



**YNAYANNA NARIZA MEDEIROS SILVA**

**OZONIZAÇÃO DE GRÃOS DE FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.): CONTROLE DE *Zabrotes subfasciatus* (BOHEMAN, 1833) (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE: BRUCHINAE) E MANUTENÇÃO DA QUALIDADE DOS GRÃOS**

**TERESINA – PI**

**2020**

**YNAYANNA NARIZA MEDEIROS SILVA**

**OZONIZAÇÃO DE GRÃOS DE FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.): CONTROLE DE  
*Zabrotes subfasciatus* (BOHEMAN, 1833) (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE:  
BRUCHINAE) E MANUTENÇÃO DA QUALIDADE DOS GRÃOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal do Piauí, como  
parte das exigências do programa de  
Pós-Graduação em Agronomia-  
Agricultura Tropical, para obtenção do  
título de Mestre em Ciências.

Orientador:

Dr. Paulo Roberto Ramalho Silva

Coorientadores:

Dr. Gutierres Nelson Silva

Dra. Solange Maria de França

**TERESINA – PI**

**2020**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processos Técnicos

- S586o Silva, Ynayanna Nariza Medeiros.  
Ozonização de grãos de Feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) : controle de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) e manutenção da qualidade dos grãos / Ynayanna Nariza Medeiros Silva. -- 2020.  
61 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Agricultura Tropical, Teresina, 2020.  
“Orientador: Dr. Paulo Roberto Ramalho Silva.”  
“Coorientadores: Dr. Gutierrez Nelson Silva, Dra. Solange Maria de França.”
1. Feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). 2. Ozônio - Toxicidade.  
3. Feijão-fava - Controle de pragas. I. Silva, Paulo Roberto Ramalho.  
II. Silva, Gutierrez Nelson. III. França, Solange Maria de. IV. Título.

CDD 635.651

Ynayanna Nariza Medeiros Silva

OZONIZAÇÃO DE GRÃOS DE FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)  
CONTROLE DE *Zabrotes subfasciatus* (BOHEMAN, 1833) (COLEOPTERA:  
CHRYSOMELIDAE: BRUCHINAE) E MANUTENÇÃO DA QUALIDADE D  
GRÃOS

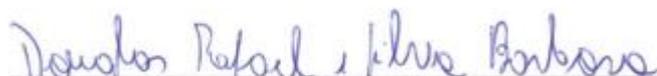
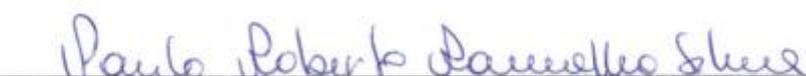
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

APROVADA em 14 de fevereiro de 2020

Comissão Julgadora:



\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Lúcia da Silva Fontes - CCN/UFPI

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Douglas Rafael e Silva Barbosa – IFMA  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gutierrez Nelson Silva – UFMS  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Roberto Ramalho Silva – CCA/UFPI  
(Orientador)

TERESINA-PI

2020

Ao meu bem mais valioso, minha família:

Minha amada mãe, Maria Luzinete por sempre acreditar em mim e por me incentivar a lutar pelos meus sonhos.

Meu querido pai Francisco por tudo que fez e ainda faz por mim.

Meus queridos irmãos, Yanna e Yago pelo incentivo e apoio.

Minha linda sobrinha Isabella, por preencher a minha vida com sua doçura e alegria.

***A vocês dedico essa vitória!***

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida, por sempre me dar forças nos momentos difíceis, e por ao saber que eu não conseguiria chegar até aqui sozinha, colocou em meu caminho anjos em forma de pessoas que me ajudaram nessa caminhada.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI) e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia- Agricultura Tropical, pela oportunidade de realização do mestrado.

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

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA), Campus Codó, por todo o suporte disponibilizado para a realização do experimento e por mais uma vez contribuir para a minha formação profissional.

À minha mãe, meu amor maior, a maior responsável por eu ter chegado até aqui. Obrigada pelo seu amor, incentivo, por sempre me dar forças, por sempre acreditar em mim até mais do que eu mesma, por todo o esforço realizado para que eu possa realizar meus sonhos, por ser meu exemplo de força, coragem e determinação. És um exemplo de mãe e uma mulher guerreira, Te amo!

Ao meu pai, por todo o esforço realizado para que eu chegasse até aqui, pelo seu amor, pelos princípios a mim passados e por ser meu exemplo de honestidade.

Aos meus irmãos, Yanna e Yago pelo carinho, incentivo e apoio.

À minha sobrinha Isabella, pelas alegrias que me proporcionaste e por entender minha ausência nos melhores momentos de sua vida.

À minha tia Lucinete, por me receber em Teresina, pelo carinho, por sua generosidade, ajuda e incentivo.

Ao meu orientador, Paulo Roberto Ramalho Silva pela orientação e confiança.

À minha coorientadora, prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Solange França, a qual denominamos como o pilar do nosso laboratório, pelos ensinamentos, conselhos, sugestões, incentivos, amizade e por ser um exemplo de professora.

Ao meu professor da graduação prof. Dr. Gutierrez Nelson Silva, por ter aceitado ser meu coorientador, pela idealização do projeto, por todo o esforço realizado para que a pesquisa saísse do papel, pelas valiosas sugestões, pelos ensinamentos passados e por ser um exemplo de professor.

A professora Lêda Rita D'Antonino Faroni da Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela doação do gerador de ozônio para a realização da pesquisa.

Ao professor Dr. Douglas Barbosa do IFMA, por as vezes que me ajudou trazendo grãos e insetos de Teresina a Codó, e também por me ajudar com a estatística.

À todos os professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia-Agricultura Tropical, pelos ensinamentos passados.

Ao Gustavo Yves e Yago Medeiros, por toda a ajuda na execução do experimento, e principalmente por todas as noites passadas em claro comigo no laboratório, abdicando até mesmo de momentos de lazer e descanso para que eu conseguisse finalizar a pesquisa dentro do prazo, e por me fazer sorrir até nos momentos de angústia e cansaço, sem vocês eu não teria conseguido.

Ao Izaías, o melhor químico do IFMA campus Codó, por toda a ajuda com a preparação das soluções usadas no experimento, se disponibilizando até mesmo nos fins de semana, pelas sugestões e conversas.

Aos técnicos de laboratório do IFMA, Gláucio e Jonathan pelo suporte durante a realização do experimento.

Ao amigo e mestrando da UFV Artur Abreu, pela disposição em ajudar e tirar dúvidas, sugestões, incentivo, força nos momentos de desânimo e pela amizade.

As amigas que ganhei no mestrado, Ana Cristina, Agda Lorena, Ingrid Setubal e Francisca Jayslane pela amizade, ajuda, pela força dada nos momentos difíceis e por compartilhar momentos de alegrias.

À família Boaventura, a qual sempre me refiro como a segunda família que Deus me deu: Carlene, Dona Maria, Dona Carlita (madrinha), Seu Wilson, Carlenilson, João Batista e João Emanuel, por me acolher mais uma vez em sua casa durante a execução do experimento, pelo carinho, pela ajuda nos momentos difíceis, pelos bons momentos compartilhados, por me fazer aliviar a saudade de casa e por fazer eu me sentir da família, os levarei sempre em meu coração.

À todos do laboratório de Entomologia, a qual denominamos de família Entomolab, Alana, Antônio Neto, Egídio, Joesley, Mateus, Marcus, Rodrigo Brito, Paulo Gomes, Mayara, Jayara, Emanoela Maria, Silvestre Moreira, Luís Carlos e José Cláudio, por me receber tão bem no laboratório, pela ajuda, carinho e momentos de alegrias que foram fundamentais durante esta caminhada. Em especial ao Rodrigo Brito, pela doação dos insetos utilizados na pesquisa e por me ensinar muito sobre

criação de *Zabrotes*, por ser sempre tão prestativo, tão alegre, pela amizade e por fazer os melhores bolos para adoçar nossas comemorações. Emanoela, pela amizade, incentivo, força nos momentos de desânimos e pelos momentos de descontração e diversão. Antônio Neto pela ajuda, incentivo, força nos momentos de desânimo e pelos momentos de descontração.

À amiga que a graduação me deu Carlene, por toda a ajuda no experimento, pela amizade, incentivo, momentos felizes e apoio nos momentos difíceis, que não foram poucos, espero que nossa amizade dure para o resto da vida.

À amiga Jéssica Caldas, pela amizade, incentivo, pelo amparo nos momentos de desânimo e por me fazer sorrir até mesmo nos momentos difíceis.

Às amigas que ganhei em Teresina, Tainá e Caroline, pela força dada durante o período de seleção do mestrado, por comemorar comigo em cada fase passada, pela amizade e pelos momentos de diversão.

Aos melhores primos do mundo, Anderson, Ana Paula, Anna Glenda e Anna Gleice, pelo incentivo, carinho, bons momentos compartilhados e por entenderem minha ausência.

Aos meus colegas de turma, pelo companheirismo.

As meninas da residência do IFMA, Débora, Larissa, Carla, Taísa e Cleria, por me disponibilizar alguns momentos de descanso no alojamento, durante os períodos de execução do experimento.

Enfim, a todos que direto ou indiretamente me ajudaram nessa árdua caminhada, o meu muito obrigada!

## RESUMO

Objetivou-se, com este estudo, avaliar a toxicidade do ozônio sobre *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) em grãos de feijão-fava, determinar a taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ ) destes insetos expostos a tempos-letais e subletais, e avaliar seu efeito nas características físicas e fisiológicas dos grãos. A toxicidade do ozônio foi determinada por meio de estimativas dos tempos de exposição letais (h) para 50 e 95% dos insetos adultos ( $TL_{50}$  e  $TL_{95}$ ), na camada superior e basal da câmara de fumigação. O ozônio foi aplicado na concentração de  $1,61 \text{ mg L}^{-1}$  e fluxo contínuo de  $2 \text{ L min}^{-1}$ . Os grãos contendo os insetos foram ozonizados em gaiolas colocadas no interior de uma câmara de fumigação confeccionada. Para determinar a  $r_i$ , os grãos contendo os insetos foram expostos ao ozônio e oxigênio (controle), nos períodos de exposição correspondentes aos tempos-letais e subletais que foram obtidos no bioensaio de toxicidade da camada superior:  $TL_0$ ;  $TL_{10}$ ;  $TL_{30}$ ;  $TL_{50}$ ;  $TL_{70}$  e  $TL_{95}$ . A avaliação das características qualitativas foi feita nos grãos de feijão-fava utilizados nos bioensaios da  $r_i$ , após 35 dias de armazenamento, no qual foram avaliados o teor de água nos grãos, a massa específica aparente, a condutividade elétrica e a germinação. Os períodos de exposição para causar mortalidade de 50% ( $TL_{50}$ ) e 95% ( $TL_{95}$ ) dos insetos, aumentou à medida que as gaiolas contendo os insetos foram distanciadas do ponto de injeção do ozônio, sendo menores (5,11 e 8,32 h) quando os insetos foram distribuídos na camada basal e maiores (15,06 e 20, 86 h) quando os insetos foram distribuídos na camada superior da câmara de fumigação, respectivamente. O ozônio influenciou na  $r_i$  dos insetos. Em geral, o tratamento controle apresentou valores médios de  $r_i$  estatisticamente superior, em relação ao tratamento com o gás ozônio. A  $r_i$  de *Z. subfasciatus* decresceu à medida que se elevou o período de exposição dos grãos de feijão-fava ao ozônio, reduzindo de 0,077 para 0,002. O tratamento com o oxigênio não apresentou efeito sobre a  $r_i$ , variando de 0,07 a 0,08. Não foi observada redução na qualidade física e fisiológicas dos grãos de feijão-fava expostos ao ozônio, após 35 dias de armazenamento. Portanto, o ozônio possui toxicidade sobre *Z. subfasciatus*, afeta sua taxa instantânea de crescimento e não afeta a qualidade dos grãos, sendo assim tem potencial para ser usado no controle deste inseto de em grãos armazenados.

**Palavras-chave:** Ozônio, toxicidade, pragas de grão armazenado, fumigação, crescimento populacional.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the ozone toxicity on *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in lima beans, to determine the instantaneous population growth rate ( $r_i$ ) of these insects exposed to time-lethal and sublethal, and evaluate its effect on the physical and physiological characteristics of the grains. Ozone toxicity was determined by estimating lethal exposure times (h) for 50 and 95% of adult insects (TL<sub>50</sub> and TL<sub>95</sub>) in the upper and lower layer of the fumigation chamber. Ozone was applied at a concentration of 1.61 mg L<sup>-1</sup> and a continuous flow of 2 L min<sup>-1</sup>. The grains containing the insects were ozonated in cages placed inside a fumigation chamber made of PVC with 20 cm in diameter and 100 cm in height. To determine the  $r_i$ , the grains containing the insects were exposed to ozone and oxygen (control), in the exposure periods corresponding to the lethal and sublethal times that were obtained in the toxicity bioassay of the upper layer: TL<sub>0</sub>; TL<sub>10</sub>; TL<sub>30</sub>; TL<sub>50</sub>; TL<sub>70</sub> and TL<sub>95</sub>. The evaluation of the qualitative characteristics was made in the grains of lima beans used in the bioassays of the  $r_i$ , after 35 days of storage, in which the water content in the grains, the apparent specific mass, the electrical conductivity and the germination were evaluated. The exposure periods to cause mortality of 50% (TL<sub>50</sub>) and 95% (TL<sub>95</sub>) of the insects increased as the cages containing the insects were distanced from the ozone injection point, being shorter (5.11 and 8.32 h) when the insects were distributed in the basal layer and larger (15.06 and 20, 86 h) when the insects were distributed in the upper layer of the fumigation chamber, respectively. Ozone influenced the laugh of insects. In general, the control treatment showed statistically higher mean values of  $r_i$  compared to the treatment with ozone gas. The laugh of *Z. subfasciatus* decreased as the period of exposure of lima beans to ozone increased, decreasing from 0.077 to 0.002. The treatment with oxygen had no effect on the  $r_i$ , varying from 0.07 to 0.08. There was no reduction in the physical and physiological quality of grains of beans exposed to ozone, after 35 days of storage. Therefore, ozone has the potential to be used to control *Z. subfasciatus* in stored grains.

**Keywords:** Ozone, toxicity, stored grain pests, fumigation, population growth.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Análises dos grãos de feijão-fava antes do tratamento com gás ozônio e oxigênio (controle).....34
- Tabela 2.** Toxicidade de ozônio (TL<sub>50</sub> e TL<sub>95</sub>) para *Zabrotes subfasciatus* em grãos de feijão-fava.....36
- Tabela 3.** Estimativa dos coeficientes de correlação linear de Pearson entre a taxa instantânea de crescimento de *Zabrotes subfasciatus* e o teor de água, massa específica, percentual de germinação e condutividade elétrica dos grãos de feijão-fava expostos aos tratamentos com gás ozônio ou oxigênio (controle).....45

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Zabrotes subfasciatus* na fase adulta. A. Fêmea; B. Macho.....17
- Figura 2.** Equipamentos utilizados na obtenção do gás ozônio A. Concentrador de oxigênio; B. Gerador de ozônio.....27
- Figura 3.** Esquematização da aplicação do gás ozônio e distribuição das gaiolas na câmara de fumigação (Adaptada de ROZADO, 2005) .....29
- Figura 4.** Taxa instantânea de crescimento (Média  $\pm$  EP) de *Zabrotes subfasciatus* em grãos de feijão-fava expostos a ozônio e oxigênio (controle), em diferentes períodos de exposição. Médias seguidas com a mesma letra, para cada período de exposição, não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. \*Significativo a 5%, \*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.  $R^2$  (coeficiente de determinação) ..... 40
- Figura 5.** Teor de água (Média  $\pm$  EP) dos grãos de feijão-fava expostos ao ozônio e oxigênio (controle), em diferentes períodos de exposição. Médias seguidas com a mesma letra, para cada período de exposição, não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (A). \*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.  $R^2$  (coeficiente de determinação) (B).....43
- Figura 6.** Percentual de germinação (Média  $\pm$  EP) dos grãos de feijão-fava expostos ao ozônio e oxigênio (controle), em diferentes períodos de exposição. Médias seguidas com a mesma letra, para cada período de exposição, não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (A). \*Significativo a 5%, \*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.  $R^2$  (coeficiente de determinação) (B).....47
- Figura 7.** Condutividade elétrica  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$  (Média  $\pm$  EP) dos grãos de feijão-fava expostos ao ozônio e oxigênio (controle), em diferentes períodos de exposição. Médias seguidas com a mesma letra, para cada período de exposição, não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (A). \*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.  $R^2$  (coeficiente de determinação) (B).....49
- Figura 8.** Massa específica aparente  $\text{kg m}^{-3}$  (Média  $\pm$  EP) dos grãos de feijão-fava expostos ao ozônio e oxigênio (controle), em diferentes períodos de exposição. Médias seguidas com a mesma letra, para cada período de exposição, não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (A). \*Significativo a 5%, \*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.  $R^2$  (coeficiente de determinação) (B).....51

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	X
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 Feijão-fava ( <i>Phaseolus lunatus</i> L.) .....	16
2.2 <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boheman, 1833) .....	16
2.3 Controle de insetos-praga de grãos armazenados .....	18
2.4 Atmosfera controlada e modificada .....	19
2.5 Atmosfera modificada com ozônio.....	20
2.6 Qualidade física e fisiológica dos grãos.....	23
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
3.1 Criação de <i>Zabrotes subfasciatus</i> .....	26
3.3 Obtenção do gás ozônio e funcionamento do sistema de aplicação.....	26
3.2 Câmara de fumigação .....	28
3.4 Toxicidade de do ozônio para <i>Zabrotes subfasciatus</i> .....	29
3.6 Taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ ) .....	30
3.7 Avaliação da qualidade dos grãos de feijão-fava.....	31
3.7.1 Teor de água .....	31
3.7.2 Massa específica aparente .....	31
3.7.3 Condutividade elétrica.....	31
3.7.4 Germinação .....	32
3.8 Delineamento experimental e análise estatística .....	32
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33
4.1 Caracterização dos grãos de feijão-fava antes do tratamento com o ozônio e oxigênio .....	33
4.2 Toxicidade do gás ozônio .....	34
4.3 Taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ ) .....	38
4.4 Avaliação da qualidade dos grãos de feijão- fava.....	42
4.4.1 Teor de água .....	42
4.4.2 Percentual de Germinação .....	46
4.4.3 Condutividade elétrica.....	48
4.4.4 Massa específica aparente .....	50
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	53
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma das cinco espécies domesticadas de *Phaseolus* (Fabaceae) e a segunda espécie mais cultivada desse gênero, ficando atrás somente do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (BAUDOIN et al., 2004). Seu cultivo é realizado, principalmente, pela agricultura familiar, especialmente no Nordeste do Brasil (LOPES et al., 2015; OLIVEIRA-SILVA et al., 2017).

