

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO INSETICIDA NOVALURON  
EM *Bombyx mori* (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE)

**MARILUCIA SANTORUM**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção  
do título de Doutora no Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia, Área de  
concentração *Biotecnologia aplicada à saúde  
humana e animal*.

*Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos*

**BOTUCATU – SP  
2019**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO INSETICIDA NOVALURON  
EM *Bombyx mori* (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE)

MARILUCIA SANTORUM

PROFA. DRA. DANIELA CARVALHO DOS SANTOS

PROFA. DRA. ROSE MEIRE COSTA

Tese apresentada ao Instituto de Biotecnologia,  
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção  
do título de Doutora no Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia, Área de  
concentração *Biotecnologia aplicada à saúde  
humana e animal*.

*Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos*

**BOTUCATU – SP  
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Santorum, Marilucia.

Avaliação da toxicidade do inseticida Novaluron em  
*Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) / Marilucia Santorum.  
- Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio  
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Daniela Carvalho dos Santos  
Coorientador: Rose Meire Costa  
Capes: 20601000

1. Bicho-da-seda. 2. Inseticidas. 3. Sinais e sintomas.  
4. Testes de toxicidade. 5. Ultraestrutura (Biologia).

Palavras-chave: Bicho-da-seda; Novaluron; sintomatologia;  
toxicidade; ultraestrutura.

*Meu filho, não se esqueça da minha lei, mas guarde no coração os meus mandamentos, pois eles prolongarão a sua vida por muitos anos e lhe darão prosperidade e paz.*

*Que o amor e a fidelidade jamais o abandonem; prenda-os ao redor do seu pescoço, escreva-os na tábua do seu coração.*

*Então você terá o favor de Deus e dos homens, e boa reputação.*

*Confie no Senhor de todo o seu coração e não se apoie em seu próprio entendimento; reconheça o Senhor em todos os seus caminhos, e ele endireitará as suas veredas.*

*Não seja sábio aos seus próprios olhos; tema o Senhor e evite o mal.*

*Isso lhe dará saúde ao corpo e vigor aos ossos.*

*Honre o Senhor com todos os seus recursos e com os primeiros frutos de todas as suas plantações; os seus celeiros ficarão plenamente cheios, e os seus barris transbordarão de vinho.*

*Meu filho, não despreze a disciplina do Senhor nem se magoe com a sua repreensão, pois o Senhor disciplina a quem ama, assim como o pai faz ao filho de quem deseja o bem.*

*Como é feliz o homem que acha a sabedoria, o homem que obtém entendimento, pois a sabedoria é mais proveitosa do que a prata e rende mais do que o ouro.*

*É mais preciosa do que rubis; nada do que você possa desejar se compara a ela.*

*Na mão direita, a sabedoria lhe garante vida longa; na mão esquerda, riquezas e honra.*

*Os caminhos da sabedoria são caminhos agradáveis, e todas as suas veredas são paz.*

**Provérbios 3:1-17**

*Dedico este trabalho...*

*Ao meu esposo Junior Cesar Luna,*

*Aos meus pais Emílio e Lúcia Santorum,*

*e aos meus irmãos Marildo, Mauro e Márcia  
Santorum.*

*A vocês, minha amada família que são o meu porto seguro, dedico a conquista deste sonho, que se torna realidade graças ao amor, confiança e apoio que sempre me deram, mesmo na distância, isso me fez e me faz ter força e coragem para continuar sempre seguindo em frente e acreditando que posso vencer!*

## *AGRADECIMENTOS*

---

- ✓ A Deus, por ouvir minhas orações, me dando força, sabedoria e conforto nas horas mais difíceis da caminhada para a conclusão deste trabalho.
- ✓ A meu esposo, amigo e companheiro Junior. Obrigada por me apoiar em todas as situações, com paciência, carinho e palavras de apoio nos momentos mais difíceis.
- ✓ A minha família, a meus pais: Emílio e Lucia, irmãos: Marildo, Mauro, Márcia e demais familiares: Carla, Luíza, Angélica, Adriana, Jacinta e Pedro pelas orações e apoio constante. A vocês meu muito obrigada!
- ✓ A minha orientadora Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos, pelos ensinamentos compartilhados que enriqueceram minha jornada acadêmica e com seu exemplo de pessoa que vai além da vida científica, os quais levarei por toda vida. Obrigada por confiar em mim e me ajudar a crescer com seu exemplo de orientação, respeito e amizade.
- ✓ A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa e auxílio financeiro para o desenvolvimento da referida tese (Processo 2015/07119-9, 2017/16714-3).
- ✓ A Profa. Dra. Rose Meire Costa e ao LABEF - UNIOESTE, pelos ensinamentos e infraestrutura para o desenvolvimento deste trabalho.
- ✓ Ao Prof. Gianluca Tettamanti e a Università Degli Studi Dell’Insubria - IT, por me receber no Doutorado sanduiche com transferência de experiência e conhecimento.
- ✓ Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica - CME/IBB: Shelly, Luciana, Maria Helena, Claudete, Tiago e Carol por todo auxílio técnico e bela amizade formada.
- ✓ Aos docentes e funcionários do Departamento de Morfologia e da seção de Pós-Graduação do IBB, agradeço pela atenção, serviços prestados e amizade construída.
- ✓ Aos amigos que fiz durante este período Bertha, Adrielli, Shelly, Márcio, Elton, Ana Silvia, Bruno, Ana Flávia, Renan e Katielle... Obrigada por ajudarem a tornar meus dias em Botucatu mais alegres!!!

# SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>21</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. CAPÍTULO 1: Negative impact of Novaluron on the nontarget insect <i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera: Bombycidae).....</b>	<b>30</b>
<b>4.2. CAPÍTULO 2: Novaluron impairs the silk gland and productive performance of silkworm <i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera: Bombycidae) larvae.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3. CAPÍTULO 3: Reproductive toxicity of Novaluron in <i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera: Bombycidae) and its impact on egg production.....</b>	<b>83</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>105</b>
<b>6. ANEXO.....</b>	<b>107</b>



## RESUMO

O bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), é o inseto de maior importância econômica na produção de seda. A lagarta se alimenta de folhas de amoreira e é altamente sensível a agrotóxicos, assim o uso destes em culturas agrícolas circunvizinhas às plantações de amoreira pode afetar o desenvolvimento de *B. mori*, acarretando em desequilíbrio nas suas funções metabólicas e, conseqüentemente, comprometendo a produção de casulos. Entre estes agrotóxicos, destaca-se o Novaluron, inseticida inibidor da síntese de quitina nos insetos e empregado no controle de insetos pragas de culturas agrícolas próximas as plantações de amoreira. Assim, investigamos os efeitos tóxicos de Novaluron no desenvolvimento de *B. mori*. Lagartas de *B. mori*, foram separadas em dois grupos experimentais: grupo controle (GC) e grupo tratamento (GT: tratado com 0, 15 mL/L de Novaluron). Após ecdise do 2º para o 3º instar, lagartas do GT foram alimentadas por 24 horas com folhas de amoreira tratadas com o inseticida. Paralelamente foi realizada uma nova exposição, porém em lagartas que realizavam a ecdise do 4º para o 5º instar. Lagartas, pupas e adultos de *B. mori* foram anestesiadas e segmentos do intestino médio, glândula da seda e órgãos reprodutores retirados e processados convencionalmente para técnicas de microscopias de luz, eletrônica e imunohistoquímica. Além disso, os efeitos no desenvolvimento, reprodução e qualidade do casulo também foram avaliados. O Novaluron provocou efeitos citotóxicos no intestino médio e na glândula da seda de lagartas de *B. mori*, bem como reprotoxicidade nos testículos e ovários de lagartas, pupas e adultos, através de pronunciadas alterações, como extrema rarefação citoplasmática e nuclear, dilatação do retículo endoplasmático, alteração mitocondrial, presença de vacúolos citoplasmáticos e dilatação celular com liberação de protusões citoplasmáticas, além de espaçamento entre células epiteliais e a lâmina basal e o desprendimento de algumas células para o lúmen. Em adição, destacamos vários sintomas de toxicidade de Novaluron em todas as fases do desenvolvimento de *B. mori*, tais como: grande taxa de mortalidade das lagartas, efeito negativo na qualidade do casulo produzido, redução no peso dos casulos construídos, construção de casulos defeituosos, além da significativa redução no número de ovos ovipositados pelas fêmeas adultas de *B. mori* tratadas. Estes resultados nos mostram que Novaluron tem grande efeito tóxico em *B. mori*, afetando seu desenvolvimento, bem como a produção dos casulos da seda, o que pode causar sérios prejuízos à sericultura no Brasil.

