

LUZ PAOLA VELASQUEZ GRISALES

**TOXICIDADE E RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS AO OZÔNIO EM
POPULAÇÕES DE *Rhyzopertha dominica***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

V434t
2013

Velasques Grisales, Luz Paola, 1980-

Toxicidade e respostas comportamentais ao ozônio em
populações de *Rhyzopertha dominica* / Luz Paola Velasques
Grisales. – Viçosa, MG, 2013.

ix, 32 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Lêda Rita D'Antonino Faroni.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 24-32.

1. *Rhyzopertha dominica* - Controle. 2. Ozônio.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

II. Título.

CDD 22. ed. 595.763

LUZ PAOLA VELASQUEZ GRISALES

**TOXICIDADE E RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS AO OZÔNIO EM
POPULAÇÕES DE *Rhyzopertha dominica***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de julho de 2013.

Alberto Soares Corrêa

**Marco Aurélio Guerra Pimentel
(Coorientador)**

**Lêda Rita D'Antonino Faroni
(Orientadora)**

À Deus,

Aos meus pais Gildardo e Miriam,

Ao meu irmão Emmanuel,

Ao meu companheiro Isloanne,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela força, sabedoria e por permitir-me estar vivendo esta história, iluminando-me e mostrando-me sempre os melhores caminhos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) pelo suporte estrutural, técnico e intelectual fornecidos nestes dois anos de mestrado.

A todos os professores do Departamento de Entomologia pelos ensinamentos, oportunidades e principalmente pela orientação e formação em um curso bem conceituado.

À minha orientadora Lêda Rita D'Antonino Faroni pela oportunidade oferecida, pelos ensinamentos e por permitir que eu fizesse parte da equipe do Laboratório de MIP-Grãos.

Ao professor Raul Narciso Carvalho Guedes do Departamento de Entomologia pela atenção, paciência, ensinamento, disponibilidade e boa vontade.

Ao pesquisador da EMBRAPA, Marco Aurélio Guerra Pimentel, pela co-orientação, disponibilidade, atenção e pela ajuda nas análises estatísticas.

À minha adorada família, Gildardo, Miriam e Emmanuel, que acreditaram e me deram total apoio para aproveitar a oportunidade de fazer o mestrado.

Ao meu grande amor Isloanne, pela paciência, força, conselhos, ensinamentos, alegria, pela preocupação com o desenvolvimento deste trabalho, por sempre escutar-me, por acreditar em mim, por mostrar-me que vale a pena sonhar e seguir perseverante no caminho da vida. Amo você.

À equipe do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, Luis, Patricia, Juliane, Cristina, Raquel, Mariane e Luane, pela amizade. Em especial, a Gutierrez pelas colaborações nos experimentos.

Às minhas colegas de república, Gabriela Britto, Julia Gaio, por tornarem meus dias mais leves e alegres.

À minha amiga Miriam Criscuolo pela amizade, ensinamentos, conselhos, companhia, vou levá-la sempre em meu coração.

À minha amiga Luana e sua família pela hospitalidade, pelos bons momentos, por fazer sentir-me parte da família.

À Luisa Patiño, pela companhia e amizade.

Ao Alex pela ajuda, boa vontade e paciência com as explicações e ensinamentos estatísticos e pelas dicas e conselhos.

De coração, a todos vocês, muito obrigada!

BIOGRAFIA

Luz Paola Velasquez Grisales, nasceu na cidade de Manizales, Caldas-Colômbia no dia 28/07/1980, filha de Gildardo Velasquez e Luz Miriam Grisales. Em 1998 ingressou na Universidade de Caldas e formou-se como Engenheira Agrônoma em 2004. Cursou especialização em Desenvolvimento Agroindustrial na Universidade de Caldas em 2007-2008. Trabalhou como chefe da Linha Agrícola na empresa Electrofumigación Toro e Cia Ltda. (Fumitoro) em 2008-2011. Em Agosto de 2011 iniciou o curso de mestrado na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, sob a orientação da Profª. Lêda Rita D'Antonino Faroni, cuja dissertação é aqui apresentada.

INDICE

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. <i>Rhizopertha dominica</i>	3
2.2.Alternativas de controle para pragas de grãos armazenados.....	4
2.2.1.Ozônio propriedades e características.....	5
2.2.2.Geração de ozônio.....	7
2.2.3.Medição de ozônio.....	9
3.MATERIAL E MÉTODOS	
3.1.Populações de <i>Rhizopertha dominica</i>	10
3.2.Obtenção do ozônio e funcionamento do sistema.....	11
3.3.Câmaras de exposição dos insetos ao gás ozônio.....	12
3.4.Bioensaios de toxicidade ao gás ozônio.....	12
3.5.Bioensaio de Caminhamento.....	13
3.6.Respirometria e massa corpórea.....	14
3.7.Análises estatísticas.....	15
4.RESULTADOS	
4.1.Toxicidade ao gás ozônio.....	15
4.2.Caminhamento.....	18
4.3.Taxa respiratória, massa corpórea e associação com toxicidade e caminhamento.....	20

5.DISSCUSSÃO.....	21
6.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

RESUMO

VELASQUEZ, Grisales Luz Paola, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Toxicidade e respostas comportamentais ao ozônio em populações de *Rhyzopertha dominica***. Orientadora: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Coorientador: Marco Aurélio Guerra Pimentel.

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a toxicidade do ozônio para cinco populações de *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) coletadas no Brasil e verificar a influência do gás sobre o comportamento locomotor das populações. Adicionalmente, foram avaliadas as taxas respiratórias (produção de CO₂) e massa corpórea para estabelecer uma associação com os níveis de susceptibilidade e padrões comportamentais. A toxicidade do ozônio foi determinada através de bioensaios de tempo-resposta, utilizando-se a concentração fixa do ozônio de 500 ppm. Os resultados de mortalidade obtidos foram utilizados para gerar as curvas de tempo-resposta, e as TL₅₀ e TL₉₅ foram estimadas e usadas para calcular as respectivas razões de toxicidade (RT). Os resultados indicaram que nenhuma das populações de *R. dominica* investigadas apresentou resistência ao ozônio. As populações foram submetidas a bioensaios de caminhada na presença e na ausência do ozônio para determinar os padrões comportamentais de locomoção (distância, velocidade de caminhada e tempo de repouso). O comportamento locomotor dos insetos na presença do ozônio foi semelhante ao comportamento no controle. Todavia, não foram observadas correlações significativas entre a toxicidade do ozônio e os padrões comportamentais de caminhada; além disso, o comportamento locomotor das populações não foi influenciado pela massa corporal dos insetos, nem pela sua taxa respiratória. Foram observados diferentes padrões respiratórios entre os tratamentos com ozônio e controle, indicando que *R. dominica* podem reduzir suas taxas respiratórias, o que pode ser um mecanismo de defesa da espécie para escapar aos efeitos tóxicos do gás. Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o ozônio têm efeito na mortalidade de *Rhyzopertha dominica*, sendo uma alternativa ao uso de inseticidas tradicionais.

ABSTRACT

VELASQUEZ, Grisales Luz Paola, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, in July 2013. **Toxicity and behavioral responses to ozone in populations of *Rhyzopertha dominica***. Adviser: Leda Rita D'Antonino Faroni. Co-adviser: Marco Aurélio Guerra Pimentel.

This study was carried out to evaluate ozone toxicity to five populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) collected in Brazil, and to verify the influence of the gas on populations locomotor behavior. Also, respiratory rates (CO₂ production) and body mass were assessed to establish their relationship with susceptibility levels and behavioral patterns. Ozone toxicity was determined through time-response bioassays at the ozone concentration of 500 ppm in a continuous flow of 1,5 L min⁻¹. Mortality results were used to create time-response curves, and TL₅₀ y TL₉₅ were estimated and used to calculate toxicity ratios. Results indicated that none of the evaluated populations of *R. dominica* showed resistance to ozone. Locomotor bioassays were conducted in the presence and the absence of ozone to determine locomotion behavioral patterns (distance, walking velocity and rest time); nevertheless, the locomotor behavior of the insects in the presence of ozone was proportional to the behavior in its absence. There were not observed significant correlations between ozone toxicity and locomotion behavioral patterns. Moreover, it was observed that the locomotor behavior of the insects was not influenced by either their body mass or their respiratory rate. Different respiratory patterns were observed among the treatments, which indicate that *R. dominica* individuals are able to reduce their respiratory rates which can be a defense mechanism to avoid the toxic effects of the gas. On the basis of the results of this study it is possible to conclude that ozone has a effect on *Rhyzopertha dominica* mortality, so this gas is an alternative to traditional insecticides.

1. INTRODUÇÃO

Para o ano de 2050 há uma estimativa de que a população humana chegue a 9,1 bilhões, exigindo um aumento de 70% na produção de alimentos (FAO, 2009). Isto cria um grande desafio para a indústria de alimentos, a qual deve desenvolver, entre outras atividades, um manejo adequado dos grãos armazenados e de outros produtos agrícolas, não só para evitar desperdícios, mas para fornecer produtos que protejam a saúde humana (Nerio et al., 2009).

Os produtos agrícolas podem ser utilizados prontamente ou armazenados para utilização em períodos de escassez, ou na espera de preços mais rentáveis. Assim, o armazenamento destes produtos tem por objetivo manter suas características qualitativas e quantitativas durante longos períodos de tempo (Phillips e Throne 2009).

