

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

HASSEN HASSAN GHARIB

ANÁLISE *in silico* DE GENES DE TOXINAS INSETICIDAS EM CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*

**PATOS DE MINAS – MG
NOVEMBRO DE 2024.**

HASSEN HASSAN GHARIB

ANÁLISE *in silico* DE GENES DE TOXINAS INSETICIDAS EM CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de bacharel em Biotecnologia

**Prof. Dr. Aulus Estevão Anjos de Deus
Barbosa**

**PATOS DE MINAS – MG
NOVEMBRO DE 2024.**

HASSEN HASSAN GHARIB

Análise *in silico* de genes de toxinas inseticidas em cepas de *Bacillus thuringiensis*

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de bacharel em Biotecnologia

Banca Examinadora:

Dr. Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa - Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC)
Presidente

Dra. Cristine Chaves Barreto - Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC)
Membro

Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas – Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC)
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas – MG, 11 de novembro de 2024

RESUMO

Atualmente, o uso de agrotóxicos na produção agrícola é extensivo e atende à crescente demanda pela produção de alimentos. No entanto, este uso excessivo de agrotóxicos tem causado sérios danos ecológicos, deixando resíduos no meio-ambiente, além de serem extremamente prejudiciais à saúde humana. Adicionalmente, os pesticidas químicos afetam insetos não-alvo, o que por sua vez pode acarretar a perda de populações benéficas para a agricultura. Uma alternativa para reduzir as aplicações de agrotóxicos é o uso de controle biológico, utilizando microrganismos como a *Bacillus thuringiensis*. Estas bactérias se destacam por apresentarem atividade entomopatogênica contra insetos praga de várias ordens. Devido as inúmeras possibilidades de aplicações das toxinas de *B. thuringiensis*, é justificada a necessidade de caracterização de cepas dessa espécie. Assim, o presente trabalho objetivou identificar e caracterizar, por métodos *in silico*, proteínas com potencial atividade inseticida em quatro cepas de *B. thuringiensis* que não foram caracterizadas ainda na literatura. Um alinhamento, por meio de BLASTp, foi realizado contra sequências referência de toxinas já conhecidas, obtendo do proteoma de cada cepa, sequências com alinhamentos significativos. Em seguida, as 31 sequências obtidas foram submetidas à ferramenta de alinhamento do banco de dados BPPRC, obtendo-se a porcentagem de identidade das sequências com outras toxinas conhecidas. Além disso, propriedades físico-químicas como peso molecular, ponto isoelétrico e tamanho de sequência foram calculados pela plataforma ExPasy para fins comparativos. CD-Search e InterProScan foram utilizados para a obtenção e análise dos domínios conservados e SWISS-MODEL para a simulação do modelo tridimensional das proteínas. Dentre as 31 sequências obtidas, 9 apresentaram 100% de identidade com proteínas do banco BPPRC (Cry1Ab18, Cry1Ja2, Cry1Bb1, Cry1Id1, Cry2Ad, Cry3Aa12, Cry7Da1, Cry7Fb1 e Cry1Ab1). Das 22 proteínas sem identidade, 5 foram classificadas como Cry, 5 como Vpb1, 4 como Vpa2, 3 como Mpp e uma Vip3. Ademais, 4 das 22 proteínas não se adequaram aos parâmetros das toxinas inseticidas de *B. thuringiensis*. Os resultados mostraram uma boa variação de quantidade e de tipos de genes inseticidas entre as cepas analisadas.

Palavras-chave: Bioinformática. Controle biológico. Toxinas inseticidas.

ABSTRACT

*Currently, pesticides use in agricultural production is extensive and meets the growing demand for food production. However, the excessive use of pesticides in crops has caused serious ecological damage, leaving residues in the environment, in addition to being extremely harmful to human health. Additionally, chemical pesticides affect non-target insects, which in turn can lead to the loss of populations beneficial to agriculture. An alternative to reduce pesticide applications is the use of biological control, using microorganisms such as *Bacillus thuringiensis*. These bacteria stand out for presenting entomopathogenic activity against various insect pests orders. Due to the numerous possible applications of *B. thuringiensis* toxins, the need to characterize strains of this species is justified. Thus, the present study aimed to identify and characterize, by in silico methods, proteins with potential insecticidal activity in four *B. thuringiensis* strains that have not yet been characterized in the literature. An alignment, using BLASTp, was performed against reference sequences of already known toxins, obtaining sequences with significant alignments from the proteome of each strain. Then, the 31 sequences obtained were submitted to the BPPRC database alignment tool, obtaining sequence identity percentage with other known toxins. In addition, physicochemical properties such as molecular weight, isoelectric point and sequence size were calculated by the ExPASy platform for comparative purposes. CD-Search and InterProScan were used to obtain and analyze the conserved domains and SWISS-MODEL for the simulation of the three-dimensional proteins models. Among the 31 sequences obtained, 9 presented 100% identity with proteins from the BPPRC bank (*Cry1Ab18*, *Cry1Ja2*, *Cry1Bb1*, *Cry1Id1*, *Cry2Ad*, *Cry3Aa12*, *Cry7Da1*, *Cry7Fb1* and *Cry1Ab1*). Among the 22 proteins without identity, 5 were classified as *Cry*, 5 as *Vpb1*, 4 as *Vpa2*, 3 as *Mpp* and one as *Vip3*. Furthermore, 4 of the 22 proteins did not fit the parameters of *B. thuringiensis* insecticidal toxins. The results showed a large variation in the quantity and types of insecticidal genes among the analyzed strains.*

