi de 1.000 nm a 2.500 nm, com incremento de  $8 \text{ cm}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em absorbância ( $\log(1/R)$ ).

Os espectros obtidos por meio do FT-NIR foram submetidos ao pré-processamento pelos seguintes métodos: centralização, SNV e pelas 1ª e 2ª derivadas de Savitzky-Golay (SG), objetivando-se a redução do ruído dos espectros coletados e aprimoramento dos modelos de classificação. Na sequência, foi feita a análise de PCA com calibração de PLS-DA (análise discriminante de mínimos quadrados parciais) no software R utilizando-se o pacote Caret (KUHNS et al., 2020).

Os modelos de classificação obtidos foram avaliados pelas métricas de acurácia e coeficiente kappa. Ainda, foram obtidas as importâncias das variáveis para o modelo selecionado como mais eficiente.



Figura 2. Análise no NIR no Espectrômetro Thermo Scientific, modelo Antaris II. Fonte: Autora (2022)

Os espectros obtidos a partir do FT-NIR foram correlacionados com os grupos funcionais, de acordo com os comprimentos de onda de maior importância para o modelo.

## 2.5 Análise estatística

No experimento em laboratório, na determinação da qualidade fisiológica das sementes de feijão, adotou-se Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). No experimento em campo, adotou-se Delineamento em Blocos ao Acaso (DBC). Em ambos os casos, utilizou-se fatorial  $2 \times 3$ , sendo dois níveis de qualidade fisiológica das sementes Lote 0h (L0h) e Lote 48h (L48h) e três concentrações de ozônio ( $0 \text{ mg L}^{-1}$  (CO0)  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (CO10) e  $20 \text{ mg L}^{-1}$  (CO20), com quatro repetições. Inicialmente foi realizada Análise de Variância e posteriormente teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Análise Univariada). Posteriormente, realizou-se Análise Multivariada, utilizando-se Análise de Componentes Principais (PCA). Na Análise Multivariada, foram consideradas somente as variáveis em que houve efeito significativo devido a interação entre níveis de qualidade fisiológica e tempos de exposição ao ozônio, ou

devido aos fatores isoladamente, na Análise Univariada. Nas análises estatísticas, utilizou-se o software StatPlus 5.0 (AnalystSoft Inc, Canada).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Análise Univariada

Verificou-se interação significativa entre níveis de qualidade fisiológica das sementes de feijão (L) e concentrações de entrada do ozônio (CO), para as variáveis germinação (GER, FLxCO<sub>2,18</sub> = 7,68;  $P = 0,004$ ), emergência (EMER, FLxCO<sub>2,15</sub> = 3,82;  $P = 0,04$ ) e índice de velocidade de emergência (IVE, FLxCO<sub>2,15</sub> = 3,79;  $P < 0,04$ ) (Tabela 2).

No que se refere à germinação, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ), quando se compararam os valores médios obtidos no Lote 0h (sementes não submetidas ao envelhecimento artificial) (Tabela 2). Por outro lado, as sementes submetidas previamente ao envelhecimento artificial (Lote 48h) apresentaram germinação superior a 85%, nas duas concentrações de entrada adotadas. Para esse lote, a germinação das sementes ozonizadas foi de  $\approx 1,2$  vezes o valor obtido nas sementes não ozonizadas. Resultados similares foram obtidos para as variáveis emergência e índice de velocidade de emergência, em que diferenças significativas entre as médias obtidas nas diferentes concentrações de ozônio foram observadas apenas nas sementes envelhecidas artificialmente (L48h). Todavia, para essas variáveis, destacou o tratamento com concentração de entrada de ozônio de 20 mg L<sup>-1</sup> (L48hCO20). Os valores médios de emergência e índice de velocidade de emergência nas sementes ozonizadas na concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> foram equivalentes a  $\approx 1,3$  vezes aqueles obtidos nas sementes não ozonizadas (Tabela 2).

Não foram verificadas interação significativa entre níveis de qualidade fisiológica das sementes de feijão (L) e concentrações de entrada do ozônio (CO), para as variáveis condutividade elétrica (CE, FLxCO<sub>2,18</sub> = 0,74;  $P = 0,501$ ), índice de vigor (IV FLxCO<sub>2,18</sub> = 0,54;  $P = 0,592$ ), índice de uniformidade (IU, FLxCO<sub>2,18</sub> = 0,24;  $P = 0,790$ ), comprimento de plântulas (CP, FLxCO<sub>2,18</sub> = 1,92;  $P = 0,18$ ), diâmetro de caule (DCAL, FLxCO<sub>2,15</sub> = 0,35;  $P = 0,71$ ), altura das plantas (APL, FLxCO<sub>2,15</sub> = 0,38;  $P = 0,69$ ), número de vagens por planta (NVPF, LxCO<sub>2,15</sub> = 1,09;  $P = 0,356$ ), número de plantas (NP, LxCO<sub>2,15</sub> = 0,18;  $P = 0,837$ ) e rendimento de grãos (REND, FLxCO<sub>2,15</sub> = 1,58;  $P = 0,234$ ). Entretanto, obteve-se diferença significativa quando se considerou o efeito da concentração de ozônio isoladamente para as variáveis (FCO<sub>2,18</sub> = 54,38;  $P < 0,001$ ), índice de vigor (FCO<sub>2,18</sub> = 5,62;  $P = 0,013$ ), índice de uniformidade (FCO<sub>2,18</sub>

= 5,74;  $P = 0,012$ ), comprimento de plântulas ( $FCO_{2,18} = 6,30$ ;  $P = 0,008$ ) e produtividade ( $FCO_{2,15} = 20,17$ ;  $P < 0,001$ ). Para essas variáveis, também houve efeito significativo quando se consideraram os níveis de qualidade fisiológica das sementes isoladamente.

