

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

**GRAZIELE MILANI PESSINI**

**Descrição da sintomatologia e análise da proteína kin17 em lagartas de *Bombyx mori* submetidas à intoxicação pelo inseticida chlorantraniliprole**

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
OUTUBRO- 2014

**GRAZIELE MILANI PESSINI**

**Descrição da sintomatologia e análise da proteína kin17 em lagartas de *Bombyx mori* submetidas à intoxicação pelo inseticida chlorantraniliprole**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Fernandez.

MARINGÁ  
PARANÁ - BRASIL  
OUTUBRO- 2014

Aos meus pais, Edna M. M. Pessini e Paulo Pessini, por tudo o que sou.

Ao meu noivo, Junior, pelo incentivo e confiança.

Com amor, dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela oportunidade de realização deste Curso de Mestrado e deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), corpo docente seus funcionários, pelo apoio e ensinamentos.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos.

À minha orientadora, professora doutora Maria Aparecida Fernandez, pela confiança, pela orientação, disponibilidade, estímulo e dedicação.

Às Coorientadoras, doutoras Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela participação na realização deste trabalho, e Roxelle Ethienne Ferreira Munhoz, em especial, professora e amiga, pela paciência, orientação na análise estatística, colaboração e ensinamentos fundamentais ao longo da minha carreira científica.

À empresa Fiação de Seda Bratac, pela doação de lagartas de híbridos comerciais e pelo suporte técnico, em especial ao Shunsuke Mizuno e Willian Shigeaki Aita, pela grande colaboração na realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Organização Funcional do Núcleo, pelas experiências trocadas. Agradeço especialmente aos colegas do Grupo de Pesquisa com *Bombyx mori*, Roxelle Ethienne Ferreira Munhoz, Thaís Souto Bignotto, Rafaela Bernalhuk, Naiara Climas Pereira, Cláudia Regina Saez das Neves, Verônica Aureliana Fassina Fecarrota, Fabiana Rando, Alana Lúcia Oro e Alex Sandro Chiarello, pela preciosa ajuda na condução dos experimentos.

A todos os meus amigos, por todas as palavras de estímulo e por fazer minha vida muito mais fácil e divertida.

Enfim, agradeço a todos que colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Graziele Milani Pessini, filha de Paulo Pessini e de Edna Marlene Milani Pessini, nasceu em 05 de fevereiro de 1984, na cidade de Cruzeiro do Sul, estado do Paraná.

Iniciou o Ensino Fundamental, em 1991, no Colégio Estadual Doutor Romário Martins, na cidade de Cruzeiro do Sul, estado do Paraná. Conclui o Ensino Médio no Colégio Estadual Antonio Tortato, em Paranacity, Paraná, no ano de 2001.

Diplomou-se em Ciências Biológicas, obtendo o título de Licenciatura e Bacharel, em dezembro de 2009, na Universidade Paranaense (Unipar), na cidade de Paranavaí, Paraná.

Em Julho de 2011, concluiu o Curso de Especialização em Biologia Vegetal, na Universidade Estadual do Paraná (Unespar), na cidade de Paranavaí, Paraná.

Em março de 2013, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá, em Maringá, estado do Paraná, Brasil.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1. <i>Bombyx mori</i> .....	4
2.2. Sericicultura .....	6
2.3. Deriva de agrotóxicos .....	8
2.4. Chlorantraniliprole .....	10
2.5. Proteína kin17 .....	13
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
3.1. Descrição da sintomatologia em lagartas de <i>B. mori</i> submetidas à intoxicação pelo inseticida chlorantraniliprole .....	17
3.1.1. Manejo e intoxicação de <i>Bombyx mori</i> .....	17
3.1.2. Concentração letal .....	17
3.1.3. Sintomatologia .....	18
3.1.4. Análise morfológica.....	19
3.1.5. Análises estatísticas .....	19
3.2. Avaliação da expressão da proteína kin17 em lagartas de <i>B. mori</i> submetidas à intoxicação pelo inseticida chlorantraniliprole .....	20
3.2.1. Manejo e intoxicação de <i>Bombyx mori</i> .....	20
3.2.2. Obtenção das amostras de proteínas .....	20
3.2.3. Gel de poliacrilamida .....	21
3.2.4. Quantificação de proteínas .....	22
3.2.5. Detecção por <i>western blot</i> .....	22
3.2.6. Análise dos efeitos de baixa dosagem sobre a produtividade de <i>Bombyx mori</i> .....	23
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>24</b>
4.1. Descrição da sintomatologia em lagartas de <i>B. mori</i> submetidas à intoxicação pelo inseticida chlorantraniliprole .....	24
4.1.1. Concentração letal do chlorantraniliprole .....	24
4.1.2. Descrição da sintomatologia .....	29
4.1.3. Avaliação da produtividade .....	32
4.1.4. Alterações morfológicas.....	34

4.2. Avaliação da expressão da proteína kin17 em lagartas de <i>B. mori</i> submetidas à intoxicação pelo inseticida chlorantraniliprole .....	36
4.2.1. Detecção da proteína kin17 .....	36
4.2.2. Análise dos efeitos de baixa dosagem sobre a produtividade em <i>B. mori</i> .....	39
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>41</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>42</b>

## RESUMO

PESSINI, Grazielle Milani, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, Outubro de 2014. **Descrição da sintomatologia e análise da proteína kin 17 em lagartas de *Bombyx mori* submetidas à intoxicação pelo inseticida chlorantraniliprole.** Orientadora: Maria Aparecida Fernandez. Conselheiros: Ana Sílvia Lapenta e Priscilla Ayleen Bustos Mac-Lean.

A pulverização aérea de um novo inseticida, cujo princípio ativo é o chlorantraniliprole, em plantações próximas a áreas de amoreiral, tem causado danos aos produtores de bicho-da-seda, *Bombyx mori*. Neste trabalho, foi avaliado o efeito do inseticida chlorantraniliprole em lagartas de diferentes idades de *B. mori*. Diferentes doses do inseticida foram aplicadas por imersão em folhas de amoreira e, em seguida, disponibilizadas para a nutrição das lagartas. Foi observado 100% de mortalidade das lagartas em concentrações elevadas de 0,2 e 0,1 ppm de chlorantraniliprole. Além disso, foram frequentes sintomas como a parada de alimentação, vômitos, desenvolvimento irregular e ecdise irregular. Outros sintomas comuns em concentrações subletais ( $0,025$ ,  $0,0125$ ,  $6,25 \times 10^{-3}$ ,  $3,13 \times 10^{-3}$  e  $1,57 \times 10^{-3}$  ppm) foram a presença de fezes em rosário e a produção de casulos de casca fina. A análise histológica revelou que o chlorantraniliprole provoca profundas alterações morfológicas na parede intestinal, tanto no epitélio de revestimento, como na musculatura associada, afetando a função fisiológica do órgão e a sobrevivência do inseto. Os resultados obtidos na imunodeteção com anticorpo contra a proteína kin17 em tecidos larvais de *B. mori* demonstraram que não houve expressão desta proteína, tanto em tecidos provenientes de lagartas controle como de lagartas intoxicadas a 0,025 ppm do inseticida. Isso sugere que, em *B. mori*, a kin17 não deve estar envolvida com processos de estresse celular por intoxicação dessa classe química do inseticida testado. Podemos concluir que elevadas concentrações do inseticida chlorantraniliprole causam significativas taxas de mortalidade, afetando o desenvolvimento das lagartas de *B. mori*, e nas concentrações subletais, reduzem a quantidade de casulos normais.

**Palavras-chave:** Bicho-da-seda, chlorantraniliprole, kin17, sintomas, mortalidade.



## ABSTRACT

PESSINI, Grazielle Milani M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, October, 2014. **Description of symptomatology and analysis of kin 17 protein in larvae of *Bombyx mori* intoxicated with chlorantraniliprole.** Adviser: Maria Aparecida Fernandez. Committee Members: Ana Silvia Lapenta and Priscilla Ayleen Bustos Mac-Lean.

Chlorantraniliprole is the main compound of a new insecticide and its aerial spraying near mulberry plantations has been caused several damages to the silkworm (*Bombyx mori*) producers. In this work, the effects of chlorantraniliprole insecticide were analyzed in different instars of *B. mori* larvae. Different doses of the insecticide were administrated by immersion of the mulberry leaves and then offered to the larvae. Were observed that, in high concentration of chlorantraniliprole (0,2 ppm and 0,1 ppm), the mortality rate of larvae were 100%. Besides, symptoms such as feeding cessation, regurgitation, late development and incomplete ecdysis were frequent. Other common symptoms in sub-lethal concentrations (0,025, 0,0125, 6,25 x 10<sup>-3</sup>, 3,13 x 10<sup>-3</sup> e 1,57 x 10<sup>-3</sup> ppm) were rosary-shaped excrements and production of thin-shelled cocoons. The histological analysis revealed that chlorantraniliprole cause serious morphological changes in the internal midgut, both to the epithelial coating and its associate muscles, modifying its physiological functions and the insect survival. The results obtained in immunodetection, using the antibody against kin17 protein in larval tissue of *B. mori*, showed that there was no expression of this protein, both in larval tissue of the control group and the larvae intoxicated with 0,025 ppm of the insecticide, this results suggests that, in *B. mori*, kin17 protein is not associated with process of cellular stress by intoxication using this class of insecticide tested. Thus, we can conclude that chlorantraniliprole, in high concentrations, caused significant mortality rates, affect the larvae development in *B. mori* and in the sub-lethal concentrations, the amount of regular cocoons were reduced.

**Keywords:** Silkworm, Chlorantraniliprole, kin17, symptoms, mortality.

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Bombyx mori*, descrita por Linnaeus, é muito estudada e usada como sistema modelo. É descrito para o bicho-da-seda um rico repertório de informações genéticas sobre mutações que afetam seu desenvolvimento, morfologia e comportamento (Arunkumar et al., 2006). São inúmeras as raças reportadas para *B. mori* L. (Lepidoptera, Bombycidae), sendo as mais conhecidas as de origens geográficas japonesas, europeias e chinesas.

A ordem Lepidoptera possui entre 400 e 500 espécies que produzem seda, porém somente de oito a nove são comercialmente utilizadas, entre elas, a *B. mori*, responsável por 99% da produção mundial de seda (Dingle et al., 2005). As outras espécies pertencem à família Saturniidae: *Antheraea pernyi* Guerin, *A. milita* Drury, *A. yamamai* Guerin, *A. assama* Helfer e *Attacus ricini* Boisduval, entre outras (Goldsmith et al., 2005).

*Bombyx mori* produz seu casulo por meio da secreção das glândulas sericígenas, as quais ocupam um terço do corpo da lagarta, quando este chega ao quinto instar, e secretam as proteínas fibroína, sericina e fibrohexamerina na forma líquida. Quando entram em contato com o ar, estas proteínas se solidificam, formando um fio e o casulo é então construído pelas lagartas por movimentos extremamente regulares e precisos (Mondal et al., 2007). Desse casulo produzido pelo inseto é extraído o fio de seda. A seda é uma fibra macia e leve, considerada adequada a todos os climas, pois é má condutora de calor e quando misturada com outros fios, produz tecidos mais resistentes (Fernandez et al., 2005).

*B. mori* é considerado uma espécie totalmente domesticada, pois não é mais encontrado na natureza, sendo totalmente dependente do homem para sobreviver. Provavelmente, este lepidóptero evoluiu da linhagem selvagem *Bombyx mandarina*, que apresenta características morfológicas semelhantes e capacidade de acasalamento interespecífica (Goldsmith et al., 2005).

Estima-se a existência de cerca de 3000 genótipos de *B. mori* em países de clima temperado e tropical (Nagaraju e Goldsmith, 2002), mantidos na Ásia e na Europa, diferindo entre si, principalmente quanto às suas preferências ambientais e ao número de gerações que podem ser obtidas anualmente. *B. mori* pode ser classificado por meio de diversas maneiras, podendo ser, de acordo com a região

nativa, o voltinismo, o número de ecdises ou até mesmo a cor do casulo (Aruga, 1994).

A prática de sericicultura inclui o cultivo de amoreira, pois este lepidóptero se alimenta exclusivamente deste vegetal, associado à produção de ovos, criação de lagartas, produção de casulos e, finalmente, à produção de seda pelo setor industrial. O clima do Brasil é favorável tanto para o cultivo de amoreira como para a criação do bicho-da-seda, sendo a sericicultura uma boa alternativa de cultura para o país, especialmente para os pequenos agricultores (Fernandez et al., 2005).

Embora plantações de amoreira sejam livres de agroquímicos, a deriva de agrotóxicos pode ocorrer (Nagaraju e Goldsmith, 2002). Por outro lado, as lagartas de *B. mori* são altamente suscetíveis aos inseticidas em geral. Sendo assim, a aplicação de inseticida no campo sericicultura não é aconselhável, uma vez que as folhas de amoreiras contaminadas ou o contato da lagarta com o inseticida pode prejudicar este inseto e conseqüentemente a produção dos casulos (Bora et al., 2012).

O uso de agroquímicos por pulverização aérea em grandes culturas pode contaminar o amoreiral, alimento do *B. mori*, trazer prejuízos aos criadores e à indústria, de forma a afetar toda a cadeia produtiva da seda. No entanto, a eliminação completa da deriva de agrotóxicos é quase impossível.

O chlorantraniliprole, uma nova classe química de pesticida diamidas antranílicas, possui potente atividade contra insetos da ordem Lepidoptera (Temple et al., 2009), além de ser seguro para mamíferos (Lahm et al., 2007). Este inseticida atua em receptores de rianodina, os quais desempenham importante papel na função muscular. A sinalização resulta em liberação de cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático, fazendo com que os filamentos de actina deslizem sobre os de miosina. Com isso, as miofibrilas se encurtam e o músculo se contrai permanentemente. Isso resulta em rápida parada alimentar, paralisia, inclusive do coração, e, finalmente, em morte da lagarta (Cordova et al., 2006).

Entre todos os patógenos que afetam o bicho-da-seda, o baculovírus *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus (BmNPV) é o principal causador de perdas na produção, causando prejuízos econômicos para os sericultores. O Nucleopolyhedrovirus faz parte do gênero Nucleopolyhedrovirus (NPV) e é um patógeno altamente infectivo, que causa uma das mais sérias doenças virais, conhecida por poliedrose nuclear ou amarelidão. No Paraná, um isolado geográfico

do vírus Nucleopolyhedrovirus, subgrupo múltiplo (MNPV) foi descrito por Brancalhão (2002) e constitui a principal ameaça à produção de seda no estado.

Recentemente, foi reportada a clonagem e sequência das proteínas de reconhecimento de origens de replicação, ORC, *Bm1* a *Bm6* em *Bombyx mori* (Yang et al., 2011). É relatado que essas proteínas apresentam domínios conservados com as proteínas descritas em mamíferos. É descrito na literatura que a infecção pelo BmNPV reflete um aumento significativo de proteínas relacionadas à replicação do DNA, denominadas BmORC, em lagartas de *B. mori*. Esses resultados reforçam a importância da utilização desse sistema para estudos de replicação do DNA em eucariotos e a possível participação de proteínas acessórias correlacionadas a focos de replicação, como a proteína de reparo kin17.

A proteína kin17 é comprovadamente envolvida no reparo do DNA e acredita-se que esta seja mais expressa em situações de estresse celular, o que pode incluir, por exemplo, a intoxicação por agrotóxicos. Esta proteína foi descoberta, em 1989, em células de rato, graças a anticorpos policlonais mono-específicos dirigidos contra a proteína RecA de *Escherichia coli* (Angulo et al., 1989). Entre os eucariotos, o gene KIN17 é conservado filogeneticamente, o que indica para atividade funcional em processos biológicos básicos. A estrutura da proteína kin17 tem sido estudada em camundongos e foi possível observar que ela apresenta cinco domínios funcionais. Estudos moleculares relacionando os sintomas da intoxicação por inseticidas e proteínas ativadas por estresse, como a kin17, em lagartas de bicho-da-seda são escassos na literatura. Por isso, faz-se necessário à investigação da expressão desta proteína em lagartas intoxicadas por inseticidas.

Em 2013, nove municípios do estado do Paraná foram afetados pela deriva de agrotóxicos, totalizando 55 sericultores prejudicados. Foram 126 hectares de amoreiral comprometidos, com um valor de prejuízo estimado em R\$ 114.893,28 (SEAB, 2013). Devido à grande demanda apresentada por sericultores de diferentes regiões do estado, fez-se necessário a investigação da sintomatologia e os efeitos biológicos das diferentes concentrações de chlorantraniliprole, pois o mesmo vem trazendo prejuízos para os sericultores e conseqüentemente para toda cadeia produtiva de seda. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os sintomas e analisar a expressão da proteína kin17 em lagartas intoxicadas experimentalmente pelo inseticida chlorantraniliprole.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Bombyx mori*

O bicho-da-seda é um lepidóptero domesticado, cujos casulos são utilizados para a produção de fios de seda. Este inseto pertence ao reino Animalia, filo Artropoda, classe Insecta, ordem Lepidoptera, família Bombycidae, gênero *Bombyx* (Hanada e Watanabe, 1986). É, além da abelha, o único inseto domesticado com finalidade comercial (Kellogg, 1910).

