

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ALEX SANDRO GULARTE CHIARELLO

**Controle do Amarelidão em Cultivo de *Bombyx mori* L.**

Maringá  
2019

ALEX SANDRO GULARTE CHIARELLO

**Controle do Amarelidão em Cultivo de *Bombyx mori* L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Fernandez  
Co-orientador: Dr. Jose Luis Conceição da Silva

Maringá  
2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)**

C532c Chiarello, Alex Sandro Gularte  
Controle do amarelidão em cultivo de *Bombyx mori* L.  
-- Alex Sandro Gularte Chiarello. -- Maringá, 2019.  
76 f. : il., color., figs., tabs.

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

Co-orientador(a): Prof. Dr. José Luis Conceição da  
Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de  
Concentração: Biologia Celular e Molecular, 2019.

1. *Bombyx mori* 2. Catepsina. 3. *Bombyx mori*  
nucleopolyhedrovirus. I. Fernandez, Maria Aparecida,  
orient. II. Silva, José Luis Conceição da, coorient.  
III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular - Área de Concentração: Biologia  
Celular e Molecular. IV. Título.

CDD 21.ed. 638.2

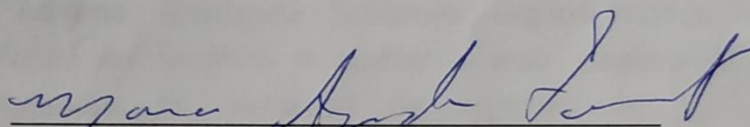
AHS-CRB-9/1065

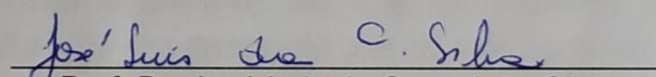
ALEX SANDRO GULARTE CHIARELLO

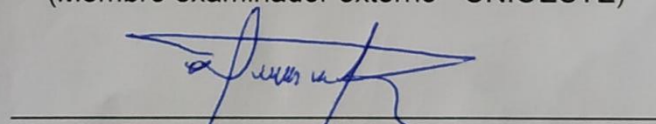
CONTROLE DO AMARELIDÃO EM CULTIVO DE *BOMBYX MORI* L.

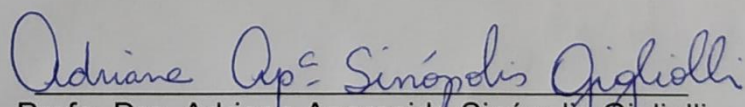
Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Maringá, sob a apreciação da seguinte banca examinadora:

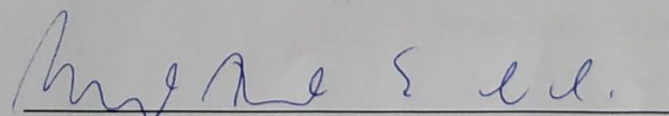
Aprovado em: 17 de janeiro de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Aparecida Fernandez  
(Presidente - Orientadora - DBC/PBC/UEM)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva  
(Membro examinador externo - UNIOESTE)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Lucinéia Fátima Chasko Ribeiro  
(Membro examinador externo - UNIOESTE)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Adriana Aparecida Sinópolis Gigliolli  
(Membro examinador - DBC/UEM)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marco Aurélio Schüler de Oliveira  
(Membro examinador - DBQ/PBC/UEM)

Maringá  
2019

## BIOGRAFIA

Alex Sandro Gularte Chiarello nasceu em Capitão Leonidas Marques/PR em 01/09/1988. Filho de Mariza Gularte e Antonio Chiarello. Mora atualmente em Maringá/PR. Casado com Polyanna Cristina Simão Saibert. Possui Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) (2012). Pós-graduação (*lato sensu*) em Docência no Ensino Superior pela Faculdade Assiz Gurgacz (FAG). Mestre em Genética e melhoramento pelo programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (2015).

## DEDICATÓRIA

À Deus, meu refúgio e fortaleza, fonte inesgotável de força e fé.

Aos meus queridos pais Mariza, Solaine, Antônio e minha querida avó Antônia pelo amor, incentivo, apoio, carinho, dedicação e ensinamentos fundamentais em minha vida.

A minha esposa Polyanna pela paciência, amor, companheirismo e compreensão essenciais para a minha conquista.

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Maringá – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Celular e Molecular, PBC, pela oportunidade da realização do curso;

A Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Fernandez, por ter me aceito como orientadora, por sua dedicação, paciência e por seus ensinamentos;

Ao professor Dr. Jose Luis pelos ensinamentos, suportes durante todos esses anos (graduação, mestrado e doutorado).

A CAPES/CNPq pelo apoio financeiro fornecido durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas de laboratório, pela convivência e pelo aprendizado;

Agradeço em especial aos meus amigos de laboratório, Grazielle, Alana, Jully, Letícia, Roger, Daniel, Lorena, Quirino, Francisco, José Renato, Roxelle, Verônica, Fabiana, Douglas pela troca de conhecimentos e ajuda durante a execução do trabalho;

Aos técnicos Valmir e Marli, pela ajuda auxiliar e essencial;

A todos os professores e funcionários do programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biologia Celular e Molecular, que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação e/ou realização dos trabalhos;

A todos os colegas do PBC pelos momentos de aprendizado, descontração e colaboração durante o curso;

A todos que de alguma forma, contribuíram para a realização dos meus trabalhos, obrigado.

## APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta de dois artigos científicos. O primeiro artigo trata-se de uma revisão redigido conforme a revista *Insects*, fator de impacto 1,848. O segundo artigo foi redigido de acordo com a revista *Animal Genetics*, fator de impacto 1.815. As duas revistas são classificadas no Qualis CAPES CBI como B2.

### **1 – Poliedrose nuclear: métodos alternativos para o de controle do *BmNPV***

Alex Chiarello e Maria Fernandez\*

Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 87020-900, Paraná, Brasil.

### **2 - Avaliação de parâmetros biológicos e produtivos de lagartas de *Bombyx mori* L. submetidos ao tratamento com o fármaco Bm5 após serem infectadas com o baculovirus *BmNPV***

A.S.G. Chiarello<sup>1</sup>, G.M. Pessini<sup>1</sup>, V.A. Fassina<sup>1</sup>, P.S.A. Bueno<sup>2</sup>, F.A.V. Seixas<sup>2</sup>, M.A. Fernandez<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 87020-900, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual de Maringá, campus Umuarama, Umuarama, 87506-370, Paraná, Brasil.



## RESUMO GERAL

A sericicultura é uma atividade agroindustrial que se iniciou na China a cerca de 5.000 anos. Consiste na criação do *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae), inseto produtor do casulo formado de fios de seda. Produto de alto valor agregado, destinada para a indústria têxtil e para confecção de biomateriais materiais como bandagens para curativos médicos e cosmetologia. O Brasil tem obtido visibilidade internacional na comercialização desse produto, devido a qualidade da matéria prima (casulos verdes), considerado o melhor do mundo. Por conta das condições climáticas favoráveis a sericicultura adaptou-se bem no país. Enquanto em outros países produtores o ciclo de criadas anuais gira em torno de três a quatro vezes o Brasil pode chegar até nove, favorecendo ao desenvolvimento da atividade no país. O Estado do Paraná lidera a produção nacional seguido de São Paulo e Mato Grosso.

Vários fatores são importantes para alcançar uma boa produtividade em uma atividade zootécnica entre eles o controle da temperatura, umidade e a adoção de medidas preventivas que visem o combate contra doenças. Na sericicultura, as boas práticas de cultivo são de suma importância, pois uma vez detectada o amarelidão, durante a criação, torna-se difícil o controle, acarretando sérios prejuízos.

Por conta da simplicidade da criação de *B. mori* e a baixa tecnologia do setor, a atividade está exposta a vários tipos de entomopatógenos tais como: protozoários, fungos, bactérias e vírus. As doenças virais representam uma ameaça mundial e são responsáveis pelos maiores prejuízos da indústria sericícola. Dentre os vírus que atacam o bicho da seda, o *Bombyx mori* nucleopolyhedrovírus (*BmNPV*) é o mais frequentemente detectado, entomopatógeno que causa o amarelidão. Como as lagartas se alimentam exclusivamente de folhas de amoreira (*Morus* sp.) e a infecção ocorre, principalmente, pela ingestão de folhas contaminadas com os poliedros (vírus ocluídos). No intestino médio os poliedros sofrem ação do pH alcalino liberando as partículas virais que atravessam a membrana das células colunares sendo introduzidos para o núcleo da célula. No núcleo, se utilizam da maquinaria nuclear para transcrever genes virais e a replicar o genoma, culminando na

liberação de novos nucleocapsídeos para infectar células do sistema traqueal e hemolinfa, forma primária de infecção. A secundária é caracterizada pelo transporte de partículas virais diretamente para as células do sistema traqueal e hemolinfa, onde as células epiteliais infectadas produzem o primeiro fenótipo viral, o BV, responsável por infectar outras células, culminando na sistematização da doença.

Nos estágios mais avançados da doença a lagarta começa a se liquefazer e liberar no ambiente o conteúdo leitoso repleto de poliedros, que irão servir de inóculo para infecção de outros insetos. A presença de enzimas hidrolíticas virais como a catepsina (V-Cath) e a quitinase (V-CHIA) auxiliam no processo de rompimento do tegumento e dessa forma contribuem para transmissão horizontal da infecção.

Nessa área de aplicação, esta tese é composta por dois artigos. O primeiro artigo trata-se de revisão que teve como objetivo reunir os recentes avanços e métodos alternativos relacionadas ao combate contra entomopatógenos incluindo aqueles relatados com tecnologias, com o objetivo de controlar o potencial de vírus e outros entomopatógenos. Abordamos as atuais substâncias relacionadas a assepsia de barracões, produtos naturais e sintéticos visando o combate ao vírus.

O segundo artigo, teve como objetivo fornecer dados em relação a biologia e parâmetros produtivos do *B. mori* tratados com o fármaco Bm5, composto modelado para inibir a catepsina viral, o que poderia contribuir para diminuir a transmissão horizontal do *BmNPV*.

A análise de publicações apresenta de que há uma preocupação mundial por métodos eficientes que possam integrar as atuais substâncias utilizadas para o controle e prevenção de patógenos no cultivo comercial de *B. mori* no campo. No entanto, ainda são reduzidas o número de pesquisas envolvendo substâncias que visem combater com eficiência esses agentes, sobre tudo, com relação ao controle do *BmNPV*.

Os resultados do ensaio envolvendo o fármaco Bm5, mostrou que, independentemente da aplicação da droga, ocorreu liquefação das lagartas, não reduzindo o índice de mortalidade. Este fato pode ser atribuído que a manutenção da atividade de demais enzimas hidrolíticas virais foram suficientes

para que a infecção ocorresse. Quanto aos parâmetros relacionados a produtividade, apesar de não ter sido estatisticamente diferente do controle negativo, os dados obtidos ficaram dentro dos índices de comercialização encontrados na literatura. Em conclusão para afetar a propagação da infecção do *BmNPV* é necessário um inibidor de amplo espectro para enzimas hidrolíticas virais.

Nosso trabalho reforça a necessidade de investigações intensas e seguras acerca de agentes que visem o combate a entomopatógenos, principalmente o vírus *BmNPV*.

PALAVRAS CHAVE: *Bombyx mori*; Catepsina; *Bombyx mori*  
Nucleopolyhedrovírus

## ABSTRACT

Sericulture is an agro-industrial activity that began in China about 5.000 years ago. It consists of silk-producing insect rearing, the *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). Silk is a high value product, destined for the textile industry and for making other materials like bandages for medical dressings and cosmetology. Brazil has gained international visibility in the commercialization of this product, due to the quality of the raw material (green cocoons), considered the best in the world, and the favorable climatic conditions the sericulture is adapted well in the country. While in other producing countries the cycle of annual maidens revolves around three to four times, Brazil can reach up to nine, favoring the development of the activity in the country. The State of Paraná leads the national production followed by São Paulo and Mato Grosso.

Several factors are important to achieve good productivity in a zootechnical activity including temperature control, humidity and the adoption of preventive measures aimed at combating diseases. In sericulture, good farming practices are of the utmost importance, since once the disease is detected, during breeding, it becomes difficult to control, leading to serious losses.

Due to the simplicity of creation of *B. mori* and the low technology of the sector, the activity is exposed to several types of pests such as: protozoa, fungi, bacteria and viruses. Viral diseases represent a worldwide threat and are responsible for the greatest damage to the sericulture industry. Among the viruses that attack the silkworm, the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (*BmNPV*) is the more frequently detected. As caterpillar feeds exclusively on mulberry leaves (*Morus sp.*) and infection occurs mainly by ingestion of leaves contaminated with polyhedra (occluded viruses). In the middle intestine the polyhedra undergo alkaline pH action releasing the viral particles that cross the membrane of the columnar cells being introduced into the cell nucleus. In the nucleus, they use the nuclear machinery to transcribe viral genes and replicate the genome, culminating in the release of new nucleocapsids to infect cells of the tracheal system and hemolymph, the primary form of infection. The secondary virus is characterized by the transport of viral particles directly into the cells of the tracheal system and hemolymph where infected epithelial cells produce the first viral phenotype, BV, responsible for infecting other cells, culminating in the systematization of the disease.

In the more advanced stages of the disease the caterpillar begins to liquefy and, upon dying and release in the environment the milky content filled with polyhedra,

which will serve as inoculum for infection of other insects. The presence of viral hydrolytic enzymes such as cathepsin such as (V-Cath) and chitinase (V-CHIA) help in the tegument rupture process and thus contributing to the horizontal transmission of infection.

In this area of application, this thesis is composed of two articles. The first one aimed to provide data on the biology and productive parameters of *B. mori* treated with the drug Bm5, a compound modeled to inhibit viral cathepsin, which could contribute to decrease the horizontal transmission of *BmNPV* virus.

The second article deals with a review aimed at gathering recent advances and alternative methods related to the fight against entomopathogens, including those reported with technologies, in order to control the potential of viruses and other entomopathogens. We address the current substances related to the asepsis of barracks, natural and synthetic products aimed at combating the virus.

The results in the test involving the drug Bm5 showed that, independently of the application of the drug, liquefaction of the caterpillars occurred, not reducing the mortality rate. This fact can be attributed that the maintenance of the activity of other viral hydrolytic enzymes was sufficient for the infection to occur. Regarding the parameters related to productivity, although it was not statistically different from the negative control, the results obtained were within the commercialization indexes found in the literature. In conclusion, to affect the propagation of the *BmNPV* infection a broad-spectrum inhibitor for viral hydrolytic enzymes is required.

The search in the literature showed that there is a worldwide concern for efficient methods that can integrate the current substances used for the control and prevention of diseases at the field level. However, there are still few researches involving substances that aim to combat these agents effectively, above all, in relation to the control of *BmNPV*.

Our work reinforces the need for intense and reliable investigations of agents that aim to combat entomopathogens, especially the *BmNPV* virus.

**KEYWORDS:** *Bombyx mori*; Cathepsin; *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus

# Poliedrose nuclear: métodos alternativos de controle do *BmNPV*

Alex Chiarello e Maria Fernandez\*

Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 87020-900, Paraná, Brasil

\*Autor para correspondência: mafernandez@uem.br; Tel.: + 55-44-3011-5398

Received: date; Accepted: date; Published: date

**Resumo:** A sericicultura enfrenta muitos desafios, sobre tudo, aqueles relacionados aos microorganismos que causam prejuízos na cadeia produtiva de seda. O *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (*BmNPV*) causa a poliedrose nuclear uma das doenças mais letais para as lagartas. Dessa maneira, a profilaxia é de suma importância, pois uma vez que a infecção pelo vírus se instala não existem métodos efetivos de controle, ocasionando prejuízos severos a produção. Todavia, as medidas preventivas convencionais, de desinfecção dos barracões de criação, nem sempre são suficientes para evitar a contaminação das lagartas, além do que, o uso indiscriminado de alguns produtos nesse processo pode selecionar organismos resistentes, agravando a infecção. Nesse sentido, pesquisas com aplicação de técnicas alternativas têm apresentado resultados satisfatórios quando aliadas as práticas de manejo tradicionais. Assim, essa revisão compreende artigos que apresentam os resultados de métodos e produtos alternativos que se mostraram efetivos no controle e prevenção de doenças, especialmente relacionado ao vírus *BmNPV* na sericicultura.

**Palavras Chave:** *Bombyx mori* nucleopolyhedrovírus; bicho-da-seda; Sericicultura.

---

## 1. Introdução

Descoberta a mais de 5.000 anos a seda começou a ser produzida em grande escala e comercializada na China e sua popularização foi possível devido a rotas que ligavam a Ásia e Europa. Devido a sua importância comercial, baixo custo de investimentos e a simplicidade do cultivo das lagartas, a produção de casulos tornou-se a fonte de renda para agricultores em muitos países em desenvolvimento, como China, Índia, Brasil, Vietnã e Tailândia [1]. Denominada sericicultura, a atividade consiste na criação do *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae), inseto que ao final do estágio larval secreta o fio de seda, produto de alto valor agregado, utilizado na indústria têxtil e confecção de biomateriais [2, 3, 4].

O Brasil tem adquirido visibilidade internacional na comercialização desse produto, devido a qualidade da matéria-prima (casulos), considerada a melhor do mundo [5]. Por conta das condições climáticas favoráveis, a sericicultura adaptou-se bem no país e pode ser considerada uma fonte de renda alternativa interessante para os produtores [6]. Como resultado dessa relação, o Relatório Takii [7], apresenta que os dados da produção nacional na safra 2016/2017 foi de 2,99 toneladas (t) de casulos, sendo o Estado do Paraná o maior produtor com 2,46 t, responsável por 82,5% da produção brasileira, seguido pelo Estado de São Paulo (12,6%) e do Mato Grosso do Sul (5%) [7].

Para a obtenção de uma boa produtividade vários fatores são importantes, entre eles o controle da temperatura, umidade e a adoção de medidas preventivas que visem a prevenção de doenças [8, 9]. Na sericicultura, como em outras atividade agroindustriais, as boas práticas de cultivo são essenciais, pois, controlar infecções instaladas é uma missão laboriosa e incerta, o que pode acarretar prejuízos significativos aos sericultores [10].

Essas perdas estão, na maioria das vezes, relacionadas a doenças causadas por vírus, fungos e bactérias que podem representar redução de até 20% no potencial de produção de casulos a cada ano na China, maior produtor mundial de seda, como mostra Jiang et al. [11]. Desse percentual, 80% está

relacionado a doenças virais, sendo os principais agentes o *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (*BmNPV*) [12, 13]), o vírus da poliedrose citoplasmática (*BmCPV*) [14] e o densovirus (*BmDENV*) [15]. Esses parasitas apresentam alta virulência [1, 16], sendo que o *BmNPV* é considerado a principal ameaça para a sericicultura mundial, causando o amarelidão.

Por este motivo, pesquisadores das mais variadas áreas tem buscado elucidar e compreender a interação entre patógeno x hospedeiro, analisando mecanismos de ação do vírus e resistência das lagartas, e o desenvolvimento de diferentes tecnologias com o objetivo de reduzir os efeitos que são causados pelo *BmNPV* no inseto. Embora se tenha avançado significativamente nos últimos anos, ainda existem muitas lacunas sobre essa relação.

Alguns cientistas, ainda, viram uma possibilidade interessante na associação de métodos alternativos às técnicas convencionais de manejo em campo como o uso de fármacos, uso de extratos vegetais e substâncias sintéticas na prevenção e controle da infecção viral nos barracões. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo revisar os resultados satisfatórios nessa linha de pesquisa com o objetivo de facilitar a disseminação de conhecimento sobre métodos alternativos de manejo que contribuam com a profilaxia de doenças em campo.