Tabela 2. Germinação (GER, %) e emergência (EMER, %) e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de feijão com diferentes níveis de qualidade fisiológica e submetidas às concentrações de entrada do ozônio de 0 mg L<sup>-1</sup>, 0 mg L<sup>-1</sup> e 0 mg L<sup>-1</sup>, por 30 min

Tempo de envelhecimento (h)	Concentração de ozônio (mg L <sup>-1</sup> )		
	0	10	20
	<b>GER (%)</b>		
0 (L0h)	89,5±2,5 Aa	94,5±3,0 Aa	94,0±3,3 Aa
48 (L48h)	70,0±1,6 Bb	86,0±1,6 Ab	86,0±5,9 Ab
	<b>EMER (%)</b>		
0 (L0h)	95,8± 5,0 Aa	97,9±3,4 Aa	96,8±4,7 Aa
48 (L48h)	69,4±14,6 Bb	80,3±4,1 ABb	90,5±3,3 Aa
	<b>IVE</b>		
0 (L0h)	5,6± 0,2 Aa	6,0±0,1 Aa	5,6±0,2 Aa
48 (L48h)	4,1±0,7 Bb	4,7±0,0 ABb	5,3±0,0 Ab

As médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na Figura 3, é apresentado o efeito das diferentes concentrações de entrada do ozônio isoladamente, nas variáveis condutividade elétrica (a), índice de vigor (b), índice de uniformidade (c), comprimento de plântulas (d) e rendimento de grãos (e). No que se refere à condutividade elétrica, verificou-se diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando se compararam os valores médios, sendo o maior valor ( $33,5 \pm 6,6 \mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) obtido nas sementes não ozonizadas (0 mg L<sup>-1</sup>) e o menor valor ( $24,7 \pm 5,6 \mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) nas sementes ozonizadas na concentração de 20 0 mg L<sup>-1</sup> (L48hCO20).

Com relação às variáveis índice de vigor, índice de uniformidade, comprimento de plântulas e rendimento de grãos, somente houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ), quando se compararam os valores médios obtidos nas sementes não ozonizadas com aqueles das sementes ozonizadas a 20,0 mg L<sup>-1</sup> (Figura 3). O índice de vigor nas sementes ozonizadas foi de  $249,8 \pm 38,8$  nas sementes ozonizadas a 20 mg L<sup>-1</sup>, enquanto nas sementes não ozonizadas (0 mg L<sup>-1</sup>) foi de  $190,3 \pm 40,3$ . Verificou-se que o índice de uniformidade nas sementes ozonizadas (20 mg L<sup>-1</sup>) foi de  $542,0 \pm 76,9$ , sendo equivalente a  $\approx 1,2$  vezes o valor médio referente às sementes não ozonizadas.

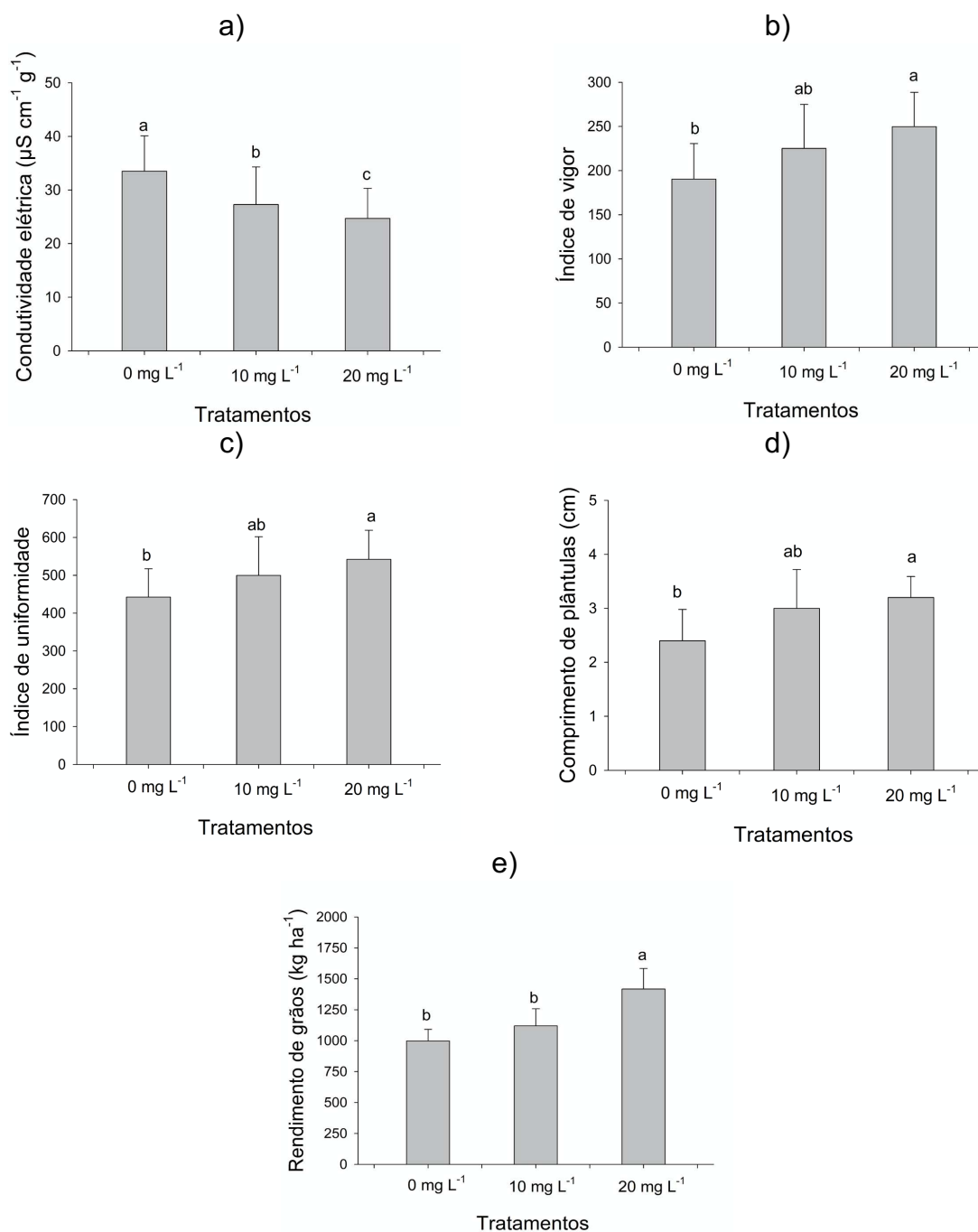


Figura 3. Condutividade elétrica (a), índice de vigor (b), índice de uniformidade (c), comprimento de plântulas(d) e e) rendimento de grãos (kg ha<sup>-1</sup>) de sementes de feijão ozonizadas nas concentrações de entrada de 0 mg L<sup>-1</sup>, 10 mg L<sup>-1</sup> e 20 mg L<sup>-1</sup>, por 30 min, independentemente da qualidade fisiológica inicial. As médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto ao comprimento de plântulas, obtiveram-se valores médios iguais a 2,4±0,6 cm e 3,2±0,4 cm, para as concentrações de ozônio de 0 mg L<sup>-1</sup> e 20 mg L<sup>-1</sup>,

respectivamente. No que se refere ao rendimento ( $\text{kg ha}^{-1}$ ), o valor médio referente às sementes ozonizadas a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  foi de  $1418,0 \pm 166,5 \text{ kg ha}^{-1}$ , equivalente a  $\approx 1,4$  vezes aquele obtido nas sementes não ozonizadas. E, com relação as variáveis diâmetro de caule, à altura das plantas, ao número de vagens por planta e ao número de plantas, obtiveram-se valores médios globais iguais a  $5,4 \pm 0,4 \text{ mm}$ ,  $7,8 \pm 0,4 \text{ cm}$ ,  $7,6 \pm 1,6$  vagens por plantas e  $236166,7 \pm 29062,7$  plantas  $\text{ha}^{-1}$ .