O *B. mori* apresenta um ciclo de vida típico dos lepidópteros, com quatro estágios distintos: ovo, lagarta, pupa e adulto, finalizando com a metamorfose. As lagartas passam por cinco estágios, classificados em 1º, 2º, 3º, 4º e 5º instar (Figura 1). O bicho-da-seda tem seu tamanho corporal elevado quase que setenta vezes e ocupa quatro vezes mais o espaço inicial. Depois de cinco semanas, quando a lagarta está no 5º instar, ela pára de se alimentar, inicia a fiação do casulo e se converte em pupa. Mais tarde, esta se transformará em uma mariposa (Aruga, 1994). Quando a pupa se transforma em mariposa, pode-se verificar o dimorfismo sexual, sendo as fêmeas significativamente maiores que os machos (Hanada e Watanabe, 1986). Os ovos são de constituição pequena, não permitindo o armazenamento de macronutrientes, como a glicose, no entanto, as vitaminas podem ser armazenadas para atender às exigências iniciais das lagartas (Toledo, 1996).

*Bombyx mori* é originário da China e vem sendo domesticado pelo homem há aproximadamente 5.000 anos para obtenção de fios de seda, o qual é utilizado para fabricação de roupas e outros utensílios (Brancahã, 2002), havendo mais de 3.000 linhagens conhecidas (Yamamoto, 2000). No entanto, este lepidóptero também tem sido usado para produzir proteínas recombinantes (Tomita et al., 2003) e como biorreatores (Zhang et al., 2006). Além disso, a seda é usada como fonte de biomateriais, como mostrado por Wang et al. (2007), e as pupas para a remoção de metais pesados de águas contaminadas (Paulino et al., 2007).

Devido às suas características de fácil manuseio e criação, *B. mori* é considerado hoje um organismo modelo em estudos científicos. A ordem Lepidoptera, ao qual o *B. mori* pertence, possui entre 400 e 500 espécies que

produzem seda, porém somente de oito a nove são comercialmente cultivadas; entre elas *B. mori*, que é responsável por 99% da produção mundial de seda (Dingle et al., 2005). As outras espécies pertencem à família Saturniidae (Nagaraju e Goldsmith, 2002).

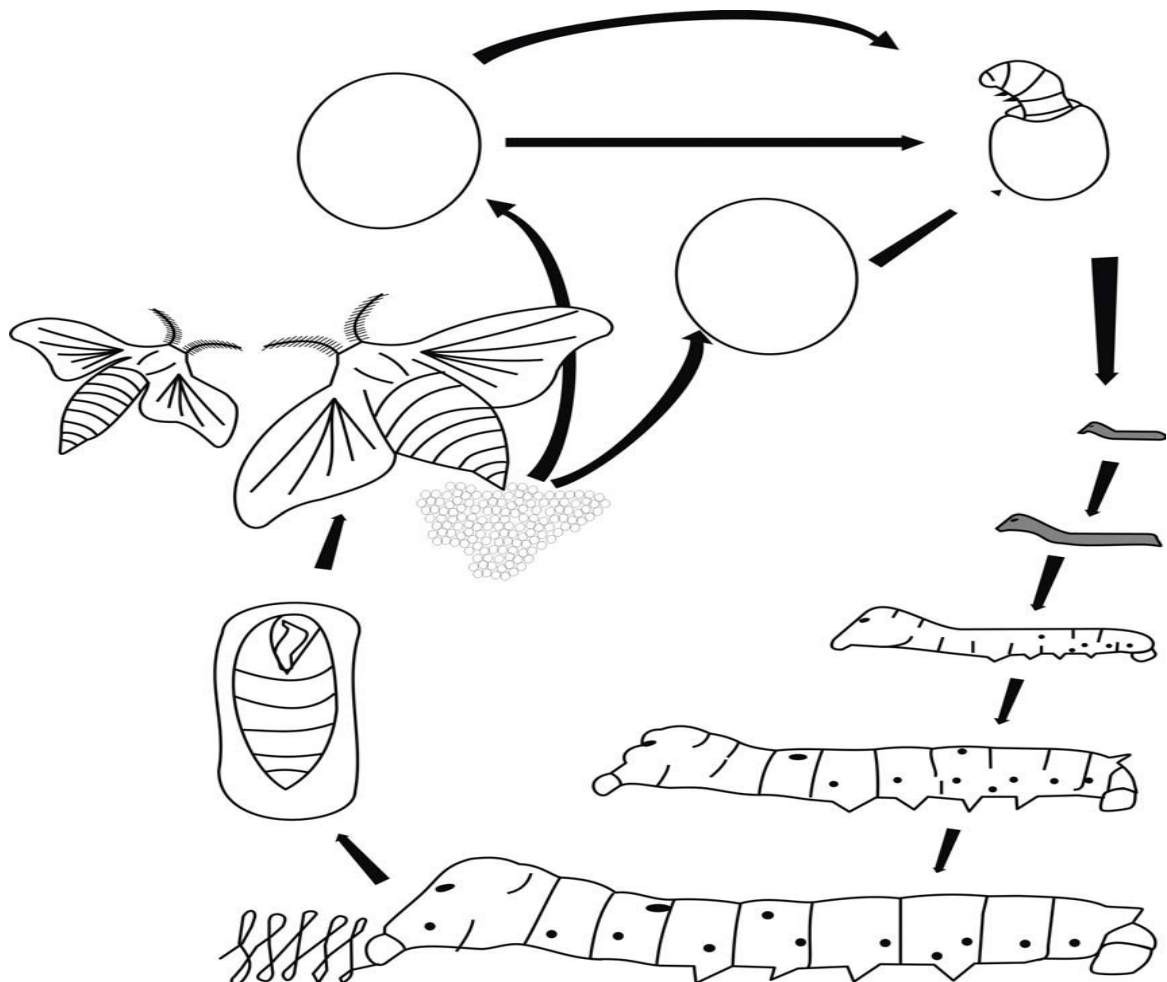


Figura 1 - Ciclo de vida do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). As lagartas de diferentes tamanhos representam os cinco instares, que culminam na pupa no interior do casulo. A mariposa menor representa o macho adulto e a maior a fêmea. (Munhoz, 2010).

Tem sido aceito que *Bombyx mandarina* seja o ancestral selvagem mais próximo de *B. mori* (Goldsmith et al., 2005), sendo ambos morfológica e fisiologicamente similares. *Bombyx mandarina*, de ocorrência no Japão e na Coréia, apresenta 27 cromossomos, enquanto *Bombyx mandarina*, da China, apresenta 28 cromossomos, assim como o domesticado *B. mori*. Os dois tipos selvagens, *Bombyx mandarina* da China e do Japão, possuem morfologia homogênea e número de cromossomos diferentes por genoma (Li et al., 2007).

A espécie domesticada foi propagada em larga escala e utilizada para a produção de seda na China, Japão e Europa, chegando ao Brasil apenas no ano de 1740 (Hanada e Watannabe, 1986). Devido ao seu antigo processo de domesticação, as lagartas não conseguem se alimentar em seu ambiente natural, necessitando que o alimento seja fornecido pelo homem. Esta dieta consiste exclusivamente em folhas de amoreiras. As mariposas de *B. mori* apresentam asas e aparelho mastigatório degenerados e não podem mais voar ou se alimentar, ou seja, esta espécie é totalmente dependente do homem, o que caracteriza a completa domesticação (Munhoz, 2010). Estima-se que a espécie sofreu mais de quatrocentas mutações, gerando raças geneticamente melhoradas para a produção de seda. (Holanda et al., 2004).

O casulo produzido pelo inseto, do qual é extraído o fio de seda, é rico em proteínas produzidas por um par de glândulas chamadas sericígenas (Rahman e Gopinathan, 2003). Essas glândulas ocupam um terço do corpo do inseto quando este chega ao quinto instar. Elas secretam as proteínas fibroína, sericina e p25 ou fibrohexamerina na forma líquida. Quando entram em contato com o ar, estas proteínas se solidificam, estando prontas para formar o casulo (Mondal et al., 2007). As cadeias de fibroína, que são proteínas fibrosas, formam filamentos rígidos, juntamente com a sericina e a fibrohexamerina, constituindo os fios de seda (Corradello, 1987). Uma terceira categoria de proteínas constituintes do casulo, caracterizada molecularmente nos lepidópteros *Galleria mellonella* e *B. mori* e denominadas seroína 1 e seroína 2, atuam como agentes antimicrobianos, protegendo o casulo de fungos e bactérias (Zurovec et al., 1998).

De acordo com a distribuição geográfica, o *B. mori* pode ser classificado e identificado como de origem japonesa, chinesa europeia ou indiana (Krishnaswami et al., 1979). Pode ser classificado também de acordo com o voltinismo, o número de ecdises ou até mesmo conforme a cor do casulo (Aruga, 1994).

## **2.2. Sericicultura**

A sericicultura é uma das atividades agroindustriais mais antigas que se tem registro na humanidade (Schoeser, 2007). Compreende a cultura da amoreira (*Morus* spp.), a criação do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) e a produção de fios de seda. É reconhecida como uma das atividades agroindustriais mais promissoras e

adequadas ao desenvolvimento econômico e social do meio rural, que proporciona oportunidades de emprego com um investimento mínimo, principalmente em pequenas propriedades. Caracteriza-se como uma atividade essencialmente familiar, que absorve mão-de-obra feminina, de baixo impacto ambiental e de rápido retorno financeiro.

Desde a antiguidade, a sericicultura tem sido um meio de subsistência para muitos trabalhadores, seja no campo ou na cidade, tornando-se um importante fator para a globalização, por aproximadamente 2000 anos, durante a chamada “Era da Rota da Seda” (Kurin, 2002). Estas rotas não só foram significativas para o desenvolvimento e florescimento de grandes civilizações, como o Egito Antigo, a Mesopotâmia, a China, a Pérsia, a Índia e até Roma, mas também ajudaram a fundamentar o início do mundo moderno. “Rota da seda” é uma tradução do alemão *Seidenstraße*, sendo a primeira denominação do caminho feita pelo geógrafo alemão Ferdinand von Richthofen, no século XIX (Eliseeff, 1998).

Atualmente, a sericicultura é a principal fonte econômica para mais de 30 milhões de famílias em países como a China, Índia, Vietnã e Tailândia. E não é diferente para o agronegócio brasileiro, contribuindo para o desenvolvimento sustentável do país, por meio da inclusão social associada ao fato de ser uma atividade de baixo impacto ambiental.

A China foi a primeira civilização a utilizar a seda. Os primeiros dados encontram-se nas escritas de Confúcio, que falam sobre a criação doméstica do bicho-da-seda nos palácios da imperatriz Siling-Chi no século XVIII a.C. Nestes escritos, há registros sobre a forma de controle do ciclo do bicho-da-seda, alimentando-o com folhas de amoreira e matando os adultos antes de nascerem, além das técnicas do bobinamento dos filamentos, tecendo-os em fios resistentes que, posteriormente, eram usados para a confecção de tecidos (Álvarez e López, 2003).

No Brasil, a introdução da sericicultura ocorreu no estado do Rio de Janeiro, no ano de 1848, no município de Itaguaí, onde foi instalada a primeira indústria de seda nacional, a Companhia Imperial Seropédica Fluminense. Posteriormente, a atividade se desenvolveu em Minas Gerais, com a instalação da primeira Estação Experimental de Sericicultura, no município de Barbacena, em 1912. Em 1992, na cidade de Campinas, São Paulo, foi criada a primeira indústria de seda, a Seda Nacional S.A. (Hanada e Watanabe, 1986). Atualmente, esta atividade é



basicamente para exportação, uma vez que o mercado nacional consome tão somente 2-3% de sua produção. Hoje a sericultura brasileira está concentrada na região centro-sul do país, especificamente nos estados de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul (Fernandez, 2005).

Especificamente no Paraná, o bicho-da-seda aparece pela primeira vez em Cambará, em 1932, mesma cidade onde, em 1946, surgiu a primeira fábrica paranaense. No final da década de 60, com o incentivo de algumas indústrias paulistas, iniciou-se na região do Norte Pioneiro, no município de Ibaiti e em outros municípios vizinhos, a criação do bicho-da-seda em escala comercial. Em 1972, instalava-se no Paraná, no município de Cornélio Procópio, a KANEBO *SILK DO BRASIL – INDÚSTRIA DE SEDA*. Em 1973 e em 1984, o sistema cooperativista do Paraná passou a participar da cadeia produtiva da seda, com a implantação de um Projeto da Cooperativa dos Cafeicultores e Agropecuaristas de Maringá Ltda. (Cocamar). A partir de 1970, a atividade começou a crescer no estado. Na safra 1985/86, o Paraná tornou-se o maior produtor nacional de casulos verdes.

O estado do Paraná continua sendo o maior produtor nacional de casulos verdes. Na safra de 2012/2013, foi responsável por mais de 89% da produção nacional, com a produção de pouco mais de 2000 toneladas de casulos verdes. Segundo consta no Relatório Takii, o segmento agroindustrial da seda contribuiu com quase vinte e sete milhões de dólares na formação do Valor Bruto da Produção Paranaense (SEAB, 2013).

O levantamento do número de sericultores no estado do Paraná é do ano 1985, quando havia 2.210 barracões e 4.446 ha de área cultivada com amoreira. O município de Nova Esperança continua como o maior produtor do estado, onde a atividade é exercida por 199 sericultores e equivale a 10% do total do estado, com 303 barracões (13%), numa área de 730 ha (16%) e 344 mil kg de casulos verdes (16%) (SEAB, 2013).

### **2.3. Deriva de agrotóxicos**

A deriva é conceituada por vários autores de forma similar, Christofolletti (1999) define deriva como tudo aquilo que não atinge o alvo. Miller (1993) define deriva como a parte de uma aplicação agrícola que é carregada para fora da área alvo, pela ação do vento. Completando, Miller (2004) afirma que o agrotóxico

também pode ser transportado, na forma de deriva, em gotas ou na forma de vapor. Além do prejuízo resultante da perda de agrotóxico e dos danos que podem ser causados em culturas e insetos adjacentes, a deriva assume grande importância devido à conscientização da população, nos últimos anos, em relação à saúde e ao ambiente (Centner, 2014).

Na sociedade atual, existe um consenso de que os agrotóxicos são prejudiciais ao homem, em razão das notícias de contaminação ambiental. O seu uso, no entanto, tem contribuído com a prática agrícola, permitindo o cultivo em larga escala. Sua utilização deve ser feita de maneira racional, dentro do contexto mais amplo da proteção integrada de plantas. Evita-se, assim, a contaminação do solo e da água, os danos à saúde humana e animal e o aparecimento de pragas, doenças e plantas daninhas mais resistentes.

Christofolletti (1999) definiu pulverização como um processo mecânico de geração de gotas por uma determinada calda, que pode ser uma mistura, suspensão ou uma diluição e definiu aplicação como um processo onde o agrotóxico é pulverizado no alvo.

A pulverização aérea de agrotóxicos surgiu da crescente demanda mundial de produção de alimentos e grandes culturas passaram cada vez mais a ser plantadas em áreas muito extensas, requerendo agilidade no combate a pragas (Centner, 2014). Porém, a deriva de agrotóxicos continua sendo um dos maiores problemas da agricultura moderna (Sumner e Sumner, 1999; Tsai et al., 2005).

A correta utilização dos agroquímicos dentro do sistema de produção agrícola é fundamental para a preservação do potencial produtivo das lavouras, mas geram uma preocupação ambiental em virtude de seu potencial de risco de contaminação (Barcellos et al., 1998). Para que seu uso ocorra de maneira segura, é preciso utilizar estes agroquímicos obedecendo às recomendações, preservando o solo, a água, a saúde humana e animal e combatendo as doenças, pragas e plantas daninhas que prejudicam a produção agrícola e a qualidade do alimento produzido.

Estudos indicam que, em aplicações por pulverização aérea, apenas 25% do volume total aplicado chegam às plantas alvo, indicando que 3/4 da dose calculada total é perdida por meio da deriva. O desvio está associado ao movimento físico das gotas de pulverização no momento da aplicação. Esse tipo de desvio é chamado deriva do vento, resultante de métodos de aplicação e fatores associados

de equipamentos. Este tipo de desvio pode ser simplesmente um desvio de não mais do que 9 metros a partir do ponto de pulverização. Gotas pequenas, no entanto, podem viajar centenas de metros e podem evaporar para a atmosfera. O desvio ocorre, por vezes, até mesmo dias após o término da aplicação. Este tipo deriva, chamado vapor derivada, é mais comumente associado com volatilização (mudança de estado de líquido para gás) de pesticidas com subsequente movimento da zona de tratamento.

Antuniassi (2008) cita que o termo deriva foi dividido em dois tipos principais sendo, exoderiva e endoderiva. Quando a perda se dá para locais fora da área alvo em que a aplicação foi realizada, esta é conhecida como exoderiva, como, por exemplo, as gotas carregadas pelas correntes de ar ou pelo vento. Quando essa perda se dá na própria área alvo em que ocorreu a aplicação, na forma de escorrimento, por exemplo, essa é caracterizada como endoderiva. A deriva é influenciada por muitos fatores que podem ser agrupados em quatro categorias: 1 - Características da pulverização, 2 - Técnicas utilizadas, 3 - Condições meteorológicas, 4 - Cuidados e habilidade do operador .

Desde a safra 2009/2010, os produtores de bichos-da-seda do estado do Paraná vêm sofrendo perdas totais ou parciais em suas produções, trazendo grandes prejuízos não só para os produtores, mas também para as fiações artesanais e para a indústria. Normalmente, isso vem acontecendo, nos períodos de janeiro a março de cada ano, por conta de derivas dos agrotóxicos pulverizados via aérea em grandes culturas.

Os inseticidas utilizados atualmente são altamente específicos para combater lepidópteros, que são considerados pragas em grandes culturas. O grande problema é que *B. mori* é um lepidóptero herbívoro monofágico, ou seja, alimenta-se exclusivamente de folhas de amoreira e que pode sofrer em consequência da deriva de agrotóxicos que tinham como alvo insetos pragas e não insetos “úteis”.