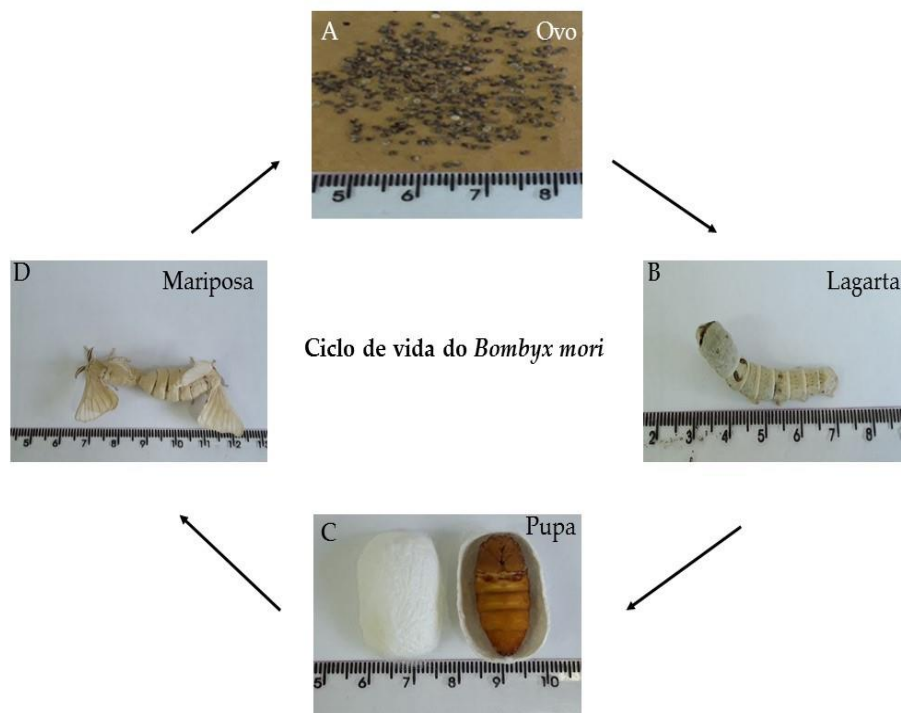
## 2. O Modelo Biológico *Bombyx mori*

O *Bombyx mori* L., Pertencente ao filo Artrópoda, classe Insecta, ordem Lepidóptera, família Bombycidae, gênero *Bombyx* [17]. Este organismo é originário da China e vem sendo domesticado aproximadamente 5.000 anos para obtenção de fios de seda, o qual é destinado para a fabricação têxtil [5, 17] e outros biomateriais [18, 19]. Além do potencial econômico, o bicho-da-seda é um modelo biológico [20, 21]. De acordo com Mita et al. [21], o inseto tem sido muito utilizado como um sistema modelo para estudos devido ao tamanho da lagarta no final do período larval, a facilidade de criação em laboratório e importância econômica da sericicultura. Esta espécie facilita os estudos de genômica comparativa levando a abordagens para controle de espécies pragas.

É aceito que *Bombyx mandarina* é o ancestral selvagem mais próximo de *B. mori* [22] sendo ambos morfologicamente e fisiologicamente similares. *Bombyx mandarina*, de ocorrência no Japão e Coreia tem 27 cromossomos, enquanto que *B. mandarina*, da China e o *B. mori* apresenta 28 cromossomos. Os dois tipos selvagens, *B. mandarina* da China e do Japão, possuem morfologia homogênea e número de cromossomos diferentes por genoma [23].

Milhares de raças de *B. mori* geograficamente distribuídas e linhagens geneticamente melhoradas são mantidas em vários países onde a sericicultura representa uma atividade expressiva [24]. De acordo com Liu et al. [23], essas linhagens se espalharam progressivamente para a Coreia, Japão, Índia, Brasil e o resto do mundo. Nessas linhagens, mais de 400 mutações foram identificadas em *B. mori* e utilizadas na conservação de recursos genéticos. Estas mutações estão relacionadas a muitos aspectos fundamentais do ciclo de vida do inseto, incluindo a formação da casca dos ovos, diapausa, alimentação, comportamento, padrões de desenvolvimento, muda, entre outros [24].

O *B. mori* é holometábolo, ou seja, apresenta metamorfose completa, sendo o indivíduo jovem completamente diferente do adulto. Este inseto apresenta quatro estádios no seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e mariposa [25], Figura 1. A mariposa desova entre 400 e 500 ovos (Figura 1A), e no período de eclosão as larvas tem cerca de 1mm de comprimento. As lagartas se alimentam exclusivamente de folhas de amoreira, vegetal com os nutrientes necessários para seu desenvolvimento [26].



**Figura 1.** Ciclo de vida do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). Após a eclosão dos ovos (A), as lagartas (B) crescem exponencialmente e tem um período desenvolvimental de cinco instares. No final do quinto instar, as lagartas tecem o casulo e as pupas tem um período de 10 dias antes da metamorfose para mariposas (C). A mariposa macho é visivelmente menor em tamanho que a fêmea (D).

Quando as larvas atingem o tamanho máximo de 70 a 80 mm de comprimento (Figura 1B), em cerca de 30 dias, passam a produzir os casulos (Figura 1C). Dentro do casulo, a larva se transforma em crisálida (pupa) e com 10 ou 12 dias, e ocorre a metamorfose em mariposa (Figura 1D). Na fase adulta do inseto, como mariposa pode-se verificar o dimorfismo sexual, sendo que as fêmeas são significativamente maiores que os machos (Figura 1D). O casulo produzido pelo inseto, do qual é extraído o fio de seda, é rico em proteínas que são produzidas por um par de glândulas chamadas sericígenas [27]. Essas glândulas ocupam um terço do corpo do inseto quando este chega ao quinto instar. Elas secretam as proteínas fibroína, sericina e p25 na forma líquida. Quando entram em contato com o ar, estas proteínas se solidificam estando prontas para formar o casulo [28].

A metamorfose ocorre através de um conjunto integrado de processos em que a larva se desenvolve e transforma-se em pupa. Durante a fase de pupa a ecdisona ativa a expressão gênica em vários tecidos larvais, como as glândulas sericígenas e pró-torácicas, culminando na morte celular programada e subsequente histólise, enquanto novas partes do adulto são formadas através da proliferação e diferenciação celular [29].

*Bombyx mori* pode ser classificado por meio de diversos parâmetros. De acordo com a distribuição geográfica e o complexo de características morfológicas e fisiológicas, como tamanho do corpo, dias de alimentação, tolerância térmica e resistência a doenças, o bicho-da-seda pode ser classificado como de origem japonesa, chinesa, européia ou indiana [24]. Também, quanto ao número de criadas anuais, voltinismo representado na Tabela 1. [25].



**Tabela 1** - Classificação de *Bombyx mori* de acordo com o voltinismo

Classificação	Sob condições normais	Clima
Monovoltino	Produz somente uma geração ao ano, com grande quantidade e qualidade de seda.	Por ser mais adaptável ao frio, o ciclo larval é mais longo e o corpo é maior, porém menos resistente a doenças e umidade
Bivoltino	Produz duas gerações por ano, o ciclo larval é mais curto e o tamanho do casulo é menor que os Monovoltinos.	Esta raça é mais resistente ao calor e por isso também é a mais utilizada por sericultores em maior frequência.
Polivoltino	Repetição da produção maior que três ao ano	As larvas têm boa resistência ao calor e ao clima tropical, porém o casulo é menor e o teor de seda é baixo

Em uma parceria entre pesquisadores japoneses e chineses foi desenvolvido um consórcio genômico internacional ([http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/lep-genome/new\\_lepgenome.htm](http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/lep-genome/new_lepgenome.htm)) com o objetivo de promover a cooperação no sequenciamento gênico de *B. mori* e de outros lepidópteros de interesse econômico. Os dados referentes ao estudo disponibilizados em 2004, quando foram publicados os primeiros rascunhos das sequências genômicas do bicho-da-seda, cobrindo mais de 90% dos genes conhecidos deste inseto [20, 21]. Estudos recentes com *B. mori* estão sendo direcionados na busca de raças puras e híbridos resistentes ou tolerantes ao nucleopolyhedrovírus, uma vez que a infecção das lagartas provoca perdas consideráveis na economia sericícola [1, 27].

### 3. Importância da Sericultura

A sericultura é a atividade agropecuária de criação do bicho-da-seda para obtenção de casulos destinados à produção de seda. Prática que inclui o cultivo da amoreira, a produção dos ovos do bicho-da-seda, criação das lagartas até a produção dos casulos e, finalmente, fiação e confecção da seda por parte do setor industrial. Atualmente, a sericultura é a principal fonte econômica para mais de 30 milhões de famílias em vários países como a China, Índia, Vietnã e Tailândia, e não é diferente para Brasil, uma vez que esta atividade contribui para o desenvolvimento sustentável do país, por meio da inclusão social, ao proporcionar trabalho no campo, com a criação do bicho-da-seda e o cultivo da amoreira, e na cidade, com a indústria de fiação e o comércio. Portanto, a atividade da sericultura proporciona importantes aspectos socioeconômicos: é uma cultura alternativa, gera produto de exportação, fixa o homem no campo, apresenta pouca dependência climática, tem pequeno custo de produção, além da racionalização da mão-de-obra [30].

Em termos de produtividade a China aparece em primeiro lugar com 82% (146 mil toneladas de seda), seguida por Índia com 16% (28,7 mil t) Uzbequistão, Tailândia e Brasil com respectivamente 0,62% (1,1 mil t); 0,39% (692 toneladas) e Brasil com 0,31% e 560 toneladas. Ainda são produtores Vietnã, Coreia do Norte e Turquia [7]. Os principais consumidores de seda do mundo são; Estados Unidos, Itália, Japão, Índia, França.

Apesar de ocupar o quinto lugar na produção mundial de seda, o Brasil ganha destaque em termos de qualidade, devido ao sistema integrado de produção, que padroniza todas as operações e insumos ao longo da cadeia produtiva, diferentemente de outros países produtores, que utilizam grande número de variedades de amoreira e diversas raças de bicho-da-seda [31]. Ainda, as condições climáticas são favoráveis ao cultivo tanto da amoreira quanto do inseto, fazendo com que a produção de casulos seja considerada uma boa alternativa para os produtores [6].

Na safra 2016/2017 o Brasil obteve uma produção total de cerca de 2,99 t de casulos verdes, sendo o estado do Paraná o maior produtor com 2,46 t de casulos verdes, perto de 83% do total, seguido dos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, representam 13 e 5% do total. Conforme a Secretaria da Agricultura e Abastecimento – SEAB (2017) o número de sericultores no estado do Paraná é de 1.867, com 2.017 barracões e 3.966 ha de área cultivada com amoreira. O município de Nova Esperança continua como o maior produtor do estado onde a atividade é exercida por 141 sericultores que equivale a 23% do total do estado, em 239 barracões, numa área de 541,39 ha, 326.942 kg de casulos verdes (*in natura*) com produtividade média de 604 kg/ha [7].

#### 4. Patologias que trazem prejuízos à sericultura

Os desafios para produção de casulos no Brasil e no mundo estão relacionados a disseminação de infecções no ambiente de criação, as quais tem causas multifatoriais [32]. Fatores bióticos e abióticos exercem papel importante na prevenção e controle dessas doenças.

Dentre os fatores abióticos estão condições climáticas, falta de higiene nos barracões, a não utilização de desinfetantes nas lagartas, barracão de produção fora dos padrões apropriados, acesso livre de pessoas ou outros animais as instalações produtivas e de armazenagem das amoreiras [33] e os fatores bióticos como a grande concentração de lagartas em ambiente fechado, a alta produção de resíduos orgânicos, ciclo biológico curto que limita o tempo de combate à doença e a ausência do controle dos micro-organismos presentes na amoreira [10]. Em geral os patógeno do bicho-da-seda penetram ou pela boca ou pelo tegumento das lagartas [17].

Entre os agentes etiológicos que estão frequentemente relacionados a patologias de *B. mori* estão protozoários, fungos, bactérias e vírus que podem contaminá-lo durante seus diferentes estádios de desenvolvimento [34], fato agravado pelas condições de cultivo no campo também propiciarem a proliferação desses patógenos.

As doenças fúngicas são comuns no ambiente de produção e são corriqueiramente provocadas por *Bauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* causando a calcinose branca e a calcinose preta respectivamente, o contágio se dá através do contato direto entre as lagartas ou pelo contato com folhas contendo esporos [35]. Os sinais apresentados pelos insetos são a perda de apetite, seguido de vômitos e às vezes diarreia. Na medida em que a doença avança o corpo da lagarta vai se irrigecendo [35]. A lagarta morta por essa infecção conserva a sua forma, porém, fica mumificado [17].

Outro grupo de entomopatógenos importantes para o bicho-da-seda são as bactérias, com destaque para *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus itálico*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus Faecium* e *Hafinnia* sp, estes organismos causam a doença chamada de flacidez bacteriana [17, 36], devido à natureza flácida da lagarta infectada, e a contaminação ocorre por via oral através da ingestão de folhas de amoreira, contendo a bactéria, ou por ferimento no tegumento [37, 38]. Em geral os sinais estão relacionados a natureza do patógeno que acomete a lagarta, mas de maneira geral os insetos infectados apresentam inapetência, inatividade e, às vezes, vomitam o suco intestinal podendo culminar na morte da lagarta.

Quando acometidos por protozoários esses insetos podem desenvolver pebrina, conhecida como diarreia do bicho-da-seda, tendo como principal agente causador o *Nosema bombycis*. O contágio pode ocorrer durante a oviposição feita por mariposas doentes ou pela ingestão de alimentos contaminados [17, 39]. Os sintomas desta doença podem ser observados em todos os estágios de vida do bicho-da-seda: no ovo percebe-se pouca aderência, falta de uniformidade, morto ou não fertilizado; na lagarta, há pouco apetite, crescimento e desenvolvimento retardados, apresentando manchas escuras sobre o tegumento, a pele apresenta-se pálida e translúcida; a pupa apresenta a área abdominal mole, inchada e mais escura; na mariposa aparecem manchas escuras maiores, abrangendo os segmentos das asas e a parte final do abdômen [39].

Embora os agentes citados acima sejam responsáveis por causar uma série de agravos, os vírus representam a principal ameaça para a sericultura mundial [40], sendo o *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (*BmNPV*) o baculovírus que causa as principais perdas na indústria sericícola [16, 40]. Na Índia os prejuízos relacionados a patógenos virais, gira em torno de 15% a 20%, dos quais

70% estão associados ao *BmNPV* [41], na China até 80% dos casos são relacionados e esse vírus [1] e no Brasil estima-se que esse número esteja em torno de 70% [5].

A principal rota de contágio ocorre pela ingestão de folhas de amoreira (*Morus sp*) contaminadas com os poliedros [1]. Durante o ciclo infeccioso os vírions estão presentes em dois fenótipos diferentes sendo eles: vírus ocluídos – *occlusion derived virus* (ODV) formados no núcleo das células infectadas e consistem em um único nucleocapsídeo (SNPV) ou múltiplo (MNPV), os quais são responsáveis pela infecção primária e entre os hospedeiros. O vírus broto – *Budded virus* (BV) realiza a infecção sistêmica no inseto [42, 43]. Cada BV consiste num único nucleocapsídeo contido em um envelope derivado da membrana plasmática de uma célula hospedeira.

Uma vez no lúmen do intestino da lagarta, os cristais poliédricos (OBs) sofrem ação do pH alcalino onde ocorre a liberação das partículas virais, os ODVs [44, 45], os quais atravessam a matriz peritrófica através de fusão de membrana [31, 32]. Dentro das células, os nucleocapsídeos são direcionados para o núcleo através dos filamentos de actina, entrando pelos poros nucleares, em seguida é iniciando a transcrição dos genes virais e a replicação do genoma [45]. Posteriormente, os nucleocapsídeos recém-formados migram para o citoplasma e brotam pela membrana plasmática sendo então envelopados individualmente, dando origem as partículas virais denominadas de BVs [46], que infectam célula a célula e são responsáveis pela infecção sistêmica, secundária, dos tecidos da lagarta [47, 48].

Nos lepidópteros infectados com o baculovirus leva a uma série de mudanças comportamentais e morfológicas resultando na morte da larva após alguns dias. Estas transformações começam a ser evidenciadas entre o terceiro e quarto dia após infecção, quando ocorre a redução na alimentação, alteração na coloração do tegumento, movimentações irregulares, retardamento do crescimento do inseto, que por vezes não chega a fazer muda [49, 50].

Decorridos quatro dias da infecção, as lagartas começam a apresentar uma cor branco-amarelada do tegumento do inseto, que se intensifica a medida que a doença avança. Ao morrer, ocorre rompimento do tegumento, devido a fragilidade do mesmo, fato que contribui para a liberação de grande quantidade de poliedros no ambiente, servindo de inoculo para outras populações subsequentes de lagartas, representando a infecção horizontal [49, 50]. Sabe-se, que os baculovirus produzem algumas proteínas que auxiliam no processo infectivo. Dentre elas, a quitinase e uma cisteíno-protease [51], enzimas hidrolíticas virais que são secretadas na fase tardia da infecção celular e acumulam-se na larva hospedeira à medida que a infecção progride. Elas agem, provavelmente, na dissolução dos tecidos do inseto, e em particular da cutícula larval, que se rompe após a morte do hospedeiro, liberando os poliedros no meio [52, 53].

Os membros da família Baculoviridae são reportados numa série de invertebrados [54, 55, 56, 57, 58, 59, 60] dos quais as ordens Diptera, Lepidoptera e Hemiptera tem essa relação parasita x hospedeiro melhor estudada [42]. Estes virus possuem genoma de fita dupla de DNA, de cerca de 80 a mais de 180 kb, que são circulares e superenrolados, e codificam entre 90 e 180 genes. Destes genes, um conjunto comum de cerca de 30 genes homólogos foi identificado, e há provavelmente outros que não podem ser reconhecidos devido à extensão das mudanças incorporadas ao longo do tempo [42]. De acordo com a classificação os baculovirus são divididos em quatro gêneros: Alphabaculovirus, Betabaculovirus, Deltabaculovirus e Gammabaculovirus [60]. Sendo os vírus dos Lepidópteros divididos em Alpha e Betabaculovirus, abrangendo os nucleopolyhedrovirus (NPVs) e granulovirus (GVs) [42]. Os NPVs são divididos em dois grupos: grupo I, que usam gp64 como sua proteína de fusão com BV e grupo II não possuem gp64, utilizam uma proteína chamada F [61].

Uma peculiaridade desse grupo de vírus é a presença em corpos de oclusão chamados de poliedros nos NPVs, a qual é constituída de uma matriz cristalina composta por uma proteína denominada poliédrica [62]. Essas estruturas são altamente estáveis conferindo às partículas virais resistência na maioria das condições ambientais e prolongando sua capacidade infecciosa, assim contribuindo para a transmissibilidade horizontal [63].

A detecção do *BmNPV* é necessária para que os produtores possam realizar as medidas de manejo adequadas para minimizar os prejuízos associados a doença viral. Sabe-se que os surtos de doenças são impulsionados pela quantidade de inóculo inicial e pela taxa de transmissão. Nesse sentido, alguns

métodos são citados na literatura com esse objetivo, dentre eles, a utilização de microscopia, através de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) [64], ensaios imunoenzimáticos - ELISA [65], transfecção de DNA viral [66], imunoensaio de fita coloidal baseada em corante têxtil [67], dentre outros. A dificuldade de se quantificar focos de infecção viral inicial em um cultivo é difícil e tentativas de se estimar esses parâmetros são atualmente propostas [41]. Quando as lagartas apresentam os sinais externo, a infecção já está muito avançada, sendo de difícil controle.

## 5. Imunidade inata em insetos e o modelo *Bombyx mori*

O grande sucesso dos insetos nos mais variados ambientes até mesmo repletos de competidores se dá pelo sistema imunológico de defesa inato. O sistema imunológico inato representa uma defesa contra partículas e/ou organismos estranhos, combatidos com mecanismos ou barreiras estruturais e fisiológicas, matriz peritrófica [68, 68, 70]. Mecanismos químicos, físicos ou biológicos representam a primeira linha de defesa dos insetos contra patógenos [71].

Quando estas barreiras são rompidas, os micro-organismos atingem a hemocele, desencadeando outros mecanismos complexos ativados, a fim de combater a entrada de um patógeno. Estes mecanismos alternativos são conhecidos como resposta celular e humoral [72].

As respostas celulares envolvem fagocitose, nodulação, encapsulação e citotoxicidade, guiadas por hemócitos celulares livres circulantes na hemolinfa, e a eficiência desta defesa é diretamente proporcional ao número e ao tipo de hemócitos relacionados a este mecanismo [73]. Essa resposta pode ser direta por encapsulação ou fagocitose ou ainda indireta, envolvendo serino-proteases e vias de sinalização intracelular imune que conduzem os peptídeos antimicrobianos - *Antimicrobial Peptide* (AMPs), que podem ser as lisozimas [74, 75].