Uma parte considerável dos alimentos produzidos no mundo nunca é consumida, pois é perdida ou desperdiçada causando uma crescente preocupação devido a recente crise financeira nos preços dos alimentos (FAO, 2012). Anualmente são registradas perdas significativas tanto em quantidade como em qualidade causadas por condições climáticas adversas e um inadequado manejo dos grãos, tanto na colheita como na pós-colheita.

Os produtos armazenados de origem agrícola e animal são atacados por mais de 600 espécies de besouros pragas, 70 de mariposas e cerca de 355 de ácaros que causam perdas quantitativas e qualitativas (Rajendran, 2002). O resultado da ação dos insetos em grãos armazenados se traduz em perdas de peso e de poder germinativo, desvalorização comercial do produto por disseminação de fungos e surgimento de bolsas de calor, presença de insetos vivos, fragmentos de insetos, tais como excreções químicas ou de seda, insetos mortos e resíduos químicos de inseticidas nos alimentos. Estas perdas podem variar de 9 a 20% do total da produção em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Phillips e Throne, 2009), sendo estes danos e prejuízos similares aos causados pelos insetos nas culturas de campo.

O menor broqueador dos grãos, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae), é uma praga primária e de distribuição cosmopolita, de difícil controle

com inseticidas aplicados diretamente aos grãos, uma vez que o inseto passa a maior parte do seu ciclo de vida dentro deles (Huang e Subramanyam, 2005).

O fumigante fosfina (PH₃) é amplamente utilizado na proteção de insetos-praga de produtos armazenados devido ao seu baixo custo, eficácia, rápida difusão no ar e facilidade de uso (Chaudhry, 1997; Bell, 2000). No entanto, o uso a longo prazo de um único fumigante aumenta o risco de desenvolvimento de resistência em populações de insetos-praga (Benhalima et al., 2004). Recentes estudos indicam altos níveis de resistência a fosfina em populações brasileiras de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Silvanidae), *R. dominica* e *Tribolium castaneum* (Herbst) (Tenebrionidae) (Pimentel et al., 2007; 2010). Uma associação entre resistência a fosfina e redução da respiração foi observada nestas espécies, sugerindo que a resistência a este fumigante está associada com a redução de sua absorção (Pimentel et al., 2007).

A nível mundial existe a necessidade de desenvolvimento de estratégias sustentáveis para o manejo de pragas de grãos armazenados, para evitar a evolução de resistência e controlar suas infestações (Shi et al., 2012).

O manejo da resistência a inseticidas em insetos de produtos armazenados é particularmente importante devido ao pequeno número de ingredientes ativos indicados para controle destas pragas, bem como aos problemas de resíduos tóxicos nos produtos resultantes da elevação das doses necessárias para efetuar controle satisfatório (Beckel et al., 2004).

Um manejo moderno para o controle de pragas em unidades armazenadoras e processadoras de grãos deve ser composto por medidas eficazes, de baixo custo e com mínimo impacto ambiental. Dentre as principais alternativas pode-se citar a atmosfera modificada, empregando o gás ozônio (O₃) (Kells et al., 2001; Sousa et al., 2008). Este gás é um forte oxidante com propriedades inseticidas já demonstradas em estudos sobre sua eficácia como fumigante contra insetos-praga de grãos armazenados como: *T. Castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), *R. dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae), *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus) (Coleoptera: Silvanidae), *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae) e

Ephestia elutella (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) (Kells et al., 2001; Sousa et al., 2008; Sousa et al., 2012).

Estudos para diagnosticar o grau de toxicidade e caracterizar mudanças de comportamento dos insetos devido à presença do gás ozônio, são essenciais para a elaboração das possíveis estratégias de manejo integrado de pragas. Neste contexto, torna-se evidente a necessidade de estudos detalhados sobre o comportamento dos insetos a fumigantes alternativos, uma vez que o uso indiscriminado de inseticidas tem levado ao desenvolvimento de populações resistentes. Deste modo, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a toxicidade e as respostas comportamentais de insetos adultos de *R. dominica* submetidos à exposição ao gás ozônio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Rhyzopertha dominica*

Rhyzopertha dominica (F.), é um membro da família Bostrichidae, conhecido como besouros broqueadores ou pulverizadores. Existem cerca de 550 espécies de bostriquídeos distribuídas em 99 gêneros (Marskeelvie, 2003). Este inseto apresenta ampla distribuição, desde os trópicos até regiões temperadas (Chittenden, 1911). Em condições ótimas de temperatura (30 a 35 °C) e umidade relativa (70%) a fêmea chega a ovipositar entre 200 e 500 ovos na superfície dos grãos ou entre eles (Hill, 2002; Toews et al., 2006; Chambang et al., 2008; Edde, 2012). Tanto os adultos como as larvas, causam danos diretos aos grãos, penetrando nestes através de perfurações no tegumento produzindo grande quantidade de resíduos em forma de pó. É considerada praga-chave em cereais como trigo, sorgo, milheto, milho e arroz, inclusive em casca (Rees 1996; Faroni et al., 2004).

Larvas de *R. dominica* causaram perda de peso de 9,5%, em média, em grãos de trigo no período de 20 dias. A perda de peso causada pelos adultos foi de 19,4; 12,0; 9,5 e 6,5% durante a 1ª, 2ª, 3ª e 4ª semana, respectivamente, após a emergência dos adultos (Rao e Wilbur, 1972).

Em condições de armazenamento, pode-se movimentar na massa de grãos até uma profundidade de 12 m, o que é mais profundo do que observações feitas para outros besouros de grãos armazenados (Flinn et al., 2010).

2.2. Alternativas de controle para pragas de grãos armazenados

Dentre as alternativas de controle destaca-se o uso de óleos essenciais, extratos de origem vegetal (Papachristose Stamopoulos, 2004; Isikber et al., 2006; Mondale Khalequzzaman, 2006) e atmosferas modificadas. Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis orgânicos produzidos como metabólitos secundários nas plantas, constituídos por hidrocarbonetos (monoterpenos e sesquiterpenos) e compostos oxigenados (álcoois, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas e fenóis) (Guenther, 1972; Nerio et al., 2009). Tais compostos são encontrados em maior quantidade na casca, flores, folhas, rizomas e sementes (Araújo, 1995), e estocados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (Pichersky et al., 2006).

Os óleos essenciais apresentam múltiplos modos de ação sobre os insetos, tais como toxicidade aguda, repelência, redução da alimentação, inibição do crescimento, limitações no desenvolvimento e na reprodução (Coats, 1994; Calatayud et al., 1994; Isman, 2006).

Outra alternativa de controle é o uso da terra diatomácea (TD), que pertence aos chamados pós-inertes. Têm sido utilizada há muitos anos como alternativa a inseticidas sintéticos, devido a sua lenta degradação e pelo fato de afetar o desenvolvimento do inseto sempre que o local permaneça seco (Timlicke Fields, 2010). Quando as diatomáceas morrem, as paredes de suas células acumulam-se no fundo dos oceanos, lagos e rios (Vardeman et al., 2007). A diatomácea fossilizada torna-se diatomite, que pode ser extraída, secada e triturada para produzir um pó fino do tipo talco conhecida como terra diatomácea e onde este possui o dióxido de sílica (~90% de SiO₂) como principal ingrediente ativo (Stathers, 2008).

Os insetos em contato com a terra diatomácea perdem água por danos provocados na cutícula e morrem após certo tempo (Korunic, 1998). Este tempo

depende da umidade relativa do ar e, no caso de insetos de grãos armazenados, do teor de água dos grãos (Korunic, 1997). Assim, a terra diatomácea é reportada como alternativa efetiva ao controle químico de insetos-praga em produtos armazenados, quando aplicada nos grãos ou nas paredes das instalações (Golob, 1997; Mewise Ulrichs, 2001).

Dentre as novas tecnologias no controle de pragas no armazenamento de grãos, o ozônio pode tornar-se uma alternativa ecologicamente correta e economicamente viável no âmbito da manutenção e preservação da qualidade dos produtos de origem vegetal (Rozado et al., 2008), sendo utilizado como substituto para os fumigantes existentes, tais como o brometo de metila e a fosfina. Há relatos de que o uso do gás ozônio mata insetos como *T. castaneum*, *R. dominica*, *O. surinamensis*, *S. oryzae* e *E. elutella* (Sousa et al., 2008).

O ozônio, na desinfestação de grãos, é favorável ao meio ambiente por não deixar resíduos tóxicos, sendo eficaz contra uma série de pragas de grãos armazenados. No entanto, a eficácia do ozônio depende de vários fatores, incluindo a quantidade aplicada, fatores ambientais como a temperatura da massa de grãos, teor de água e os constituintes químicos da camada externa de grãos (Tiwari et al., 2010).

Apesar de vários estudos terem investigado a toxicidade do ozônio em termos de mortalidade (Rozado et al., 2008; Sousa et al., 2008; McDonough et al., 2011; Hansen et al., 2012; Sousa et al., 2012), o mecanismo de ação do ozônio sobre os insetos não é completamente conhecido, porém o sistema respiratório é um alvo provável (Tiwari et al., 2010). Então, pouco se sabe sobre os efeitos fisiológicos envolvidos na toxicidade do ozônio nos insetos.