Keywords: Bioinformatics. Biological control. Insecticide toxins.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EPI: equipamento de proteção individual
ACB: agente de controle biológico
QS: *Quorum sensing*
Bt: *Bacillus thuringiensis*
Cry: proteína cristal
Vip: proteína inseticida vegetativa
Sip: proteína inseticida secretada
pb: pares de bases
Mtx: toxina mosquitocida
Cyt: toxina citotóxica
3D-Cry: toxina cristal de três domínios
APN: aminopeptidase N
ALP: fosfatase alcalina
ABCC2: cassete de ligação de ATP do membro 2 da subfamília C
UV: ultravioleta
BLASTp: *Protein Basic Local Alignment Search Tool*
BPPRC: *Bacterial Pesticidal Protein Resource Center*
Da: dalton
aa: aminoácido
pI: ponto isoelétrico
GMQE: *Global Model Quality Estimation*
ETX: toxina epsilon
Mpp: *major pore-forming protein*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Uso de pesticidas químicos no Brasil.....	8
1.2 Controle Biológico	9
1.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
1.4 Toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
1.4.1 Toxinas Cry.....	13
1.4.2 Toxinas Cyt.....	15
1.4.3 Toxinas Vip.....	16
1.5 Plantas Transgênicas.....	17
OBJETIVOS.....	19
Objetivo geral	19
Objetivos específicos	19
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1 Busca e seleção de cepas em banco de dados	19
2.2 Identificação de sequências proteicas de toxinas.....	19
2.3 Caracterização molecular, análise de domínios conservados e simulação de modelo tridimensional das proteínas	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.1 Alinhamentos.....	20
3.2 Parâmetros físico-químicos.....	25
3.3 Domínios conservados.....	28
3.4 Estrutura tridimensional.....	31
3.5 Classificação	34
4. CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

1.1 Uso de pesticidas químicos no Brasil

O Brasil é um país onde sua economia é fortemente dependente do setor agrícola. Com 88 milhões de hectares cultivados no país, há a produção de uma gama diversificada de commodities para exportação (CASTRO et al., 2020). As atividades agrícolas possuem uma participação de mais de 25% no PIB brasileiro, envolvendo produtos que variam desde grãos, oleaginosas, frutas, vegetais, até biocombustíveis (RAMSER et al., 2019). Segundo o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, desde 1930 até o momento, a área de colheita veio se expandindo numa média de 23,48% a cada década, enquanto a produtividade aumentou em 8% por década, demonstrando, dessa forma, a continuidade da expansão das fronteiras agrícolas no país.

Atualmente, o uso de agrotóxicos na produção agrícola continua extensivo e a razão desse uso indiscriminado é atender à crescente demanda pela produção de alimentos. O combate às pragas agrícolas é feito principalmente por meio do uso de agrotóxicos sintéticos. Contudo, o uso excessivo de agrotóxicos em diversas culturas tem causado sérios danos ecológicos, deixando resíduos no solo, na água e nos alimentos, tornando-os tóxicos para animais e humanos, além de afetar insetos não-alvo, o que por sua vez pode acarretar a perda de populações benéficas para o meio ambiente (LEE et al., 2018).

De acordo com Nasralla Neto et al. (2014), o modelo de produção implantado no Brasil permitiu a rápida expansão do mercado nacional de agrotóxicos nas últimas décadas, tendo uma taxa de crescimento maior do que o dobro do mercado global. Ao mesmo tempo que o Brasil se tornou o maior produtor mundial de soja nas últimas décadas, também liderou mundialmente o consumo de pesticidas químicos.

Pesticidas constituem um grupo grande e heterogêneo de compostos químicos utilizados primariamente para destruir, repelir ou mitigar insetos, nematoides, ervas, pequenos animais e outros organismos indesejáveis (LEE et al., 2018). Quimicamente, essas substâncias podem ser classificadas ou categorizadas como organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, neonicotinóides e fenilpirazóis. Devido a suas propriedades lipofílicas e longa meia-vida, a maior parte dessas substâncias químicas acumulam no meio ambiente, sendo então consideradas poluentes persistentes (LEE et al., 2018). Uma vez no meio ambiente, os

agrotóxicos podem alcançar o organismo humano por meio da rotina tradicional de ingestão de água e alimentos contaminados.

Em países onde a economia é baseada na agricultura, as intoxicações por agrotóxicos representam um sério problema de saúde pública nacional. Doenças neurodegenerativas, patologias respiratórias, distúrbios metabólicos, disfunção reprodutiva e câncer já foram associados à exposição do corpo humano aos pesticidas (KOUAL et al., 2022).

Todavia, o uso de defensivos químicos não se restringe a produção de commodities agrícolas. Eles podem ser comumente encontrados em horticultura e fruticultura como observado a partir dos relatórios do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os agricultores de países de baixa e média renda, localizados principalmente em áreas tropicais com fácil proliferação de pragas, tendem a ter maior exposição a pesticidas devido à falta de regulamentação de segurança, vigilância e treinamento, uso exagerado de produtos químicos altamente tóxicos, falta de uso de equipamentos de proteção individual (EPI) e descuido no manuseio e pulverização. Estudos realizados no Brasil mostraram que os agricultores costumam usar misturas complexas de pesticidas sem precaução de medidas (BENDETTI et al., 2017).