#### **2.4. Chlorantraniliprole**

As propriedades inseticidas do extrato aquoso das plantas do gênero *Ryania* foram descobertas em 1940. Pesquisas provenientes das Universidades Rutgers e Cornell descobriram que extratos do caule de *Ryania speciosa*

(Flacourtiaceae) contêm diversos compostos estruturalmente relacionados (Jefferies et al., 1992). Entre eles, o mais estudado é a rianodina, que pode ser usado para o controle de insetos.

O chlorantraniliprole é um inseticida que contém a molécula Rynaxypyr e seu nome é derivado da rianodina, inseticida natural. (Cordova et al., 2006). Este inseticida pertence à nova classe química de pesticida, diamidas antranílicas, que possui potente atividade contra insetos da ordem Lepidoptera (Temple et al., 2009), sendo considerado específico e seguro para mamíferos (Lahm et al., 2007). Seu mecanismo de ação controla pragas resistentes a outros inseticidas, ocorrendo por meio da ativação de receptores de rianodina do inseto. Esses receptores desempenham papel crucial na função muscular, pois a contração das células musculares exige uma liberação exata de cálcio dos depósitos intracelulares no citoplasma celular. O chlorantraniliprole, por sua vez, liga-se aos receptores de rianodina, causando a liberação descontrolada e depleção de cálcio do retículo sarcoplasmático para as miofibrilas musculares, fazendo com que os filamentos de miosina deslizem por entre os filamentos de actina (Figura 2). Com isso, as miofibrilas se encurtam e o músculo se contrai permanentemente, o que resulta em rápida parada alimentar, paralisia, inclusive do coração, e finalmente na morte da lagarta (Cordova et al., 2006; Papa, 2008). Este modo de ação é diferente de outras classes de inseticidas. Portanto, não existe resistência cruzada entre o chlorantraniliprole e outros grupos de inseticidas (Lahm et al., 2009).

Inseticidas pertencentes ao grupo das diamidas antranílicas são particularmente potentes contra insetos recém-nascidos, quando eles saem dos ovos (atividade ovo-larvicida). Além disso, a significativa ação ovicida é observada em diferentes níveis, dependendo da espécie da praga, sendo que o maior percentual de controle é visualizado quando os ovos são depositados em superfícies tratadas. A eficiência de controle sobre lagartas também é satisfatória graças às características do produto em possuir ação translaminar, quando pulverizado sobre as folhas e frutos da planta, e ação sistêmica, se aplicado em *drench* no solo na projeção da copa (Anonymous, 2007).

Os inseticidas mencionados agem primeiramente por ingestão e secundariamente por contato (Papa, 2008). O inseticida move-se dentro do tecido foliar, onde fica protegido da lixiviação, e enquanto isso permanece disponível à alimentação de insetos mastigadores em ambas as superfícies da folha.

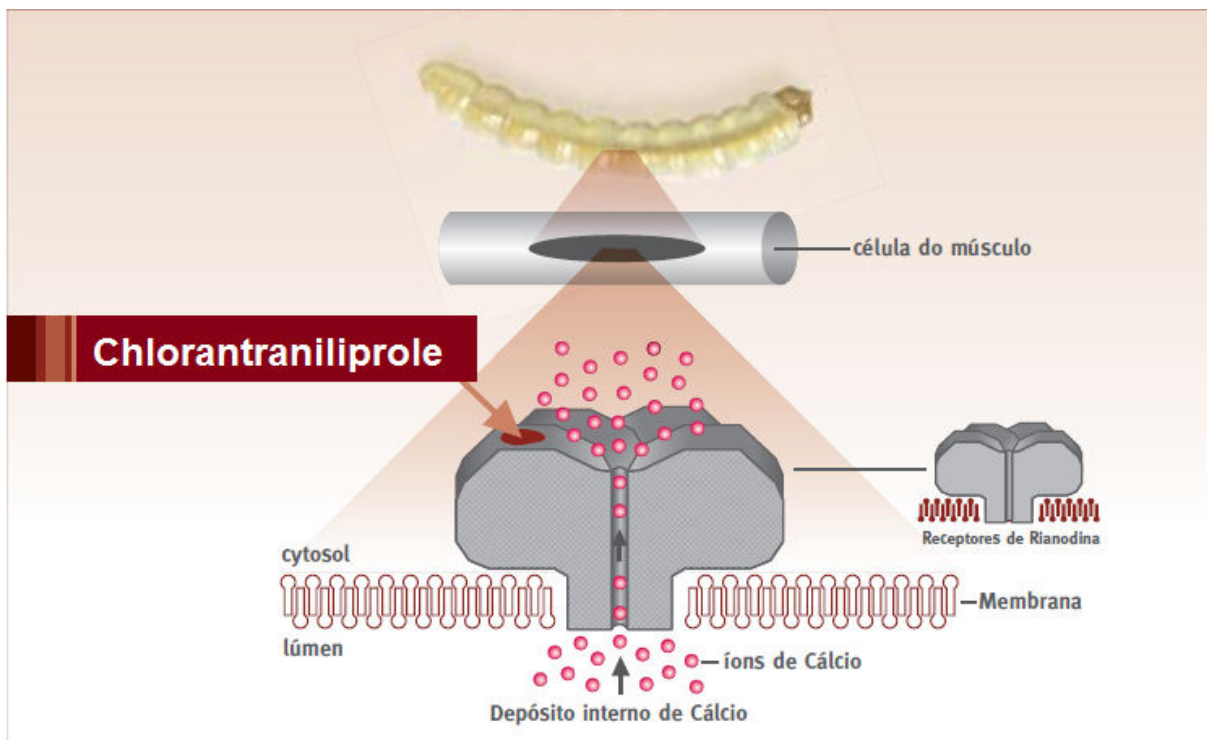


Figura 2 - Mecanismo de ação do inseticida chlorantraniliprole nas células musculares de lepidópteros (Anonymous, 2007).

Estudos comparativos sobre a ativação do receptor rianodina, entre as linhagens de células de insetos e mamíferos, foram realizados para determinar se a seletividade do receptor é um fator diferencial que contribui para a baixa toxicidade em mamíferos. A base para essa seletividade é uma diferença estrutural entre os receptores de rianodina dos insetos, denominados RyR1, e mamíferos que expressam três receptores isomórficos. Portanto, o chlorantraniliprole age preferencialmente sobre RyR1, único em insetos, e, como consequência, é de 400 a 3000 vezes mais potente em artrópodes fitófagos do que em humanos (Lahm et al., 2007).

O pesticida mencionado acima controla pragas-chave de frutíferas, tais como maçã (*Malus domestica*), pêra (*Pyrus communis*), uva (*Vitis vinifera*), pêssego (*Prunus pérsica*) e plantas produtoras de grãos, como milho (*Zea mays*) e soja (*Glycine max*). Em pragas do tomateiro, o chlorantraniliprole é indicado no controle de traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* e broca-pequena-do-fruto, *Neoleucinodes elegantalis* e outras pragas da ordem Lepidóptera, como, por exemplo, lagarta rosca, *Agrotis ipsilon* e *Helicoverpa zea* (Cordova et al., 2007).

Devido ao seu princípio único e um efeito inseticida excelente, chlorantraniliprole foi rapidamente adotado como um dos principais inseticidas para controle de pragas de grandes culturas (Chen et al., 2010). A pulverização aérea deste inseticida em plantações próximas a áreas de amoreiral tem causado graves perdas na produção de casulos dos bichos-da-seda e conseqüentemente prejuízos para os produtores, para as fiações artesanais e para as indústrias.

## 2.5. Proteína kin17

A proteína ativada por estresse kin17 é uma das proteínas descritas como putativa de envolvimento com o processo de iniciação da replicação, recombinação e reparo do DNA em mamíferos (Despras et al., 2003; Mazin et al., 1994a). Uma dessas evidências foi obtida por meio de técnicas de imunofluorescência indireta e microscopia eletrônica, com as quais foi possível demonstrar que a proteína kin17 está associada à cromatina, formando focos de replicação por todo o nucleoplasma, similar àqueles observados com outras proteínas envolvidas no *splicing* de RNA, na replicação e reparo do DNA (Kannouche et al., 2000). Provavelmente, a proteína kin17 deve participar como uma proteína acessória na replicação do DNA, promovendo a interação entre a replicação e o reparo do DNA, como componente de complexos proteicos de alto peso molecular (Biard et al., 2002; Masson et al., 2003; Miccoli et al., 2005).

A proteína kin17 foi descoberta, em 1989, em células de rato, graças a anticorpos policlonais monoespecíficos dirigidos contra a proteína RecA de *Escherichia coli* (Angulo et al., 1989). Em bactérias, o papel essencial da proteína RecA é no reparo do DNA em processos de recombinação, mutagênese e regulação de genes da resposta SOS (Anderson e Kowalczykowski, 1998). Entre os eucariotos, o gene KIN17 é conservado filogeneticamente, o que indica o gene KIN17 para atividade funcional em processos biológicos básicos. Têm sido identificados ortólogos da kin17 em humanos, camundongo, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Brugia malayi* e *Schizosaccharomyces pombe* e outros organismos eucarióticos (Despras et al., 2003).

O gene da proteína kin17 está situado no cromossomo 2 em murinos e no braço curto do cromossomo 10 nos seres humanos (Angulo et al., 1991). Em humanos, o gene apresenta tamanho de 20.000 pares de bases, sendo composto

por 12 éxons e 11 íntrons. As proteínas kin17 de murinos e humanos têm uma homologia de 92,4%. Elas possuem, respectivamente, 391 e 393 aminoácidos e uma massa molecular de 45 e 47 kDa, apresentando o mesmo ponto isoelétrico de 9,3 (Kannouche et al., 2000).

A estrutura da proteína kin17 tem sido estudada em camundongos. Estes estudos permitiram observar que ela apresenta cinco domínios funcionais, como pode ser visto na Figura 3 (Kannouche et al., 1997; Mazin et al., 1994b).

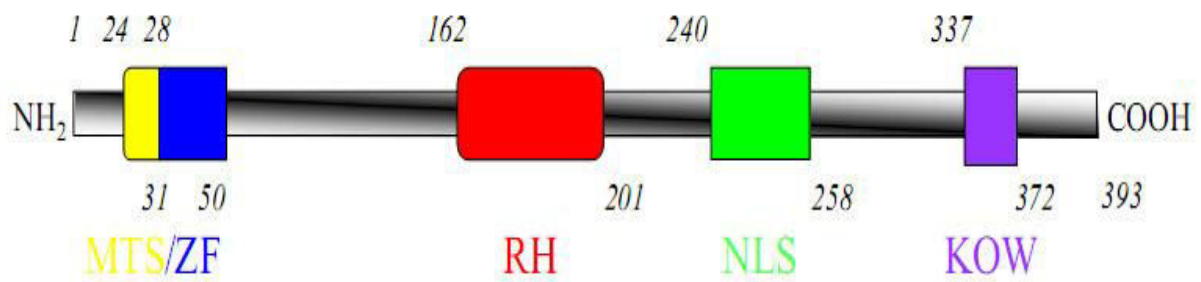


Figura 3 - Domínios funcionais da proteína kin17: MTS (sinal putativo de localização mitocondrial); ZF (dedo de zinco); RH (domínio de homologia a proteína RecA de *E. coli*); NLS (sinal de localização nuclear); KOW (motivo KOW) (Despras, 2006).

A proteína kin17 apresenta três domínios particulares, que se localizam nas regiões hidrofílicas da molécula:

- Um sinal de localização nuclear, NLS (nuclear localization signal), situado entre os aminoácidos 240 e 258 da proteína kin17. Ele assegura a localização nuclear da proteína, a qual possui uma distribuição intranuclear em compartimentos específicos, que se localizam com sítios de síntese de DNA.
- Um motivo dedo de zinco, ZF (zinc finger) do tipo Cx2Cx12Hx5H, situado entre os aminoácidos 28 e 50, que permite a interação da proteína kin17 com o DNA (Mazin et al., 1994b). Este dedo de zinco é similar ao da PARP (poly ADP-ribose polymerase), uma proteína que está envolvida no reparo do DNA.
- Uma região de 40 aminoácidos situados no corpo da proteína (aminoácidos 162 a 201), que apresenta uma homologia de 49% com a extremidade C-terminal da proteína RecA bacteriana (Angulo et al., 1991). Esta região de

homologia explica a detecção da kin17 por anticorpos dirigidos contra a RecA, sendo uma região fortemente conservada na sequência da proteína kin17. De fato, a deleção deste fragmento inibe a reação cruzada com os anticorpos dirigidos contra a RecA e provoca uma redistribuição da kin17 no núcleo (Kannouche et al., 1997). Um motivo denominado KOW foi identificado entre os aminoácidos 330 e 363, sendo confirmado por análise de cristalografia da extremidade C-terminal da proteína kin17 (Le Maire et al., 2006). Alguns dados indicam que os motivos KOW estão, dentro do metabolismo do RNA, relacionados com interações proteína-proteína e proteína-RNA (Steiner et al., 2002).

Em um estudo da expressão do gene KIN17 em células de carcinoma colorretal humano (linhagem RKO), utilizando RNA anti-senso para silenciar o RNA mensageiro da proteína, foi observado que a redução no nível de expressão desta é acompanhada de uma redução do crescimento e da proliferação celular, além de um acúmulo de células no começo ou no meio da fase S do ciclo celular (Biard et al., 2002). A análise por citometria de fluxo de células que superexpressam a proteína kin17 revelou uma alteração no padrão de intercalamento do iodeto de propídeo ao DNA, um composto fluorescente que é utilizado nesta técnica para marcar a molécula. Assim, a superexpressão da proteína poderia induzir a mudanças conformacionais na cromatina, hipótese esta que Condiz com fato de que uma fração da proteína está associada à cromatina (Biard et al., 2002).

Estudos realizados por Zeng et al. (2011) demonstraram uma superexpressão da proteína kin17 em tumores de câncer de mama. Em estudos de expressão desta proteína em algumas linhagens celulares humanas derivadas de tumores, pode ser observado que a mesma foi expressa em diferentes níveis dentre as células analisadas: nas linhagens H1299 (câncer de pulmão), RKO (carcinoma colorretal), K562 (leucemia mielóide crônica) e HEK 293 (células embrionárias de rim humano), a kin17 se encontra superexpressa; em MeWo (melanoma), as células demonstraram uma diminuição nos desta proteína. Entretanto, para células de linhagens de melanoma em camundongos B16F10-Nex2 e seus clones B16F10-Nex2B e B16F10-Nex2D, a kin17 foi detectada em todas as frações analisadas, citoplasma, núcleo e associada à cromatina, maior intensidade nas amostras de kin17 associada à cromatina, em especial na linhagem mais agressiva, mas não metastática (Cardoso, 2014). Essa alteração na expressão da proteína kin17



poderia estar relacionada a um fenótipo tumoral ou ser um pré-requisito para o seu aparecimento (Despras et al., 2003; Biard et al., 2002).

Publicações recentes associam a proteína kin17 a uma função distinta das já conhecidas. Cloutier et al. (2013) relatam que essa proteína pode se associar a uma metiltransferase, sendo metilada na lisina 137. Nessas condições, a kin17 pode ter atividade de chaperona, afetando a sua atividade primária de resposta a estresse celular. Em outro trabalho (Cloutier et al., 2014), é descrito que a associação da kin17 à metiltransferase ocasiona o deslocamento dessa proteína do núcleo para o citoplasma. Os autores descrevem também que o motivo c-terminal KOW, além de ser uma região de ligação de RNAs, pode estar associado à mediação da associação do complexo do spliceossomo com RNA ribossomais.

Em *B. mori*, a expressão discreta de uma isoforma de ~50 kDa foi anteriormente descrita em extratos celulares da linhagem *Bm5* de *B. mori*, detecção essa só observada quando ocorre a utilização de anticorpos contra a região RecA e não do anticorpo contra a região KOW (Rando et al., 2011). O peso molecular aproximado de 50 kDa concorda com o observado para células em cultura de hamster Chinês de 49 kDa da amostra 422, o qual foi utilizado como controle positivo (Lima Neto et al., 2014). Na análise da sequência do gene ortólogo da proteína kin17 de *B. mori* (AK377488.1), é observado que, na região C-terminal, não é descrito a sequência denominada KOW, região que está presente em proteínas kin17 de mamíferos. A falta de uma região envolvida na ligação com RNA pode indicar que, pelo menos para *B. mori*, essa proteína é expressa somente em resposta ao estresse celular.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Descrição da sintomatologia em lagartas de *B. mori* submetidas à intoxicação pelo inseticida chlorantraniliprole

##### 3.1.1. Manejo e intoxicação de *Bombyx mori*

Os experimentos foram realizados no laboratório de Fiação de Seda - BRATAC S.A., na cidade de Bastos, São Paulo, com os híbridos comerciais de *B. mori* desta empresa. As lagartas de *B. mori* foram criadas em condições de sanidade, temperatura e umidade controladas. A temperatura das salas de criação foi ajustada a  $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e  $90 \pm 5\%$  de umidade relativa para a criação de lagartas de *B. mori* do 1º instar, enquanto as lagartas do 2º instar foram mantidas a  $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e com  $85 \pm 5\%$  de umidade relativa. As lagartas de *B. mori* do 3º, 4º e 5º instar foram criadas em  $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $70 \pm 5\%$ .

Uma iluminação artificial branca foi utilizada nas salas de criação para expor as lagartas de *B. mori* a 14 horas diárias de fotoperíodo e 10 horas de escuro. Durante as experiências, foram registrados o número de lagartas mortas e os sintomas observados.