No Brasil foram produzidas 10.092 toneladas de grãos de feijão-fava, no ano de 2017, com uma produtividade média de 433 kg ha<sup>-1</sup>. A região Nordeste se destaca como a maior produtora de feijão-fava, com uma produção de 9.330 toneladas em 2017. Os estados com maior produção do Brasil são: Ceará, Paraíba, Piauí, Goiás e Pernambuco com uma produção de 3.596, 3.352, 801, 650 e 606 toneladas respectivamente (IBGE, 2017). Apesar da importância desta cultura, são observadas perdas no campo e no armazenamento.

Durante o armazenamento de grãos são observadas consideráveis perdas, tanto de natureza quantitativa quanto qualitativa (PARFITT et al., 2010). Essa realidade não é diferente no armazenamento de feijão-fava. A quantidade perdida é provocada por fatores bióticos e abióticos. Entre os fatores bióticos, os insetos-praga tem grande importância, sendo responsáveis por grandes perdas econômicas em grãos armazenados (SILVA et al., 2012).

Uma praga de grande importância que ataca grãos armazenados de feijão-fava é *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) (FARONI; SOUSA, 2006; SANTOS et al., 2018). Este inseto é classificado como primário interno, devido a presença de mandíbulas desenvolvidas, que são capazes de romper o grão inteiro e sadio se alimentando do seu conteúdo interno. Esses insetos completam seu ciclo de vida no interior do grão, saindo apenas na fase adulta. E, além de causarem danos específicos, abrem caminho para o ataque de outros insetos (FARONI; SILVA, 2008). Os danos causados pela alimentação da larva são perda de peso, redução no poder germinativo e do valor nutritivo e desvalorização comercial dos grãos (COSTA et al., 2014).

Por ser eficaz, de baixo custo e fácil manuseio, o método químico tem sido a forma mais utilizada para o controle de pragas de produtos armazenados (GONZÁLEZ et al., 2014). Os principais inseticidas utilizados tem sido os protetores (piretroides e organofosforados) e o fumigante fosfina (PIMENTEL et al., 2012; SOUSA et al., 2008).

Entretanto, os altos níveis de resistência a esses produtos (GUEDES et al., 2006; PIMENTEL et al., 2007; RIBEIRO et al., 2003) justificam estudos sobre técnicas alternativas para o controle de pragas de grãos armazenados.

Dentre as tecnologias com potencial para uso no controle de pragas no armazenamento, destaca-se o uso da atmosfera modificada com gás ozônio (O<sub>3</sub>), sendo uma alternativa ecologicamente correta e economicamente viável, capaz de manter a qualidade dos grãos (ROZADO et al., 2008).

O ozônio é um poderoso agente oxidante e é usado no tratamento de água, no controle de pragas e doenças, remoção de pesticidas e outros contaminantes de frutas e grãos (SILVA et al., 2016; SOUZA et al., 2018), visto que, age promovendo danos às membranas celulares ou desencadeando a morte celular nos organismos vivos, devido ao estresse oxidativo (HOLLINGSWORTH; ARMSTRONG, 2005).

Além disso, o ozônio é capaz de controlar os insetos em todas as fases de vida, no entanto, concentrações mais altas são necessárias para controle das fases imaturas (AMOAHA; MAHROOF, 2018; E et al., 2019).

Atualmente a utilização do ozônio na pós-colheita de grãos vem se tornando atrativa, devido a uma série de vantagens: não deixa resíduos no produto aplicado, pois o seu produto de degradação é o oxigênio; pode ser gerado no local, eliminando, assim, problemas com o armazenamento e manipulação de embalagens de produtos químicos (KELLS et al., 2001). Essas vantagens tornam o ozônio um candidato potencial como alternativa à fosfina, que é um fumigante usado há muito tempo para eliminar insetos em produtos armazenados (E et al., 2017).

Na literatura é possível encontrar vários estudos que demonstram que os tratamentos com ozônio podem ser eficientes no controle de insetos-praga em grãos armazenados, como *Rhyzopherta dominica* (Fabricius, 1972) (Coleoptera: Bostrichidae), *Sitophilus granarius* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae) e *Plodia interpunctella* (Hubner, 1813) (Lepidoptera; Pyralidae) em grãos de trigo; *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), *Lasioderma serricorne* (Fabricius, 1792) (Coleoptera: Anobiidae), *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae), em grãos de milho e *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchidae) em feijão mungu (HANSEN et al., 2013; PANDISELVAM et al., 2019; ROZADO et al., 2008; ; SOLANO et al., 2016; SOUSA et al., 2016; VELASQUEZ et al., 2017). Porém, não há estudos a respeito do uso do ozônio no controle de *Z. subfasciatus* em grãos de feijão-fava.

Diante do exposto, objetivou-se, com este estudo, avaliar a toxicidade do ozônio sobre *Z. subfasciatus* em grãos de feijão-fava, determinar a taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ ) destes insetos expostos a tempos-letais e subletais ao ozônio e avaliar o efeito da  $r_i$  nas características físicas e fisiológicas dos grãos de feijão-fava.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)

O Brasil se destaca na produção mundial de grãos, sendo o quinto maior produtor, com uma safra de 238,9 milhões de toneladas para o ciclo 2018/2019 (USDA, 2016; CONAB, 2018). Entre as leguminosas, o feijão-fava *Phaseolus lunatus* L. (Fabaceae) tem grande importância na produção de grãos no país.

*Phaseolus lunatus* também pode ser conhecido como feijão-fava ou feijão-lima, é cultivado na América do Norte, na América do Sul, na Europa, no leste e oeste da África e no sudeste da Ásia (BAUDOIN, 1988). Pertence à família das Fabaceae, tem ciclo de crescimento anual, trepadeira e é cultivada devido aos seus grãos comestíveis. O feijão-fava é utilizado tanto na alimentação humana, animal e também na adubação verde e cobertura do solo para proteção do mesmo contra a erosão (AZEVEDO et al., 2003; VIEIRA, 1992). Devido ao seu fornecimento de proteína, o feijão-fava tem se apresentado como uma opção de alimentação e de renda para as populações mais carentes, principalmente da região Nordeste do país, que o consome sob a forma de grãos maduros ou verdes, sendo produzido por pequenos produtores que utilizam principalmente cultivares de crescimento indeterminado (OLIVEIRA et al., 2004; VIEIRA, 1992).

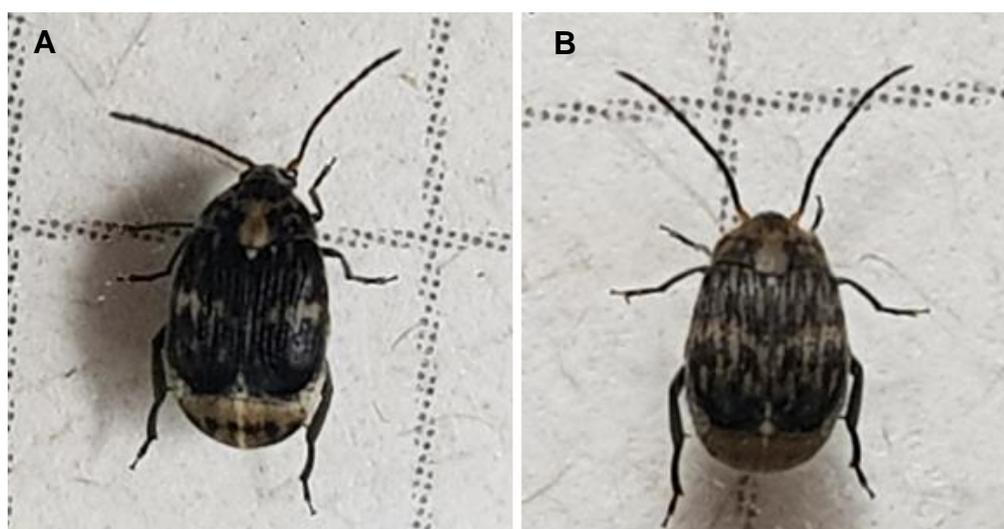
Apesar de ser cultivada em todos os estados do país e de apresentar capacidade de adaptação maior que o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), o cultivo do feijão-fava ainda tem pouca importância econômica. As principais razões para o cultivo limitado, se deve ao fato de maior tradição de consumo do feijão-comum, o paladar do feijão-fava e o seu tempo de cocção mais longo (AZEVEDO et al., 2003). A importância econômica e social se deve principalmente à sua rusticidade em regiões semiáridas do Nordeste brasileiro, o que possibilita prolongar a colheita em período seco (AZEVEDO et al., 2003). Geralmente pequenos agricultores vendem a fava logo após a colheita, quando o preço de mercado é baixo. Tal fato se deve, principalmente, às limitações tecnológicas de armazenamento e falta de controle de insetos-praga.

### 2.2 *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833)

O gorgulho *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833), pertence a ordem Coleoptera, família Chrysomelidae e subfamília Bruchinae, tem origem no novo mundo com importância nas Américas Central e do Sul. Além de também ser

encontrado na África Central e leste, em Madagascar, no Mediterrâneo e na Índia. É considerado uma praga cosmopolita, principalmente por causar grandes prejuízos a grãos armazenados como o feijão. Essa praga tem preferência por atacar principalmente os feijões dos gêneros *Phaseolus* e *Vigna* e também infesta ervilha (DOBIE et al., 1984; MEIK; DOBIE, 1986; FARONI; SOUSA, 2006; GALLO et al., 2002). É classificada como praga primária ou praga interna, que devido suas mandíbulas conseguem romper as películas protetoras dos grãos intactos e penetram no seu interior onde completam seu desenvolvimento, alimentando-se de seu conteúdo interno (LAZZARI; LAZZARI, 2009).

Em relação à morfologia, *Z. subfasciatus* é um inseto castanho-escuro, tem seu tamanho variando de 1,8 a 2,5 mm de comprimento. Apresentam dimorfismo sexual, sendo os machos (Figura 1B) menores que as fêmeas (Figura 1A), e essas têm manchas brancas nos élitros e apresentam longevidade média de 11 dias, colocando cerca de 22 ovos, tendo ciclo em torno de 26 dias. Para realizar a oviposição, a fêmea libera um líquido de cor clara e grudento, onde o ovo é colocado e aderido. É possível a observação de ovos brancos aderidos aos grãos de feijão. A larva, que é do tipo curculioniforme, eclode do ovo diretamente para o interior da semente, construindo galerias, onde ocorre todo o seu desenvolvimento. Antes de empupar, a larva abre um orifício para saída do adulto. A pupa é maior que o adulto, apresentando 3 mm de comprimento e cor branco-leitosa, sem pelos (ATHIÉ; PAULA, 2002; GALLO et al., 2002).



**Figura 1.** *Zabrotes subfasciatus* na fase adulta. A. Fêmea; B. Macho. Fonte Brito (2019).

*Zabrotes subfasciatus* ocorre nas regiões mais quentes dos trópicos, a 26° C de temperatura, os ovos desenvolvem-se em cinco a sete dias, a larva em 14-16 dias e a pupa em seis a sete dias. As larvas passam por quatro ínstares, quando se transformam em pupas. A larva do último ínstar e a câmara pupal ficam visíveis externamente, na forma de um orifício circular coberto por uma fina camada do tegumento da semente. O adulto emerge pelo orifício, vive por aproximadamente 14 dias e normalmente não se alimenta (QUINTELA; BARBOSA, 2015).

Os danos diretos causados resultam da alimentação da larva, que consomem o endosperma e o embrião dos grãos, resultando em perda nutricional, redução do peso, diminuição da germinação e vigor. Os danos indiretos são causados pela presença de insetos vivos e mortos, exúvias, ovos, excrementos, orifícios de saída dos adultos, que afetam a qualidade do produto e reduz o padrão comercial (LAZZARI; LAZZARI, 2009). Portanto, os danos são ocasionados pela fase larval que ocorre no interior dos grãos, já que os adultos não se alimentam (WARE, 1988). Ocorre também aquecimento dos grãos e aumento da umidade, devido ao metabolismo do inseto, criando um ambiente favorável para o desenvolvimento de outros insetos, fungos e outros microrganismos, provocando a deterioração dos grãos (LAZZARI; LAZZARI, 2009; QUINTELA; BARBOSA, 2015).

O período de ovo-adulto de *Z. subfasciatus* em grãos de feijão-fava nas condições de temperatura e umidade relativa de  $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $47 \pm 10\%$ , foi aproximadamente 30 dias (SILVA et al., 2018).

### **2.3 Controle de insetos-praga de grãos armazenados**

O controle químico tradicional que é utilizado atualmente em todo o mundo na proteção e combate à infestação de insetos em produtos armazenados, apresenta algumas vantagens: é efetivo, de fácil manejo e de baixo custo, quando comparado com métodos não-tradicionais. No entanto, devido ao descumprimento das práticas corretas de aplicação do inseticida, como aplicação de dosagens inadequadas e o uso de um único princípio ativo, como também o desrespeito ao tempo mínimo de contato do inseto com o inseticida, tem feito com que alguns insetos que atacam produtos armazenados desenvolvam pressão de seleção às dosagens convencionais do princípio ativo de alguns produtos químicos (FARONI; SILVA, 2008; PIMENTEL et al., 2009), além de oferecerem riscos à saúde humana e ao meio ambiente (WAKIL et al., 2013). Além do mais, atualmente não existem produtos químicos registrados para

prevenção e controle dos insetos-praga que atacam grãos de feijão-fava. Assim, quando é necessário controlar estes insetos, são utilizadas recomendações destinadas à *P. vulgaris*. Os principais inseticidas utilizados para o controle deste inseto (*Z. subfasciatus*) tem sido os protetores (piretroides e organofosfarados) e o fumigante fosfina (SOUSA et al., 2008).

Consumidores cada vez mais conscientes estão exigindo produtos mais seguros e que causem um menor impacto ambiental e sobretudo à saúde humana (BEIRÃO-DA-COSTA et al., 2014). A perda de fumigantes, a resistência a esses inseticidas remanescentes e a tendência dos consumidores a se afastarem dos produtos químicos residuais, exigem o desenvolvimento de alternativas de controle (KELLS et al., 2001).

Deste modo, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que visem à obtenção de métodos alternativos para o controle de *Z. subfasciatus* durante o armazenamento de feijão-fava.

#### **2.4 Atmosfera controlada e modificada**

Atmosfera controlada é um método de controle de pragas de grãos armazenados, que se baseia na alteração da concentração dos gases na atmosfera, com redução do oxigênio e aumento de gases tóxicos, tornando o ambiente letal aos insetos. Esse método consiste em uma alternativa aos produtos químicos utilizados no controle de insetos que atacam os produtos armazenados além de impedir o crescimento de fungos e manter a qualidade do produto (NAVARRO, 2012; NAVARRO et al., 2012). Para ter um ambiente com atmosfera controlada, é necessário que as instalações da unidade armazenadora sejam herméticas, caso contrário pode não se obter êxito e custos elevados (LORINI et al., 2015).