### 3.2 Análise multivariada

Para a análise multivariada, foram consideradas as variáveis cujos efeitos da interação entre níveis de qualidade fisiológica e concentração de ozônio ou dos fatores isoladamente foram significativos, de acordo com a análise de variância a 5% de probabilidade. As variáveis consideradas foram: germinação (GER), condutividade elétrica (CE), índice de vigor (IV), índice de uniformidade (IU), comprimento de plântulas (CP), emergência (EMER), índice de velocidade de emergência (IVE) e rendimento de grãos (REND). Constatou-se que as componentes principais PC1 e PC2 foram capazes de explicar 82,6 % da variação (Figura 4).

Na Figura 4a, tem-se a direção dos vetores, sendo possível observar a ordenação no espaço de cada uma das variáveis consideradas. Verifica-se que somente a condutividade elétrica permaneceu no primeiro quadrante (CE). As variáveis comprimento de plântulas (CP), índice de vigor (IV), índice de uniformidade (UNI) e rendimento de grãos (REND) permaneceram localizadas no segundo quadrante. Por outro lado, emergência (EMER), germinação (GER) e índice de velocidade de emergência (IVE) estão localizadas no terceiro quadrante. Tem-se, na Tabela 3, os *loadings* ou coeficientes das equações para as componentes principais PC1 e PC2. Na componente principal PC1, as variáveis comprimento de plântulas, índice de vigor, germinação, índice de uniformidade, índice de velocidade de emergência e rendimento dos grãos contribuíram negativamente, com coeficientes na faixa entre -0,53 e -0,93. Por outro lado, a condutividade elétrica contribuiu positivamente, com coeficiente igual a 0,90. Quanto à componente principal PC2, destacou-se a variável rendimento de grãos, com coeficiente igual a 0,72 (Tabela 3).

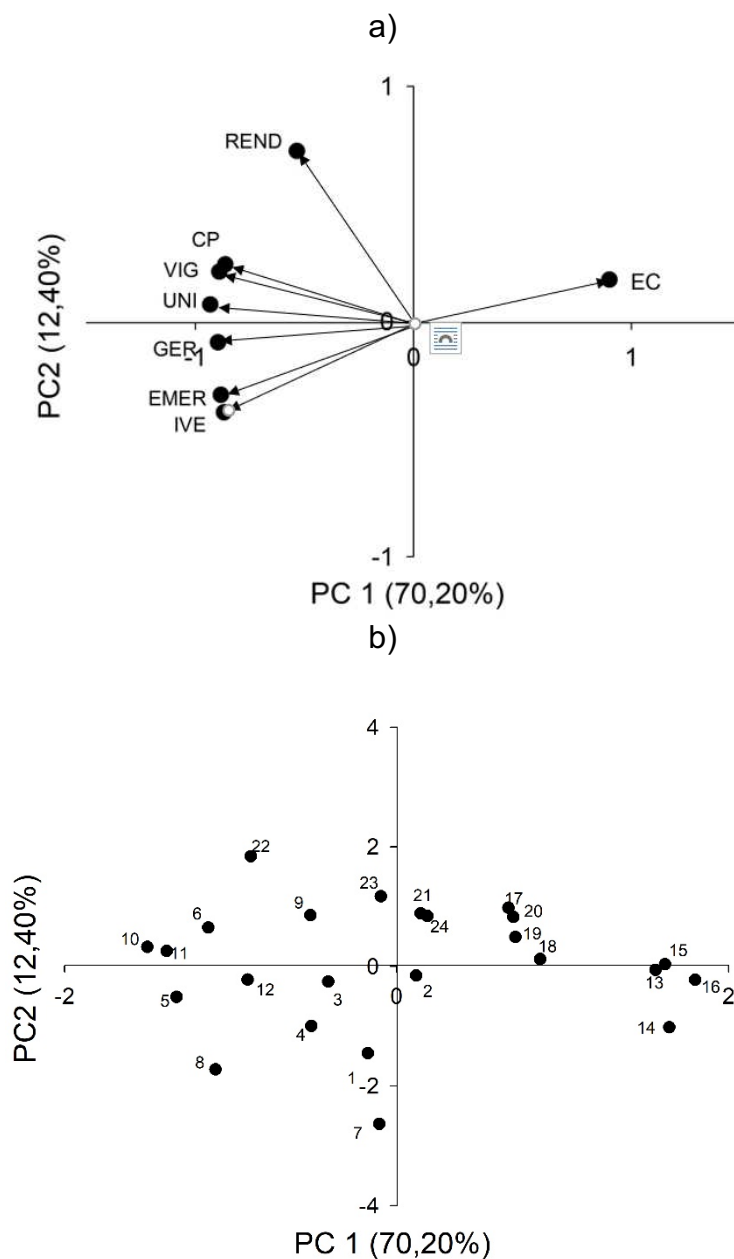


Figura 4. Análise de componentes principais. A) PCA das variáveis; b) PCA dos tratamentos. GER – porcentagem de germinação; CE- condutividade elétrica; IV- índice de vigor; IU- índice de uniformidade; CP- comprimento de plântulas; EMER- porcentagem de emergência; IVE- índice de velocidade de emergência e REND- Rendimento de grãos. 1(L0hCO0) -1,2,3 e 4; 2 (L0hCO10) – 5,6,7 e 8; 3 (L0hCO20) – 9,10,11 e 12; 4 (L48hCO0) – 13, 14, 15 e 16; 5 (L48hCO10) – 17,18,19 e 20 e 6 (L48hCO20) – 21,22,23 e 24