Folhas de amoreira foram imersas em solução contendo chlorantraniliprole e outro grupo, o grupo controle, recebeu folhas imersas em água e, em seguida, oferecidas às lagartas de *B. mori*. Antes e após as aplicações do inseticida, as lagartas foram tratadas com folhas normais de amoreira. As caixas foram limpas diariamente, sendo que os restos de amoreiras e fezes, que constituem a “cama”, foram retirados para melhoria das condições sanitárias da criação, dificultando assim a proliferação de doenças.

##### 3.1.2. Concentração letal

Os tratamentos foram aplicados em três repetições, com 20 lagartas de *B. mori* cada. As seguintes concentrações chlorantraniliprole em ppm (partes por milhão), foram usadas: 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125;  $6,25 \times 10^{-3}$ ;  $3,13 \times 10^{-3}$  e  $1,57 \times 10^{-3}$ . Os grupos controle consistiam em lagartas de *B. mori* que foram alimentadas exclusivamente de folhas de amoreira livres do inseticida.

Foram oferecidas às lagartas de *B. mori* folhas de amoreira contendo clorantraniliprole em diferentes dias e diferentes idades: 1º e 2º dia do 1º instar, 1º e

3º dia do 2º instar, 1º e 3º dia do 3º instar, 1º e 3º dia do 4º instar, 1º e 5º dia do 5º instar. Além disso, duas aplicações de chlorantraniliprole foram realizadas para lagartas no 5º instar: 1º e 2º dias do 5º instar e 5º e 6º dias do 5º instar.

Para os bioensaios de concentração letal, folhas de amoreira foram imersas em soluções aquosas, contendo diferentes concentrações de chlorantraniliprole, como mencionado acima. As folhas foram secas em temperatura ambiente e, em seguida, oferecidas às lagartas de *B. mori*. Cada repetição incluiu 20 lagartas de *B. mori* que foram alimentadas uma vez por dia, em placa de Petri com folhas de amoreira contendo diferentes concentrações de chlorantraniliprole, da seguinte forma: as lagartas expostas ao inseticida no 1º ou 2º dia do 1º instar foram alimentadas com 7 cm<sup>2</sup> de folhas de amoreira, enquanto as lagartas expostas no 1º ou 3º do 2º instar foram alimentadas com 16 cm<sup>2</sup>; lagartas do 1º ou 3º dia do 3º instar foram alimentadas com 10 g de folhas de amoreira e as lagartas do 1º ou 3º dias do 4º instar e do 1º ou 5º dia do 5º instar foram alimentadas com 30 g de folhas de amoreira. Os tratamentos que envolveram a exposição de lagartas de *B. mori* duas vezes ao chlorantraniliprole foram de 30 g de folhas de amoreira, quando a exposição ocorreu no 1º e 2º dia do 5º instar e com 100 g de folhas de amoreira quando a exposição ocorreu no 5º e 6º dia do 5º instar. Antes e depois das aplicações, as lagartas foram alimentadas em abundância, com folhas de amoreira livres do inseticida.

As amoreiras utilizadas nos bioensaios foram cultivadas no campo experimental da empresa Fiação de Seda BRATAC S.A., na cidade de Bastos, São Paulo. As folhas de amoreiras utilizadas para a alimentação das lagartas de *B. mori* foram retiradas de amoreiras com idade a partir de 75 dias. As lagartas do 1º, 2º e 3º instar foram alimentadas com folhas jovens de amoreira retiradas da parte superior do galho principal, enquanto as folhas mais velhas foram oferecidas para as lagartas do 4º e 5º instar.

### **3.1.3. Sintomatologia**

Após as aplicações de chlorantraniliprole, sintomas relacionados à exposição ao inseticida foram registrados imediatamente após o primeiro dia de exposição: parada na alimentação, vômito, desenvolvimento tardio e ecdise irregular. Estes sintomas foram classificados de acordo com a intensidade, em que 0 representou a

ausência de sintomas e 5 representou o mais alto nível dos sintomas. Além disso, as seguintes variáveis produtivas foram coletadas: QCN – quantidade de casulos normais, QCCF – quantidade de casulos casca fina, PCN – peso unitário do casulo normal, PCCF – peso unitário do casulo casca fina, PV – pupas vivas, CD – quantidade de casulos duplos. Embora não fossem tomadas medidas para distinguir casulos de casca fina de casulos normais, casulos de casca fina podem ser visualmente diferenciados de casulos normais, uma vez que suas conchas são mais finas e translúcidas.

#### **3.1.4. Análise morfológica**

Os efeitos da toxicidade de chlorantraniliprole em lagartas de *B. mori* de 5º instar foram avaliados por meio de bioensaios com híbridos comerciais, sendo utilizado duas concentrações do inseticida 0,2 e 0,1 ppm, além do controle. Folhas de amoreira foram imersas em solução, contendo chlorantraniliprole e oferecidas às lagartas no 1º dia do 5º instar. Antes e após as aplicações, as lagartas foram tratadas com folhas normais de amoreira. No 4º dia após a ingestão das folhas com inseticida, as lagartas foram anestesiadas e dissecadas, havendo a retirada de segmentos da parede do intestino médio. Estes foram fixados em DuBosq Brasil, seguindo o processamento histológico convencional para emblocamento em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados no micrótomo Olympus CUT4055, cortes de 7 µm. As lâminas assim obtidas foram coradas pela técnica da hematoxilina e eosina para análise tecidual geral (Junqueira; Junqueira, 1983). Todas as lâminas foram analisadas em um microscópio de luz Olympus CBA e fotomicrografadas em fotomicroscópio Olympus BX60 da UNIOESTE.

As caixas foram limpas diariamente, sendo que os restos de amoreiras e fezes, que constituem a “cama”, foram retirados para melhoria das condições sanitárias da criação, dificultando assim a proliferação de doenças.

#### **3.1.5. Análises estatísticas**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com três repetições por tratamento. Vinte lagartas de *B. mori* foram usadas por repetição. Os dados obtidos através das avaliações foram submetidos à análise de variância, seguida de teste de média Scott-Knott (0,05%), utilizando-se o programa computacional SISVAR 5.3 (Ferreira, 2010).

### **3.2. Avaliação da expressão da proteína kin17 em lagartas de *B. mori* submetidas à intoxicação pelo inseticida chlorantraniliprole**

#### **3.2.1. Manejo e intoxicação de *Bombyx mori***

Os experimentos foram realizados no laboratório de Melhoramento Genético de Bicho-da-seda - UEM, na cidade de Maringá, Paraná, com os híbridos comerciais de *B. mori* da Fiação de Seda - BRATAC S.A. As lagartas de *B. mori* foram criadas em condições higiênicas e em ambientes controlados. A temperatura das salas de criação foi ajustada a  $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e  $90 \pm 5\%$  de umidade relativa para a criação de lagartas de *B. mori*. Uma iluminação artificial branca foi utilizada nas salas de criação para expor as lagartas de *B. mori* a 14 horas diárias de fotoperíodo com 10 horas de escuro.

Após estabelecer os valores para concentrações letais e subletais, foi escolhida a concentração de 0,025 ppm (partes por milhão), que foi considerada subletal, de chlorantraniliprole para ser utilizada neste experimento.

Um disco de folha de amoreira de aproximadamente  $16\text{ cm}^2$  contendo  $10\ \mu\text{l}$  de chlorantraniliprole nas diferentes concentrações foi oferecido às lagartas de *B. mori* todos os dias de manhã, no 1º, 2º, 3º, e 4º dia do 5º instar, de modo que tivéssemos certeza da ingestão de todo o inseticida pela lagarta. O mesmo foi feito com as lagartas do grupo controle, onde os discos oferecidos continham  $10\ \mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Os tratamentos consistiam em 4 repetições de 20 indivíduos cada.

Antes e após as aplicações, as lagartas foram tratadas com folhas normais de amoreira. As caixas foram limpas diariamente e os restos de amoreiras e fezes, que constituem a “cama”, foram retirados para melhoria das condições sanitárias da criação, dificultando assim a proliferação de doenças.

#### **3.2.2. Obtenção das amostras de proteínas**

Os tecidos larvais, túbulo de Malpighi e corpo gorduroso foram dissecados de lagartas de *B. mori* em diferentes horas pós-intoxicação (hpi): 120 hpi, 144 hpi, 168 hpi e 192 hpi. Estes tecidos foram escolhidos por estarem relacionados com excreção e metabolismo de algumas substâncias neste inseto. O mesmo foi feito

com as lagartas do grupo controle. Tais horários foram escolhidos após testes preliminares demonstrarem maior alteração nos tecidos larvais ocasionado pelo inseticida. Esses tecidos, coletados de 5 lagartas por horário, foram transferidos para tampão de lise (lauril sulfato de sódio 2%, EDTA 10 mM pH 8,0, Tris-HCl 0,1 M pH 8,0) e armazenados a -80°C (Rando et. al., 2011; Brancalhão, 2002).

As amostras foram homogeneizadas com auxílio de pistilos e fragmentadas por sonicação (2x por 30 segundos com potência 50% e 2x por 30 segundos com potência 60%, Fisher Scientific). Na sequência, foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi retirado e acondicionado a -80°C para posterior utilização.

Houve a necessidade de um protocolo para retirada de substâncias, como lipídeos, que interferem nas amostras de corpo gorduroso. Este protocolo consistiu da adição de 400 µl de metanol e 100 µl de clorofórmio, respectivamente, em 100 µl de amostra. Para a separação das fases, foi adicionado ainda 300 µl de H<sub>2</sub>O. Na sequência, a amostra foi centrifugada a 9000 rpm, por 1 minuto; a fase mais alta foi então descartada e 300 µl de metanol foram novamente adicionados, seguido por nova centrifugação, de 2 minutos, a 9000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao pellet, após secagem, foram adicionados 50 µl de tampão SDS-page + SDS 10% (Pakkianathan et al., 2012; Wessel e Flugge, 1984).

As amostras utilizadas como controle positivo neste trabalho foram linhagens de melanoma de camundongo (Ramos, 2013). O marcador de peso molecular utilizado foi o ColorPlus Prestained Protein Ladder (New England Biolabs).

Em todas as amostras, foi ainda adicionado Red Loading Buffer (New England Biolabs) na proporção de 1:3, seguido pela fervura a 100°C, por 4 minutos, antes da aplicação no gel.

### **3.2.3. Gel de poliacrilamida**

As amostras de proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional do tipo descontínuo, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com Laemmli (1970). Para a preparação dos géis, foi utilizada uma solução de acrilamida/bis-acrilamida na proporção de 29:1. O gel de empilhamento foi utilizado a uma concentração de 4% (0,125 M de Tris-HCl, pH 6,8;

0,1% de SDS) e o gel de separação a uma concentração de 12% (0,375 M de Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% de SDS) em sistema de eletroforese Mini-Protean III (BioRad). O tampão de eletroforese foi Tris-glicina 1X. As amostras foram incubadas a 100°C, por 4 minutos, e aplicadas no gel. A separação eletroforética foi realizada a 100 volts.

#### **3.2.4. Quantificação de proteínas**

A quantificação de proteínas é necessária para avaliar a integridade das amostras e também para especificar a quantidade necessária para melhor visualização da expressão das proteínas por amostra.

O método de Bradford (1976) foi realizado utilizando a coloração de Coomassie brilliant blue (Bio-Rad) para avaliar a integridade da amostra. O gel de poliacrilamida preparado foi mantido em solução de Coomassie brilliant blue (Sigma Aldrich) por, no mínimo, 1 hora e depois descorado em solução de descoloração, contendo 50ml de álcool absoluto, 10ml de ácido acético glacial e 40ml de água destilada, por 30 minutos.

Foi realizada também uma quantificação utilizando o BCA Protein Macro Assay Kit (Serva Electrophoresis) em Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e os dados obtidos foram utilizados para as amostras aplicadas na imunodeteção.

#### **3.2.5. Detecção por *western blot***

As proteínas separadas em gel de poliacrilamida foram transferidas para membranas de nitrocelulose e a imunodeteção realizada com anticorpos monoclonais anti-Kin17. Foi utilizado o anticorpo contra Kin17 humana (K58, Santa Cruz Biotechnology), que reconhece uma sequência localizada ao longo do domínio homólogo ao da RecA (domínio central da proteína KIN17 humana). A eficiência da eletrotransferência foi avaliada pela coloração das membranas com o corante *Ponceau S* para proteínas. O corante foi removido por sucessivas lavagens com TBS-T 1X (Tris-HCl 200 mM pH 7,5; NaCl 1,35 M e Tween-20 1%). A etapa de bloqueio foi realizada com solução de bloqueio (Albumina *Amersham* Pharmacia 3% em TBS-T 1X, por meio de incubação por 1 hora, sob agitação, a 25°C. Sequencialmente, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti Kin17 humana (K58, Santa Cruz Biotechnology (diluição 1:7500)) em TBS-T 1x + albumina

3%, por 16 horas, a 4°C, sob agitação. A incubação com o anticorpo secundário Polyclonal goat anti-mouse immunoglobulin (Dako – Denamark (diluição 1:15000)) foi realizada por 1 hora, sob agitação em temperatura ambiente. A revelação foi obtida utilizando o kit ECL Plus da GE Healthcare. Os sinais de quimiluminescência foram detectados no aparelho ImageQuant Las 500 (GE Healthcare Life Sciences).

### **3.2.6. Análise dos efeitos de baixa dosagem sobre a produtividade de *Bombyx mori***

Os experimentos foram realizados no laboratório de Melhoramento Genético de Bicho-da-seda - UEM, na cidade de Maringá, Paraná, com os híbridos comerciais de *B. mori* da Fiação de Seda - BRATAC S.A. As lagartas de *B. mori* foram criadas em condições higiênicas e em ambientes controlados. A temperatura das salas de criação foi ajustada para  $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e  $90 \pm 5\%$  de umidade relativa para a criação de lagartas de *B. mori*. Uma iluminação artificial branca foi utilizada nas salas de criação para expor as lagartas de *B. mori* a 14 horas diárias de fotoperíodo com 10 horas de escuro.

Um disco de folha de amoreira de aproximadamente  $16\text{ cm}^2$  contendo  $10\ \mu\text{l}$  de chlorantraniliprole foi oferecido às lagartas de *B. mori* no 1º dia do 5º instar, de modo que tivéssemos certeza da ingestão de todo o inseticida pela mesma. O mesmo foi feito com as lagartas do grupo controle, onde os discos oferecidos continham  $10\ \mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Os tratamentos consistiam em 4 repetições de 20 indivíduos cada.

Antes e após as aplicações, as lagartas foram tratadas com folhas normais de amoreira. As caixas foram limpas diariamente, retirando-se os restos de amoreiras e fezes, que constituem a “cama”, para melhoria das condições sanitárias da criação, dificultando assim a proliferação de doenças.

As seguintes variáveis produtivas foram coletadas para análise: CC - comprimento do casulo, PC – peso do casulo e PCS – peso da casca sérica.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições por tratamento. Vinte lagartas de *B. mori* foram usadas por repetição. Os dados obtidos por meio das avaliações foram submetidos à análise de variância, seguido de teste de média Scott-Knott (0,05%), utilizando-se o programa computacional SISVAR 5.3.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O chlorantraniliprole é frequentemente aplicado por pulverização aérea para eliminar insetos lepidópteros, causando grandes danos e perdas na produção de casulos. Nos últimos anos, os produtores brasileiros de bicho-da-seda têm apresentado grandes perdas na produção de casulos, em consequência da aplicação irresponsável de inseticidas próximos aos barracões de criação. Aparentemente, essas perdas estão relacionadas ao período de tempo em que os inseticidas são pulverizados em lavouras próximas de barracões de criação de *B. mori*.

### 4.1. Descrição da sintomatologia em lagartas de *B. mori* submetidas à intoxicação pelo inseticida chlorantraniliprole

#### 4.1.1. Concentração letal do chlorantraniliprole

Analisou-se a mortalidade das lagartas de bicho-da-seda depois de terem sido expostas a oito concentrações diferentes de chlorantraniliprole (Quadro 1). As duas maiores concentrações do inseticida, 0,2 e 0,1 ppm resultaram em 100% de mortalidade das lagartas na maioria das idades. A única exceção foi a aplicação do inseticida realizada no 2º instar larval, onde a mortalidade foi de 85% e 55%, quando aplicado o inseticida na concentração de 0,1 ppm, no 1º e 3º dia, respectivamente, e na concentração de 0,2 ppm, quando aplicado no 3º dia (88,33%). Este fato também ocorreu na concentração de 0,05 ppm, no 5º instar, tanto com uma aplicação do agroquímico no 5º dia, como com duas aplicações no 5º e no 6º dia, que resultou em 100% de mortalidade. Uma alta taxa de mortalidade também foi apresentada por Han et al. (2011), quando aplicado chlorantraniliprole a uma concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> em *Plutella xylostella*. A mortalidade, neste trabalho, variou de acordo com os dias após a aplicação do chlorantraniliprole. Este lepidóptero, conhecido como traça das crucíferas, é uma praga comum na família das Brassicaceae, tendo como representantes de importância econômica o repolho, o couve, a couve-flor e o brócolis.

As lagartas do 5º instar que receberam duas aplicações (5º e 6º dias) na concentração de 0,025 ppm também apresentaram alta mortalidade: 98,33%. Quando foram realizadas duas aplicações de chlorantraniliprole no 5º e 6º dias em lagartas do 5º instar, nas concentrações iguais 0,2, 0,1 e 0,05 ppm, ocorreram taxas de mortalidade de 100%, evidenciando que, quando ocorre contato das lagartas com chlorantraniliprole nessas condições, elas estão mais susceptíveis aos seus efeitos prejudiciais. Segundo Chen et al. (2010), o período residual tóxico deste inseticida é muito longo. Folhas de amoreira pulverizadas com  $1,25 \times 10^{-4}$  m/L, após 60 dias, pode causar mortalidade de 100% em lagartas do 3º e 5º instar.

