

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – CÂMPUS DOIS
VIZINHOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS

ANA FLAVIA MARCELINO

***Bacillus thuringiensis* COMO BIOINSETICIDA: UMA AVALIAÇÃO DO ESTADO DA
ARTE E BIOENSAIO**

DISSERTAÇÃO

DOIS VIZINHOS, 2019

ANA FLAVIA MARCELINO

***Bacillus thuringiensis* COMO BIOINSETICIDA: UMA AVALIAÇÃO DO ESTADO DA
ARTE E BIOENSAIO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas – Área de Concentração: Genética de Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Cintra Maniglia
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Nédia de Castilhos Ghisi
Co-orientador: Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano da Silva

DOIS VIZINHOS, 2019

M314b Marcelino, Ana Flavia.
Bacillus thuringiensis como bioinseticida: uma avaliação do estado da arte e bioensaio. / Ana Flavia Marcelino – Dois Vizinhos, 2019.
50 f.:il.

Orientador: Profº Dr. Thiago Cintra Maniglia.
Coorientador: Profº Dr. Everton Ricardi Lozano da Silva.
Coorientadora: Profª Drª. Nédia de Castilhos Ghisi.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Dois Vizinhos, 2019.
Bibliografia p.44-49.

1. Entomologia. 2. Pragas agrícolas. 3. Plantas - Efeito dos inseticidas. I. Maniglia, Thiago Cintra, orient. II. Silva, Everton Ricardi Lozano da, coorient. III. Ghisi, Nédia de Castilhos, coorient. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos. V. Título

CDD: 595.7



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Dois Vizinhos
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n° 27

***BACILLUS THURINGIENSIS* COMO BIOINSETICIDA: UMA AVALIAÇÃO DO ESTADO DA ARTE E BIOENSAIO**

Ana Flavia Marcelino

Dissertação apresentada às nove horas do dia onze de fevereiro de dois mil e dezenove, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGROECOSSISTEMAS, Linha de Pesquisa – Manejo e Conservação de Agroecossistemas, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas (Área de Concentração: Agroecossistemas), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho

Banca examinadora:

Dr. Thiago Cintra Maniglia
UTFPR - TD

Dra. Samara Ernandes
UTFPR - DV

Dra. Suzana Costa Wrublack
UNIVEL

Coordenador(a) do PPGSIS
Assinatura e carimbo

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas.

AGRADECIMENTOS

Através destas palavras, gostaria de expressar todo meu sentimento de gratidão, àqueles que contribuíram para esta vitória!

Não foi fácil, a batalha foi árdua, mas com o apoio de muitas pessoas eu consegui. Em primeiro lugar agradeço a Deus por não me deixar fraquejar na Fé.

Agradeço ao meu pai Rogério, minha mãe Rozemari e ao meu namorado Darlei, pelo apoio emocional e também financeiro, para que pudesse realizar mais esta etapa de formação. Também agradeço a esta família, incluindo a minha irmã Natália, por estarem sempre ao meu lado, me dando força e coragem para continuar enfrentando as dificuldades que surgiram pelo caminho.

Agradeço também aos amigos que fiz durante o mestrado, àqueles que me ajudaram de forma incondicional na realização dos experimentos, como o Rodrigo e a Amanda e aos voluntários dos laboratórios.

Não posso deixar de agradecer também pelos amigos que fiz na graduação e que seguiram junto comigo no mestrado, muitas vezes me acolhendo em suas casas, como a Gilmarise e o Ednilson, Aliciane, Fernanda e Maiara.

Agradeço aos meus orientadores, Thiago e Nédia por acreditarem em meu trabalho, e também ao meu co-orientador Everton pelos conhecimentos compartilhados.

A todos os professores do mestrado, que deixaram sua contribuição para minha formação.

A UTFPR-DV, por estes 6 anos de ensino público de excelente qualidade.

Meu muito obrigada!

“Até que tenhamos coragem de reconhecer crueldade pelo que ela é - seja a vítima um animal humano ou não humano - não podemos esperar que as coisas melhorem neste mundo... não podemos ter paz vivendo entre homens cujos corações se deleitam em matar criaturas vivas. Para cada ato que glorifica o prazer de matar, estamos atrasando o progresso da humanidade.”

(Rachel Carson)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Amplificação de DNA através da PCR	18
Figura 2. Erlenmeyers contendo isolados prontos para centrifugação	19
Figura 3. Quantificação de UFCs através da técnica da microgota	20
Figura 4. Placas de 12 poços com tratamento já aplicado sobre a dieta	21
Figura 5. <i>Chrysodeixis includens</i> sobre dieta artificial após a aplicação do tratamento	21
Figura 6. Preparação da corrida eletroforética	23
Figura 7. Gráfico comparativo de tratamentos pelo teste de Kruskal Wallis.	24
Figura 8. Resultados obtidos através de eletroforese	28
Figura 9. Gráfico demonstrativo “Categorias Web of Science”	34
Figura 10. Gráfico demonstrativo “Anos de Publicação”	36
Figura 11. Gráfico demonstrativo “Países” com até 5 citações	37
Figura 12. Autores mais citados como referência nos artigos selecionados	39
Figura 13. Gráfico gerado pelo CiteSpace relacionando autor+citação	40
Figura 14. Gráfico gerado pelo CiteSpace demonstrando as categorias de pesquisa com maior número de publicações	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gene, primer e condições de PCR utilizados para caracterização dos isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
Tabela 2. Perfil Genético obtido após PCR	27
Tabela 3. Top 10 trabalhos mais citados entre 1988 e 2018	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	9
2. POTENCIAL BIOINSETICIDA DE LINHAGENS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> SOBRE <i>Chrysodeixis includens</i>	12
RESUMO	12
ABSTRACT	13
2.1 Introdução	14
2.2 Material e Métodos	19
2.2.1 Bioensaio	19
2.2.2 Caracterização molecular	21
2.2.3 Estatística Descritiva	23
2.3 Resultados e Discussão	23
2.3.1 Bioensaio	23
2.3.2 Caracterização Molecular	26
2.4 Conclusões	29
3. ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA	30
RESUMO	30
ABSTRACT	30
3.1 Introdução	31
3.2 Materiais e Métodos	33
3.3 Resultados e Discussão	34
3.4 Conclusões	42
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO GERAL

O manejo dos ecossistemas naturais para sistemas de produção agrícola (agroecossistema) visando maximizar a produção de alimentos têm se intensificado ano após ano, a partir da década de 60, onde instaurou-se a chamada “Revolução Verde”. De acordo com Hart (1978), um agroecossistema pode ser definido como o conjunto de interações físicas e biológicas de seus componentes, onde o ambiente vai determinar a presença de cada componente no tempo e espaço, sendo que este arranjo de componentes será capaz de processar *inputs* (insumos) ambientais e produzir *outputs* (produtos). O objetivo dos agroecossistemas na agricultura sustentável é reduzir ao máximo os *inputs* externos, ou seja, que o agroecossistema seja capaz de produzir seus insumos naturalmente, gerando produtos para a exploração sustentável.

Porém, devido à grande pressão produtiva e comercial sofrida pelos agricultores, estes agroecossistemas têm se tornado bastante simplificados, onde a cobertura vegetal diversificada é substituída pelo cultivo de uma única espécie vegetal (monocultura) em grandes extensões e em ciclos anuais, causando perda de biodiversidade dos ecossistemas naturais (AGUIAR-MENEZES; SILVA, 2011) e utilizando grande quantidade de *inputs* vindos de fora dos agroecossistemas.

Estas modificações na forma tradicional de trabalho na agricultura, causaram impactos sobre o meio ambiente e a saúde humana. Foram disponibilizadas novas tecnologias baseadas no uso extensivo de agrotóxicos para o controle de doenças e pragas e aumento da produtividade (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

Com o passar dos anos, vêm se acumulando no meio ambiente os prejuízos causados pelo uso de pesticidas químicos, incluindo os inseticidas de amplo espectro que atingem organismos não-alvo causando desequilíbrio no ecossistema. A partir da percepção dos danos causados por estes agroquímicos, se deu início a busca por alternativas que fossem capazes de controlar as pragas sem prejudicar os demais seres vivos. O controle biológico, praticado desde o século III d. C. é uma destas alternativas (PARRA, 2014). Os microrganismos entomopatogênicos ocupam papel de destaque neste controle, devido a sua ocorrência natural e capacidade de manipulação como inseticida biológico (MOSCARDI, 1998).

Segundo Alves; Lopes (2008), o controle biológico constitui praticamente a única alternativa viável para o controle de pragas que atenda à demanda mundial cada vez mais expressiva de alimentos e produtos livres de resíduos tóxicos de pesticidas químicos.

Microrganismos entomopatógenos como vírus, fungos e bactérias são capazes de provocar doenças nos insetos e controlar a população destes. A vantagem da utilização destes agentes está na sua alta seletividade e especificidade quanto aos organismos alvo, além da grande diversidade e facilidade de manipulação. Além disso, inseticidas biológicos não causam poluição ambiental e nem prejuízos à saúde humana.

As bactérias da espécie *Bacillus thuringiensis* (Bt) são esporulantes, gram-positivas, formadora de esporos, que sintetiza uma extraordinária diversidade de proteínas inseticidas e tem demonstrado seu potencial e segurança como agente de biocontrole ao longo de mais de cinco décadas (PALMA et al., 2014). As proteínas inseticidas incluem cristal e proteínas secretadas altamente tóxicas contra uma ampla gama de espécies de invertebrados e a compreensão de seus modos de ação e biologia estrutural têm aumentando concomitantemente a busca pela diminuição do uso de inseticidas químicos, devido à grande quantidade de prejuízos que estes últimos causam a organismos não-alvo e inclusive a saúde humana.

O Bt é uma bactéria única na medida em que compartilha um lugar comum com um número de compostos químicos que são usados comercialmente para controlar insetos importantes para a agricultura e saúde pública. Embora outras bactérias sejam usadas como inseticidas microbianos, seu espectro de atividade inseticida é bastante limitado em comparação ao Bt. É importante ressaltar que o Bt é seguro para os seres humanos e é o biopesticida ambientalmente compatível usado em todo o mundo. Além disso, genes inseticidas desta bactéria foram incorporados a várias culturas importantes, tornando-as resistentes a insetos e fornecendo um modelo para a engenharia genética na agricultura (IBRAHIM et al., 2010).

O ataque de insetos praga às culturas é um fator que limita a produção e causa prejuízos econômicos. Tradicionalmente, os produtores estão acostumados a lidar com uma gama de insetos praga que atacam suas culturas, buscando sempre métodos eficazes de controle. Porém, nos últimos anos, pragas que eram consideradas secundárias, têm ocorrido com maior frequência caracterizando-se como pragas chave, o que têm preocupado agricultores (MOSCARDI, 2003).

A lagarta *Chrysodeixis includens* é um inseto da ordem Lepidóptera, que em sua fase larval ataca folhas de culturas como a soja, e tem sido considerada pelos pesquisadores como uma praga que está tomando lugar de destaque, pois devido aos seus hábitos alimentares causa prejuízos devido a diminuição de área foliar e conseqüentemente de fotossíntese da planta. O controle desta espécie de Lepidóptera, também conhecida como lagarta-falsa-medideira é feito tipicamente com inseticidas químicos sintéticos. Contudo, esta praga é considerada de difícil controle por apresentar resistência aos inseticidas e também por ter o hábito de permanecer na

parte inferior das folhas, dificultando o contato com o agrotóxico pulverizado (BERNARDI, 2012).

Este trabalho teve como objetivo verificar o potencial inseticida de oito isolados de Bt para a lagarta *C. includens*, e identificar a presença de genes que produzem proteínas entomopatogênicas utilizando técnicas de biologia molecular. Além disso, foi realizada uma análise cienciométrica sobre a produção científica envolvendo Bt como biopesticida.

2. POTENCIAL BIOINSETICIDA DE LINHAGENS DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE *Chrysodeixis includens*

RESUMO

O inseto *Chrysodeixis includens*, também conhecida como lagarta-falsa-medideira têm se destacado nos últimos anos como uma praga que causa grandes prejuízos econômicos, principalmente a cultura da soja (*Glycine max*). Devido ao seu hábito alimentar de consumir o parênquima foliar, ela prejudica o desenvolvimento da planta afetando diretamente a produção. Sendo considerada uma praga de difícil controle por inseticidas químicos e de grande importância econômica, faz-se necessária a realização de estudos que permitam identificar métodos alternativos de controle. Dentre as alternativas para o controle desta praga pode-se destacar o uso de microrganismos entomopatogênicos como a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), com grande quantidade de produtos comerciais já disponíveis no mercado. Os formulados de Bt em sua maioria são produzidos a partir de linhagens isoladas em grandes empresas que detêm as patentes destes produtos. Os métodos de controle alternativo são bastante eficientes e buscam a diminuição da utilização de produtos químicos, a fim de diminuir a poluição ambiental e os efeitos deletérios em organismos não-alvo. Todavia, assim como ocorre com os inseticidas químicos, as pragas apresentam mecanismos de defesa que driblam a ação e prejudicam a eficiência dos biopesticidas. Além disso, a seleção de indivíduos resistentes pode comprometer totalmente o funcionamento de um método de controle. Com isso, sabendo da grande diversidade de linhagens de Bt existentes é possível manter constantemente uma grande diversidade de estudos que buscam linhagens potencialmente entomopatogênicas com o objetivo de manter sempre no mercado biopesticidas eficientes tornando cada vez menor a quantidade de inseticidas químicos utilizados. As pesquisas que se constituem de bioensaios para verificar a letalidade dos isolados em pragas alvo, também contam com técnicas de biologia molecular que permitem identificar genes e relacioná-los a patogenicidade específica de algumas linhagens. Sendo assim, realizou-se bioensaio de oito isolados de Bt sobre *C. includens*. Não havendo mortalidade dos insetos, buscou-se através da caracterização molecular identificar quais genes estavam presentes nestes oito isolados. Após a caracterização, foi possível observar que os isolados em questão não apresentavam os genes tradicionalmente descritos como patogênicos para insetos da ordem Lepidoptera, confirmando os resultados obtidos no bioensaio. Ainda, foram encontrados outros 3 genes, que de acordo com a literatura

apresentam efeitos positivos no controle de insetos da ordem Coleóptera, também frequentemente relatada com representantes causando prejuízos a agricultura e pecuária.