A técnica de atmosfera controlada substitui a atmosfera interna da massa de grãos pela injeção de gases tóxicos (dióxido de carbono, nitrogênio, amônia ou uma mistura de gases) até que a concentração de oxigênio diminua. A maioria dos insetos presentes nos grãos armazenados morre quando a concentração de oxigênio é reduzida a 2% em volume (AFONSO et al., 2000).

A composição normal da atmosfera se encontra em torno de 78% de nitrogênio, 21% de oxigênio, 0,03 de gás carbônico e porcentagens pequenas de outros gases, a atmosfera controlada consiste principalmente, no controle das concentrações de O<sub>2</sub>

e CO<sub>2</sub>, já que o N<sub>2</sub> é um gás inerte. Na técnica não é necessário a utilização de produtos químicos. Diminuir a porcentagem de O<sub>2</sub> e elevar a de CO<sub>2</sub> é o princípio básico da técnica (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Na técnica de atmosfera modificada, a atmosfera ambiental é no geral alterada pelo uso de embalagens provocando um aumento de CO<sub>2</sub>, oriundo do próprio produto, e uma diminuição da concentração de O<sub>2</sub> a medida que é utilizado no processo respiratório. Nessa técnica, as concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> não são controladas, e variam com o tempo, temperatura, tipo de embalagem e com a taxa respiratória do produto (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Os termos atmosfera modificada e atmosfera controlada diferem com base no grau de controle que é exercido sobre a composição da atmosfera. Na atmosfera modificada, a composição do gás é modificada inicialmente e muda dinamicamente dependendo da taxa respiratória do produto alimentar e permeabilidade da embalagem ou estrutura de armazenamento em torno do produto. Na atmosfera controlada, a atmosfera de gás é controlada de forma contínua (JAYAS; JEYAMKONDAN, 2002).

## **2.5 Atmosfera modificada com ozônio**

O ozônio vem se mostrando como uma alternativa atraente para o controle de insetos e fungos em grãos armazenados, pois a geração *in loco* de ozônio descarta os problemas de manuseio, armazenamento e descarte de produtos químicos utilizados na pós-colheita convencionalmente. Além disso, apresenta vantagens por não deixar resíduos nos alimentos e não contribuir para a contaminação ambiental, pois tem uma meia-vida curta e sua degradação é em oxigênio (KELLS, 2001), sendo classificado como "GRAS" (Geralmente Reconhecido como Seguro) pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) (ISIKBER; ATHANASSIOU, 2014), portanto, liberado para uso direto em alimentos. O ozônio pode se tornar um método alternativo de controle de pragas para grãos armazenados, é altamente oxidativo, instável e se decompõe rapidamente em oxigênio, sem deixar resíduos (HILL; RICE, 1982; HORVATH et al., 1985; TIWARI et al., 2010). O alto poder de oxidação e a decomposição espontânea, faz do ozônio um desinfetante viável para garantir a ação antimicrobiana e a qualidade dos produtos alimentares (KIM et al., 1999).

O ozônio resulta do rearranjo de átomos de oxigênio, que pode ser produzido por descargas elétricas ou pela incidência de radiação eletromagnética de alta energia (luz ultravioleta) no ar. À temperatura ambiente, o ozônio encontra-se no estado gasoso, sendo um gás azulado com odor pungente e fortes propriedades oxidantes. Em comparação com outros agentes oxidantes, o ozônio se destaca por ser o sanitizante com elevado potencial de oxidação (2,07 mV) que pode entrar em contato com alimento. O ozônio é o segundo mais poderoso agente oxidante, só perde para o flúor (3,06 mV) (SILVA et al., 2011; RUSSEL et al., 1999).

Esse gás é formado de forma natural na estratosfera em quantidades pequenas, cerca de 0,05 mg / litro, por ação de radiação UV solar no oxigênio. Uma pequena quantidade do gás também é formada na troposfera como subproduto de reações fotoquímicas entre hidrocarbonetos, oxigênio e nitrogênio que são liberados dos escapes de automóveis, indústrias, florestas e ação vulcânica. Entretanto, o ozônio produzido é muito instável e decompõem-se rápido no ar (HORVATH et al., 1985). Para aplicações comerciais, o ozônio é gerado pelo método de descarga corona, que consiste em forçar o oxigênio entre as placas de alta tensão. O oxigênio é então quebrado e recombina-se para formar o ozônio (WEAVERS; WICKRAMANAYAKE, 2001).

Um gerador de ozônio que utiliza o processo corona é formado por dois eletrodos que são submetidos a uma elevada diferença de potencial (aproximadamente 1000 V). Ocorre a passagem de ar ou oxigênio puro entre os dois eletrodos, gerando ozônio. Quando os elétrons possuem energia suficiente para quebrar a molécula de oxigênio, começam a ocorrer colisões, que causam a quebra do oxigênio e a conseqüente formação do ozônio (USEPA, 1999).

A geração elétrica de ozônio elimina os problemas de manuseio, armazenamento e descarte de pesticidas pós-colheita usados convencionalmente. Já que o ozônio se decompõe rapidamente (em cerca de 50 minutos) para oxigênio molecular sem deixar um resíduo, não há necessidade de descarte pós-fumigação ou aeração do produto tratado. Essas vantagens tornam o ozônio um candidato potencial para o controle de insetos e fungos em produtos armazenados (AMOA; MAHROOF, 2018; RICE et al., 1982).

O mecanismo de ação do ozônio sobre os insetos não é totalmente conhecido, no entanto, acredita-se que as vias respiratórias do inseto é um alvo provável (TIWARI et al., 2010). Além do que o ozônio por ser um poderoso agente oxidante, atua

danificando as membranas celulares de diversos organismos mediante estresse oxidativo, levando esses organismos à morte (HOLLINGSWORTH; ARMSTRONG, 2005).

A aplicação do ozônio no armazenamento aumenta a vida útil dos produtos, no entanto, é importante levar em consideração a concentração aplicada, caso esta for elevada pode causar danos oxidativos, odor desagradável e alteração na coloração do alimento. É importante destacar, por ser um gás e extremamente tóxico em concentrações elevadas, que a aplicação do ozônio exige alguns cuidados (SILVA et al., 2011).

Como o ozônio em altas concentrações se torna um gás tóxico, limites máximos de exposição são definidos e as pessoas que trabalham com ozonização devem ser submetidas a revisões médicas regulares (FREITAS-SILVA; VENANCIO, 2010). O ozônio não causa sinais de toxicidade em baixas concentrações, mas em concentrações altas pode ser letal aos humanos (CHIATTONE et al., 2008); portanto, o cuidado operacional e ocupacional deve ser sempre obedecido (COELHO et al., 2015).

Nos Estados Unidos, o ozônio no ambiente de trabalho tem limite máximo de exposição de 0,1 ppm (vol/vol) numa base de 8 horas/dia, de uma semana de 40 h de trabalho. No Brasil, a legislação, por meio da Norma Regulamentadora Nº 15, Portaria Nº 3.214/78 da ANVISA, estabelece limite de exposição de trabalhadores ao gás ozônio de 0,08 ppm, para jornada semanal de trabalho de até 48 h (CFR, 1997; BRASIL, 1978).

Diversas pragas de grãos armazenados são suscetíveis ao ozônio. Como exemplo tem-se *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) e *Tribolium confusum* (Jacquelin du Val, 1863) (Coleoptera: Tenebrionidae), que embora existam diferenças entre as espécies e nos níveis de exposição exigidos para causar toxicidade, *E. kuehniella* é geralmente muito mais suscetível ao ozônio do que *T. confusum* (IŞIKBER; OZTEKIN, 2009). Bem como o ozônio é uma alternativa potencial para controle de *L. serricorne*, o besouro do cigarro, podendo ser utilizada em todas as fases da vida desse inseto (AMOAHA; MAHROOF, 2018).

Vários fatores podem influenciar a toxicidade do ozônio sobre pragas de grãos armazenados, entre eles pode-se citar a concentração do ozônio, o tempo de exposição do inseto e as fases de desenvolvimento do inseto. Os percentuais de mortalidade para diferentes estágios de *C. maculatus* em *Vigna radiata* L aumentaram

com o aumento da concentração de ozônio e o tempo de exposição, onde o estágio adulto é menos tolerante ao ozônio (500 ppmv por 274,40 min de exposição necessária para matar 90%), enquanto o estágio mais tolerante é pupa (500 ppmv por 1816,54 min é necessário para matar 90%) (PANDISELVAM et al., 2019). Os resultados indicam que o ozônio gasoso é a alternativa atraente aos fumigantes sintéticos no controle de pragas de grãos armazenados.

Fatores como posicionamento dos insetos ou do ozônio na massa do grão pode afetar a toxicidade do ozônio. A ozonização dos insetos em diferentes pontos dentro da câmara de fumigação: no *plenum* (base), na parte central e na superfície, afetaram a toxicidade de *R. dominica* em grãos de trigo, onde os períodos de exposição ao ozônio que foram necessários para causar mortalidades de 50 e 95% em *R. dominica* variaram de 8,69 a 13,08 horas e de 11,28 a 18,11 horas, respectivamente. Os menores tempos letais foram observados quando os insetos foram distribuídos na base da coluna de grãos e a taxa instantânea de crescimento diminuiu com o aumento do período de exposição ao ozônio, bem como não foi verificada redução da qualidade física, fisiológica e físico-química dos grãos de trigo expostos ao gás ozônio, após 60 dias de armazenamento (SILVA et al., 2016).

## 2.6 Qualidade física e fisiológica dos grãos

Além da toxicidade que o ozônio pode ocasionar, outro fator importante a ser observado quanto à sua utilização, são os parâmetros de qualidade dos grãos armazenados, tais como: teor de umidade, condutividade elétrica, germinação e massa específica aparente. A qualidade dos grãos é um parâmetro importante para a comercialização e processamento, influenciando no valor final do produto (JAYAS; WHITE, 2003).

Os grãos podem ser classificados de acordo com três ou mais características: teor de umidade; massa específica aparente; porcentagem de grãos quebrados ou danificados; porcentagem de materiais estranhos e impurezas; dano por calor ou outros; susceptibilidade à quebra; característica de moagem; teor de proteína; teor de óleo; germinação; presença de insetos; contagem de fungos; e tipo do grão e outros (SILVA et al., 2008). Essas características são utilizadas como indicadores de qualidade.

O teor de água do grão é um parâmetro que limita o desenvolvimento de bactéria, actinomicetes, leveduras, fungos, ácaros e insetos, que são os principais

agentes que causam a deterioração dos grãos armazenados. A quantidade de água livre presente nos grãos logo após a colheita e durante o armazenamento determina de forma indireta, na maioria dos casos, a qualidade do produto armazenado (FARONI; SILVA, 2008). A combinação de baixa temperatura e baixo teor de umidade dos grãos é ideal para manter a qualidade durante o armazenamento de sementes e grãos, visto que, o teor de umidade e a temperatura, são fatores primordiais na conservação do produto armazenado. Teor de água baixo, 11 a 13% b.u., diminui a respiração e o metabolismo (BRAGANTINI, 2005).

A germinação é tida como o evento no qual o eixo embrionário dá continuidade ao seu desenvolvimento, que tinha sido cessado por ocasião da maturidade fisiológica. As sementes perdem sua viabilidade devido a fatores intrínsecos, que resulta do metabolismo da semente, e fatores extrínsecos como microrganismos que vivem em associação com a semente. O potencial de germinação é também um parâmetro de avaliação qualitativa dos grãos (FARONI; SILVA, 2008; BROOKER et al., 1992).

O teste de condutividade elétrica é um dos mais empregados na avaliação da qualidade fisiológica de sementes. O valor da condutividade elétrica está diretamente ligado com a integridade das membranas celulares, uma vez que é função da quantidade de lixiviados da solução de embebição das sementes. Assim, baixos valores de condutividade (baixa lixiviação) indicam que as sementes apresentam alta qualidade, enquanto valores elevados estão relacionados a sementes de qualidade inferior (VIERA; CARVALHO, 1994; WOODSTOCK, 1973). A lixiviação é a perda de compostos orgânicos, como açúcares, ácidos graxos, aminoácidos, ácidos orgânicos e íons metálicos. Estes solutos, tem propriedades eletrolíticas, apresentando carga elétrica, que podem ser detectados por condutivímetros, sendo assim um método importante para avaliação da qualidade fisiológica das sementes (PAIVA AGUERO, 1995).

Massa Específica pode ser definida como a razão entre a massa e o volume de determinada quantidade de produto, incluindo os espaços intergranulares. A massa específica refere-se a massa de 100 L do produto, e a aplicação do seu conceito é importante em comercialização, dimensionamento de silos, secadores, depósitos e sistemas de transportes, podendo também ser utilizado para determinar teores de umidade e danos causados por insetos e pragas nos grãos armazenados (CORRÊA; SILVA, 2008), e representa de forma indireta características de qualidade dos grãos.

Nenhum efeito negativo na qualidade e nas características nutricionais do trigo, milho e arroz foi verificado, quando submetidos a um tratamento com 50 mg kg<sup>-1</sup> de ozônio durante 30 dias (MENDEZ et al., 2003).

Rozado et al. (2008) avaliando a suscetibilidade dos adultos de *S. zeamais* e *T. castaneum* e a qualidade fisiológica dos grãos de milho submetidos ao tratamento com ozônio, em diferentes camadas da massa de grãos, submetidos a uma atmosfera modificada com 50 mg kg<sup>-1</sup> de ozônio, constataram que os tratamentos com atmosfera modificada com ozônio e com ar atmosférico, não afetaram a qualidade fisiológica dos grãos de milho.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os grãos de feijão-fava (*P. lunatus*) foram adquiridos do Centro de Abastecimento do Piauí - CEAPI de Teresina – PI. Os grãos foram mantidos em freezer sob temperatura de 10°C, por sete dias, para eliminação de eventuais infestações de insetos provenientes do campo. Após a retirada, os grãos foram mantidos 48 h sob temperatura ambiente com a finalidade de atingirem o equilíbrio higroscópico.

Analisou-se a caracterização dos grãos antes de serem submetidos ao tratamento com o gás ozônio, os parâmetros avaliados foram: condutividade elétrica, massa específica aparente, percentual de germinação, percentual de infestação e teor de água. Os bioensaios de toxicidade e taxa instantânea de crescimento, bem como as análises de qualidade física e fisiológica dos grãos de feijão-fava foram realizadas no Laboratório de Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão – IFMA/campus Codó, na cidade de Codó-MA.

O teste de infestação foi realizado para determinar a porcentagem de grãos danificados do lote utilizado no experimento de acordo com a metodologia adaptada das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Foi considerado danificado por insetos os grãos com ovo, larva, pupa, inseto adulto e os que continham orifícios de saída dos insetos. O teste foi realizado com 8 repetições de 25 grãos cada, retirados ao acaso. Os grãos foram examinados individualmente para observação de orifícios de saída de insetos. Os que estavam danificados foram registrados como infestados e em seguida descartados. Os demais, aparentemente não danificados por insetos, foram imersos em água por 24 horas, tempo suficiente para amolecer. Após

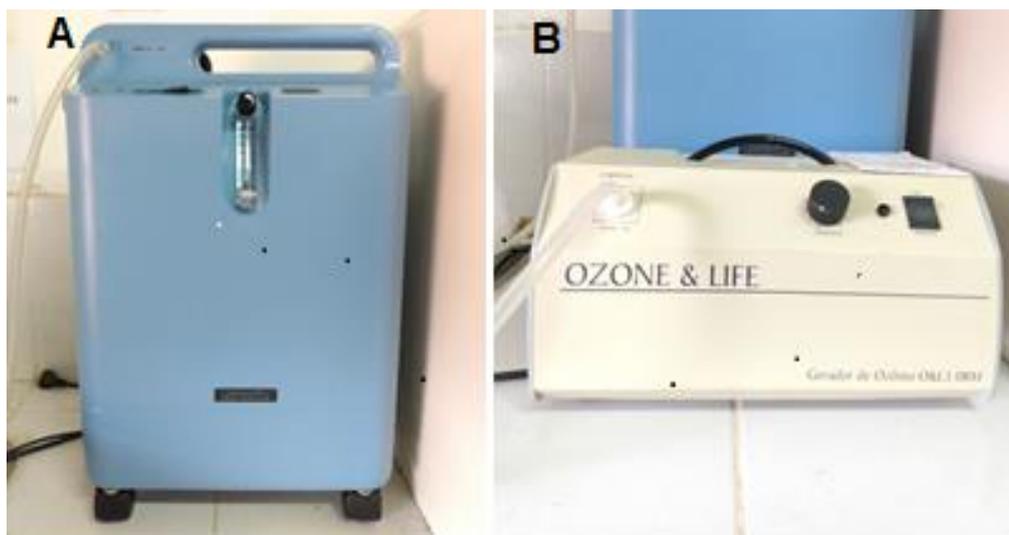
esse período foram cortados individualmente e registrado a quantidade dos que apresentaram ovo, larva, pupa ou adulto no interior do grão. Somou-se o número de grãos perfurados de cada repetição quantificado anteriormente para obter o número total de danificados. O resultado foi a média dos grãos danificados por insetos de todas as repetições e expresso em porcentagem.