Quadro 1 - Taxa de mortalidade em lagartas de *B. mori*, considerando dia de aplicação e concentração do inseticida chlorantraniliprole (Munhoz et al., 2013)

Instar	Dia de exposição	Concentração de chlorantraniliprole (ppm)	Mortalidade (%)
1º Instar	1º dia	0,2	100,00 a
1º Instar	1º dia	0,1	100,00 a
1º Instar	1º dia	0,05	80,00 b
1º Instar	1º dia	0,025	0,00 f
1º Instar	1º dia	0,0125	0,00 f
1º Instar	1º dia	$6,25 \times 10^{-3}$	0,00 f
1º Instar	1º dia	$3,13 \times 10^{-3}$	0,00 f
1º Instar	1º dia	$1,57 \times 10^{-3}$	0,00 f
1º Instar	1º dia	Grupo Controle	0,00 f
1º Instar	2º dia	0,2	100,00 a
1º Instar	2º dia	0,1	100,00 a
1º Instar	2º dia	0,05	96,66 a
1º Instar	2º dia	0,025	0,00 f
1º Instar	2º dia	0,0125	0,00 f
1º Instar	2º dia	$6,25 \times 10^{-3}$	0,00 f
1º Instar	2º dia	$3,13 \times 10^{-3}$	0,00 f
1º Instar	2º dia	$1,57 \times 10^{-3}$	0,00 f
1º Instar	2º dia	Grupo Controle	0,00 f
2º Instar	1º dia	0,2	100,00 a
2º Instar	1º dia	0,1	85,00 b
2º Instar	1º dia	0,05	0,00 f
2º Instar	1º dia	0,025	0,00 f
2º Instar	1º dia	0,0125	0,00 f
2º Instar	1º dia	$6,25 \times 10^{-3}$	0,00 f
2º Instar	1º dia	$3,13 \times 10^{-3}$	0,00 f
2º Instar	1º dia	$1,57 \times 10^{-3}$	0,00 f
2º Instar	1º dia	Grupo Controle	0,00 f
2º Instar	3º dia	0,2	88,33 b
2º Instar	3º dia	0,1	55,00 c
2º Instar	3º dia	0,05	0,00 f
2º Instar	3º dia	0,025	0,00 f

Quadro 1, cont...

2º Instar	3º dia	0,0125	0,00 f
2º Instar	3º dia	$6,25 \times 10^{-3}$	0,00 f
2º Instar	3º dia	$3,13 \times 10^{-3}$	0,00 f
2º Instar	3º dia	$1,57 \times 10^{-3}$	0,00 f
2º Instar	3º dia	Grupo Controle	0,00 f
3º Instar	1º dia	0,2	100,00 a
3º Instar	1º dia	0,1	100,00 a
3º Instar	1º dia	0,05	5,00 f
3º Instar	1º dia	0,025	0,00 f
3º Instar	1º dia	0,0125	0,00 f
3º Instar	1º dia	$6,25 \times 10^{-3}$	0,00 f
3º Instar	1º dia	$3,13 \times 10^{-3}$	0,00 f
3º Instar	1º dia	$1,57 \times 10^{-3}$	0,00 f
3º Instar	1º dia	Grupo Controle	0,00 f
3º Instar	3º dia	0,2	100,00 a
3º Instar	3º dia	0,1	98,33 a
3º Instar	3º dia	0,05	33,33 d
3º Instar	3º dia	0,025	13,33 d
3º Instar	3º dia	0,0125	0,00 f
3º Instar	3º dia	$6,25 \times 10^{-3}$	0,00 f
3º Instar	3º dia	$3,13 \times 10^{-3}$	0,00 f
3º Instar	3º dia	$1,57 \times 10^{-3}$	0,00 f
3º Instar	3º dia	Grupo Controle	0,00 f
4º Instar	1º dia	0,2	100,00 a
4º Instar	1º dia	0,1	100,00 a
4º Instar	1º dia	0,05	3,33 f
4º Instar	1º dia	0,025	1,66 f
4º Instar	1º dia	0,0125	3,33 f
4º Instar	1º dia	$6,25 \times 10^{-3}$	6,66 f
4º Instar	1º dia	$3,13 \times 10^{-3}$	1,66 f
4º Instar	1º dia	$1,57 \times 10^{-3}$	3,33 f
4º Instar	1º dia	Grupo Controle	0,00 f
4º Instar	3º dia	0,2	100,00 a
4º Instar	3º dia	0,1	100,00 a
4º Instar	3º dia	0,05	15,00 e
4º Instar	3º dia	0,025	5,00 f
4º Instar	3º dia	0,0125	0,00 f
4º Instar	3º dia	$6,25 \times 10^{-3}$	5,00 f
4º Instar	3º dia	$3,13 \times 10^{-3}$	1,66 f
4º Instar	3º dia	$1,57 \times 10^{-3}$	3,33 f
4º Instar	3º dia	Grupo Controle	1,66 f
5º Instar	1º dia	0,2	100,00 a
5º Instar	1º dia	0,1	100,00 a
5º Instar	1º dia	0,05	13,33 e
5º Instar	1º dia	0,025	3,33 f
5º Instar	1º dia	0,0125	3,33 f
5º Instar	1º dia	$6,25 \times 10^{-3}$	1,66 f

Quadro 1, cont...

5º Instar	1º dia	3,13 x 10 <sup>-3</sup>	3,33 f
5º Instar	1º dia	1,57 x 10 <sup>-3</sup>	1,66 f
5º Instar	1º dia	Grupo Controle	0,00 f
5º Instar	5º dia	0,2	100,00 a
5º Instar	5º dia	0,1	100,00 a
5º Instar	5º dia	0,05	100,00 a
5º Instar	5º dia	0,025	56,66 c
5º Instar	5º dia	0,0125	1,66 f
5º Instar	5º dia	6,25 x 10 <sup>-3</sup>	0,00 f
5º Instar	5º dia	3,13 x 10 <sup>-3</sup>	1,66 f
5º Instar	5º dia	1,57 x 10 <sup>-3</sup>	0,00 f
5º Instar	5º dia	Grupo Controle	0,00 f
5º Instar	1º e 2º dia	0,2	100,00 a
5º Instar	1º e 2º dia	0,1	100,00 a
5º Instar	1º e 2º dia	0,05	56,66 c
5º Instar	1º e 2º dia	0,025	3,33 f
5º Instar	1º e 2º dia	0,0125	1,66 f
5º Instar	1º e 2º dia	6,25 x 10 <sup>-3</sup>	0,00 f
5º Instar	1º e 2º dia	3,13 x 10 <sup>-3</sup>	0,00 f
5º Instar	1º e 2º dia	1,57 x 10 <sup>-3</sup>	0,00 f
5º Instar	1º e 2º dia	Grupo Controle	0,00 f
5º Instar	5º e 6º dia	0,2	100,00 a
5º Instar	5º e 6º dia	0,1	100,00 a
5º Instar	5º e 6º dia	0,05	100,00 a
5º Instar	5º e 6º dia	0,025	98,33 a
5º Instar	5º e 6º dia	0,0125	0,00 f
5º Instar	5º e 6º dia	6,25 x 10 <sup>-3</sup>	5,00 f
5º Instar	5º e 6º dia	3,13 x 10 <sup>-3</sup>	0,00 f
5º Instar	5º e 6º dia	1,57 x 10 <sup>-3</sup>	3,33 f
5º Instar	5º e 6º dia	Grupo Controle	0,00 f
Média Geral			28,34
CV (%)			23,78

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são diferentes pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

A aplicação de chlorantraniliprole na concentração de 0,05 ppm mostrou taxa de mortalidade variável entre os instares, como pode ser visto no Quadro 1. Alta taxa de mortalidade (96,66%) ocorreu quando o inseticida foi aplicado uma vez no 2º dia do 1º instar, no 5º dia do 5º instar ou duas vezes no 5º e 6º dia do 5º instar.

Elevada taxa de mortalidade (80%) também foi observada quando a aplicação de 0.05 ppm ocorreu no 1º dia do 1º instar. Quando o inseticida foi aplicado duas vezes (1º e 2º dia do 5º instar) a taxa de mortalidade novamente foi alta, superando os 50%. Nars (2011) também verificou uma alta taxa de mortalidade em lagartas de *Bombyx mori* que foram submetidas à intoxicação ao Chlorpirifos numa concentração de 500 mg/L no 5º instar. Este inseticida é um organofosforado, muito utilizado nas culturas de algodão, batata, trigo, soja, entre outros vegetais.

Por outro lado, foram observadas taxas menores de mortalidade das lagartas após a aplicação do inseticida nesta concentração no 1º e 3º dia do 3º instar, 1º e 3º dia do 4º instar e no 1º dia do 5º instar. A mortalidade foi igual a 0 nessa concentração, quando aplicada no 1º e no 3º dia do 2º instar. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que, uma vez que ocorre a ecdise, as lagartas de *B. mori* ficam paradas e comem menos do que nos últimos dias de cada instar. Quando a aplicação de chlorantraniliprole ocorreu nos últimos dias do instar, as lagartas provavelmente consumiram mais folhas contaminadas e, por isso, ocorreu maior taxa de mortalidade.

As outras concentrações de chlorantraniliprole (0,025, 0,0125, 6,25 x 10<sup>-3</sup>, 3,13 x 10<sup>-3</sup> e 1,57 x 10<sup>-3</sup> ppm) resultaram em menor ou nenhuma mortalidade da lagarta. Uma exceção ocorreu quando as lagartas foram expostas ao chlorantraniliprole em concentração de 0.025 ppm no 3º dia do 3º instar, 5º dia do 5º instar ou no 5º e 6º dia do 5º instar, o que resultou em taxas de mortalidade das lagartas de 13,33%, 56,66% e 98,33%, respectivamente. Essas concentrações mais baixas não são geralmente fatais para as lagartas de *B. mori*, mas elas podem provocar outros tipos de danos.

Embora concentrações mais baixas deste inseticida causem pouca ou nenhuma mortalidade das lagartas, ainda resultam em danos, tais como a parada da alimentação e a produção de um casulo de casca fina, que não é economicamente viável. Assim, nossos resultados demonstraram que os híbridos brasileiros de *B. mori* são extremamente sensíveis ao chlorantraniliprole. Em experimentos realizados na China foi detectada alta sensibilidade ao chlorantraniliprole pelo *B. mori* e identificou-se um valor limite de CL<sub>50</sub> em 0,02045 ppm deste inseticida para aplicação em lagartas no 3º instar (Chen et al., 2010).

Não foi possível detectar uma concentração letal média única (CL<sub>50</sub>), para todos os tratamentos com as concentrações de chlorantraniliprole utilizadas neste

estudo. Han et al. (2011) também não detectaram uma concentração letal média, (CL<sub>50</sub>) em lagartas de *Plutella xylostella* no 3º instar. A concentração de chlorantraniliprole para CL<sub>50</sub> variou de 0,17 a 0,32 mg L<sup>-1</sup> neste trabalho.

Os resultados de nossos bioensaios demonstraram que três tratamentos que tinham CL<sub>50</sub> foram bem definidos, como no 3º dia do 2º instar, na concentração de 0,1 ppm; no 5º dia do 5º instar; na concentração de 0.025 ppm e no tratamento com duas aplicações de inseticida; no 1º e 2º dia do 5º instar, na concentração de 0,05 ppm. No entanto, altas concentrações deste inseticida foram responsáveis por 100% de mortalidade das lagartas. As concentrações letais (CL) para todos os tratamentos foram de 0,2 ppm, 0,1 ppm de chlorantraniliprole (Quadro 1).

O valor de CL<sub>50</sub> apresentado por Chen et al. (2010) é semelhante aos nossos resultados, mas com lagartas no 5º instar, em vez de lagartas do 3º instar, provavelmente devido a diferenças genéticas dos bichos e das condições climáticas. Em lagartas no 3º instar de *Plutella xylostella*, foi estabelecido por Han et al. (2011) um valor de CL<sub>50</sub> de 0,23 e 0,25 mg L<sup>-1</sup>.

#### **4.1.2. Descrição da sintomatologia**

As concentrações abaixo de 0,1 ppm do inseticida não causaram altas taxas de mortalidade, porém alguns sintomas foram comuns nas concentrações consideradas subletais de chlorantraniliprole e resultaram em perdas na produtividade. Estes sintomas foram classificados de acordo com o grau de intensidade e foram os seguintes: parada de alimentação, vômitos, desenvolvimento irregular (lagartas atrasadas) e ecdise irregular (lagartas que não conseguiram realizar a ecdise completa) (Quadro 2). Lagartas de *Plutella xylostella* que se alimentaram de folhas contendo concentrações subletais de chlorantraniliprole também apresentaram desenvolvimento irregular, como problemas na pupação e dificuldades do casulo em emergir (Han et al., 2011).

Todos os sintomas podem estar relacionados à deficiência de cálcio destinado para a atividade das miofibrilas musculares. Os sintomas foram frequentes nas três primeiras concentrações de chlorantraniliprole e, na maioria dos tratamentos, houve forte parada de alimentação das lagartas (Figuras 4 (A) e (B)). Hannig et al. (2009) demonstraram que o chlorantraniliprole é o inseticida de ação

mais rápida, em comparação a outros inseticidas quando avaliada a parada e a diminuição na alimentação de alguns lepidópteros.

Quadro 2 - Descrição da sintomatologia em lagartas de *B. mori* nos cinco instares larvais submetidas à aplicação de diferentes concentrações do inseticida chlorantraniliprole. Níveis de intensidade dos sintomas de 0 (menor) a 5 (maior) (Pereira et al., 2012)

Instar	DA	[ ] (ppm)	Parada de alimentação	Vômitos	Desenvolvimento irregular	Ecdise irregular
1º	1º	0,2	5	4	0	0
1º	1º	0,1	5	1	0	0
1º	1º	0,05	5	0	0	0
1º	2º	0,2	5	2	0	0
1º	2º	0,1	5	0	0	0
1º	2º	0,05	4	0	0	0
2º	1º	0,2	5	4	0	0
2º	1º	0,1	1	1	4	0
2º	3º	0,2	2	1	0	4
2º	3º	0,1	0	0	1	4
3º	1º	0,2	5	3	0	0
3º	1º	0,1	5	1	0	0
3º	1º	0,05	0	0	1	0
3º	3º	0,2	5	3	0	3
3º	3º	0,1	5	4	0	4
3º	3º	0,05	0	0	1	4
3º	3º	0,025	0	0	0	2
4º	1º	0,2	5	2	0	0
4º	1º	0,1	5	0	0	0
4º	3º	0,2	5	2	0	0
4º	3º	0,1	5	1	0	0
4º	3º	0,05	0	0	0	2
5º	1º	0,2	5	1	0	0
5º	1º	0,1	5	0	0	0
5º	1º	0,05	0	1	0	0
5º	5º	0,2	5	0	0	0
5º	5º	0,1	5	0	0	0
5º	5º	0,05	0	3	0	0
5º	1º-2º	0,2	5	0	0	0
5º	1º-2º	0,1	5	0	0	0
5º	1º-2º	0,05	0	4	0	0
5º	5º-6º	0,2	5	0	0	0
5º	5º-6º	0,1	5	0	0	0
5º	5º-6º	0,05	3	4	0	0

DA – dia de aplicação e [ ] (ppm) – concentração do Chlorantraniliprole

Outro sintoma comum nas concentrações sub letais foi a presença de fezes em forma de rosário (Figura 4C), resultado da provável dificuldade na execução dos movimentos peristálticos pelo intestino, devido ao comprometimento das miofibrilas musculares. Além desses sintomas, foi observada a produção de casulos casca fina (Figura 4D), os quais não podem ser aproveitados para a fiação, causando prejuízo aos produtores de bicho-da-seda. Como esses casulos não são aproveitados, as empresas de sericultura não os aceitam e os produtores de bicho-da-seda precisam assumir a perda financeira. Todos os sintomas variaram em relação à concentração de inseticidas e aos dias da exposição de cada idade.



Figura 4 - Sintomas observados em híbridos brasileiros de *B. mori* expostos ao chlorantraniliprole: ecdise incompleta (A e B), fezes em forma de rosário (C) e casulos de casca fina (D) (Munhoz et al., 2013).

Observamos sintomas semelhantes aos encontrados por Chen et al., 2010. Eles também relataram que os sintomas surgiram rapidamente, de acordo com as nossas observações. Os sintomas observados são mais relacionados à liberação de cálcio não regulamentada, que controla a atividade das miofibrilas musculares. Isso acarreta alterações na alimentação que conseqüentemente leva a mudanças na conversão do alimento ingerido e digerido, o que pode, eventualmente, causar anormalidades no desenvolvimento posterior.



### 4.1.3. Avaliação da produtividade

Foram avaliadas também características relacionadas à produtividade do *B. mori*. Essas variáveis foram analisadas apenas nos tratamentos referentes ao 4º e 5º instares, pois somente nesses tratamentos o ciclo de vida do bicho-da-seda foi completado em concentrações consideradas subletais. O Quadro 3 apresenta os dados obtidos para as seguintes variáveis: QCN – quantidade de casulos normais, QCCF – quantidade de casulos casca fina, PCN – peso unitário do casulo normal, PCCF – peso unitário do casulo casca fina, PV – pupas vivas, CD – quantidade de casulo duplos. Este quadro não apresenta os tratamentos com concentração de chlorantraniliprole iguais a 0,1 e 0,2 ppm, pois essas concentrações foram tão altas que nenhuma lagarta sobreviveu para completar seu ciclo de vida.