Palavras chave: Bioensaio, *Bacillus thuringiensis* (Bt), Entomopatogênico, Genes *cry*

ABSTRACT

The insect *Chrysodeixis includens*, also known in Brazil as lagarta-falsa-medideira has been highlighted in recent years as a pest that causes great economic losses, especially the crop of soy (*Glycine max*). Due to its eating habit of consuming the leaf parenchyma, it impairs the development of the plant directly affecting production. Being considered a pest of difficult control by chemical insecticides and of great economic importance, it is necessary to carry out studies that allow to identify alternative methods of control. Among the alternatives for the control of this pest can be highlighted the use of entomopathogenic microorganisms such as *Bacillus thuringiensis* (Bt) bacteria, with a high quantity of commercial products already available in the market. Bt formulations are mostly produced from isolated lineages in large companies that hold the patents of these products. Alternative control methods are quite efficient and seek to reduce the use of chemicals in order to reduce environmental pollution and deleterious effects on non-target organisms. However, as with chemical insecticides, the pests present defense mechanisms that dribble the action and impair the efficiency of biopesticides. In addition, the selection of resistant individuals may totally compromise the functioning of a control method. Thus, knowing the great diversity of existing Bt strains, it is possible to maintain a great diversity of studies that seek potentially entomopathogenic strains with the objective of always maintaining efficient biopesticides in the market, reducing the amount of chemical insecticides used. The researches that constitute of bioassays to verify the lethality of the isolates in target pests, also count on techniques of molecular biology that allow to identify genes and to relate them to the specific pathogenicity of some lineages. Thus, the present study performed a bioassay of 8 Bt isolates on *C. includens*. Without insect mortality, it was sought through the molecular characterization to identify which genes were present in these 8 isolates. After characterization, it was possible to observe that the isolates in question did not present genes traditionally described as pathogenic to insects of the Lepidoptera order, confirming the results obtained in the bioassay. Also, 3 other genes were found, which according to the literature have positive effects on the control of coleoptera insects, also frequently reported with representatives causing damage to agriculture and livestock.

Keywords: Bioassay, *Bacillus thuringiensis* (Bt), Entomopathogenic, *cry* genes.

2.1 Introdução

A agricultura, além de ser produtora de alimentos é parte fundamental da composição da economia mundial e pode contribuir para a erradicação da pobreza e da fome. Além disso possibilita a rápida industrialização, a diversificação econômica, os recursos sustentáveis, os investimentos e a gestão ambiental. Contudo, a necessidade da adoção de práticas agrícolas sustentáveis tornou-se primordial para a manutenção dos recursos (UMESHA; SINGH; SINGH, 2018). A adoção de técnicas que incluem controle biológico e biotecnologias podem ajudar na transição da atual agricultura tradicional para uma agricultura mais sustentável, retornando aos conceitos ecológicos de agroecossistemas.

Desde o século III d.C. já existem relatos da utilização de controle biológico de pragas, mas somente em 1988 o primeiro programa de sucesso foi aplicado na Califórnia, com o uso de *Rodolia cardinalis* (Coleoptera: Coccinellidae) para controle *Icerya purchasi* (Hemiptera: Monophlebidae), uma cochonilha que estava infestando pomares (PARRA, 2014).

DeBach (1968) define o controle biológico como “a ação de parasitoides, predadores e patógenos na manutenção da densidade de outro organismo a um nível mais baixo do que aquele que normalmente ocorreria nas suas ausências”.

Existem três classes de controle biológico: Clássico, Conservativo e Aumentativo. De acordo com Erthal Junior (2011) é possível definir controle clássico como importação de um agente de controle de outra região ou até mesmo país, visando estabelecer um nível de equilíbrio da praga no ecossistema em que ela se encontra inserida; Já o controle conservativo baseia-se na manipulação do ambiente para favorecer o desenvolvimento de inimigos naturais que ocorrem naturalmente na mesma região da praga, visando mantê-los no agroecossistema. Por fim, o controle aumentativo é aquele que consiste em liberações controladas do inimigo natural, durante um período do ano em que ela não ocorra naturalmente, ou quando a quantidade presente não for suficiente para controlar a praga, na forma inoculativa (liberando pequenas quantidades) ou inundativa (liberando grandes quantidades).

No Brasil, o controle biológico está progredindo, principalmente quando utilizado dentro de programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP). A abordagem do MIP traz técnicas de controle que visam manter a densidade populacional de pragas abaixo do limiar de dano econômico (PARRA, 2014).

Dentre os agentes de controle biológico, os microrganismos entomopatogênicos (vírus, fungos e bactérias) vêm ganhando destaque no mercado, totalizando cerca de 3% das vendas de pesticidas no ano de 2014 (LACEY et al., 2015).

O uso de bactérias entomopatogênicas para o controle de pragas iniciou-se após a descoberta do potencial inseticida de toxinas bacterianas, pela investigação de doenças que acometiam criações de insetos como *Apis mellifera* (Abelha melífera) e *Bombyx mori* (Bicho da seda) (COSTA et al., 2010)

A bactéria Bt foi isolada pela primeira vez em 1902 no Japão em criação massal de *Bombyx mori*. Alguns anos mais tarde em 1911 na Alemanha, foi isolado o microrganismo responsável pela morte de *Anagasta kuehniella* (traça da farinha) o qual recebeu o nome de *Bacillus thuringiensis*. A presença de cristais só foi descoberta em 1953, quando foi associada a toxicidade aos mesmos (HABIB; ANDRADE, 1998).

O microrganismo Bt é descrito como uma bactéria esporulante, gram-positiva, formadora de cristal paraesporal durante a fase estacionária de seu crescimento e com atividade entomopatogênica (SCHNEPF et al., 1998).

A espécie *Chrysodeixis* (= *Pseudoplusia*) *inclusens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae) também conhecida como lagarta-falsa-medideira, tem se destacado nos últimos anos como uma praga economicamente prejudicial a cultura da soja (*Glycine max*). De acordo com Bernardi (2012), o acréscimo no índice de surtos desta praga está relacionada ao aumento do uso de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja, que diminuem a ação do controle biológico natural, além da resistência aos inseticidas químicos e também biológicos já disponíveis em mercado a base de Bt, sendo considerada de difícil controle por produtores.

A distribuição geográfica da lagarta-falsa-medideira restringe-se ao Ocidente, sendo encontrada desde o Sul da América do Sul até o norte dos Estados Unidos (MOSCARDI et al., 2012). No Brasil já foi registrada a ocorrência da praga desde o extremo norte do Brasil, no estado de Roraima, até o extremo sul no Rio Grande do Sul (MARSARO et al., 2010).

Esta espécie pode se desenvolver em pelo menos 73 tipos de plantas hospedeiras e é considerado polífaga, o que contribui para o desenvolvimento de populações em diferentes hospedeiros, permanecendo no ambiente até a localização do hospedeiro de preferência, como a soja (BERNARDI, 2012).

Além da soja, outras culturas de interesse agrônômico e até mesmo de floricultura são consideradas hospedeiras da lagarta-falsa-medideira (MOSCARDI et al., 2012). Há alguns anos, houve o primeiro registro de ataque em cultivo de abacaxi (*Ananas comosus* L.) (Bromeliaceae) por *C. inclusens* (DETONI et al., 2010).

A espécie *C. includens* é um inseto da ordem Lepidoptera, família Noctuidae e Subfamília Plusiinae. As lagartas-falsas-medideiras são assim chamadas por seu deslocamento característico de “medir palmos” possuindo dois pares de falsas pernas abdominais, são de cor clara com listras brancas longitudinais e pontuações pretas. A fase larval dura de 14 a 20 dias, passando por 6 ínstaes atingindo até 45 mm de comprimento em seu último estágio larval (SOSA-GÓMEZ et al., 2014).

Os prejuízos causados pela lagarta-falsa-medideira na cultura da soja ocorrem durante a fase de vegetativa e de floração, onde o parênquima foliar é consumido pela lagarta, deixando de lado as nervuras, conferindo aspecto rendilhado (SOSA-GÓMEZ et al., 2014).

Sabendo do potencial de controle oferecido pelas diferentes linhagens de Bt, iniciaram-se trabalhos que buscam identificar as cepas com atividade bioinseticida. Além de bioensaios-teste realizados sobre insetos alvo e não alvo, as pesquisas envolvendo este microrganismo entomopatogênico passaram a contar com o auxílio das tecnologias da biologia molecular, que através do estudo do DNA genômico das linhagens de Bt permitem a identificação do perfil proteico produzido por cada linhagem. Com isso, foi possível estabelecer uma relação entre as proteínas expressadas pelos isolados e sua ação bioinseticida para determinadas ordens de inseto.

O DNA (ácido desoxirribonucleico) é uma molécula que tem em sua estrutura duas cadeias polipeptídicas compostas por quatro tipos de subunidades nucleotídicas (ALBERTS et al., 2011). A descoberta desta estrutura se deu por meio da aplicação de difração de raios X, possibilitando a determinação da estrutura tridimensional da molécula na década de 1950, por Rosalind Franklin. Em 1953, James Watson e Francis Crick, propuseram que as moléculas de DNA consistem em duas cadeias de nucleotídeos. Essas cadeias são mantidas juntas por atrações químicas fracas – chamadas ligações de hidrogênio - entre pares particulares de bases (SNUSTAD; SIMMONS, 2013).

Para a realização de estudos em biologia molecular, a extração do DNA é a etapa inicial e que deve ser realizada seguindo protocolos que estejam de acordo com o objeto de estudo. Os protocolos de extração geralmente dividem-se em duas etapas, onde inicialmente ocorre o rompimento de membranas e a exteriorização do material genético e em seguida deve ser feita a purificação deste material (GOUVEIA; REGITANO, 2007).

A Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foi desenvolvida em 1983 por Kary Banks Mullis, que em 1993 recebeu o Prêmio Nobel de Química por esta descoberta (BESNARD et al., 2015).

A PCR é um método *in vitro* para produzir grandes quantidades de um fragmento de DNA específico de comprimento e sequência definidos a partir de pequenas quantidades de um modelo complexo, denominados primers ou iniciadores (WHITE; ARNHEIM; ERLICH, 1989). Por ser uma técnica muito sensível, a PCR tem inúmeras aplicações em biologia. Ela pode amplificar sequências alvo que estão presentes em números de cópias extremamente baixos em uma amostra, desde que sejam utilizados primers específicos para essa sequência rara (GRIFFITHS et al., 2016).

A PCR tornou-se comum e muitas vezes uma técnica indispensável usada em laboratórios de pesquisa médica e biológica para uma variedade de aplicações. Estes incluem clonagem de DNA para sequenciamento, filogenia baseada em DNA ou análise de genes, o diagnóstico de doenças hereditárias, a identificação de impressões digitais genéticas nas ciências forenses e testes de paternidade, e a detecção e diagnóstico de doenças infecciosas (PATEL et al., 2005).

Este método de amplificação do DNA genômico é constituída de três etapas: Desnaturação, Anelamento (ou hibridização) e Elongação (ou Extensão). A etapa de desnaturação consiste na elevação da temperatura da reação a 94°C, permitindo a abertura da dupla fita de DNA, tornando-as fitas simples. A segunda etapa, o anelamento, possibilita que um par de primers se liguem a sequência complementar nas fitas abertas (hibridização), a temperatura deste passo varia de acordo com o tipo de primer utilizado geralmente entre 50 e 60°C. Na última etapa, chamada de alongação, a enzima DNA-polimerase faz a adição de bases complementares nas fitas simples de DNA, tornando-as novamente dupla fita; esta etapa ocorre em 72°C (SANTIAGO et al., 2007).

As três etapas de amplificação constituem um ciclo, que é repetido de 30 a 40 vezes, para que haja a quantidade desejada de DNA. O produto de cada ciclo serve como molde para o ciclo seguinte, obtendo-se um crescimento exponencial no número de cópias de DNA, como pode ser observado na figura 1.

A eletroforese em gel é uma ferramenta extremamente importante para os trabalhos de biologia molecular. Através dela é possível observar a amplificação de genes e comparar os resultados obtidos pela técnica da PCR. O princípio da eletroforese consiste na separação de macromoléculas de diferentes tamanhos através da passagem de uma corrente elétrica pelo gel. As moléculas de DNA têm uma carga constante por unidade de massa o que permite que todos os fragmentos de DNA migrem. A separação destes fragmentos ocorre em função de seu tamanho, pois os géis que podem ser de agarose ou de poliacrilamida, funcionam como

peneiras, que retardam a passagem das moléculas de maior peso molecular (SNUSTAD; SIMMONS, 2013).