Uma alternativa para minimizar esses problemas é a utilização de bioinseticidas e sistemas de controle biológico utilizando microrganismos como a *Bacillus thuringiensis*, que se destaca por apresentar atividade entomopatogênica contra insetos praga de várias ordens como Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (BONATERRA et al., 2022).

1.2 Controle Biológico

O conceito de manejo biológico de pragas tem dado origem a debates técnicos, econômicos e políticos centrados na agricultura sustentável com baixo impacto ecológico. Com base nesta informação, vários países desenvolveram programas de conservação para reduzir pela metade a utilização de pesticidas químicos. Estes esforços demonstram uma compreensão clara da presença de resíduos tóxicos no ambiente, ao longo de toda a cadeia alimentar. Ressalta-se também que não há alternativa para reduzir a dependência da indústria agrícola em relação aos pesticidas. Neste contexto, é importante melhorar a nossa compreensão do controle biológico de pragas em termos de eficácia e utilização. Muito progresso foi feito nas pesquisas utilizando inóculos microbianos, que juntamente com outras estratégias, oferecem boas oportunidades para o tratamento eficaz de doenças de plantas (LAHLALI et al., 2022).

O controle biológico oferece várias vantagens sobre outras abordagens de manejo de doenças de plantas, levando em consideração o seguinte: os agentes de controle biológico (ACB) geralmente têm como alvo um grupo específico de patógenos e, portanto, têm menos impactos negativos no ecossistema em relação aos pesticidas químicos. Além disso, existe um *tradeoff* documentado entre a resistência do hospedeiro e suas características agronômicas. *Tradeoff* trata-se de um conceito onde os ACBs impedem a expressão consistente do sistema imunológico do hospedeiro, permitindo que as plantas aloquem mais energia e recursos para características agronômicas importantes para os agricultores e o mercado (HE et al., 2021).

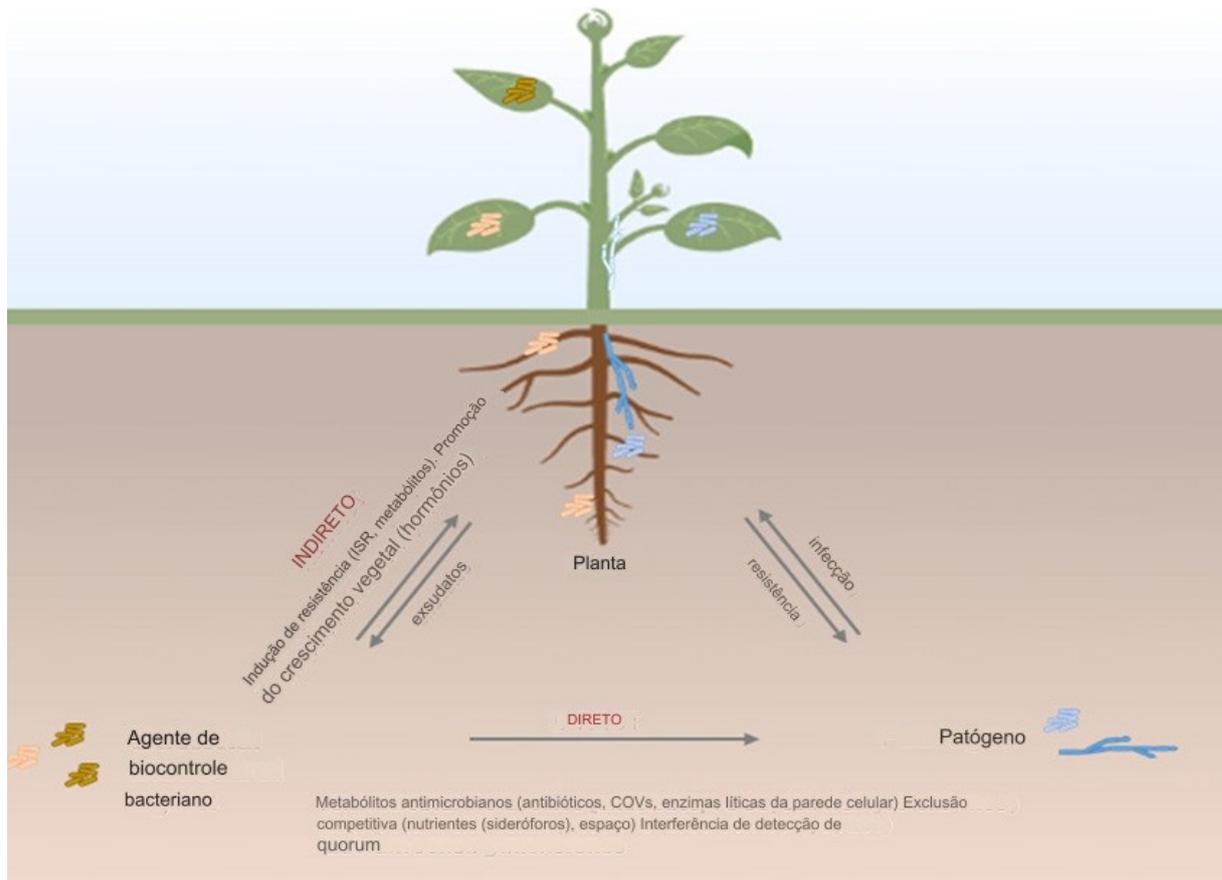
Uma ampla gama de agentes de biocontrole microbiano foram desenvolvidos nas últimas décadas para o manejo de doenças em plantas. Alguns dos mais intensamente estudados são bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Streptomyces* spp., que já foram registrados como produtos comerciais. A eficácia de um agente de controle biológico bacteriano depende do agente microbiano (mecanismo de ação, condicionamento, dose, métodos de aplicação), alvos de patógenos de plantas (sensibilidade), hospedeiro (tipo de cultivar, propriedades físicas) e condições ambientais (fatores bióticos e abióticos, resíduos químicos, disponibilidade de nutrientes, temperatura e umidade) (BONATERRA et al., 2022).