Para todos os tratamentos referentes ao 4º instar, nos dois dias de aplicação, nenhuma das variáveis consideradas apresentou variação estatística, excetuando-se a variável CD, que foi maior quando o agrotóxico foi aplicado no 3º dia do 4º instar, na concentração de  $6,25 \times 10^{-3}$ , apresentando o valor de 2,00 casulos duplos.

A análise das características para os tratamentos com aplicação de chlorantraniliprole no 1º dia do 5º instar também se mostrou homogênea, apresentando variação somente nas variáveis PCN e CD. PCN apresentou valores menores nas concentrações de 0,025 e 0,0125 ppm, com valores iguais a 2,23 e 2,26, respectivamente. Já na concentração igual a 0,025 ppm, a quantidade de casulos duplos (CD) foi maior: 2,66.

Os tratamentos referentes à aplicação em lagartas no 5º dia do 5º instar não apresentaram variação estatística somente em PCCF. O peso médio do casulo de casca fina foi menos do que a metade do peso do casulo normal. A exposição de raças tailandesas de *Bombyx mori* ao inseticida Oxymatrine também diminuiu o peso do casulo quando essas lagartas foram expostas a diferentes concentrações deste inseticida (Nars, 2011).

O peso do casulo desempenha papel extremamente importante na sericultura, devido à comercialização do mesmo ser feita somente por peso. Neste trabalho, ficou evidente que folhas contaminadas por agroquímicos afetam negativamente o desenvolvimento das lagartas e conseqüentemente a qualidade

dos casulos. Kumutha (2009) demonstrou que casulos produzidos por lagartas saudáveis apresentam peso muito maior do que aqueles produzidos por lagartas intoxicadas por diferentes concentrações de Dichlorvos, um organofosforado utilizado na agricultura e horticultura.

Quadro 3 - Avaliação das características relacionadas à produtividade em *B. mori* expostos ao inseticida chlorantraniliprole. DA – dia de aplicação de chlorantraniliprole, [ ] (ppm) – concentração do chlorantraniliprole (Munhoz et al., 2013)

Instar	DA	[ ] (ppm)	QCN	QCCF	PCN	PCCF	PV	CD
4°	1°	0,05	19,00 a	0,33 b	2,46 a	0,97 a	19,33 a	0,66 b
4°	1°	0,025	19,00 a	0,33 b	2,65 a	0,98 a	19,66 a	0,66 b
4°	1°	0,0125	19,33 a	0,00 b	2,55 a	0,00 a	19,33 a	0,66 b
4°	1°	6,25 x 10 <sup>-3</sup>	19,66 a	0,33 b	2,41 a	1,40 a	18,66 a	0,00 b
4°	1°	3,13 x 10 <sup>-3</sup>	19,00 a	0,33 b	2,48 a	0,73 a	19,66 a	0,66 b
4°	1°	1,57 x 10 <sup>-3</sup>	19,33 a	0,66 b	2,47 a	0,83 a	19,33 a	0,00 b
4°	1°	Controle	19,66 a	0,33 b	2,47 a	1,00 a	20,00 a	0,00 b
4°	3°	0,05	17,33 a	0,33 b	2,37 a	0,80 a	17,00 a	0,00 b
4°	3°	0,025	18,66 a	0,66 b	2,37 a	1,71 a	19,00 a	0,66 b
4°	3°	0,0125	19,33 a	0,00 b	2,31 a	0,00 a	20,00 a	0,66 b
4°	3°	6,25 x 10 <sup>-3</sup>	17,66 a	0,33 b	2,30 a	0,68 a	19,00 a	2,00 a
4°	3°	3,13 x 10 <sup>-3</sup>	19,00 a	0,33 b	2,29 a	0,82 a	19,66 a	0,66 b
4°	3°	1,57 x 10 <sup>-3</sup>	18,66 a	0,00 b	2,40 a	0,00 a	19,33 a	1,33 b
4°	3°	Controle	19,33 a	0,66 b	2,46 a	1,57 a	19,66 a	0,00 b
5°	1°	0,05	16,66 a	0,00 b	2,35 a	0,00 a	17,33 a	0,66 b
5°	1°	0,025	16,66 a	0,66 b	2,23 b	1,74 a	19,33 a	2,66 a
5°	1°	0,0125	18,66 a	0,33 b	2,26 b	0,99 a	19,33 a	0,66 b
5°	1°	6,25 x 10 <sup>-3</sup>	19,33 a	0,00 b	2,29 a	0,00 a	19,66 a	0,66 b
5°	1°	3,13 x 10 <sup>-3</sup>	19,00 a	0,33 b	2,30 a	0,79 a	19,33 a	0,66 b
5°	1°	1,57 x 10 <sup>-3</sup>	17,00 a	1,00 b	2,29 a	1,53 a	19,66 a	2,00 a
5°	1°	Controle	19,33 a	0,66 b	2,41	1,46 a	20,00 a	0,00 b
5°	5°	0,05	-2	0,66 b	-2	1,40 a	-2	-2
5°	5°	0,025	6,66 b	7,66 a	2,13 b	2,17 a	8,66 d	1,33 b
5°	5°	0,0125	16,66 a	0,00 b	2,11 b	0,00 a	19,66 a	3,33 a
5°	5°	6,25 x 10 <sup>-3</sup>	19,66 a	0,66 b	2,16 b	1,03 a	20,00 a	0,00 b
5°	5°	3,13 x 10 <sup>-3</sup>	18,66 a	0,66 b	2,27 a	0,64 a	20,00 a	0,66 b
5°	5°	1,57 x 10 <sup>-3</sup>	18,33 a	0,33 b	2,16 b	0,64 a	20,00 a	1,33 b
5°	5°	Controle	18,33 a	0,00 b	2,20 b	0,00 a	20,00 a	1,33 b
5°	1°-2°	0,05	8,33 b	0,33 b	1,85 b	0,60 a	11,33 c	0,00 b
5°	1°-2°	0,025	17,33 a	0,66 b	2,07 b	1,00 a	16,00 b	1,33 b
5°	1°-2°	0,0125	18,00 a	0,00 b	2,17 b	0,00 a	19,00 a	2,00 a
5°	1°-2°	6,25 x 10 <sup>-3</sup>	18,00 a	0,00 b	2,20 b	0,00 a	20,00 a	2,00 a
5°	1°-2°	3,13 x 10 <sup>-3</sup>	17,33 a	0,00 b	2,08 b	0,00 a	20,00 a	2,66 a
5°	1°-2°	1,57 x 10 <sup>-3</sup>	18,66 a	0,00 b	2,12 b	0,00 a	20,00 a	1,33 b
5°	1°-2°	Controle	16,33 a	0,00 b	1,99 b	0,00 a	20,00 a	3,33 a
5°	5°-6°	0,05	-2	-2	-2	-2	-2	-2
5°	5°-6°	0,025	0,33 c	0,00 b	0,70 c	0,00 a	0,33 e	0,00 b
5°	5°-6°	0,0125	17,00 a	0,33 b	2,03 b	0,60 a	20,00 a	2,66 a
5°	5°-6°	6,25 x 10 <sup>-3</sup>	16,00 a	2,33 b	2,27 b	1,53 a	19,00 a	0,66 b
5°	5°-6°	3,13 x 10 <sup>-3</sup>	19,33 a	0,00 b	2,02 b	0,00 a	20,00 a	0,66 b
5°	5°-6°	1,57 x 10 <sup>-3</sup>	18,00 a	0,00 b	2,05 b	0,00 a	19,33 a	1,33 b
5°	5°-6°	Controle	17,00 a	0,00 b	1,98 b	0,00 a	20,00 a	2,66 a

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são diferentes pelo teste de Scott-Knott (P<0,05). <sup>2</sup> Parcela perdida.

Na concentração de chlorantraniliprole igual a 0,5 ppm aplicada no 5º dia do 5º instar, foi observado somente casulos casca fina e, assim, as variáveis QCN, PCN e PV não puderam ser avaliadas. As características QCN, QCCF, PCN e PV variaram no tratamento referente à concentração de 0,025 ppm, sendo iguais a 6,66; 7,66; 2,13 e 8,66, respectivamente. Esses valores foram menores para QCN, PCN e PV e maior para QCCF. A quantidade de casulos duplos foi maior na concentração de 0,0125 ppm, apresentando média de 3,33 casulos duplos.

Houve, também, tratamentos que envolveram duas exposições ao inseticida chlorantraniliprole em diferentes idades do 5º instar. Quando chlorantraniliprole foi aplicado duas vezes no 5º instar, nos 1º e 2º dias, não houve variação entre PCN, QCCF e, conseqüentemente, PCCF nos tratamentos. A QCN e o PV apresentaram os menores valores no tratamento com chlorantraniliprole a uma concentração de 0,05 ppm, atingindo valores de 8,33 para a quantidade de casulos e 11,33 para as pupas vivas, respectivamente. A quantidade de casulos duplos foi maior nas concentrações 0,0125,  $6,25 \times 10^{-3}$ ,  $3,13 \times 10^{-3}$  ppm e controle, apresentando valores de 2,00; 2,00; 2,66 e 3,33 respectivamente.

Quando as aplicações ocorreram no 5º e 6º dia do 5º instar, a concentração de 0,05 ppm foi alta o suficiente para que todas as lagartas morressem sem completar seu ciclo de vida e, por isso, as análises das características para essa concentração do agrotóxico não puderam ser realizadas. Neste tratamento, não houve variação em QCCF e PCCF. QCN, PCN e PV variaram na concentração igual a 0,025 ppm, apresentando valores menores: 0,33; 0,70 e 0,33, respectivamente. A quantidade de casulos duplos foi maior na concentração de 0,0125 ppm e no controle, apresentando valores de 2,66 para ambos os tratamentos.

#### **4.1.4. Alterações morfológicas**

A análise microscópica da parede do intestino médio de lagartas de *B. mori* expostas a duas concentrações de chlorantraniliprole (0,2 e 0,1 ppm) revelou um aspecto morfológico bastante alterado. Nas células colunares do epitélio de revestimento intestinal verifica-se que o núcleo é deslocado para a superfície apical, sendo eliminado via brotamento (Figura 5vB e C). Neste processo, as células, que são microvilosidades apicais (Snodgrass; Eickwort, 1993), perdem a borda em escova, o núcleo migra para a superfície apical, que se apresenta dilatada (Figura

5B) e, posteriormente, verifica-se a presença de inúmeras vesículas apicais, muitas das quais apresentam o núcleo no seu interior (Figura 5C). Estas vesículas se abrem na luz intestinal. A presença do núcleo nas estruturas observadas em microscopia óptica foi confirmada como sendo o resultado da morte das células epiteliais do intestino médio. Células colunares são mais abundantes no epitélio do intestino médio de insetos e são responsáveis pelo processamento de alimentos, secretando enzimas digestivas e de absorção dos produtos finais da digestão (Lehane; Billingsley, 1996). Seu mal funcionamento afeta todo o metabolismo, incluindo a produção de seda.

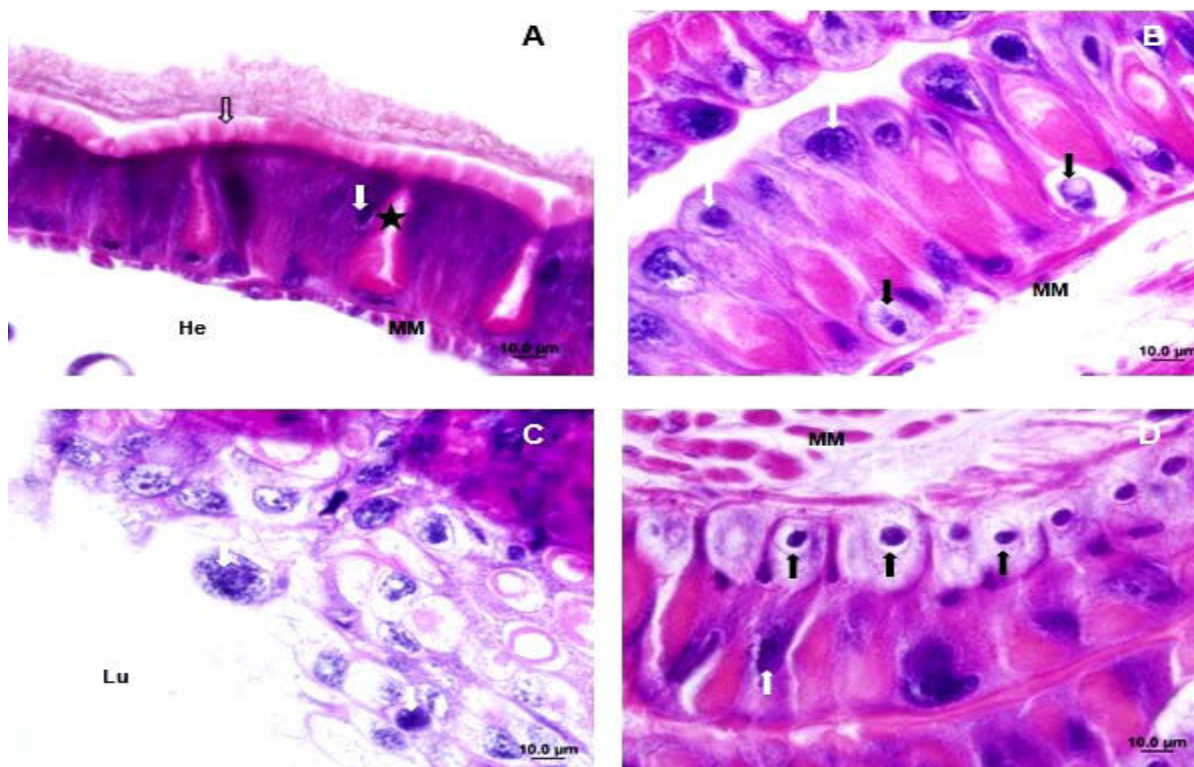


Figura 5 - Fotomicrografias do epitélio de revestimento do intestino médio de lagartas de *B. mori*, de 5º instar, coloração HE. Imagem A, B, C, com chlorantraniliprole. Em A, aspecto morfológico do epitélio controle, núcleo das células colunares (seta branca), lúmen das células caliciformes (estrela), borda estriada (seta vazada), camada muscular (MM) e hemocele (He). Em B, C e D, seqüência de alterações morfológicas no epitélio. Em B, o núcleo das células colunares (seta branca) se direciona para o ápice celular dilatado e grande quantidade de células regenerativas (setas pretas) hipertrofiadas é observada na base do epitélio. Em C, liberação de parte do citoplasma das células colunares, via brotamento, culminando com a expulsão do núcleo celular, no detalhe em D, para o lúmem intestinal (Lu).

As células regenerativas presentes na base do epitélio de revestimento sofrem hiperplasia e hipertrofia (Figura 5D), diferindo bastante do aspecto normal (não mostrado). Supõe-se que essas células sejam responsáveis pela regeneração do epitélio de revestimento e as precursoras de outros tipos de células, incluindo as células colunares (Illa-Bochaca; Montuenga, 2006), entretanto, o mesmo não acontece já que estão morfológicamente alteradas.

Verifica-se, ainda, que a parede intestinal apresenta camadas de musculatura longitudinal e circular, que atuam na peristalse. Estes músculos se apresentam desorganizados, possivelmente devido ao desarranjo de suas miofibrilas (Figura 5B e D). A figura 5A apresenta a musculatura controle para comparação.

O intestino médio é responsável pela digestão do alimento e absorção dos nutrientes necessários ao desenvolvimento e à manutenção das funções metabólicas normais do inseto. Assim, as alterações microscópicas observadas pela ação do chlorantraniliprole em concentrações de 0,2 e 0,1 ppm prejudicam o desenvolvimento de suas funções orgânicas normais, sendo responsável por muitos dos sintomas manifestados, como o desenvolvimento irregular, fezes em rosário e até mesmo pela produção de casulos casca fina.

## **4.2. Avaliação da expressão da proteína kin17 em lagartas de *B. mori* submetidas à intoxicação pelo inseticida chlorantraniliprole**

### **4.2.1. Detecção da proteína kin17**

Observa-se, na Figura 6 (A e B), as membranas de nitrocelulose (detecção por *Ponceau S*). Essas figuras evidenciam que as amostras estão em concentrações praticamente iguais e foram quantificadas pelo método de Bradford (1976).

Na Figura 7 (A e B), podem ser observadas bandas detectadas com o anticorpo primário K58 (Santa Cruz Biotechnology) anti Kin17. Este anticorpo reconhece a região da proteína de reparo kin17 de humanos, como descrito anteriormente.