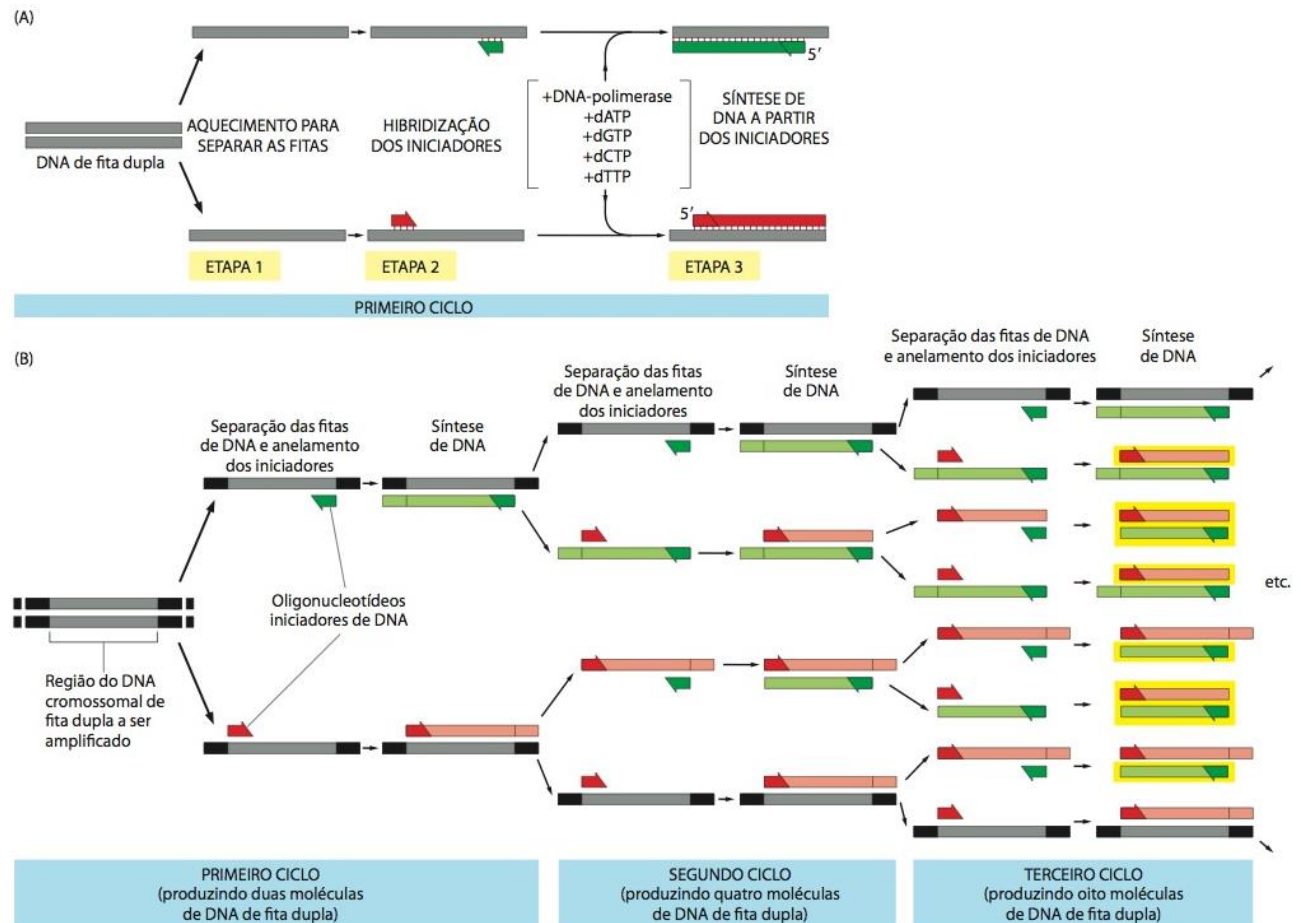


Figura 1. Amplificação de DNA através da PCR. Em (A) estão representadas as três etapas que constituem cada ciclo de PCR, indicada da figura como o primeiro ciclo. Em (B), o processo representado em (A) é repetido dentro de cada ciclo, aumentando o número de cópias de DNA.

Fonte: (ALBERTS et al., 2011)

Para a corrida eletroforética, o gel é posicionado em uma cuba com eletrodos nas extremidades, de modo que os poços estejam na extremidade catódica (negativamente carregada) e o DNA, em virtude da sua carga negativa, migre até a extremidade anódica (positivamente carregada). A velocidade de migração das moléculas de DNA no gel é inversamente dependente do seu tamanho, sendo que as pequenas moléculas se movimentam mais fácil e rapidamente quando comparada aos fragmentos maiores (GRIFFITHS et al., 2016).

O objetivo desta pesquisa foi identificar isolados de *B. thuringiensis* com possível efeito inseticida sobre a lagarta *C. includens*. Além disso, buscou-se identificar quais genes *cry*

estavam presentes no DNA destes isolados e se o perfil de proteínas que são expressas por estes genes estavam de acordo com os resultados obtidos durante os bioensaios.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Bioensaio

O bioensaio foi realizado no laboratório de Controle Biológico I da UTFPR – Dois Vizinhos.

Oito isolados de *Bt* provenientes da Universidade Estadual de Londrina (UEL) foram selecionados. Os isolados BR135, BR138, IPS82, BR58, BR80, BR137, BR146, BR67 encontravam-se armazenados em freezer à -4°C em sua forma purificada.

Para a multiplicação, uma alíquota de cada isolado foi coletada e inoculada em Erlenmeyers contendo meio de cultura líquido Caldo-Nutriente, composto de caldo de carne e peptona e multiplicados durante 96 h em agitador horizontal a 30°C e 110 rpm.

Após a multiplicação, o conteúdo dos Erlenmeyers foi transferido para tubos falcon de 15 mL para purificação. A purificação foi realizada através de centrifugação, sendo composta por 4 etapas: uma centrifugação por 15 minutos à 14000 rpm, seguida por três centrifugações de 5 minutos cada também à 14000 rpm. Após cada centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com água destilada autoclavada.



Figura 2. Erlenmeyers contendo isolados de *B. thuringiensis* já multiplicados prontos para centrifugação.

Fonte: A autora, 2017

Posteriormente a purificação dos isolados, estes foram ressuspensos em um tubo estoque e diluídos através de diluição seriada para quantificação. Os isolados foram quantificados pela técnica da microgota, em que placas de Petri contendo meio de cultura Ágar-Nutriente foram inoculadas em 5 pontos contendo 5 μ L de isolado cada. As placas foram incubadas em BOD por 15 horas, a 30°C. Após o crescimento foi possível quantificar o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em cada 5 μ L e também no tubo estoque. Obtendo-se o número de UFC foi possível determinar a concentração 3 x 10⁸ UFC/mL (padrão) para a utilização no bioensaio.

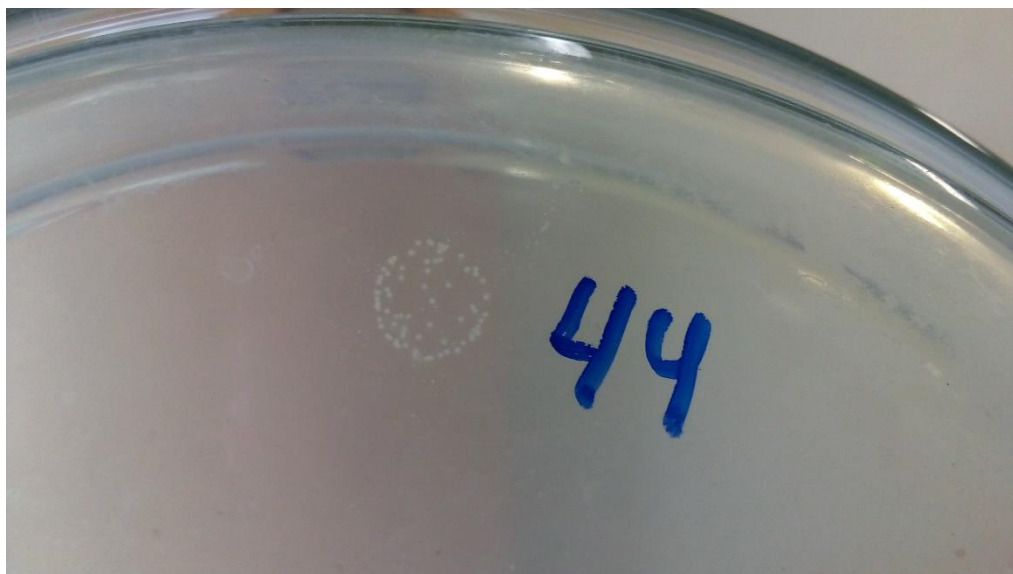


Figura 3. Quantificação de UFCs através da técnica da microgota.
Fonte: A autora, 2017

O bioensaio foi realizado com dez tratamentos: oito isolados de Bt, um controle negativo composto por água + Tween e um controle positivo composto por um produto comercial *B. thuringiensis*, subsp. kurstaki, linhagem HD-1.

Cada tratamento contou com sete repetições, sendo que cada repetição consistia em uma placa de 12 poços. Os poços foram preenchidos com dieta artificial para *C. includens*, e em seguida receberam uma alíquota de solução (calculada de acordo com a quantificação) contendo a concentração padrão (3 x 10⁸ UFC/mL) para cada tratamento. Após a absorção total do tratamento pela dieta, foi alocado um inseto por poço e as placas foram fechadas. As placas foram armazenadas em câmara climatizada a 27°C, UR60% e fotofase de 14 horas. As avaliações foram realizadas após 12, 24, 48 e 72 h.



Figura 4. Placas de 12 poços com tratamento já aplicado sobre a dieta.
Fonte: A autora, 2017.

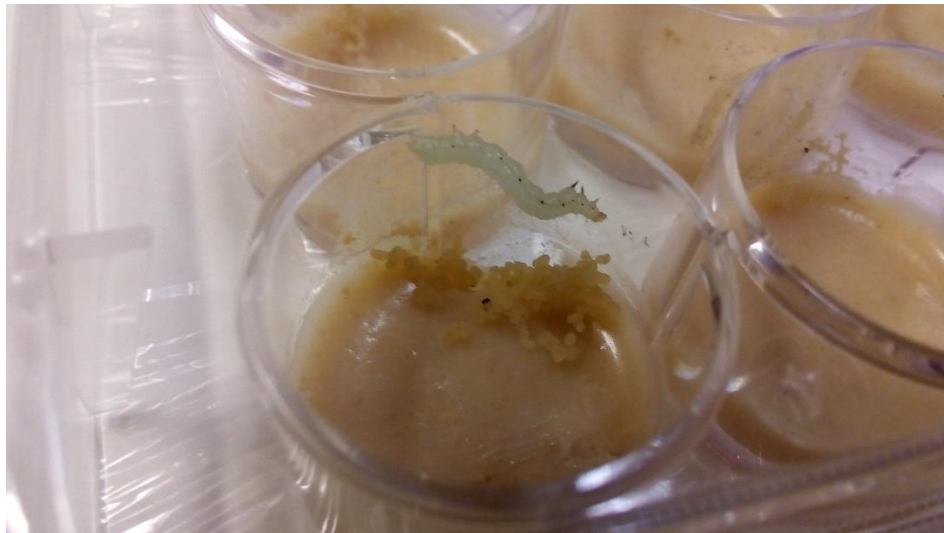


Figura 5. *Chrysodeixis includens* sobre dieta artificial após a aplicação do tratamento.
Fonte: A autora, 2017.

2.2.2 Caracterização molecular

A caracterização molecular foi realizada para cinco do total de oito isolados utilizados no bioensaio, sendo que os outros três já haviam sido descritos em outros estudos. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da UTFPR-DV.

O procedimento inicial consistiu na extração do DNA dos isolados, através da técnica de fervura em solução TE (Tris-EDTA) descrita por Hansen e Hendriksen (2001). Após a extração o material genético de cada isolado foi mantido armazenado em freezer à -4°C .

As PCRs foram realizadas utilizando MasterMix da marca Ludwig®. Para cada reação foram utilizados 15µL de MasterMix, 0,5µL de cada primer e 3µL de DNA. As reações foram processadas em Termociclador da marca Agilent® com temperaturas e número de ciclos específicos para cada par de primers, conforme descrito da tabela 1. Foram utilizados 6 pares de primers para amplificação dos genes *cry1*, *cry2* e *cry11* utilizados por Bravo et al., (1998) e Ibarra et al., (2003), *cry3* usado por Ben-Dov et al., (1997), *cry4* por Bukhari; Shakoori (2014) e *cry10* também utilizado por Ibarra et al., (2003).

Após a realização das PCRs, os resultados obtidos foram observados através de corrida de eletroforese em gel de agarose a 1%. Os géis foram preparados em cuba de 100 mL, contendo 14 poços. Para a corrida, uma alíquota de 1,5µL de loading buffer mais 1µL de GelRed eram acrescentados a 8µL de DNA, sendo misturados e adicionados aos poços do gel. A mistura para o marcador de pares de bases era preparada com 1,5µL de loading buffer, 1µL de GelRed e 5µL de ladder.

Cada corrida foi realizada em condições de 100 mA, 80 V, durante 60 minutos. Após a corrida os resultados foram observados em fotodocumentador Locus® e registrados na forma de imagens.