Os agentes de biocontrole bacteriano usam uma grande variedade de mecanismos para proteger as plantas de infecções por patógenos. Eles podem usar um ou uma combinação de mecanismos para prevenir ou reduzir doenças de plantas, interagindo direta ou indiretamente com o patógeno (Figura 1). O agente pode interagir diretamente com o patógeno por meio da secreção de compostos, interferindo na virulência do patógeno e competindo por nutrientes e espaço. Muitos agentes de controle biológico sintetizam e liberam metabólitos como lipopeptídeos, toxinas, antibióticos, biossurfactantes, enzimas de degradação da parede celular ou compostos voláteis microbianos que reduzem o crescimento ou a atividade metabólica de patógenos. O agente de biocontrole também pode interferir no sistema de detecção de quorum (*Quorum sensing*) dos patógenos, degradando enzimaticamente ou inibindo a síntese de moléculas de sinalização usadas para iniciar infecções. Lactonases, pectinases e quitinases são exemplos de inibidores de QS, que degradam moléculas de sinalização (BONATERRA et al., 2022).

Além das interações diretas, os agentes de biocontrole podem atuar nas plantas indiretamente, desencadeando a resposta de defesa ou promovendo o crescimento da planta. Eles podem aumentar o mecanismo de defesa do hospedeiro, provocando resistência sistêmica. Isso resulta em um acúmulo de barreiras estruturais e desencadeia muitas respostas de defesa bioquímicas e moleculares no hospedeiro, conferindo um sistema de proteção contra uma ampla

gama de patógenos. Além disso, podem promover o crescimento da planta aumentando a absorção de minerais e água ou produzindo compostos estimulantes, como hormônios, e, assim, melhorando a saúde e a aptidão da planta (BONATERRA et al., 2022).

Figura 1. Visão geral dos mecanismos diretos e indiretos de biocontrole envolvendo interação entre agente de biocontrole bacteriano, patógeno e planta.



Fonte: BONATERRA, 2022.

1.3 *Bacillus thuringiensis*

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) é um dos biopesticidas mais conhecidos presentes no mercado. As toxinas Cry são as toxinas produzidas por Bt mais exploradas como biopesticida. Elas são extremamente específicas em relação ao grupo-alvo e à segurança, sendo também biodegradáveis e não prejudiciais ao meio ambiente. Todas essas características, juntamente com a facilidade para sua produção comercial, resultaram em seu uso por mais de 60 anos em mais de 90% dos países do mundo. Muitas culturas transgênicas que expressam genes Cry se espalharam pelo mundo desde 1996, também se mostrando notavelmente eficazes no controle de pragas. Atualmente, mais de 50% do algodão e 40% do milho cultivados nos

Estados Unidos são transgênicos que expressam genes Bt. O Bt, além do uso como um inseticida eficiente para pragas agrícolas, também é usado para o controle biológico de insetos de importância médica (vetores transmissores de dengue, zika, chikungunya, febre amarela, malária e filariose) (SANTOS et al., 2022).

B. thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva esporulante que é amplamente distribuída na natureza ao redor do mundo. Pertencente ao grupo filogenético do *B. cereus*, foi isolada pela primeira vez em 1901, no Japão por Ishiwata, de larvas de *Bombyx mori* (bicho-da-seda), que foram contaminadas por uma bactéria entomopatogênica. No entanto, foi nomeada *B. thuringiensis* em 1911 por Ernest Berliner, que a isolou de larvas mortas da traça da farinha (*Ephestia kuehniella*) (SANTOS et al., 2022).

O Bt é conhecido mundialmente por produzir diferentes tipos de metabólitos secundários ao longo de seu ciclo de vida, que são tóxicos para uma gama diversificada de organismos, sendo os insetos seu grupo-alvo mais conhecido e difundido. Durante a fase vegetativa, o Bt produz proteínas que são liberadas no meio, Vip (proteínas inseticidas vegetativas) e Sip (proteínas inseticidas secretadas). Além dessas toxinas durante a fase vegetativa, o Bt também produz outros metabólitos menos conhecidos, como esfericolisinas, alveolisinas, beta-exotoxina e proteínas semelhantes à enancina. Além disso, durante a fase de esporulação, o Bt produz os corpos de inclusão mais conhecidos e explorados em forma parasporal, conhecidos como cristais de delta-endotoxina ou proteínas cristalinas inseticidas, distribuídos em duas famílias bem conhecidas: Cry e Cyt. As proteínas Cyt demonstraram atuar em sinergia com proteínas Cry contra diversos vetores (PALMA et al., 2014).