**Palavras-chave:** Bicho-da-seda; ultraestrutura; Novaluron; toxicidade; sintomatologia.

## ABSTRACT

The silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) is the insect of major economic importance in the production of silk. The larvae feeds on mulberry leaves and is highly sensitive to agrochemicals, thus the use of these in agricultural crops surrounding the mulberry plantations can affect the development of *B. mori*, causing an imbalance in its metabolic functions and, consequently, compromising the production of cocoons. Among these agrochemicals, stands out the Novaluron, an insecticide inhibitor of the synthesis of chitin in insects and used in the control of insect pests of crops near mulberry plantations. Thus, we investigated the lethal and sublethal effects of Novaluron on the development of *B. mori*. Larvae were selected into two experimental groups: control group (CG) and treatment group (TG: treated with 0, 15 mL/L Novaluron). After ecdysis from the 2<sup>nd</sup> to the 3<sup>rd</sup> instar, the TG larvae were fed for 24 hours with mulberry leaves treated with the insecticide. In parallel, a new exposition was carried out, however in larvae that carry out the ecdysis from the 4<sup>th</sup> to the 5<sup>th</sup> instar. *B. mori* larvae, pupae and adults were anesthetized and segments of the midgut, silk gland and reproductive organs were removed and processed conventionally for light microscopy, electron microscopy and immunohistochemistry. In addition, the effects on the development, reproduction and quality of the cocoon were also evaluated. Novaluron caused cytotoxic effects on the midgut and the silk gland of *B. mori* larvae, as well as reprotoxicity on the testes and ovaries of larvae, pupae and adults, through pronounced alterations such as extreme cytoplasmic and nuclear rarefaction, endoplasmic reticulum dilatation, mitochondrial alteration, presence of cytoplasmic vacuoles and cell dilatation with release of cytoplasmic protrusions, as well as spacing between epithelial cells and the basal lamina and the detachment of some cells into the lumen. In addition, we highlight several symptoms of Novaluron toxicity in all stages of the development of *B. mori*, such as: great mortality of larvae, negative effect on the quality of the cocoon produced, reduction in the weight of the cocoons constructed, construction of defective cocoons, besides the significant reduction in the number of eggs deposited by adult *B. mori* females treated. These results show that Novaluron has a great toxic effect on *B. mori*, affecting its development, as well as the production of the silk cocoons, which can cause serious damages to sericulture in Brazil.

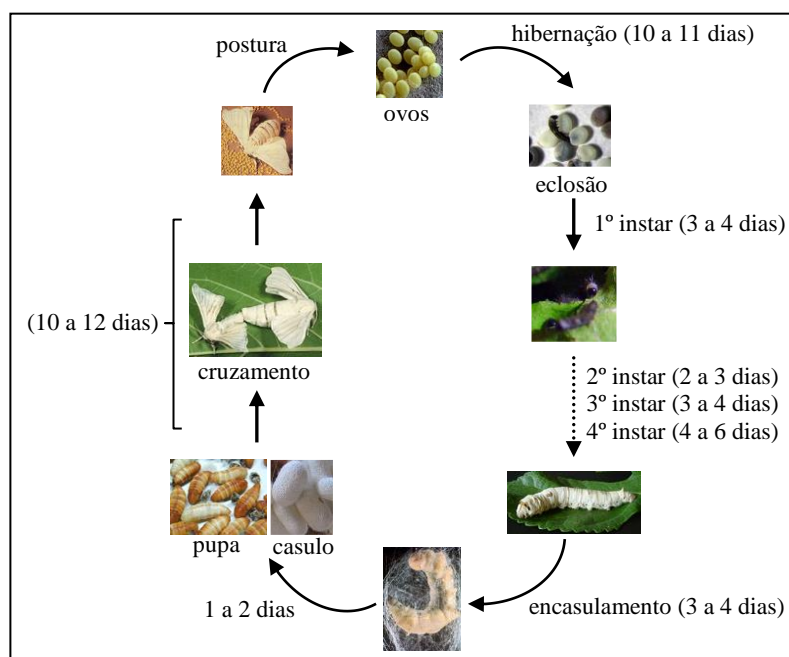
**Keywords:** silkworm; ultrastructure; Novaluron; toxicity; symptomatology.

## *1. INTRODUÇÃO*

---

A sericicultura é uma atividade agroindustrial, e sua cadeia produtiva abrange o cultivo da amoreira (*Morus* spp.), a produção e o preparo dos ovos do bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), criação das lagartas, obtenção dos casulos, industrialização dos fios de seda, tecelagem e o comércio da seda (WATANABE; YAMAOKA; BARONI, 2000), sendo a espécie *B. mori*, responsável por 95% da produção comercial total de fios de seda (WATANABE; YAMAOKA; BARONI, 2000; ZANETTI, 2007). Este é um inseto holometábolo, ou seja, com metamorfose completa, o qual apresenta quatro estágios de desenvolvimento durante seu ciclo de vida. O ovo é o primeiro estágio, de onde eclode a lagarta ou larva (segundo estágio), segue-se o estágio de pupa ou crisálida, que por metamorfose transforma-se em mariposa, forma adulta e último estágio do seu ciclo de vida, na qual se dedica exclusivamente à reprodução. O seu ciclo completo finaliza em torno de 35 a 40 dias (Figura 1) (ARUGA, 1994).