A resposta humoral é efetivada por AMPs produzidos pelo corpo gorduroso da lagarta e liberados na hemolinfa, ativando uma complexa cascata proteolítica que leva a coagulação e a mineralização da hemolinfa [76, 77, 69]. Os peptídeos antimicrobianos são amplamente distribuídos nos organismos vivos desde os procariotos até os eucariontes superiores [78], sendo classificados como peptídeos de baixo peso molecular, pois possuem massa entre 2 a 5 kDa, ativados contra micro-organismos que invadem a hemolinfa [79].

Estudos têm sido realizados a fim de mostrar a eficiência dos AMPs frente aos corpos estranhos presentes na hemolinfa, pois esta alternativa se torna uma ferramenta no combate a micro-organismos resistentes a antimicrobianos [80]. Sabe-se que os micro-organismos demoram um tempo maior para desenvolverem resistência aos AMPs, levando a crer que estas moléculas são candidatas a antibiótico natural [81]. No modelo biológico *Drosophila melanogaster*, os mecanismos dos patógenos e ativação de vias de sinalização e regulação da expressão dos peptídeos de defesa são bem conhecidos [82]. Em *Bombyx mori* resistentes, alguns AMPs específicos de lepidópteros (gloverina-1, 2, 3, lebecina, cecropina, attacina e lisozima) foram encontrados como induzidos pela infecção por *BmNPV* em bichos-da-seda resistentes e suscetíveis [83, 84].

Nos fluídos corpóreos dos insetos, existe uma variedade de fatores de defesa humoral, naturais ou induzíveis, sendo as defesas naturais constituídas por aglutininas, lisozimas, outras lisinas, bactericidas, enzimas lisossomais e fatores de imobilização. Após poucas horas da injeção de antígeno, os fatores induzíveis são verificados e estão envolvidos no reconhecimento de partículas estranhas. Logo que há o reconhecimento de algum patógeno, as respostas de defesa são ativadas a fim de garantir a morte dos micro-organismos e a homeostase do sistema [40].

Lipídios na epicutícula no *Bombyx mori* atuam inibindo a invasão de fungos como *Beauveria bassiana* [85]. Danos na cutícula estimulam a síntese de peptídeos antibacterianos pelas células epidérmicas [86]. O conhecimento das respostas imunológicas desencadeadas pelos insetos pode fornecer informações valiosas para o delineamento de novas formas de controle biológico. A compreensão sobre a organização e regulação do sistema imune dos insetos tem sido ampliado, sobretudo devido a estudos relacionados a caracterização e a purificação de peptídeos antimicrobianos produzidos em resposta a infecções causadas por bactéria ou fungos e vírus em várias espécies de insetos, como as lagartas *Manduca sexta*

[87], *Galleria mellonella* [88] e o mosquito *Aedes aegypti* [89], juntamente com as informações genéticas sobre *Drosophila melanogaster* [90] e *Bombyx mori* [40].

Estas informações levaram ao reconhecimento de que os insetos possuem um sistema capaz de reconhecer um patógeno e ativar um complexo de moléculas sinalizadoras e, a partir de sinais gerados por este processo, coordenar a expressão de vários genes ou reprimir a expressão de alguns genes. Em alguns representantes da ordem Lepidóptera, o sistema imune é bem caracterizado, principalmente em *Bombyx mori*, *Manduca sexta*, *Galleria mellonella* e *Spodoptera frugiperada*. Para essas espécies, foram descritos AMPs [40].

A grande maioria dos trabalhos envolvendo a imunidade inata dos insetos tem se concentrado em infecções bacteriana ou fúngicas [74, 79]. Mais recentemente, os estudos têm avançando sobre o mecanismo de defesas de insetos contra vírus [40]. As principais respostas conhecidas nos insetos são medidas por RNA de interferência (RNAi) que, por meio do sistema enzimático Dicer2/R2D2, produz siRNAs que inibem a replicação viral [91] e através da morte celular programada, acredita-se, desempenhar um papel fundamental no mecanismo de defesa animal contra a infecção viral [92]. Foi confirmado que algumas espécies de lepidópteros eliminaram as células do epitélio intestinal infectado através da apoptose seletiva e, portanto, resistiram a infecção por baculovírus [93].

Adicionalmente, a análise de expressão de genes relacionados à resistência ao *BmNPV* em linhagens resistentes de *B. mori* apontam para proteínas que poderiam estar envolvidas no mecanismo de defesa contra o vírus. Contudo, o mecanismo permanece pouco esclarecido [94, 40]. A compreensão das respostas imunes inatas dos bichos-da-seda contra vírus fornece informações essenciais para o estabelecimento de métodos eficazes de controle de vírus. Entretanto, o controle de infecções virais pode ser afetado com medidas profiláticas.

## 6. Manejo e soluções alternativas de controle do *BmNPV*

As medidas preventivas são de suma importância à atividade sericícola, visto que, os insetos são susceptíveis aos patógenos e o controle das doenças após infecção é difícil, acarretando prejuízos consideráveis ao setor. Para isso, o barracão de criação das lagartas (sirgaria), deve ser localizado em ambiente seco e com boa ventilação, evitando a proximidade com locais insalubres ou passíveis de contaminações. Além disso, é recomendado aos produtores que executem um plano de controle com medidas que evitem a entrada dos principais vetores nos barracões, organizando as instalações para prevenir a entrada de insetos, anfíbios, roedores, aracnídeas e aves [10].

A desinfecção prévia do local de criação deve ser criteriosa, durante o cultivo e na ausência das lagartas, já que patógenos se alojam nos locais de criação e equipamentos [35]. Esse manejo tem por finalidade eliminar ou baixar ao máximo o potencial de infecção das doenças, evitando seu aparecimento e impedindo a disseminação das pragas [10]. Todavia, alguns métodos para a desinfecção são recomendados tais como: desinfecção com solução de formol a 3% pulverizada no local e em todos os equipamentos utilizados [95]. Aplicação de cal no piso antes de iniciar a criação [31]. Porém, mesmo tomados as medidas preventivas de profilaxia ainda há contaminação por micro-organismos [96]. Isso porque o uso indiscriminado ou frequente de algumas substâncias pode levar a seleção de organismos resistentes. Nesse contexto, são necessários métodos alternativos e ou combinação de métodos que visem o combate aos patógenos de maneira eficiente e que não representem risco de saúde aos produtores, e afetem a biologia das lagartas.

Diante disso, estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar produtos, naturais e sintéticos, com propriedades antimicrobianas, para integrar ao manejo tradicional como medida de prevenção e controle de eventuais doenças ocasionadas por estes patógenos, bem como, os efeitos relacionados à produtividade das lagartas tendo em vista sua importância econômica. Algumas formulações foram testadas e seus efeitos, diretos ou indiretos, relatados.

### 6.1 formulações para controle de doenças do bicho-da-seda

Produtos sintéticos são amplamente utilizados na sericultura, no entanto, pesquisadores relatam que o uso contínuo de uma substância pode levar ao aparecimento de microrganismos resistentes.

Nesse contexto, Porto e Okamoto [97] realizaram teste com o desinfetante (cloreto didecildimetilamônio) composto com efeitos ativos contra bactérias, fungos e vírus. No experimento foram realizadas três diluições (1mL do produto/1000 mL de água, 1mL/ 550mL e 1mL/100mL) e comparado a um controle (água), sendo cada tratamento aplicado em dois locais distintos: na superfície da folha de amoreira, antes de ser fornecida às lagartas e diretamente no tegumento das lagartas, antes do trato. Os resultados observados mostraram que o tratamento onde o desinfetante foi aplicado na sua forma mais diluída (1/1000), tanto na folha quanto na lagarta, não trouxe efeitos nocivos ao bicho-da-seda e ao casulo produzido.

Outro produto testado é a calda bordalesa, usado como fungicida agrícola permitido na agricultura orgânica por ser o sulfato de cobre um produto pouco tóxico. Fernandes et al. [98] estudou o efeito da solução contra fungos e o *BmNPV*. O experimento foi conduzido em dois períodos, outono e primavera, as lagartas foram alimentadas com folhas de amoreira enriquecidas com solução aquosa de calda bordalesa nas concentrações de 5, 10 e 20%. Os resultados revelaram redução de 55,1% nas UFC presentes nas folhas de amoreira no período do outono, utilizado solução 5% de calda bordalesa. Neste mesmo período, verificou-se redução da UFC de 28,5, 74,9 e 74,4%, no tegumento de *B. mori*, quando utilizados soluções de 5, 10 e 20% de calda bordalesa, respectivamente, em relação aos dados obtidos no grupo controle. No caso do *BmNPV*, verificou-se que a solução de 10% de calda bordalesa promoveu maior resistência à infecção viral, possivelmente favorecendo a ativação de mecanismos de defesa dos insetos. Sendo assim, os pesquisadores concluem que a utilização da calda bordalesa pode ser considerada uma alternativa viável para o controle de doenças fúngicas e virais na sericultura.

#### 6.2 Efeito da combinação sinérgica de compostos químicos com extratos vegetais

Para Rassol et al. [99] uma maneira de tornar o manejo mais eficiente seria a combinação de compostos. Nesse sentido, realizaram um experimento mesclando desinfetantes químicos, já conhecidos na sericultura tais como: cal, captan, bavistin e vijetha com casca de noqueira, cinza de madeira e açafraão em pó. No experimento o composto químico vijetha serviu como controle positivo. A combinação (cal + captan + casca de noqueira) apresentou resultados quase semelhantes ao observado no controle positivo, sendo que houve diferença significativa na incidência de poliedrose entre os outros tratamentos. Não obstante, além da incidência relativamente baixa de poliedroses nos lotes tratados com essa formulação referida, refletindo a melhor ação de desinfecção de casco de noqueira em combinação com cal e captan. Isso também pode ser atribuído ao fato que aleloquímicos e outros compostos fenólicos presentes no vegetal atuarem contra o vírus, de modo que os bichos-da-seda tiveram maior sobrevivência.

Embora a maior porcentagem de sobrevivência (45,00%) tenha sido registrada no tratamento com o vijetha, entre as combinações preparadas, a formulação (cal + captan + casco de noqueira) forneceu a porcentagem de sobrevivência de 40,23% que foi significativamente superior ao restante das combinações preparadas, ainda, os pesquisadores relatam que este tratamento não deixou qualquer toxicidade residual permitindo assim que as lagartas pudessem continuar seu crescimento e desenvolvimento, sem qualquer efeito adverso [99].

Resultados semelhantes ao observado por Rassol et al [99] foram demonstrados por Mahalingam et al. [100] no qual observou redução na mortalidade de lagartas infectadas com o *BmNPV* ao tratar as larvas com um agente químico denominado de Tnau e extrato de *Psoralea*. Ainda no experimento, foi observado que as lagartas que receberam o tratamento apresentaram um bom desempenho no peso do casulo, peso da casca sérica e teor de seda. Posteriormente, os testes foram realizados em campo onde novamente houve redução na mortalidade das larvas e a melhora nos parâmetros econômicos e produtivos do bicho-da-seda.

#### 6.3 Extratos vegetais

O desenvolvimento de resistência viral contra agentes antivirais aumenta a necessidade de novos compostos eficazes contra infecções virais. Plantas medicinais têm uma variedade de constituintes químicos, capazes de inibir o ciclo de replicação de vários tipos de vírus de DNA ou RNA . Panizzi e Parra

[101] citaram, como principais classes de compostos secundários envolvidos nas interações plantas x animais, os compostos nitrogenados (alcaloides, aminas, aminoácidos, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos), os terpenóides (monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, saponinas, limonóides, cucurbitacinas, cardenólídeos e carotenóides), os compostos fenólicos (fenóis simples, flavonóides e quinonas) e os poliacetilenos. Conforme Jassin e Naji [102], dentre outras funções metabólicas, estes compostos podem inibir micro-organismos. Além disso, a facilidade da elaboração de preparados faz com que a cada dia surjam novas receitas e aplicabilidades.

Nesse contexto, Manimegalai et al. [103] conduziram experimentos com três raças de bicho-da-seda infectados com o baculovirus e tratado com extrato de plantas. Os resultados obtidos revelaram que 800 ppm de extrato de folhas de *Psoralea corylifolia*, *Plectranthus amboinicus* e gentamicina (50 ppm) são eficazes contra *BmNPV* registrando menor mortalidade larval. Além disso, os parâmetros econômicos, do grupo tratado apresentaram valores similares de peso larval, peso do casulo, peso da casca sérica e o teor de seda encontrado no controle (não infectado). O isolamento de princípios ativos a partir do extrato hexânico de *P. corylifolia* revelou duas frações que possuem propriedades antivirais que posteriormente foram purificadas usando cromatografia líquida de alta performance (HPLC), e a caracterização destas frações purificadas foi realizada por espectroscopia de massa de cromatografia líquida (LCMS) o que revelou a presença de dois compostos flavonóides, bakuchicin e bavacoumestan, com propriedades antioxidantes e antimicrobianas.

O efeito antiviral destes compostos pode ser devido à sua capacidade de formar complexos com DNA viral, alterando o pH intestinal inativando as partículas infecciosas ou bloqueando os poros na matriz peritrófica. A afinidade dos compostos de *Psoralea* pelo ácido nucleico foi demonstrada por Scott et al. [104], Song e Tapley [105]. Mason e Wasserman [106] atribuem que, o mecanismo por trás da toxicidade fenólica para micro-organismos é devido a inibição enzimática por compostos oxidados, possivelmente através da reação com o grupo sulfidril ou através de uma interação mais específica com as proteínas. O rompimento das membranas microbianas pelos flavonóides foi relatado por Tsuchiya et al. [107].

Para Ya et al. [108] o modo de ação do fenol está relacionado com a capacidade de compostos vegetais inativarem a adesão microbiana, enzimas, envelope, proteína transportadora formando complexos com polissacarídeos. Felton e Duffey [109] relataram que a clorogenoquinona, um poderoso agente oxidante que se liga covalentemente aos corpos de oclusão do NPV reduzindo significativamente a solubilidade, enfraquecendo a liberação dos virions infecciosos no intestino médio.

Da mesma maneira, Porto et al. [33] testaram extrato de *Mirabilis Jalapa* (família: Nyctaginaceae), conhecida como “quatro horas”, cujo a composição é rica em compostos ativos incluindo triterpenos, proteínas, flavonóides, alcaloides [110], com destaque para o grupo proteico chamado *Mirabilis* Antiviral Proteínas (MAPs) que contêm as Proteínas de Inativação Ribossômica - *Ribosomal Inactivation Proteins* (RIPs) atuam bloqueando a síntese de proteínas [111].

No experimento, Porto et al. [33] verificou que em condições de laboratoriais o extrato *M. jalapa*, na concentração de 10%, sobre o controle do vírus da poliedrose (*BmNPV*), conferiu entre 90 e 100% de proteção ao inseto. A pesquisa foi estendida para o local de criação (sirgarias). E os resultados mostraram que tanto em condições de laboratório como em condições de criação comercial o extrato não causou alterações na biologia e produção do bicho-da-seda, quando comparado com grupos controle. Embora os insetos estivessem infectados com NPVBm, não foram observados sintomas de infecção, sugerindo que a população viral, apesar de presente, foi mantida em níveis reduzidos não afetando o desempenho produtivo.

Latha et al. [112] realizaram experimentos com *Adathoda vasica*, *Bougainvillea spectabilis*, *Phyllanthus niruri*, *Terminalia arjuna* e *Pongamia gabla* para conhecer a propriedade antiviral dos fenóis totais e taninos, bioquímicos com propriedades fago-estimulante, presentes nos cinco extratos botânicos. Os pesquisadores observaram que quando tratados uma vez no primeiro dia de larva do quinto instar de PMxCSR2, os resultados foram positivos para peso de casulo, peso da casca sérica, comparados com o controle (não infectado) sendo que, *P. niruri* registrou maior peso do casulo e peso da casca sérica (1,59 e 1,65; 0,264 e 0,284) comparado com o controle. Quando tratados em diferentes horas (0h, 3h e 7h) no

quarto e quinto instar, *P. niruri* apresentaram os melhores resultados no que se refere aos parâmetros teor de seda 17.36 %. Esses resultados são semelhantes ao observado por Sivaprakasam [113] realizado com extrato *B. spectabilis*. No experimento observou maior proteção das lagartas ao *BmNPV* e aumento no rendimento e qualidade dos casulos produzidos.

Mohanta et al. [114] utilizando um isolado de bactérias patogênicas de *B. mori* realizaram um estudo com quatro plantas medicinais *Ciannamomum zeylenicum*, *Azadirachta indica*, *Curcuma longa* e *Zingiber officinale*, em seus experimentos puderam constatar que *C. zeylenicum*, *C. longa*, *Z. officinale* demonstraram uma forte atividade contra bactérias gram-negativas e que de maneira adequada tais plantas podem ser utilizadas na indústria da sericultura.

Chavan et al. [115], além de *C. longa*, avaliou o efeito de *Argemone mexicana* e *Bulgainvillea spectabilis* sobre duas raças (PM e CSR2), inoculadas com o *BmNPV*. Após o tratamento os pesquisadores puderam constatar que a proporção máxima de casca sérica foi encontrada no grupo tratado com *B. spectabilis* em comparação com os demais extratos vegetais testados nas raças. Embora todos os extratos vegetais estudados, tenham apresentado resultados dos parâmetros econômicos superiores aos observado no grupo inoculado. Em conclusão, a utilização de extratos de plantas não só reduziu a mortalidade, mas também melhorou o peso larval, o peso do casulo, o peso da casca sérica, parâmetros que são importantes para a comercialização desse produto. Isso pode ser devido aos compostos fito-estimulantes presentes nessas plantas antimicrobianas.

Gore et al. [116] observaram que extrato aquoso de *Phyllanthus emblica* (Amla), mostrou a ação antibacteriana contra *Bacillus subtilis* em ambos os experimentos *in vivo*. As lagartas de *Bombyx mori* foram infectadas com *B. subtilis* no quarto instar utilizando folhas de amoreira e, 96 horas após a infecção as lagartas foram tratadas com 10 µl de extrato de Amla a 10% sobre discos foliares de amoreira. Posteriormente os parâmetros biológicos e produtivos foram relatados. Os pesquisadores concluíram que o extrato a 10% em um período intermitente durante a criação resultou em um mecanismo defensivo aprimorado, conforme evidenciado no estudo, aumentando a sobrevivência das lagartas e prevenindo a infecção bacteriana sem afetar a capacidade de produção de seda devido ao tratamento.

Karthikairaj et al. [117] descreveram a atividade antibacteriana de alguns extratos vegetais preparados a partir de *Acalypha indica*, *Leucas aspera* e *Ocimum sanctum* para controle de *Staphylococcus* sp em laboratório. Observou-se que, tanto os extratos aquosos, como os alcoólicos, foram eficazes contra micro-organismos. Assim, infere-se que tais efeitos de extratos de ervas poderiam ser explorados para controlar patógenos microbianos no momento da criação do bicho-da-seda e obter uma melhor produção de seda. O caule e as folhas de *O. sanctum*, conhecido popularmente como manjerição, contém uma variedade de constituintes incluindo saponinas, flavonóides, triterpenóides e taninos com diversas atividades biológicas, dentre elas, antimicrobiana [118].

Thangavel et al. [119] referiram estudo com extrato de cinco plantas medicinais: *Embllica officinalis*, *Calendula officinalis*, *Cassia fistula*, *Allium sativum* e *Pelargonium hortroum* para controlar os patógenos virais do bicho-da-seda. No presente estudo, foram avaliados a mortalidade larval, e parâmetros produtivos. O tratamento com *E. officinalis* resultou em menor mortalidade larval (43%), praticamente o mesmo observado para *C. officinalis* (45%) sendo o controle (sem tratamento) (57%). A Maior mortalidade larval (65%) foi relatada em 1000 ppm de tratamento com *A. sativum*. O tratamento com *E. officinalis* resultou em maior peso de casulo (2,00 g), resultado similar ao observado com *C. officinalis* (1,77g), no controle sem tratamento (1,11g), já *A. sativum* e *P. hortroum* registraram os menores valores de peso do casulo (1,45 e 1,50 g). Quanto ao parâmetro peso da casca sérica obtiveram 0,27, 0,26, 0,17, 0,21, respectivamente para *E. officinalis*, *C. officinalis*, *A. sativum* e controle não tratado. Enquanto que para teor de seda observado nos experimentos foram (23,82, 23,05, 18,68) para *E. officinalis*, *C. officinalis* e *A. sativum*, respectivamente.