Tabela 1. Gene, primer e condições de PCR utilizados para caracterização dos isolados de *Bacillus thuringiensis*

Primer (gene)	Sequência de nucleotídeos	Produto (pb)	Número de ciclos	Tempo (s), Temperatura (°C) Desnaturação	Tempo (s), Temperatura (°C) Anelamento	Tempo (s) e Temperatura (°C) Extensão
<i>cry1</i>	(f) CTGGATTTACAGGTGGGGATAT (r) TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT	(r) 558	30	60, 94	60, 52	60, 72
<i>cry2</i>	(f)GAGTTTAATCGACAAGTAGATAATTT (r)GGAAAAGAGAATATAAAAATGGCCAG	526	30	60, 94	60, 50	60, 72
<i>cry3</i>	(f) CGTTATCGCAGAGATGACATTAC (r) CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT	(r) 652-733	30	60, 94	60, 52	60, 72
<i>cry4</i>	(f) GCATATGATGTAGCGAAACAAGC (r) GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC	439	30	60, 94	60, 52	60, 72
<i>cry10</i>	(f) TCAATGCTCCATCCAATG (r) CTTGTATAGGCCTTCCTCCG	348	30	45, 94	60, 51	60, 72
<i>cry11</i>	(f) CGCTTACAGGATGGATAGG (r) GCTGAAACGGCACGAATATAAATA	342-352	30	60, 94	45, 50	60, 72

Todas as reações contaram com uma etapa inicial de aquecimento à 94°C por 2 minutos e uma etapa final de extensão à 72 °C por 5 minutos.



Figura 6. Preparação da corrida eletroforética.
Fonte: A autora, 2018.

2.2.3 Estatística Descritiva

A estatística descritiva dos resultados obtidos durante o bioensaio incluíram dados de mortalidade diária, que foram somados na forma de mortalidade acumulada, e os tratamentos foram submetidos a análise no software Statística®. Foram realizados testes de pressupostos para verificar a normalidade e homocedasticidade. Não havendo normalidade dos dados, os mesmos foram analisados por meio Kruskal-Wallis, com um nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95%.

2. 3 Resultados e Discussão

2.3.1 Bioensaio

Observando os dados obtidos no bioensaio, verificou-se a seguinte porcentagem de mortalidade para os seguintes tratamentos: Controle negativo 13% (T1), BR135 8,33% (T2), BR138 9,5% (T3), IPS82 8,33% (T4), BR58 13,09% (T5), BR80 8,33% (T6), BR137 4,76% (T7), BR146 9,5% (T8), BR67 5,95% (T9) e Controle Positivo 72% (T10).

Após análise estatística, verificou-se diferença significativa apenas do controle positivo para os demais tratamentos, obtendo-se um valor $p=0,0021$. Os demais tratamentos, ou seja, os

isolados de Bt e o controle negativo, não diferiram entre si, como pode ser observado na figura 7.

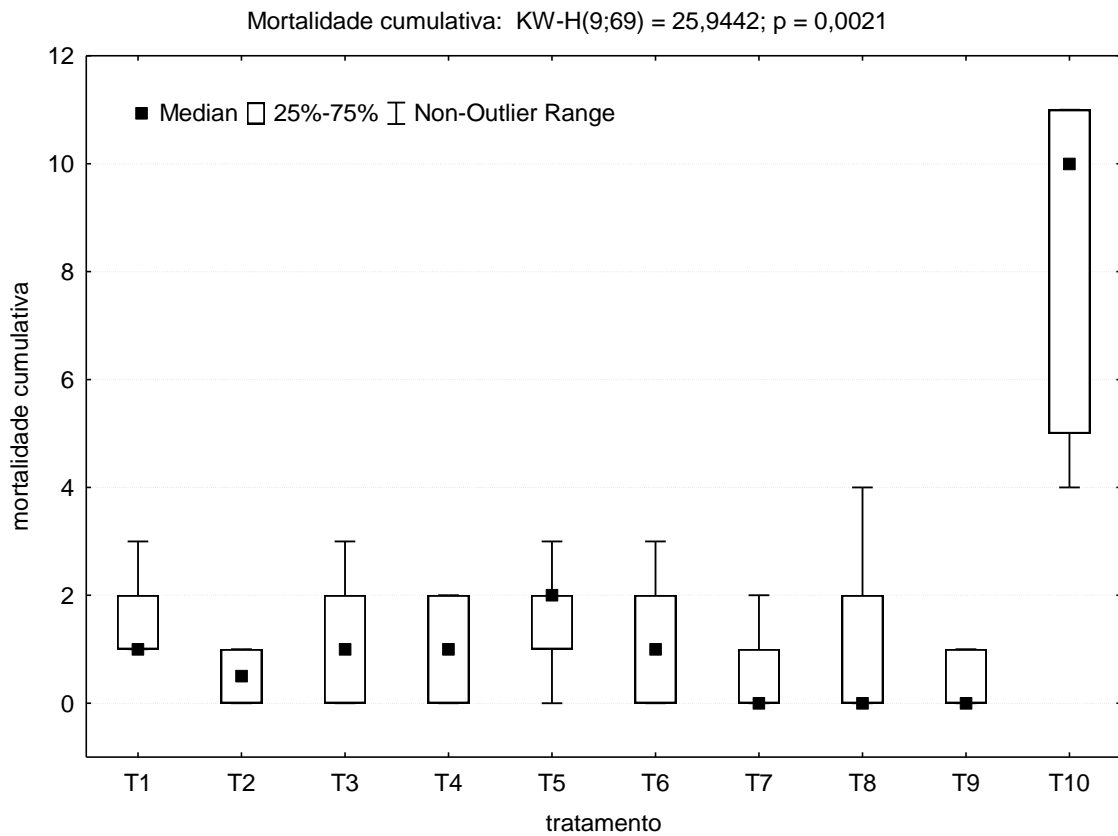


Figura 7. Gráfico comparativo de tratamentos obtido pelo teste de Kruskal-Wallis.
Fonte: A autora, 2018

A linhagem HD-1, que foi considerada como controle positivo e apresentou 72% de mortalidade já foi descrita em vários estudos como sendo letal para insetos da ordem Lepidóptera, existindo inclusive produtos comerciais fabricados a partir deste isolado. O resultado obtido pode ser explicado porque diferentes linhagens da bactéria são capazes de produzir uma gama de cristais determinados por genes *cry*. A atividade entomopatogênica de Bt está relacionada a produção do cristal paraesporal. Juntamente com o cristal é liberada uma proteína denominada Cry, codificadas por genes chamados *cry*. São estas proteínas que agregam o potencial inseticida para determinados insetos, tornando-se letais após a ingestão e solubilização no pH alcalino do inseto. Além das proteínas Cry, existem também as proteínas Cyt e Vip com ação semelhante (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

As toxinas produzidas pelo cristal, que também podem ser chamadas de delta-endotoxinas, são produzidas após o crescimento vegetativo durante o processo de esporulação. A diversidade de populações naturais dessa bactéria em relação a sua patogenicidade pode ser explicada pelo fato de a grande maioria dos genes para toxinas ser extracromossômica, sendo

encontrada em plasmídeos, o que permite a formação de novas combinações de toxinas naturalmente através da troca dessas partículas entre as diferentes linhagens (HABIB; ANDRADE, 1998).

O efeito inseticida de Bt é provocado após a ingestão dos cristais pelo inseto. Quando os cristais chegam ao intestino do inseto, as proteínas que tem peso molecular de 70 a 140 kDa (variando de acordo com o tipo de proteína) são quebradas em fragmentos menores, por enzimas digestivas, ativando as protoxinas. As protoxinas reconhecem receptores das microvilosidades do intestino médio do inseto ligando-se a eles em caso de especificidade. Uma vez ligadas aos receptores, as protoxinas promovem a formação de poros na membrana da célula provocando o desequilíbrio iônico do meio interno da célula com o meio externo. A destruição das microvilosidades e a turgidez das células levam à lise celular, seguido da paralisia da musculatura intestinal e do restante do corpo. Além disso, a toxina bacteriana presente na proteína é capaz de promover a permeabilidade na parede intestinal, alterando o pH da hemolinfa e desencadeando a septicemia no inseto (FIUZA, 2010).

Diferentes linhagens da espécie *B. thuringiensis* são letais a diferentes ordens de insetos. Isso ocorre devido a diversidade de genes *cry* existentes. Cada gene codifica um determinado tipo de proteína, e estas proteínas tem ação tóxica para insetos que possuam receptores específicos para elas (PINTO et al., 2010)

A observação destas características levou ao desenvolvimento de inseticidas biológicos a base de Bt para o controle de certas espécies de insetos dentro das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e outras (SCHNEPF et al., 1998).

Segundo (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007), os cristais codificados pelos genes *cry1* e *cry2* estão associados a letalidade de insetos da ordem Lepidoptera, enquanto *cry4* e *cry11* são considerados letais para ordem díptera. Para a ordem Coleoptera, isolados de *B. thuringiensis* que expressam cristais codificados pelo *cry3* são considerados eficientes no controle (LACEY et al., 2015).

É importante ressaltar que o isolado IPS82 corresponde a uma linhagem já descrita por Schnepf et al., (1998), como sendo uma subespécie: *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Com o perfil molecular já identificado, este isolado apresenta apenas os *cry4*, *cry10* e *cry11*, os quais estão associados ao potencial bioinseticida para insetos da ordem Diptera e Coleoptera.

Os bioensaios com insetos-teste são de fundamental importância justamente pelo fato de *B. thuringiensis* não ser único, ou seja, existem variedades com especificidade diversificada, e para cada uma das variedades há muitas linhagens com diferentes níveis de virulência para um mesmo hospedeiro e também com relação a outros hospedeiros. Além disso, sabe-se que a

toxicidade dos esporos de *B. thuringiensis* provém principalmente das delta-endotoxinas, as quais também são extremamente diversificadas em peso molecular e potência biológica (BUENO, 2003).

Estudos realizados por (CARVALHO, 2017), onde a espécie *C. includens* também foi testada por meio de bioensaios com aplicação de diferentes linhagens de Bt para verificação de potencial bioinseticida, foi observado que os isolados que apresentaram efeitos positivos para o controle da falsa-medideira apresentaram em seu perfil molecular os genes *cry1*, *cry2* e *cry9*.

Os *cry1* e *cry2* são comumente associados como entompatógenos de lepidópteros, porém a presença do *cry9*, que nem sempre é verificada nas pesquisas relacionadas também representa uma importante ferramenta de controle de insetos desta ordem.

Em pesquisas desenvolvidas na Universidade Estadual de Londrina, 50 linhagens Bt foram bioensaiadas contra *C. includens*, e apenas 16 apresentaram potencial bioinseticida, sendo que no perfil genético identificado destas 16 linhagens foram identificados a presença dos *cry1*, *cry2* e *cry3* (NEVES, 2008).

Sendo assim, pode-se inferir que os resultados de baixa mortalidade para o bioensaio desenvolvido no presente estudo deve-se a não presença dos genes *cry1* e *cry2* nos isolados utilizados.

2.3.2 Caracterização Molecular

Após os procedimentos de amplificação do DNA genômico e visualização dos resultados, foi possível verificar a presença dos genes *cry4*, *cry10* e *cry11* nos isolados analisados. Os genes *cry1*, *cry2* e *cry3* não foram identificados em nenhum isolado. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 2 e figura 8.

Conforme a hipótese levantada após o bioensaio, a caracterização molecular confirmou a ausência dos genes *cry1* e *cry2* em todos os isolados, os quais codificam as proteínas com função letal para grande número de espécies da ordem Lepidóptera.

No entanto, houve a confirmação da presença de ao menos outros 3 genes, que foram amplificados após a reação de PCR. O isolado BR67 apesar de ter tido amplificação para os *cry10* e *cry11*, não apresentou bandas consistentes com o número de pares de bases previamente descrito na literatura. Os demais isolados que amplificaram para os *cry4*, *cry10* e *cry11* produziram perfil molecular com o peso esperado, sendo confirmada a presença destes genes.

Tabela 2. Perfil Genético obtido após PCR

Isolado	<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry3</i>	<i>cry4</i>	<i>cry10</i>	<i>cry11</i>	Referência
BR67	-	-	-	Banda inconsistente	-	Banda inconsistente	Este trabalho
BR137	-	-	-	+	+	+	Este trabalho
BR80	-	-	-	+	+	+	Este trabalho
BR135	-	-	-	+	+	+	Este trabalho
BR138	-	-	-	+	+	+	
BR58	-	-	-	Não testado	+	+	Zorzetti et al. (2018)
BR146	-	-	-	Não testado	+	+	Zorzetti et al. (2018)
IPS82	-	-	-	Não testado	+	+	Zorzetti et al. (2018)

Os *cry4*, *cry10* e *cry11*, são genes capazes de codificar proteínas que tem ação letal em insetos da ordem Diptera (PALMA et al., 2014).

Em um estudo realizado por Zuanazzi (2017), utilizando os mesmos isolados desta pesquisa, foram observados resultados positivos com mortalidade acima de 50% para a espécie *Alphitobius diaperinus*, pertencente a ordem coleoptera. De acordo com a literatura, o gene capaz de codificar proteínas letais para coleopteros é o *cry3*, porém a caracterização molecular apresentou resultado negativo para a presença deste gene. Contudo, o resultado positivo obtido no controle de *A. diaperinus* pode ser explicado pela presença de outro gene, da classe de proteínas Cyt as quais não foram testadas pela caracterização molecular.