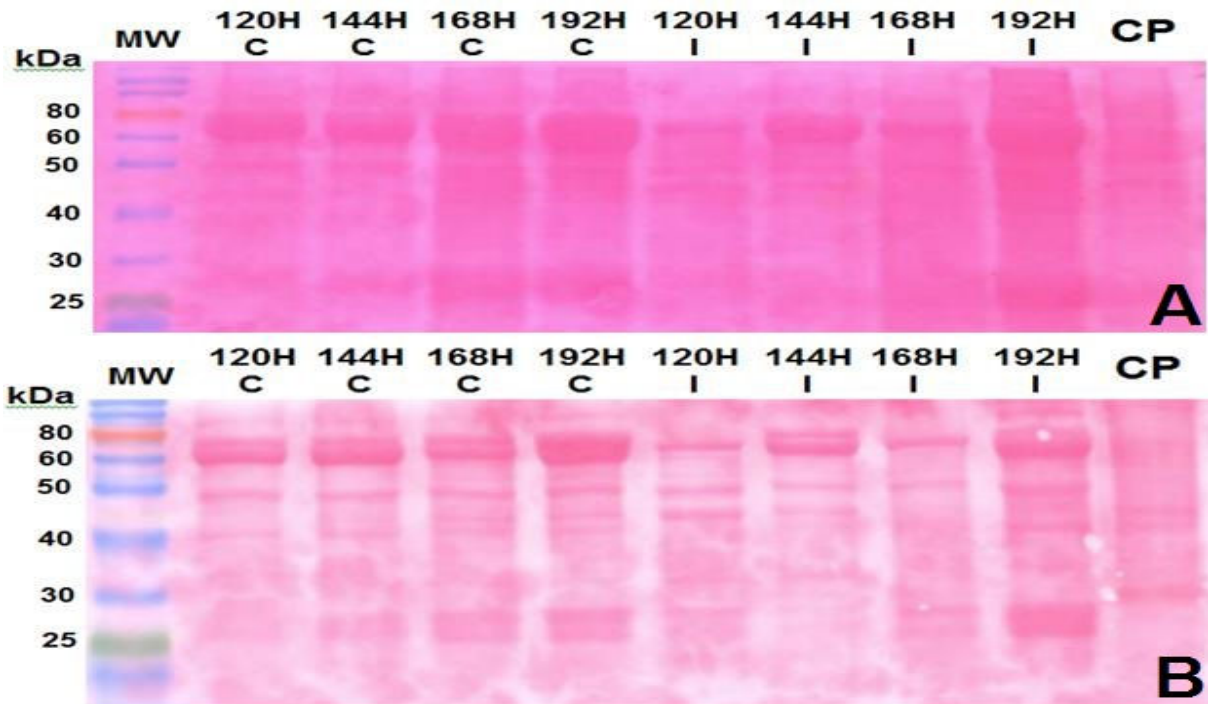


Figura 6 - Análise de frações proteicas após intoxicação de lagartas de *Bombyx mori* pelo inseticida chlorantraniliprole. **A)** Amostras de corpo gorduroso; **B)** Túbulo de malpighi. **(MW)** Marcador de peso molecular Biolabs Color Plus. Membrana de nitrocelulose corada com *Ponceau S*. Amostras de 120 a 192 horas após o 5º instar. C - controle, I - infectado.

A seta na Figura 7 (A e B) indica que, na posição esperada para a proteína kin17, não foi detectada nenhuma fração associada ao peso molecular estimado para essa proteína (45kDa; AK377488.1) em ambas as amostras e tempos analisados. Entretanto, houve a detecção, pelo anticorpo utilizado, de uma fração de ~32kDa em todas amostras de corpo gorduroso (Figura 7A) controles e intoxicadas, uma banda adicional de ~20 kDa nas amostras de corpo gorduroso controle (168 e 192 hpi) e intoxicadas (120, 144 e 168 hpi). Nas amostras de túbulo de Malpighi (Figura 7B), houve a detecção da fração de 32kDa em todas as amostras controles e 120 e 144 hpi nas amostras provenientes de lagartas intoxicadas. As evidências indicam que os fragmentos visualizados podem ser degradação e/ou detecção não específica de proteínas nessas amostras.

Esses resultados, em conjunto com a observação de que a proteína kin17 de *B. mori* e de *Drosophila melanogaster* (Freitas, D.V.B., informação pessoal) não apresentam o motivo KOW, região envolvida na ligação com RNA, localizado na porção C-terminal da kin17 de mamíferos (Le Marie et al., 2006), não sendo detectadas pelo anticorpo específico para essa região (K36 Santa Cruz

Biotechnology), indicam que, pelo menos para esses dois insetos, *B. mori* e *Drosophila melanogaster*, analisados neste trabalho, a kin17 deve estar envolvida somente com processos de estresse celular e não com a replicação do DNA, conforme observado em mamíferos (Despras, 2006).

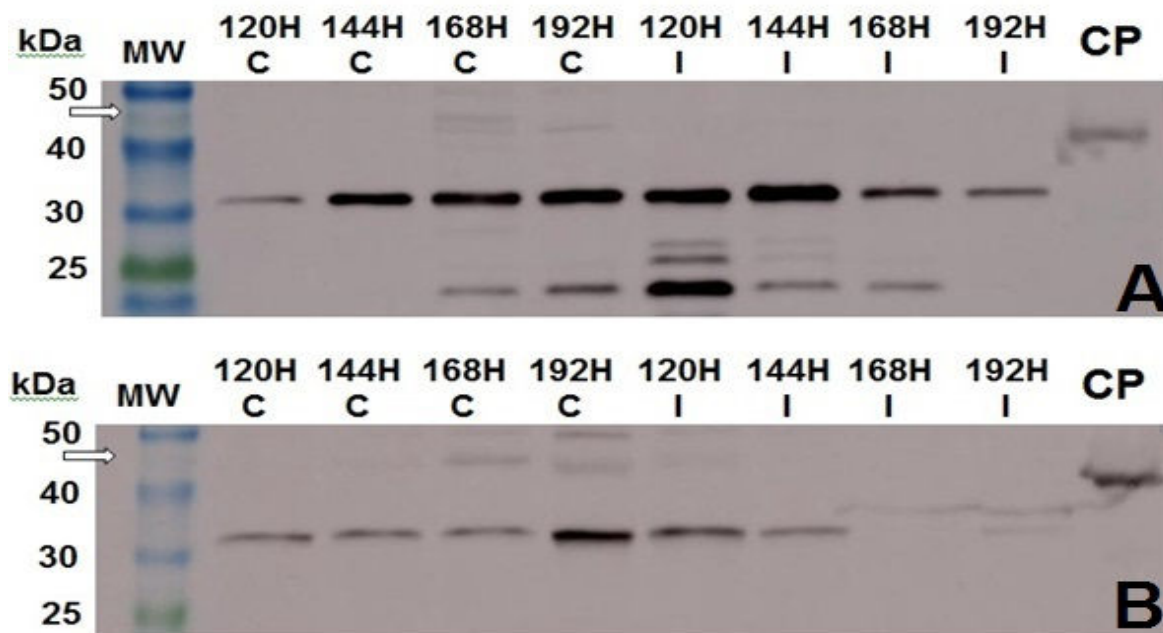


Figura 7 - Imunodeteção da proteína kin17 em tecidos larvais de *B. mori*. A) corpo gorduroso e B) túbulo de malpighi. Amostras: 120, 144, 168, e 192 hpi controle (C) e intoxicados (I) com chlorantraniliprole. (M) ColorPlus Prestained Protein Ladder (New England Biolabs), (CP) Controle positivo.

Ainda não é claro o papel da proteína kin17 em insetos. Pereira et al. (2014) detectaram esta proteína em amostras de túbulos de malpighi de lagartas infectadas pelo baculovírus causador da doença amarelidão (*Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus, BmNPV) no 10º dia após a infecção. Acredita-se que, neste estudo, o aumento da expressão da proteína kin17 está relacionado com o estresse causado pela infecção viral. No entanto, verificamos em nossos resultados que, na situação de estresse provocada pelo inseticida chlorantraniliprole, não houve a expressão da proteína kin17.

Os sintomas mencionados anteriormente e atribuídos à intoxicação pelo chlorantraniliprole, que incluem a parada de alimentação, seguida pela interrupção dos movimentos peristálticos, provocando desnutrição severa e danos no metabolismo, podem afetar a expressão desta proteína. Neste caso, não há expressão ou superexpressão de kin17 em bicho-da-seda.

#### 4.2.2. Análise dos efeitos de baixa dosagem sobre a produtividade em *B. mori*

Foram avaliadas características relacionadas à produtividade de *B. mori* submetidos à intoxicação por uma baixa dosagem do inseticida chlorantraniliprole. O quadro 4 apresenta os dados obtidos para as seguintes variáveis: CC- comprimento do casulo, PC – peso do casulo e PCS – peso da casca sérica.

Quadro 4 - Avaliação das características relacionadas à produtividade em *B. mori* expostos à baixa dosagem do inseticida chlorantraniliprole

Tratamentos	CC	PC	PCS
Controle	33,37 a	1,52 a	0,32 a
Intoxicada	29,84 b	1,24 b	0,23 b
Média geral	31,60	1,38	0,28
CV	2,49	7,19	5,42

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são diferentes pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

Todas as variáveis consideradas apresentaram variação estatística. Os casulos produzidos por lagartas intoxicadas pelo inseticida chlorantraniliprole a 0,025 ppm possuem valores inferiores aos comparados aos casulos produzidos por lagartas saudáveis. Para a variável CC, o grupo controle apresentou média igual a 33,37, enquanto no grupo de lagartas intoxicadas a média apresentada foi de 29,84 (Figura 8).

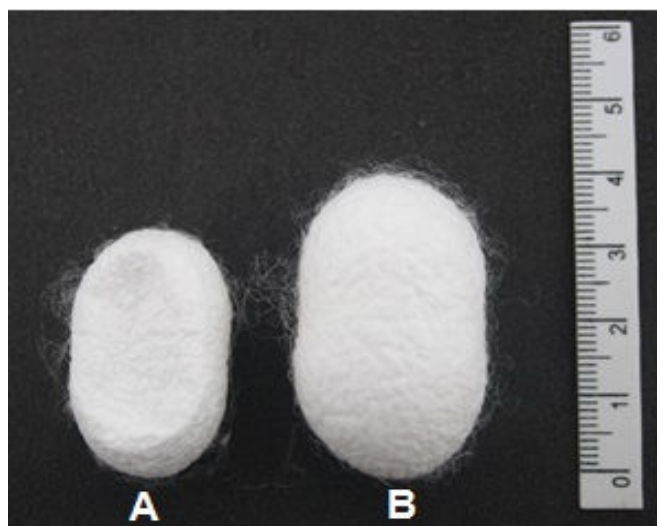


Figura 8 - Casulos de híbridos comerciais de *B. mori*. A - casulos produzidos por lagartas intoxicadas pelo inseticida chlorantraniliprole a 0,0025 ppm; B - casulos produzidos por lagartas do grupo controle.



O grupo controle apresentou média igual a 1,52 para a variável PC. Para esta mesma variável, o tratamento composto por casulos produzidos por lagartas intoxicadas foi significativamente menor, apresentando média igual a 1,24. Em relação às médias obtidas na variável PCS, o grupo controle teve média superior (0,32) ao grupo composto por casulos produzidos por lagartas intoxicadas pelo inseticida chlorantraniliprole a 0,025 ppm.

Resultados semelhantes foram obtidos por Nars (2011), avaliando o peso dos casulos produzidos por lagartas de *Bombyx mori* no 5º instar, submetidas à intoxicação pelo inseticida Chlorfluazuron. A utilização deste agroquímico resultou numa diminuição significativa do PC quando comparado ao grupo controle. Neste mesmo trabalho, o uso de diferentes concentrações do inseticida Oxymaltrine resultou numa diminuição significativa do peso da casca sérica (PCS) de lagartas de *Bombyx mori* quando comparados ao grupo controle.

A produção de casulos de casca fina é resultado da provável dificuldade na execução dos movimentos peristálticos pelo intestino, devido ao comprometimento das miofibrilas musculares. Sem a possibilidade de executar o movimento peristáltico, o intestino não elimina corretamente os restos alimentares (fezes em rosário) ocasionando futura parada da alimentação. Esta parada da alimentação gera como consequência o subdesenvolvimento da glândula sericígena e casulos de casca fina (figura 4D), que não possuem qualquer valor comercial.

## 5. CONCLUSÕES

A pulverização aérea indiscriminada de inseticidas em plantações próximas a áreas de amoreiral tem causado graves perdas na produção de casulos dos bichos-da-seda e conseqüentemente grandes prejuízos para os produtores, para as fiações artesanais e para a indústria. Vários autores têm relatado distúrbios no ciclo de vida do bicho-da-seda e na produção de seus casulos, devido aos diferentes tipos de inseticidas (Nars, 2011; Kuribayashi, 1988; Nath et al., 1997).

Os dados obtidos neste trabalho demonstram uma alta toxicidade produzida por pelo inseticida chlorantraniliprole em lagartas de *B. mori*. Nosso estudo mostrou que elevadas concentrações desse inseticida, como 0,2 e 0,1 ppm, acarretam, na grande maioria das vezes, morte total das lagartas. Apesar de concentrações mais baixas do inseticida, como 0,05, 0,025 e 0,0125 ppm, causar nenhuma ou reduzida mortalidade, ainda é capaz de produzir danos como parada de alimentação e produção de casulos casca fina, os quais são economicamente inviáveis e não possuem qualquer valor comercial.

O intestino médio é responsável pela digestão do alimento e absorção dos nutrientes necessários ao desenvolvimento e à manutenção das funções metabólicas normais do intestino. O chlorantraniliprole, nas concentrações de 0,2 e 0,1 ppm, altera a morfologia do epitélio de revestimento do intestino médio, bem como a musculatura da parede intestinal e respondem por muitos dos sintomas manifestados pelos insetos intoxicados.

Os resultados obtidos na imunodeteção com anticorpo contra a proteína kin17 em tecidos larvais de *B. mori* demonstraram que não houve expressão desta proteína, tanto em tecidos provenientes de lagartas controle como de lagartas intoxicadas. Esses dados sugerem que, a kin17 não é expressa em resposta à intoxicação pelo inseticida aqui analisado.

O inseticida chlorantraniliprole é prejudicial aos híbridos brasileiros de bicho-da-seda, mesmo em baixas concentrações, como revelado por nosso estudo. Sendo assim, medidas para evitar perdas na sericultura devem ser iniciadas, como a proibição da utilização deste inseticida próximo a áreas de sericultura.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SHANNAF, H.M.; MEAD, H.M.; SABRY, A.H.; Toxic and Biochemical Effects of Some Bioinsecticides and IGRs on American Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hub.) (Noctuidae: Lepidoptera) in Cotton Fields. **Journal of Biofertilizers & Biopesticides**, 3:1-6, 2012.

ÁLVAREZ, F.A.; LÓPEZ, A.E.C. **Sericicultura**. Zoologia aplicada. Madrid: Díaz de Santos S.A., 2003. 231p.

ANDERSON, D.G.; KOWALCZYKOWSKI, S.C. Reconstitution of an SOS response pathway: depression of transcription in response to DNA breaks. **Cell Press**, 95:975-979, 1998.

ANGULO, J.F.; MOREAU, P.L.; MAUNOURY, R.; LAPORTE, J.; HILL, A.M.; BERTOLOTTI, R.; DEVORET, R. Kin, a mammalian nuclear protein immunologically related to *E. coli* RecA protein. **Mutation Research**, 217:123-134, 1989.

ANGULO, J.F.; ROUER, E.; MAZIN, A.; MATTEI, M-G.; TISSIER, A.; HORELLOU, P.; BENAROUS, R.; DEVORET, R. Identification and expression of the cDNA of kin17, a zinc-finger gene located on mouse chromosome 2, encoding a new DNA-binding protein. **Nucleic Acids Research**, 19:5117-5123, 1991.

ANONYMOUS. **DuPont Rynaxypyr® insect control technical bulletin**. Disponível em: <[http://www2.dupont.com/Production\\_Agriculture/en\\_US/assets/downloads/pdfs](http://www2.dupont.com/Production_Agriculture/en_US/assets/downloads/pdfs)> Acesso em: 23, setembro, 2014.

ANTUNIASSI, U.R.; BAIO, F.H.R. Tecnologia de aplicação de defensivos. In: VARGAS, L.; ROMAN, E.S. **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. Passo Fundo: Embrapa trigo, 2008. p. 174-175.

ARUGA, H. **Principles of Sericulture**. Tokyo, Japão: CRC Press, 1994. 85p.

ARUNKUMAR, K.P.; METTA, M.; NAGARAJU, J. Molecular phylogeny of silkmoths reveals the origin of domesticated silkmoth, *Bombyx mori* from Chinese *Bombyx*

*mandarina* and paternal inheritance of *Antheraea proylei* mitochondrial DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 40:419-427, 2006.

BARCELLOS, L.C.; CARVALHO, Y.C.; SILVA, A.L. Estudo sobre a penetração de gotas de pulverização no dossel da cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Engenharia na agricultura**, 6:81-94, 1998.

BIARD, D.S.; MICCOLI, L.; DESPRAS, E.; CREMINON, C.; ANGULO, J.F. Ionizing radiation triggers chromatin-bound kin17 complex Formation in human cells. **The journal of biological chemistry**, 277:19156–19165, 2002.

BORA, D.; KHANIKOR, B.; GOGOI, H. Plant based pesticides: green environment with special reference to silk worms. In: SOUNDARARAJAN, R.P. **Pesticides - advances in chemical and botanical pesticides**. Tamil Nadu: In tech, 2012. p. 171-206.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248-254, 1976.

BRANCALHÃO, R.M.C. Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda: Taxonomia e citopatologia causada por Nucleopolyhedrovirus em células de *Bombyx mori*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 24:54-58, 2002.

CARDOSO, A.C. **Detecção da proteína kin 17 em linhagens de melanoma**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá. 2014. 29p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas).

CENTNER, T.J. Damages from pesticide spray drift under trespass law. **Ecology Law Currents**, 41:1-17, 2014.

CHEN, W.G.; DONG, R.H.; SUN, H.Y.; DAI, J.Z.; ZHU, H.L.; WU, F.A. An investigation on toxicity of the agricultural pesticide chlorantraniliprole to the silkworm, *Bombyx mori*. **Science of Sericulture**, 1:84-90, 2010.

CHRISTOFOLETTI, J.C. **Considerações sobre deriva nas pulverizações agrícolas e seu controle**. São Paulo: TeeJet South América, 1999. 15p.