Sujatha e Sampath [120] estudaram o efeito de doses crescentes de óleo de cravo e sua ação contra bactérias *Bacillus cereus* e *Proteus vulgaris* relatando tanto parâmetros nutricionais e características relacionadas a produtividade. No experimento, as lagartas de *B. mori* foram alimentadas com folhas de amoreira com óleo de cravo nas concentrações de 1% e 5%. Os resultados observados mostraram que as



lagartas tratadas tiveram um incremento na produtividade de seda e obtiveram um maior controle da doença flacidez.

Rodroju et al. [121] demonstraram o efeito de extratos de folhas e sementes de *Trichosanthes cucumerina* sobre doenças que infectam lagartas de bicho-da-seda. No experimento as folhas de amoreira foram enriquecidas com diferentes concentrações do extrato e administradas por via oral. Posteriormente os pesquisadores verificaram a influência sobre a biologia e caracteres produtivos. Concluíram que, os extratos metanólicos apresentaram atividade antibacteriana máxima, e que as várias concentrações (1:1, 1:2 e 1:3) de extratos metanólicos aumentaram o comprimento e o peso da glândula de seda em dias alternados no IV instar. Em síntese, os pesquisadores mostraram que a concentração moderada do extrato de *T. cucumerina* promoveu não somente efeito antimicrobiano como também, incremento relacionados a produtividade.

Somu et al. [122] avaliou o efeito atividade antiviral de plantas medicinais tais como: *Lantana camara*, *Phyllanthus amarus* e algas marinhas: *Sargassum wightii*, *Turbinaria ornata* contra *BmNPV*. Extratos brutos foram preparados usando diferentes solventes, como hexano, acetato de etila, metanol e água. Cada extrato foi testado para sua atividade anti-*BmNPV* usando várias concentrações de extratos brutos variando de 200 µg a 1000 µg. Entre os extratos brutos testados, o metanol e os extratos aquosos de *P. amarus* apresentaram significativa atividade anti-*BmNPV*.

*Phyllanthus amarus* pertence a família Euphorbiaceae é uma pequena erva conhecida pelas suas propriedades medicinais e amplamente utilizada em todo o mundo. Estudos fitoquímicos revelaram a presença de muitos compostos valiosos, como flavonóides, taninos hidrolisáveis (elagitaninos), polifenóis, triterpenos, esteróis e alcaloides. Os extratos e os compostos isolados de *P. amarus* apresentam um amplo espectro de atividades farmacológicas, incluindo propriedades antivirais [123].

### 6.3 Efeito da Alga *Spirulina Plantensis* sobre o *BmNPV*

A alga *Spirulina platensis*, é uma cianobactéria filamentosa utilizada como complementação nutricional que possui funções biomoduladoras e imunomoduladoras [124]. Badu et al. [125] utilizaram extrato de *Spirulina Plantensis* em várias concentrações 2,4,6,8,10,12,1,16,18 e 20% oferecidas para as lagartas sob a folha de amoreira juntamente com o inóculo de *BmNPV*. Os resultados observados mostraram que lagartas alimentadas com *Spirulina plantensis* na concentração de 10% obtiveram 90% de resistência ao *BmNPV*, além de melhorar os caracteres econômicos em geral. Isso se deve a presença da proteína *Spirulina* no sistema que pode ter produzido melhores condições digestivas e de absorção, e isso, por sua vez, poderia ter permitido que a lagarta convertesse mais da proteína consumida em suas próprias proteínas corporais.

Como afirmado por Naguchi et al. [126], a proteína adicional absorvida nos últimos instares da criação, pode ser diretamente utilizada para a produção de seda. Ou seja, o uso de *Spirulina plantensis*, isoladamente ou em lagartas infectadas com o vírus, indica que *S. Platensis* pode atuar como um agente antiviral contra o NPV de *B. mori* e desempenhar um papel importante em reduzir a incidência de doenças no bicho-da-seda.

### 6.4 Fármacos antivirais

Estudos utilizando antibióticos para fins clínicos humanos tem mostrado efetividade contra o *BmNPV*. Orihara et al. [127] observaram que os antibióticos os ganciclovir, foscarnet, vidarabina e ribavirina, inibiram a proliferação de *BmNPV* na linhagem celular de *Bombyx mori* (BmN4). A rifampicina e clorafenicol em concentrações de 0,05%, reduziram a mortalidade de lagartas infetadas com *BmNPV* [128].

Pesquisas envolvendo enzimas virais também tem sido alvo de investigações, devido ao importante papel desempenhado no curso da doença viral. O processamento proteolítico dos precursores da poliproteína viral por uma proteinase viral é essencial para a maturação do vírus. Em estudos realizados por Hawtin et al. [52] observaram que quando os genes *v-cach* e *chiA* foram silenciados em baculovirus recombinante o vírus perdeu a capacidade de liquefazer o corpo da lagarta. Efeito similar foi observado por Slack et al. [129], quando o gene *v-cath* foi deletado do genoma do baculovirus *Autographa californica*

*multiple nuclear polyhedrovirus (AcMNPV)*, evidenciando a importância dessa enzima no processo de transmissão do vírus. Estes estudos demonstram que a *BmNPV-Cath* tem um papel importante na transmissão do vírus, porém, não no curso da infecção, uma vez que ela só é expressa pela célula do hospedeiro após a infecção viral. Contudo, a inibição seletiva desta enzima, pode interromper a liquefação do tegumento e, conseqüentemente interferir no processo de transmissão horizontal do vírus, diminuindo o número de lagartas infectadas, o que facilita o manejo da produção e reduz as perdas.

Nesse contexto, recentemente Bueno et al. [130] realizaram teste com o fármaco Bm5, composto modelado molecularmente para inibir a catepsina viral. Estas proteases atuam catalisando a hidrólise de ligações peptídicas de macromoléculas proteicas, resultando em peptídeos menores ou até mesmo degradando-as. No experimento, 10 µL de fármaco foram administrados junto com a alimentação das lagartas no quarto dia após a infecção com o *BmNPV* (quinto dia do quinto instar). No teste *in vivo*, sob condições controladas de laboratório, os pesquisadores relataram que a dose de 100 µg de Bm5, dissolvido como veículo Pluronic-F127 (0,02%), foi capaz de reduzir a mortalidade de lagartas em 22,6%. Nesses experimentos foi utilizada Concentração Letal de dose Viral CL<sub>20</sub>, situação na qual não foi impedida a liquefação das lagartas infectadas.

No intuito de verificar a eficácia do fármaco Bm5 em lagartas infectadas com concentração CL<sub>50</sub>, a análise para a avaliação dos parâmetros relacionados a mortalidade das lagartas e a produtividade do cultivo foram então testadas. No ensaio a aplicação do fármaco foi conduzida no quarto dia do quinto instar (dose única), período em que o produtor começa a visualizar os primeiros sinais da infecção viral, e outro ensaio testou a aplicação em três doses do Bm5, realizadas no terceiro, quarto e quinto dia do quinto instar. Os resultados obtidos mostraram que, independentemente da aplicação do fármaco, em uma ou dividida em três doses sequenciais, foram observados a liquefação do tegumento das lagartas e o índice de mortalidade não foi reduzido [Chiarello et al., em redação]. Esse fato pode ser atribuído a manutenção da atividade de demais enzimas hidrolíticas virais, que foram suficientes para que a infecção ocorresse. Com relação a produtividade desse ensaio citado, verificou-se que a aplicação da droga não interferiu negativamente, sendo que os casulos produzidos apresentaram valores similares aos encontrados na literatura para híbridos comerciais.

Esses resultados observados nos experimentos anteriores levaram a proposta de que a antecipação da aplicação da droga poderia gerar resultados positivos para inibir a infecção pelo *BmNPV*. Nesse sentido, dados preliminares, de infecção com concentração CL<sub>50</sub>, no qual a dose do fármaco foi administrada imediatamente após a infecção com o vírus e/ou em doses sequenciais de Bm5 (primeiro, segundo e terceiro dia do quinto instar), a redução do índice de mortalidade [58%] das lagartas infectadas foi detectado, mas somente quando o teste foi realizado com dose única logo após a infecção [Chiarello, A.S.G., informações pessoais]. Esses dados reforçam que o tratamento do fármaco Bm5 é eficiente somente nessas condições, isto é, quando aplicado imediatamente após a infecção. Como não é possível definir parâmetros visuais de início de infecção pelo *BmNPV*, a necessidade de se detectar por exames *in loco* deve ser otimizado para que o Bm5 seja adicionado ao cultivo em etapas iniciais da infecção. Nesses experimentos, foram detectados que os parâmetros relacionados à produtividade nesse cultivo apresentaram valores de acordo com os observados na literatura para híbridos comerciais, mesmo com a aplicação do fármaco Bm5.

## 7. Conclusão

A sericultura enfrenta muitos desafios, sobre tudo, aqueles relacionados aos patógenos que causam inúmeros prejuízos ao setor. A busca na literatura mostrou que há uma preocupação mundial na busca por métodos eficientes que possam integrar as atuais substâncias utilizadas para o controle e prevenção de doenças a nível de campo. A proposta, envolvendo o fármaco Bm5 deve ser considerada para a efetivação com relação ao controle da infecção do vírus *BmNPV*.

**Agradecimentos:** Os autores agradecem a Fundação Araucária (Processos 147/14 e 40/16); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo 305960/2015-6); União Europeia (Projeto SEDA – Processo LA/2016/378-553); Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, UGF; Fiação de Seda BRATAC S.A., pela cooperação

e fornecimento de lagartas híbridas comerciais. Pelo suporte ao Complexo de centrais de Apoio à Pesquisa – COMCAP/UEM.

## Referências Bibliográficas

1. Jiang, L.; Xia G. The progress and future of enhancing antiviral capacity by transgenic technology in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect. Biochem. Mol. Biol* **2014**, *48*, 1-7. DOI: 10.1016/j.ibmb.2014.02.003. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24561307> (13, Setembro, 2018).
2. Shadforth, A.M.A.; Suzuki, Shuko.; Alzonne, R.; Edwards, G.A.; Richardson, N.A.; Chirila, T.V.; Harkin, D.G. Incorporation of human recombinant tropoelastin into silk fibroin membranes with the view to repairing bruch's membrane. *J. Funct. Biomater.* **2015**, *6*, 946-962. DOI: 10.3390/jfb6030946. Disponível online: <http://www.mdpi.com/2079-4983/6/3/946> (13, Setembro, 2018).
3. Vu, T.; Xue, Ye.; Vuong, T.; Erbe, M.; Bennet C.; Palazzo, B.; Popielski, L.; Rodriguez, N.; Hu, X. Comparative study of ultrasonication-induced and naturally self-assembled silk fibroin-wool keratin hydrogel biomaterials. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1497. DOI: 10.3390/ijms17091497. Disponível online: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/9/1497> (13, Setembro, 2018).
4. Kunz, R.I.; Brancalhão, R.M.; Ribeiro, L.F.C.; Natali, M.R.M. Silkworm sericin: Properties and biomedical applications. *Biomed. Res. Int.* **2016**, *1*, 1-19. DOI: 10.1155 / 2016/8175701. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5124675/pdf/BMRI2016-8175701.pdf> (9, Setembro, 2018).
5. Brancalhão, R.M.C.; Souza, V.B.V.; Soares, M.A.M. Infecção causada por nucleopolyhedrovírus nas células gordurosas de *Bombyx mori* L. 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). *Arq. Inst. Biol.* **2002a**, *69*, 57-63. Disponível online: [http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V69\\_2/brancalhao.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V69_2/brancalhao.pdf) (13, Setembro, 2018).
6. 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 sericultura brasileira. *Biotec. Ciênc. Desenvol.* **2005**, *35*, 56-61. Disponível online: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/complexo\\_da\\_seda/biotecnologia\\_sericcic.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/complexo_da_seda/biotecnologia_sericcic.pdf) (14, Setembro, 2018).
7. Secretaria da agricultura e do abastecimento - SEAB. Análise da conjuntura agropecuária safra 2016/2017. Sericultura. Curitiba, Brasil, **2017**. Disponível online: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2018/Sericultura\\_2016\\_17.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2018/Sericultura_2016_17.pdf) (14, Setembro, 2018).
8. Porto, A.J. Performance of races of *Bombyx mori* L. under conditions temperature limits. *Semin. Ciênc. Agrár.* **2012**, *33*, 1263-1272. DOI: 10.5433/1679-0359.2012v33n4p1263, Disponível online: <http://www.iz.sp.gov.br/pdf/sbia/1233156933.pdf> (14, Setembro, 2018).
9. Hussain, M.; Naeem, M.; Khan, S.A.; Bhatti, M.F.; Munawar, M. Studies on the influence of temperature and humidity on biological traits of silkworm (*Bombyx mori* L.; Bombycidae). *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 12368-12375. DOI: 10.5897/AJB11.1805. Disponível online: <http://www.academicjournals.org/AJB> (14, Setembro, 2018).
10. Porto, A. J. Medidas profiláticas na criação do bicho-da-seda. *Pesq. Tecnol.* **2016**, *13*, 1-5. Disponível online: <http://ruralpecuaria.com.br/tecnologia-e-manejo/novas-tecnologias/medidas-profilaticas-na-criacao-do-bicho-da-seda.html> (14, Setembro, 2018).
11. Jiang, L.; Zhao, P.; Cheng, T.; Sun, Q.; Peng, Z.; Dang, Y.; Wu, X.; Wang, G.; Jin, S.; Lin, P.; Xia, Q. A transgenic animal with antiviral properties that might inhibit multiple stages of infection. *Antivir. Res.* **2013**, *98*, 171-173. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.02.015. Disponível online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354213000521?via%3Dihub> (13, Setembro, 2018).
12. Gomi, S.; Majima, K.; Maeda, S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* **1999**, *80*, 1323-1337. Doi: 10.1099/0022-1317-80-5-1323. Disponível online: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/80/5/0801323a.pdf?expires=1541287826&id=id&accname=guest&checksum=6883969A2DDD7CED4F8EBD771AC17F9A> (13, Setembro, 2018).
13. Rahman, Md, M.; Gopinathan, K.P. Systemic and in vitro infection process of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Res.* **2004**, 109-118. DOI: 10.1016/j.virusres.2003.12.027. Disponível online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170203003952> (13, Setembro, 2018).
14. Cao, G.; Meng, X.; Xue, R.; Zhu, Y.; Zhang, X.; Pan Z.; Zheng, X.; Gong, C. Charaterization of the complete genome segments from BmCPV-SZ, a novel *Bombyx mori* cypovirus 1 isolate. *Can. J. Microbiol.* **2012**, *58*, 872-883. DOI: 10.1139/w2012-064. Disponível online: <https://doi.org/10.1139/w2012-064> (13, Setembro, 2018).

15. Wang, Y.J.; Yao, Q.; Chen, K.P.; Wang, Y.; Lu, J.; Han, X. Characterization of the genome structure of *Bombyx mori* densovirus (China isolate). *Virus Genes*. **2007**, *35*, 103-108. Disponível online: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2s2.034248571625&origin=inward&txGid=d5b233fdc6aa34c547f0d398ca7c9c12> (13, Setembro, 2018).
16. Xu, K.; Li, F.; Ma, L.; Wang, B.; Zhang, H.; Ni, M.; Hong, F.; Shen, W.; Li, Bing. Mechanism of enhanced *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus-resistance by titanium dioxide nanoparticles in silkworm. *PLoS ONE*. **2015**, *10*, 1-18. DOI: 10.1371/journal.pone.0118222. Disponível online: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0118222&type=printable> (13, Setembro, 2018).
17. Hanada, Y.; Watanabe, J.K. Manual de criação do bicho-da-seda. *Curitiba: COCAMAR, 1986. 224p.*
18. Huang, W., Ling, S., Li, C., Omenetto, F.G. Kaplan. Silkworm silk-based materials and devices generated using bio-nanotechnology. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 6486-6504. DOI: 10.1039 / c8cs00187a. Disponível online: <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2018/CS/C8CS00187A#divAbstract> (26, Setembro, 2018).
19. Fazal, N.; Latief, N. *Bombyx mori* derived scaffolds and their use in cartilage regeneration: a systematic review. *Ostearthr. cartil.* **2018**. DOI: 10.1016/j.joca.2018.07.009. Disponível online: [https://ac.els-cdn.com/S1063458418313840/1s2.0S1063458418313840main.pdf?\\_tid=fe2aa98d3ed84d0490dff816ced72e1e&acdnat=1539094246\\_0266742b2fc3c284a3263e907cf1ca4a](https://ac.els-cdn.com/S1063458418313840/1s2.0S1063458418313840main.pdf?_tid=fe2aa98d3ed84d0490dff816ced72e1e&acdnat=1539094246_0266742b2fc3c284a3263e907cf1ca4a) (9, Setembro, 2018).
20. Xia, Q.; Zhou, Z.; Lu, C.; Cheng, D.; Dai, F.; Li, B.; Zhao, P.; Zha, X.; Cheng, T.; Chai, C.; Pan, G.; Xu, J.; Liu, C.; Lin, Y.; Qian, J.; Hou, Y.; Wu, Z.; Li, G.; Pan, M.; Li, C.; Shen, Y.; Lan, X.; Yuan, L.; Li, T.; Xu, H.; Yang, G.; Wan, Y.; Zhu, Y.; Yu, M.; Shen, W.; Wu, D.; Xiang, Z.; Yu, J.; Wang, J.; Li, R.; Shi, J.; Li, H.; Li, G.; Su, J.; Wang, X.; Li, G.; Zhang, Z.; Wu, Q.; Li, J.; Zhang, Q.; Wei, N.; Xu, J.; Sun, H.; Dong, L.; Liu, D.; Zhao, S.; Zhao, X.; Meng, Q.; Lan, F.; Huang, X.; Li, Y.; Fang, L.; Li, C.; Li, D.; Sun, Y.; Zhang, Z.; Yang, Z.; Huang, Y.; Xi, Y.; Qi, Q.; He, D.; Huang, H.; Zhang, X.; Wang, Z.; Li, W.; Cao, Y.; Yu, Y.; Yu, H.; Li, J.; Ye, J.; Chen, H.; Zhou, Y.; Liu, B.; Wang, J.; Ye, J.; Ji, H.; Li, S.; Ni, P.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Zheng, H.; Mao, B.; Wang, W.; Ye, C.; Li, S.; Wang, J.; Wong, G.K.-S.; Yang, H. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Sci.* **2004**, *306*, 1937-1940, DOI: 10.1126/science.1102210. Disponível online: <http://science.sciencemag.org/content/306/5703/1937> (13, Setembro, 2018).
21. Mita, K.; Kasahara, M.; Sasaki, S.; Nagayasu, Y.; Yamada, T.; Kanamori, H.; Namiki, N.; Kitagawa, M.; Yamashita, H.; Yasukochi, Y.; Kadono-Okuda, K.; Yamamoto, K.; Ajimura, M.; Ravikumar, G.; Shimomura, M.; Nagamura, Y.; Shin, T.; Abe, H.; Shimada, T.; Morishita, S.; Sasaki, T. The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res.* **2004**, *11*, 27-35, DOI: doi.org/10.1093/dnares/11.1.27. Disponível online: <https://academic.oup.com/dnares/article/11/1/27/342818> (13, Setembro, 2018).
22. Goldsmith, M.R.; Shimada, T.; Abe, H. The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Annu. Rev. Entomol.* **2005**, *50*, 71-100. DOI: 10.1146 / annurev.ento.50.071803.130456. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15355234> (3, Dezembro, 2018).
23. Liu, Y. Q.; Li, Q.; Li, Y. P.; Wang, H.; Xia, R.X.; Qi, Y.H.; Li, X.S.; Lu, C.; Xiang, Z.H. Comparative genetic diversity and genetic structure of three chinese silkworm species *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae), *Antheraea pernyi* Guérin-Meneville and *Samia cynthia ricini* Donovan (Lepidoptera: Saturniidae). *Neotrop. Entomol.* **2010**, *39*, 967-976. DOI: 10.1590/S1519-566X2010000600019. Disponível online: <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2010000600019> (3, Dezembro, 2018).
24. Nagaraju, J.; Goldsmith, M.R. Silkworm genomics - progress and prospects. *Curr. Sci.* **2002**, *83*, 411-425. Disponível online: <https://pdfs.semanticscholar.org/e6ea/20195c8949cb4285785a7b544c01e897508d.pdf> (3, Dezembro, 2018).
25. Aruga, H. Silkworm and its Strains. In: Principles of Sericulture. CRC Press; EUA, 1994, p. 97-111. ISBN 13:9789054102540.
26. Okamoto, F.; Porto, A.J. Sericultura. *Pesq. tecnol.* **2004**, *1*, 1-5. Disponível online: <http://www.aptaregional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao-2004;1037-sericultura> (3, Setembro, 2018).
27. Masmudur, R.M.D.; Gopinathan, K.P. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus-based surface display system for recombinant proteins. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 2023-2031. DOI: 10.1099/vir.0.19225-0. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12867632> (3, Dezembro, 2018).
28. Mondal, M; Trivedy, K; Kumar, N.S. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn. C. *J. E. S.* **2007**, *5*, 63-76. Disponível online: [https://www.researchgate.net/publication/267974556\\_The\\_silk\\_proteins\\_sericin\\_and\\_fibroin\\_in\\_silkworm\\_Bombyx\\_mori\\_Linn\\_-\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/267974556_The_silk_proteins_sericin_and_fibroin_in_silkworm_Bombyx_mori_Linn_-_A_review) (3, Dezembro, 2018).