A principal fase no ciclo de vida de *B. mori* para a sericicultura, é a fase de lagarta até o início da construção dos casulos de seda, nesta fase *B. mori* alimenta-se exclusivamente de folhas de amoreira e passa por cinco instares ou estádios larvais (1º, 2º, 3º, 4º e 5º). Na passagem de um instar ao outro, o inseto sofre a ecdise ou a muda do exoesqueleto e, assim, passa por quatro ecdises. No final do 5º instar, o inseto cessa a alimentação e começa a tecer o casulo, é no seu interior que realiza a metamorfose transformando-se em pupa. Neste processo, ocorre a morte celular programada ou apoptose em vários tecidos e órgãos, como no intestino, o epitélio larval é reabsorvido, sendo substituído por um epitélio pupal (HAKIM; BALDWIN; SMAGGHE, 2010). Ao término da metamorfose, cerca de 10 a 12 dias, o inseto adulto (mariposa) emerge do casulo (Figura 1) (ARUGA, 1994; FERNANDEZ et al., 2005; HANADA; WATANABE, 1986).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Bombyx mori* (TAKEDA, 2009).

A sericicultura ou produção de seda é desenvolvida em vários países, movimentando bilhões de dólares por ano no mundo. Neste cenário o Brasil, em 2016, segundo dados do IBGE, produziu 2,8 mil toneladas de casulos de bicho-da-seda, ficando em quinto lugar na produção mundial, atrás da China, Índia, Uzbequistão e Tailândia. A sericicultura nacional é bem desenvolvida no estado do Paraná, o qual tem se destacado nos últimos 10 anos como o maior produtor nacional, responsável por 83%, seguido por São Paulo (13%) e Mato Grosso do Sul (5%) (SEAB, 2017).

No Brasil, esta atividade tem se desenvolvido em pequenas propriedades rurais e se utiliza da mão de obra familiar, proporcionando aos produtores um meio de subsistência. Outro aspecto importante da sericicultura é o baixo impacto ao meio ambiente, uma vez que não é aconselhável o uso de agrotóxicos nas propriedades produtoras, caso contrário as lagartas de *B. mori*, que são muito sensíveis as adversidades do meio, podem morrer intoxicadas (BRANCALHÃO, 2002; DOURADO et al., 2011; PANUCCI-FILHO; CHIAU; PACHECO, 2011; TAKAHASHI, R.; TAKAHASHI, K.; TAKAHASHI, L., 2001).

A atividade sericícola apresenta importância econômica e social e, como relatam Panucci-filho; Chiau; Pacheco (2011) tem influenciado na permanência de famílias nas pequenas propriedades rurais e, com isso, contribuindo diretamente na diminuição da pobreza, minimizando desigualdades sociais, permitindo e assegurando o contato com a

“terra” e a aproximação do ser humano em atividades interdisciplinares de inclusão na sociedade. Neste sentido, a sericultura é uma atividade sustentável para o país, ao gerar ganhos econômicos, diminuir o êxodo rural e apresentar aspectos ecológicos favoráveis. Entretanto como relata Tsukamoto (2009), esta atividade requer algumas melhorias na produção e nas condições de trabalho, pois exige uma grande jornada diária, principalmente na colheita dos ramos de amoreira, pois é uma das atividades que requer maior esforço, devendo ser feita mesmo em dias chuvosos, dificultando o trabalho no campo, uma vez que as lagartas precisam se alimentar de 3 a 4 vezes ao dia.

Aliado a isso ocorrem outros fatores que podem influenciar a cadeia produtiva da seda, como: baixo valor agregado ao produto; a espera por resultados de pesquisas que envolvam melhoramento genético de *B. mori*; manejo adequado da criação; limpeza e desinfecção do ambiente de criação das lagartas, no objetivo de reduzir a ocorrência de doenças, que podem ser causadas por protozoários, fungos, bactérias e vírus, bem como a deriva de resíduos advindos do uso de agrotóxicos, em culturas circunvizinhas as propriedades produtoras de *B. mori* (BRANCALHÃO, 2002; MARGATHO et al., 2012).

Além da sua grande importância econômica no agronegócio, *B. mori* se destaca também como inseto modelo em pesquisas entre os lepidópteros, sido amplamente utilizado como organismo referência em biologia celular e molecular, fisiologia, biotecnologia, medicina, toxicologia e outros campos (MATSUMOTO et al., 2011; TANSIL et al., 2011; KUNDU et al., 2014; QIN et al., 2012; MAO et al., 2019).

No entanto, o uso de agrotóxicos em culturas agrícolas circunvizinhas as plantações de amoreira, podem afetar a produção de *B. mori*; durante a pulverização aérea, os resíduos destes compostos podem se fixar nas folhas de amoreira, que são a principal fonte de alimento das lagartas, levando assim, à contaminação do inseto. Isso causa desequilíbrio nas funções metabólicas das lagartas, comprometendo seu crescimento e reprodução, incluindo a qualidade do casulo, eclosão e fecundidade (BHOSALE E KALLAPUR, 1985; YIN et al., 2008; KUMUTHA et al., 2013; MUNHOZ et al., 2013; YU et al., 2013; GU et al., 2014; NICODEMO et al., 2014, 2018).