CLOUTIER, P.; LAVALLÉE-ADAM, M.; FAUBERT, D.; BLANCHETTE, M.; COULOMBE, B.A. Newly Uncovered group of distantly related lysine methyltransferases preferentially interact with molecular chaperones to regulate their activity. **PLoS Genet**, 9:e1003210, 2013a.

CLOUTIER, P.; LAVALLÉE-ADAM, M.; FAUBERT, D.; BLANCHETTE, M.; COULOMBE, B. Methylation of the DNA/RNA-binding protein kin17 by METTL22 affects its association with chromatin. **Journal of Proteomics**, 100:115-124, 2013b.

CORDOVA, D.; BENNER, E.A.; SACHER, M.D.; RAUH, J.J.; SOPA, J.S.; LAHM, G. P.; SELBY, T.P.; STEVENSON, T.M.; FLEXNER, L.; GUTTERIDGE, S.; RHOADES, D.F.; WU, L.; SMITH, R.M.; TAO, Y. Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 84:196–214, 2006.

CORDOVA, D.; BENNER, E.A.; SACHER, M.D.; RAUH, J.J.; SOPA, J.S.; LAHM, G. P.; SELBY, T.P.; STEVENSON, T.M.; FLEXNER, L.; CASPAR, T.; RAGGHIANI, J, J.; GUTTERIDGE, S.; RHOADES, D.F.; WU, L.; SMITH, R.M.; TAO, Y. Elucidation of the mode of action of Rynaxypyr®, a selective ryanodine receptor activator. In: OHKAWA, H.; MIYAGAWA, H.; LEE, P.W. (eds.). **Pesticide chemistry, crop protection, public health, and environmental safety**. Wiley-VCH Verlag: GmbH & CO. KGaA, 2007. p. 121-126.

CORRADELLO, E.F.A. **Bicho-da-seda e amoreira: da folha ao fio a trama de um segredo milenar**. São Paulo: Ícone, 1987. 101p.

DESPRAS, E. **Les proteines kin17, xpc, dna-pkcs et xrcc4 dans la reponse cellulaire aux dommages de l'adn. Etude des relations entre la reparation par excision de nucleotides et la recombinaison non homologue dans un modele syngenique humain**. Paris : Universite Paris V, 2006. 248p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular e Celular).

DESPRAS, E.; MICCOLI, L.; CRÉMINON, C.; ROULLARD, D.; ANGULO, J. F.; BIARDS, D.S. Depletion of kin17, a human DNA replication protein, increases the radiosensitivity of RKO cells. **Radiation Research**, 159:748–758, 2003.

DINGLE, J. G.; HASSAN, E.; GUPTA, M.; GEORGE, D.; ANOTA, L.; BEGUM, H. Silk production in Australia. **Rural industries research and Development Corporation, ISBN 1741512085**. Publication 05/145. 2005. 113p.

ELIESEEFF, V.; Approaches old and new to the silk roads. In: ELIESEEFF, V. **The silk roads: high-ways of culture and commerce**. Paris: UNESCO, 1998. p. 1-127.

FERNANDES, S.O. **Bicho-da-seda: produção cresce entre os pequenos**. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=8702>>. Acesso em: 23, setembro, 2014.

FERNANDEZ, M.A.; CIFERRI, R.R.; PATUSSI, E.V.; PEREIRA, M.P.; FELIPES, J.; BRAVO, J.P.; ZANATTA, D.B.; GOUVEIA, F.S.; BALANI, V.A. A Utilização da Biotecnologia na Sericicultura Brasileira. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 35:56-61, 2005.

FERREIRA, D.F. SISVAR - Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras-MG:UFLA, 2010.

GOLDSMITH, M.R.; SHIMADA, T.; ABE, H. The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. **Annual Review of Entomology**, 50:71–100, 2005.

HAN, W.; ZHANG, S.; SHEN, F.; LIU, M.; REN, C.; GAO, X. Residual toxicity and sublethal effects of chlorantraniliprole on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Pest Management Science**, 68:1184-1190, 2010.

HANADA, Y.; WATANABE, J.K. **Manual de criação do bicho-da-seda**. Curitiba: COCAMAR, 1986. 224p.

HANNIG, G.T.; ZIEGLER, M.; MARCON, P.G. Feeding cessation effects of chlorantraniliprole, a new anthranilic diamide insecticide, in comparison with several insecticides in distinct chemical classes and mode of action groups. **Pest Management Science**, 65:969-974, 2009.

HOLANDA, P.R.H.; MATA, S.F.; LIMA, A.G.B. Propriedades físicas e secagem de casulos do bicho-da-seda em leito fixo: uma investigação teórica e experimental. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 2:101-114, 2004.

ILLA-BOCHACA, I.; MONTUEGA, L.M. The regenerative nidi of the locust midgut as a model to study epithelial cell differentiation from stem cells. **The Journal of Experimental Biology**, 209:2215-2223, 2006.

JEFFERIES, P.A.; TOIA, R.F.; BRANNIGAN, B.; PESSAH, I. CASIDA, J.E. Ryania insecticide: analysis and biological activity of 10 natural ryanoids. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 40:142-146, 1992.

JUNQUEIRA, L.C.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. Santos, São Paulo: 1983. 124p.

KANNOUCHE, P.; MAUFFREY, P.; PINON-LATAILLADE, G.; MATTEI, M.G.; SARASIN, A.; DAYA-GROSJEAN L.; ANGULO, J.F. Molecular cloning and characterization of the human kin17 cDNA encoding a component of the UVC response that is conserved among metazoans. **Carcinogenesis**, 21:1701-1710, 2000.

KANNOUCHE, P.; PINON-LATAILLADE, G.; MAUFFREY, P.; FAUCHER, C.; BIARD, D.S.; ANGULO, J.F. Overexpression of kin17 protein forms intranuclear foci in mammalian cells. **Biochimie**, 79: 599-606, 1997.

KELLOGG, V. **Insect Breeding. Journal of Heredity**, 1:133-135, 1910.

KRISHNASWAMI, S.; NARASIMHANNA, M.N. **Sericulture manual 2- silkworm rearing**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1979. 131p.

KUMUTHA, P. **Impacts of mulberry crop pest control agents on the silkworm *Bombyx mori***. Nagercoil: Scott Christian College, 2009. 173p. Tese (Doutorado em Fisiologia).

KURIBAYASHI, S. Damage of silkworms caused by pesticides and preventive measures. **Japan Agricultural Research Quarterly**, 21:274-283, 1988.

KURIN, R. The Silk Road: Connecting Cultures, Creating Trust. **Smithsonian Institution**, 21:1-24, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685, 1970.

LAHM, G.P.; CORDOVA, D.; BARRY, J.D. New and selective ryanodine receptor activators for insect control. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 174127–4133, 2009.

LAHM, G.P.; STEVENSON, T.M.; SELBY, T.P.; FREUDENBERGER, J.H.; CORDOVA, D.; FLEXNER, L.; BELLIN, C.A.; DUBAS, C.M.; SMITH, B.K.; HUGHES, K.A.; HOLLINGSHAUS, G.; CLARK, C.E.; BENNER, E. A. Rynaxypyr™: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 17:6274–6279, 2007.

LE MAIRE, A.; SCHILTZ, M.; BRAUD, S.; GONDROY, M.; CHARBONNIER, J. B.; ZINN-JUSTIN, S.; STURA, E. Crystallization and halide phasing of the C-terminal domain of human kin17. **Acta Crystallograph. Section F, Structural Biology Crystalization Communications**, 62:245-248, 2006.

LEHANE, M.J.; BILLINGSLEY, P.F. **Biology of the insect midgut**. Cambridge: Chapman & Hall, 1996. 486p.

LI, M.; HOU, C.; MIAO, X.; XU, A.; HUANG, Y. Analyzing Genetic Relationships in *Bombyx mori* using intersimple Sequence Repeat Amplification. **Journal of economy Entomology**, 100:202-208, 2007.

LIMA NETO, Q.A.; RANDO, F.S.; PATTARO JUNIOR, J.R. ; FREITAS, D.V.B.; KELMER, S.M.; RAMOS, A.C.; FERNADEZ, M.A. Molecular Cloning of the Chinese Hamster *KIN17* cDNA and Identification of the kin17 From Different Protein Fractions. In: XLIII Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society. **Resumos...** Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. 07p.

MASSON, C.; MENAA, F.; PINON-LATAILLADE, G.; FROBERT, Y.; CHEVILLARD, S.; RADICELLA, J.P.; SARASIN, A.; ANGULO, J.F. Global genome repair is required to activate kin17, a UVC-responsive gene involved in DNA replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100:616-621, 2003.



MAZIN, A.; MILOT, E.; DEVORET, R.; CHARTRAND, P. kin17, a mouse nuclear protein, binds to bent DNA fragments that are found at illegitimate recombination junctions in mammalian cells. **Molecular and General Genetics**, 244:435-438, 1994a.

MAZIN, A.; TIMCHENKO, T.; MÈNISSIER-DE MURCIA, J.; SCHREIBER, V.; ANGULO, J. F. ; DE MURCIA, G. ; DEVORET, R. kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA. **Nucleic Acids Research**, 22:4335-434, 1994b.

MICCOLI, L.; FROUIN, I.; NOVAC, O.; DI PAOLA, D.; HARPER, F.; ZANNIS-HADIOPOULOS, M.; MAGA, G.; BIARDS, D. S.; ÂNGULO, J. F. The human stress-activated protein kin17 belongs to the multiprotein DNA replication complex and associates in vivo with mammalian replication origins. **Molecular and Cellular Biology**, 25:3814-3830, 2005.

MILLER, P.C.H. Spray drift and its measurement. In: MATTHEWS, G.A.; HISLOP, E. C. **Application technology for crop protection**. London: CAB International: 1993. p. 101-122.

MILLER, P.C.H. Reducing the risk of drift from boom sprayers. In: RAETANO, C.G.; ANTUNIASSI, U.R. **Qualidade em tecnologia de aplicação**. Botucatu: FEPAF, 2004. p. 110-124.

MONDAL, M.; TRIVEDI, K.; KUMAR, N.S. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, 5:63-76, 2007.

MUNHOZ, R.E.F. **Variabilidade genética em raças e híbridos simples de *Bombyx mori* L. do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2010. 106p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

MUNHOZ, R.E.F.; BIGNOTTO, T.S.; PEREIRA, N.C.; SAEZ, C.R.N.; BESPALHUK, R.; FASSINA, V.A.; PESSINI, G.M.; BAGGIO, M.P.D.; RIBEIRO, L.F.C.; BRANCALHÃO, R.M.C.; MIZUNO, S.; AITA, W.S.; FERNANDEZ, M.A. Evaluation

of the toxic effect of insecticide chlorantraniliprole on the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). **Open journal of animal sciences**, 3:343-353, 2013.

NAGARAJU, J.; GOLDSMITH, M.R. Silkworm genomics - progress and prospects. **Current Science**, 83:415-425, 2002.

NARS, H.M. Toxicological and biochemical effects of chlorpyrifos, chlorfluazuron and oxydemeton-methyl on larvae of *Bombyx mori*. **Journal of Agricultural Research of Kafer El-Sheikh Universit**, 37:209-222, 2011.

NATH, B.S.; SURESH, A.; VERMA, B.M.; KUMAR, R.P.S. Changes in protein metabolism in haemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) in response to OP insecticidal toxicity. **Eco-toxicology and Environmental Safety**, 36:169-173, 1997.

PAKKIANATHAN, B.C.; SINGH, N.K.; KRISHNAN, M.; KONIG, S.A proteomic view on the developmental transfer of homologous 30 kDa lipoproteins from peripheral fat body to perivisceral fat body via hemolymph in silkworm, *Bombyx mori*. **BMC biochemistry**, 13:1-14, 2012.

PAPA, G. Manejo integrado de pragas. In: ZAMBOLIM, L.; ZUPPI, M.; SANTIAGO, T. **O que engenheiros agrônomos devem saber para orientar uso de produtos fitossanitários**. Viçosa: Departamento de Fitopatologia, 2008. p. 225-258.

PAULINO, A.T.; GUILHERME, M.R.; REIS, A.V.; TAMBOURGI, E.B.; NOZAKI, J.; MUNIZ, E.C. Capacity of adsorption of Pb<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> from aqueous solutions by chitosan produced from silkworm chrysalides in different degrees of deacetylation. **Journal of Hazardous Materials**, 147:139-147, 2007.

PEREIRA, N.C.; FERNANDEZ, M.A.; MUNHOZ, R.E.F.; PESSINI, G.M.; ORO, A.L. Análise da proteína de reparo kin17 em bicho-da-seda infectados experimentalmente com *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus, BmNPV. In: **XXIII ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – EAIC. Resumos...** Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2014. 3p.

PEREIRA, N.C.; MIZUNO, S.; AITA, W.S.; MUNHOZ, R.E.F.; BIGNOTTO, T.S.; SAE, C.R.N.; BESPALHUK, R.; FASSINA, V.A.; PESSINI, G.M.; RIBEIRO, L.F.C.;

BRANCALHÃO, R.M.C.; COLOMBELLI, K.T.; FERNANDEZ, M.A. Concentração letal e sintomatologia da intoxicação pelo inseticida Chlorantraniliprole em lagartas de *Bombyx mori*. In: III SIMPÓSIO DE CIÊNCIAS APLICADAS A SERICICULTURA – SICAS. **Resumos...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2012. p. 3.

RAHMAN, M.M.; GOPINATHAN, K.P. Bombyx mori nucleopolyhedrovirusbased surface display system for recombinant proteins. **Journal of General Virology**, 84:2023-2031, 2003.

RANDO, F.; ANDRADE, T.L.S.M.; PASSOS, K.J.R.; GASPAR, V.P., PATTARO JÚNIOR, J.; CANEZIN PEDRO, H.; FERNANDEZ, M.A. kin17 stress protein detection in *Bombyx mori* L. larval tissues. In: XL ANNUAL MEETING OF BRAZILIAN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY SOCIETY. **Resumos...** Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011. 04p.

SCHOESER, M. **Silk**. New Haven and London: Yale University Press, 2007. 256p.

SEAB. SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO PARANÁ. **Relatório Takii – Perfil da sericicultura no Estado do Paraná - Safra 2012/13**. p. 7-10. Disponível em: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/Sericicultura\\_2012\\_13.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/Sericicultura_2012_13.pdf). Acesso em: 23, setembro, 2014.

SNODGRASS, R.E.; EICKWORT, G.C. **Principles of insect morphology**. Cornell University Press, New York. 1993. 768p.

STEINER, T.; KAISER, J.T.; MARINKOVIC, S.; HUBER, R.; WAHL, M.C. Crystal structures of transcription factor NusG in light of its nucleic acid- and protein-binding activities. **The EMBO Journal**, 21:4641-4651, 2002.

SUMNER, P.E.; SUMNER, S.A. **Comparison of new drift reduction nozzles**. St. Joseph: ASAE, 1999.17p.

TEMPLE, J.H.; POMMIREDDY, P.L.; COOK, D.R.; MARCON, P.; LEONARD, B.R. Susceptibility of selected lepidopteranpests to Rynaxypyr, a novel insecticide. **The Journal of Cotton Science**, 13: 23-31, 2009.

TOLEDO, J.O.A. **Eficiência da utilização do alimento e desempenho do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) sob diferentes temperaturas e do manejo de alimentação.** Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 1996. 145p.. Tese (Doutorado em Zootecnia).

TOMITA, M.; MUNETSUNA, H.; SATO, T.; ADACHI, T.; HINO, R.; HAYASHI, M.; SHIMIZU, K.; NAKAMURA, N.; TAMURA, T.; YOSHIKATO, K. Transgenic silkworm produce recombinant human type III procollagen in cocoons. **Nature Biotechnology**, 21:52–56, 2003.

TSAI, M.; ELGETHUN, K.; RAMAPRASAD, J.; YOST, M.G.; FELSOT, A.S.; HEBERT, V.R.; FENSKE, R.A. The Washington aerial spray drift study: modeling pesticide spray drift deposition from an aerial application. **Atmospheric Environment**, 39:6194-6203, 2005.

WANG, X.; HU, X.; DALEY, A.; RABOTYAGOVA, O.; CEBE, P.; KAPLAN, D.L. Nanolayer biomaterial coatings of silk fibroin for controlled release. **Journal of Controlled Release: Official Journal of Controlled Release Society**, 121:190-199, 2007.

WESSEL, D.; FLUGGE, U.I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. **Analytical Biochemistry**, 138:141-143, 1984.

YAMAMOTO, T. **Silkworm strains**. Tokyo: N. Nakatsuji, 2000. 342p.

YANG, H.P.; L.S.J.; LI, Y.N.; ZHANG, Y.Z.; ZHANG, Z.F. Identification and characterization of the DNA replication origin recognition complex gene family in the silkworm *Bombyx mori*. **Bioscience Reports**, 31:353–361, 2011.

ZENG, T.; GAO, H.; YU, P.; HE, H.; OUYANG, X.; DENG, L.; ZHANG, Y. Up-regulation of kin17 is essential for proliferation of breast cancer. **PLoS ONE** 6:e25343, 2011.

ZHANG, Y.; CHEN, J.; LV, Z.; NIE, Z.; ZHANG, X.; WU, X. Can 29 kDa expressed by silkworm pupae bioreactor bring into effect as active cytokine through orally administration. **European Journal of Pharmaceutical Science**, 28:212-223, 2006.

ZUROVEC, M.; YANG, C.; KODRÍK, D.; SEHNAL, F. Identification of a novel type of silk protein and regulation of its expression. **The Journal of Biological Chemistry**, 25:15423-15428,1998.