29. Tsuchida, K.; Wells, M.A.; Digestion, absorption, transport and storage of fat during the last larval instar of *Manduca sexta*. Changes in the role of lipophorin in the delivery of dietary lipid to the fat body. *Insect Biochem.* **1988**, *18*, 263-268. Disponível online: [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(88\)90090-X](https://doi.org/10.1016/0020-1790(88)90090-X) (3, Dezembro, 2018).
30. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento - SEAB. Sericicultura. Curitiba, Brasil, **2014**. Disponível online: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/sericicultura\\_2015.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/sericicultura_2015.pdf) (3, Dezembro, 2018).
31. Zanetti, R. Notas de aula de entomologia: Sericicultura. Manejo e criação do bicho-da-seda. Lavras: DEN/UFLA, **2011**. Disponível online: <http://www.den.ufla.br/siteantigo/Professores/Ronald/Disciplinas/Notas%20Aula/Sericicultura%20bichodaseda.pdf> (20, Setembro, 2018).
32. Trivedy, K.S.; Kumar, N.N.; Vinutha Qadri, S.M.H. *In vitro* testing of common disinfectants used in sericulture to control the growth of fungi in rearing houses. *Res. J. Microbiol.* **2011**, *6*, 439-465. DOI: 10.3923/jm.2011.439.465. Disponível online: <https://scialert.net/abstract/?doi=jm.2011.439.465> (13, Setembro, 2018).
33. Porto, A.J.; Okamoto, F.; Ikuno, A.A.; Ferreira, V.C.A.; Margatho, L.F.A. Avaliação biológica e produtiva do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) alimentado com folhas de amoreira pulverizadas com extrato de *Mirabilis jalapa*. *Arq. Inst. Biol.* **2005**, *72*, 445-453. Disponível online: [https://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v72\\_4/porto.PDF](https://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v72_4/porto.PDF), (14, Setembro, 2018).
34. Brancalhão, R.M.C. Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda. *Biotec. Ciênc. Desenvol.* **2002b**, 54-58. Disponível online: <https://www.researchgate.net/publication/285831196/download> (19, Setembro, 2018).
35. Kumar, V.; Singh, G.P.; Babu, A.M.; Ahsan, M.M.; Datta, R.K. Germination, penetration, and invasion of *Beauveria bassiana* on silkworm, *Bombyx mori*, causing white muscardine. *Ital. J. Zool.* **1999**, *66*, 39-43, DOI: 10.1080/11250009909356235. Disponível online: [www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11250009909356235](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11250009909356235) (18, Setembro, 2018).
36. Santos, S.A.; Vidigal, P.G.; Merlini, L.S. A criação do *Bombyx mori* (bicho-da-seda e as principais doenças). *Arq. Ciênc. Vet. Zool.* **2011**, *14*, 57-64. Disponível online: <http://www.revistas.unipar.br/index.php/veterinaria/article/viewFile/3745/2445> (13, Setembro, 2018).
37. Yaoi, K.; Nakanishi, K.; Kadotani, T.; Imamura, H.; Koizumi, N.; Iwahana, H.; Sato, R. cDNA cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin binding 120 kDa aminopeptidase N from *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, *18*, 131-7. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9931470> (18, Setembro, 2018).
38. Polanczyk, R.; Alves, S. *Bacillus thuringiensis* uma breve revisão. *Agrociên.* **2003**, *7*, 1-10. Disponível online: <http://www.fagro.edu.uy/agrociencia/index.php/directorio/article/view/363/287> (18, Setembro, 2018).
39. Jyothi, N.B.; Patil, C.S.; Dass, M.S. Action of Carbendazim on the development of *Nosema bombycis* Naegeli in silkworm *Bombyx mori* L. *J. Appl. Entomol.* **2005**, *129*, 205-210. DOI: 0.1111/j.1439-0418.2005.00922.205-210. Disponível online: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1439-0418.2005.00922.x> (18, Setembro, 2018).
40. Lu, P.; Pan, Ye.; Yang, Y.; Zhu, F.; Li, C.; Guo, Z.; Yao, Q.; Chen, K. Discovery of anti-viral molecules and their vital functions in *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.* **2018**, *154*, 12-18. DOI: 10.1016/j.jip.2018.02.012. Disponível online: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.012> (18, Setembro, 2018).
41. Gani, M.; Chouhan, S.; Lal, B.; Gupta, R.K.; Khan, G.; Kumar, N.B.; Saini, P.; Ghosh, M.K. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV): Its impact on silkworm rearing and management strategies. *J. Biolog. Contr.* **2017**, *31*, 189-193. DOI: 10.18311/jbc/2017/16269. Disponível online: <https://www.informaticsjournals.com/index.php/jbc/article/view/16269/17221> (22, Setembro, 2018).
42. Rohrmann, G.F. Introduction to the baculoviruses, their taxonomy, and evolution. In: *Baculovirus Molecular Biology*, 3a edição. Bethesda (MD): National Library of Medicine, United States, 2013: pp. 9-22. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138298/> (20, Novembro, 2018).
43. Blissard G.W.; Wenz J. R. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J. Virol.* **1992**, *66*, 6829-6835. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC240187/pdf/jvirol00042-0599.pdf> (18, Setembro, 2018).
44. Horton, H.M.; Burand, J.P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and membrane fusion. *Journ. Virol.* **1993**, *67*, 1860-1868. Disponível online: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2s2.00027535099&origin=inward&txGid=ee95a033a632934ecd41428895492601> (13, Setembro, 2018).

45. Keddie, B.A.; Aponte, G.W.; Volkman, L.E. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Sci.* **1989**, *243*, 1728-1730. DOI: 10.1126/science.2648574. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2648574> (13, Setembro, 2018).
46. Funk, C.J.; Consigli, R.A. Evidence for zinc binding by two structural proteins of *Plodia interpunctella* Granulosis virus. *J. Virol.* **1992**, *66*, 3168-3171. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC241081/pdf/jvirol00037-0580.pdf> (19, Setembro, 2018).
47. Engelhard, E.K.; Kam-Morgan, L.N.; Washburn, J.O.; Volkman, L.E. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 3224-3227. DOI: 10.1073/pnas.91.8.3224. Disponível online: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3224> (19, Setembro, 2018).
48. Rahman, M.M.; Gopinathan K.P. Systemic and in vitro infection process of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Research.* **2014**, *101*, 109-118. DOI:10.1016/j.virusres.2003.12.027. Disponível online: [https://ac.els-cdn.com/S0168170203003952/1-s2.0-S0168170203003952-ain.pdf?\\_tid=d5cd7bcb-b229-417e-96e5-4aa32e332a73&acdnat=1539195805\\_b8d01c829f6033bec1d1a504df3f69c8](https://ac.els-cdn.com/S0168170203003952/1-s2.0-S0168170203003952-ain.pdf?_tid=d5cd7bcb-b229-417e-96e5-4aa32e332a73&acdnat=1539195805_b8d01c829f6033bec1d1a504df3f69c8) (13, Setembro, 2018).
49. Granados, R.R.; Williams, K.A. *In vivo* infection and replication of baculoviruses. In: Granados, R.R.; Federici, B.A. (Eds.). *The biology of baculoviruses*. Boca Raton: CRC, 1986. v.1, pp.89-108. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138298/> (4, Dezembro, 2018).
50. Volkman, L.E.; keddie, B.A. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. *Semin. Virol.* **1990**, *1*, 249-256.
51. Ohkawa, T.; Majima, K.; Maeda, S. A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* **1994**, *68*, 6619-6625. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8083997> (21, Novembro, 2018).
52. Hawtin, R.E.; Arnold, K.; Ayres, M.D.; Zanutto, P.M.A.; Howard, S.C.; Gooday, G.W.; Chappell, L.H.; Kitts, P.A.; King, L.A.; Possee, R.D. Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology.* **1995**, *69*, 975-982. DOI: 10.1006/viro.1995.1525. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7571437> (21, Novembro, 2018).
53. Ishimwe, E.; Hodgson, J.J.; Clem, R.J.; Passarelli, A.L. Reaching the melting point: Degradative enzymes and protease inhibitors involved in baculovirus infection and dissemination. *Virology.* **2015**, *480*, 637-649. DOI: 10.1016/j.virol.2015.01.027. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25724418> (21, Novembro, 2018).
54. Hall, D.W.; Hazard, E.I. A nuclear polyhedrosis virus of a caddisfly, *Neophylax* sp. *J. Invertebr. Pathol.* **1973**, *21*, 323-324. Disponível online: <https://kundoc.com/pdf-a-nuclear-polyhedrosis-virus-of-a-caddisfly-neophylax-sp-.html> (21, Novembro, 2018).
55. Couch, J.A. An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence, and enhancement. *J. Invertebrate Pathol.* **1974**, *24*, 311-331. DOI: 10.1016/0022-2011(74)90139-6. Disponível online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022201174901396> (21, Novembro, 2018).
56. Couch J.A. Free and occluded virus, similar to *Baculovirus*, in hepatopancreas of pink shrimp. *Nature.* **1974**, *247*, 229-231. Disponível online: <https://www.nature.com/articles/247229a0.pdf> (21, Novembro, 2018).
57. Henry, J.E.; Jutila, J.W. The isolation of a polyhedrosis virus from a grasshopper. *J. Invertebr. Pathol.* **1966**, *8*, 417-418.
58. Wang, Y.; Kleespies, R.G.; Ramle, M.B.; Jehle, J.A. Sequencing of the large dsDNA genome of *Oryctes rhinoceros* nudivirus using multiple displacement amplification of nanogram amounts of virus DNA. *J Virol Methods.* **2008**, *152*, 106-8. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.06.003. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598718> (21, Novembro, 2018).
59. Ryel, R.B.; Cline, G.B.; Isolation and characterization of a nuclear polyhedral inclusion body from the boll weevil, *Athonomas grandis*. *J. Alabama Acad. Sci.* **1970**, *41*, 193.
60. Smith, K.M.; Hills, G.J.; Rivers, C.F.; Polyhedroses in neuropterous insects. *J. Insect Pathol.* **1959**, *1*, 431-437.
61. Jehle, J.A.; Blissard, G.W.; Bonning, B.C.; Cory, J.S.; Herniou, E.A.; Rohrmann, G.F.; Theilmann, D.A.; Thiem, S.M.; Vlak, J.M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch. Virol.* **2006**, *151*, 1257-1266, DOI: 10.1007/s00705-006-0763-6. Disponível online: [link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-006-0763-6](http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-006-0763-6) (19, Setembro, 2018).
62. Pearson, M.N.; Rohrmann, G.F. Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the *Baculoviridae*, *Orthomyxoviridae*, and *Metaviridae* (insect retrovirus) families. *J. Virol.* **2002**, *76*,

- 5301-5304. DOI: 10.1128/JVI.76.11.5301-5304.2002. Disponível online: <https://jvi.asm.org/content/76/11/5301.long> (21, Novembro, 2018).
63. Summers, M.D.; Smith, G.E.; Knell, J.D.; Burand, J.P. Physical maps of *Augrapha californica* and *Rachiplusia* ou nucleolar polyhedrosis virus recombinans. *J. Virol.* **1980**, *34*, 693-703. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC288758/> (21, Novembro, 2018).
  64. Joshi, R.P.; Raja, I.A. Polymerase chain reaction based detection of grasserie virus, BmNPV in Silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotech. Res. Comm.* **2016**, *10*, 121-124. Disponível online: [http://bbrc.in/bbrc/2017jan-mar-chPDF/BBRC11\\_018.pdf](http://bbrc.in/bbrc/2017jan-mar-chPDF/BBRC11_018.pdf) (19, Novembro, 2018).
  65. Vanapruck, P.; Attathom, T.; Sanbatsiri, K.; Attathom, S. Comparison of methods for the detection of nuclear polyhedrosis virus in silkworm, *Bombyx mori* L in. In: Proceedings of the 30<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference: Plant Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, 1992, pp. 237-243.
  66. Zubiatur, Y.M.; Abreu M.P, Hernández, M.C.P.; Sihler, W.; Falcão, R.; Ribeiro, B.M.; Souza, M.L. First record of a *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) isolate from Cuba. *J. Curr. Res.* **2016**, *8*, 35766- 35770. Disponível online: <http://www.journalcra.com/sites/default/files/16594.pdf> (19, Setembro, 2018).
  67. Nataraju, B.; Sivaprasad, V.; Datta, R.K.; Gupta, S.K.; Shamim, M. Colloidal textile dye-based dipstick immunoassay for the detection of nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) of silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Invertebr. Pathol.* **1994**, *63*, 135-139. DOI: <https://doi.org/10.1006/jipa.1994.1026>. Disponível online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201184710263> (21, Novembro, 2018).
  68. Bulet, P.; Hetru, C.; Dimarcq, J.L.; Hoffmann, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol.* **1999**, *23*, 329-344. DOI: 10.1016/S0145-305X(99)00015-4. Disponível online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X99000154?via%3Dihub> (24, Novembro, 2018).
  69. Lavine, M.D.; Strand, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *32*, 1295-1309. DOI: 10.1016/S0965-1748(02)00092-9. Disponível online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174802000929?via%3Dihub> (24, Novembro, 2018).
  70. Wu, K.; Yang, B.; Huang, W.; Dobens, L.; Song, H.; Ling E. Gut immunity in Lepidopteran insects *Dev. Comp. Immunol.* **2016**, *64*, 65-74. DOI: 10.1016/j.dci.2016.02.010. Disponível online: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2s2.04976262083&origin=inward&txGid=f8ce5775581581499400932d3be10a98> (24, Novembro, 2018).
  71. Ikeda, M.; Yamada, H.; Hamajima, R.; Kobayashi, M. Baculovirus genes modulating intracellular innate antiviral immunity of lepidopteran insect cells. *Virology*, **2013**, *435*, 1-13. DOI:10.1016/j.virol.2012.10.016. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23217611> (24, Novembro, 2018).
  72. Ai, H.; Wang, F.; Zhang, N.; Zhang, L.; Lei, C. Antiviral, immunomodulatory, and free radical scavenging activities of a protein-enriched fraction from the larvae of the housefly, *Musca domestica*. *J. Insect. Sci.* **2013**, *3*, 1-16. DOI: 10.1673/031.013.11201. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24735244> (24, Novembro, 2018).
  73. Russo, J.; Brehélin, M.; Carton, Y. Hemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J. Insect. Physiol.* **2001**, *47*, 167-172. Disponível online: <https://pdfs.semanticscholar.org/094b/eeb84129446f233d23aadee47fca65352399.pdf> (24, Novembro, 2018).
  74. Ferrendon, D.; Imler, J.L.; Hetru, C.; Hoffann, J.A. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signaling during bacterial and fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 862-874. DOI: 10.1038/nri2194. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17948019> (24, Novembro, 2018).
  75. Warr, E.S.; Dong, Y.; Dimopoulos, G. The gram-negative bacteria binding protein gene family: its role in the innate immune system of *Anopheles gambiae* and in anti-plasmodium defense. *Insect Mol. Biol.* **2008**, *17*:39-51. DOI: 10.1111/j.1365 2583.2008.00778.x. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18237283> (24, Novembro, 2018).
  76. Bogdan, C.; Rollinghoff, M.; Diefenbach, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **2000**, *12*, 64-76. DOI: 10.1016/S0952-7915(99)00052-7. Disponível online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791599000527?via%3Dihub> (24, Novembro, 2018).
  77. Vass, E.; Nappi, A.J. Fruit fly immunity. *BioScience.* **2001**, *51*, 529-535. Disponível online: <https://academic.oup.com/bioscience/article-pdf/51/7/529/19409000/51-7-529.pdf> (24, Novembro, 2018).

78. Bulet, P.; Stocklin, R.; Menin, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* **2004**, *198*, 169-184. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15199962> (24, Novembro, 2018).
79. Chen, k.; Lu, Z. Immune responses to bacterial and fungal infections in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Comp. Immunol.* **2018**, *83*, 3-11. DOI: 10.1016/j.dci.2017.12.024. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29289612> (24, Novembro, 2018).
80. Marshall, S.H.; Arenas, G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electron. J. Biotechnol.* **2003**, *6*, 271-284. Disponível online: <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/2253/1/ej03030.pdf> (24, Novembro, 2018).
81. Conlon, J.M.; Seidel, B.; Nielsen, P.F. An atypical member of the brevinin-1 family of antimicrobial peptides isolated from the skin of the European frog *Rana dalmatina*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2004**, *137*, 191-196. DOI: 10.1016/j.cca.2004.01.003. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1505093010.1016/j.cca.2004.01.003> (24, Novembro, 2018).
82. Kounatidis, I.; Ligoxygakis, P. *Drosophila* as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. *Open. Biology.* **2012**, *2*, 1-14. DOI: 10.1098/rsob.120075. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22724070> (25, Novembro, 2018).
83. Bao, Y.Y.; Tang, X.D.; Lv, Z.Y.; Wang, X.Y.; Tian, C.H.; Xu, Y.P.; Zhang, C.X. Gene expression profiling of resistant and susceptible *Bombyx mori* strains reveals nucleopolyhedrovirus-associated variations in host gene transcript levels. *Genomics.* **2009**, *94*, 138-145. DOI: 10.1016/j.ygeno.2009.04.003. Disponível online: [https://ac.els-cdn.com/S0888754309000834/1-s2.0-S0888754309000834-main.pdf?\\_tid=14c9d072-04aa-44cf-86f2-854d8e7bfaaa&acdnat=1543066957\\_28ba32428c478800e83a8e7aadffae5a](https://ac.els-cdn.com/S0888754309000834/1-s2.0-S0888754309000834-main.pdf?_tid=14c9d072-04aa-44cf-86f2-854d8e7bfaaa&acdnat=1543066957_28ba32428c478800e83a8e7aadffae5a) (25, Novembro, 2018).
84. Bao, S.Y.; Lv, Z.Y.; Liu, Z.B.; Xue, J.; Xu, Y.P.; Zhang, C.X. **Comparative analysis of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus responsive genes in fat body and hemocyte of *B. mori*.** *Insect. Mol. Biol.* **2010**, *19*, 347-358. DOI: 10.1111/j.1365-2583.2010.00993.x. Disponível online: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2583.2010.00993.x> (25, Novembro, 2018).
85. Saito, T.; Aoki, J. Toxicity of free fatty acids on the larval surfaces two lepidopterous insects towards *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Paecilomyces fumoso-roseus* (Wize) (Deuteromycetes: Moniliales). *Appl. Entomol. Zool.* **1983**, *2*, 225-233. DOI: 10.1303/aez.18.225. Disponível online: <https://doi.org/10.1303/aez.18.225> (25, Novembro, 2018).
86. Brey, P.T.; Lee, W.J.; Yamakawa, M.; Koizumi, Y.; Perrot, S.; François, M.; Ashida, M. Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 6275-6279. DOI: 10.1073/pnas.90.13.6275. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8327509> (26, Novembro, 2018).
87. Russell, V.; Dunn, P.E. Antibacterial proteins in the mid gut of *Manduca sexta* during metamorphosis. *J. Insect Physiol.* **1996**, *42*, 41-52. DOI: 10.1016/0022-1910(95)00083-6. Disponível online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022191095000836> (26, Novembro, 2018).
88. Dunphy, G.B.; Halwani, A. Haemolymph proteins of larvae of *Galleria mellonella* detoxify endotoxins of the insect pathogenic bacteria *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *J. Insect Physiol.* **1997**, *43*, 383-391. DOI: 10.1016/S0022-1910(97)00072-3. Disponível online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022191097000723?via%3Dihub> (26, Novembro, 2018).
89. Lowenberger, C.A.; Smart, C.T.; Bulet, P.; Ferdig, M.T.; Severson, D.W.; Hoffmann, J.A.; Christensen, B.M. Insect immunity: molecular cloning, expression and characterization of cDNAs and genomic DNA encoding three isoforms of insect defensin in *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* **1999**, *8*, 107-118. DOI: 10.1046/j.1365-2583.1999.810107.x. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9927179> (27, Novembro, 2018).
90. Han, Z.S.; Enslin, H.; Hu, X.D.; Meng, X.J.; Wu, I.H.; Barrett, T.; Davis, R.J.; IP, Y.T. A conserved p38 mitogen activated protein kinase pathway regulates *Drosophila* immunity gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 3527-3539. DOI: 10.1128 / MCB.18.6.3527. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9584193> (27, Novembro, 2018).
91. Kingsolver, M.B.; Huang, Z.; Richard, W.H. Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 4921-4936. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.10.006. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24120681> (27, Novembro, 2018).
92. Portt, L.; Norman, G.; Clapp, C.; Greenwood, M.; Greenwood, M.T. Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochim. Biophys. Acta.* **2011**, *1813*, 238-259. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.10.010. Disponível online: <https://ac.els->