### **3.1 Criação de *Zabrotes subfasciatus***

*Zabrotes subfasciatus* foram multiplicados a partir de criações preexistentes no Laboratório de Entomologia do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí - UFPI. Os insetos foram acondicionados em recipientes de plástico com volume de 1 L, fechados com tampa plástica perfurada e revestida internamente com tela tecido tipo organza para permitir as trocas gasosas. Os insetos foram confinados para realizarem a oviposição até a mortalidade, em seguida foram retirados com auxílio de uma peneira e descartados. Os recipientes contendo os grãos com ovos foram estocados até a emergência da geração F1. Este procedimento foi efetuado por sucessivas gerações, a fim de garantir a quantidade de adultos necessários para a execução dos experimentos.

### **3.3 Obtenção do gás ozônio e funcionamento do sistema de aplicação**

O ozônio foi obtido por meio de um gerador O&L3 ORM (Ozone & Life, São José dos Campos, Brasil) (Figura 2B), utilizando como insumo gás oxigênio isento de umidade obtido por meio de um concentrador de oxigênio EverFlo (PHILIPS RESPIRONICS, Murrysville, PA 15668 EUA) (Figura 2A).



**Figura 2.** Equipamentos utilizados na obtenção do gás ozônio. A. Concentrador de oxigênio; B. Gerador de ozônio. Fonte Silva (2019).

O ozônio é obtido quando o oxigênio passa pelo reator refrigerado, no qual recebe uma descarga por barreira dielétrica (DBD); essa é produzida com a aplicação de uma alta voltagem entre dois eletrodos paralelos, entre estes dois tem-se um dielétrico (vidro) e um espaço livre por onde passa o  $O_2$ . No espaço livre formado, ocorre a produção de uma descarga em forma de filamentos, no qual são gerados elétrons com energia suficiente para produzir a quebra das moléculas de oxigênio, essas moléculas se reorganizam formando o ozônio.

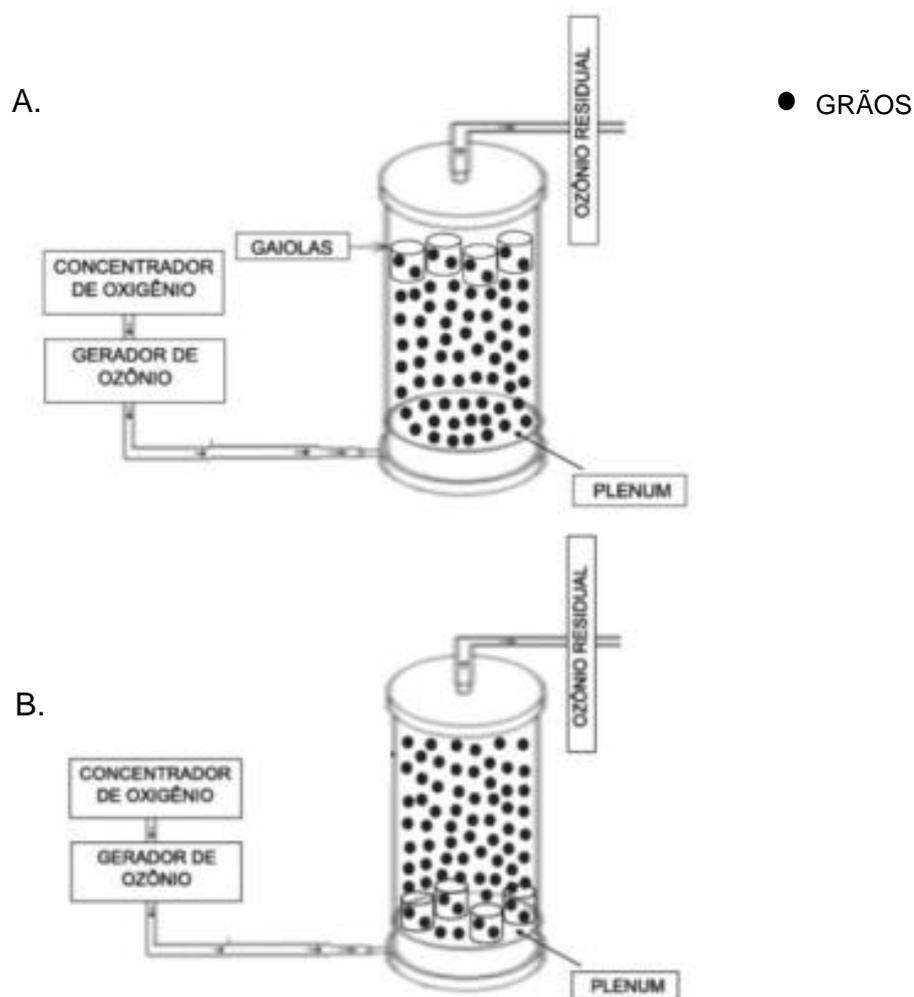
O gerador de ozônio possui duas saídas, uma por onde entra o ar atmosférico obtido pelo concentrador de oxigênio e outra por onde sai o ozônio gerado. O ozônio e o oxigênio (utilizado como controle) foram distribuídos uniformemente para a câmara de fumigação no qual foram acondicionados os grãos e as gaiolas contendo grãos e insetos.

A concentração de ozônio foi quantificada utilizando-se o método iodométrico, por titulação indireta, conforme recomendado pela International Ozone Association (IOA). Esse método, descrito por Clescerl et al. (2000), consiste no borbulhamento do ozônio em 50 mL de solução de iodeto de potássio (KI) a 5%, com produção de Iodo ( $I_2$ ). Para garantir o deslocamento da reação para a produção de  $I_2$ , foi necessário acidificar o meio com 2,5 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ). A solução foi então titulada com tiosulfato de sódio ( $Na_2S_2O_3$ ) 0,01 N, com uso de solução de amido a 1% como indicador.

### 3.2 Câmara de fumigação

Os grãos foram ozonizados no interior de uma câmara de fumigação confeccionado de PVC com 20 cm de diâmetro e 100 cm de altura. Foi colocada uma tela metálica, a 10 cm de altura no interior da câmara de fumigação, para sustentação e formação de um *plenum*, para melhor distribuição do gás. Nas tampas inferior e superior da câmara, foram instaladas conexões para injeção e exaustão do gás, respectivamente. No interior de cada câmara de fumigação foi utilizada uma massa de 7,6 kg de grãos de feijão-fava. A câmara de fumigação foi hermeticamente fechada e selada com parafilme para evitar a fuga do gás durante a fumigação (Figura 3).

Gaiolas plásticas com 7,5 cm de diâmetro e 10,0 cm de altura, contendo 300 g de feijão-fava foram infestadas com 50 insetos adultos não-sexados (0-48 h de idade). Primeiro as gaiolas foram acondicionadas no interior da massa de grãos na parte superior (Figura 3A) e depois sobre o *plenum* (Figura 3B), sendo assim a toxicidade determinada na camada superior e na camada basal da coluna de grãos. Esse procedimento foi realizado em quatro repetições, sendo cada gaiola correspondendo a uma repetição, para cada tempo de exposição com o gás ozônio e oxigênio (controle). As gaiolas foram confeccionadas com o fundo e a tampa em tecido do tipo organza, para permitir a livre passagem do ozônio ou do oxigênio através da massa de grãos e impedir a fuga dos insetos.



**Figura 3.** Esquematização da aplicação do gás ozônio e distribuição das gaiolas na câmara de fumigação (Adaptada de ROZADO, 2005). A. Camada superior; B. Camada inferior.

### 3.4 Toxicidade de do ozônio para *Zabrotes subfasciatus*

Foi determinada por meio de estimativas dos tempos de exposição letais para 50 e 95% dos insetos adultos ( $TL_{50}$  e  $TL_{95}$ ). As curvas de tempo-resposta foram estabelecidas mediante bioensaios com períodos crescentes de exposição ao gás ozônio. Foram realizados testes preliminares para estimar os tempos de exposição mínimos e máximos a serem utilizados nos bioensaios, a partir dos quais foram estabelecidos os intervalos de tempo. Foram utilizados quatro períodos de exposição (6, 8, 10 e 15 h) na camada superior e cinco períodos de exposição (1, 3, 5, 7 e 10 h) na camada basal. O ozônio foi aplicado na concentração de  $1,61 \text{ mg L}^{-1}$  e fluxo contínuo de  $2 \text{ L min}^{-1}$ , conforme metodologia desenvolvida por Silva et al. (2016). O

tratamento controle consistiu em grãos e insetos expostos ao gás oxigênio, nos mesmos tempos e repetições usados para o tratamento com ozônio.

A avaliação da mortalidade foi realizada após cada período de exposição, insetos que não conseguiam se mover eram considerados mortos. A mortalidade foi expressa em porcentagem com base no número de adultos mortos a partir do total exposto.

### **3.6 Taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ )**

Foi determinada na camada superior da câmara de fumigação. Para determinar a taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ), foram utilizados 50 insetos adultos, não-sexados, com idade de até 48 horas, os quais foram mantidos em gaiolas plásticas confeccionadas de PVC com 7,0 cm de diâmetro e 17 cm de altura, contendo 500 g de grãos de feijão-fava. As gaiolas foram distribuídas no interior da massa de grãos na parte superior. Os grãos e os insetos foram expostos ao gás ozônio e ao oxigênio (controle) nos períodos de exposição correspondentes aos tempos-letais e subletais que foram obtidos no bioensaio de toxicidade da camada superior: TL<sub>0</sub>; TL<sub>10</sub>; TL<sub>30</sub>; TL<sub>50</sub>; TL<sub>70</sub> e TL<sub>95</sub>. Foram utilizadas quatro repetições para cada tempo de exposição. Após a exposição ao ozônio e ao oxigênio, a massa de grãos de feijão-fava contendo os insetos foi retirada das gaiolas e transferida para recipientes de plásticos de 1 L com tampa revestida de tecido de organza para permitir as trocas gasosas.

Os recipientes contendo os grãos e insetos foram acondicionados em sala com fotoperíodo de 12 horas, foi utilizado termohigrômetro digital, onde registrou-se a temperatura e umidade relativa média diária de  $30,5^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $65 \pm 8 \%$ , respectivamente, sendo a leitura do termohigrômetro realizada três vezes ao dia durante todo o período de armazenamento dos grãos e insetos. A progênie adulta foi contabilizada após 35 dias de armazenamento. Para determinar a  $r_i$  foi utilizada a equação de Walthal e Stark (1997):  $r_i = \ln (N_f/N_0)/\Delta t$ , sendo  $N_0$  o número inicial de indivíduos na população e  $N_f$  o número de indivíduos ao final do intervalo de tempo  $\Delta t$ . O valor da  $r_i$  positivo indica que houve crescimento populacional, a  $r_i$  igual a zero indica que a população está estável e a  $r_i$  negativo indica declínio da população até a extinção.

### **3.7 Avaliação da qualidade dos grãos de feijão-fava**

A avaliação das características qualitativas foi feita nos grãos de feijão-fava utilizados nos bioensaios de taxa instantânea de crescimento, após 35 dias de armazenamento, no qual foram avaliados o teor de água nos grãos, a massa específica aparente, a condutividade elétrica e o percentual de germinação.

#### **3.7.1 Teor de água**

O teor de água foi determinado pelo método-padrão da estufa, de acordo com a metodologia descrita pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) em triplicata que sugerem a utilização de estufa com circulação forçada de ar a  $105 \pm 3$  °C durante 24 h, em amostras de  $4,5 \pm 0,5$  g (em relação ao diâmetro do recipiente) de grãos de feijão-fava. As pesagens foram feitas em balança analítica.

#### **3.7.2 Massa específica aparente**

Massa específica aparente pode ser definida como a razão entre a massa e o volume de determinada quantidade de produto, incluindo os espaços intergranulares. A massa específica refere-se a massa de 100 L do produto. A determinação da massa específica foi realizada em balança de precisão, em recipiente de volume conhecido para posterior cálculo da massa específica, adaptado da metodologia descrita pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Para esse procedimento, os grãos foram despejados em recipiente de vidro de 160 ML e pesados em seguida, sendo realizado em quatro repetições.

#### **3.7.3 Condutividade elétrica**

No teste de condutividade elétrica foram realizadas três repetições para cada parcela do experimento, cada repetição contendo 50 grãos, esses foram pesados em balança analítica com precisão de 0,01 g e colocados em copos plásticos de 200 mL, aos quais foram adicionados 125 mL de água destilada. Foi colocado um copo somente com água destilada (controle) para utilizar no cálculo. Após, os copos foram colocados em câmara de germinação, em uma temperatura de  $25$  °C  $\pm$   $1$  °C, por um período de 24 h. Logo após esse período, os copos foram retirados da câmara para a realização das medições da condutividade elétrica da solução contendo os grãos. As leituras foram realizadas com um condutivímetro de bancada. Antes de realizar as

leituras, o aparelho foi calibrado com uma solução padrão de cloreto de sódio, de condutividade elétrica conhecida, à temperatura de  $25 \pm 1$  °C. O valor de condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) fornecido pelo aparelho foi então dividido pela massa em gramas dos 50 grãos, obtendo-se então o valor de condutividade elétrica expresso com base na massa seca da amostra, em  $\mu\text{S cm}^{-1}\text{g}^{-1}$ . Sendo portanto, a condutividade elétrica da solução contendo os grãos de feijão-fava foi medida através do “Sistema de Copo” ou “Condutividade de Massa” (VIEIRA; CARVALHO, 1994).

### **3.7.4 Germinação**

Para o teste de germinação foram utilizados 200 grãos de feijão-fava divididos em 4 repetições de 50 grãos para cada parcela do experimento, os grãos foram selecionados de forma aleatória. O teste foi realizado em papel-germitest que foi pesado e previamente umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. Os grãos foram distribuídos em duas folhas e após cobertos com mais uma folha, os papéis foram embrulhados formando rolos, esses foram colocados dentro de um saco plástico transparente, a fim de manter a umidade, e identificados. Em seguida os rolos foram colocados na posição vertical dentro de um germinador em uma temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h. A contagem inicial foi realizada após 5 dias da semeadura e a final após 9 dias, os dados foram expressos em porcentagem média de germinação, de acordo com a metodologia adaptada das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

### **3.8 Delineamento experimental e análise estatística**

Os dados de toxicidade foram submetidos à análise de Probit, utilizando-se o procedimento PROBIT do software SAS (SAS Institute, 2001), para gerar assim as curvas de tempo-mortalidade. As Razões de Toxidade (RT) foram calculadas através da razão entre o maior tempo letal e os demais tempos determinados.

O experimento de taxa instantânea de crescimento e análise de qualidade dos grãos de feijão-fava foi realizado em esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas os tratamentos com gás (oxigênio e ozônio) e nas subparcelas os tempos de exposição ( $TL_0$ ;  $TL_{10}$ ;  $TL_{30}$ ;  $TL_{50}$ ;  $TL_{70}$  e  $TL_{95}$ ) em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Os dados quantitativos foram analisados por meio de análise de variância e de regressão. Para o fator qualitativo, as médias foram comparadas, utilizando o teste de

Tukey a 5% de probabilidade. Independentemente da interação ser ou não significativa, optou-se pelo desdobramento da mesma, devido ao interesse de estudo.

Para o fator quantitativo, o modelo foi escolhido baseado na significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o teste “t” a 10, 5 e 1% de probabilidade, no coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e no fenômeno biológico. Como não foi possível o ajuste de modelos de regressão para o tratamento controle, optou-se em utilizar análise de regressão somente para o tratamento com ozônio.

Na análise de variância foi utilizado o Software SAS (SAS Institute, 2001). Para a obtenção das equações de regressão, para a plotagem dos gráficos, foi utilizado o Software SigmaPlot (SPSS, 2001).

Foi calculada a correlação linear de Pearson entre a taxa instantânea de crescimento populacional e o teor de água, massa específica aparente, percentual de germinação e condutividade elétrica dos grãos de feijão-fava utilizando o Software SAS o Software SAS (SAS Institute, 2002).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Caracterização dos grãos de feijão-fava antes do tratamento com o ozônio e oxigênio**

Os grãos de feijão-fava antes do tratamento com o ozônio e oxigênio apresentaram teor de água de 8,59%, condutividade elétrica de 30,16,  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , germinação de 98,5%, massa específica aparente de 732,2  $\text{kg m}^{-3}$  e baixo grau de infestação por insetos (2%) (Tabela 1).