Tabela 3 – Equações dos componentes 1 (PC1) e 2 (PC2) da Análise de Componentes Principais (PCA) para sementes de feijão com diferentes níveis de qualidade fisiológica e submetidas às concentrações de entrada do ozônio de 0 mg L<sup>-1</sup>, 10 mg L<sup>-1</sup> e 20 mg L<sup>-1</sup>, por 30 min

Componente:	Equações
PC1	$PC1 = -0,90GER + 0,90CE - 0,89IV - 0,93IU - 0,86CP - 0,88EMER - 0,87IVE - 0,53REND$
PC2	$PC2 = -0,09GER + 0,18CE + 0,21IV + 0,07IU + 0,24CP - 0,31EMER - 0,39IVE + 0,72REND$

GER – porcentagem de germinação; CE- condutividade elétrica; IV- índice de vigor; IU- índice de uniformidade; CP- comprimento de plântulas; EMER- porcentagem de emergência; IVE- índice de velocidade de emergência e REND- Rendimento de grãos

Analisando-se a projeção dos escores das componentes CP1 e CP2 (Figura 4b), é possível observar dois agrupamentos referentes às amostras do lote de sementes submetidas ao envelhecimento artificial. O primeiro grupo é formado pelas amostras do tratamento L48hCO0 (13, 14, 15 e 16), que não foram submetidas ao processo de ozonização. O segundo grupo é formado pelas amostras de sementes L48hCO10 (17, 18, 19 e 20) que foram ozonizadas na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>. Por outro lado, as amostras do tratamento L48hCO20 (21, 22, 23 e 24) (ozonizadas a 20 mg L<sup>-1</sup>) permaneceram mais próximas das amostras de sementes não submetidas ao envelhecimento artificial, ozonizadas ou não.

### 3.3 Espectroscopia no infravermelho próximo (FT-NIR) em sementes de feijão ozonizadas

A partir dos espectros FT-NIR foi possível obter um modelo eficiente para separar as sementes ozonizadas das não ozonizadas somente no lote 48h (sementes submetidas ao envelhecimento artificial por 48h). Na Tabela 4, são apresentados os parâmetros utilizados para avaliar o desempenho do modelo de classificação para as sementes previamente submetidas ao envelhecimento artificial e ozonizadas nas concentrações 0 - L48hCO0 (controle), 10 - L48hCO10 e 20 mg L<sup>-1</sup> - L48hCO20. Os parâmetros foram expressos como valores variando entre 0 e 1, considerando-se que o ideal é acurácia e kappa igual a 1. Constatou-se que somente o pré-processamento dos dados pela 2ª derivada de Savitzky – Golay (SG) foi eficaz na redução do ruído dos espectros coletados (Figura 5b), obtendo-se índices de acurácia de 0,91 e kappa de 0,86 (Tabela 4).

Tabela 4. Métricas dos modelos para classificação de sementes de feijão submetidas ao envelhecimento artificial e ozonizadas nas concentrações de entrada de 0, 10 e 20 mg L<sup>-1</sup> de ozônio pelo método de Savitzky – Golay (SG).

Pré-processamento	Treinamento (n=51)		Teste (n=21)	
	Acurácia	Kappa	Acurácia	Kappa
<b>Dados originais</b>	<b>0,726</b>	<b>0,588</b>	<b>0,286</b>	<b>-0,714</b>
Centralização	0,726	0,588	0,286	-0,714
<b>EA vs Oz</b>				
SNV	0,745	0,618	0,33	0
1a Derivada SG	1	1	0,762	0,643
2a Derivada SG	1	1	0,905	0,857

EA- Envelhecimento artificial por 48 h; Oz- Concentração de ozônio.

De modo geral, pode-se constatar que para o mesmo comprimento de onda, a sequência de maior para menor para os valores de absorbância foi a seguinte: i) sementes expostas à concentração de ozônio de 20 mg L<sup>-1</sup>; ii) sementes expostas à concentração de ozônio de 10 mg L<sup>-1</sup>; e iii) sementes não tratadas com ozônio (Figura 5a).