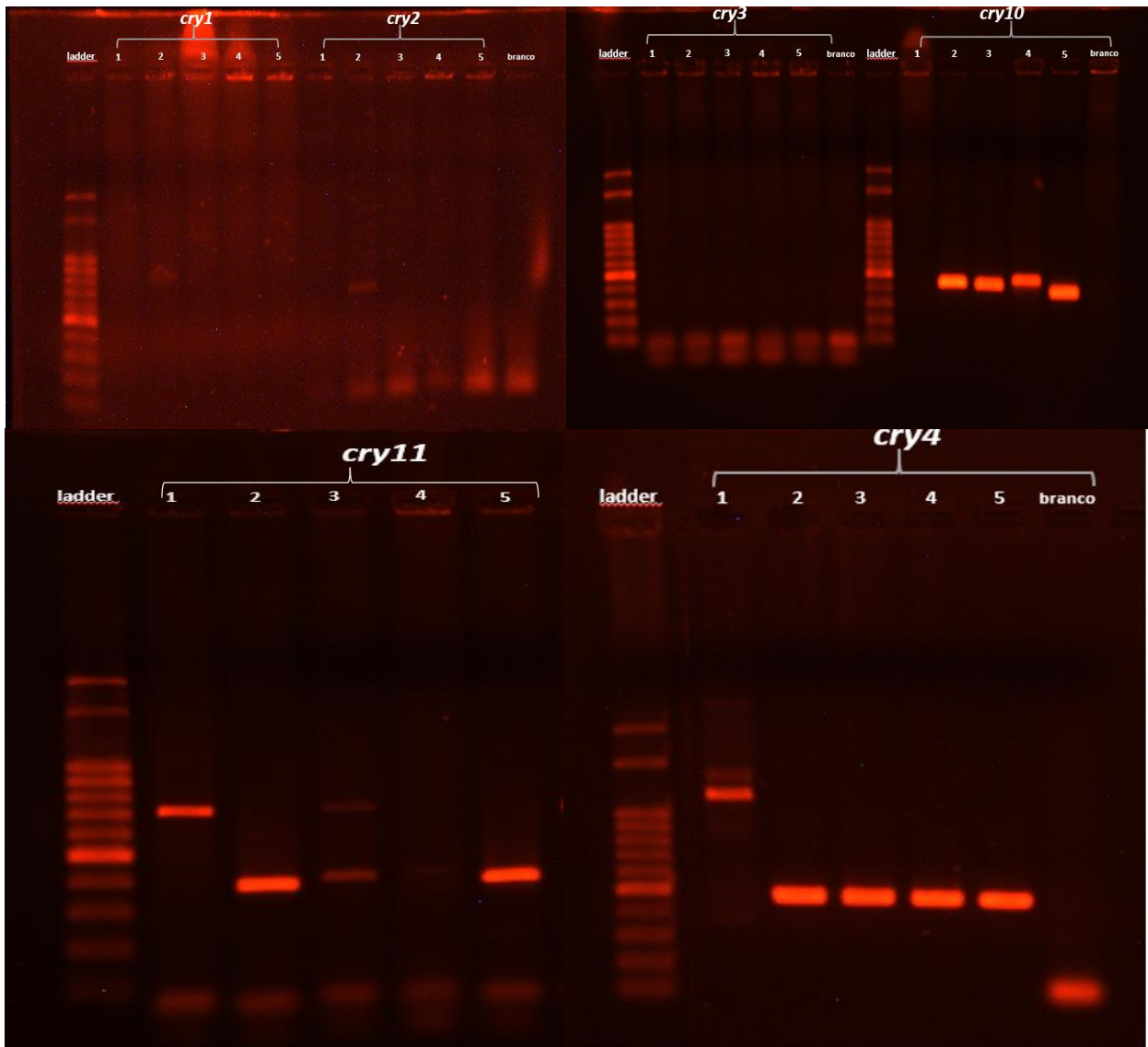


Figura 8. Resultados obtidos através de eletroforese. Isolados BR 67 (1), BR137 (2), BR80 (3), BR135 (4) e BR138 (5).

Fonte: A autora, 2018.

As proteínas Cyt também fazem parte do grupo das delta-endotoxinas, assim como as Cry. No entanto, estas toxinas citolíticas não apresentam qualquer homologia de aminoácidos com as proteínas Cry, sendo estruturalmente distintas. As proteínas Cyt geralmente são produzidas pela subespécie de *B. thuringiensis israelensis* e outras. Apesar de estar altamente relacionada com a patogenicidade a dípteros, um grupo específico de proteínas Cyt têm efeitos entomopatogênicos em insetos da ordem coleoptera (CORREA, 2012).

O bioensaio realizado por Zorzetti et al. (2018), utilizando as mesmas linhagens Bt que foram testadas no presente estudo, demonstraram efeito inseticida para o coleóptero *Hypothenemus hampei*, com até 98% de letalidade. Ainda no estudo de Zorzetti et al. (2018), a

caracterização molecular confirmou a presença dos genes *cry10*, *cry11* conforme demonstrado também na tabela 2, e também o gene *cyt1*.

Como já descrito anteriormente, a alta variabilidade de linhagens de Bt assim como a de toxinas produzidas pelo cristal interfere na especificidade que a bactéria tem para atuar com efeito entomopatogênico em diferentes ordens de insetos. Mesmo não sendo tóxicas para insetos da ordem Lepidóptera, como a *C. includens*, bioensaiada no presente estudo, as oito linhagens utilizadas demonstraram ação biopesticida em diferentes espécies de insetos da ordem Coleóptera e Diptera em estudos realizados por outros autores.

2.4 Conclusões

Os isolados BR135, BR138, IPS82, BR58, BR80, BR137, BR146 e BR67 demonstraram-se ineficientes para o controle da lagarta *C. includens*, não apresentando letalidade para esta espécie no bioensaio. A caracterização molecular confirmou a ausência dos genes *cry1*, *cry2* e *cry3*, que de acordo com a literatura são responsáveis por produzir proteínas letais aos insetos da ordem Lepidóptera. Apesar disso, com a realização da caracterização molecular foi constatada a presença de dos genes *cry4*, *cry10* e *cry11*, os quais historicamente possuem efeito entomopatógeno para a ordem Coleóptera.

3. ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA

RESUMO

A cienciometria é uma área cujos métodos de estudos buscam quantificar a produção científica de conhecimento em uma determinada categoria de pesquisas. Com o auxílio dos bancos de dados mundiais, trabalhos de pesquisadores do mundo todo, quando publicados, são indexados permitindo a formação dos bancos. Através deles, pesquisadores podem realizar levantamentos quantitativos da produção científica de um determinado assunto, analisando inclusive a variação no número de publicações ao longo dos anos e podendo obter inúmeras inferências sobre a pesquisa científica. Sendo assim, este tipo de análise permite estabelecer patamares sobre os estágios da pesquisa científica no mundo. Desta forma, o presente estudo objetivou a realização de uma cienciometria utilizando o banco de dados ISIWebofScience™ o qual trabalha com a utilização de palavras chave na busca de trabalhos relacionados. Neste caso, as palavras chave utilizadas foram: “*Bacillus thuringiensis*” e “biopesticida”, afim de obterem-se trabalhos que abordassem a busca, caracterização e obtenção de isolados de Bt com atividade entomopatogênica. Como metodologia de análise de dados, foram utilizadas as diversas ferramentas presentes no ISIWebofScience™ que permitem quantificação de ‘n’ fatores de cienciometria. Além disso, os arquivos selecionados no refinamento foram submetidos a análises no programa CiteSpace, o qual cria redes de citações e permite identificar o impacto dos trabalhos selecionados nesta área de pesquisa científica.

Palavras chave: *Bacillus thuringiensis*, Biopesticida, Controle Biológico, Produção Científica.

ABSTRACT

Scientometry is an area whose methods of study seek to quantify the scientific production of knowledge in a given research category. With the help of the world-wide databases, works of researchers of the whole world, when published, are indexed allowing the formation of the banks. Through them, researchers can carry out quantitative surveys of the scientific production of a given subject, even analyzing the variation in the number of publications over the years and being able to obtain innumerable inferences about scientific research. Thus, this type of analysis allows establishing levels on the stages of scientific research in the world. In this way, the present study aimed to perform a scientometry using the

ISIWebofScience™ database which works with the use of keywords in the search of related works. In this case, the keywords used were: "Bacillus thuringiensis" and "biopesticide", in order to obtain works that addressed the search, characterization and obtaining of Bt isolates with entomopathogenic activity. As a methodology of data analysis, we used the various tools present in ISIWebofScience™ that allow quantification of 'n' factors of scientiometry. In addition, the files selected in the refinement were submitted to analyzes in the CiteSpace program, which creates citation networks and allows the identification of the impact of the selected works in this area of scientific research.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Biopesticide, Biological Control, Scientific Production

3.1 Introdução

Um campo da genética que busca compreender o conteúdo, a organização, funcionamento e evolução da informação contida em genomas inteiros é denominado Genômica. Aliado as técnicas de biologia molecular, a Genômica revolucionou a pesquisa com seres vivos, trazendo contribuições significativas para a saúde humana, agricultura e inúmeras outras áreas. Por exemplo, a comparação de sequências genômicas de organismos possibilita uma melhor compreensão da evolução e história de vida (PIERCE, 2011). Diversos estudos que levavam em conta apenas aspectos morfológicos e fisiológicos puderam contar com as análises moleculares para compreender estes aspectos que estão relacionados ao genoma do ser vivo.

Além disso as técnicas de genética molecular e engenharia genética, ou tecnologia do DNA recombinante possibilitaram o desenvolvimento de seres geneticamente modificados, capazes de expressar proteínas fornecidas por genes de um organismo diferente. Na agricultura, o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas conferiu resistência a fatores ambientais e a insumos, que permitiram produzir mais em menos tempo (PIERCE, 2011)

Paralelamente à pesquisa em biologia molecular, desenvolveu-se uma área de estudos que foca em relações já existentes na natureza, visando manipulá-las para a otimização de seus resultados: o controle biológico. Este campo de estudos busca compreender como o equilíbrio natural das populações nos ecossistemas pode beneficiar o controle de pragas em sistemas de cultivo agrícola.

Uma das áreas do controle biológico, têm como agente de controle microrganismos entomopatogênicos que são capazes de matar uma grande diversidade de insetos-praga. É o caso da bactéria Bt, que possui em seu DNA genes capazes de expressar proteínas tóxicas à

diferentes espécies de insetos. Porém, a toxicidade e a letalidade destas proteínas variam de acordo com o polimorfismo dos genes dentro da espécie Bt. Sendo assim, uma infinidade de isolados desta bactéria pode apresentar genes diferentes que atuam de maneira distinta em diversos grupos de insetos.

Quando os conhecimentos de biologia molecular são aliados aos estudos em controle biológico, é possível caracterizar quais genes têm efeito tóxico sobre quais espécies de artrópodes, podendo assim possibilitar o desenvolvimento de produtos à base de Bt com potencial pesticida, favorecendo o conhecimento científico e desenvolvimento econômico.

O controle biológico vem sendo pesquisado em diferentes partes do mundo, visando o controle das pragas agrícolas presentes nos mais diversos países. Porém, no caso dos microrganismos entomopatogênicos, os pesquisadores de várias partes do planeta têm em comum um dos mais importantes e promissores agentes de controle, a bactéria Bt. Com isso, a difusão das informações obtidas pelos pesquisadores e a divulgação dos resultados é imprescindível para que haja avanços rápidos na criação de métodos de controles alternativos envolvendo este microrganismo, e assim diminuindo o uso de agentes químicos de controle de pragas.

De acordo com Macias-Chapula (1998), após a realização de uma pesquisa científica, de qualquer área, é fundamental que o pesquisador responsável busque a publicação destes dados para difusão do conhecimento por ele observado. O avanço no número de publicações deve-se principalmente pelo contexto de troca, onde os conhecimentos difundidos na comunidade científica tornam-se acessíveis a comunidade em geral e também aos outros pesquisadores (OKUBO, 1997).

Com o aumento do número de publicações e a disseminação do conhecimento científico possibilitou-se um novo campo de pesquisa, o de mensurar a quantidade de produções por país ou por área de estudos, por exemplo. Este campo de pesquisa foi nomeado com o “bibliometria” pelo bibliotecário belga Poul Otlet em 1934, quando definiu este termo como a medição de todos os aspectos com a publicação e a leitura de livros e documentos (MOMESSO; NORONHA, 2017). Para Pritchard (1969) a bibliometria desenvolve padrões e modelos matemáticos para medir os aspectos quantitativos da produção, disseminação e uso do conhecimento.

A cienciometria, é uma área de estudos cujos métodos quantitativos de pesquisa versam sobre a produção exclusivamente de áreas, campos, indicadores de ciência, tecnologia e inovação. Este termo foi definido pela primeira vez por Nalimov em 1971, como “métodos de pesquisa sobre o desenvolvimento da ciência como um processo informacional” (MINGERS;

LEYDESDORFF, 2015). A cienciometria sobrepõe-se à bibliometria pelo fato de envolver estudos quantitativos das atividades científicas, incluindo a publicação (MACIAS-CHAPULA, 1998).

A cienciometria tem como objeto de estudo disciplinas, assunto, áreas e campos. As variáveis são os fatores que diferenciam as subdisciplinas, as revistas, os autores, documentos e a forma de comunicação entre os cientistas, que são analisadas por métodos de conjunto e correspondência, com o objetivo de identificar os domínios de interesse, onde os assuntos estão concentrados e compreender como os cientistas se comunicam (MACIAS-CHAPULA, 1998).

Este estudo teve como objetivo realizar uma análise cienciométrica das produções científicas na área de pesquisa de controlo biológico envolvendo *Bacillus thuringiensis*, levando em conta principalmente trabalhos relacionados a caracterização molecular e identificação de genes espécie-específicos para o controle de pragas de importância agrícola.