Estudos recentes da Secretaria de Agricultura do Estado do Paraná, Brasil, apontam as grandes perdas na sericultura através da deriva de resíduos de inseticidas em culturas agrícolas próximas as propriedades produtoras do bicho-da-seda. No oeste paulista, ocorreu a perda quase total da produção de seda, e a mesma situação foi relatada no Paraná, onde produtores das lagartas de *B. mori* apontaram que a pulverização aérea de inseticidas

em canaviais contaminou as plantações de amoreira, acarretando em casulos de baixa qualidade, com grande parte da produção perdida, pois suas lagartas não conseguiam completar o ciclo e o casulo ficava transparente, com prejuízo na safra de mais de R\$ 200 mil (GLOBO RURAL, 2011; MUNHOZ et al., 2013).

Yin et al. (2008), descreveram o impacto negativo de pesticidas sobre o bicho-da-seda, resultando em drástica redução na produção de seda. Os autores verificaram que a exposição, mesmo com baixas doses ao herbicida Clodinafop-propargyl, houve aumento significativo da porcentagem de dano ao DNA de hemócitos de lagartas de *B. mori*. Além disso, a exposição ao pesticida produziu genotoxicidade em lagartas e a porcentagem de pupação e formação de casulos foi significativamente reduzida nas lagartas tratadas.

Munhoz et al. (2013) relataram a mortalidade de lagartas de *B. mori* localizadas nas proximidades da cultura da cana-de-açúcar e que, segundo registros da Secretaria da Agricultura do Estado do Paraná, houve uma perda de 8.626 kg de casulos no estado. Estas mortes foram atribuídas aos diversos tipos de inseticidas utilizados no controle da Broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), como o Chlorantraniliprole. Os autores relataram que o uso desse inseticida acarretou em *B. mori*, ecdise incompleta, casulos defeituosos e comprometimento das funções orgânicas do inseto, observando-se alterações no intestino médio larvário, com células epiteliais colunares liberando corpos apoptóticos, os quais hipotetizaram que a ocorrência de células mortas por apoptose em células do intestino médio comprometeu o desenvolvimento do bicho da seda, bem como a produção de casulos (MUNHOZ et al., 2013).

Alterações no intestino médio requerem muita atenção, uma vez que é o principal órgão responsável pelos principais eventos de digestão e absorção, e seus tipos celulares desempenham funções importantes no organismo. Células colunares, tipo mais abundante, atuam na secreção de enzimas digestivas, bem como, na absorção de nutrientes (CASARTELLI et al., 2001); as caliciformes estão envolvidas no controle da homeostase iônica (WIECZOREK et al., 2000); as regenerativas são indiferenciadas, atuando na renovação do epitélio e substituindo células que danificam ou envelhecem, além de garantir o crescimento do canal alimentar a cada ecdise (CHAPMAN, 1998) e as células endócrinas secretam diferentes hormônios que desempenham um papel na diferenciação de células regenerativas e auxiliam na secreção de enzimas digestivas (WIGGLESWORTH, 1972). Assim, sendo diretamente afetado pelo inseticida durante a alimentação, o intestino médio é um órgão-chave para estudos sobre os efeitos tóxicos dos agrotóxicos nos insetos

(CATAE et al., 2014), uma vez que alterações morfológicas, ultraestruturais e moleculares neste órgão podem comprometer as funções orgânicas do inseto prejudicando seu desenvolvimento com consequências na produção de seda como relatado na literatura.

Outro órgão a ser considerado em estudos toxicológicos de inseticidas e seu impacto na produção de seda, é a glândula da seda (GS), por ser um órgão altamente especializado, responsável por sintetizar e secretar as proteínas da seda, principalmente a fibroína e sericina, que compõem a maior parte da seda e do casulo, sendo deste modo essenciais na sericultura pelo seu alto valor comercial (AKAI, 1984; LI et al., 2014; MONDAL; TRIVEDY; KUMAR, 2007; LIU; ZHANG, 2014).

A GS é uma estrutura par, simétrica e translúcida, com forma tubular, que se estende latero-ventralmente ao canal alimentar, iniciando em um ducto comum no segmento labial alcançando a região caudal. Em *B. mori* este órgão se apresenta ainda muito rudimentar do 1º ao 4º instar larval, produzindo pequena quantidade de seda (DHAWAN; GOPINATHAN, 2003; SEHNAL; AKAI, 1990; TANAKA, 1911), que é secretada no final de cada instar e utilizada para fixar o tegumento a ser descartado após cada muda para o substrato. Porém no início do 5º instar, ocorre a hipertrofia da glândula, com aumento do volume celular, alta biossíntese e secreção de seda, assim o crescimento e o peso da glândula é desencadeado rapidamente, sendo seu peso estimado entre 20% e 40% do peso total do inseto (DHAWAN; GOPINATHAN, 2003; SEHNAL; AKAI, 1990; TASHIRO et al., 1968).