Segundo González et al. (2019), *B. thuringiensis* desenvolveu uma fascinante variedade de mecanismos moleculares para produzir grandes quantidades de toxinas pesticidas. A notável diversidade de cepas e toxinas da Bt se deve, pelo menos em parte, a um alto grau de plasticidade genética. A maioria dos genes de toxinas de *B. thuringiensis* parece residir em plasmídeos, frequentemente como partes de estruturas compostas que incluem elementos genéticos móveis. Muitos plasmídeos contendo genes cry parecem ser de natureza conjugativa.

1.4 Toxinas de *Bacillus thuringiensis*

1.4.1 Toxinas Cry

As toxinas Cry são formadas como inclusões cristalinas parasporais durante a fase estacionária do crescimento da Bt e são classificadas com base em sua sequência primária de aminoácidos, com mais de 500 toxinas diferentes incluídas em 67 grupos (Cry1 até Cry67) (CRICKMORE et al., 2010). Essas sequências de genes Cry eram divididas em pelo menos quatro famílias de proteínas filogeneticamente não relacionadas que podem ter diferentes modos de ação: a família de toxina Cry de três domínios (3D), a família de toxina Cry que mata mosquitos (Mtx), a família de toxina binária (Am) e a família de toxina Cyt (BRAVO et al., 2005). Na nomenclatura atual de Crickmore, a classe Cry engloba apenas toxinas Cry de três domínios, sendo Mtx e Am reagrupadas na classe Mpp e Cyt isolada como uma classe própria (Crickmore et al., 2021).

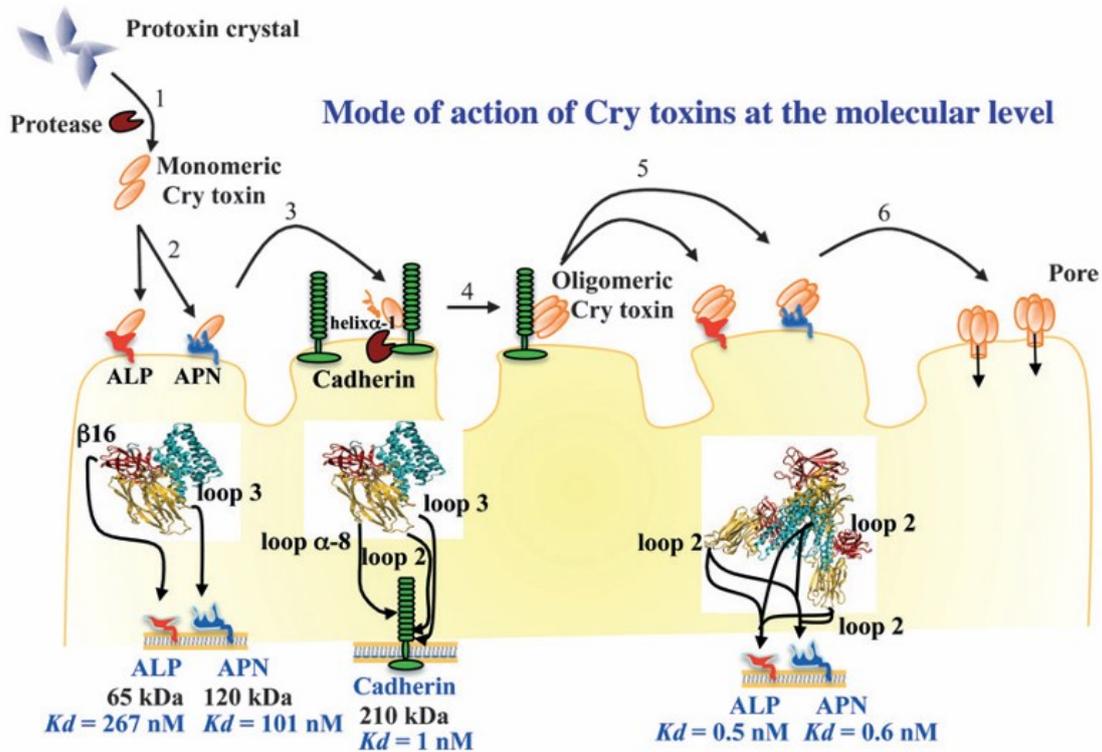
A maior família de toxinas Cry é o Cry de três domínios (3D-Cry), formado por pelo menos 40 grupos diferentes com mais de 200 sequências genéticas diferentes. A estrutura tridimensional de sete toxinas 3D-Cry diferentes foi resolvida (Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa, Cry4Ba e Cry8Ea), demonstrando que, embora a maioria dessas toxinas compartilhe baixa identidade de sequência de aminoácidos, elas compartilham uma estrutura semelhante que consiste em três domínios (GUO et al., 2009). O domínio I é um feixe de sete α -hélices, que está implicado na inserção da toxina na membrana, oligomerização das unidades e formação dos poros. O domínio II é um beta-prisma de três folhas β antiparalelas empacotadas em torno de um núcleo hidrofóbico com regiões de loop expostas que estão envolvidas no reconhecimento do receptor, e o domínio III é um β -sanduíche de duas folhas β antiparalelas. Ambos os domínios II e III estão implicados na especificidade do inseto ao mediar interações específicas com diferentes proteínas intestinais do inseto. Como a estrutura tridimensional é conservada entre os membros da família 3D-Cry, é sugerido que proteínas desta família podem compartilhar um mecanismo de ação semelhante (BRAVO et al., 2007).