2.2.1. Ozônio, propriedades e características

O ozônio (O₃) é um gás incolor de odor pungente e menos estável do que o oxigênio (O₂). Decompõe-se em O₂ em média de 20-50 min, à temperatura ambiente. Este gás é um forte oxidante, com uma longa história de uso seguro em muitos campos, sendo usado principalmente nas indústrias de produtos farmacêuticos, lubrificantes sintéticos, branqueamento de substâncias, controle de micro-organismos da água e fontes de ar, erradicação de parasitas transmitidos pela água e

branqueamento de celulose e papel (Cullen et al., 2009; Tiwari e Muthukurappan, 2012). Também tem o potencial para controlar pragas de grãos armazenados e degradar micotoxinas (Rozado et al., 2008; Sousa et al., 2008; Alencar et al., 2012).

O ozônio foi descoberto pelo pesquisador europeu Schönbein, que, em 1839, produziu ozônio sintético a partir da eletrólise do ácido sulfúrico (Khadre et al., 2001). A molécula de ozônio possui o segundo maior potencial de oxidação entre os elementos químicos, sendo superada somente pela molécula do Flúor (F_2). Em condições normais de temperatura e pressão, o ozônio é moderadamente solúvel em água, 13 vezes mais solúvel que o O_2 , e é facilmente detectável em concentrações muito baixas, na faixa de 0,01 a 0,05 mg L^{-1} (Hill e Rice, 1982) (Tabela 1).

A composição química do ozônio é caracterizada pela forma triatômica do oxigênio (Figura 1). Os três átomos de oxigênio desta molécula estão arranjados em ângulo obtuso, onde o oxigênio central é ligado a dois átomos equidistantes do oxigênio (Oehlschlaeger, 1978).

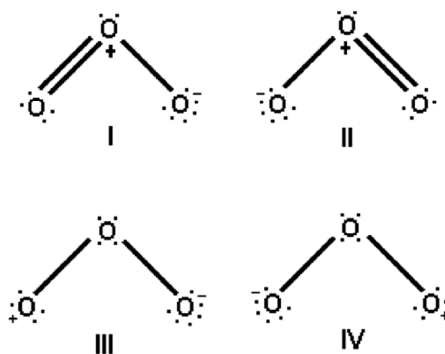


Figura 1. Variação da molécula de ozônio devido à ressonância magnética (Guzel-Seydim et al., 2004).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas e fatores de conversão para utilização do ozônio

Propriedades Físico-químicas	
Estado físico	Gasoso
Fórmula química	O ₃
Massa molecular	48,0 g mol ⁻¹
Ponto de fusão a 1 atm	- 192,5 °C
Ponto de ebulição a 1 atm	-111,9 °C
Massa específica do gás nas CNTP	2,14 g L ⁻¹
Temperatura crítica	-12,1 °C
Pressão crítica	54,6 atm
Volume crítico	111 cm ³ mol ⁻¹
Conversões do ozônio	
Concentração de ozônio em água (massa)	1 mg L ⁻¹ = 1 ppm O ₃ = 1 g O ₃ m ⁻³
Concentração de ozônio em ar (volume)	1 g O ₃ m ⁻³ = 467 ppm O ₃ 1 ppm O ₃ = 2,14 mg O ₃ m ⁻³
Concentração de ozônio em ar (massa)	100 g O ₃ m ⁻³ = 7,8% O ₃ 1% O ₃ = 12,8 g O ₃ m ⁻³
Concentração de ozônio em oxigênio (massa)	100 g O ₃ m ⁻³ = 6,99% O ₃ 1% O ₃ = 14,3 g O ₃ m ⁻³

Fonte: Hill e Rice (1982)

2.2.2. Geração de ozônio

Devido à instabilidade do ozônio, o que impede seu armazenamento, torna-se necessário sua geração "*in situ*". Rice et al. (1981) resume assim a geração de ozônio: o oxigênio molecular é dissociado e o oxigênio livre resultante reage com outro oxigênio diatômico para formar a molécula triatômica de ozônio. Portanto, a fim de quebrar a ligação O-O, é necessário muita energia, e para isso, os métodos de radiação ultravioleta (188 nm comprimento de onda) e o de descarga por efeito corona podem ser empregados. A fim de gerar níveis comerciais de ozônio, o método de descarga por efeito corona é geralmente o mais utilizado, devido a sua vantagem de gerar uma maior quantidade de O₃ com menor custo (Khadre et al., 2001; Almeida et al., 2004).

O processo de descarga por efeito corona é constituído por dois eletrodos submetidos à elevada diferença de potencial (aproximadamente 1000 V) (Figura 2). Deste modo, o ozônio é gerado pela passagem de ar ou oxigênio puro entre os dois eletrodos (um eletrodo é de alta tensão e o outro de baixa tensão separados por um dielétrico cerâmico). Quando os elétrons possuem energia suficiente para dissociar a molécula de oxigênio, iniciam-se colisões, que causam a dissociação do oxigênio e a consequente formação do ozônio (Guzel-Seydim et al., 2004; Pirani, 2011; Silva et al., 2011).

Na síntese de ozônio pelo método da luz ultravioleta, os átomos de oxigênio formados na fotodissociação do O_2 pela baixa radiação ultravioleta, reagem com o O_2 para formar a molécula de ozônio (Chiattonne, 2009).

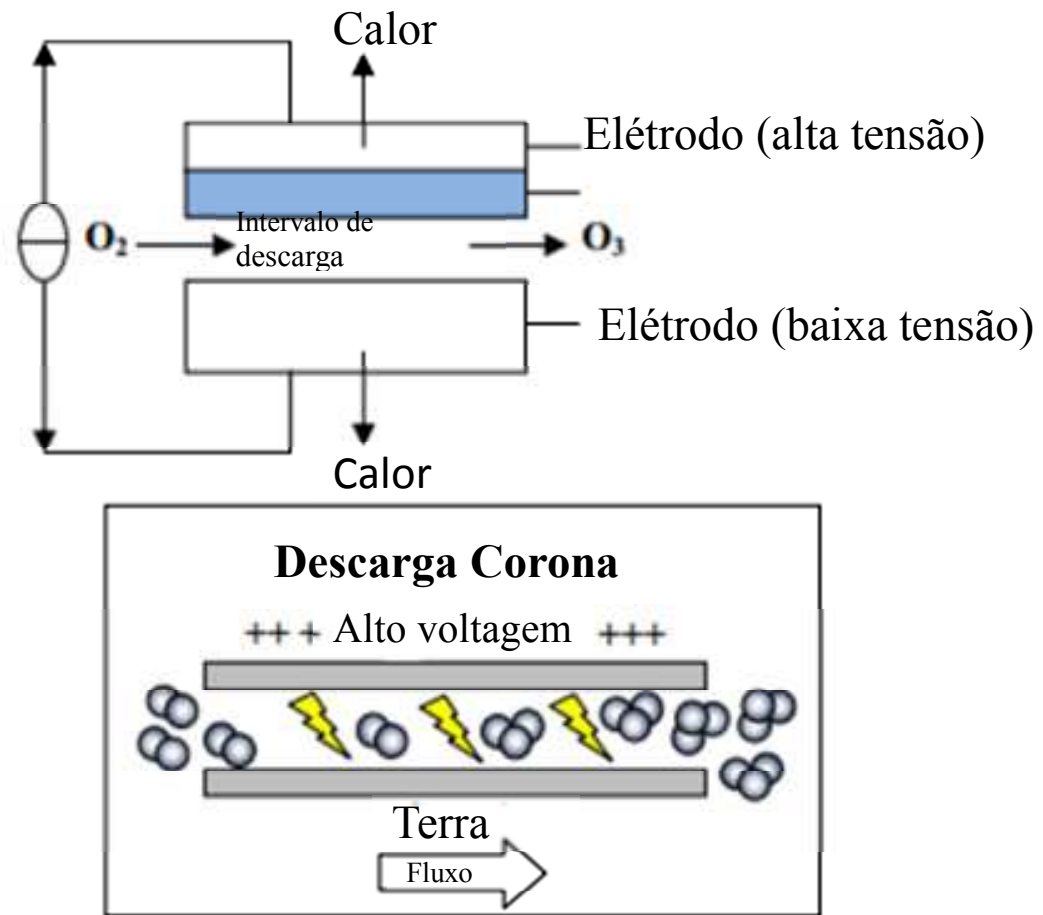


Figura 2. Geração do ozônio pelo método de descarga corona (Gonçalves, 2009).

2.2.3. Medição do gás ozônio

Vários métodos estão disponíveis para medir o gás ozônio, podendo ser classificados como: físicos, químicos e físico-químicos. Os métodos físicos medem as respostas, tais como a capacidade de adsorção de radiações no espectro visível, ultravioleta (UV) ou infravermelho (IR). Os métodos químicos medem a formação de produtos de reação, quando o ozônio reage com substâncias como o iodeto de potássio (KI) ou iodeto de hidrogênio (HI) e os métodos físico-químicos medem os efeitos físicos da reação com ozônio com diferentes substâncias químio-

luminescentes (luminol, acedium), onde mede-se a luz produzida por oxidação química, o que confere maior sensibilidade ao método (Tomiyasue Gordon, 1984; Khadre, 2001).