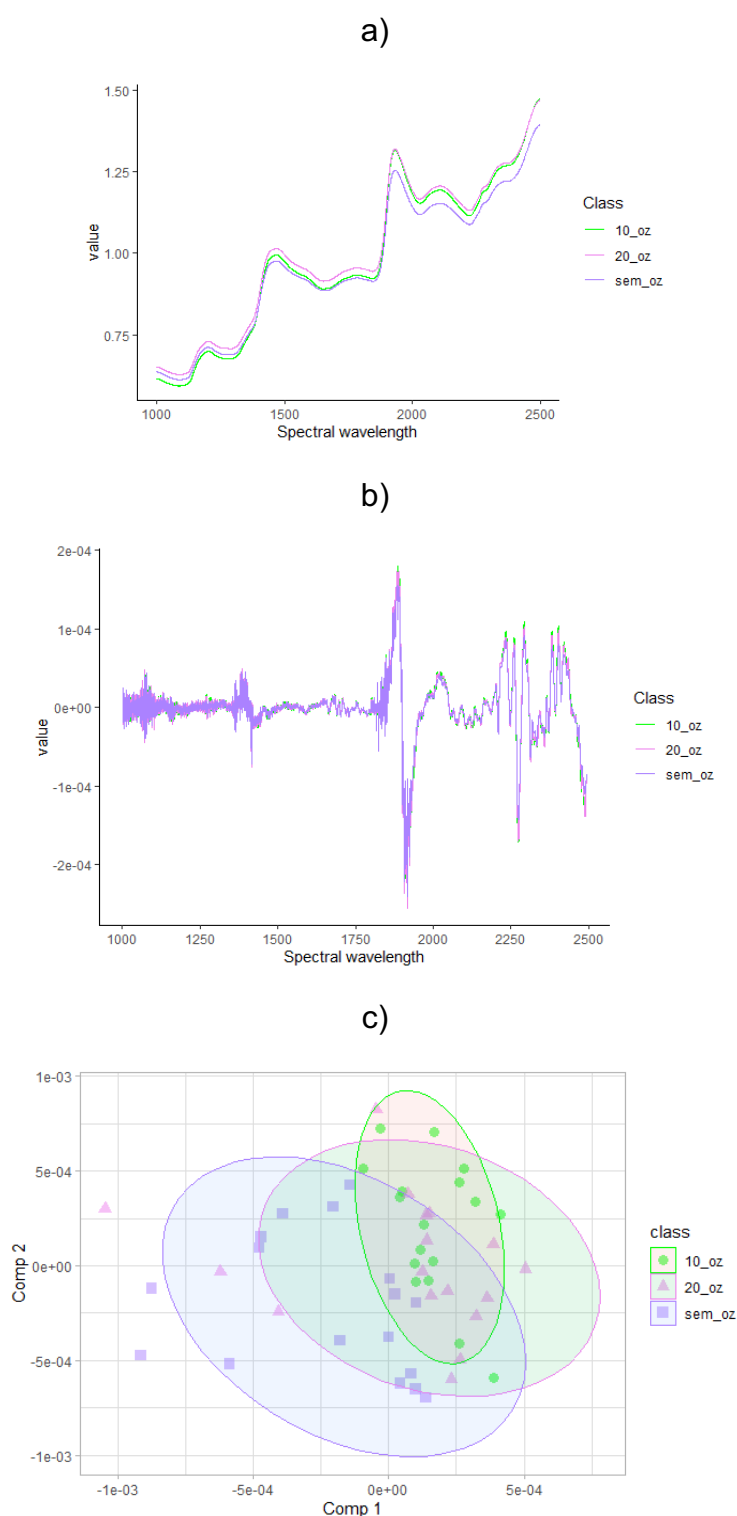


Figura 5. Pré-processamento e análise dos espectros NIR obtidos para sementes de feijão envelhecidas artificialmente e ozonizadas; a) média espectros brutos das sementes do lote envelhecido por 48 h; b) média dos espectros transformados pela 2ª derivada de SG; c) PLS-DA *score plot* para comparação entre os tratamentos. Sem Oz – não tratadas com ozônio-C1; 10\_oz- C2 e 20\_oz- C3 – ozônio na concentração de 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Por meio dos escores da PLS-DA (Figura 5c) observa-se o agrupamento em três classes distintas, sendo eles: i) Agrupamento I - constituído por sementes submetidas ao envelhecimento artificial por 48h e não expostas ao ozônio ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ); ii) Agrupamento II - constituído por sementes submetidas ao envelhecimento artificial por 48 h e exposta ao ozônio na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . e Agrupamento III - constituído por sementes submetidas ao envelhecimento artificial por 48 h e exposta ao ozônio na concentração de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Considerando os parâmetros fisiológicos associados (GER, IU, IV, CMP, REND e CE) a cada agrupamento (Tabela 3 e Figura 4), o grupo I pode ser classificado como de baixa qualidade fisiológica, o grupo II como de qualidade fisiológica razoável e o grupo III como de boa qualidade fisiológica. Os comprimentos de onda que mais contribuíram para o desenvolvimento do modelo de PLS-DA foram 1000, 2000 e 2250 nm (Figura 6 a, b e c).

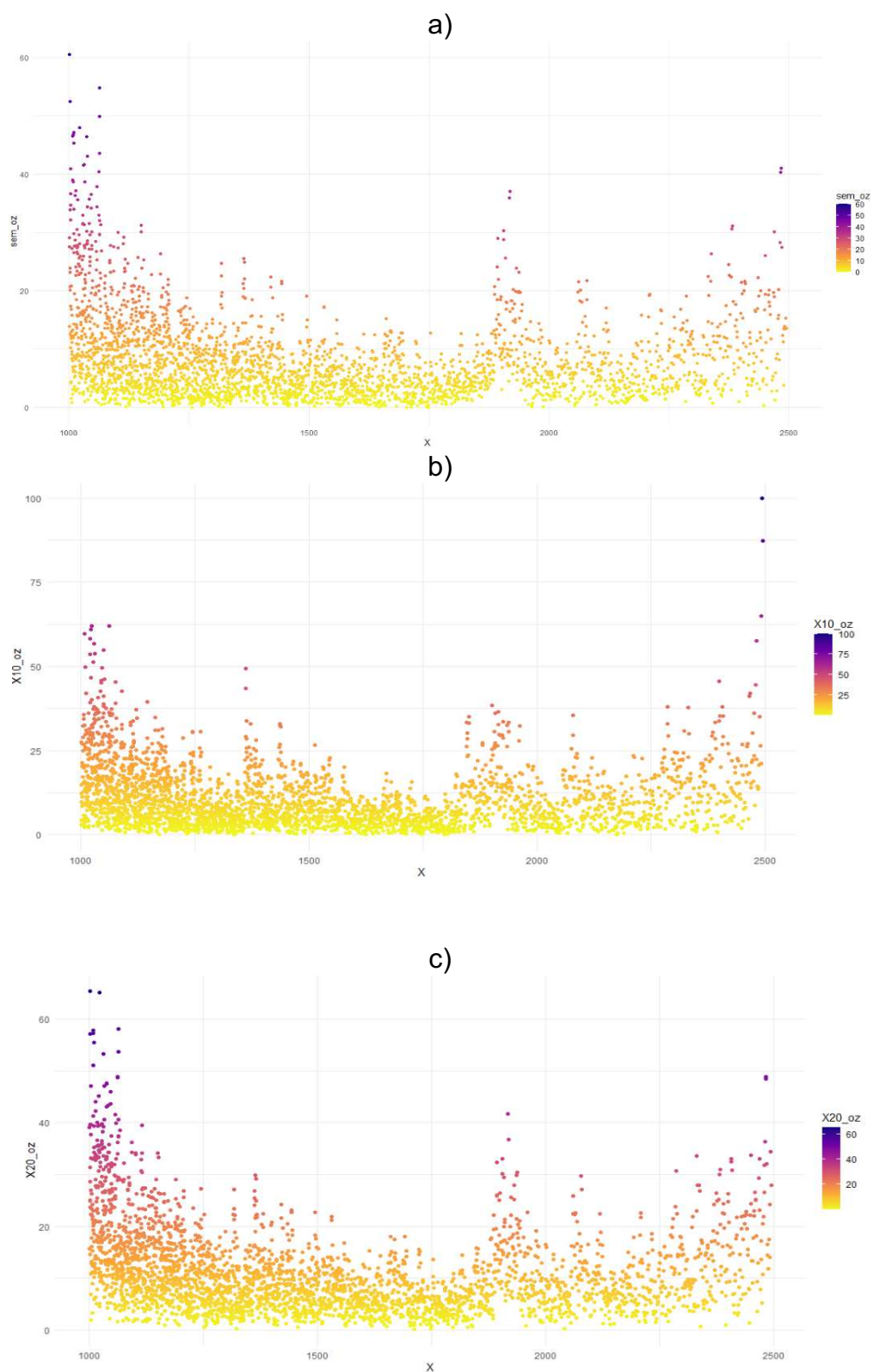


Figura 6. Importância das variáveis para classificação das sementes de feijão não submetidas ou submetidas a diferentes concentrações de ozônio. a) Sem Oz – não tratadas com ozônio (C1); b) 10\_oz (C2) e c) 20\_oz (C3) – ozônio na concentração de 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi determinado o efeito do ozônio em diferentes concentrações de entrada e tempo de exposição de 30 min, na qualidade fisiológica e desempenho em campo em sementes de feijão submetidas ou não ao envelhecimento artificial por 48h. Além disso, foi verificada a possibilidade de análise por espectrometria no infravermelho próximo para detectar alterações nas sementes.

