

AVALIAÇÃO ANTIVIRAL DO FORMULADO DE SÓDIO DICLOROISOCIANURATO
CONTRA O NUCLEOPOLIEDROVÍRUS DO BICHO-DA-SEDA

R.M.C. Brancalhão¹, L.F.C. Ribeiro¹, E.F.B. Torquato¹,
M.A. Fernandez², R.E.F. Munhoz², K.T. Colombelli¹, T.R.G. da Costa¹

¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária, 2069, CEP 85819-110, Cascavel, PR, Brasil.
E-mail: rosecb@gmail.com

RESUMO

O estudo avaliou a eficiência de um desinfetante que apresenta baixa ação corrosiva e que não é tóxico ao meio ambiente, o formulado de sódio dicloroisocianurato, sobre o nucleopoliedrovírus *Bombyx mori* (BmNPV). Para tanto, lagartas do bicho-da-seda, *B. mori*, de 5º instar foram divididas em quatro grupos experimentais, 4 repetições com 15 lagartas cada, totalizando 60 lagartas por grupo. Os grupos foram alimentados com discos foliares de amoreira (*Morus* sp.) contendo: o BmNPV tratado com o desinfetante (solução 1); o BmNPV não tratado (solução 2); apenas o desinfetante (solução 3); e água (solução 4, controle). Os resultados mostraram que o desinfetante não inativa o BmNPV e também exerce efeito negativo na resistência do inseto.

PALAVRAS-CHAVE: *Baculoviridae*, desinfecção, Lepidoptera, *Bombyx mori*.

ABSTRACT

VIRUCIDAL EVALUATION OF SODIUM DICHLOROISOCYANURATE FORMULATION AGAINST NUCLEOPOLYHEDROVIRUSES OF SILKWORM. This study evaluated the effectiveness of a disinfectant with low corrosive action and which is not toxic to the environment, the sodium dichloroisocyanurate formulation, on the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV). For this, 5th-instar *B. mori* silkworm larvae were divided into four experimental groups of 4 replicates with 15 larvae each, totalling 60 larvae per group. The groups were fed with mulberry (*Morus* sp.) leaf discs containing: BmNPV treated with the disinfectant, untreated BmNPV, only the disinfectant, and water (control). The results showed that the disinfectant does not inactivate the BmNPV and also exerts a negative effect on the insect's resistance.

KEY WORDS: *Baculoviridae*, disinfection, Lepidoptera, *Bombyx mori*.

Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) é um vírus envelopado da família Baculoviridae, ocluído em uma matriz proteica, sendo um importante patógeno do bicho-da-seda, *Bombyx mori* (lepidoptera, Bombycidae), e que causa a doença conhecida popularmente como "amarelidão" ou flacidez infecciosa (BRANCALHÃO, 2002; POTRICH *et al.*, 2007).

B. mori pode ser infectado por BmNPV no estágio larval do seu ciclo de vida, quando a criação é conduzida em barracões de propriedades rurais. Nesta situação, verifica-se que as práticas de produção em muito contribuem na dispersão da doença, como a concentração elevada de indivíduos em ambiente fechado, a produção significativa de resíduos orgânicos nos barracões e sua rusticidade, que dificulta a desinfecção. Acrescenta-se o ciclo biológico curto do inseto, que limita o tempo de combate à doença (PORTO *et al.*, 2005).

Como consequência da doença, muitas lagartas não sobrevivem antes de construírem o casulo e, aquelas que o tecem, geralmente morrem no seu interior. O casulo assim produzido é de baixa qualidade, causando prejuízos econômicos ao produtor rural e à empresa sericícola, que não recebe o casulo para o processamento e a comercialização, afetando, assim, toda a cadeia produtiva da seda (WATANABE *et al.*, 2000).

Neste sentido, medidas profiláticas para o controle de entomopatógenos são essenciais no manejo adequado da criação, como ocorre com o formol, usado na desinfecção de barracões e utensílios de criação (TAKAHASHI *et al.*, 2001). SURENDRA; SURENDRA (1999) destacaram a possibilidade de aquisição de resistência pelos patógenos aos produtos de desinfecção usados em sericultura, devido ao seu uso sistemático por longo período. Soma-se o fato de que

²Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Organização Funcional do Núcleo, Maringá, PR, Brasil.

eles apresentam restrições pelo risco de intoxicação das lagartas e também dos produtores rurais. Com isso, são necessários estudos para se avaliar e ampliar as opções para controle de doenças na sericicultura (PORTO *et al.*, 2005).