Realizou-se esta pesquisa avaliando a toxicidade do gás ozônio em populações de *R. dominica*, assim como aspectos fisiológicos (taxa respiratória) e comportamentais (distância percorrida, velocidade de caminamento, tempo de repouso) envolvidos possivelmente com a toxicidade do gás O₃.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de toxicidade ao gás ozônio, caminamento, taxa respirométrica e massa corpórea foram realizados no setor de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola (DEA) e no Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG.

3.1. Populações de insetos

Foram utilizadas cinco populações de *R. dominica*, provenientes de três localidades dos estados do Mato Grosso (MT), Minas Gerais (MG) e Paraná (PR) (Tabela 2). Os insetos foram criados em frascos de vidro de 1,5 L, em câmaras climáticas do tipo B.O.D, sobre condições constantes de temperatura (30±2 °C), umidade relativa (70±5%) e escotofase de 24 h, no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (MIP-Grãos) do DEA. O substrato utilizado para manutenção das populações foram grãos de trigo com 13% umidade base úmida (b.u), previamente expurgados e mantidos sob-refrigeração (-18 °C), para evitar re-infestação.

Tabela 2. Origem das populações de *Rhizopertha dominica*

Código	Cidade	Estado	Local de coleta	Produto	Ano de coleta
1	Belo Horizonte	Minas Gerais (MG)	Fábrica de farinha	Trigo	2011
2	Campos de Júlio	Mato Grosso (MT)	Fundo de silo metálico	Milho	2005
3	Cornélio Procópio	Paraná (PR)	Laboratório	Milho	2005
4	Rio Pomba	Minas Gerais (MG)	Fábrica de ração	Trigo	2005
5	Viçosa	Minas Gerais (MG)	Laboratório	Milho/Trigo	2005

3.2. Obtenção do gás ozônio e funcionamento do sistema

O gás ozônio foi obtido por meio do gerador de ozônio, baseado no método de Descarga por Barreira Dielétrica (DBD), desenvolvido pela empresa Ozone & Life, São José dos Campos, São Paulo (SP), Brasil (Figura 3 A). No processo de geração do gás, foi utilizado como insumo o oxigênio com grau de pureza de 90±3%, isento de umidade, obtido pelo concentrador Mark 5 Plus Oxygen Concentrator desenvolvido pela empresa Oxxisul Industrial Ltda, Curitiba, Paraná (PR), em fluxo contínuo de 1,5 L min⁻¹.

A concentração do ozônio foi quantificada, utilizando-se o método iodométrico, pela titulação indireta conforme recomendado pela International Ozone Association (IOA). Este método, consiste no borbulhamento do ozônio em uma solução de 50 mL de iodeto de potássio (KI) 1 N. Desta reação, ou seja, da oxidação do KI pelo ozônio (Equação 1), ocorre liberação de iodo (I₂).



Para garantir a produção de I₂, foi necessário acidificar o meio (pH) pela adição de 2,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 N. Depois, foi realizada a titulação com tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) 0,01 N, até que a coloração amarela do iodo se apresentasse quase transparente. Em seguida, foi adicionado 1 mL de uma solução indicadora de amido 1% e titulado até o desaparecimento da coloração azul. Devido a

instabilidade do ozônio, a quantificação da sua concentração no meio foi realizada logo após o borbulhamento do gás.

3.3. Câmaras de exposição dos insetos ao gás ozônio

A exposição dos insetos ao ozônio foi feita no interior de câmaras plásticas cilíndricas (13 cm de largura × 20 cm de altura) (Figura 3 B). A injeção e exaustão do gás foram feitas por intermédio de uma conexão instalada a 6 cm da base de cada câmara e outra na parte superior (tampa), respectivamente. O mesmo sistema foi utilizado para o tratamento controle (ar atmosférico). Os insetos de cada população foram acondicionados em gaiolas plásticas cilíndricas de 4 cm de largura e 3,5 cm de altura, suspensas a 10 cm da base das câmaras de fumigação sobre uma tela metálica que propiciou a criação de um *plenum*. As gaiolas tiveram a tampa e o fundo confeccionados com tecido do tipo organza, permitindo a passagem livre do ozônio e do ar atmosférico.



Figura 3. Gerador de ozônio (A) e câmara de exposição dos insetos ao gás O_3 (B).

3.4. Bioensaios de toxicidade do ozônio

A toxicidade do gás ozônio para as populações de *R. dominica* foi determinada através de estimativas dos tempos de exposição letais para 50 e 95% dos insetos (TL_{50} e TL_{95} , respectivamente). O ozônio foi aplicado na concentração de 500

ppm ($\approx 1,07 \text{ g O}_3 \text{ m}^{-3}$) em fluxo contínuo de $1,5 \text{ L min}^{-1}$. Segundo Silva (2011) esta concentração não altera a qualidade dos grãos de trigo. Foram utilizadas três repetições, cada uma com 20 adultos não-sexados, com idade variando de uma a quatro semanas. A mortalidade dos insetos foi avaliada após 48 h de cada período de exposição ao gás. Foram realizados testes preliminares para estimar os menores tempos de exposição ao gás onde não ocorresse morte de insetos (extremo inferior) e o maior tempo em que ocorresse a maior mortalidade (extremo superior). Para isso, foram estabelecidas curvas tempo-resposta mediante bioensaios com períodos crescentes de exposição ao ozônio. Após a exposição ao gás ozônio os adultos foram retirados da câmara de fumigação e colocados em placas de Petri contendo grãos de trigo moído. Estas placas foram mantidas em câmaras climáticas do tipo B.O.D, à temperatura de $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 5\%$.

3.5. Bioensaios de caminhamento

Os bioensaios de caminhamento foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia da UFV, em sala climatizada $28 \pm 2^\circ\text{C}$, e iluminação artificial. A metodologia utilizada nos bioensaios comportamentais foi adaptada de Pereira et al. (2009) e Sousa et al. (2012). As arenas com tampa utilizadas nestes bioensaios foram confeccionadas em material acrílico transparente, com 15,0 cm de diâmetro e volume interno de 0,345 L. O gás O_3 foi gerado em condições já descritas (Seção 3.4). A injeção e exaustão do gás foram feitas por intermédio de duas conexões instaladas opostamente em cada arena. O tratamento controle foi constituído apenas por ar atmosférico. Foram utilizados insetos adultos (não-sexados) com idade variando de uma a quatro semanas. Cada inseto foi colocado no centro da arena com 1 min de antecedência do início dos testes para que ocorresse a saturação das câmaras com o gás ozônio e para que o inseto fizesse o reconhecimento da arena. O movimento de cada inseto dentro da arena foi registrado por um sistema de rastreamento formado por uma câmara de vídeo acoplada a um computador (View Point Life Sciences Inc., Montreal, Canadá) por um período de 10 min. Os parâmetros comportamentais avaliados foram distância percorrida (cm), tempo de repouso (s) e velocidade de caminhamento (mm s^{-1}). O delineamento foi inteiramente casualizado, com 20

repetições para cada população e estruturado em um fatorial (5 x 2). Cada repetição constituiu-se de um único inseto.

3.6. Respirometria e massa corpórea

Os bioensaios de respirometria foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia da UFV, em condições de laboratório, utilizando-se um respirômetro do tipo TR3C (Sable System International, Las Vegas, EUA), para mensurar a produção de dióxido de carbono (CO₂) ($\mu\text{L de CO}_2 \text{ h}^{-1}\text{inseto}^{-1}$) pelo uso da metodologia adaptada de Guedes et al., 2006 e Sousa et al., 2008.

Os insetos utilizados na medição da taxa respiratória foram submetidos ao gás ozônio e ar atmosférico, por um período de 5 h, nas mesmas condições que os bioensaios de toxicidade. A escolha deste tempo foi baseada nas curvas de tempo mortalidade determinadas para as cinco populações. Este tempo torna-se então subletal, em relação ao período de exposição utilizado na estimativa das curvas de tempo-mortalidade.

Foram utilizados cinco repetições de 20 insetos adultos (não-sexados) de cada população com idade variando de uma a quatro semanas acondicionados em câmaras respirométricas, com capacidade volumétrica de 25 mL, conectadas a um sistema completamente fechado. A produção de dióxido de carbono (CO₂) produzida pelos insetos foi mensurada três horas depois, na temperatura de 28 ± 2 °C. Para fazer a varredura de todo o CO₂ produzido no interior de cada câmara, procedeu-se a passagem de ar isento de CO₂ em fluxo de 600 mL min^{-1} por um período de 2 min. Essa corrente de ar faz com que todas as moléculas de CO₂ produzidas passem por um leitor de infravermelho acoplado ao sistema, que continuamente faz a mensuração do CO₂ produzido pelos insetos contido no interior de cada câmara. Após a mensuração do CO₂, os insetos foram removidos das câmaras e, em seguida, foram pesados usando uma balança analítica (Sartorius BP 210 D, Göttingen, Germany). Os ensaios foram conduzidos em temperatura de 27 ± 2 °C e umidade relativa de $70 \pm 5\%$.

3.7. Análises estatísticas

Os dados dos bioensaios de toxicidade ao ozônio foram submetidos à análise de probit (PROC PROBIT; SAS Institute, 2002), gerando as curvas de tempo-mortalidade. Os dados de mortalidade obtidos para as cinco populações foram corrigidos pela mortalidade que ocorreu no tratamento controle (Abbott, 1925).