Os resultados obtidos confirmaram o potencial da ozonização no tratamento de sementes. Os efeitos positivos obtidos em laboratório foram confirmados, quando avaliado o desempenho das sementes em campo (Tabela 2). É importante destacar que os resultados obtidos no Capítulo 1 já indicavam que a aplicação do ozônio, na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> e período de exposição de 30 min, pode acarretar efeitos positivos, como incremento da germinação nas sementes de feijão. Tais resultados foram válidos para sementes submetidas ao envelhecimento acelerado por 48 h. No presente estudo, adotando-se essa mesma condição, foi obtido resultado similar. Todavia, resultados mais satisfatórios foram observados quando se utilizou a concentração de 20 mg L<sup>-1</sup>, por 30 min. Nessa condição, além do incremento significativo (P<0,05) da germinação, verificou-se aumento significativo nas variáveis de campo, emergência e índice de velocidade de emergência (Tabela 2).

Outros autores também observaram efeitos positivos do ozônio em sementes, como incremento na germinação, tanto quando se utilizou na forma gasosa (SUDHAKAR et al. 2011; ROSA et al., 2022) ou dissolvido em água (MONTEIRO et al. 2021). Salienta-se que Monteiro et al. (2021) determinaram o efeito do ozônio em meio aquoso na qualidade fisiológica e desempenho em campo de sementes de milho de alta e baixa qualidade. Esses autores, mesmo em meio aquoso, também indicaram que a concentração de entrada adequada é 20 mg L<sup>-1</sup>, associada a tempo de exposição de 30 min. É importante mencionar que no Capítulo 1 do presente estudo, foi possível associar as alterações positivas observadas nas sementes ao aumento da atividade enzimática, em especial da catalase e peroxidase.

É importante mencionar que a ozonização das sementes (envelhecidas por 48 h), na concentração de 20 mg L<sup>-1</sup>, por 30 min, ocasionaram outras alterações positivas nas sementes, conforme mostrado na Figura 3. Nessa condição, obtiveram-se menor valor médio de condutividade elétrica e maiores valores de comprimento de plântulas, de índice de vigor, de índice de uniformidade e de rendimento de grãos. A redução da

condutividade elétrica pode estar associada a ativação de mecanismos de reparação da integridade de membranas, com redução expressiva na quantidade de exsudados (MAXIMIANO et al., 2018). Efeito similar foi observado por Monteiro et al. (2021) que utilizaram água ozonizada na concentração de entrada do gás de 20 mg L<sup>-1</sup>, por 30 min, no pré-condicionamento de sementes de milho.

Ressalta-se que é fundamental avaliar o efeito de diferentes concentrações do ozônio na qualidade das sementes, assim como o tempo de exposição ao gás, conforme evidenciado no Capítulo 1. Tendo em vista o elevado potencial oxidativo do ozônio (2,07 mV) (LAPOLLI et al., 2003) e caso a concentração seja inadequada, é possível que ocorram alterações indesejáveis, tais como redução do percentual de germinação e comprometimento do desenvolvimento das plantas (MAXIMIANO et al., 2018; MONTEIRO et al., 2021; ROSA et al., 2022). Rosa et al. (2022) verificaram menor comprimento de plântulas quando expuseram sementes de milho de alta qualidade fisiológica ao ozônio na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup>, em comparação com aquelas tratadas a 10 mg L<sup>-1</sup>. No presente estudo, os melhores resultados para sementes de feijão foram obtidos na concentração de 20 mg L<sup>-1</sup>, considerando-se as variáveis condutividade elétrica, comprimento de plântulas, de índice de vigor, de índice de uniformidade e de rendimento de grãos (Figura 3).

O rendimento dos grãos também foi influenciado positivamente pelo ozônio, em especial quando adotada a concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> (Figura 3e), apesar de não ter ocorrido variação significativa ( $P > 0,05$ ) das variáveis diâmetro de caule, altura das plantas, número de vagens por planta, número de plantas. Destaca-se que essas variáveis têm relação direta com o rendimento dos grãos. Tem-se ainda que o rendimento dos grãos é resultante do acúmulo de matéria seca. Maior rendimento é resultado da maior eficiência no enchimento das vagens e, conseqüentemente, maior número de grãos por vagens.

A análise de componentes principais para variáveis de qualidade fisiológica e de desempenho em campo confirmou os resultados da análise univariada (Figura 4). Constatou-se a tendência de agrupamento das sementes previamente envelhecidas (48h) e ozonizadas (20 mg L<sup>-1</sup>/30 min) com as sementes não envelhecidas, ozonizadas ou não. Isso reforça o potencial da ozonização como técnica de tratamento de sementes, no intuito de reverter danos provocados pela deterioração, considerando-se a qualidade fisiológica inicial das sementes.

No que se refere à análise da qualidade das sementes por FT-NIR, pode-se constatar que os valores de acurácia e kappa obtidos após o pré-processamento pela 2ª derivada de Savitzky – Golay foram elevados (Tabela 4). Então, a análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) das características espectrais foi adotado para construir modelos de classificação (FENG et al., 2019). Dessa forma, pode-se afirmar que a 2ª derivada de SG foi eficiente como método de pré-processamento.

Os picos no comprimento de onda de 1000 nm são correspondentes às combinações harmônicas da 2ª sobreposição dos grupos funcionais C-H e N-H (Figura 2) está relacionado ao teor de proteínas das sementes (AMBROSE et al., 2016). Quanto maior é o teor das proteínas, maior a qualidade fisiológica das sementes (DELARMELINO-FERRARESI; VILLELA; AUMONDE, 2014). Salienta-se que durante o processo de deterioração de sementes ocorre redução das proteínas, em consequência do estresse oxidativo, o que resulta na desnaturação das células das membranas (MARCOS-FILHO, 2020). Verificou-se incremento nos valores de absorvância para concentrações do ozônio de 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>. Por outro lado, os picos no comprimento de onda de 2000 nm são consequência das vibrações harmônicas dos grupos O-H e alongamento dos grupos C-H (Figura 2), que estão relacionados diretamente aos carboidratos e às proteínas (AMBROSE et al., 2016; ZHANG et al., 2018; HE et al., 2019). As sementes possuem substâncias de reservas que são importantes para o embrião durante o processo de germinação, para o vigor e crescimento inicial das plântulas (GAZOLLA-NETO et al., 2012). Portanto, de acordo com os resultados obtidos, é possível que o ozônio tenha afetado a composição bioquímica das sementes.