3.2 Materiais e Métodos

Este estudo foi conduzido como uma pesquisa internacional de produção científica publicada entre os anos de 1945 a 2018, que estavam indexados na base de dados do “ISIWebofScience™” (<http://apps.webofknowledge.com>). A pesquisa foi realizada com base nas seguintes palavras chave: “*Bacillus thuringiensis*” e “biopesticidas”. Foram encontrados pela base de dados 509 trabalhos relacionados às palavras buscadas. O refinamento foi feito observando-se trabalhos que relacionavam a bactéria entomopatogênica ao seu potencial como biopesticida, principalmente envolvendo análises moleculares de seus genes. Estudos que envolviam organismos geneticamente modificados foram descartados, assim como técnicas de cultivo da bactéria em meios alternativos e métodos de fermentação pois não estavam relacionados ao escopo da pesquisa.

Após o refinamento, foram selecionados 223 trabalhos que correspondiam aos critérios de seleção e adicionados a lista marcada. A produção científica selecionada então pode ser quantificada e classificada através da ferramenta de “analisar os dados” do ISIWebofScience™, os resultados da cienciometria foram obtidos através dos filtros disponíveis, dentro da própria ferramenta. Os filtros utilizados foram “Categorias Web of Science”, “anos de publicação”, “tipos de documento”, “títulos da fonte”, “países”, “idiomas” e “áreas de pesquisa”. Além disso a ferramenta “criar relatórios de citações” foi utilizada para obtenção do “H-index” ou Índice H. Os dados foram organizados previamente pelas ferramentas do ISIWebofScience™ e em seguida tabulados em planilhas do Excel, para melhor formatação. Para uma maior qualidade da visualização dos resultados, os dados previamente estabelecidos em tabelas foram

transformados em gráficos.

Além disso, também foram conduzidas análises no programa CiteSpace, o qual utiliza a base de trabalhos selecionados na lista marcada e através de combinações métricas computacionais e atributos visuais busca pontos cruciais do conhecimento estruturado, visando facilitar a análise de tendências de pesquisa, destacando o impacto oferecido pelos trabalhos em cada categoria analisada, ou ainda, criando redes que permitem visualizar colaborações entre autores, instituições e países. O CiteSpace foi utilizado neste trabalho afim de relacionar autores e citações, bem como categorias de pesquisa.

3.3 Resultados e Discussão

Um total de 43 categorias foram listadas no filtro “Categorias Web of Science” para o total de 223 trabalhos selecionados e estão representados na figura 9. A categoria principal em que os trabalhos indexados pelo ISIWeb of Science™ se encaixam é a “Entomologia”, correspondendo a 57 trabalhos, seguida pela “Biotecnologia Aplicada a Microbiologia”, com 52 trabalhos, “Microbiologia”, 35 trabalhos, “Bioquímica e biologia molecular”, totalizando 21 trabalhos. Outras 39 categorias totalizam juntas cerca de 28% do total de trabalhos selecionados na cienciometria.

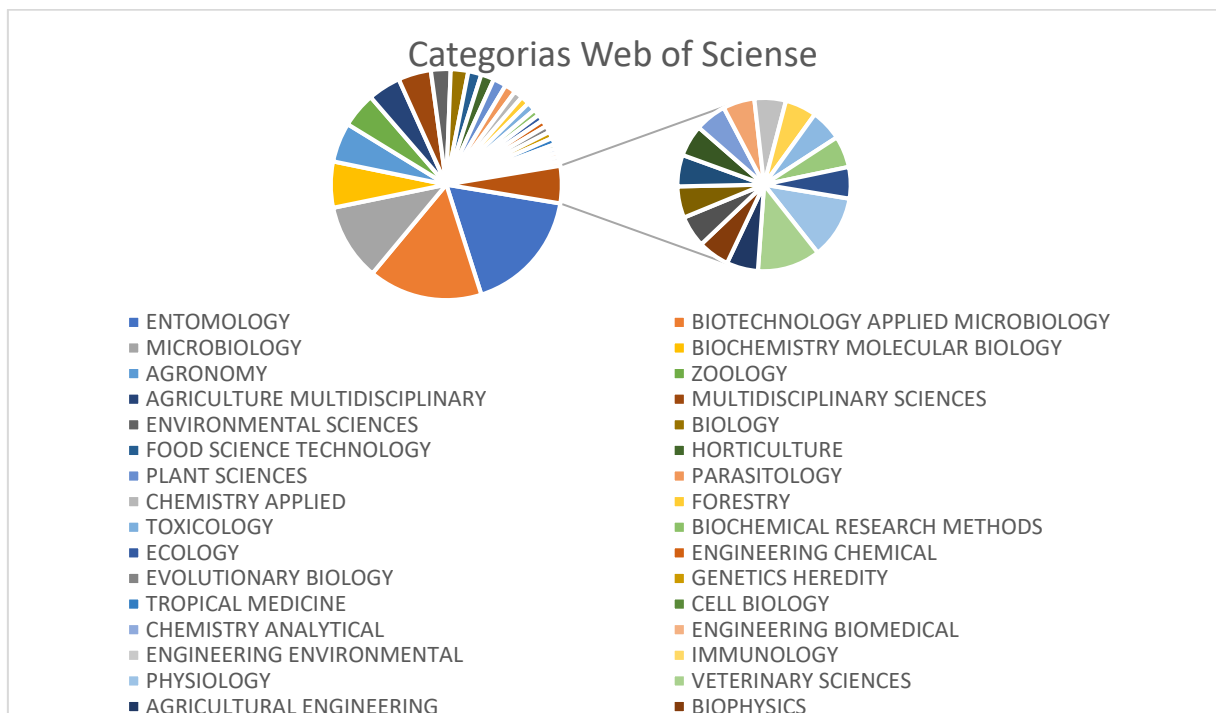


Figura 9. Gráfico demonstrativo “Categorias Web of Science”
Fonte: A autora, 2018.

A entomologia é a área da ciência destinada ao estudo dos insetos e animais

relacionados. Esta ciência visa compreender a relação entre insetos, plantas e outros animais, incluindo o homem. Sendo assim, pode-se dizer que a entomologia se dedica a estudar e buscar soluções para problemas causados por insetos na agricultura, medicina e medicina veterinária. Além disso, a entomologia tem se tornado uma importante ferramenta para a investigação e resolução de crimes, através da entomologia forense (LEI et al., 2019). Desta forma, é possível compreender porque a categoria “Entomologia” corresponde a 57 do total de 223 trabalhos selecionados para este estudo.

Em segundo lugar, encontra-se a categoria “Biotecnologia aplicada a microbiologia”, uma vez que as técnicas de engenharia genética e biotecnologia permitem a manipulação de microrganismos visando explorar genes importantes para agricultura e entomologia.

Como a terceira categoria mais importante, a “Microbiologia” é a ciência que se dedica ao estudo de microrganismos, especialmente patogênicos. Neste caso, o grupo de bactérias *B. thuringiensis* torna-se alvo dos estudos em microbiologia, devido ao seu potencial como biopesticida, sendo que este possui amplo espectro patogênico para uma diversidade de pragas (BRAVO et al., 2011)

A categoria “Bioquímica e biologia molecular”, que aparece como a quarta mais importante nesta análise está diretamente relacionada com os métodos utilizados para os estudos envolvendo os genes *cry*, uma vez que são aplicadas técnicas de biologia molecular para identificação e caracterização destes genes. Além disso, a bioquímica é de fundamental importância para observar a expressão de proteínas Cry que conferem as bactérias a característica de entomopatogênica.

O segundo filtro utilizado apresenta o total de publicações por ano (Figura 10). O primeiro trabalho que foi associado a busca desta pesquisa foi publicado em 1988. O ano com maior número de publicações foi 2015, totalizando 23 trabalhos, seguido por 2017, com 20 publicações. Apesar de o primeiro registro de uma subespécie de Bt com atividade bioentocida ter sido relatada em 1961, foi no ano de 1988 que o “*Bacillus thuringiensis* Management Working Group” foi formado por empresas que estavam desenvolvendo biopesticidas comerciais a base da bactéria, com o objetivo de obter um maior entendimento em relação as proteínas Cry e os organismos alvos nos ecossistemas, visando o uso efetivo das toxinas para o controle de pragas à longo prazo (SCHNEPF et al., 1998). Apesar da tendência de o número de publicações ser crescente desde o ano inicial até o ano atual, é possível observar que nesta análise houve uma flutuação com relação a este número. O ano que mais apresentou publicações relacionadas as palavras chave pesquisadas foi 2015.



Figura 10. Gráfico demonstrativo “Anos de Publicação”

Fonte: A autora, 2018.

No ano de 1996, os países da Argentina e Estados Unidos da América legalizaram o uso e a comercialização de grãos de soja transgênicos, e no ano de 2003 o Brasil entrou para o hall de países produtores de grãos geneticamente modificados. Sabe-se que a engenharia genética trabalhou para tornar plantas resistentes a uma série de condições adversas enfrentadas pelos produtores agrícolas (PIERCE, 2011). Entre as tecnologias desenvolvidas, plantas com genes de *B. thuringiensis* (plantas Bt) capazes de serem resistentes aos ataques principalmente de lepidópteros. Pode-se dizer então que entre os anos de 1996 a 2008 foram dedicados aos estudos com este microrganismo para utilizá-lo na engenharia genética e não como controle biológico avulso.

Porém nos anos que se seguiram, uma série de problemas afrontou a evolução dos transgênicos, como a não redução na quantidade de pesticidas utilizados no cultivo e a resistência das pragas as tecnologias aplicadas, incluindo as plantas Bt (BRAVO et al., 2007). Além disso, o questionamento sobre a segurança alimentar destes produtos gerou muitas dúvidas e polêmicas acerca dos transgênicos (MONQUERO, 2005).

Com isso, nos últimos 8 anos pode-se observar que o número de publicações relacionando Bt como um biopesticida voltou a crescer, mantendo-se uma média acima de 10 publicações por ano. De acordo com Polanczyk (2016), até 2010 os biopesticidas à base de Bt no Brasil com uso recomendado para cerca de 24 espécies porém, nos anos de 2014 e 2015 houve um acréscimo expressivo na utilização e desenvolvimento destes biopesticidas, chegando a um total de 6,5 milhões de hectares tratados com estes produtos, tornando o Brasil o maior mercado de produtos de Bt como biopesticidas. Além disso, ainda de acordo com Polanczyk (2016), este aumento se deve principalmente ao aparecimento de duas pragas da soja, a

Helicoverpa armigera e *C. includens*, que devido a ineficácia dos agentes de controle químico forçaram produtores voltar a buscar formas alternativas de controle.

O filtro “tipo de documento” indicou que dentre os 223 trabalhos selecionados, 88% eram artigos científicos, 7,62% revisões, 5,38% documentos de procedimentos. Capítulos de livros, materiais editoriais e resumos de encontros totalizaram 0,45% cada uma.

O filtro “Título da fonte” que indica o número de publicações por revistas, mostrou que a de maior relevância foi a “JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY”, com 13 publicações, seguida da “APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY” com 10 publicações no total. Ao todo foram listadas 137 revistas.

O filtro “Países” possibilitou a visualização de quais nações possuem mais publicações que envolvem a linha de pesquisa desta análise (Figura 11). Os Estados Unidos da América (EUA) publicaram 19,28% dos trabalhos, seguindo da China, com 13,45% e Índia com 13%. O Brasil apareceu em quarto lugar, totalizando 7,62% dos trabalhos analisados. O número de artigos relacionados a pesquisas com Bt categorizados por país pode ser observado no gráfico. É importante ressaltar, que de acordo com a Embrapa (2018), os EUA são o maior produtor de soja do mundo, seguido pelo Brasil, Argentina, China e Índia. Pelo número de produções científicas é possível relacionar a busca pelo uso de biopesticidas ao potencial produtivo de grãos destes países, principalmente com relação a soja.

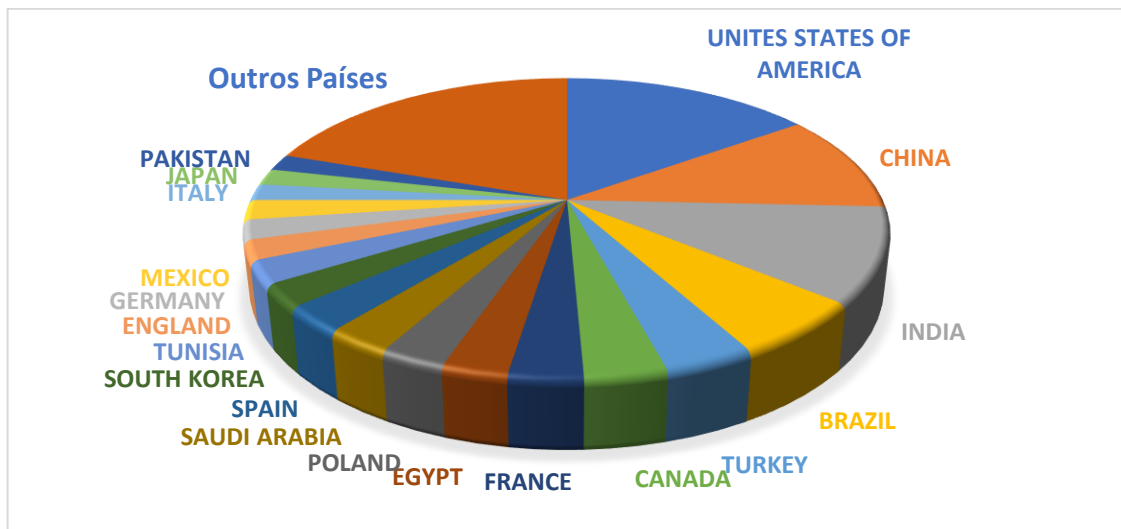


Figura 11. Gráfico demonstrativo “Países” com até 5 citações. Países com 4 citações ou menos foram agrupados como “Outros Países”

Fonte: A autora, 2018

O filtro “Idioma” indicou que aproximadamente 96% dos trabalhos foram publicados na língua inglesa. Houve também três trabalhos publicados em espanhol e dois em português.