- cdn.com/S0167488910002764/1-s2.0-S0167488910002764-main.pdf?\_tid=9e36b422-c9a7-4988-b4c0-9feac7ab7ca0&acdnat=1543074637\_2b2bbbece9b2b35cb3d569ccc4137a62 (27, Novembro, 2018).
93. Passarelli, A.L. Barriers to success: how baculoviruses establish efficient systemic infections. *Virol.* **2011**, 411 383-392. DOI: 10.1016/j.virol.2011.01.009. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21300392> (28, Novembro, 2018).
  94. Cheng, Y.; Wang, X.Y.; Du, C.; Gao, J.; Xu, J.P. Expression analysis of several antiviral related genes to BmNPV in different resistant strains of silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Sc.* **2014**, 14, 1-9. DOI: 10.1093 / jis / 14.1.76. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4212868/> (28, Novembro, 2018).
  95. Okino, I. Manual de sericultura. Bauru, Brasil: 1982. 80p, Disponível online: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGB.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=122714> (20, Setembro, 2018).
  96. Margatho, L.F.F.; Okamoto, F.; Almeida, A.M.; Santo, C.A.J.P. Avaliação quantitativa da contaminação por micro-organismos no ambiente de criação do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) na fase de chocadeira. *Arq. Inst. Biol.* **2012**, 79, 233-238. Disponível online: <https://www.scielo.br/pdf/aib/v79n2/a11v79n2.pdf> (20, Setembro, 2018).
  97. Porto, A.J.; Okamoto, F. Efeito da aplicação de desinfetante sobre o bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). *B. Indústria. anim.* **2000**, 57, 193-199. Disponível online: <https://www.iz.sp.gov.br/pdfsbia/1233159304.pdf> (21, Setembro, 2018).
  98. Fernandes, J.; Brancalhão, R.M.C.; Nicodemo, D.; Ribeiro, L.F.C.; Santorum, M. Mulberry leaves treated with bordeaux mixture protect silkworm caterpillars against fungal and viral diseases. *Semin. Ciênc. Agrár.* **2016**, 37, 1-12. DOI: 10.5433/1679-0359.2016v37n1p43. Disponível online: [https://www.researchgate.net/publication/297893073\\_Mulberry\\_leaves\\_treated\\_with\\_bordeaux\\_mixture\\_protect\\_silkworm\\_caterpillars\\_against\\_fungal\\_and\\_viral\\_diseases](https://www.researchgate.net/publication/297893073_Mulberry_leaves_treated_with_bordeaux_mixture_protect_silkworm_caterpillars_against_fungal_and_viral_diseases) (21, Setembro, 2018).
  99. Rassol, S.; Ganie, N.A.; Wani, M.Y.; Khan, I.L.; Mehraj, S. Evaluation of a suitable silkworm bed disinfectant against silkworm diseases and survivability under temperate conditions of Kashmir. *Int. J. Chem. Stud.* **2018**, 6, 1571-1574. DOI: <https://dx.doi.org/10.22271/chemi>. Disponível online: <http://www.chemijournal.com/archives/?year=2018&vol=6&issue=1&ArticleId=1809&si=false> (21, Novembro, 2018).
  100. Mahalingam, C.A.; Muruges, K.A.; Shanmugam, R. Grasserie disease incidence on silkworm and development of botanical based management strategy. *Biosc. Trends.* **2010**, 3, 212-215. Disponível online: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20133149379> (28, Novembro, 2018).
  101. Panizzi, A.R.; Parra, J.R.P. A ecologia nutricional e o manejo integrado de pragas. In: Panizzi, A.R., Parra, J.R.P. Ecologia Nutricional de insetos e suas implicáveis no manejo de pragas, Manole, Brazil, 1991. p.313-336. Disponível online: [https://www.researchgate.net/publication/250026465\\_Ecologia\\_Nutricional\\_de\\_Insetos\\_e\\_suas\\_Implicacoes\\_no\\_Manejo\\_de\\_Pragas](https://www.researchgate.net/publication/250026465_Ecologia_Nutricional_de_Insetos_e_suas_Implicacoes_no_Manejo_de_Pragas) (21, Novembro, 2018).
  102. Jassim, S.A.A.; Naji, M.A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, 95, 412-427. DOI: doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02026.x. Disponível online: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-2672.2003.02026.x> (22, Novembro, 2018).
  103. Manimegalai, S.; Rajeswari, T.; Shanmugam R.; Rajalakshmi, G. Botanicals against nuclear polyhedrosis virus infecting three breeds of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Biopest.* **2010**, 3, 242-245. Disponível online: <http://www.jbiopest.com/users/lw8/efiles/manimegalai.pdf> (14, Novembro, 2018).
  104. Scott, B.R.; Patthak, M.A.; Mohn, G.R. Molecular and genetic basis of furonocoumarins reactions. *Mutat. Res.* **1976**, 39, 29-74. DOI: 10.1016/0165-1110(76)90012-9 Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13299> (21, Novembro, 2018).
  105. Song, P.S.; Tapley, K.J. Photochemistry and photobiology of psoralens. *Photochem. Photobiol.* **1979**, 29, 1177-1197. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1979.tb07838.x. Disponível online: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07838.x> (21, Novembro, 2018).
  106. Mason, T.L.; Wasserman, B.P. Inactivation of red beet beta-glucan synthesis by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry.* **1987**, 26, 2197-2202. Disponível online: <https://eurekamag.com/research/005/657/005657160.php> (12, Novembro, 2018).
  107. Tsuchiya, H.; Sato, Miyazaki, M.; Fujiwara, T.; Tanigaki, S.; Ohyama, S.; Tanaka, T.; Linuma, M. Comparative study on the antibacterial activity of photochemical flavanones against Methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* **1996**, 50: 27 - 34. DOI: 10.1016/0378-8741(96)85514-0 Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8778504> (12, Novembro, 2018).

108. Ya, C.; Gaffney, S.H.; Lilley, T.H.; Haslam, E. Carbohydrate polyphenol complexation. In: Chemistry and significance of condensed Tannins (Hemingway, R. W. and Karchesy, J. J. eds.) Plenum Press, New York, United States, 1988, 553p.
109. Felton, G. W. and Duffey.. Inactivation of baculovirus by quinines formed in insect-damaged plant tissues. *J. Chem. Ecol.* **1990**, *16*, 1221-1236. DOI: 10.1007/BF01021021. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24263722> (6, Dezembro, 2018).
110. Gogoi, J.; Nakhuru, K.S.; Policegoudra, R.S.; Chattopadhyay, P.; Rai, A.K.; Vee, V. Isolation and characterization of bioactive components from *Mirabilis jalapa* L. radix. *J. Tradit. Complement. Med.* **2015**, *6*, 41-47. DOI 10.1016/j.jtcm.2014.11.028. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26870679> (22, Novembro, 2018).
111. Bolognesi, A.; Polito, L.; Lubelli, C.; Barbieri, L.; Parente, A.; Stirpe, F. Ribosome-inactivating and adenine polynucleotide glycosylase activities in *Mirabilis jalapa* L tissues. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13709- 13716. DOI: 10.1074/jbc.M111514200. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11825901> (28, Novembro, 2018).
112. Latha, S.; Bhaskar, R.N.; Pallavi, Chikkalingaiah. Effect of botanical treatment to BmNPV polyhedral bodies on cocoon parameters of silkworm *B. mori* (PM x CSR2). *I. J. A. B. R.* **2011**, *1*, 45-51. Disponível online: [http://scienceandnature.org/IJABR\\_Vol1\(1\)2011/IJABR\\_V1\(1\)8.pdf](http://scienceandnature.org/IJABR_Vol1(1)2011/IJABR_V1(1)8.pdf) (21, Setembro, 2018).
113. Sivaprakasam, N. Botanical formulation for management of grasserie disease of silkworm, *Bombyx mori* L. *Proc. Natl. Sem. Trop. Seric.* **1999**, *1*, 335-337.
114. Mohanta, M.K.; Saha, A.K.; Saleh, D.K.M.A.; Hasan, M.A. Bioefficacy of some plant extracts against pathogenic bacteria isolated from diseased silkworm larvae. *Univ. j. zool. Rajshahi. Univ.* **2013**, *32*, 09-14. Disponível online: <http://journals.sfu.ca/bd/index.php/UJZR> (14, Setembro, 2018).
115. Chavan, J.A.; Bhawane, G.P. Effect of BmNPV infection and subsequent oral treatment of ethanolic plant extracts on cocoon and post cocoon characters in PM and CSR2 *B. mori* L. *Biolife.* **2016**, *4*, 475-481. DOI: 10.17812/blj.2016.4309. Disponível online: [https://www.researchgate.net/publication/312040306\\_Effect\\_Of\\_BmNPV\\_Infection\\_and\\_Subsequent\\_Oral\\_Treatment\\_Of\\_Ethanolic\\_Plant\\_Extracts\\_On\\_Cocoon\\_and\\_Post\\_Cocoon\\_Characters\\_In\\_PM\\_and\\_CSR2\\_B\\_Mori\\_L](https://www.researchgate.net/publication/312040306_Effect_Of_BmNPV_Infection_and_Subsequent_Oral_Treatment_Of_Ethanolic_Plant_Extracts_On_Cocoon_and_Post_Cocoon_Characters_In_PM_and_CSR2_B_Mori_L) (29, Novembro, 2018).
116. Gore, D.; Rai, M.; Shinde, G. Effect of Amla extract on bacterial infection in the Silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Pharm. Res.* **2014**, *8*, 679-680. Disponível online: <http://jpr solutions.info/files/final-file-56c0a262b94cc0.85593950.pdf> (8, Novembro, 2018).
117. Karthikairaj, L.; Isaiarasu, L.; Sakthivel, N. Efficacy of some herbal extracts on microbes causing flacherie disease in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Biopest.* **2014**, *7*, 89-93. Disponível online: [http://www.jbiopest.com/users/LW8/efiles/vol\\_7\\_0\\_89-93.pdf](http://www.jbiopest.com/users/LW8/efiles/vol_7_0_89-93.pdf) (21, Setembro, 2018).
118. Geeta, V.D.M.; Kedlaya, R Deepa, S.; Ballal, M. Activity of *Ocimum sanctum* (the traditional Indian medicinal plant) against the enteric pathogens. *Indian J Med Sci.* **2001**, *472*, 434-438. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12026506> (14, Novembro, 2018).
119. Thangavel, K.; Muthusamy, M.; Merlin, M.; Peaula, P.C. Evaluation of medicinal plants, *Embllica officinalis*, *Calendula officinalis*, *Cassia fistula*, *Allium sativum* and *Pelargonium hortroum* extract to grasserie diseased silk worm *Bombyx mori* L. *Int. J. Adv. Biol. Sci.* **2015**, *2*, 32-38. DOI: <http://s-o-i.org/1.15/ijarbs-2-11-6>. Disponível online: <https://www.ijarbs.com/pdfcopy/nov2015/ijarbs6.pdf> (20, Setembro, 2018).
120. Sujatha, K.; Sampath, A. Clove oil for the control of flacherie disease and its effect on economic traits of silkworm, *Bombyx mori* L., Lepidoptera; (Mbicidae). *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* **2015**, *6*, 1311-1323. Disponível online: [https://www.researchgate.net/publication/281962102\\_Clove\\_oil\\_for\\_the\\_control\\_of\\_flacherie\\_disease\\_and\\_its\\_effect\\_on\\_economic\\_traits\\_of\\_silkworm\\_Bombyx\\_moriL\\_Lepidoptera\\_Mbicidae](https://www.researchgate.net/publication/281962102_Clove_oil_for_the_control_of_flacherie_disease_and_its_effect_on_economic_traits_of_silkworm_Bombyx_moriL_Lepidoptera_Mbicidae) (9, Novembro, 2018).
121. Rudroju, S.S.; Akula, S.; Jang, S.; Kuntamalla, S. Effect of leaf and seed extracts of *T. cucumerina* L on antibacterial activity and economic traits of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Entomol. Zoo. Stud.* **2017**, *5*, 889-894. Disponível online: [www.entomoljournal.com](http://www.entomoljournal.com). (9, Novembro, 2018).
122. Somu, Chitra.; Paulchamy, Ramaraj.; Mothy S.M.; Sundaram, J. Antiviral activity of selected medicinal plants and marine seaweeds on the grasserie infected larvae of silkworm, *Bombyx mori*. *Arch Phytopathology Plant Protect.* **2017**, *50*, 850-867. Doi: 10.1080/03235408.2017.1401700. Disponível online: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03235408.2017.1401700> (22, Novembro, 2018).

123. Patel, J.P.; Tripathi, P.; Sharma, V.; Chauhan, N.S.; Dixit V.k. *Phyllanthus amarus*: Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: A review. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *138*, 286-313. DOI: 10.1016/j.jp.2011.09.040. Disponível online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111007112?via%3Dihub> (22, Novembro, 2018).
124. Wu Q, Liu L, Miron A, Klímová B, Wan D, Kuc K The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. *Arch. Toxicol.* **2016**, *90*, 1817-1840. DOI: 10.1007/s00204-016-1744-5. Disponível online: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00204-016-1744-5.pdf> (22, Novembro, 2018).
125. Badu, S.M.; Gopalaswamy, G.; Chandramohan, N. Identification of an antiviral principle in *Spilulina plantensis* against *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV). *I. Journ. Biotech.* **2005**, *4*, 384-388. Disponível online: [http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5746/1/IJBT%20\(3\)%20384-388.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5746/1/IJBT%20(3)%20384-388.pdf) (9, Novembro, 2018).
126. Naguchi, A.; Takeshita, H.; Shigematsu, H. Interrelationship between the silk gland and other tissues in protein metabolism in the latest larval stage of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Insect. Physical.* **1974**, *20*, 783-784. DOI: 10.1016/0022-1910(74)90170-X. Disponível online: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002219107490170X?via%3Dihub> (22, Novembro, 2018).
127. Orihara, Y.; Hamamoto, H.; Kasuga, H.; Shimada, T.; Kawaguchi, Y.; Sekimiz, K. A silkworm–baculovirus model for assessing the therapeutic effects of antiviral compounds: characterization and application to the isolation of antivirals from traditional medicines. *J. Gen. Virol.* **2007**, *89*, 188-194. DOI: 10.1099/vir.0.83208-0. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18089742>, (21, Setembro, 2018).
128. Bhattacharya, J.; Krishnan, N.; Chandra, A.K.; Das, N.K.; Sen, S.K. Reduction of mortality by some antibiotics in nuclear polyhedrosis of silkworm, *Bombyx mori* L. *A C.S.R.T.I.B.* **1998**, *38*, 161-164.
129. Slack, J.M.; Kuzio, J.; Faulkner, P. Characterization of *v-cath*, a cathepsin 1-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa-californica multiple* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* **1995**, *76*, 1091-1098. Doi: 10.1099/0022-1317-76-5-1091. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7730794> (6, Dezembro, 2018).
130. Bueno, P.S.A.; Biavatti, D.C.; Chiarello, A.S.G.; Fassina, V.A.; Fernandez, M.A.; Seixas, F.A.V. The structure of viral cathepsin from *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus as a target against grasserie: Docking and molecular dynamics simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2018**, *8*, 1-24. Doi: 10.1080/07391102.2018.1521344. [Epub ahead of print].
131. Chiarello, A.S.G.; Pessini, G.M.; Fassina, V.A.; Bueno, P.S.A.; Seixas, F.A.V.; Fernandez, M.A. Evaluation of biological and productive parameters of *Bombyx mori* L. caterpillars submitted to treatment with the Bm5 drug after infection with BmNPV baculovirus. (Em preparação).



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Avaliação de parâmetros biológicos e produtivos de *Bombyx mori* L. inoculados com o *BmNPV* e tratados com o fármaco Bm5**

A.S.G. Chiarello<sup>1</sup>, G.M. Pessini<sup>1</sup>, V.A. Fassina<sup>1</sup>, P.S.A. Bueno<sup>2</sup>, F.A.V. Seixas<sup>2</sup>, M.A. Fernandez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 87020-900, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual de Maringá, campus Umuarama, Umuarama, 87506-370, Paraná, Brasil.

\*Autor correspondente: Telefone.: +554430115398, E-mail: mafernandez@uem.br

## Resumo

O amarelidão, doença causada pelo *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (*BmNPV*) provoca prejuízos para o setor produtivo de seda. O *BmNPV* é um vírus altamente infectivo, e até o momento, a doença causada pelo mesmo não foi controlada de forma eficaz. Seu processo de infecção é facilitado devido a presença de enzimas hidrolíticas virais como a catepsina viral (V-Cath) e a quitinase (V-CHIA), que promovem a liquefação do corpo das lagartas infectadas contribuindo para transmissão horizontal do vírus. O objetivo desse estudo foi avaliar um novo fármaco, Bm5, construído através de modelagem molecular para inibir a catepsina viral (*BmNPV*-Cath) em lagartas do quinto ínstar inoculadas com o *BmNPV*, no intuito de prevenir a liquefação de lagartas contaminadas e a propagação da contaminação. Os ensaios foram conduzidos para a avaliação dos parâmetros relacionados a produtividade do cultivo, quando utilizado estritamente a Concentração Letal de dose Viral  $CL_{50}$  quando da infecção experimental. Os resultados obtidos mostraram que, independentemente da aplicação do fármaco, em uma ou dividida em três doses sequenciais, foram observados liquefação do tegumento de lagartas infectadas, não reduzindo o índice de mortalidade das lagartas. Este fato pode ser atribuído que a manutenção da atividade de demais enzimas hidrolíticas virais foram suficientes para que a infecção ocorresse. Em conclusão para afetar a propagação da infecção do *BmNPV* é necessário um inibidor de amplo espectro para enzimas hidrolíticas virais, o que pode levar a infecção horizontal.

**Palavras chave** Bicho-da-seda, *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, Catepsina viral

## Introdução

O *Bombyx mori*, lepidotera Bombycidae, é um inseto domesticado e tem sido utilizado para a produção de fios de seda a mais de 5.000 anos (Panthee *et al.* 2017). A sericicultura atualmente contribui para a economia de muitos países ( Jiang & Xia 2014), entre eles o Brasil, conhecido por exportar fios de seda de excelente qualidade (SEAB 2011; Sabbag *et al.* 2013). Segundo Relatório Takii (SEAB 2017), a produção nacional na safra 2016/2017 foi 2,99 toneladas de casulos verdes, sendo o estado do Paraná o maior produtor com 2,46 t concentrando 83% da produção brasileira, seguido de São Paulo e Mato Grosso do Sul.

Entretanto, como em outras atividades agroindustriais, a sericicultura enfrenta muitos desafios, sobre tudo, devido a susceptibilidade do cultivo a patógenos (Lu *et al.* 2018). Fatores como temperatura, umidade (Hussain *et al.* 2011; Rahmathulla 2012; Porto 2016), acúmulo de resíduos orgânicos, ciclo de vida curto da lagarta e a densidade de insetos em um único local, contribuem para o aparecimento de entomopatógenos causando inúmeras doenças, interferindo diretamente na produtividade do setor (Porto *et al.* 2005; Brancalhão *et al.* 2013).