Para testar as diferenças entre os tratamentos com ozônio e sem ozônio (controle) dos três parâmetros de caminhamento de cada população de *R. dominica* (distância percorrida, tempo de repouso e velocidade de caminhamento), foi utilizado o procedimento PROC GLM com MANOVA do programa System of Statistical Analyses – SAS (SAS Institute, 2002). Para testar as diferenças entre as populações foi utilizado o teste Duncan ($P < 0,05$).

Os dados da produção de CO_2 e de massa corpórea de *R. dominica* foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste LSD (Least Significant Difference) ($P < 0,05$), utilizando-se o procedimento PROC GLM do programa SAS (SAS Institute, 2002). Foram feitas análises de correlação empregando o procedimento PROC CORR do SAS (SAS Institute, 2002) entre toxicidade e a distância percorrida e velocidade de caminhamento. Adicionalmente, foram feitas também correlações entre distância percorrida e taxa respiratória de *R. dominica* com o intuito de estudar a possível relação entre elas.

4. RESULTADOS

4.1. Toxicidade ao gás ozônio

Os resultados dos bioensaios de tempo-mortalidade para as cinco populações de *R. dominica* expostas ao ozônio são apresentadas na Tabela 3. Estes mostram baixos valores de qui-quadrado (χ^2) ($< 7,00$) e valores elevados de P ($> 0,10$), indicando adequação dos dados ao modelo probit para estimativa dos tempos letais para as cinco populações.

As curvas de tempo-mortalidade (Tabela 3) foram usadas para estimar a toxicidade do gás ozônio para as populações. A razão de toxicidade (RT) foi

substancialmente baixa (<2 vezes) e os TL_{50} e TL_{95} variaram de 1,05 a 1,37 e de 0,51 a 0,93 vezes, respectivamente. As inclinações das curvas de tempo mortalidade variaram entre as populações, sendo menor na população de Rio Pomba ($2,55 \pm 0,35$) e maior para a população de Belo Horizonte ($6,68 \pm 1,31$).

Tabela 3. Suscetibilidade das populações de *Rhyzopertha dominica* ao gás ozônio (O₃)

Populações	N	Inclinação ± EPM	TL ₅₀ (IF 95%) Horas	RT (TL ₅₀)	TL ₉₅ (IF 95%) Horas	χ^2	P
Rio Pomba - MG	300	2,55 ± 0,35	10,45 (9,05-12,01)	-	46,00 (32,94-81,07)	6,68	0,15
Campos de Júlio - MT	300	3,81 ± 0,47	11,02 (10,02-12,13)	1,05	29,80 (24,18-41,44)	6,56	0,16
Viçosa - MG	300	3,80 ± 0,45	11,45(10,38-12,60)	1,10	31,09 (24,41-42,48)	3,54	0,31
Cornélio Procópio - PR	300	2,83 ± 0,43	12,83(11,36-14,73)	1,23	48,95 (34,74-90,95)	5,30	0,15
Belo Horizonte - MG	240	6,68 ± 1,31	14,40 (13,46-15,26)	1,37	25,39 (21,70-35,81)	1,46	0,48

N = Número total de insetos por bioensaio; EPM = Erro padrão da média; TL = Tempo letal, IF 95% = Intervalo fiducial a 95% de probabilidade; χ^2 = Qui-quadrado; P = Probabilidade.

4.2. Caminhamento

Observou-se diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) para as características comportamentais de caminhamento (distância percorrida, velocidade e tempo de repouso) entre as populações de *R. dominica* no tratamento com ozônio (distância percorrida: $F_{4,95}=13,10$; $P < 0,0001$; velocidade de caminhamento: $F_{4,95}=29,73$; $P < 0,0001$; tempo de repouso $F_{4,95}=11,06$; $P < 0,0001$) e no tratamento controle (distância percorrida: $F_{4,95}=6,40$; $P < 0,0001$; velocidade de caminhamento: $F_{4,95}=4,88$; $P < 0,001$; tempo de repouso $F_{4,95}=4,70$; $P < 0,001$) (Figuras 4, 5 e 6).

Verificou-se diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre tratamento com ozônio e o controle, para todas as populações nas características comportamentais de caminhamento (distância percorrida $F_{1,198}=16,68$; $P < 0,0001$; velocidade $F_{1,198}=21,43$; $P < 0,0001$ e tempo de repouso $F_{1,198}=6,71$; $P < 0,01$).

Dentro do tratamento com o gás ozônio, a população de Cornélio Procópio apresentou menor distância percorrida ($165,17 \pm 36,93$ cm), menor velocidade de caminhamento ($0,454 \pm 0,006$ mm s⁻¹) e maior tempo de repouso ($236,54 \pm 21,13$ s), e a população de Belo Horizonte apresentou maior distância percorrida ($260,17 \pm 13,36$ cm) e maior velocidade de caminhamento ($0,5928 \pm 0,016$ mm s⁻¹). A população de Viçosa apresentou menor tempo de repouso ($101,05 \pm 11,17$ s).

Ao comparar as cinco populações dentro do tratamento controle, a população de Cornélio Procópio apresentou maior distância percorrida ($216,67 \pm 8,3$ cm), maior velocidade de caminhamento ($0,482 \pm 0,0009$ mm s⁻¹) e menor tempo de repouso ($151,94 \pm 13,42$ s). A população de Rio Pomba apresentou menor distância percorrida ($164,55 \pm 5,57$ cm), menor velocidade de caminhamento ($0,434 \pm 0,004$ mm s⁻¹) e maior tempo de repouso ($222,12 \pm 12,15$ s).

Não houve correlação significativa entre a toxicidade e a distância percorrida dos insetos tanto no tratamento com ozônio ($r=0,18$; $P=0,76$) como no tratamento controle ($r=0,83$; $P=0,07$); também não houve correlação significativa entre a toxicidade e a velocidade de caminhamento dos insetos tanto no tratamento com ozônio ($r=0,74$; $P=0,15$) como no controle ($r=0,92$; $P=0,02$).

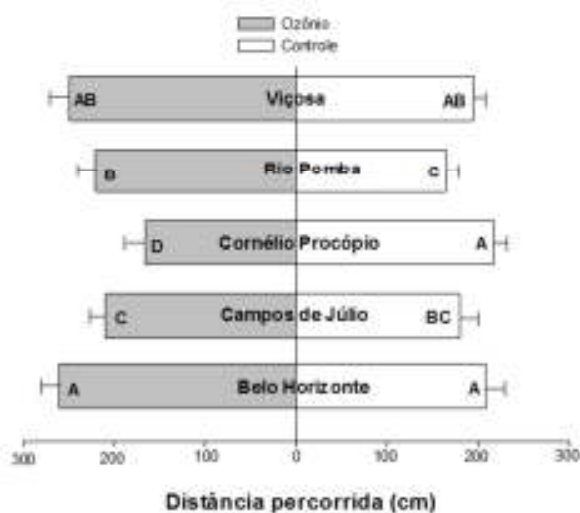


Figura 4. Distância percorrida (cm) (\pm E.P.M.) por indivíduos das populações de *Rhyzopertha dominica* submetidas a arenas tratadas com ozônio (500 ppm) e sem ozônio (controle), durante 10 min. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre as populações pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

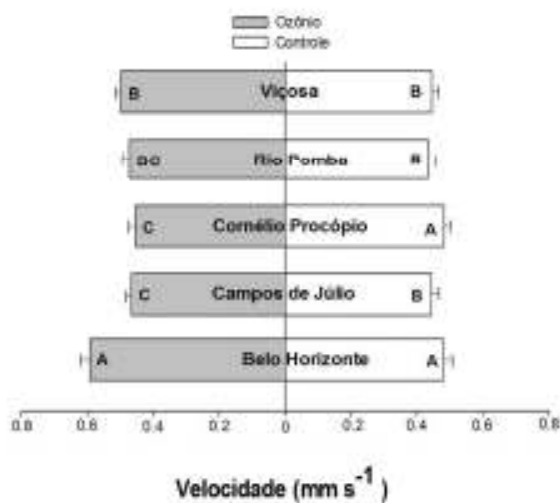


Figura 5. Velocidade de caminhada (mm s^{-1}) (\pm E.P.M.) por indivíduos das populações de *Rhyzopertha dominica* submetidas a arenas tratadas com ozônio (500 ppm) e sem ozônio (controle), durante 10 min. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre as populações pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

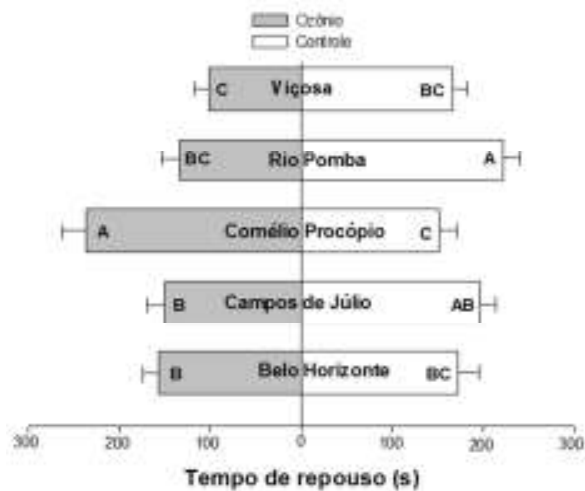


Figura 6. Tempo de repouso (s) (\pm E.P.M.) por indivíduos das populações de *Rhyzopertha dominica* submetidas a arenas tratadas com ozônio (500 ppm) e sem ozônio (controle), durante 10 min. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre as populações pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

4.3. Taxa respiratória, massa corpórea e associação com toxicidade e caminhada

A taxa respiratória, equivalente à liberação de CO₂ pelos insetos (Figura 7), diferiu significativamente entre os tratamentos com ozônio e o controle ($F_{1,48}=7,85$; $P<0,01$); todavia, não apresentou diferença significativa entre as populações de *R. dominica* quando expostas ao tratamento com o gás ozônio ($F_{4,20}=2,66$; $P=0,06$) e ao tratamento controle ($F_{4,20}=1,73$; $P=0,18$).