FERREIRA *et al.* (2010) relataram que o formulado de sódio dicloroisocianurato (Na DCC), utilizado na desinfecção de galpões e equipamentos de aviários, elimina diversas espécies de vírus, envelopados e não envelopados, em um curto tempo de exposição, entre 5 a 10 minutos. Além disso, o produto apresenta baixa ação corrosiva, não sendo tóxico para aves e meio ambiente. SALOMÃO *et al.* (2011) apresentaram as vantagens do composto orgânico Na DCC, devido a sua estabilidade maior em solução aquosa que os inorgânicos, por ser menos reativo com matéria orgânica e não formar triometanos em quantidade significativa, substância com efeito carcinogênico.

Assim, considerando a necessidade de controlar a doença viral, de realizar o rodízio dos agentes químicos de controle e de substituir o produto químico, o formol, utilizado atualmente na sericicultura, devido a sua toxicidade, o presente trabalho avaliou a ação do formulado de Na DCC sobre o BmNPV.

O formulado de Na DCC, comercializado como Aviclor, é marca registrada da empresa HidroAll do Brazil Ltda., Valinhos, São Paulo, Brasil. A solução do produto foi preparada conforme indicações do fabricante, na concentração de 1,5 g/L. A suspensão viral de $1,09 \times 10^7$ COPs/mL (COPs = corpos de oclusão poliédricos por mililitro) do BmNPV (GenBank Accession No. EU251694.1) foi obtida de lagartas anteriormente infectadas e acondicionada a 4 °C. Um mL da suspensão viral foi tratada por imersão em 9 mL da solução do formulado de Na DCC, por 48 horas (solução 1). Da mesma forma, 1 mL da suspensão viral foi imerso em 9 mL de água filtrada (solução 2). A solução 3 foi preparada com 9 mL de formulado de Na DCC e 1 mL de água filtrada, já a solução 4 apresentou apenas água filtrada (controle). Todas as soluções foram acondicionadas em tubo Falcon e mantidas em temperatura ambiente, com média de 25° C.

As soluções 1 e 2 foram analisadas a fresco, em microscopia de luz, para observação da estrutura poliédrica e, juntamente às soluções 3 e 4, foram usadas no bioensaio. Neste caso, as lagartas de *B. mori* no primeiro dia do 5º instar foram divididas em quatro grupos (tratamentos), com quatro repetições de 15 lagartas cada, sendo alimentadas com discos foliares (2 cm²) de amoreira (*Morus sp.*), de plantação no Campus da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, contendo 10 µL das soluções. As lagartas permaneceram confinadas em recipientes individualizados até se alimentarem de todo o disco foliar, assegurando o consumo das soluções. No grupo 1 as lagartas foram alimentadas com a solução 1 (BmNPV

tratado). As lagartas do grupo 2 foram alimentadas com a solução 2 (BmNPV não tratado). No grupo 3, apenas com a solução 3 e no grupo 4 com água filtrada (solução 4). Ao término do consumo dos discos foliares, as lagartas foram transferidas para caixas de criação (polietileno), mantidas em temperatura ambiente, sendo alimentadas três vezes ao dia, com folhas frescas de amoreira, isentas de qualquer tratamento, até o final do experimento, ou seja, até encasularem, cerca de 10 dias.

Os dados relativos à mortalidade e encasulamento foram submetidos à análise de variância (ANOVA), efetuando a análise múltipla das médias pelo teste de Tukey (P < 0,05), utilizando-se o programa Sisvar® (FERREIRA, 2009).

Os resultados da análise microscópica a fresco da estrutura poliédrica do BmNPV, tanto o tratado com o desinfetante por 48 horas (grupo 1), quanto o não tratado (grupo 2), indicaram que a estrutura viral se manteve inalterada, sendo caracterizada por TORQUATO *et al.* (2006) como a de um octaedro truncado. Entretanto, variações morfológicas no tamanho e na forma dos poliedros virais também foram visualizadas. Estas variações foram previamente relatadas em condições normais para o BmNPV (PEREIRA *et al.*, 2008) e, portanto, não se relacionam a ação do desinfetante.

Os poliedros são estruturas virais de resistência, formados basicamente pela proteína poliedrina, que se cristaliza ao redor dos vírions, e um envoltório membranoso externo (ROHRMANN, 2008). Contudo, mesmo não havendo modificações na estrutura poliédrica do BmNPV, os vírions poderiam ter sido afetados, seu DNA ou o capsídeo, devido a uma possível penetração do desinfetante, o que não seria perceptível em microscopia.

Assim, foi possível verificar que o formulado do Na DCC não se apresentou eficaz na inativação do BmNPV, mesmo após 48h de exposição ao desinfetante, conforme Tabela 1. Ao se comparar a mortalidade das lagartas inoculadas com o BmNPV, tratado com o desinfetante e sem o tratamento, não foi observada diferença significativa. Neste sentido, o poliedro, estrutura de resistência viral, permaneceu inalterado, impedindo que substâncias químicas, componentes do desinfetante, afetassem seus vírions, que se mantiveram viáveis, ou seja, com potencial infectivo. Em condições de campo, os resultados indicam que se manteriam inalterados, tendo em vista as condições severas de exposição do vírus ao desinfetante, conduzidas em laboratório.