Advíncula et al. (2015) avaliaram a qualidade física, fisiológica e as características morfológicas de quatro variedades e três lotes de sementes de feijão-fava, obtendo teor de umidade das variedades e lotes estudados, variando de 8,97 a 10,68% e germinação variando de 78,5 a 93%. O teor de umidade inicial dos grãos de feijão-fava encontrado neste estudo está bem próximo aos valores encontrados por esses autores. Já a germinação inicial dos grãos encontrado neste estudo foi 5,5% superior.

**Tabela 1.** Análises dos grãos de feijão-fava antes do tratamento com gás ozônio e oxigênio (controle)

<b>Análises</b>	<b>Valor</b>
Teor de água (% b.u.)	8,59
Condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ )	30,16
Germinação (%)	98,5
Massa específica aparente ( $\text{kg m}^{-3}$ )	732,2
Grau de infestação (%)	2

É importante que o grão seja mantido com baixo teor de água, em torno de 13%, pois inibe o crescimento da maioria dos microrganismos e ácaros; abaixo de 10% limita o desenvolvimento da maioria dos insetos-praga no armazenamento (FARONI; SILVA, 2008). Diante do exposto, o teor de água dos grãos deste estudo estava dentro do recomendado para favorecer a preservação da qualidade dos grãos.

Nascimento et al. (2019) destacam que a condutividade elétrica do feijão-fava varia de acordo com diferentes cultivares, esses autores encontraram valores de 0,54; 0,62; 1,07; 15,1; 41,53; 31,91  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ . A variedade Roxinha, que teve condutividade elétrica de 31,91  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , foi a que teve condutividade elétrica mais próxima da encontrada neste estudo, que teve condutividade de 30,16  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ .

Para as propriedades físicas de grãos de feijão-fava rajada *in natura* foram encontrados valores de massa específica aparente de 0,439  $\text{g cm}^{-3}$  (439  $\text{kg m}^{-3}$ ) e 0,492  $\text{g cm}^{-3}$  (492  $\text{kg m}^{-3}$ ) (SILVEIRA et al. 2019). Neste estudo foi observado valor superior, sendo justificado pela diferença de variedades.

O percentual de grãos de feijão-fava infestados por insetos foi baixo. Provavelmente isto se deve ao fato do baixo teor de água dos grãos. Uma vez que o teor de água menor que 10% b.u prejudica o desenvolvimento dos insetos-praga de grãos armazenados (FARONI; SILVA, 2008). Os insetos-praga de grãos armazenados retiram dos produtos a umidade que necessitam para seus processos vitais. Devido a isso o teor de umidade é considerado limitante para a sobrevivência do inseto (FIELDS, 1992).

#### **4.2 Toxicidade do gás ozônio**

Os períodos de exposição para controlar 50% ( $TL_{50}$ ) dos insetos foram de 8,32 e 5,11 h, quando os insetos foram distribuídos na camada superior e camada basal da câmara de fumigação, respectivamente. Para controlar 95% ( $TL_{95}$ ) dos insetos, esses períodos de exposição foram de 20,86 e 15,06 h (Tabela 2).

A equação tempo-mortalidade para as duas camadas em que os grãos e insetos foram expostos ao ozônio, apresentaram baixos valores de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ( $<3,00$ ) e valores altos de  $P$  ( $>0,05$ ), demonstrando que os dados observados ficaram muito próximos dos dados estimados, o que indica que houve adequação dos dados ao modelo de Probit para a estimativa das curvas de tempo-mortalidade.

Na camada inferior de grãos foram obtidos os menores  $TL_{50}$  e  $TL_{95}$ , apresentando assim maior toxicidade, que foi significativamente diferente da camada superior de acordo com seus intervalos de confiança.

**Tabela 2.** Toxicidade de ozônio (TL<sub>50</sub> e TL<sub>95</sub>) para *Zabrotes subfasciatus* em grãos de feijão-fava.

Posição	N	GL	Inclinação (± EP)	TL <sub>50</sub> (95% IC)	RT <sub>50</sub>	TL <sub>95</sub> (95% IC)	RT <sub>95</sub>	$\chi^2$	P
Base	1000	3	3,50±0,22	5,11 (4,80-5,43)	1,63	15,06 (13,23-17,72)	1,38	1,54	0,67
Superfície	800	2	4,12±0,35	8,32 (7,87-8,76)	-	20,86 (18,29-24,97)	-	2,46	0,29

EP = Erro padrão ; N = Número de insetos; TL = Tempo letal; IC 95% = Intervalo de confiança a 95% de probabilidade;  $\chi^2$  = Qui-quadrado; P = Probabilidade; RT= Razão de toxicidade.

Os tempos necessários para matar 50 e 95% dos insetos foram reduzidos com a diminuição da distância entre as gaiolas contendo os insetos e o ponto de injeção de ozônio. Não foi observada sobreposição nos intervalos de confiança dos tempos de exposição TL<sub>50</sub> e TL<sub>95</sub> entre as duas camadas que os insetos foram distribuídos, indicando que houve diferença significativa. Para os grãos distribuídos na camada basal a toxicidade do ozônio foi 1,63 e 1,38 vezes maior, para a TL<sub>50</sub> e TL<sub>95</sub>, respectivamente, considerando-se a razão de toxicidade. As inclinações das curvas de tempo-mortalidade variaram entre as camadas, sendo menor ( $3,50 \pm 0,22$ ) para a camada basal e maior ( $4,12 \pm 0,35$ ) para a camada superior. Valores mais elevados de inclinação da curva, indicam que pequenas variações no tempo de exposição proporcionam grandes variações na mortalidade (Tabela 2).

Para *Rhyzopertha dominica* o tempo de exposição para a toxicidade do ozônio também se elevou à medida que as gaiolas contendo os insetos se distanciaram do ponto de injeção do gás. Assim, o menor tempo para mortalidade de 50% (TL<sub>50</sub>) e 95% (TL<sub>95</sub>) ocorreu quando os insetos foram distribuídos na parte basal da câmara de fumigação. Os valores de tempo letal para este inseto foram TL<sub>50</sub> de 8,69 h e TL<sub>95</sub> de 11,28 h quando os insetos foram distribuídos no *plenum*, TL<sub>50</sub> de 13,08 e TL<sub>95</sub> de 18,11 h quando os insetos estavam na camada superfície. Este fato pode ser explicado pela variação na concentração de gás ao longo da coluna de grãos, já que a concentração de ozônio na coluna de grãos depende da resistência que o grão oferece à passagem do gás. Quanto mais próximo ao ponto de injeção do gás, maior a toxicidade (SILVA et al., 2016). Isikber; Oztekin (2009) também observaram para *Ephestia kuehniella* e *Tribolium confusum* que a toxicidade maior do ozônio ocorreu quando os insetos estavam mais próximos ao ponto de injeção do gás.

Para manter concentrações letais de ozônio para os insetos em toda a coluna de grãos uma das medidas que pode ser tomada é a injeção do ozônio em vários pontos, afim de manter altas concentrações de ozônio por toda a câmara de fumigação (HARDIN et al., 2010).

O ozônio é altamente reativo e decai rapidamente quando entra em contato com os grãos (MCDONOUGH et al., 2011). A degradação do ozônio em oxigênio pode levar à redução da mortalidade do inseto (PANDISELVAM et al., 2019). Isso pode explicar o maior tempo necessário para ocasionar uma maior mortalidade na camada superior, uma vez que o gás precisou percorrer a camada de grãos até chegar nas

gaiolas contendo os insetos, o que não ocorreu quando os insetos foram colocados sobre o *plenum*.

O processo de aplicação do ozônio nos grãos apresenta duas fases. Na primeira fase, o ozônio ao entrar em contato com os grãos se degrada em oxigênio muito rápido, após a saturação dos locais onde ocorre a degradação do gás, esse começa a fluir livremente pela massa de grãos com pouca degradação e movimentação mais lenta, sendo caracterizado como a segunda fase (KELLS et al., 2001).

Estudo realizado para testar o efeito inseticida do ozônio no controle de *C. maculatus*, comprovaram que a mortalidade para as diferentes fases aumentou com o aumento da concentração e tempo de exposição. Sendo assim, o ozônio se destaca como uma alternativa atraente aos fumigantes sintéticos para controle de *C. maculatus* (PANDISELVAM et al., 2019).

No primeiro momento o ozônio age sobre a membrana celular dos microrganismos, provocando a oxidação de glicolípidios, glicoproteínas e aminoácidos na parede celular, alterando a permeabilidade da membrana e provocando rápida lise celular. O ozônio também atua nos grupos sulfidrilas nas enzimas, desativando algumas atividades das enzimas celulares. Tem também ação sobre material nuclear dos microrganismos, alterando as bases de ácidos nucleicos, purina e a pirimidina. A decomposição do ozônio pode resultar na formação de radicais intermediários OH, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HO<sub>2</sub>, que assim como o O<sub>3</sub> pode provocar estresse oxidativo (SERRAZANETTI et al., 2009; SILVA et al., 2011; TIWARI et al., 2009).

Para manter a suscetibilidade dos insetos ao ozônio é necessário adotar medidas de manejo integrado, utilizando o ozônio na concentração correta e aplicando de forma alternada com outros inseticidas, afim de evitar que os insetos apresentem resistência ao gás.

#### **4.3 Taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ )**

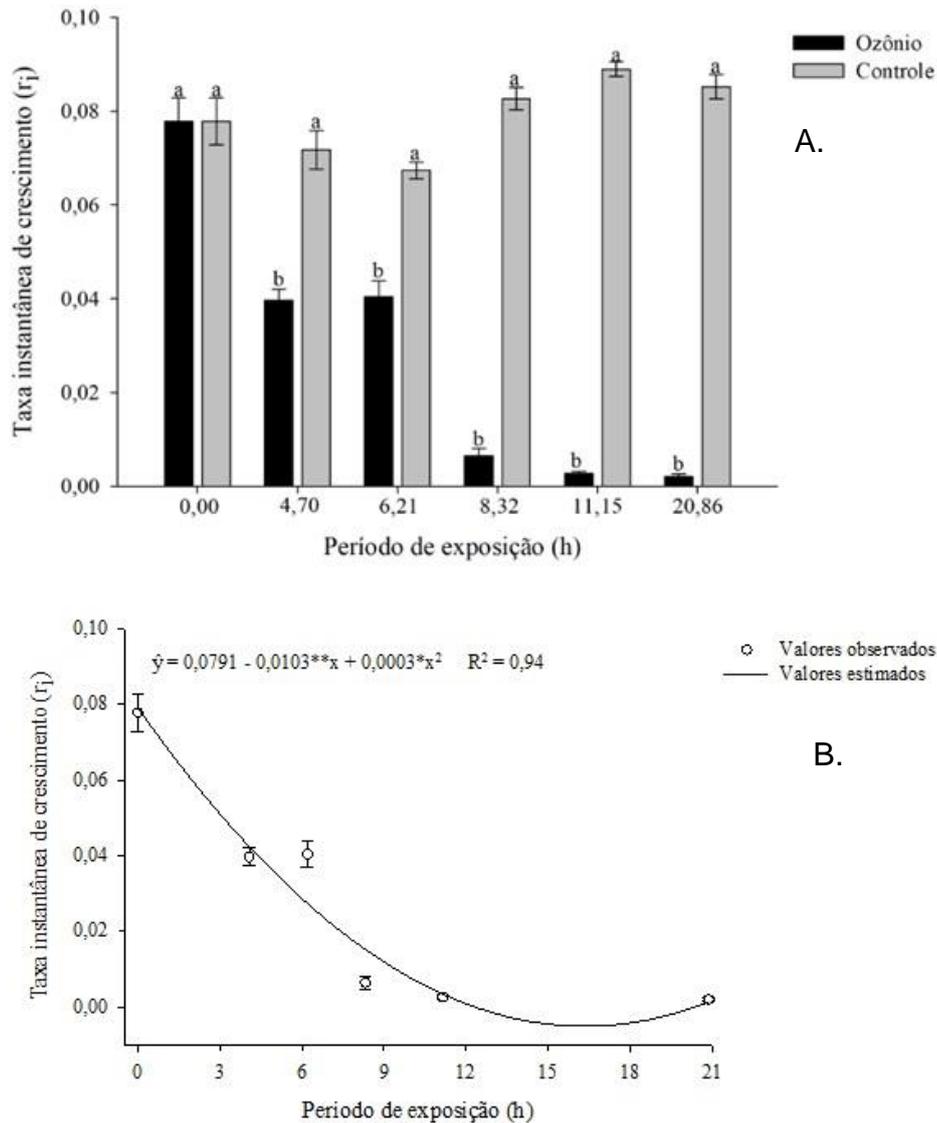
Um fator que é influenciado pelo ozônio é a taxa instantânea de crescimento populacional ( $r_i$ ) dos insetos, que mede a capacidade de uma população para aumentar exponencialmente ao longo do tempo (HALL, 1964). Para o cálculo da  $r_i$  é utilizado a quantidade inicial e final da população de insetos, em um determinado período de tempo. Sendo um modelo de fácil utilização, do ponto de vista experimental, pois apresenta resultado rápido (WALTHALL; STARK, 1997).

Os grãos de feijão-fava foram expostos ao gás ozônio por 0; 4, 07; 6, 21; 8, 32; 11, 15 e 20, 86 h que corresponde aos tempos letais TL<sub>0</sub>, TL<sub>10</sub>, TL<sub>30</sub>, TL<sub>50</sub>, TL<sub>70</sub> e TL<sub>95</sub>, respectivamente, obtidos no teste de toxicidade na camada superior dos grãos.

A taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ) de *Z. subfasciatus* foi influenciada significativamente pelos tratamentos com o gás ozônio e tratamento controle ( $F^{1,6}=486,8169$ ;  $P<0,01$ ). Também houve variação significativa da  $r_i$  entre os períodos de exposição ao ozônio ( $F^{5,30}=19,3655$ ;  $P<0,01$ ). Constatou-se interação significativa na  $r_i$  entre os tipos de gases utilizados (ozônio e oxigênio) e períodos de exposição ( $F^{5,30}=49,4857$ ;  $P<0,01$ ).

Observou-se diferença significativa na taxa instantânea de crescimento de *Z. subfasciatus* entre os tratamentos com o gás ozônio e o tratamento controle, para todos os períodos de exposição, exceto para o tempo zero. Em geral, o tratamento controle apresentou valores médios de  $r_i$  estatisticamente superior, em relação ao tratamento com o gás ozônio (Figura 4A).

A  $r_i$  de *Z. subfasciatus* expostos ao ozônio, nos diferentes períodos de exposição ajustou-se a curva de regressão quadrática (Figura 4B). A taxa instantânea de crescimento de *Z. subfasciatus* decresceu à medida que se elevou o período de exposição dos grãos de feijão-fava ao gás ozônio. A  $r_i$  de *Z. subfasciatus* reduziu de 0,077 para 0,002, no tratamento com ozônio, obtendo-se um percentual de redução de 97,4% em relação ao TL<sub>0</sub>. Em relação ao tratamento controle, não foi possível o ajuste de modelo de regressão, pois nesse tratamento a  $r_i$  variou de 0,07 a 0,08, nos diferentes períodos de exposição. Para ozônio e oxigênio em todos os tempos de exposição houve  $r_i$  positiva, indicando que houve aumento da população de *Z. subfasciatus*. No entanto, é possível observar que houve uma diminuição da  $r_i$  à medida que se aumentou o tempo de exposição ao ozônio, sendo a menor  $r_i$  obtida nos maiores tempos de exposição. Na derivação da equação de regressão foi encontrado ponto médio 17,16 h, o qual é o tempo mínimo necessário para provocar máxima redução da taxa instantânea de crescimento (Figura 4B).



**Figura 4.** Taxa instantânea de crescimento (Média  $\pm$  EP) de *Zabrotes subfasciatus* em grãos de feijão-fava expostos ao gás ozônio e gás oxigênio (controle), em diferentes períodos de exposição. Médias seguidas com a mesma, para cada período de exposição, não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (A). \*Significativo a 5%, \*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.  $R^2$  (coeficiente de determinação) (B).

A taxa instantânea de crescimento de *R. dominica* foi influenciada significativamente, quando os insetos foram submetidos ao ozônio em uma concentração de  $1,61 \text{ mg L}^{-1}$  em grãos de trigo, após 60 dias de armazenamento, com exceção do  $TL_{10}$ , que foi estatisticamente igual ao controle. A  $r_i$  de *R. dominica* decresceu à medida que aumentou o tempo de exposição dos grãos de trigo ao gás ozônio, entretanto o ar atmosférico, utilizado como controle, não afetou a  $r_i$  de *R. dominica* em nenhum dos períodos de exposição (SILVA et al., 2016). Corroborando assim com os resultados encontrados neste estudo.