É geralmente aceito que as toxinas Cry exercem toxicidade devido à sua capacidade de formação de poros no trato digestivo de insetos (SOBERÓN et al., 2009). Para exercer toxicidade, as protoxinas Cry devem ser ativadas por proteases do intestino médio para produzir o núcleo ativo da toxina, que se liga às moléculas receptoras de toxinas, levando à morte das células do intestino médio do inseto (MAAGD et al., 2001). Diferentes proteínas de ligação ao

Cry foram caracterizadas em diferentes espécies de insetos. Entre estes, demonstrou-se que os transportadores da aminopeptidase N (APN), fosfatases alcalinas (ALP), caderina e cassete de ligação de ATP do membro 2 da subfamília C (ABCC2) estão envolvidos na toxicidade (PIGOTT; ELLAR, 2007).

De acordo com Bravo et al. (2005), as toxinas Cry passam por um mecanismo de ligação sequencial com diferentes proteínas intestinais de insetos, para que ocorra a oligomerização, inserção e formação de poros. O modo de ação das toxinas Cry1A foi particularmente bem definido (Figura 2). Toxinas como a Cry1A, são produzidas como protoxinas que são dissolvidas e processadas proteoliticamente por proteases de insetos, liberando o fragmento tóxico ativo com estrutura de três domínios. A primeira interação de ligação da toxina Cry1A ativada ocorre por meio de regiões de aminoácidos expostas do domínio II e domínio III da toxina com ALP e APN que são sítios de ligação de baixa afinidade altamente abundantes para a toxina (GÓMEZ et al., 2006). Essas interações de ligação concentram a toxina ativada na membrana das microvilosidades das células do intestino médio, onde a toxina então se liga com alta afinidade por meio de loops do domínio II expostos ao receptor de caderina (XIE et al., 2005). Essa interação com o receptor de caderina facilita a clivagem proteolítica adicional da extremidade N-terminal, incluindo a hélice α -1 do domínio I, que induz a formação de um oligômero pré-poro da toxina (GÓMEZ et al., 2006).

Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação das toxinas Cry



Fonte: LÓPEZ, 2012.

1.4.2 Toxinas Cyt

Proteínas Cyt (citotóxicas), codificadas por genes *cyt*, constituem outra família de proteínas inseticidas relevantes em Bt, exibindo uma atividade citolítica (hemolítica) geral *in vitro* e especificidade predominantemente para dípteros *in vivo*. Essas toxinas costumam ser proteínas alfa-beta de domínio único e três camadas (PALMA et al., 2014). Em contraste às toxinas Cry, que se ligam a receptores específicos nas microvilosidades das células do intestino médio do inseto, as toxinas Cyt não se ligam a receptores de proteína, mas interagem diretamente com lipídios de membrana, inserindo-se na membrana e formando poros ou destruindo a membrana por uma interação semelhante a detergente (BUTKO et al., 2003).

Por meio de estudos com a toxina Cyt1Aa, dois modelos distintos que explicam o mecanismo de ação das toxinas Cyt foram propostos. Primeiro, o modelo de formação de poros sugere que, após a ligação à membrana celular, a toxina Cyt forma um canal seletivo de cátions, levando à lise coloidal-osmótica da célula. O segundo modelo sugere um efeito detergente, pelo qual a agregação não específica da toxina na superfície da membrana leva à desmontagem da bicamada lipídica e à morte celular (ONOFRE et al., 2020).

O mecanismo preciso pelo qual a toxina Cyt se insere na membrana não é conhecido. No modelo de formação de poros, foi proposto que a região da folha beta de Cyt1Aa está envolvida na inserção da toxina na membrana, enquanto as hélices alfa-1 e alfa-3 são importantes para o reconhecimento da membrana e oligomerização para finalmente formar oligômeros de alto peso molecular, que se inserem na membrana e formam os poros líticos compostos de 16 monômeros. Foi demonstrado que a oligomerização de Cyt1Aa é necessária para a inserção da membrana e formação de poros porque os mutantes da hélice alfa-3 de Cyt1Aa foram incapazes de oligomerizar e perderam a toxicidade e atividade hemolítica. No entanto, mutações na hélice alfa-1 na toxina Cyt1Aa não prejudicaram a formação de oligômeros, mas afetaram a atividade hemolítica, sugerindo que as atividades inseticidas e hemolíticas de Cyt1Aa podem envolver mecanismos diferentes (ONOFRE et al., 2020).