Esses resultados diferem dos obtidos por FERREIRA *et al.* (2010) que analisaram a ação desinfetante do Na DCC na inativação de vírus envelopados e não envelopados de aves, bem como sobre bactérias. SALOMÃO *et al.* (2011) destacaram ainda a eficiência do Na DCC na destruição de esporos de *Penicillium expansum*.

Tabela 1 - Comparação entre tratamentos relacionados à ação do desinfetante de sódio dicloroisocianurato contra o nucleopoliedrovírus de *B. mori* em condições não controladas de criação das lagartas.

| Bioensaio (tratamentos) | Frequência (%) de lagartas mortas | Frequência (%) de encasulamento |
|--------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| BmNPV tratado com o desinfetante | 86,67 a* | 13,33 c |
| BmNPV não tratado com o desinfetante | 85,00 a | 15,00 c |
| Desinfetante (formulado de Na DCC) | 40,00 b | 60,00 b |
| Controle (água) | 8,33 c | 91,67 a |
| CV (%) | 11,87 | 14,51 |

*Médias, com letras diferentes na coluna, diferem estaticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Ainda, quando se compara a ocorrência de mortalidade das lagartas que receberam o alimento exposto ao desinfetante e a água (controle) (Tabela 1), fica evidente que o desinfetante exerce efeito negativo na resistência do inseto, tornando-o mais susceptível a doenças, neste caso, as virais. Assim, este estudo representa o primeiro relato da efeito/ação do Na DCC sobre o BmNPV e sobre lagartas de *B. mori*.

REFERÊNCIAS

BRANCALHÃO, R.M.C Vírus Entomopatogênicos no bicho-da-seda. *Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento*, v.24, p.54-58, 2002.

FERREIRA, A.J.P.; FERREIRA, C.S.A.; CHACÓN, J.L.; REVOLLEDO, L.; GROSS, R.; COTRIM, E. In vitro virucidal and bactericidal activities of Aviclor (a formulation of sodium dichloroisocyanurate) against pathogens of poultry origin. *Journal of Applied Poultry Research*, v.19, p.93-100, 2010.

FERREIRA, D.F. *Sistema Sisvar para análises estatísticas*. 2007. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/softwares.htm>> Acesso em: 10 ago. 2009.

PEREIRA, E.P.; CONTE, H.; RIBEIRO, L.F.; ZANATTA, D.B.; BRAVO, J.P.; FERNANDEZ, M.A.; BRANCALHÃO, R.M. Cytopathological process by multiple nucleopolyhedrovirus in the testis of *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v.99, p.1-7, 2008.

PORTO, A.J.; OKAMOTO, F.; IKUNO, A.A.; FERREIRA, V.C.A.; MARGATHO, L.F.F. Avaliação biológica e produtiva do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) alimentado com folhas de amoreira pulverizadas com extrato de *Mirabilis jalapa*. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.72, n.4, p.445-453, 2005.

POTRICH, M.; ALVES, L.F.A.; BRANCALHÃO, R.C.; DALCIN, G. Entomopatogênicos associados a lagartas de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) no estado do Paraná. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.74, n.4, p.363-367, 2007.

ROHRMANN, G.F. *Baculovirus Molecular biology*. Bethesda: NCBI, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bacvir>>. Acesso em: 18 out 2011.

SALOMÃO, B.C.M.; MÜLLER, C.; MASSAGUER, P.R.; ARAGÃO, G.M.F. Aplicação de dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético para redução de esporos de *Penicillium expansum*, *Byssosclamyces fulva* e *Alicyclobacillus Acidoterrestres* na superfície de maçãs e em soluções aquosas. *Alimentos e Nutrição*, v.22, p.219-230, 2011.

SURENDRA, N.B.; SURENDRA, K.R.P. Toxic impact of organophosphorus insecticides on acetylcholinesterase activity in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.42, p.157-162, 1999.

TAKAHASHI, R.; TAKAHASHI, K.M.; TAKAHASHI, L.S. *Sericicultura: uma promissora exploração agropecuária*. Jaboticabal: Funep, 2001. 140p.

TORQUATO, E.F.B.; MIRANDA NETO, M.H.; BRANCALHÃO, R.M.C.; VALDENI, S.F. Nucleopolyhedrovirus: scanning electron microscopy technique. *Neotropical Entomology*, v.35, p.787-790, 2006.

WATANABE, J.K.; YAMAOKA, R.S.; BARONI, S.A. *Cadeia produtiva da seda: diagnóstico e demandas atuais*. Londrina: IAPAR, 2000. 129 p.

Recebido em 12/6/12

Aceito em 18/4/13