Um dos fatores que podem influenciar a toxicidade do ozônio sobre os insetos é o tempo de exposição (PANDISELVAM et al., 2019). Vários estudos concluem que à medida que se eleva o período de exposição ocorre aumento na mortalidade dos insetos (PANDISELVAM et al., 2019; SILVA et al., 2016) e por consequência ocorre uma diminuição na sua taxa instantânea de crescimento populacional. Neste estudo, os maiores tempos letais ocasionaram uma maior mortalidade dos insetos, provocando uma diminuição na  $r_i$ .

Este estudo indica que a mortalidade parental de *Z. subfasciatus* está diretamente relacionada à diminuição da produção de progênie, uma vez que quando os insetos foram expostos ao TL<sub>95</sub>, houve uma maior mortalidade, causando efeitos adversos ao crescimento populacional, o que ocasionou uma menor  $r_i$  quando os insetos foram expostos a esse tempo letal.

O ozônio suprimiu efetivamente a produção de progênie adulta de *Tribolium castaneum* (Herbst), *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus), *Sitophilus zeamais* Motschulsky e *Sitophilus oryzae* (Linnaeus), havendo uma redução na população em função do tempo de exposição ao ozônio. Sendo este gás um fumigante alternativo viável para o controle dessas quatro espécies de pragas resistentes a fosfina (E et al., 2017).

Observou-se que os tempos subletais utilizados no bioensaio de  $r_i$ , mesmo não provocando alta mortalidade dos insetos, afetou seu crescimento populacional, podendo este efeito ser ocasionado pelo ozônio prejudicando a reprodução e desenvolvimento dos insetos. A utilização de tempos curtos representa um ganho econômico, uma vez que haverá um menor tempo de exposição, por consequência redução dos custos de aplicação da tecnologia. E ainda, diminui os riscos de problemas futuros de resistência.

Para se ter sucesso no controle de pragas de grãos armazenados é necessário a adoção de diferentes métodos que é uma prática fundamental para evitar a resistência de insetos a um único método de controle. Devido aos problemas de insetos resistentes a inseticidas, que é crescente no país, torna-se necessário a utilização de métodos integrados e não apenas o químico (LORINI et al., 2015).

O efeito observado no crescimento populacional de *Z. subfasciatus* é de grande importância para a integração à programas de manejo de pragas de grãos armazenados, já que os tempos subletais podem ser uma técnica de grande utilidade para integrar o uso de controle químico e atmosferas modificadas. Os tempos

subletais podem reduzir a população de insetos a níveis em que seja utilizado uma quantidade menor de produtos químicos, e assim reduzir a aplicação quase que exclusiva de fosfina que é usada no controle curativo.

A utilização da integração de métodos possíveis de serem realizados durante o armazenamento e um monitoramento adequado, os quais, integrados a medidas preventivas e curativas de controle de pragas, permitirão que os grãos sejam armazenados isentos de insetos, evitando a perdas quantitativas e qualitativas (LORINI et al., 2015).

Na avaliação da toxicidade de ozônio a 16 populações de *T. castaneum*, 11 populações de *R. dominica* (F.) e nove populações de *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Silvanidae) recolhidas a partir de seis regiões do Brasil, sendo que essas populações também foram usadas para comprovar se existe resistência cruzada ao ozônio e fosfina. Concluíram que todas as populações foram sensíveis ao ozônio e que não havia resistência cruzada aos dois gases ozônio e fosfina (SOUSA et al., 2008). Isto implica na possibilidade da utilização do ozônio integrado com a fosfina.

Os resultados deste estudo indicam que o ozônio poderá tornar-se uma alternativa ao uso de produtos químicos, já que este gás apresentou toxicidade a *Z. subfasciatus* em grãos de feijão-fava e influenciou a taxa instantânea de crescimento populacional.

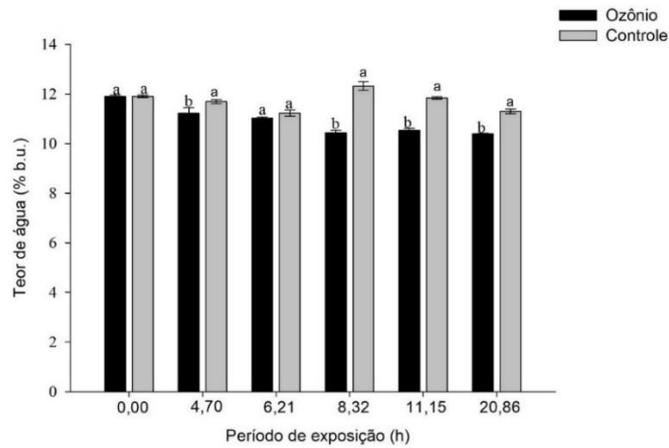
#### **4.4 Avaliação da qualidade dos grãos de feijão- fava**

Para todos os parâmetros avaliados, quando foi analisado o fator quantitativo, não foi possível ajustar modelo de regressão para o tratamento com oxigênio, mostrando que o oxigênio não apresentou influência no parâmetros avaliados.

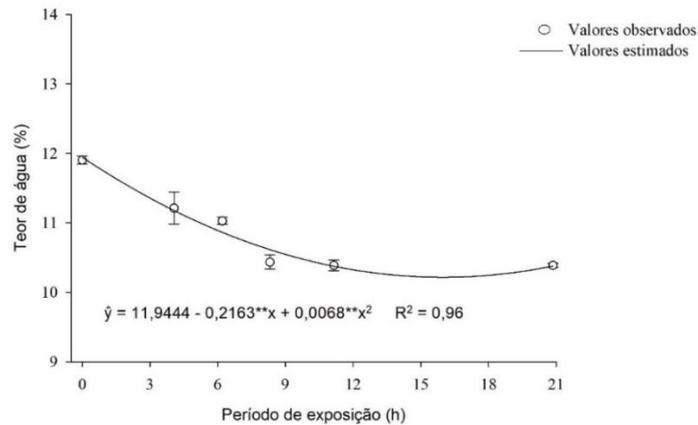
##### **4.4.1 Teor de água**

Observa-se que houve diferença significativa do teor de água entre os grãos submetidos ao ozônio e controle ( $P < 0,05$ ), após 35 dias de armazenamento, exceto para os períodos 0 h e 6,21 h. O teor de água no tratamento controle apresentou valores médios estatisticamente superiores para todos os períodos de exposição, exceto para o período de exposição 6,21 h, em relação ao tratamento com o gás ozônio. O período de exposição ao ozônio de 4,70 h apresentou o maior valor médio

de teor de água (11,90 % b.u), já no tratamento controle o período de 8,32 h apresentou o maior valor médio de teor de água (12,31 % b.u) (Figura 5A).



A.



B.

**Figura 5.** Teor de água (Média  $\pm$  EP) dos grãos de feijão-fava expostos ao gás ozônio e gás oxigênio (controle), em diferentes períodos de exposição. Médias seguidas com a mesma, para cada período de exposição, não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (A). \*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.  $R^2$  (coeficiente de determinação) (B).

O teor de água dos grãos de feijão-fava expostos ao ozônio, nos diferentes períodos de exposição ajustou-se a curva de regressão quadrática. O teor de água decresceu à medida que se elevou o período de exposição dos grãos de feijão-fava ao gás ozônio, reduzindo de 11,90 (% b.u) para 10,38 (% b.u). Na derivação da equação de regressão foi encontrado ponto médio 15,9 h, o qual é o tempo mínimo necessário para máxima redução do teor de água dos grãos (Figura 5B). No tratamento controle o teor de água variou de 11,22 a 12,31 (% b.u), nos diferentes períodos de exposição (Figura 5B).

Observou-se correlação significativa e positiva entre a taxa instantânea de crescimento ( $r_i$ ) e o teor de água dos grãos de feijão-fava expostos ao ozônio,

mostrando que houve um aumento no teor de água com o aumento da  $r_i$  de *Z. subfasciatus*. Para o tratamento controle foi observada correlação positiva e não significativa entre a  $r_i$  e o teor de água dos grãos de feijão-fava (Tabela 3).

**Tabela 3.** Estimativa dos coeficientes de correlação linear de Pearson entre a taxa instantânea de crescimento de *Zabrotes subfasciatus* e o teor de água, massa específica, percentual de germinação e condutividade elétrica dos grãos de feijão-fava expostos aos tratamentos com gás ozônio ou oxigênio (controle).

Correlações	Controle		Ozônio	
	n	r	n	r
Taxa instantânea de crescimento x Teor de água	24	0,363 <sup>ns</sup>	24	0,885 <sup>**</sup>
Taxa instantânea de crescimento x Massa específica	24	0,334 <sup>ns</sup>	24	-0,838 <sup>**</sup>
Taxa instantânea de crescimento x Percentual de germinação	24	0,650 <sup>**</sup>	24	-0,795 <sup>**</sup>
Taxa instantânea de crescimento x Condutividade elétrica	24	0,701 <sup>**</sup>	24	0,881 <sup>**</sup>

n=Número de amostra; r = Coeficiente de correlação; ns não significativo e \*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

O teor de umidade é considerado o fator mais importante que atua no processo de deterioração de grãos armazenados. Mantendo-se este em níveis baixos, os demais terão seus efeitos gradualmente diminuídos: menor ataque de microrganismos e diminuição da respiração dos grãos (SILVA et al., 2008).

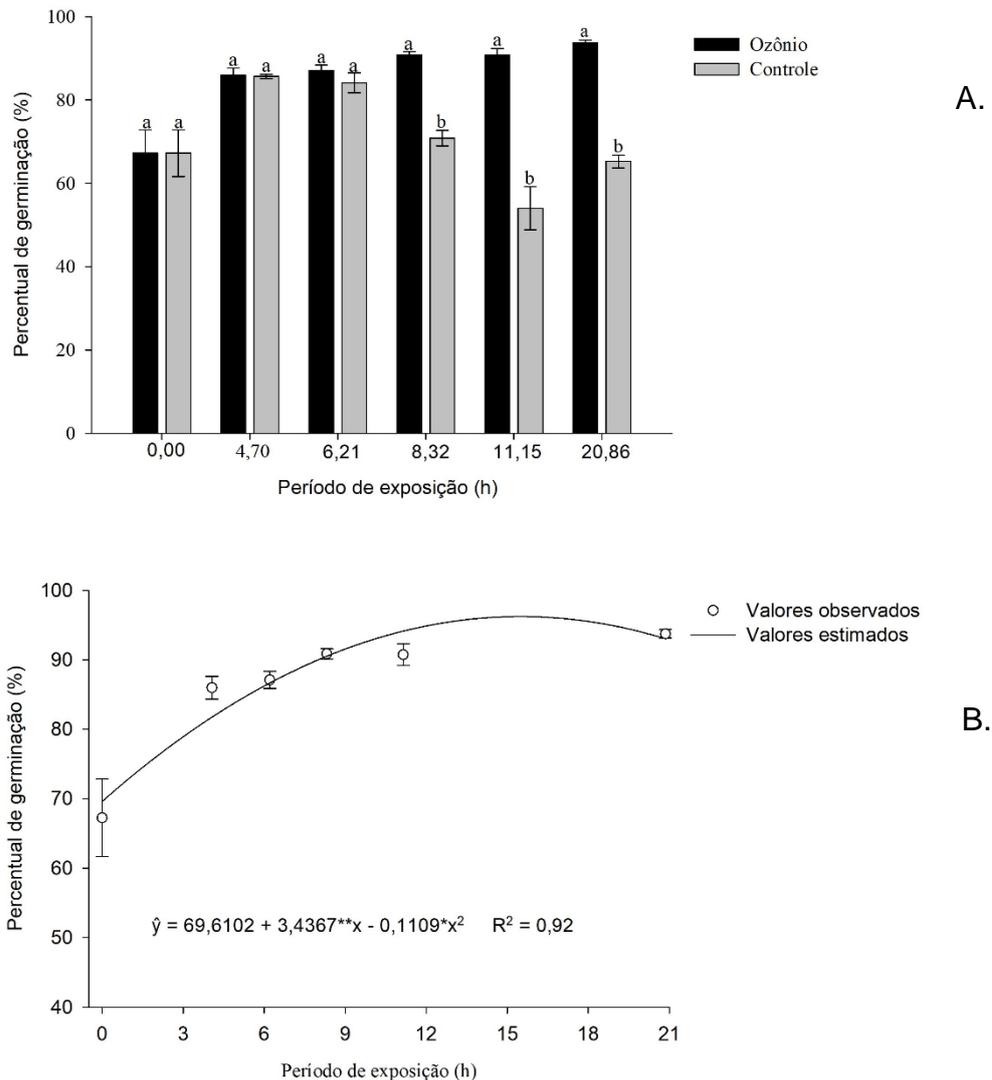
Os resultados do teor de água dos grãos de milho expostos ao ozônio e ar atmosférico, mostraram uma relação com o grau de infestação por insetos. Observou-se que, quanto maior o percentual de grãos infestados, maior foi o teor de água dos grãos (PEREIRA et al., 2007). Resultados semelhantes foram encontrados neste estudo, observando-se que quanto maior a  $r_i$  maior foi o teor de água nos grãos.

Houve uma correlação positiva significativa entre a taxa de crescimento instantâneo e o teor de umidade dos grãos de trigo expostos ao ozônio, ou seja, o teor de umidade dos grãos de trigo aumentou com o aumento da taxa de crescimento instantâneo de *R. dominica* (SILVA et al., 2016). Corroborando com os resultados deste estudo.

O teor de umidade dos grãos de milho armazenados e infestados com *S. zeamais* foi aumentado devido a ocorrência de maiores taxas de crescimento populacional do inseto, devido ao metabolismo do inseto é produzido  $H_2O$ , o que induz o aumento no teor de umidade dos grãos (ALVES et al., 2008). Esse inseto é praga primária de milho e outros grãos, tendo a capacidade de romper um grão intacto, danificando seu tegumento. Quando o tegumento é danificado, o grão acelera seu metabolismo, aumentando a taxa respiratória. A respiração ocorre quando o oxigênio se difunde livremente para o tecido que está respirando, sendo tanto mais rápida quanto menor for a restrição das membranas à troca de gases (ALVES et al., 2008). Isso pode explicar a correlação significativa e positiva da  $r_i$  com o teor de água dos grãos de feijão-fava neste estudo, pois *Z. subfasciatus* também é classificado com praga primária, que assim como *S. zeamais* tem a capacidade de romper o tegumento dos grãos, conseqüentemente aumentando a respiração dos grãos e teor de água.

#### 4.4.2 Percentual de Germinação

Observou-se que houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) da germinação entre os grãos submetidos ao ozônio e controle nos períodos de 8,32 h, 11,15 h e 20,86 h, já para os períodos 0 h, 4,70 h e 6,21 h não foi observado diferença significativa ( $P > 0,05$ ) (Figura 6A).



**Figura 6.** Percentual de germinação (Média  $\pm$  EP) dos grãos de feijão-fava expostos ao gás ozônio e gás oxigênio (controle), em diferentes períodos de exposição. Médias seguidas com a mesma, para cada período de exposição, não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (A). \*Significativo a 5%, \*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.  $R^2$  (coeficiente de determinação) (B).

A germinação dos grãos de feijão-fava expostos ao ozônio, nos diferentes períodos de exposição ajustou-se a curva de regressão quadrática. O percentual de germinação aumentou à medida que se elevou o período de exposição, aumentando de 67% para 93%. No tratamento controle a germinação variou de 54% a 85% (Figura 6B). O maior período de exposição ao ozônio ocasionou uma menor infestação de insetos, o que explica o maior percentual de germinação no maior tempo de exposição, já que nesse houve uma menor infestação e por consequência menor consumo dos grãos pelos insetos. Na derivação da equação de regressão foi

encontrado ponto médio 15, 49 h, o qual é o tempo mínimo necessário para provocar mínima redução da germinação dos grãos (Figura 6B).