Em contraste, o modelo de ação detergente propôs que a interação de Cyt1Aa com lipídios, desencadeia mudanças estruturais de Cyt, e a toxina é espalhada na superfície da membrana afetando a organização lipídica, resultando na quebra do lipossomo e liberando seu conteúdo. Foi demonstrado que polímeros pequenos e de alto peso molecular, poderiam ser liberados das vesículas pela ação de Cyt, e foi estimado que pelo menos 140 moléculas de toxina devem se ligar a grandes vesículas unilamelares para induzir sua quebra (BUTKO et al., 2003). A toxina Cyt pode interagir com diferentes tipos de sistemas de membrana e provavelmente as mudanças conformacionais nessa toxina que são necessárias para afetar a integridade da membrana podem ser diferentes. Recentemente, algumas etapas importantes no modo de ação da Cyt1Aa foram estudadas em linhas de células de insetos e grandes vesículas unilamelares. Os autores propuseram que o grampo de hélices alfa-3/alfa-4 se afasta da folha beta após a ativação. A toxina se agrega na superfície da bicamada e se insere formando grandes poros com mais de 56 monômeros (TETREAU et al., 2020).

1.4.3 Toxinas Vip

Algumas cepas de Bt produzem proteínas que são secretadas no meio, contendo propriedades inseticidas contra uma série de insetos e estendendo a gama geral de hospedeiros desta bactéria. As proteínas inseticidas secretadas constituem duas classes, que foram designadas como proteínas inseticidas vegetativas (Vip) e proteínas inseticidas secretadas (Sip). Atualmente, o Comitê de Nomenclatura de Toxinas Bt identificou e classificou as proteínas Vip em quatro famílias diferentes, a saber, Vip1, Vip2, Vip3 e Vip4. As proteínas secretáveis, como Vip1, Vip2 e Sip, contêm sequências de peptídeos sinalizadores conservadas que são

comumente clivadas antes ou depois que o processo de secreção é concluído (PALMA et al., 2014).

Muitos pesquisadores demonstraram que as cepas de Bt secretam proteínas Vip durante a fase de crescimento vegetativo e essas proteínas não compartilham nenhuma homologia estrutural e de sequência com proteínas Cry, portanto, são consideradas complemento ou fonte suplementar de toxinas Cry no manejo de resistência e proteção de culturas. A abordagem de combinação de proteínas tóxicas com diferentes modos de ação vem ganhando importância como uma estratégia viável para o manejo do desenvolvimento de resistência em insetos praga. Dessa forma, várias culturas comerciais de Bt combinam proteínas Vip e Cry (GUPTA; KUMAR; KAUR, 2021).

As proteínas Vip1 e Vip2 juntas constituem uma toxina binária. A toxicidade de Vip1, Vip2 e sua combinação foi testada contra uma série de espécies de insetos pertencentes às ordens Coleoptera, Lepidoptera, Diptera e Hemiptera, bem como nematoides. Até agora, a toxicidade contra 10 espécies de coleópteros e a espécie de hemípteros *Aphis gossypii* foi encontrada. Testes com proteínas Vip1 ou Vip2 individuais contra várias espécies de insetos de diferentes ordens confirmou o fato de que essas proteínas devem agir em conjunto para serem tóxicas, uma vez que nenhuma proteína sozinha apresentou qualquer atividade tóxica contra as espécies testadas (CHAKROUN et al., 2016).

O mecanismo molecular da atividade inseticida da toxina Vip1/Vip2 não é totalmente compreendido, porém, foi proposto um modelo no qual o domínio de ligação ao receptor da Vip1 se liga aos receptores de membrana do intestino médio do inseto alvo como monômero ou oligômero e forma o poro/canal através do qual o domínio citotóxico da proteína Vip2 exerce sua ação através da ADP-ribosiltransferase no citoplasma do inseto. Vip2 também pode entrar na célula através de endocitose. Após entrar no citoplasma, a Vip2 atua contra a actina nas células alvos, impedindo a formação de microfilamentos por meio da transferência catalítica de ADP-ribose de NAD para actina, desintegrando o citoesqueleto e resultando na morte do inseto alvo. Ao contrário de Vip1 e Vip2, as toxinas Vip3 e Vip4 apresentam atividade inseticida individualmente, porém, o mecanismo de ação permanece mal compreendido (GUPTA; KUMAR; KAUR, 2021).

1.5 Plantas Transgênicas

Por fim, um avanço importante na redução de inseticidas químicos na agricultura veio com o desenvolvimento de plantas transgênicas que são capazes de expressar proteínas da Bt.

Em plantas transgênicas, a toxina é produzida continuamente e é protegida da degradação por UV. Em 2009, mais de 40 milhões de hectares de culturas Bt foram cultivadas em todo o mundo, resultando em uma redução significativa no uso de inseticidas químicos e contribuindo em alguns casos para a supressão de certas pragas de insetos como *P. gossypiella*, uma praga do algodoeiro (JAMES, 2009).

Atualmente, as culturas Bt mais importantes são de soja, milho, algodão e canola. O algodão Bt comercial expressa a proteína Cry1Ac para o controle de pragas lepidópteras como *Helicoverpa zea*, *Pectinophora gossypiella* e entre outras. Uma segunda geração de algodão Bt produz Cry2Ab além de Cry1Ac como um mecanismo de gerenciamento de resistência. O milho Bt expressando Cry1Ac controla efetivamente pragas de lepidópteros como *Heliothis virescens* e *Ostrinia nubilalis* (CHRISTOU et al., 2006). Novas gerações de milho Bt comercial expressam uma série de toxinas incluindo a toxina binária Cry34Ab/Cry35Ab e Cry3Bb para controlar pragas de coleópteros como *Diabrotica virgifera* e Cry1A, Cry2Ab e Cry1F para o controle de pragas de lepidópteros incluindo *Spodoptera frugiperda*. Embora ainda não esteja disponível comercialmente, o VIP3 também foi produzido com sucesso em milho transgênico (CHRISTOU et al., 2006).