Tem-se ainda que os picos no comprimento de onda de 2250 estão relacionados às vibrações harmônicas das combinações de N-H (teor de proteínas) e O-H (teor de carboidratos). Tanto as proteínas quanto os carboidratos fazem parte das substâncias de reserva da semente de feijão, sendo esses compostos relacionados à qualidade fisiológica (GAZOLLA-NETO et al., 2012; DELARMELINO-FERRARESI; VILLELA; AUMONDE, 2014). Pelo método empregado no presente estudo, não foi possível elucidar as alterações químicas de forma específica.

Embora, não tenha sido possível discriminar as alterações químicas, pelo método empregado no estudo, foi possível verificar que houve alterações nas sementes expostas ao ozônio nas diferentes concentrações. As três classes obtidas,

a partir da análise dos espectros de FT-NIR (Figura 5) com calibração de PLS-DA, corroboram com os resultados obtidos a partir da análise multivariada (Figura 3). Menciona-se que vários autores indicaram que a análise de espectros do FT-NIR, com pré-processamento pelo método de SG (1ª e ou 2ª derivada) e calibração PLS-DA como eficiente na classificação de sementes, grãos, variedades, entre outros (ARNGREN et al. 2011; PLANS, M. et al., 2012; RODRÍGUEZ-PULIDO et al., 2014; HUANG et al., 2016; ANDRIAZZI et al. 2023).

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- O tempo de exposição de 30 min, em concentrações de até 20 mg L<sup>-1</sup> mostrou-se adequado para tratamento de sementes de feijão, considerando-se qualidade fisiológica e desempenho em campo.
- O aumento da concentração do ozônio de 10 para 20 mg L<sup>-1</sup> potencializa os efeitos positivos do ozônio em sementes previamente envelhecidas por 48 h.
- A análise das sementes no infravermelho próximo (FT-NIR) possibilitou a detecção de alterações na composição bioquímica de sementes previamente envelhecidas por 48 h e ozonizadas nas concentrações de entrada de 0 mg L<sup>-1</sup>, 10 mg L<sup>-1</sup> e 20 mg L<sup>-1</sup>, por 30 min.

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, L. et al. Treatment of spring wheat seeds by ozone generated from humid air and dry oxygen. **Research in Agricultural Engineering**, v. 64, n. 1, p. 34-40, 2018.
- AMBROSE, A. et al. High-speed measurement of corn seed viability using hyperspectral imaging. **Infrared Physics & Technology**, v. 75, p. 173-179, 2016.
- ANDRIAZZI, C. V. G.; ROCHA, D. K.; CUSTÓDIO, C. C. Determination of the physiological quality of corn seeds by infrared equipment. **Journal of Seed Science**, v. 45, 2023.
- ARNGREN, M. et al. Analysis of pregerminated barley using hyperspectral image analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 21, p. 11385-11394, 2011.
- BATALLER, M. et al. Effect of Ozone on Sprouting of Potato and Sugarcane Seeds: A Sustainable Alternative of Disinfection. **Ozone: Science & Engineering**, v. 43, n. 5, p. 451-460, 2021.
- BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A Cultura. In: CARNEIRO, J. E.; JÚNIOR, T. J. P.; BORÉM, A. (Orgs.). **FEIJÃO - do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, , p. 9-15, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 395 p, 2009.
- CASTAN, D. O. C.; GOMES-JUNIOR, F. G.; MARCOS-FILHO, J. Vigor-S, a new system for evaluating the physiological potential of maize seeds. **Scientia Agrícola**, v.75, p. 167-172, 2018.
- DA COSTA, A. R. et al. Use of ozonized water to control anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) and its effect on the quality of the fruits. **Ozone: Science & Engineering**, v. 43, n. 4, p. 384-393, 2021.
- DELARMELINO-FERRARESI, L. M.; VILLELA, F. A.; AUMONDE, T. Z. Desempenho fisiológico e composição química de sementes de soja. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 1, p. 14-18, 2014.
- FARHADI, M.; TIGABU, M.; ODÉN, P. Near Infrared Spectroscopy as non-destructive method for sorting viable, petrified and empty seeds of *Larix sibirica*. **Silva Fennica**, v.49, n.5, 2015.
- FENG, L. et al. Hyperspectral imaging for seed quality and safety inspection: A review. **Plant methods**, v. 15, n. 1, p. 1-25, 2019.

FERREIRA, W. F. S. et al. Ozonation of Brazil nuts in aqueous media at different pH levels: ozone decomposition, *Aspergillus flavus* inactivation, and effects on nut color and crude oil lipid profile. **Ozone: Science & Engineering**, v. 43, n. 4, p. 351-362, 2021.

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. A. importância do uso de sementes de soja de alta qualidade. Informativo **ABRATES**, v.20, p.037-038, 2010.

GAD, Hassan A. et al. Efficacy of ozone for *Callosobruchus maculatus* and *Callosobruchus chinensis* control in cowpea seeds and its impact on seed quality. **Journal of Stored Products Research**, v. 92, p. 101786, 2021.

GAZOLLA-NETO, A. et al. Níveis de umidade do solo de várzea e seus efeitos sobre a emergência e crescimento inicial de plântulas de soja. Informativo **Abrates**, v. 22, n. 2, p. 28-31, 2012.

HARDIN, James A. et al. Ozone fumigation of stored grain; closed-loop recirculation and rate of ozone consumption. In: **2009 Reno, Nevada, June 21-June 24, 2009**. American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009. p. 1.

HE, X. et al. Rapid and nondestructive measurement of rice seed vitality of different years using near-infrared hyperspectral imaging. **Molecules**, v. 24, n. 12, p. 2227, 2019.

HENNING, F. A. et al. Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. **Bragantia**, v. 69, p. 727-734, 2010.

HUANG, M. et al. Maize seed variety classification using the integration of spectral and image features combined with feature transformation based on hyperspectral imaging. **Applied Sciences**, v. 6, n. 6, p. 183, 2016.