A GS também é comumente conhecida como glândula labial e, devido a diferenças morfológicas e funcionais no decorrer de seu comprimento, é dividida em três regiões: a glândula da seda anterior (GSA), constituída por cerca de 200 células, e tem função de ducto excretor, ou seja, um ducto que realiza a saída da seda para o exterior; a glândula da seda média (GSM), secreta três tipos de sericina ao redor da coluna de fibroína, formada por aproximadamente 300 células secretoras, com cerca de 7 cm de comprimento, podendo ser ainda subdividida em quatro áreas distintas: anterior, anterior-médio, posterior-médio e posterior, devido a diferenças na densidade e morfologia do material contidos em vesículas secretoras, cada área sintetiza um tipo diferente de sericina no lúmen; e a glândula da seda posterior (GSP) que possui cerca de 15 cm de comprimento e aproximadamente 500 células secretoras que realizam a secreção da fibroína e proteínas adicionais (AKAI, 1983; DHAWAN; GOPINATHAN, 2003; MONDAL; TRIVEDY; KUMAR, 2007).



É das folhas de amoreira que *B. mori* obtém os nutrientes para o seu crescimento e para o desenvolvimento de suas funções metabólicas essenciais que permitem a síntese de proteínas, incluindo as proteínas da seda, por isso alterações no seu alimento podem determinar a quantidade e qualidade dos fios de seda produzidos pelas lagartas (TAKANO; ARAI, 1978; PARRA, 1991; KI; PARK, 2013), deste modo a qualidade das folhas de amoreira podem ser comprometidas se estas estiverem contaminadas por inseticidas via deriva de pulverizações (BORA et al., 2012; MUNHOZ et al., 2013). Li et al. (2013, 2014) associam a redução na produção de casulos por *B. mori* ser resultado da exposição a inseticidas. Os autores relataram a redução na produção de casulos de lagartas expostas ao inseticida Phoxin, e acreditam que esta redução pode estar relacionada a toxicidade do inseticida na GS, uma vez que os autores verificaram alterações epiteliais da GS e nos perfis de expressão gênica, redução na síntese de proteínas totais de seda e atribuíram este fato ao comprometimento do tecido da glândula e as expressões de baixos níveis de alguns genes envolvidos na síntese de proteínas da seda.

Em adição, estudos anteriores também tem apontado para os efeitos tóxicos de inseticidas sobre as funções reprodutivas de *B. mori*, prejudicando a oviposição, viabilidade de ovos e a eclosão larval (KURIBAYASHI, 1981; TANG et al., 2018), ponto este importante a ser considerado, uma vez que os órgãos reprodutores e os processos por eles desenvolvidos na reprodução dos insetos são de extrema importância para a manutenção das espécies. No entanto, poucos são os relatos sobre a reprotoxicidade de agrotóxicos em nível celular, assim como o mecanismo de ação do agrotóxico.

Tang et al. (2018), reportam alterações celulares nos espermatócitos de *B. mori* exposto a fluoreto de sódio, utilizado na composição de inseticidas, os autores verificaram ainda características de apoptose e necrose. Em adição, fluoreto de sódio acarretou em fêmeas de *B. mori*, diminuição no número total de ovos, sugerindo alterações nos ovários do inseto. A exposição de lagartas de *B. mori* a doses subletais de pesticidas organofosforados, resultou em danos a reprodução do inseto, com formação de ovos anormais, diminuição no número de ovos totais, grande número de ovos não fertilizados, morte dos embriões em estágio precoce de desenvolvimento, e morte de indivíduos recém emergidos (KURIBAYASHI, 1981). Segundo autores a exposição a químicos induz a esterilidade de insetos, podendo ser relacionado a um dos três fatores, supressão na produção das células envolvidas na espermatogênese ou na oogênese, ocorrência de alterações nestas células após sua

formação ou a inibição de genes na célula sem promover a morte desta (BORKOVEL, 1964; KURIBAYASHI, 1981; THANGARAJ et al., 2018).

Em *B. mori* o sistema reprodutor é formado por um par de gônadas, localizado no lado dorsal do quinto segmento abdominal, sendo após o 3º instar larval fácil a distinção entre testículos e ovários. Os testículos apresentam formato riniforme (SAKAGUCHI, 1978B, SAKAI et al., 2016), e são compostos por células da linhagem germinativa, as células espermáticas, envoltas por células somáticas, as células císticas. Cada testículo encontra-se circundado por uma túnica celular (interna e externa), que emite septos que dividem o testículo em quatro folículos testiculares, estes folículos estão fundidos e fixados em uma estrutura comum, o ducto deferente localizado na extremidade proximal. Na extremidade distal localiza-se o germário, região de proliferação celular, onde ocorre a produção contínua de espermatogônias, e na extremidade proximal estão localizados os cistos de espermatócitos (grupos de células germinativas interconectadas por pontes citoplasmáticas). O crescimento é gradual dos testículos e dos cistos germinativos no decorrer dos estágios de seu ciclo de vida, ocorrendo o processo de maturação do cisto durante a espermatogênese no sentido distal-proximal no interior dos testículos, com cistos germinativos em diferentes estágios de desenvolvimento (SAKAGUCHI, 1978A; SAKAI et al., 2016).