Dentre os patógenos que acometem o *B. mori* destacam-se o *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (*BmNPV*), pertencente ao gênero *Alphabaculorivus* e família *Baculoviridae* (Jehle *et al.* 2006). Este vírus acarreta prejuízos para a sericicultura mundial (Jiang & Xia 2014; Dong *et al.* 2015). A contaminação se inicia quando a lagarta ingere folhas de amoreira (*Morus sp.*) com o *BmNPV*. Durante o ciclo infeccioso dois fenótipos são produzidos; o vírus broto – *Budded virus* - BV e o vírus derivado da oclusão – *Occlusion derived virus* - ODV (Rohrmann 2013), sendo os ODVs responsáveis pela transmissão horizontal entre os hospedeiros e pela infecção primária das células colunares do intestino médio da larva de insetos (Granados *et al.* 1986). O

BV é responsável pela infecção célula a célula processo facilitado devido a glicoproteína de membrana gp64, proteína que está envolvida na fusão do fenótipo BV com a célula hospedeira culminando com a infecção sistêmica no inseto (Blissard & Wenz 1992).

A manifestação da doença no hospedeiro é acompanhada por uma variedade de mecanismos fisiológicos e vias biológicas (Wang *et al.* 2018), que levam ao comprometimento da capacidade motora e diminuição da alimentação, culminando na morte de muitos indivíduos. A morte é acompanhada do rompimento do seu tegumento, fato que contribui para a infecção horizontal, pois o conteúdo leitoso liberado durante esse processo é repleto de poliedros e, dessa forma, contaminam a cama de cultivo possibilitando a infecção de outras lagartas (Volkman & Keddie 1990). A ação das enzimas hidrolíticas virais catepsina viral (V-Cath) e quitinase viral (V-CHIA) auxiliam na degradação e rompimento do tegumento (Katsuma *et al.* 2009), contribuindo para esse tipo de transmissão horizontal dos vírus (Hom & Volkman 2000).

Diante disso, a inibição destas enzimas poderia contribuir para interromper a ruptura do tegumento do hospedeiro e conseqüentemente diminuir a quantidade de lagartas infectadas reduzindo os prejuízos do setor sericícola causados pelo amarelidão. Considerando a importância da sericultura para o Estado do Paraná que concentra mais de 83% da produção de casulos no Brasil e a grande demanda apresentada por sericultores, faz-se necessário a investigação de compostos que possam minimizar ou até mesmo combater o vírus causador do amarelidão. Assim, o presente trabalho avaliou a ação do fármaco Bm5 (Bueno *et al.* 2018), sobre os parâmetros biológicos e produtivos de lagartas inoculados com a Concentração Letal Viral de dose CL<sub>50</sub>, do *BmNPV*.

## **Materiais e métodos**

## Material biológico

As lagartas híbridas de *Bombyx mori*, utilizadas neste trabalho, foram fornecidas pela empresa Fiação de Seda Bratac S/A PR, Brasil, no terceiro instar. O experimento foi conduzido no laboratório de Melhoramento Genético do Bicho-da-seda da Universidade Estadual de Maringá - UEM. As lagartas foram criadas dentro de caixas plásticas em sala climatizada ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) com fotoperíodo 14h: 10h (Luz: Escuro) e umidade relativa de aproximadamente 70% ( $\pm 10\%$ ) em caixas de criação, até o final de seu ciclo de vida, sendo alimentadas três vezes ao dia com folhas frescas de amoreira (*Morus sp*).

## Inoculação das lagartas

Os ensaios de infecção viral foram realizados com lagartas no primeiro dia do quinto instar (24 horas após a ecdise). Neste dia, a infecção foi realizada por meio de uma suspensão de inóculo do *BmNPV* (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus), isolado geográfico do Paraná-Brasil, a uma Concentração Letal Viral de dose de  $8 \times 10^8$  cops/mL (cops = corpos de oclusão poliédricos por mililitro). Foram aplicados 10  $\mu\text{L}$  da suspensão viral sobre discos foliares de amoreira em forma de gota (12,25  $\text{cm}^2$  de diâmetro), e fornecidos como alimento para as lagartas do grupo infectado. Durante a alimentação as lagartas permaneceram confinadas individualmente dentro de copos descartáveis para assegurar a ingestão de toda a suspensão viral (Material suplementar, Fig. S1A, B e C). Foram realizados três grupos de lagartas infectadas com o *BmNPV*, cada grupo contendo 60 lagartas. Um grupo controle, denominado *BmNPV*, grupo *BmNPV+Pluronic* e grupo *BmNPV+Bm5*.

## Inoculação do inibidor *BmNPV-Cath*



O inibidor testado foi o Bm5 (Bueno *et al.* 2018). A solução contendo o inibidor foi dissolvida na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> na presença de 0,02% de Pluronic-F127, utilizado como veículo, em água destilada. Foi realizado dois grupos com 60 lagartas cada grupo, denominados *BmNPV+ Bm5* (1), dose única e *BmNPV+Bm5* (3), três doses.

### Administração do Bm5

Cinco grupos contendo 60 lagartas cada foram divididos em: *Controle Negativo* (sem inoculações de vírus e Bm5, tratadas somente com água); *Controle Pluronic* (sem inoculação do vírus e tratadas com pluronic-F127 a 0,02%); *BmNPV+Pluronic* (infectado com o vírus e tratadas com o veículo pluronic-F127 a 0,02%); *BmNPV* (infectado com vírus e tratadas com o veículo pluronic-F127 a 0,02%); *BmNPV* (infectado com vírus e tratadas com água); *BmNPV+ Bm5* (infectado com vírus e tratadas com Bm5). O tratamento dose única foi realizado no quarto dia pós-infecção (DPI) utilizando 15 µL de solução de Bm5. No tratamento, três doses, o fármaco foi fornecido as lagartas no terceiro, quarto e quinto dia do quinto instar, 6 µL da solução de Bm5 para os respectivos dias conforme descrito anteriormente (Bueno *et al.* 2018; Material suplementar, Fig. S2). Os tratamentos foram realizados com a ingestão de folhas contendo as respectivas substâncias sejam elas placebo ou o fármaco.

### Sintomatologia e parâmetros produtivos

A confirmação da infecção pelo *BmNPV* foi determinada pelo acompanhamento dos sinais apresentados pelas lagartas, como os descritos por Ribeiro *et al.* (2009a) de

alterações na coloração do tegumento e inchaço das membranas segmentares, diarreia, vômito e pela presença de poliedros na hemolinfa, através de pulsão da hemolinfa (Senem *et al.* 2016; Material suplementar, Fig. S3).

Os seguintes parâmetros foram analisados: porcentagem de mortalidade das lagartas (ML); quantidade de casulos produzidos (QC); peso médio em gramas dos casulos (PC); peso da casca sérica em gramas (PCS); porcentagem de teor de seda, (TS), para o cálculo de teor de seda líquida foi utilizada a seguinte fórmula:

$(PCS/PC) \times 100 - 24\%$ , porção não fiável (Oliveira *et al.* 2010). Porcentagem de pupas mortas, (MP). Foram observados nos ensaios também os sinais clássicos como apresentação da parada na alimentação, vômito, desenvolvimento irregular e problemas na ecdise (Brancahão *et al.* 2003).

### Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), quatro repetições por tratamento. Quinze lagartas de *B. mori* foram usadas por repetição. Os dados obtidos através das avaliações foram submetidos a análise de variância, seguido de teste de média DUNNETT ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o programa computacional SISVAR 5.6 (Ferreira 2011).

## Resultados e Discussão

### Análise do efeito do Bm5 em lagartas infectadas pelo BmNPV

Os dados referentes aos dois bioensaios estão resumidos na Tabela 1 (aplicação do fármaco dose única) e Tabela 2 (aplicação do fármaco em três doses). Os sinais da infecção viral começaram a manifestar no quarto DPI, com perda de apetite, mudança na cor do tegumento, deslocamento aleatório marcado por traços líquidos brancos, geotropismo negativo tais como descrito por Brancalhão *et al.* (2003) e observado por Ribeiro *et al.* (2009a). Sendo que, as lagartas do grupo controle negativo não manifestaram sintomas do amarelidão.

As lagartas de híbrido comercial infectadas com *BmNPV*, foram avaliadas em relação às variáveis biológicas e produtivas após submissão ao tratamento com o fármaco Bm5, testando dose única (Tabela 1), realizado no quarto DPI e, três doses do tratamento realizadas no terceiro, quarto e quinto DPI. Analisando o limiar de confiança de 95 % para os parâmetros estudados observou-se que, independente da dose de Bm5 (dose única ou três doses), não foram detectadas diferenças significativas na taxa de mortalidade de lagartas em função do tratamento em ambos os bioensaios.

**Tabela 1** Parâmetros biológicos e produtivos de lagartas infectadas pelo *BmNPV*. O inóculo viral foi administrado na Concentração Letal Viral de dose  $CL_{50}$  ( $8 \times 10^8$  ceps/mL) submetidas ao tratamento com o fármaco Bm5 em dose única realizado no quarto dia pós infecção. Porcentagem de mortalidade das lagartas, ML (%); quantidade de casulos, QC; peso dos casulos em gramas, PC (g); peso da casca sérica em gramas, PCS (g); porcentagem do teor de seda, TS (%); porcentagem de mortalidade das pupas MP (%).

Tratamentos	ML (%)	QC	PC (g)	PCS (g)	TS (%)	MP (%)
Controle Negativo	0,00*	15*	2,00	0,44	16,78	8,33*
Controle Pluronic	0,00*	14*	2,23	0,49	16,59	6,67*
<i>BmNPV</i> +Pluronic	51,67	6,75	1,96	0,46	17,86	29,63
<i>BmNPV</i> +Bm5	40,00	8,25	2,01	0,51	19,35	57,57*
<i>BmNPV</i>	48,33	7,5	2,03	0,49	18,31	33,33

\*Dados diferem estatisticamente do valor médio da amostra contaminada pelo *BmNPV* sem tratamento através do teste de DUNNETT ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2** Parâmetros biológicos e produtivos de lagartas infectadas pelo *BmNPV*. O inóculo viral foi administrado na Concentração Letal Viral de dose  $CL_{50}$  ( $8 \times 10^8$  ceps/mL) submetidas ao tratamento com o fármaco Bm5 em três doses, realizados no terceiro, quarto e quinto dia do quinto instar. Porcentagem de mortalidade das lagartas, ML (%); quantidade de casulos, QC; peso de casulos em gramas, PC (g); peso da casca sérica em gramas, PCS (g); porcentagem do teor de seda, TS (%); porcentagem de mortalidade das pupas MP (%).

Tratamentos	ML (%)	QC	PC (g)	PCS (g)	TS (%)	MP (%)
<b>Controle Negativo</b>	0,00*	14,5*	2,12*	0,46	16,48	0,00*
<b>Controle Pluronic</b>	0,00*	14*	2,24*	0,49*	16,65	1,66*
<b><i>BmNPV</i>+Pluronic</b>	58,33	6,25	1,76	0,41	17,79	49,32
<b><i>BmNPV</i>+Bm5</b>	43,33	8,25	1,53	0,37	18,15	50,62
<b><i>BmNPV</i></b>	51,67	7	1,58	0,37	17,94	48,55

\*Dados diferem estatisticamente do valor médio da amostra contaminada pelo *BmNPV* sem tratamento através do teste de DUNNETT ( $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos podem ser explicados devido ao tratamento ter sido realizado em um período em que já se observava os principais sinais da doença viral (Branca-lhão *et al.* 2003). A aplicação do fármaco foi realizada nesse período, porque é onde normalmente, os produtores visualizam os primeiros indícios da infecção viral. Portanto, é possível que o comprometimento tecidual pelo vírus fosse bem avançado fato que poderia contribuir para menor eficácia do fármaco.

Outra característica que possa ter interferido negativamente nesses resultados é o prolongamento do estágio larval. Em média os grupos infectados (*BmNPV+Bm5* e *BmNPV*) do presente estudo apresentaram duração equivalente no quinto instar larval entre 10/11 dias. Semelhante ao observado por Brancalhão *et al.* (2002) e Ribeiro *et al.* (2009b) com tempos de duração do estágio larval de 9 a 11 dias em híbridos comerciais infectados. Para o grupo controle foi observado intervalo do último estágio larval de 9 dias. Asha *et al.* (2012) visualizaram uma média de 9,97 dias em híbridos do grupo controle, enquanto no grupo infectado com o vírus foi de 10,67 dias. O prolongamento do estágio larval em lagartas infectadas pode ocorrer através do gene *EGT* (Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase; Katsuma 2015), presente no genoma dos baculovírus, que codifica a produção da enzima UDP-glicosiltransferase, responsável pela inativação dos ecdisteróides do hospedeiro, envolvidos na regulação do desenvolvimento larval e na ecdise. Esta enzima bloqueia a capacidade da lagarta de passar para estádios posteriores, adiando o ciclo de vida, possivelmente para aumentar a replicação viral e conseqüentemente, aumentar a produção de poliedros (Katsuma 2015).

Esses mesmos fatores podem ser também utilizados para explicar a taxa de mortalidade elevada das pupas (Tabelas 1 e 2). Visto que o comprometimento tecidual e o prolongamento do estágio larval podem ter ocasionado um processo irreversível da

infecção impedindo que o fármaco fosse eficiente para esse estágio de desenvolvimento da infecção.

A análise visual realizada diariamente mostrou que as lagartas em estágios avançados da doença sofreram liquefação do tegumento, independente do tratamento (Material suplementar, Fig. S4). Estes resultados também foram descritos por Bueno *et al.* (2018). Adicionalmente, esse efeito pode estar relacionado com o fato que a liquefação não seja apenas provocada pela catepsina viral, mais também por quitinas virais (Hawtin *et al.* 1995). Diante disso, atribuímos a esses resultados o fato de que nesse trabalho foi utilizado somente o fármaco Bm5, específico para *BmNPV-Cath*.

### Avaliação dos parâmetros produtivos

Em termos de sericicultura, além dos dados referentes a mortalidade de lagartas, deve-se também verificar àqueles relacionados a produtividade. Nesse sentido, a avaliação dos seguintes parâmetros foi realizada: QC - quantidade de casulos formados; PC - peso do casulo; PCS - peso da casca sérica; TS - teor de seda, cujos resultados são apresentados nas tabelas 1 e 2. A quantidade de casulos está diretamente relacionada com o peso do casulo, portanto, quanto maior a peso, melhor será o rendimento na produção de fios de seda. O teor de seda TS, por outro lado, é o resultado da relação PCS e PC, definindo, junto com outros fatores qualitativos e quantitativos, a atribuição de valores para o produto (Porto *et al.* 2008).

Por conta do amarelidão, muitas lagartas não sobrevivem antes de construírem o casulo e, as que produzem casulos nessas condições, em geral morrem no seu interior (Brancahão *et al.* 2013). Diante disso, os casulos são de baixa qualidade afetando economicamente todo o setor produtivo de seda (Watanabe *et al.* 2000).

A variável quantidade de casulos formados QC apresentou média 8,25 para os dois bioensaio dose única e três doses - com o tratamento Bm5 (Tabela 1 e 2). Esses resultados foram inferiores ao observado no controle negativo que apresentou médias de 15 e 14,5 (bioensaio dose única e três doses respectivamente). Da mesma forma, Brancalhão *et al.* (2013), quando analisaram o desinfetante formulado de sódio dicloroisocianurato usado na inativação do *BmNPV* obtiveram resultado de QC estatisticamente inferior ao apresentado pelo controle, representando que sob as condições do experimento o composto utilizado interferiu negativamente nesse índice de produtividade.

Através do parâmetro PC é possível fazer uma inferência do desenvolvimento larval, avaliar a sanidade da crisálida, caracterizar os padrões de raça, obter uma estimativa da produção de seda e, além disso, é o principal parâmetro para comercialização do produto junto com o teor de seda (Almeida & Porto 2008).

De maneira geral, o desempenho das lagartas tratadas com o fármaco Bm5, no ensaio dose única, não mostraram diferença significativa com o grupo avaliado, *BmNPV*. Esses resultados se assemelham ao observado por Porto *et al.* (2005) com média geral do PC de 1,92g, trabalhando com extrato de *Mirabilis jalapa* utilizado como inibidor natural contra patógenos oportunistas. Também, Porto & Okamoto (2000), não observaram valores diferentes quando da análise dos parâmetros de linhagens de *B. mori*. Os resultados obtidos nesse trabalho foram superiores ao observado por Pares *et al.* (2017) com PC variando entre 1,48 a 1,59 g, utilizando produtos fitossanitários alternativos para o controle e prevenção de calcinose branca em *B. mori*. Na prática, para os sericultores que comercializam os casulos por peso, sendo estes mais pesados resultam em maiores rendimentos no valor final da produção (Okamoto e Rodella, 2004).

Contudo, o PC, nos ensaios com três doses do Bm5, observou-se valores de médias inferiores para o peso do casulo (Tabela 2). Com isso, podemos inferir que houve a formação de casulos de casca fina, uma das características avaliadas pelo setor que depreciam o valor dos casulos.

Em relação a variável PCS, as médias apresentadas por ambos os tratamentos são semelhantes as observadas na literatura como apresentadas por Porto *et al.* (2005) que verificaram valores de PCS que variam entre 0,36 a 0,38 g. Fernandes *et al.* (2017) que verificaram valores de PCS que variam entre 0,27 a 0,31 g utilizando calda bordalesa nas folhas de amoreira ofertadas a lagartas de *B. mori*. Entretanto, nos híbridos utilizados para esses bioensaios, a variável PCS é normalmente maior do que o máximo descrito por Porto *et al.* (2005), o que pode ser determinante para apresentar um TS maior do que os controles analisados, embora sendo que os dados não diferem estatisticamente.

O teor de seda TS é uma característica importante na determinação da qualidade do casulo, pois representa a porcentagem de fio efetivamente extraído do casulo e, portanto, consistindo no principal componente para a definição do valor do casulo verde no momento da comercialização (Okamoto & Rodella 2004).

As médias de TS apresentadas nos dois bioensaios foram de 19,35% (dose única) e 18,15% (três doses). Porto & Okamoto (2003) observaram um valor médio de 16,01%, com variações entre 15,34 e 16,83%. Porto *et al.* (2004) obteve um TS médio de 16,53%, com variação de 15,99 a 17,25%. Tais valores foram superiores aos encontrados por Pares *et al.* (2017) que relatam em seu estudo, oscilação entre 13,2 e 17,3% de teor de seda líquida produzida pelas lagartas de *B. mori* quando alimentadas com folhas de amoreira que foram pulverizadas com produtos fitossanitários.



Face aos resultados obtidos, é possível constatar que o emprego do fármaco Bm5, não causou efeitos depreciativos na produção do casulo de seda, mesmo que estatisticamente não tenha representado resultado superior ao *BmNPV* observado nesse experimento. Ainda, é possível que, as lagartas se utilizem de estratégias fisiológicas para ajustar o desenvolvimento fato que poderia explicar essa melhora no teor de seda, hipótese proposta por Porto *et al.* (2005), assim como o observado por Crocomo & Parra (1985), em lagartas de *Spodoptera Frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) descrito por Parra (1991) e observado por Paul *et al.* (1992) em *Bombyx mori*. Considerando os efeitos drásticos da infecção causada pelo *BmNPV* sobre o bicho-da-seda e conseqüentemente a sericicultura, a comunidade científica busca alternativas mais eficientes que visem amenizar os efeitos do amarelidão para que possa contribuir com os métodos de profilaxia empregados pelos produtores ou substituir a utilização de compostos tóxicos que representam risco de intoxicação das lagartas e também dos produtores rurais (Brancahão *et al.* 2013).

A literatura mais atual mostra outras linhas de pesquisa envolvendo esse tema, como a descoberta de moléculas antivirais e suas funções, possibilitando a compreensão das respostas imunes inatas do *B. mori* contra *BmNPV* (Jiang & Xia 2014; Lu *et al.* 2018; Chen *et al.* 2018). Métodos que impeçam a liquefação do corpo morto da lagarta, impedindo a transmissão horizontal viral (Bueno *et al.* 2018), pode contribuir de modo significativo nessa área de atuação. Estes registros permitem entender melhor os mecanismos utilizados pelo vírus para disseminar-se no ambiente, possibilitando traçar estratégias e desenvolver métodos para prevenir a infecção pelo *BmNPV*.