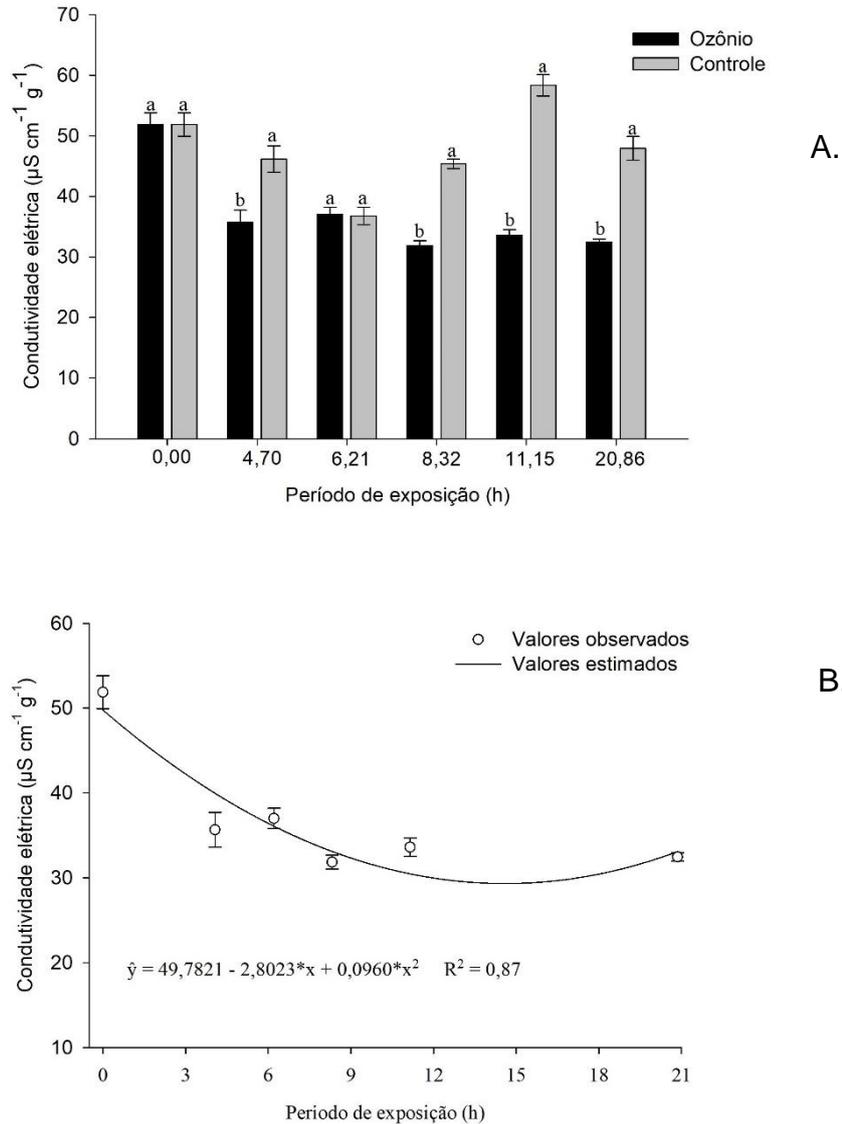
Observou-se correlação significativa e negativa entre a taxa instantânea de crescimento e a germinação dos grãos de feijão-fava expostos ao ozônio, mostrando que houve uma diminuição da germinação com o aumento da  $ri$  de *Z. subfasciatus*. Para o tratamento controle também foi observada correlação negativa e significativa entre a  $ri$  e a germinação dos grãos de feijão-fava (Tabela 3).

Em estudo com *R. dominica* em grãos de trigo, foi observado que a porcentagem de germinação dos grãos de trigo foi negativamente correlacionada com a taxa de crescimento instantâneo do inseto. A correlação entre a porcentagem de germinação dos grãos de trigo expostos ao ozônio e a  $ri$  de *R. dominica* foi significativa e negativa, indicando que a germinação dos grãos de trigo diminuiu com a crescente infestação de *R. dominica* (SILVA et al., 2016). No presente estudo também foi observado uma diminuição da germinação com o aumento da  $ri$ .

A larva ao se alimentar no interior dos grãos, acaba consumindo o endosperma e o embrião dos grãos, o que resulta em redução da germinação (LAZZARI; LAZZARI, 2009). Isso pode explicar a diminuição da germinação com o aumento da  $ri$ , uma vez que quando maior a quantidade de insetos, maior será o consumo dos grãos e os danos nos tecidos que são essenciais no processo de germinação.

#### **4.4.3 Condutividade elétrica**

Observa-se que houve diferença significativa da condutividade elétrica da solução contendo os grãos submetidos ao ozônio e controle ( $P < 0,05$ ), o tratamento controle apresentou valores médios superiores para todos os períodos de exposição, em relação ao tratamento com ozônio, exceto para o período 0 h e 6,21 h, que foram estatisticamente iguais ( $P > 0,05$ ) (Figura 7A).



**Figura 7.** Condutividade elétrica  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$  (Média  $\pm$  EP) dos grãos de feijão-fava expostos ao gás ozônio e gás oxigênio (controle), em diferentes períodos de exposição. Médias seguidas com a mesma, para cada período de exposição, não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (A). \*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.  $R^2$  (coeficiente de determinação) (B).

A condutividade elétrica da solução contendo os grãos de feijão-fava expostos ao ozônio, nos diferentes períodos de exposição ajustou-se a curva de regressão quadrática. A condutividade diminuiu à medida que se elevou o período de exposição. Observou-se que a condutividade decresceu de  $51,88 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$  para  $32,47 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ . No tratamento controle a condutividade elétrica da solução variou de  $36,76 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$  a  $58,34 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ , nos diferentes períodos de exposição (Figura 7B). Na derivação da equação de regressão foi encontrado ponto médio 14,59 h, o qual é o tempo mínimo necessário para máxima redução da condutividade elétrica (Figura 7B).

Observou-se correlação significativa e positiva entre a taxa instantânea de crescimento e a condutividade da solução contendo os grãos de feijão-fava expostos ao ozônio, mostrando que houve um aumento da condutividade com o aumento da  $r_i$  de *Z. subfasciatus*. Para o tratamento controle também foi observada correlação positiva e significativa entre a  $r_i$  e a condutividade elétrica da solução contendo os grãos de feijão-fava (Tabela 3).

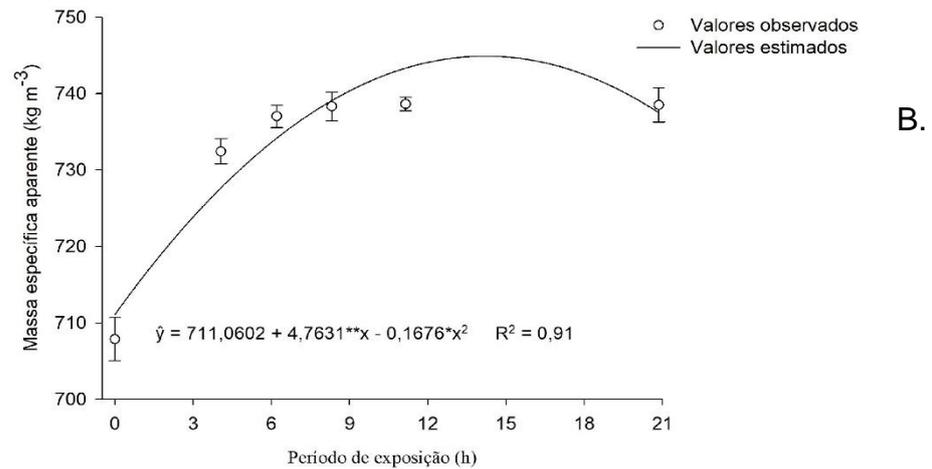
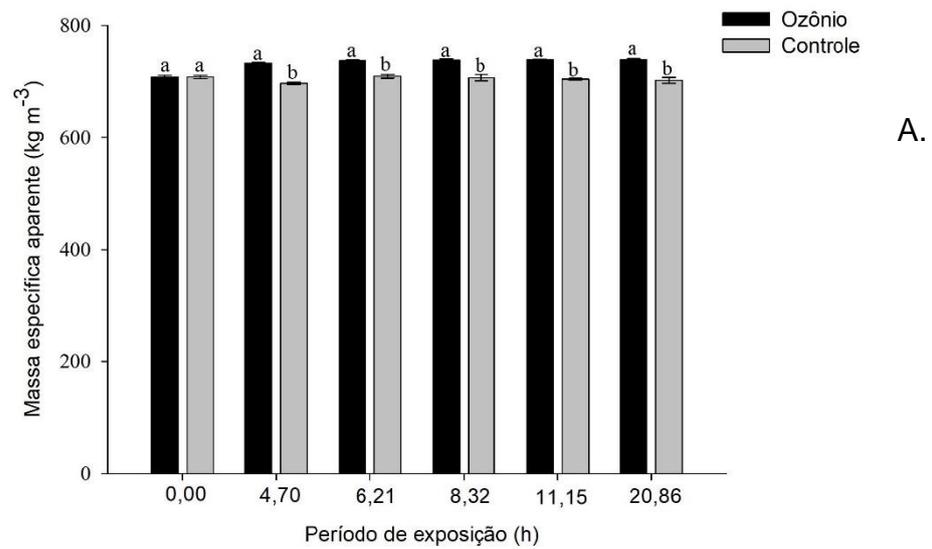
Os resultados condutividade elétrica da solução contendo os grãos de milho expostos ao ozônio e ar atmosférico, mostraram uma relação com o grau de infestação por insetos. Observou-se que, quanto maior o percentual de grãos infestados, maior foi a condutividade elétrica da solução contendo os grãos de milho (PEREIRA et al., 2007).

Foi observada uma relação da condutividade elétrica da solução contendo os grãos de trigo com o grau de infestação de *R. dominica*, quando os grãos foram expostos ao ar atmosférico e quando exposto ao ozônio no período de exposição de 10,11 h, observou-se alta condutividade elétrica e alta taxa taxa instantânea de crescimento de *R. dominica*, após 60 dias de armazenamento (SILVA et al., 2016). Esse comportamento também foi observado no presente estudo.

O teste de condutividade elétrica é um dos mais empregados na avaliação da qualidade fisiológica de sementes. O valor da condutividade elétrica está diretamente ligado com a integridade das membranas celulares, uma vez que é função da quantidade de lixiviados da solução de embebição das sementes. Assim, baixos valores de condutividade (baixa lixiviação) indicam que as sementes apresentam alta qualidade, enquanto valores elevados estão relacionados a sementes de qualidade inferior (VIERA; CARVALHO, 1994; WOODSTOCK, 1973). Isso pode explicar o comportamento da condutividade elétrica encontrada neste estudo, uma vez que quanto maior a quantidade de insetos, maior será os danos no tegumento e membranas dos grãos, sendo maior a quantidade de lixiviados na solução, indicando uma maior deterioração dos grãos.

#### **4.4.4 Massa específica aparente**

Para a variável massa específica aparente, observa-se que houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os grãos submetidos ao ozônio e controle, exceto no período de 0 h ( $P > 0,05$ ) (Figura 8A).



**Figura 8.** Massa específica aparente  $\text{kg m}^{-3}$  (Média  $\pm$  EP) dos grãos de feijão-fava expostos ao gás ozônio e gás oxigênio (controle), em diferentes períodos de exposição. Médias seguidas com a mesma, para cada período de exposição, não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (A). \*Significativo a 5%, \*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.  $R^2$  (coeficiente de determinação) (B).

A da massa específica aparente dos grãos de feijão-fava expostos ao ozônio nos diferentes períodos de exposição ajustou-se a curva de regressão quadrática. A massa específica aparente aumentou à medida que se elevou o período de exposição ao ozônio, aumentando de  $732,44 \text{ kg m}^{-3}$  para  $738,51 \text{ kg m}^{-3}$ . No tratamento controle a massa variou de  $696,75 \text{ kg m}^{-3}$  a  $707,84 \text{ kg m}^{-3}$ . (Figura 8B). Na derivação da equação de regressão foi encontrado ponto médio  $14,21 \text{ h}$ , o qual é o tempo mínimo necessário para mínima redução da massa específica aparente (Figura 8B).

Observou-se correlação significativa e negativa entre a taxa instantânea de crescimento e a massa específica aparente dos grãos de feijão-fava expostos ao ozônio, mostrando que houve uma diminuição da massa específica aparente com o aumento da  $r_i$  de *Z. subfasciatus*. Para o tratamento controle foi observada correlação negativa e não significativa entre a  $r_i$  e a massa específica aparente dos grãos de feijão-fava (Tabela 3).

Pereira et al. (2007) observaram que durante o processo de fumigação com o ozônio e com o ar atmosférico, a massa específica aparente dos grãos de milho, diminuiu ao longo do armazenamento proporcionalmente ao aumento do grau de infestação. Os autores destacam que a redução da massa específica durante o armazenamento foi causada pelo aumento da infestação por insetos e pelo aumento do teor de água dos grãos.

A correlação entre  $r_i$  e a massa específica de *R. dominica* foi significativa e negativa, mostrando que a massa específica dos grãos de trigo diminuiu quando a infestação por *R. dominica* aumentou (SILVA et al., 2016). Corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

*Zabrotes subfasciatus* é classificado como praga primária interna e alimenta-se do conteúdo interno dos grãos, o que causa redução do seu peso, causando uma diminuição também da massa específica aparente (LAZZARI; LAZZARI, 2009). Isso pode explicar a diminuição da massa específica com o aumento da  $r_i$ , pois uma maior quantidade de insetos provocou maior consumo dos grãos, diminuindo seu peso e massa específica.

Nenhum efeito negativo na qualidade e nas características nutricionais do trigo, milho e arroz foi verificado, quando submetidos a um tratamento com 50 mg kg<sup>-1</sup> de ozônio durante 30 dias (MENDEZ et al., 2003).

Quando foi avaliado a suscetibilidade dos adultos de *S. zeamais* e *T. castaneum* a qualidade fisiológica dos grãos de milho submetidos ao tratamento com ozônio, em diferentes camadas da massa de grãos, submetidos a uma atmosfera modificada com 50 mg kg<sup>-1</sup> de ozônio, foi constatado que os tratamentos com atmosfera modificada com ozônio e com ar atmosférico, não afetaram a qualidade fisiológica dos grãos de milho (ROZADO et al., 2008).

## 5 CONCLUSÃO

O ozônio apresentou toxicidade sobre *Zabrotes subfasciatus* em grãos de feijão-fava e influenciou a taxa instantânea de crescimento populacional destes insetos, reduzindo sua população. Não foi observada redução na qualidade física e fisiológicas dos grãos de feijão-fava expostos ao ozônio, após 35 dias de armazenamento. Portanto, o ozônio apresenta potencial para ser utilizado no controle de *Z. subfasciatus* em grãos armazenados.

## REFERÊNCIAS

- ADVÍNCULA, T. L.; NADAI, F.B.; NOBRE, D. A.; FERREIRA, É. N. M. B.; BRANDÃO JÚNIOR, D. S.; COSTA, C. A. Qualidade física e fisiológica de sementes de *Phaseolus lunatus* L. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.10, n.3, p.341-346, 2015.
- AFONSO, A. D. L.; SILVA, J. S. BERBERT, P. A. Controle de pragas por atmosferas controladas In: SILVA, J. S. **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas**. Viçosa, p. 407-416, 2000.
- ALVES, W. M.; FARONI, L. R. A.; ALENCAR, E. R.; PAES, J. L. Influência do inseto-praga *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera-Curculionidae) na taxa respiratória e na perda de matéria seca durante o armazenamento de milho. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, MG, v.16, n.3, 260-269, 2008.
- AMOA, B. A.; MAHROOF, R.M. Susceptibility of the life stages of cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (F.) (Coleoptera: Anobiidae) to ozone. **Journal of Stored Products Research**, v. 78, p. 11-17, 2018.
- ATHIÉ I.; PAULA D. C. **Insetos de grãos armazenados: aspectos biológicos e identificação**. 2ª ed, São Paulo, Varela, 244p, 2002.
- AZEVEDO, J.N.; FRANCO, L.J.D.; ARAÚJO, R.O.C. Composição química de sete variedades de feijão-fava. Teresina: Embrapa Meio-Norte, **comunicado técnico**, n.152, 4p, 2003.
- BAUDOIN, J. P. Genetic resources, domestication and evolution of lima bean, *Phaseolus lunatus*. In: Gepts, P. (ed.). Genetic resources of *Phaseolus* bean. Amsterdam: Kluwer **Academic Publishers**, p.393-407, 1988.
- BAUDOIN, J. P.; ROCHA, O.; DEGREEF, J.; MAQUET, A.; GUARINO, L. Ecogeography, demography, diversity and conservation of *Phaseolus lunatus* L. in the central valley of Costa Rica. Systematic and ecogeographic studies on crop genepools. **Int Plant Genet Resourc Inst**, Rome, 2004.
- BRAGANTINI, C. **Alguns aspectos do armazenamento de sementes e grãos de feijão**. Santo Antônio de Goiás. Embrapa Arroz e Feijão. 28p. 2005.
- BRASIL. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Brasília, 399p. 2009.
- BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Norma Regulamentadora N° 15 – Atividades e Operações Insalubres, Portaria GM nº. 3,214, de 08 de junho de 1978, publicada no **Diário Oficial da União** de 06.07.1978, Brasília, DF.
- BEIRÃO-DA-COSTA, S.; MOURA-GUEDES M. C.; FERREIRA-PINTO M. M.; EMPIS, J.; MOLDÃO-MARTINS, M. Alternative sanitizing methods to ensure safety

and quality of fresh-cut kiwifruit. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.38, n. 01, p.1-10, 2014.