Não houve correlação significativa entre a taxa respiratória e a toxicidade ao gás ozônio das populações de *R. dominica* na presença de O₃ ($r=0,11$; $P=0,85$), assim como na ausência do gás O₃ ($r=-0,17$; $P=0,78$).

Não houve correlação significativa entre a produção de CO₂ e a massa corpórea dos insetos tanto no tratamento com ozônio ($r=0,03$; $P=0,95$) como no controle ($r=-0,21$; $P=0,73$).

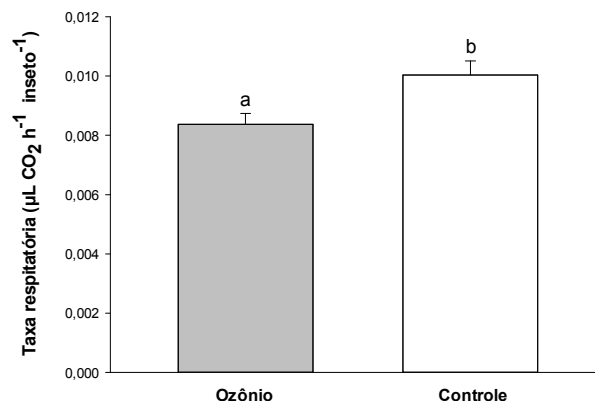


Figura 7. Taxa respiratória (\pm E.P.M.) das populações de *Rhyzopertha dominica* na presença e na ausência do gás ozônio.

5. DISCUSSÃO

Efeitos da fumigação com gás ozônio em diversas espécies de pragas de grãos armazenados tem sido relatados nos últimos anos (Sousa et al., 2008; Lu et al., 2009; Bonjour et al., 2011; Holmstrup et al., 2011; Marissa et al., 2011; Sousa et al., 2012). No entanto, a toxicidade do ozônio para populações de *R. dominica*, assim como as modificações comportamentais e suas interações com os padrões fisiológicos da espécie, são relatadas pela primeira vez.

Os bioensaios de tempo-mortalidade indicaram que as populações de *R. dominica* avaliadas foram sensíveis ao ozônio e suas respostas foram homogêneas, não exibindo resistência a este gás. Resultados similares foram reportados por Sousa et al. (2012) para adultos de *S. zeamais*.

De acordo com Haynes (1998), alguns compostos inseticidas podem estimular ou até mesmo reduzir a mobilidade dos insetos, afetando o seu comportamento locomotor. Neste trabalho observaram-se diferentes padrões comportamentais de caminhada (distância percorrida, velocidade de caminhada e tempo de repouso) entre as populações, tanto na presença como na ausência do ozônio. Essa variação entre populações pode ser explicada por diferenças nos processos sensoriais dos insetos, o que pode levar a uma intensificação ou redução de processos. Essas mudanças podem funcionar como mecanismo de defesa aos efeitos deletérios

provocados pelos inseticidas (Haynes, 1988; Hoyet al., 1998; Desneux et al., 2007). Assim, os padrões comportamentais das populações podem estar associados com as diferenças existentes no metabolismo que levam à produção de diferentes compostos capazes de influenciar no comportamento dos insetos (Guedes et al., 2006; 2009).

Os padrões comportamentais de caminhamento das populações de *R. dominica* aqui estudadas, não apresentaram correlação com a toxicidade ao ozônio. Sousa et al. (2012) reporta comportamento semelhante para adultos de *S. zeamais* expostos a este mesmo gás. A inexistência de correlação entre as respostas comportamentais e a susceptibilidade dos inseticidas já tem sido reportado por vários autores em diferentes espécies de insetos (Lockwood et al., 1984; Pereira et al., 2009; Renou et al., 1997). O fato de não observar correlação entre as respostas comportamentais de caminhamento e a toxicidade ao gás ozônio, possivelmente, é explicado devido a este gás não ser utilizado em condições de campo por mais de quatro décadas, como a fosfina, por exemplo. Consequentemente, os insetos não foram ainda submetidos à pressão de seleção para resistência ao gás ozônio.

O contrário é observado para indivíduos de *R. dominica* fumigados com fosfina, os quais apresentaram redução na mobilidade normal, permanecendo em repouso por maior tempo, percorrendo menores distâncias e de forma mais lenta (Pimentel et al., 2012). Tal fato é explicado devido ao uso contínuo e indiscriminado deste inseticida ao longo de décadas, o que tem favorecido o desenvolvimento de populações de insetos resistentes a este produto (Guedes et al., 1994; Pimentel et al., 2009).

Os inseticidas podem deixar os insetos sem coordenação ou até mesmo promover convulsões, podendo interferir significativamente na reprodução, na localização de presas ou alimento, na dispersão e migração (Haynes, 1988). Porém, os insetos evoluíram de uma variedade de respostas aos inseticidas refletindo seu modo de ação e como estes compostos podem afetar o comportamento (Cox et al. 1997, Bayley, 2002, Guedes et al., 2008). No caso de *R. dominica* exposta ao gás ozônio, a resposta fisiológica foi a diminuição da taxa respiratória, mas isto não interferiu em sua mobilidade. Pode-se dizer então, que a exposição ao gás ozônio não afeta a atividade de caminhamento nas populações de *R. dominica* estudadas.

A toxicidade dos fumigantes varia com a taxa respiratória dos insetos (Cotton, 1932), que pode ser mensurada pela produção de CO₂ ou consumo de O₂ (Emekci et al., 2002; 2004; Mitcham et al., 2006). No presente estudo, não foi observado correlação significativa entre a taxa respiratória e a toxicidade ao ozônio nas cinco populações de *R. dominica*. Resultados semelhantes foram encontrados em populações de *T. castaneum*, *O. Surinamensis* e *R. dominica* (Sousa et al., 2008). Não é sempre que a toxicidade dos fumigantes está associada com a taxa respiratória dos insetos (Oliveira et al., 2007; Sousa et al., 2008; Pereira et al., 2009). Estes resultados reforçam a falta de resistência cruzada ao ozônio e fosfina, já que Pimentel et al. (2007) relatou uma estreita associação entre a resistência à fosfina e à baixa taxa respiratória em populações de *T. castaneum*, *O. Surinamensis* e *R. dominica*.

Apesar da absorção de oxigênio representar o somatório dos requisitos de energia para os processos fisiológicos dos insetos (Clarke, 1993), os resultados indicam que na presença do ozônio, os insetos das diferentes populações de *R. dominica* podem reduzir suas taxas respiratórias sofrendo algum tipo de distúrbio em termos de trocas gasosas, o que pode ser um mecanismo de defesa da espécie para escapar aos efeitos tóxicos do gás. Estes resultados são interessantes, pois podem demonstrar a capacidade de adaptação das populações a diferentes condições ambientais através de seus processos fisiológicos básicos (Marais e Chown, 1993).

Neste trabalho, não houve correlação significativa entre a produção de CO₂ e a massa corpórea dos adultos de *R. dominica*. Este resultado pode ser devido ao fato de não ter ocorrido variação significativa na taxa respiratória dos insetos entre as populações. Van et al. (2004) também não reporta correlação significativa entre a massa corpórea e a taxa metabólica em *Drosophila melanogaster*. Sendo assim, a falta de correlação entre os parâmetros comportamentais é um fenômeno já documentado. Ressalta-se a necessidade de estudos adicionais com o uso do gás ozônio, a fim de verificar se este gás interfere na reprodução, longevidade e crescimento dos insetos, uma vez que, estes parâmetros são indicadores de efeitos letais.

Diante do exposto, a adoção de estratégias para a utilização do gás ozônio é necessária, a fim de minimizar a possível ocorrência da evolução de resistência ao gás

ou pelo menos para diminuir a velocidade de fixação do fenômeno de resistência nos insetos-praga de grãos armazenados. Vale ressaltar também, que é necessária a adoção de estratégias de manejo integrado de pragas, como por exemplo, o uso da concentração e período de exposição do gás de forma correta, assim como a aplicação do gás de forma intercalada com outros inseticidas, tendo como consequência, a manutenção dos padrões de susceptibilidade das populações ao gás, além de realizar o monitoramento da massa de grãos para detecção de infestações (Metcalf, 1980; McKenzie e Batterham, 1998; Sousa et al., 2008, 2009; Hagstrum e Subramanyam, 2009).