Já os ovários de *B. mori* possuem uma forma triangular e são formados por quatro ovaríolos, que na fase larval ainda são curtos e se tornam mais longos gradativamente, assumindo uma forma tubular nas fases de pupa e adulto (SAKAGUCHI, 1978A; TAKAMI, 1969; SAKAI et al., 2016). Cada ovaríolo é revestido por uma camada acelular contínua, a túnica própria, e mais externamente encontra-se a bainha ovaríolar. O ovaríolo é do tipo meroístico politrófico, ocorrendo no seu interior a diferenciação morfofuncional das células germinativas e somáticas, originando os folículos ovarianos. Cada ovaríolo apresenta internamente uma região conhecida por germário, e é nela que as células germinativas se dividem dando origem aos cistos, que juntamente com as células somáticas, diferenciam-se nos folículos ovarianos. Logo abaixo do germário encontra-se a região do vitelário, onde estão presentes células germinativas diferenciadas: um oócito e sete células nutridoras; que são cercadas por uma camada de células somáticas chamadas de células foliculares que formam o epitélio folicular, e então, é nesta região que os folículos ovarianos crescem e suas células sofrem modificações necessárias dando origem ao ovo, ovulado na porção proximal do ovaríolo, seguindo para o oviduto lateral, ducto de

união dos quatro ovariolos. Em adultos encontra-se aproximadamente 50 a 90 ovos maduros por ovariolo (HASEGAWA, 1943; TAKAMI, 1969).

Como vimos, lagartas de *B. mori* são sensíveis a agroquímicos e o contato com esses produtos pode comprometer órgãos do inseto e seu desenvolvimento normal, impactando todas as fases do seu ciclo de vida (BORKOVEL, 1964; KURIBAYASHI, 1981; LI et al., 2010, 2011; PENG et al., 2011; YU et al., 2011, 2013; MUNHOZ et al., 2013; GU et al., 2014; KORDY, 2014; NICODEMO et al., 2018; THANGARAJ et al., 2018). E embora os agrotóxicos não sejam utilizados diretamente nas plantações de amoreira, diversos são os inseticidas empregados em culturas agrícolas circunvizinhas as propriedades de produção do bicho-da-seda no intuito de controlar os diversas insetos pragas destas culturas, e assim, através das pulverizações podem atingir as plantações de amoreira e acarretar danos ao inseto não-alvo e de grande importância econômica como *B. mori*.

Entre estes inseticidas destaca-se o Novaluron, (RS)-1-[3-cloro-4-(1,1,2-trifluoro-2-trifluorometoxi-etoxi)fenil]-3-(2,6-difluorobenzil) uréia, (formulação comercial Rimon Supra - ADAMA Makhteshim Ltd.), registrado no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob nº 14511. Este inseticida é utilizado em culturas agrícolas como milho, soja, feijão, trigo, cana-de-açúcar, batata e tomate, entre diversas outras (MAPA, 2015). Atua como potente supressor de insetos pragas importantes, principalmente das ordens Lepidóptera e Coleóptera, além de algumas espécies Hemípteras e Dípteras.

Novaluron atua como regulador de crescimento de insetos, com modo de ação por contato e ingestão. Pertence ao grupo químico Benzoiluréia, os quais alteram a composição da cutícula dos insetos, especialmente através da inibição de processos bioquímicos que levam à formação da quitina sintetase, causando um depósito anormal da endocutícula que afeta a elasticidade cuticular e firmeza, prejudicando a muda do inseto. Assim, atua principalmente nos estágios larvais, levando a morte (CUTLER; SCOTT-DUPREE, 2007), e de acordo com Retnakaran e Wright (1987) age como ovicida e larvicida, porém têm sido relatados também os seus efeitos sobre a fecundidade, fertilidade e longevidade de insetos adultos (MARCO; PEREZ-FARINOS; CASTANERA, 1998).

Estudos tem sido realizados sobre os efeitos do uso do inseticida Novaluron em importantes insetos da ordem lepidóptera e considerados pragas da agricultura. Como por Storch et al. (2007) com a *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:Noctuidae) popular lagarta-da-soja, os quais apontaram os efeitos deletérios do inseticida durante o desenvolvimento

de todas as fases deste inseto. Já em estudo com a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) uma importante praga da cultura do milho, houve redução da fecundidade, afetando o número de espermátóforos encontrados nas fêmeas, sugerindo efeitos no aparelho reprodutor do inseto (ROMANO, 2007).