Bueno *et al.* (2018) utilizando o fármaco Bm5 para o tratamento de lagartas infectadas com o *BmNPV*, observou a redução na mortalidade de lagartas em torno de

22,6 % e de 47,05% de pupas, com relação à amostra infectada pelo *BmNPV* sem tratamento, utilizando Concentração Letal Viral de dose  $CL_{20}$  ( $3 \times 10^6$  COPS/mL). No presente estudo, utilizando a Concentração Letal Viral de dose de  $8 \times 10^8$  COPS/mL, observou-se que, no bioensaio dose única e/ou três doses, a porcentagem média de mortalidade de lagartas foi de 42% e de, 54 % de pupas. Nesse sentido, considerando a concentração de  $CL_{50}$  empregada nesse experimento, é possível que ao tratar as lagartas logo após a infecção, anteriormente a visualização dos sintomas da infecção, ou possivelmente com a adição de mais doses concentradas do fármaco a mortalidade de lagartas e pupas seja reduzida.

Outro ponto a ser questionado é o que ocorre quando de uma infecção no cultivo do produtor, qual seria a concentração Letal Viral de dose que ocasiona a perda da produção? Sabe-se que os surtos de doenças são impulsionados pela quantidade de inóculo inicial e pela taxa de transmissão, de maneira geral, o nível em que a doença se torna aparente depende em grande parte da capacidade do produtor para reconhecer a doença. Entretanto, muitas vezes a doença permanece indetectável, ou, os sinais são visualizados quando a doença atingiu os níveis epidêmicos letais, dificultando qualquer forma de intervenção. A dificuldade de se quantificar focos de infecção viral inicial em um cultivo, é extremamente difícil e tentativas de se estimar esses parâmetros são atualmente propostas (Gani *et al.*, 2017).

De qualquer modo, é extremamente plausível de que experimentos futuros devem ser delineados para determinar as condições adequadas para que o fármaco Bm5 ou compostos de atividade relacionada, possam ser testados para a redução da transmissão do *BmNPV*, permitindo que o produtor possa ter uma fração acentuada de produtividade nas condições de infecção pelo baculovirus.

## **Agradecimentos**

Esse trabalho recebeu recursos da Fundação Araucária (Processos 147/14 e 40/16); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo 305960/2015-6); União Europeia (Projeto SEDA – Processo LA/2016/378-553) e Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, UGF. Os autores agradecem a Fiação de Seda BRATAC S.A., pela cooperação e fornecimento de lagartas híbridas comerciais e pelo suporte do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa – COMCAP/UEM, na utilização de equipamentos.

## Referências Bibliográficas

- Almeida J.E. & Porto A.J. (2008) Variação do peso do casulo em raças de bicho-da-seda durante a metamorfose. *Boletim de indústria animal*, **65**, 225-230.
- Asha M.H., Bhaskar R.N., Naika R., Gowda M. & Raghunath B.V. (2012) Influence of silkworm breeds and their hybrids to BmNPV on fifth instar larval duration (days), pupal duration (days) and silk productivity (cg/day). *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, **9**, 69-73.
- Blissard G.W. & Wenz J. R. (1992) Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *Journal of Virology*, **66**, 6829-6835.
- Brancahão R.M.C., Ribeiro L.F.C., Torquato E.F.B., Fernandez M.A., Munhoz R.E.F., Colombelli K.T. & Costa T.R.G. (2013) Avaliação antiviral do formulado de sódio dicloroisocianurato contra o nucleopolyhedrovírus do Bicho-da-seda. *Arquivos do Instituto Biológico*, **80**, 233-235.
- Brancahão R.M.C., Souza V.B.V. & Soares M.A.M. (2002) Infecção causada por nucleopolyhedrovirus nas células gordurosas de *Bombyx mori* L. 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). *Arquivo do Instituto de Biológico*, **69**, 57-63.
- Brancahão, R.M.C. & Ribeiro L.F.C. (2003) Citopatologia da infecção causada por BmNPV no tegumento de *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, **6**, 15-20.
- Bueno P.S.A., Biavatti D.C., Chiarello A.S.G., Fassina V.A., Fernandez M.A & Seixas F.A.V. (2018) The structure of viral cathepsin from *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus as a target against grasserie: Docking and molecular dynamics simulations. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* (Accepted for publication 31 august 2018).

- Chen T., Tan L., Hu N., Dong Z., Hu Z., Jiang Y., Chen P., Pan M. & Lu C. (2018) C-lysozyme contributes to antiviral immunity in *Bombyx mori* against nucleopolyhedrovirus infection. *Journal of Insect Physiology*, **108**, 54-60.
- Crocomo W.B. & Parra J.R.P. (1985) Consumo e utilização de milho, trigo e sorgo por *Spodoptera Frugiperda* (J.E.Smith 1797) (Lepidoptera, Nocitividae). *Revista Brasileira de Entomologia*, **29**, 225-260.
- Dong X.L., Liu H., Wang W., Pan C.X., Wu Y.F., Du G.Y., Chen P., Lu C. & Pan M.H. (2015) *BmREEPa* Is a Novel Gene that Facilitates BmNPV Entry into Silkworm Cells. *PloS ONE*, **10**, 1-17.
- Fernandes J., Nicodemo D., Oliveira J.E., Silva F.A., Fidelis M.E.A., SILVA L.E., Tonoli, G.H.D. (2017) Enhanced silk performance by enriching the silkworm diet with bordeaux mixture. *Journal of Materials Science* **52**, 2684-2693.
- Ferreira D.F. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, **35**, 1039-1042.
- Gani M., Chouhan S., Babu Lal., Gupta R.K., Khan G., Kumar B.N. (2017) *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmBPV): Its impact on silkworm rearing and management strategies. *Journal of Biological Control*, **31**, 189-193.
- Hawtin R.E., Arnold K., Ayres M.D., Zanotto P.M.D., Howard S.C., Gooday G.W., Chappell, L. H., Kitts, P. A., King, L. A. & Possee, R. D. (1995) Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology*, **212**, 673-685.
- Hom L.G. & Volkman L.E. (2000) *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus *chiA* is required for processing of V-CATH. *Virology*, **277**, 178-183.
- Hussain M., Naeem M., Khan S.A., Bhatti M.F., Munawar M. (2011) Studies on the influence of temperature and humidity on biological traits of silkworm (*Bombyx*

- mori* L.; Bombycidae). *African Journal of Biotechnology* , *Abraka*, **10**, 12368-12375.
- Jehle J.A., Blissard G.W., Bonning B.C., Cory J.S., Herniou E.A., Rohrmann G.F., Theilmann D.A., Thiem S.M. & Vlak J.M. (2006) On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of Virology*, **151**, 1257-1266.
- Jiang L. & Xia Q. (2014) The progress and future of enhancing antiviral capacity by transgenic technology in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **48**, 1-7.
- Katsuma S. (2015) Baculovirus Controls host caterpillars by manipulating host physiology and behavior. *Agri-Bioscience Monographs*, **5**, 1-27.
- Katsuma S., Nakanishi T., Daimon T. & Shimada T. (2009) N-linked glycans located in the pro-region of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus V-CATH are essential for the proper folding of V-CATH and V-CHIA. *Journal General Virology*, **90**, 170-176.
- Lu P., Pan Y., Yang Y., Zhu F., Li C., Guo Z., Yao Q. & Chen K. (2018) Discovery of anti-viral molecules and their vital functions in *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **154**, 12-18.
- Okamoto F., Rodella R.A. (2004) Produção de casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) e sua relação com características morfológicas e bromatológicas da folha de amoreira (*Morus* sp.). *Boletim de Indústria Animal*, **61**, 91-99.
- Oliveira J.R., Ferreira G.A., Oliveira F.C., Bezagio R.C., Zanetti E.A., Signorini T., Volpini A.F.N., Tanabe A.p., Fabrin T.M.C., Jambersi V.L. & Calderon R.N. (2010) Avaliação da dosagem de própolis pulverizada nas folhas de amoreira (*Morus* sp.) sobre o desenvolvimento biológico e produtivo do bicho-da-seda

- (*Bombyx mori* L.). *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, **13**, 71-75.
- Panthee S., Paudel A., Hamamoto H & Sekimizu K. (2017) Advantages of the silkworm as a animal model for developing novel antimicrobial agents. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 1-8.
- Pares R.B., Alves L.F.A., Mamprim A.P., Bonini A.K. (2017) Alternative phytosanitary products against to white muscardine in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, **84**, 1-7.
- Parra J.R.P. (1991) Consumo e utilização de alimentos por insetos. In: Panizzi, A.R. & Parra J.R.P. (Eds.). *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. São Paulo: Manole p. 9-66.
- Paul D.C., Rao G.S.& Deb D.C. (1992) Impact of dietary moisture on nutritional indices and growth of *Bombyx mori* and concomitant larval duration. *Journal of Insect Physiology*, **38**, 229-235.
- PAWAN SAINI<sup>1</sup> and M. K. GHOSH<sup>1</sup>Granados R.R., Derksen A.C. & Dwyer K.G. (1986) Replication of the *Trichoplusia ni* granulosis and nuclear polyhedrosis viruses in cell cultures. *Virology*, **152**, 472-476.
- Porto A.J. & Okamoto F. (2000) Sistemas de utilização de dois cultivares de amoreiras em duas idades de crescimento vegetativo, no desempenho do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). *Boletim de Indústria Animal*, **57**, 171-178.
- Porto A.J. & Okamoto F. (2003). Desempenho produtivo de quatro raças do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) e seus cruzamentos. *Boletim de Indústria Animal*, **60**, 179-184.
- Porto A.J. (2008) Avaliação de híbridos duplos do *Bombyx mori* L. formados por combinações de acasalamentos. *Veterinária e Zootecnia*, **15**, 131-138.

- Porto A.J. (2012) Performance of races of *Bombyx mori* L under conditions temperature limits. *Ciências Agrárias*, **33**, 1263-1272.
- Porto A.J., Funari S.R.C. & Dierckx S.M.A.G. (2004) Avaliação da idade de corte de dois cultivares de amoreira nos desempenhos biológico e produtivo do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). *Revista de Educação Continuada de Medicina e Zootecnia CRMV-SP*, **7**, 55-56.
- Porto A.J., Okamoto F., Ikuno A.A., Ferreira V.C.A. & Margatho L.F.F. (2005) Avaliação biológica e produtiva do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) alimentado com folhas de amoreira pulverizadas com extrato de *Mirabilis jalapa*. *Arquivo Instituto Biológico*, **72**, 445-453.
- Porto, A. J. (2016) Medidas Profiláticas na Criação do Bicho-da-Seda. *Pesquisa e Tecnologia*, **13**, 1-5.
- Rahmathulla V.K. (2012) Management of climatic factors for successful silkworm (*Bombyx mori* L.) crop and higher silk production: Review. *Psyche: A Journal of Entomology*, **1**, 1-12.
- Ribeiro L.F.C., Brancalhão R.M., Torquato E.F. & Fernandez M.A. (2009a) Susceptibility of the *Bombyx mori* Cardia Cells to *Nucleopolyhedrovirus*, multiple subgroup, BmMNPV. *Journal of Invertebrate Pathology*, **100**, 195-198.
- Ribeiro L.F.C., Zanatta D.B., Bravo J.P., Brancalhão R.M.C. & Fernandez M.A. (2009b). Molecular markers in commercial *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) hybrids susceptible to multiple nucleopolyhedrovirus. *Genetics and Molecular Research*, **8**, 144-153.
- Rohrman G.F. (2013) *Baculovirus Molecular Biology*. 3<sup>a</sup> ed. Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (EUA), Bethesda (MD).



- Sabbag O.J., Nicodemo D. & Oliveira J.E.M. (2013) Custos e viabilidade econômica da produção de casulos do bicho-da-seda. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, **43**, 187-194.
- Secretaria da agricultura e do abastecimento - SEAB. (2011) Análise da conjuntura agropecuária safra 2010/2011. Sericicultura. Curitiba: PR. Disponível em:>[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/seda\\_2010\\_11.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/seda_2010_11.pdf)<. Acesso em: 22 jun. 2018.
- Secretaria da agricultura e do abastecimento - SEAB. (2017) Análise da conjuntura agropecuária safra 2016/2017. Sericicultura. Curitiba: PR. Disponível em:<[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2018/Sericicultura\\_2016\\_17.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2018/Sericicultura_2016_17.pdf)>. Acesso em: 22 jun. 2018.
- Senem J.V., Torquato E.F.B., Ribeiro L.F.C. & Brancalhão R.M.C. (2016) Cytopathology of the trachea of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Micron*, **80**, 39-44.
- Sezgin Z., Yuksel N. & Baykara T. (2006) Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **64**, 261-268.
- Slack J.M. & Faulkner P. (1995) Characterization of *v-cath*, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosisvirus. *Journal of General Virology*, **76**, 1091-1098.
- Volkman L.E. & Keddie B.A. (1990) Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. *Seminars in Virology*, **1**, 249-256.
- Wang L., Xiao Q., Zhou X.L., Zhu Y., Dong Z.Q., Peng C., Pan M.H. & Lu C. (2018) *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis virus (BmNPV) induces host cell autophagy to benefit infection. *Viruses*, **10**, 2-14.

Watanabe, J.K., Yamaoka R.S. & Baroni S.A. (2000) Cadeia produtiva da seda:  
Diagnóstico e demanda atuais. Londrina: (IAPAR), 2000. 129p.

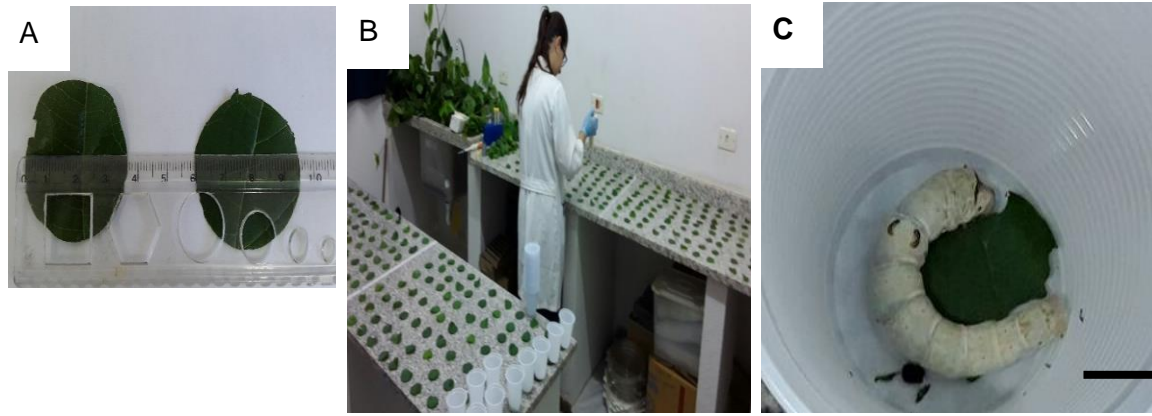
## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Figura S1.** (A) Recorte das folhas em tamanho favorável a alimentação. (B) Aplicação do inóculo viral em discos foliares de amoreira na Concentração Letal de dose de  $8 \times 10^8$  cops/mL (cops= corpos de oclusão poliédricos por mililitro) no primeiro dia do quinto instar. Após completa secagem da folha foi oferecido as lagartas. (C) Lagarta de *Bombyx mori* do quinto instar acondicionada em copo descartável para ingestão da folha com a suspensão viral. Barra: 1 cm.

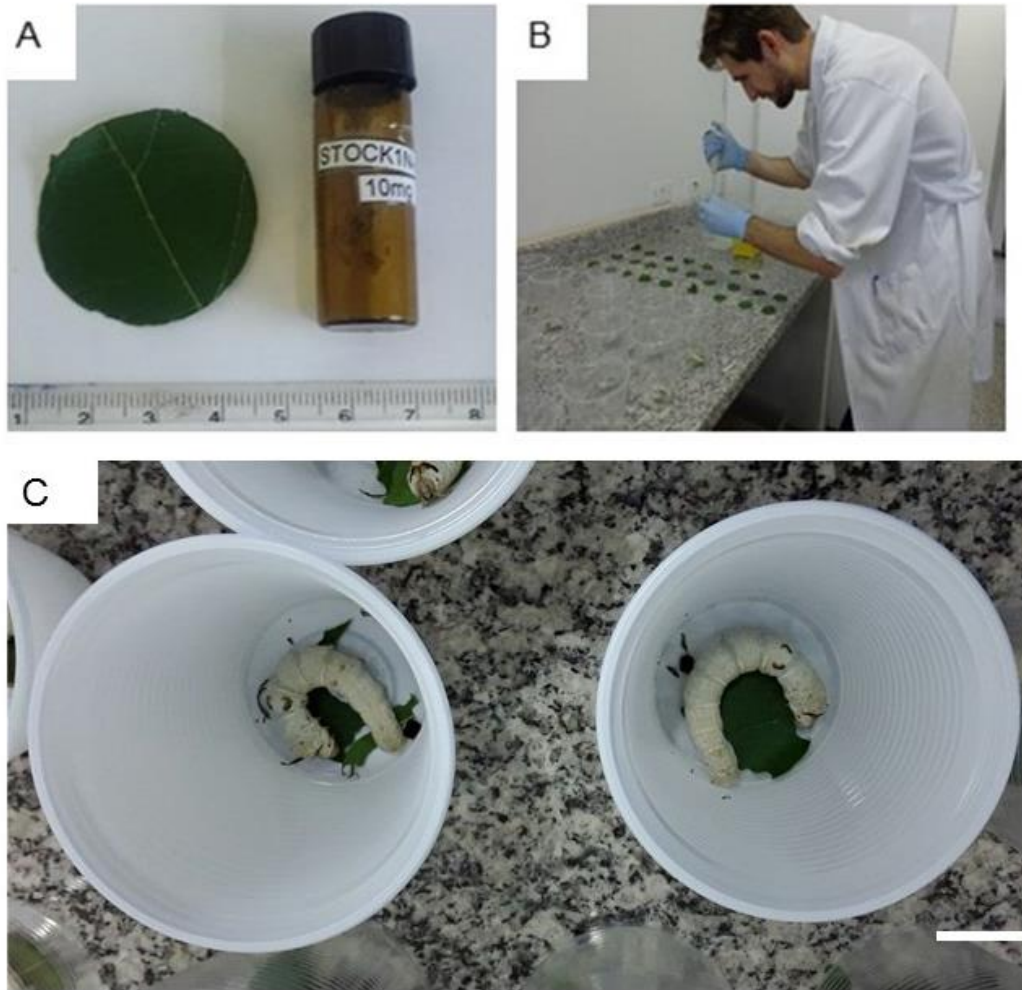
**Figura S2.** (A) Recorte da folha e diluição do fármaco. (B) Aplicação do fármaco nos discos foliares procedimento realizado no quarto dia após infecção para lagartas do bioensaio dose única e, no terceiro, quarto e quinto dia do quinto instar em lagartas do bioensaio três doses. Após completa secagem da folha foi fornecido as lagartas. (C) Lagartas de *Bombyx mori* de quinto instar acondicionadas em copos descartáveis para ingestão da folha com o fármaco Bm5. Barra: 2cm.

**Figura S3.** Sinais observados em lagartas híbridas de *Bombyx mori* infectadas com *BmNPV* e expostas ao tratamento com o fármaco Bm5: (A) inchaço das membranas intersegmentais, (B) desenvolvimento irregular (C) diarreia, (D) Geotropismo negativo, (E) vômito (F) poliedros na hemolinfa. Barra: 1 cm.

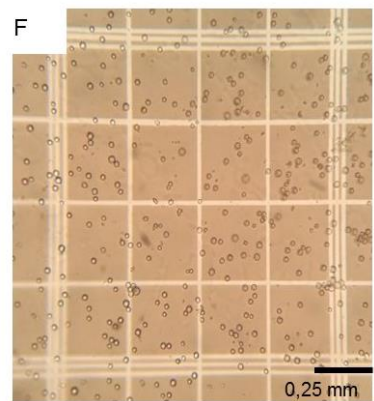
**Figura S4.** Sinais observados em lagartas híbridas de *Bombyx mori* infectadas com *BmNPV* e expostas aos tratamentos com o fármaco Bm5 em estádios avançados da doença, (A) retardamento do crescimento, amarelidão, (B) liquefação e morte. Barra: 1cm.



**Figura S1**



**Figura S2**



**Figura S3**



**Figura S4**