O “Índice H” foi proposto pelo físico Jorge Hirsch, sendo capaz de mesurar o impacto dos pesquisadores através da quantificação da atividade científica e de seus artigos mais citados (LIMA; VELHO; FARIA, 2012). Nesta análise, o Índice-H foi de 32, com uma média de 14,17 citações por trabalho. Os dez trabalhos mais citados entre os anos de 1988 e 2018 podem ser observados na tabela 3. Observa-se que entre os top 10 trabalhos aparecem principalmente estudos relacionados a busca de linhagens específicas de Bt com ação biopesticida em pragas chave, como a *Manduca sexta*, também conhecida como mandarová do fumo, uma praga que causa graves prejuízos econômicos.

Tabela 3. Top 10 trabalhos mais citados entre 1988 e 2018.

Classificação		Autores	Título da Fonte	Ano da publicação	Total de citações	Média de citações por ano
1°	A specific binding-protein from <i>manduca-sexta</i> for the insecticidal toxin of <i>Bacillus-thuringiensis</i> subsp <i>berliner</i>	VADLAMUDI, R.K.; JI, T.H.; BULLA, L.A.	Journal Of Biological Chemistry	1993	144	5,54
2°	Do Biopesticides Affect the Demographic Traits of a Parasitoid Wasp and Its Biocontrol Services through Sublethal Effects?	BIONDI, A.; ZAPPALA, L.; STARK, J. D.; et al.	Plos One	2013	107	17,83
3°	Biological control of the diamondback moth, <i>Plutella xylostella</i> : A review	SARFRAZ, M.; KEDDIE, A.B.; DOSDALL, L.M.	Biocontrol Cience And Technology	2005	105	7,50
4°	PCR-based approach for detection of novel <i>Bacillus thuringiensis</i> cry genes	JUAREZPEREZ, V.M.; FERRANDIS, M.D.; FRUTOS, R.	Applied And Environmental Microbiology	1997	98	4,45
5°	Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to <i>Bacillus thuringiensis</i> toxin Cry1Ac in cabbage looper	TIEWSIRI, K.; WANG, P.	Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America .	2011	96	12,0
6°	Cloning, sequencing, and expression of the <i>Bombyx mori</i> receptor for <i>Bacillus thuringiensis</i> insecticidal CryIA(a) toxin	NAGAMATSU, Y.; TODA, S.; KOIKE, T.; et al.	Bioscience Biotechnology And Biochemistry	1998	91	4,33
7°	PCR-based identification of <i>Bacillus thuringiensis</i> pesticidal crystal genes	PORCAR, M.; JUAREZ-PEREZ, V.	Fems Microbiology Reviews	2003	87	5,44
8°	Cry toxin mode of action in susceptible and resistant <i>Heliothis virescens</i> larvae	JURAT-FUENTES, J.L.; ADANG, M. J.	Journal Of Invertebrate Patology	2006	76	5,85

9º	Identification of <i>Bombyx mori</i> midgut receptor for <i>Bacillus thuringiensis</i> insecticidal CryIA(a) toxin	NAGAMATSU, Y.; TODA, S.; YAMAGUCHI, F.; et al.	Bioscience Technology And Biochemistry	1998	76	3,62
10º	Biocontrol of pests of apples and pears in northern and central Europe: 1. Microbial agents and nematodes	CROSS, J.V.; SOLOMON, M.G.; CHANDLER, D.; et al.	Biocontrol Science And Technology	1999	74	3,70

Além do índice H de citações, o ISIWebofScience™ oferece uma ferramenta que permite visualizar quais referências foram mais citadas dentro dos artigos selecionados na lista marcada. Os resultados obtidos demonstram que os autores que mais têm artigos citados foram BRAVO, A. seguida de SOBERON, M. e SUN, M. Estes pesquisadores são listados como autores em grande quantidade artigos utilizados como referência para os trabalhos selecionados na lista marcada do ISIWebofScience™.

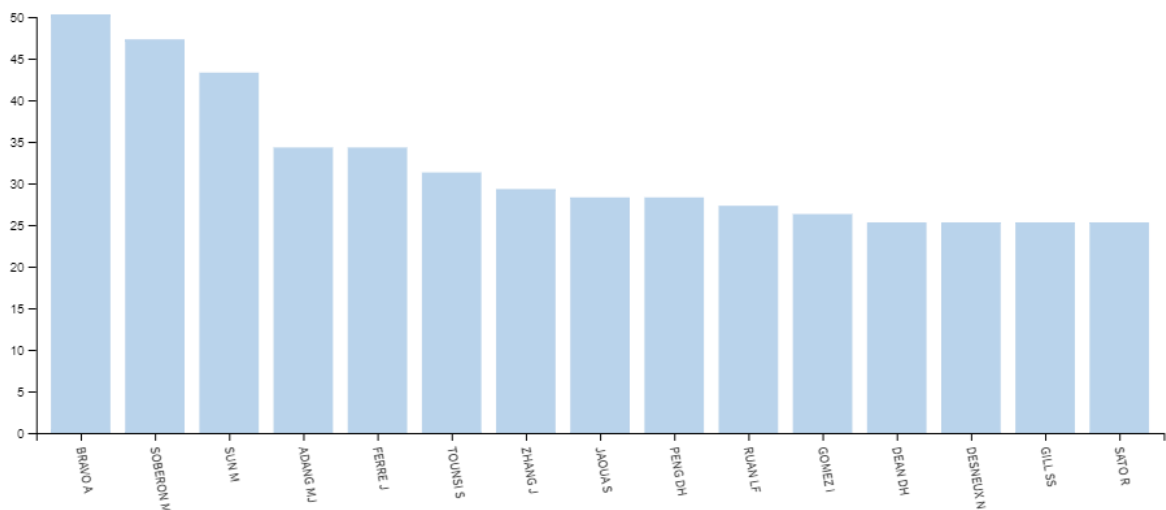


Figura 12. Autores mais citados como referência nos artigos selecionados.

Fonte: A autora, 2018.

A partir da base de dados obtida no ISIWebofScience™, torna-se possível a aplicação do programa CiteSpace que foi desenvolvido por Chaomei Chen e é codificado pelo JAVA, que é capaz de estabelecer redes de comunicação e clusters que demonstram as interações entre autores e referências citadas, por exemplo.

Com base na lista marcada obtida a partir do refinamento de dados do ISIWebofScience™, uma base foi formada e carregada no programa CiteSpace. Através da formação de clusters, o programa relaciona banco de dados fornecidos por exemplo pelo ISIWebofScience™. Desta forma permite a visualização de dados que demonstram o domínio

progressivo do conhecimento, como por exemplo a relação de autores que mais foram citados entre os anos 1988 a 2018 (intervalo de artigos da lista marcada).

De acordo com Chen (2014) os clusters são estabelecidos de acordo com os filtros aplicados ao banco de dados no programa. Os filtros que servem de base para a formação dos clusters são chamados de *nós*. Os nós formam uma rede de ligações resultantes do cluster gerado, demonstrando as passagens mais importantes das atividades de pesquisas relacionadas.

Além disso, os nós são representados na forma de anéis, com uma variação na coloração de acordo com a centralidade e a ordem cronológica dos trabalhos. De acordo com LIU et al. (2015), a coloração azul em um nó representa um trabalho ou uma citação mais antiga, enquanto o laranja remete a atualidade. Já a coloração roxa que se forma ao redor de alguns nós indicam maior centralidade. De acordo com Xiang; Wang; Liu (2017) a centralidade indica o quanto este nó tem de relevância para a área de pesquisa, ou qual sua significância.

Aplicando-se a base de dados deste trabalho os nós Autor e Citação, foi possível observar a formação de clusters representados pelos nós mostrados na figura 13.

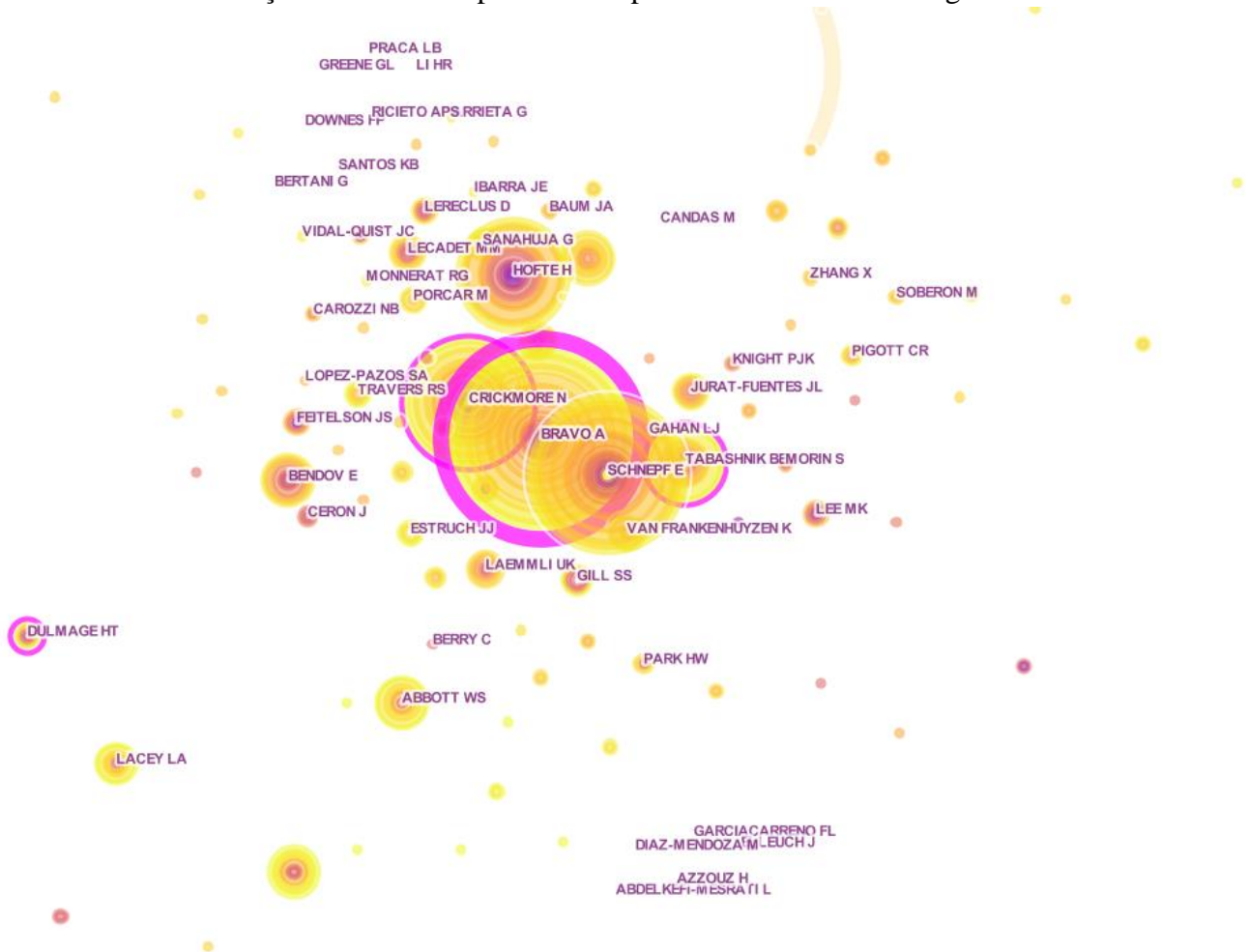


Figura 13. Gráfico gerado pelo CiteSpace relacionando autor e citação.

Fonte: A autora, 2018.

Os resultados obtidos demonstram a grande centralidade dos autores Bravo e Crickmore. Isso pode ser explicado porque a Dra. Alejandra Bravo, pesquisadora da Universidade Autônoma do México desenvolve pesquisas relacionadas às formas de atuação da bactéria *Bacillus thuringiensis*, tendo grande relevância para a comunidade científica. Além disso, seus trabalhos trazem informações sobre o modo de ação das proteínas do cristal (Cry e Cyt) demonstrando as porções dos genes que são ativadas e proporcionam o efeito inseticida dos cristais.

Já Neil Crickmore é um pesquisador britânico, atuante na Universidade Sussex. Suas pesquisas também são voltadas para o Bt e suas toxinas proteicas, visando o desenvolvimento de inseticidas biológicos estudando a ação deste microrganismo em seu hospedeiro e também relação deste com insetos não alvo e mamíferos (<http://www.sussex.ac.uk/lifesci/btlab/index>). Crickmore, publicou em 1998 um artigo relacionado a nomenclatura de *B. thuringiensis*, que serve de base para trabalhos científicos até hoje. Este artigo originou um banco de dados universal que é atualizado diariamente por pesquisadores de acordo com suas descobertas relacionadas ao microrganismo. Além disso, outro trabalho de grande importância para a área de pesquisa com *B. thuringiensis* têm Crickmore como coautor, sendo o primeiro Schepf que também aparece com uma centralidade grande no cluster formado pelo CiteSpace. Este segundo trabalho está relacionado a caracterização das proteínas do cristal produzidas por *B. thuringiensis*, onde consta o sequenciamento de diversos genes *cry* encontrados, sendo utilizado para fins de comparação com a caracterização realizada com novas cepas descobertas.

É importante ressaltar que duas pesquisadoras brasileiras, Ana Paula Scaramal Ricieto e Rose Monnerat, estão presentes na análise de autor e citação, destacando a importância da pesquisa científica brasileira envolvendo Bt como agente controle.