A literatura aponta os efeitos do Novaluron em outras ordens de insetos pragas. Alyokhin e Choban (2010) verificaram que o inseticida causa mortalidade nos estágios larvais e sugerem que possui propriedades ovicidas, podendo apresentar efeito transovariano nas fêmeas do besouro da batateira (Coleoptera:Chrysomelidae) e reduzir a eclosão de suas larvas. Estudo de Alyokhin, Guillemette e Choban (2009) também ressaltam o efeito de Novaluron na redução da fertilidade dos adultos desta mesma praga da batata. Novaluron afetou negativamente a reprodução da mosca-branca (Diptera: Aleyrodidae), praga do tomateiro, reduzindo a viabilidade de seus ovos (CLOYD; KEITH; GALLE, 2004).

Novaluron tem sido considerado aceitável para inclusão nos programas de manejo integrado de pragas (MIP), porque a classe Benzoiluréia inicialmente parecia ser mais segura e mais seletiva em seu modo de ação, potencialmente atuando apenas contra as espécies-alvo com riscos reduzidos ao meio ambiente, incluindo mamíferos, aves, animais aquáticos e insetos benéficos e não-alvo (TUNAZ; UYGUN, 2004; DHADIALLA et al., 2005). No entanto, os danos causados por inseticidas ao meio ambiente e para organismos não-alvo ainda precisa ser minimizado (DESNEUX et al., 2007), uma vez que alguns estudos apontaram para efeitos negativos de Novaluron em insetos benéficos não-alvo, incluindo predadores, parasitóides e polinizadores. Nestes organismos não-alvo, Novaluron pode reduzir a eclosão e o desenvolvimento das lagartas, via contato e ingestão. Além disso, Novaluron pode prejudicar a muda, oviposição e viabilidade de ovos de adultos tratados, bem como reduzir sua vida útil (MOMMAERTS et al., 2006; CUTLER; SCOTT-DUPREE, 2007).

Como exposto por Cutler et al. (2006) em estudo com o predador *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae), um inimigo natural do besouro da batateira, verificando que insetos provenientes de ovos tratados com o Novaluron foram capazes de emergir, porém os recém-nascidos foram posteriormente incapazes de fazer a muda e as fêmeas adultas tratadas apresentaram redução na longevidade, além de redução significativa na oviposição e viabilidade dos ovos. Mommaerts, Sterk e Smagghe (2006) também observaram efeitos negativos de Novaluron em outro inseto benéfico o *Bombus*

*terrestris* L. (Hymenoptera), um dos mais importantes polinizadores em cultura como a do tomate. Neste caso, Novaluron reduziu a eclosão das larvas e afetou o desenvolvimento larval via contato e ingestão.

Entretanto, a literatura não traz informações sobre a toxicidade de Novaluron em *B. mori*, e embora este inseticida não ser utilizado diretamente nas plantações de amoreira, há registros de que o uso de inseticidas em culturas vizinhas às amoreiras causem grandes perdas para sericicultura. Em adição, a literatura aponta que a aplicação foliar de Novaluron apresenta persistente atividade biológica em campo e um grande potencial no controle de pragas principalmente as da ordem lepidóptera (CUTLER et al., 2005; ISHAAYA et al., 2002), além de que estudos apontam efeitos negativos de Novaluron em alguns insetos benéficos e não-alvo (CUTLER et al., 2006; CUTLER; SCOTT-DUPREE, 2007; MOMMAERTS; STERK; SMAGGHE, 2006). Tais informações, aliadas à possibilidade de ocorrência de resíduos deste inseticida advindo das pulverizações em culturas circunvizinhas as amoreiras e o importante papel desempenhado pelo bicho-da-seda na sericicultura, reforçam a necessidade e a importância de investigações sobre os efeitos de Novaluron em *B. mori*.

## *5. CONCLUSÕES*

---

- A ingestão do inseticida Novaluron na fase larval de *B. mori* induz efeitos citotóxicos no intestino médio e na glândula da seda de lagartas de *B. mori*, bem como dos órgãos reprodutores (testículo e ovário) de lagartas, pupas e adultos (mariposas);

- A exposição de *B. mori* ao Novaluron ocasiona significativos efeitos em sua biologia e desenvolvimento, comprometendo todas as fases do seu ciclo de vida, principalmente na construção dos casulos de seda, e redução da fecundidade de fêmeas expostas, afetando assim, conseqüentemente a sobrevivência do inseto;

- Todos esses efeitos comprometem a produção e a manutenção da espécie, podendo trazer sérios prejuízos a toda a cadeia produtiva da seda.