KANDPAL, L. M. et al. Near-infrared hyperspectral imaging system coupled with multivariate methods to predict viability and vigor in muskmelon seeds. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 229, p. 534-544, 2016.

KRZYZANOWSKI, F.C; VIEIRA, R.D; FRANÇA-NETO, J.B and MARCOS-FILHO, J. (2020). **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes [Seed Vigour: Concepts and Tests]**, 2nd Edition, ABRATES, Londrina, Brazil.

KUHN, M., WING, J., WESTON, S., WILLIAMS, A., KEEFER, C., ENGELHARDT, A., ... & TEAM, R. C. Package 'caret'. **The R Journal**, v. 223, n. 7, (2020).

LAPOLLI, F. R. et al. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. Desinfecção de efluentes Sanitários. Tradução. Rio de Janeiro: ABES, 2003. . . Acesso em: 08 mar. 2023.

LOVATO, F. et al. Proximate composition and mineral content of different cultivars of biofortified beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

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

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015. 660p.

MARCOS-FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J.B.; MARCOS-FILHO, J. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, p.182-244, 2020.

MAXIMIANO, C. V. et al. Physiological and sanitary quality of maize seeds preconditioned in ozonated water. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 22, p. 360-365, 2018.

MEDEIROS, A. D.; PEREIRA, M. D. SAPL®: a free software for determining the physiological potential in soybean seeds. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 48, p.222–228, 2018.

MO, C. et al. Determination of germination quality of cucumber (*Cucumis sativus*) seed by led-induced hyperspectral reflectance imaging. **Journal of Biosystems Engineering**, v. 38, n. 4, p. 318-326, 2013.

MONTEIRO, N. O. C. et al. Ozonized water in the preconditioning of corn seeds: physiological quality and field performance. **Ozone: Science & Engineering**, v. 43, n. 5, p. 436-450, 2021.

PANDISELVAM, R.; THIRUPATHI, V. Reaction Kinetics of Ozone Gas in Green Gram (*Vigna radiata*), **Ozone: Science & Engineering**, 37:4, 309-315, 2015.

PANDISELVAM, R.; THIRUPATHI, V.; RAJAMAN, M. Decay rate kinetics of ozone gas in rice grains. **Ozone: Science & Engineering**, v. 37, n. 5, p. 450-455, 2015.

PASQUINI, C. Princípios Da Espectroscopia No Infravermelho Próximo. In: TIBOLA, C. S.; MEDEIROS, E. P.; SIMEONE, M. L. F.; OLIVEIRA, M. A. **Espectroscopia no Infravermelho Próximo para Avaliar Indicadores de Qualidade Tecnológica e Contaminantes em Grãos**, Brasília, DF: Embrapa, 2018. p. 13-30.

PLANS, M. et al. Near-infrared spectroscopy analysis of seed coats of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.): A potential tool for breeding and quality evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 706-712, 2012.

RODRÍGUEZ-PULIDO, F. J. et al. A novel method for evaluating flavanols in grape seeds by near infrared hyperspectral imaging. **Talanta**, v. 122, p. 145-150, 2014.

ROSA, C. C. et al. Physiological Quality of Corn Seeds Treated with Gaseous Ozone. **Ozone: Science & Engineering**, v. 44, n. 1, p. 117-126, 2022.

SAKO, Y. et al. A system for automated seed vigor assessment. **Seed Science and Technology**, v. 29, p. 625-636, 2001.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 104-114, 2005.

SILVA, M. V. A. et al. Ozone Injection at Low Pressure: Decomposition Kinetics, Control of *Sitophilus zeamais*, and Popcorn Kernel Quality. **Ozone: Science & Engineering**, v. 44, n. 1, p. 66-78, 2022.

SMITH, M. R.; RAO, I. M. Common bean. In: **Crop Physiology Case Histories for Major Crops**. Academic Press, p. 384-406, 2021.

SUDHAKAR, N. et al. Assessing influence of ozone in tomato seed dormancy alleviation. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2, n. 03, p. 443, 2011.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FNEP, 1994. 164p.

VIEIRA, R. F.; LIMA, M. S.; NEVES, J. C. L.; ANDRADE, M. J. B. Adubação. In: CARNEIRO, J. E.; JÚNIOR, T. J. P.; BORÉM, A. (Orgs.). **FEIJÃO - do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2015, p. 145-172.

WANG, Y. et al. Feasibility analysis of NIR for detecting sweet corn seeds vigor. **Journal of Cereal Science**, v. 93, p. 102977, 2020.

XAVIER, J. B. et al. Morphological, chemical and physiological characterization of *Amaranthus spp.* Seeds. **Journal of Seed Science**, v. 41, p. 478-487, 2019.

YEKEN, M. Z. et al. Breeding of dry bean cultivars using *Phaseolus vulgaris* landraces in Turkey. **International Journal of Agriculture and Wildlife Science (IJAWS)**, 2018.

ZHANG, T. et al. A reliable methodology for determining seed viability by using hyperspectral data from two sides of wheat seeds. **Sensors**, v. 18, n. 3, p. 813, 2018.

ZUCARELI, C. et al. Qualidade fisiológica de sementes de feijão carioca armazenadas em diferentes ambientes. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, v. 19, p. 803-809, 2015.

## CONCLUSÃO GERAL

Nas condições adotadas no presente estudo, foi possível concluir que:

- A ozonização de sementes de feijão envelhecidas por 48 h, na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , por 30 min, é capaz de ocasionar efeitos positivos, tais como aumento do percentual germinação, do comprimento de plântulas e dos níveis de catalase e peroxidase.
- O ozônio não é capaz de induzir recuperação da qualidade fisiológica de sementes submetidas a envelhecimento acelerado por período superior a 48 h.
- De modo geral, a exposição de sementes de feijão por tempo superior a 30 minutos, na concentração de entrada do gás de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , não implica em efeitos positivos na qualidade fisiológica e atividade enzimática.
- O tempo de exposição de 30 min, em concentrações de até  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , mostrou-se adequado para tratamento de sementes de feijão, considerando-se qualidade fisiológica e desempenho em campo.
- O aumento da concentração do ozônio de 10 para  $20 \text{ mg L}^{-1}$  potencializa os efeitos positivos do ozônio em sementes previamente envelhecidas por 48 h.
- A análise das sementes no infravermelho próximo (FT-NIR) possibilitou a detecção de diferenças na composição bioquímica em sementes previamente envelhecidas e ozonizadas nas concentrações de entrada de  $0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg L}^{-1}$  e  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , por 30 min.