Considerando os resultados obtidos neste estudo, pode-se inferir que a fumigação com ozônio para controle de *R. dominica* é uma alternativa para uso nos programas de manejo desse inseto em unidades armazenadoras.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As populações de *R. dominica* mostraram uniformidade de resposta ao ozônio e nenhuma exibiu resistência ao gás. Constatou-se redução da taxa respiratória das populações depois da sua exposição ao gás ozônio; tal fato pode demonstrar adaptação ao ambiente tóxico. Por outro lado, foi constatado que o gás O₃ não promoveu alteração no comportamento locomotor dos insetos. O gás ozônio pode-se tornar uma alternativa promissora no controle de insetos-praga de grãos armazenados, uma vez que, este gás não necessita de adequações nas unidades armazenadoras; além disso, o gás ozônio é aplicado em fluxo contínuo, eliminando a necessidade de um ambiente hermeticamente fechado.

7. REFERÊNCIAS

Abbott, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265-266, 1925.

Alencar, E.R.; Faroni, L.R.D.; Soares, N.F.F.; Carvalho, M.C.S.; Pereira, K.F. Effect of the ozonization process on the quality of peanuts and crude oil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 2, p. 154-160, 2011.

Alencar, E. R.; Faroni, L.R.D' A.; Soares, N.D.F.F.; da Silva, W.A.; Silva, M. C. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 4, p. 899-905, 2012.

Almeida, E.; Assalin, M.R.; Rosa, M.A.; Durán, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v. 27, p. 818-824, 2004.

Araújo, E.L.; Sampaio, E.V.S.B.; Rodal, M.J.N. Composição florística e fitossociologia de três áreas de caatinga. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 55, p. 595-607, 1995.

Bayley, M. Basic behavior: the use of animal locomotion in behavioural ecotoxicology. In: Dell'Omo, G. **Behavioural Ecotoxicology**. West Sussex: Giacomo Dell'Omo. 2002. p. 211-230.

Beckel, H.; Lorini, I.; Lázzari, S.M.N. Comportamento de adultos de diferentes raças de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera, Bostrichidae) em superfície tratada com deltamethrin. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 48, n. 1, p. 115-118, 2004.

Bell, C.H. Fumigation in the 21 st century. **Crop Protection**, v. 19, p. 563-569, 2000.

Benhalima, H.; Chaudhry, M.Q.; Mills, K.A.; Price, N.R. Phosphine resistance in stored product insects collected from various grain storage facilities in Morocco. **Journal of Stored Products Research**, v. 40, n. 3, p. 241-249, 2004.

Bonjour, E.L.; Opit, G.P.; Hardin, J.; Jones, C.L.; Payton, M.E.; Beeby, R.L. Efficacy of ozone fumigation against the major grain pests in stored wheat. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n.1, p. 308-316, 2011.

Calatayud, P.A.; Tertuliano, M.; LeRü, B. Seasonal changes in secondary compounds in the phloem sap of cassava in relation to plant genotype and infestation by *Phenacoccus manihoti* (Homoptera: Pseudococcidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 84, p. 453-459, 1994.

Chambang, Y.; Arthur, F.H.; Wilde, G.E.; Throne, J.E.; Subramanyam, B.H. Methodology for Assessing Rice Varieties for Resistance to the Lesser Grain Borer *Rhyzopertha dominica*. **Journal of Insect Science**, v. 8, p. 1-5, 2008.

Chaudhry, M.Q. A review of the mechanism involved in the action of phosphine as an insecticide and phosphine resistance in stored product insects. **Pesticide Science**, v. 49, p. 213-228, 1997.

Chiattonne, P.V.; Torres, L.M.; Zambiasi, R.C. Aplicação do ozônio na indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 3, p. 341-349, 2009.

Chittenden, F.H. The lesser grain borer and the larger grain borer. **Bulletin of United State Bureau of Entomology**, v. 96, p. 29-47, 1911.

Clarke, A. Seasonal acclimatization and latitudinal compensation in metabolism: do they exist? **Functional Ecology**, v. 7, n. 2, p. 139-149, 1993.

Coats, J.R. Risks from natural versus synthetic insecticides. **Annual Review of Entomology**, v. 39, n. 1, p. 489-515, 1994.

Cotton, R.T. The relation of respiratory metabolism of insects to their susceptibility to fumigants. **Journal of Economic Entomology**, v. 25, n. 5, p. 1088-1103, 1932.

Cox, P.D.; Fleming, D.A.; Atkinson, J.E.; Bannon, K.L.; Whitefield, J.M. The effect of behaviour on the survival of *Cryptolestes ferrugineus* in an insecticide-treated laboratory environment. **Journal of Stored Products Research**, v. 33, n. 3, p. 257-269, 1997.

Cullen, P.J.; Tiwari, B.K.; O'Donnell, C.P.; Muthukumarappan, K. Modelling. Approaches to ozone processing of liquid foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 3, p. 125-136, 2009.

Desneux, N.; Decourtye, A.; Delpuech, J.M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 81-106, 2007.

Edde, P.A. A review of the biology and control of *Rhyzopertha dominica* (F.) the lesser grain borer. **Journal of Stored Products Research**, v. 48, p. 1-18, 2012.

Emekci, M.; Navarro, S.; Donahaye, E.; Rindner, M.; Azrieli, A. Respiration of *Tribolium castaneum* (Herbst) at reduced oxygen concentrations. **Journal of Stored Products Research**, v. 38, n. 5, p. 413-425, 2002.

Emekci, M.; Navarro, S.; Donahaye, E.; Rindner, M.; Azrieli, A. Respiration of *Rhyzopertha dominica* (F.) at reduced oxygen concentrations. **Journal of Stored Products Research**, v. 40, n. 1, p. 27-38, 2004.

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Estado de la labor de la FAO relativa a las pérdidas postcosecha, Adopción de un nuevo planteamiento para reducir las pérdidas y el desperdicio de alimentos. Mayo/2012. Disponible em: <http://www.fao.org/docrep/meeting/024/md290s.pdf> Acceso em: 8 de abril 2013.

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. How to Feed the World in 2050. Informe 2009. Disponible em: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf Acceso em: 06 abril 2013.

- Faroni, L.R.D'A.; Oliveira, C.R.F.; Gonçalves, J.R.; Pimentel, M.A.G. Influência da alimentação na biologia de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae). **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 29, n. 1, p. 13-18, 2004.
- Flinn, P.W.; Hagstrum, D.W.; Reed, C.; Phillips, T.W. Insect population dynamics in commercial grain elevators. **Journal of Stored Products Research**, v. 46, n. 1, p. 43-47, 2010.
- Golob, P. Current status and future perspectives for inert dusts for control of stored products insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 33, n. 1, p. 69-79, 1997.
- Gonçalves, A.A. Ozone: an emerging technology for the seafood industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 6, p. 1527-1539, 2009.
- Guedes, R.N.C.; Lima, J.O.G.; Santos, J.P.; Cruz, C.D. Inheritance of deltamethrin resistance in a Brazilian strain of maize weevil *Sitophilus zeamais*. **Journal of Pest Management**, v. 40, n. 1, p. 103-106, 1994.
- 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.1, p. 30-38, 2006.
- Guedes, R.N.C.; Campbell, J.F.; Arthur, F.H.; Opit, G.P.; Zhu, K.Y.; Throne, J.E. Acute lethal and behavioral sublethal responses of two stored-product psocids to surface insecticides. **Pest Management Science**, v. 64, n. 12, p. 1314-1322, 2008.
- Guedes, N.M.P.; Guedes, R.N.C.; Ferreira, G.H.; Silva, L.B. Flight take off and walking behavior of insecticide-susceptible and resistant strains of *Sitophilus zeamais* exposed to deltamethrin. **Bulletin of Entomological Research**, v. 99, n. 4, p. 393-400, 2009.
- Guenther, E. The production of essential oils: methods of distillation, enfleurage, maceration, and extraction with volatile solvents. In: Guenther, E. **The essential oils. History origin in plants. Production analysis**. Malabar, Florida: Krieger Publishing. Co. 1972. p. 85-188.
- Guzel-Sydim, A.B.; Greene, A.K.; Seydim, A.C. Use of ozone in the food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technology**, v. 37, p. 453-460, 2004.
- Hagstrum, D.W.; Subramanyam, B.A. review of stored-product entomology information sources. **American Entomologist**, v. 55, n. 3, p. 174-183, 2009.
- Hansen, L.S.; Hansen, P.; Jensen, K.M.V. Lethal doses of ozone for control of all stages of internal and external feeders in stored products. **Pest Management Science**, v. 68, n. 9, 1311-1316, 2012.

Haynes, K.F. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Annual Review of Entomology**, v. 33, n. 1, p. 149-168, 1988.

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. Michigan: eds: Ann Arbor Science. 1982. p.1-37

Hill, D.S. **Pest: Class Insecta**. In: Hill, D.S. Pests of stored foodstuffs and their control. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. p. 195-196.

Holmstrup, M.; Sorensen, J.G.; Heckmann, L.H.; Slotsbo, S.; Hansen, P.; Hansen, L.S. Effects of ozone on gene expression and lipid peroxidation in adults and larvae of the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **Journal of Stored Products Research**, v. 47, n.4, p. 378-384, 2011.

Hoy, C.W.; Head, G.P.; Hall, F.R. Spatial heterogeneity and insect adaptation to toxins. **Annual Review of Entomology**, v. 43, n. 1, p. 571-594, 1998.