BROOKER, D.B.; BARKER-ARKEMA, F. W.; HALL, C. W. Drying and storage of grains and oilseeds. New York; Van Nostrand Reinhold, 450p, 1992.

CFR (Code of Federal Regulations). **Contaminantes do ar**. Título 29, vol. 6, parte 1910. Office Federal Register, Washington, DC, 1997.

CHIATTONE, P. V.; TORRES, L. M.; ZAMBIAZI, R. C. Application of ozone in industry of food. **Alimentos e Nutrição, (Brazilian Journal of Food and Nutrition)**, v.19, n. 03, p.341-349, 2008.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutas e hortaliças : fisiologia e manuseio. 2. ed. rev. amp. 2005. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005

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

COELHO, C. C. DE S.; FREITAS-SILVA, O.; CAMPOS, R. DA S.; BEZERRA, V. S.; CABRAL, L. M. C. Ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de frutas e hortaliças: Uma revisão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.19, n.04, p.369–375, 2015.

CORRÊA, P. C.; SILVA, J. S. Estrutura, composição e propriedades dos grãos In: SILVA, J. S. **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas**. Viçosa, p. 21-37, 2008.

COSTA, J.T.; FORIM, M.R.; COSTA, E.S.; SOUZA, J.R.; MONDEGO, J.M.; BOIÇA JUNIOR, A.L. Effects of different formulations of neem oil-based products on control *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Bruchidae) on beans. **Journal of Stored Products Research**, v. 56, p. 49-53, 2014.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira – Sétimo Levantamento, julho de 2018**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/index.php/info-agro/safras>. Acesso em: 19/07/2018.

DOBIE, P.; HAINES, C.P.; HODGES, R. J.; PREVETT, P. F. Insects and arachnids of tropical stored products, their biology and identification: a training manual. UK, **Tropical Development and Research Institute**, 273p.1984.

E, X.; LI, B.; SUBRAMANYAM, B. Efficacy of ozone against adults and immature stages of phosphine susceptible and resistant strains of *Rhyzopertha dominica*. **Journal of Stored Products Research**, v. 83, p. 110-116, 2019.

E, X.; SUBRAMANYAM, B.; LI, B. Efficacy of ozone against phosphine susceptible and resistant strains of four stored-product insect species. **Insects**, v. 8, n. 02, p. 1-14, 2017.

FARONI, L. R. A.; SOUSA, A. H. Aspectos biológicos e taxonômicos dos principais insetos-praga de produtos armazenados. In: ALMEIDA, F. DE A. C.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C. **Tecnologia de Armazenagem em sementes**, Cap.7, p.371-402, 2006.

FARONI, L. R. A.; SILVA, J.S. Manejo de pragas no ecossistema de grãos armazenados. In: SILVA, J. S. (Ed). **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas**. Viçosa: **Aprenda Fácil** p. 371-406, 2008.

FIELDS, P. G. The control of stored-product insects and mites with extreme temperatures, **Journal of Stored Products Research**, v. 28, n. 02, p. 89–118, 1992.

FREITAS-SILVA, O.; VENÂNCIO, A. Ozone applications to prevent and degrade mycotoxins: A review. **Drug Metabolism Reviews**, v.42, n. 04, p.612-620, 2010.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. 920p. 2002.

GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E.; GUEDES, N. M. P.; RIBEIRO B.; SERRÃO, J.E. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Physiological Entomology**, v.31, n. 01, p. 30-38, 2006.

GONZÁLEZ, J.O.W.; GUTIÉRREZ, M.M.; FERRERO, A.A.; BAND, B.F. Essential oils nanoformulations for stored-product pest control Characterization and biological properties. **Chemosphere** v.100, p.130-138, 2014.

HALL, D.J. An experimental approach to the dynamics of a natural population of *Daphnia galeata mendotae*. **Ecological Society of America**, v. 45, p.94-112, 1964.

HANSEN, L. S.; HANSEN, P.; JENSEN, K. M. V. Effect of gaseous ozone for control of stored product pests at low and high temperature. **Journal of Stored Products Research**. V.54, p. 59-63, 2013.

HARDIN, J.A.; JONES, C.L.; BONJOUR, E.L.; NOYES, R.T.; BEEBY, R.L.; ELTISTE, D.A.; DECKER, S. Ozone fumigation of stored grain; closed-loop recirculation and the rate of ozone consumption. **Journal of Stored Products Research**, v. 46, p. 149-154, 2010.

HILL, A.G.; RICE, R.G. Historical background properties and application of ozone. In: RICE, R.G.; NETZER, A. **Handbook of Ozone Technology and Applications**. Ann Arbor Science. p.1-37, 1982.

HOLLINGSWORTH, R. G.; ARMSTRONG, J. W. Potential of temperature, controlled atmospheres and ozone fumigation to control thrips and mealybugs on ornamental plants for export. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 2, p. 289-298, 2005.

HORVATH, M.; BILITZKY, L.; HUTTNER, J. Ozone. New York: **Elsevier**. 350 p. 1985.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – LSPA**, 2017. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em: 08/07/2018.

ISIKBER, A. A.; ATHANASSIOU, C. G. The use of ozone gas for the control of insects and micro-organisms in stored products. **Journal of Stored Products Research**, p.1-7, 2014.

IŞIKBER, A. A.; ÖZTEKIN, S. Comparison of susceptibility of two stored-product insects, *Ephestia kuehniella* Zeller and *Tribolium confusum* du Val to gaseous ozone. **Journal of Stored Products Research**, v. 45, p. 159-164, 2009.

JAYAS, D. S.; JEYAMKONDAN, S. Modified Atmosphere Storage of Grains Meats Fruits and Vegetables. **Biosystems Engineering**, v. 82, n. 3, p. 235–251, 2002.

JAYAS, D. S.; WHITE, N. D. G. Storage and drying of grain in Canada: low cost approaches. **Food Control**, v. 14, n. 04, p. 255-261, 2003.

KELLS, S. A.; MASON, L. J.; MAIER, D. E.; WOLOSHUK, CHARLES. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 37, p. 371-382, 2001.

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

LAZZARI, S.M.M.; LAZZARI, F.A. Insetos pragas de grãos armazenados. In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R. (Ed.). **Bioecologia e nutrição de insetos. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**, p.1475-1637, 2009.

LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; ARAUJO, A. S. F. de. *Phaseolus lunatus* L. Diversity, Growth and Production. Nova Science Inc., New York, 2015.

LORINI, I.; KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. DE B.; HENNING, A. A.; HENNING, F. A. **Manejo Integrado de Pragas de Grãos e Sementes Armazenadas**. Brasília, DF: Embrapa-Soja, 84p, 2015.

MCDONOUGH, M. X.; CAMPABADAL, C. A.; MASON, L. J.; MAIER, D. E.; DENVER, A.; WOLOSHUK, C. Ozone application in a modified screw conveyor to treat grain for insect pests, fungal contaminants, and mycotoxins, **Journal of Stored Products Research**, v. 47, n. 3, p. 249–254, 2011.

MEIK, J.; DOBIE, P. The ability of *Zabrotes subfasciatus* Boh. (Coleoptera, Bruchidae) to attack cowpeas. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 42: p.151-158, 1986.

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

NASCIMENTO, M. G. R.; SILVA, M. L. M.; ALVES, E. U.; RODRIGUES, C. M.; SILVA, M. J. Vigor tests in seeds creole of *Phaseolus lunatus* L. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 5, p. 1463-1469, 2019.

NAVARRO, S. The use of modified and controlled atmospheres for the disinfestation of stored products. **Journal of Pest Science**, v. 85, p. 301-322, 2012.

NAVARRO, S.; TIMLICK, B.; DEMIANYK, C.J.; WHITE, N.D.G. Controlled or modified atmospheres. In: HAGSTRUM, D.W.; PHILLIPS, T.W.; CUPERUS, G. (Ed.). **Stored product protection**. Manhattan: State Research and Extension, p. 191-202, 2012.

OLIVEIRA, A.P.; ALVES, E.U.; ALVES, A.U.; DORNELAS, C.S.M.; SILVA, J.A.; PORTO, M.L.; ALVES, A.V. Produção de feijão-fava em função do uso de doses de fósforo em um Neossolo Regolítico. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.03, p.543-546, 2004.

OLIVEIRA-SILVA, R.N.; BURLE, M.L.; PÁDUA, J.G.; LOPES, A.C.A.; GOMES, R.L.F.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. Phenotypic diversity in lima bean landraces cultivated in Brazil, using the WardMLM strategy. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.77, n.01, p.35-40, 2017.

PAIVA AGUERO, J. A. **Correlação de condutividade elétrica e outros testes de vigor com emergência de plântulas de soja em campo**. (Dissertação – Mestrado em Agronomia), Jaboticabal: UNESP, 92p. 1995.

PARFITT, J.; BARTHEL, M.; MACNAUGHTON, S. Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. Philosophical 36 Transactions of the Royal Society B: **Biological Sciences**, v.365, n.1554, p.3065-3081, 2010.

PANDISELVAM, R.; THIRUPATHI, V.; MOHAN, S.; VENNILA, P.; UMA, D.; SHAHIR, S.; ANANDAKUMAR, S. Gaseous ozone: A potent pest management strategy to control *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) infesting green gram. **Journal of applied entomology**, 2019.

PEREIRA, A. M., FARONI, L. R. D'A., SOUSA, A. H., URRUCHI, W. I., ROMA, R. C. C. Efeito imediato e latente da fumigação com ozônio na qualidade dos grãos de milho. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.32, n.2, p.100-110, 2007.

PIMENTEL, M. A. G.; FARONI, L. R. A.; GUEDES, R.N.C.; SOUSA, A. H.; TÓTOLA, M. R. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschusky (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 45, n. 01, p. 71-74, 2009.

PIMENTEL, M. A. G.; FARONI, L. R. A.; TÓTOLA, M.R.; GUEDES, R. N. C. Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. **Pest Management Science**, v.63, p. 876-881, 2007.

PIMENTEL, M. A. G.; FARONI, L. R. A.; CORREA, A. S.; GUEDES, R. N. C..Phosphine-induced walking response of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica*). **Pest Management Science**. v.68, n.10, p.1368–1373, 2012.

QUINTELA, E. D.; BARBOSA, F. R. Manual de Identificação de Insetos e Outros Invertebrados Pragas do Feijoeiro. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 94 p. (**Embrapa Arroz e Feijão. Documentos**, 246), 2015.

RICE, R. G.; FARQUHAR, J. W.; BOLLYKY, L. J, Review of the applications of ozone for increasing storage times of perishable foods. **Ozone: Science and Engineering**, v. 4, 147-163, 1982.

RIBEIRO, B. M.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E.; SANTOS, J.P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.39, n.01, p. 21-31, 2003.

ROZADO, A. F.; FARONI, L. R. A.; URRUCHI, W. M. I.; GUEDES, R. N. C.; PAES, J. L. Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, n.03, p.282–285, 2008.

ROZADO, A. F. **Ozônio como fumigante na proteção de milho armazenado**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG,58f, 2005.

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

SANTOS, V. S. V.; RAMALHO, P. R.; PÁDUA, L. E. M. Atividade inseticida de pós vegetais sobre *Zabrotes subfasciatus* (Boheman)(Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchidae) em grãos de feijão fava. **Holos**, v.7, n. 34, p. 53-58, 2018.

SAS Institute. **SAS/STAT User`s Guide**, version 8.0. Cary: SAS Institute Inc., 2002.

SERRAZANETTI, D. I.; GUERZONI, M. E.; CORSETTI, A.; VOGEL, R. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. **Food Microbiology**, v. 26, n. 07, p. 700–711, 2009.

SILVA, G. N.; FARONI, L. R. D. F.; CECON, P. R.; SOUSA, A. H.; HELENO, F. F. Ozone to control *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) in stored wheat grains. **Journal of Stored Products and Postharvest Research**, v.7, n.04, p.37-44, 2016.

- SILVA, S. B.; LUVIELMO, M. M.; GEYER, M. C. PRÁ, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 02, p. 659-682, 2011.
- SILVA, J. D. C.; GIRÃO FILHO, J. E.; MEDEIROS, W. R.; SILVA NETO, J. S.; FRANÇA, S. M.; SILVA, P. R. R. Bean weevil biology in different hosts. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 61, 2018.
- SILVA, G. N.; FARONI, L. R. A.; SOUSA, A. H.; FREITAS, R. S. Bioactivity of *Jatropha curcas* L. to insect pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**, v. 48, n. 01, p. 111-113, 2012.
- SILVA, J.S.; BERBERT, P. A.; RUFANO, S.; AFONSO, A. D. L. Indicadores da qualidade dos grãos. (Ed). **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas**. Viçosa: **Aprenda Fácil** p. 63-107, 2008.
- SILVEIRA, D. C.; LEITE, A. C. N.; SANTOS, N. C.; GOMES, J. P. Características físicas de grãos de feijão-fava rajada (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Verde**. v. 14, n. 4, p. 518-523, 2019.
- SOLANO, Y.; TRIANA, J.; ÁVILA, R.; HERNÁNDEZ, D.; MORALES, J. Efecto del ozono sobre adultos del gorgojo del cigarrillo, *Lasioderma serricorne* (F.) (Coleoptera: Anobiidae). **Idesia [online]**, v.35, n.2, p. 41-47, 2016.
- SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. A.; GUEDES, R. N. C.; TÓTOLA, M. R.; URRUCHI, W. I. Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect-pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**, v. 44, n. 4, p. 379-385, 2008.
- SOUSA, A.H.; FARONI, L. R. A.; PIMENTEL, M.A.G.; SILVA, G.N.; GUEDES, R.N.C. Ozone toxicity to *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) populations under selection pressure from ozone. **Journal of Stored Products Research**, v. 65, p. 1-5, 2016.
- SOUZA, L. P.; FARONI, L. R. A.; HELENO, F. F.; CECON, P. R.; GONÇALVES, T. D. C.; SILVA, G. J.; PRATES, L. H. F. Effects of ozone treatment on postharvest carrot quality. **LWT-Food Science and Technology**, v.90, p.53-60, 2018.
- TIWARI, B.K.; BRENNAN, C.S.; CURRAN, T.; GALLAGHER, E.; CULLEN, P.J.; O'DONNELL, C.P. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, v.51, n.03, p. 248-255, 2010.
- TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P.; PATRAS, A.; BRUNTON, N.; CULLEN, P. J. Effect of ozone processing on anthocyanins and ascorbic acid degradation of strawberry juice. **Food Chemistry**, v. 113, n. 04, p. 1119–1126, 2009.
- USDA – United States Department of Agriculture. Disponível em: <http://www.usda.gov> Acesso em: 15/07/2018.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. Alternative disinfectants and oxidants guidance manual. 1999. Disponível em: <[http://www.epa.gov/OGWDW/mdbp/alternative\\_disinfectants\\_guidance.pdf](http://www.epa.gov/OGWDW/mdbp/alternative_disinfectants_guidance.pdf)>. Acesso em: 15/07/2018.

VELASQUEZ, L.P.; FARONI, L. R. A.; PIMENTEL, M. A. G.; PRATES, L. H. F. Behavioral and physiological responses induced by ozone in five Brazilian populations of *Rhyzopertha dominica*. **Journal of Stored Products Research**, v. 72, p. 111-116, 2017.

VIEIRA, R. D, CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p. 103-132. 1994.

VIEIRA, R. F. A cultura do feijão-fava. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 16, n. 174, p. 30-37, 1992.

WALTHALL, W. K.; STARK, J. D. Comparasion of two population level ecotoxicological endpoints: The intrinsic ( $r_m$ ) and instantaneous ( $r_i$ ) rates of increase. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n.05, p. 1068-1073, 1997.

WAKIL, W.; RIASAT, T.; LORDC, J. C. Effects of combined thiamethoxam and diatomaceous earth on mortality and progeny production of four Pakistani populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) on wheat, rice and maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 52, n. 01, p. 28-35, 2013.

WARE, G. W. Complete guide to pest control: with and without chemicals. Fresno, **Thomson Publications**, 2a ed. 1988.

WEAVERS, L.K., WICKRAMANAYAKE, G.B. **Disinfection and sterilization using ozone**. In: BLOCK, S.S. (Ed.), Disinfection, Sterilization, and Preservation, fifth ed. Lippincott, Williams and Wilkins, New York, USA, p. 205 e 214, 2001.

WOODSTOCK, L.M. Physiological and biochemical tests for seed vigor. **Seed Science and Technology**. v. 1, p. 127-157, 1973.