A análise de categorias realizada no Cite Space demonstra quais disciplinas de um determinado assunto em estudo apresenta um maior domínio do conhecimento publicado (LIU et al., 2015). De acordo com os resultados obtidos neste tipo de análise (Figura 14), para este estudo observou-se que as categorias com maior quantidade publicações no banco de dados analisado foram entomologia (21%), biotecnologia e microbiologia aplicada (20%), agricultura e microbiologia (ambas com 11%). Outras áreas como biologia molecular e zoologia também aparecem entre as categorias com grande índice de publicações.

Observando os resultados, percebe-se que a entomologia, com grande relevância para agricultura e insetos praga ocupa lugar de destaque dentre as categorias de publicações, seguida pela biotecnologia e microbiologia aplicada que compreende estudos de engenharia genética

em microrganismos com fins específicos. Segundo Cotter, 2017, os avanços em biologia molecular, sequenciamento de última geração e bioinformática, revigoraram vários campos de pesquisa, e permitiram o surgimento de muitos outros. Desta forma, entrelaçam-se os resultados desta análise, onde o Bt é o alvo de estudos da microbiologia aplicada e ferramenta de trabalho da entomologia.

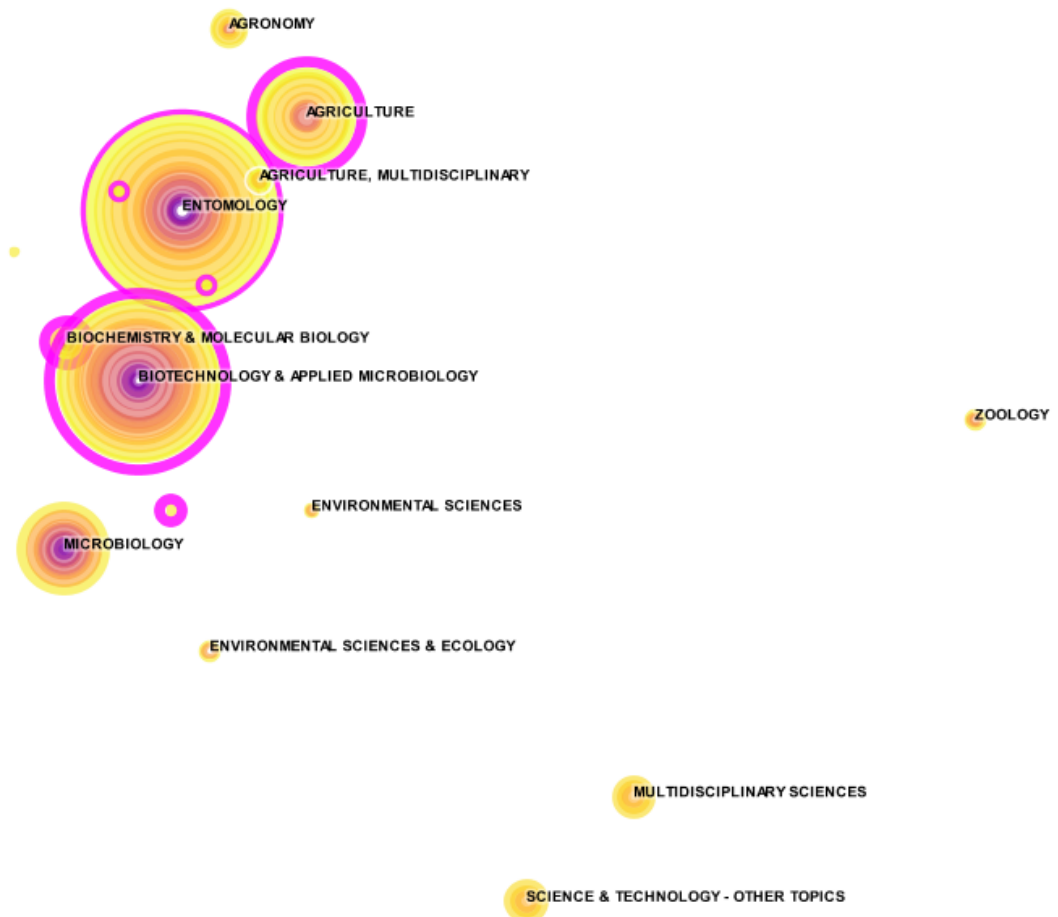


Figura 14. Gráfico gerado pelo CiteSpace demonstrando as categorias de pesquisa com maior número de publicações.

Fonte: A autora, 2018.

3.4 Conclusões

As pesquisas envolvendo o Bt como um biopesticida estão em sua maioria baseadas na realização de bioensaios e caracterizações moleculares. A maior parte das pesquisas bem como o maior número de trabalhos são publicados em sua maioria em países com grandes interesses econômicos na agricultura, como é o caso dos Estados Unidos da América, China, Índia e Brasil.

Foi possível perceber, com a realização desta análise cienciométrica, que as áreas de estudo como entomologia, agricultura, engenharia genética e biotecnologia trabalham juntas em busca de resultados eficientes no controle de pragas, visando a redução de prejuízos na produção de alimentos do mundo e auxiliando na redução do consumo de agentes químicos de controle.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O bioensaio realizado com os oito isolados de Bt selecionados demonstrou que os mesmos foram ineficientes para o controle de *C. includens*. Contudo, a realização da caracterização molecular permitiu a identificação de genes que codificam proteínas com potencial inseticida para insetos da ordem Coleóptera e Diptera.

A análise cienciométrica revelou o aumento na produção científica no que se refere ao uso de Bt como biopesticida, levando em conta a utilização de diferentes isolados com efeito específico para determinadas ordens ou espécies de insetos. Além disso, percebeu-se que o maior número de trabalhos é realizado em países com grande atividade econômica agrícola, ressaltando a importância do uso de métodos de controle alternativo e diminuição do uso de pesticidas químicos para o controle de pragas.

REFERÊNCIAS

AGUIAR-MENEZES, E. de L.; SILVA, A. de C. Plantas atrativas para inimigos naturais e sua contribuição no controle biológico de pragas agrícolas. **Embrapa Agrobiologia Documentos 283**, p. 60, 2011.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Celula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: Avanços e Desafios**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 2008.

BEN-DOV, E. et al. Extended Screening by PCR for Seven cry -Group Genes from Field-Collected Strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4883–4890, 1997.

BERNARDI, O. **Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera : Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 87701 × MON 89788 no Brasil**. 2012.

BESNARD, G. et al. Polymerase Chain Reaction (PCR). **Research Gate**, 2015.

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423–431, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>>

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423–435, 2007.

BRAVO, A.; SARABIA, S. .; LOPEZ, L. et. al. Characterization of cry Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, 1998.

BUENO, V. H. P. **Controle biológico de pragas**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2003.

BUKHARI, D. A.; SHAKOORI, A. R. Isolation and Molecular Characterization of cry4 Harboursing *Bacillus thuringiensis* Isolates from Pakistan and Mosquitocidal Activity of their Spores and Total Proteins. n. April, 2014.

CARVALHO, K. S. D. E. **SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE**

CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* EFICIENTES CONTRA LAGARTA FALSA-MEDIDEIRA (*Chrysodeixis includens*). 2017. Universidade Federal de Lavras, 2017.

CHEN, C. CiteSpace Manual. [s. l.], 2014. Disponível em:
<<http://cluster.cis.drexel.edu/~cchen/citespace/%0AEquipe>>

CORREA, R. F. T. **Avaliação da toxicidade de proteínas Cry e Cyt de *Bacillus thuringiensis* subsp . israelensis para diferentes linhagens de células de inseto e de mamífero.** 2012. Universidade de Brasília, 2012.

COSTA, E. L. N. et al. ARTRÓPODES E BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICOS. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 38, p. 4–13, 2010.

COTTER, P. D. Microbiology. **Reference Module in Life Sciences**, 2017.

DEBACH, P. **Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas.** México: Continental, 1968.

DETONI, A. M. et al. First report of *Chrysodeixis includens* (Walker , [1858]) (Lepidoptera : Noctuidae) Injurious to Pineapple (*Ananas comosus* L .) (Bromeliaceae) in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 6984, n. 4, p. 1–3, 2010.

EMBRAPA. **Soja em Números: Safra 2017/2018.** 2018. Disponível em:
<<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

ERTHAL JUNIOR, M. Controle biológico de insetos pragas. **I Seminário Mosaico Ambiental**, p. 1–16, 2011.

FIUZA, L. M. MECANISMO DE AÇÃO DE *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p. 32–35, 2010.

GOUVEIA, J. J. de S.; REGITANO, L. C. de A. Protocolos de Biologia Molecular Aplicadas à Produção Animal. In: **Protocolos de Biologia Molecular Aplicadas à Produção Animal**. 1. ed. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudoeste, 2007.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à Genética**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias Entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 1163.

HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of Enterotoxins. **Society**, v. 67, n. 1, p. 185–189, 2001.

HART, R. D. Methodologies to produce agroecosystem management plants for small farmers in tropical environment. In: WORLD AGRICULTURAL WORKSHOP CONFERENCE ON BASIC TECHNICS IN ECOLOGICAL AGRICULTURE 1978, Montreal. **Anais...** Montreal

IBARRA, J. E. .; RINCÓN, D.; M. C.; ORDÚZ, S. et al. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Appl. Environ. Microbiol**, n. 69, 2003.

IBRAHIM, M. A. et al. *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 1, p. 31–50, 2010.

LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, n. August, p. 1–41, 2015.

LEI, G. et al. A bibliometric analysis of forensic entomology trends and perspectives worldwide over the last two decades (1998 – 2017). **Forensic Science International**, v. 295, p. 72–82, 2019.

LIMA, R. A. De; VELHO, L. M. L. S.; FARIA, L. I. L. De. Bibliometria e “ avaliação ” da atividade científica : um estudo sobre o índice h Bibliometrics and “ evaluation ” of scientific activity : a study of the h- index., p. 3–17, 2012.

LIU, Z. et al. Visualizing the intellectual structure and evolution of innovation systems research : a bibliometric analysis. **Scientometrics**, p. 135–158, 2015.

MACIAS-CHAPULA, C. A. O papel da informetria e da cienciometria e sua perspectiva nacional, p. 134–140, 1998.

MARSARO, A. L. et al. Population fluctuation of insect pests in soybean crop in Roraima State (T) Flutuação populacional de insetos-praga na cultura da soja no Estado de Roraima. v. 2010, n. I, p. 71–76, 2010.

MINGERS, J.; LEYDESDORFF, L. A Review of Theory and Practice in Scientometrics.

European Journal of Operational Research, v. 246, n. 1, p. 1–19, 2015.

MOMESSO, A. C.; NORONHA, D. P. Bibliométrie ou Bibliometrics: o que há por trás de um termo? **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 22, n. 2, p. 118–124, 2017.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-99362017000200118&lng=pt&tlng=pt>

MONQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: Situação e perspectivas. **Bragantia**, v. 64, n. 4, p. 517–531, 2005.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 509–540.

MOSCARDI, F. O controle de pragas agrícolas e a sustentabilidade ecológica. **Ciência e Ambiente**, v. 27, p. 67–84, 2003.

MOSCARDI, F. et al. Artrópodes que atacam as folhas da soja. **Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga**, p. 860, 2012.

NEVES, P. M. O. J. **SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* PARA O CONTROLE DE PRAGAS**. Londrina. 2008.

OKUBO, Y. Bibliometric Indicators and Analysis of Research Systems METHODS AND EXAMPLES. **OECD Science, Technology and Industry Working Papers**, v. 1, 1997.

PALMA, L. et al. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. p. 3296–3325, 2014.

PARRA, J. Biological control in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 71, n. October, p. 345–355, 2014.

PATEL, S. V. et al. Polymerase Chain Reaction (PCR). **Agrobios Newsletter**, v. 13, n. 9, p. 10–12, 2005.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, Ga. S. AGROTÓXICOS , SAÚDE E AMBIENTE : uma introdução ao tema. In: **É veneno ou é remédio**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 21–42.

PIERCE, B. A. **Genética: Um enfoque conceitual**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

PINTO, L. M. N. et al. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p. 24–31, 2010.

POLANCZYK, R. A. **Bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis*: Um caminho para a sustentabilidade**. 2016.

PRITCHARD, A. Statistical bibliography or bibliometrics? **Journal of Documentation**, v. 25, n. 4, 1969.

SANTIAGO, A. C.; VENERONI, G. B.; REGITANO, L. C. de A. Reação Em Cadeia Da Polimerase (Pcr). In: **Protocolos de Biologia Molecular Aplicadas à Produção Animal**. 1. ed. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudoeste, 2007. p. 15–17.

SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 32, n. 3, p. 775–806, 1998. b.

SNUSTAD, D. P. .; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

SOSA-GÓMEZ, D. R. et al. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. 3. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014.

UMESHA, S.; SINGH, P. K.; SINGH, R. P. Microbial Biotechnology and Sustainable Agriculture. In: **Biotechnology for Sustainable Agriculture Emerging Approaches and Strategies**. p. 185–205.

WHITE, T. J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H. A. The polymerase chain reaction. **Trends in Genetics**, v. 5, n. 6, p. 185–189, 1989.

XIANG, C.; WANG, Y.; LIU, H. A scientometrics review on nonpoint source pollution research. **Ecological Engineering**, v. 99, p. 400–408, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.11.028>>

ZORZETTI, J. et al. Isolation, morphological and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, n. 3, p. 198–204, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rbe.2018.07.002>>

ZUANAZZI, N. R. AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). 2017. UNIPAR, 2017.