Huang, F.; Subramanyam, B. Management of five stored-product insects in wheat with pirimiphos-methyl and pirimiphos-methyl plus synergized pyrethrins. **Pest Management Science**, v. 61, n. 4, p. 356-362, 2005.

Isikber, A.A.; Alma, M.H.; Kanat, M.; Karci, A. Fumigant toxicity of essential oils from *Laurusnobilis* and *Rosmarinus officinalis* against all life stages of *Tribolium confusum*. **Phytoparasitica**, v. 34, p. 167-177, 2006.

Isman, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45-66, 2006.

Kells, S.A.; Mason, L.J.; Maier, D.E.; Wolososhuk, C.P. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 37, n. 4, p. 371-383, 2001.

Khadre, M.A.; Yousef, A.E.; Kim, J.G. Microbiological aspects of ozone applications in food. A review. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 9, p. 1241-1252, 2001.

Korunic, Z. Rapid assessment of the insecticidal value of diatomaceous earths without conducting bioassays. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 219-229, 1997.

Korunic, Z. Review diatomaceous earths, a group of natural insecticides. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 34, n. 2/3, p. 87-97, 1998.

Lockwood, J.A.; Sparks, T.C.; Story, R.N. Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. **Bulletin of the Entomological of America**, v. 30, n. 4, p. 41-51, 1984.

Lorini, L.; Collins, P.J.; Daghli, G.J.; Nayak, M.K.;Pavic, H. Detection and characterization of strong resistance to phosphine in Brazilian *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). **Pest Management Science**, v. 63, n. 4, p. 358-364, 2007.

Lu, B.; Ren, Y.; Du, Y.; Fu, Y.; Gu, J. Effect of ozone on respiration of adult *Sitophilus oryzae* (L.), *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Rhyzopertha dominica* (F.). **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 10, p. 885-889, 2009.

Marais, E.; Chown, S.L. Repeatability of standard metabolic rate and gas exchange characteristics in a highly variable cockroach, *Perisphaeria* sp. **Journal of Experimental and Biology**, v. 206, n. 4, p. 4565-4574, 1993.

Marissa X.; Linda, J.M.; Charles P.W. Susceptibility of stored product insects to high concentrations of ozone at different exposure intervals. **Journal of Stored Products Research**, v, 47, n. 4, p. 306-310, 2011.

Marske, K.A.; Ivie, M.A. Beetle fauna of the United State and Canada. **The Coleopterist Bulletin**, v. 57, p. 495-503, 2003.

McDonough, M.X.; Mason, L.J.; Woloshuk, C.P. Susceptibility of stored product insects to high concentrations of ozone at different exposure intervals. **Journal of Stored Products Research**, v. 47, n.4, p. 306-310, 2011.

McKenzie, J.A.; Batterham, P. Predicting insecticide resistance: mutagenesis, selection and response. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 353, n. 1376, p. 1729-1734, 1998.

Metcalf, R.L. Changing role of insecticides in crop protection. **Annual Review of Entomology**, v. 25, p. 219-256, 1980.

Mewis, I.; Ulrichs, C. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pest *Tribolium confusum*, *Tenebrio molitor*, *Sitophilus granarius* and *Plodia interpunctella*. **Journal of Stored Product Research**, v. 37, n. 2, p. 153-164, 2001.

Mitcham, E.; Martin, T.; Zhou, S. The mode of action of insecticidal controlled atmospheres. **Bulletin of Entomological Research**, v. 96, n. 3, p. 213-222, 2006.

Mondal, M.; Khalequzzaman, M. Toxicity of essential oils against red flour beetles, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Bio-Sciences**, v. 14, p. 43-48, 2006.

Nerio, L.S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E.E. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). **Journal of Stored Products Research**, v. 45, n. 3, p. 212-214, 2009.

Nerio, L.S.; Olivero-Verbel, J; Stashenko, E.E. Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 372-378, 2010.

Tiwari, B.K.; Muthukumarappan, K. **Ozone in fruit and vegetable processing**. In: O'Donnell, C.; Tiwari, B.K.; Cullen, P.J.; Rice, R.G. Ozone in food processing. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2012. p. 55-80.

Oehlschlaeger, H.F. **Reactions of ozone with organic compounds**. In: Rice, R.G.; Cotruvo, J.A. Ozone/chlorine dioxide oxidation products of organic material. Cleveland: Cotruvo (Eds.). 1978. p. 20-37.

Oliveira, E.E.; Guedes, R.N.C., Tótola, M.R., De Marco Jr, P. Competition between insecticide susceptible and -resistant populations of the maize weevil *Sitophilus zeamais*. **Chemosphere**, v. 69, n. 1, p. 17-24, 2007.

Papachristos, D.P.; Stamopoulos, D.C. Fumigant toxicity of three essential oils on the eggs of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 40, p. 517-525, 2004.

Pereira, C.J.; Pereira, E.J.G.; Cordeiro, E.M.G.; Della Lucia, T.M.C.; Tótola, M.R.; Guedes, R.N.C. Organophosphate resistance in the maize weevil *Sitophilus zeamais*: Magnitude and behavior. **Crop Protection**, v. 28, n.2, p.168-173, 2009.

Phillips, T.W.; Throne, J.E. Biorational approaches to managing stored-product insects. **Annual review of entomology**, v. 55, n. 1, p. 375, 2009.

Pichersky, E.; Noel, J.P.; Dudareva, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, p. 808-811, 2006.

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, n. 9, p. 876-881, 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. 1, p. 71-74, 2009.

Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.A.; Silva, F.H.; Batista, M.D.;Guedes, R.N.C. Spread of phosphine resistance among brazilian populations of three species of stored product insects. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 1, p. 101-107, 2010.

Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.D'A.; Corrêa, 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.

Pirani, S., Gilda, M. **Application of ozone in food industries**, Doctoral Program in Animal Nutrition and Food Safety, Universidade gli Studi di Milano. 2011. p. 131.

Rajendran, S. Selection for resistance to phosphine or methyl bromide in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 82, n. 1, p. 119-124, 1992.

Rajendran, S. **Postharvest pest losses**. In: Pimentel, D. Encyclopedia of pest management. New York: Marcel Dekker, p. 654-656. 2002.

Rees, D.P. **Coleoptera**. In: Subramanyam, B.; Hagstrum, D.W. (Eds.) Integrated Management of Insects in Stored Products. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996. p. 1-39.

Rao, H.R.; Wilbur, D.A. Loss of wheat weight from feeding of lesser grain borer. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 45, p. 238-41, 1972.

Renou, M.; Henninot-Rodes, E.; Delorme, R.; Augé, D.; Touton, P. Oviposition of resistance and susceptible strains of *Drosophila melanogaster* in the presence of deltamethrin. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 84, n. 2, p.173-181, 1997.

Rice, R.G.; Robson, C.M.; Miller, G.W.; Hill, A.G. Uses of ozone in drinking water treatment. **Journal of the American Water Works Association**, v. 73, n. 1, p. 44-57, 1981.

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. 3, p. 282-285, 2008.

Shi, M.; Collins, P.J., Ridsdill-Smith, J.; Renton, M. Individual-based modelling of the efficacy of fumigation tactics to control lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* in stored grain. **Journal of Stored Products Research**, v. 51, p. 23-32, 2012.

Silva, S.B.; Mello, L.M.; Geyer, M.C.;Prá, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Seminário: CiênciasAgrárias**, v. 32, n. 2, p. 659-682, 2011.

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.D.A.; Silva, G.N.; Guedes, R.N.C. Ozone Toxicity and Walking Response of Populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 6, p. 2187-2195, 2012.

Stathers, T.E.; Riwa, W.; Mvumi, B.M.; Mosha, R.; Kitandu, L.; Mngara, K.; Kaeoneka, B.; Morris, M. Do diatomaceous earths have potential as grain protectants for small-holders farmers in sub-Saharan Africa? The case of Tanzania. **Crop Protection**, v. 27, n. 1, p. 44-70. 2008.

Timlick, B.; Fields, P.G. A comparison of the effect of two diatomaceous earth formulation on *Plodia interpunctella* (Hunbner) and the effect of different commodities on diatomaceous earth efficacy. **10th International Working Conference on Stored Product Protection**, p. 840-844, 2010.

Tiwari, B.K.; Brennan, C.S.; Curran, T.; Gallagher, E.; Cullen, P.J.; O'Donnell, C.P. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, v. 51, p. 248-255, 2010.

Toews, M.D.; Campbell, J.F.; Arthur, F.H.; Ramaswamy, S.B. Outdoor flight activity and immigration of *Rhyzopertha dominica* into seed wheat warehouses. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 121, n. 1, p. 73-85, 2006.

Tomiyasu, H.; Gordon, G. Colorimetric determination of ozone in water based on reaction with bis (terpyridine) iron (II). **Analytical Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 752-754, 1984.

VanVoorhies, W.A.;Khazaeli, A.A.; Curtsinger, J.W. Lack of correlation between body mass and metabolic rate in *Drosophila melanogaster*. **Journal of insect physiology**, v. 50, n.5, p. 445-453, 2004.

Vardeman, E.A.; Arthur, F.H.; Nechols, J.R.; Campbell, J.F. Efficacy of surface applications with diatomaceous earth to control *Rhyzopertha dominica* (f.) (Coleoptera: Bostrichidae) in stored wheat. **Journal of Stored Products Research**, v. 43, n. 4, p. 335-341, 2007.