Perante a crescente utilidade e possibilidades de aplicações das toxinas Bt, é justificada a importância e a necessidade de análises de cepas de Bt e suas toxinas. Por meio de métodos de análises com ferramentas de bioinformática, é possível identificar cepas, comparar sequências e caracterizar toxinas, acelerando e facilitando o processo de seleção de cepas e toxinas ideais para futuros experimentos e criação de novos bioprodutos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Identificar e caracterizar, por meio de ferramentas de bioinformática, possíveis toxinas inseticidas em cepas de *Bacillus thuringiensis*

Objetivos específicos

- Selecionar cepas de *B. thuringiensis* que ainda não tiveram suas proteínas descritas na literatura
- Verificar a existência de possíveis genes de toxinas inseticidas nas cepas e caracterizar seus produtos proteicos

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Busca e seleção de cepas em banco de dados

A fim de buscar genomas de cepas de *B. thuringiensis*, o banco de dados do NCBI foi utilizado (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Deste banco, foram selecionadas 4 cepas sem a caracterização das proteínas na literatura, obtendo-se de cada cepa o seu *Genome Assembly*, que contém as sequências gênicas e proteicas.

2.2 Identificação de sequências proteicas de toxinas.

Por meio de BLASTp no software BioEdit, foi realizado uma busca inicial nos genomas selecionados. Essa busca foi feita por alinhamento das sequências proteicas das cepas contra as seguintes sequências referência de toxinas inseticidas; ABR68091.1 (Cry2Aa), ACF35049.1 (Cyt2Aa), 6V1V_A (Vip3), AGC08396.1 (Vpa), AGC08395.1 (Vpb), AKA64627.1 (Mpp), AAA22353.1 (Cry1Aa1), CAA68485.1 (Cry4Aa1), AAA67694.1 (Cry5Aa1), Q03749.1 (Cry7Aa1), WP_087997148.1 (Cry9Aa1), AAA21516.1 (Cry14Aa1) e O32321.1 (Cry20Aa1),

com um limiar de E-value de 10^{-6} , a fim de obter sequências com alinhamentos significativos. Em seguida, uma segunda comparação de sequências foi realizada no banco de dados do *Bacterial Pesticidal Protein Resource Center* (BPPRC), sendo utilizado como parâmetro a porcentagem de identidade das sequências. Esse alinhamento identificou se as sequências encontradas já haviam sido previamente caracterizadas ou se eram novas.

2.3 Caracterização molecular, análise de domínios conservados e simulação de modelo tridimensional das proteínas

Propriedades moleculares como tamanho da sequência, peso molecular e ponto isoelétrico foram obtidas por meio da plataforma ExPasy (https://web.expasy.org/compute_pi/). As sequências proteicas selecionadas foram submetidas ao CD-Search do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) e ao InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) a fim de identificar os domínios conservados dentro das sequências e avaliar a classificação das possíveis toxinas. Para a obtenção do modelo tridimensional das proteínas, foi utilizado o servidor do SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Alinhamentos

Após a análise do banco de dados e da literatura foi possível identificar 4 cepas de *B. thuringiensis* com genoma completo disponível e sem publicações com caracterização dos genes inseticidas: *B. thuringiensis* IBL 200 (ACNK000000000), *B. thuringiensis* serovar indiana HD521 (PRJNA263441), *B. thuringiensis* FDAARGOS 801 (PRJNA231221) e *B. thuringiensis* serovar tenebrionis NB-176 (PRJNA886432).

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) é a ferramenta de bioinformática chave para comparação de sequências e recuperação em bancos de dados. BLAST é frequentemente o primeiro passo no uso de informações baseadas em sequências para projetar experimentos e contextualizar resultados experimentais. O alinhamento das sequências proteicas das 4 cepas

permitiu a identificação de toxinas já conhecidas e registradas, como também, novas proteínas com possível atividade inseticida. O BLASTp inicial no software BioEdit retornou do proteoma de cada cepa, as sequências proteicas com alinhamentos significativos. O critério analisado neste primeiro alinhamento para a seleção inicial das sequências proteicas foi o E-value. O E-value é um parâmetro muito importante de se olhar ao realizar um alinhamento. Ele demonstra a possibilidade do alinhamento ter sido realizado ao acaso. Se o E-value for muito próximo de 0, então o score de alinhamento não é devido ao acaso. No entanto, se estiver próximo de 1, significa que o alinhamento pode ser devido ao acaso. No software BioEdit, foi estabelecido um E-value com limiar de 10^{-6} , ou seja, todos os alinhamentos devem apresentar um E-value menor ou igual a 10^{-6} . Foi possível obter das 4 cepas um total de 31 sequências produzindo alinhamentos significativos. A tabela 1 mostra o número de acesso de cada proteína obtida, a proteína referência com qual cada uma foi melhor alinhada e o E-value de cada alinhamento.

O segundo alinhamento foi realizado no banco de dados do Bacterial Pesticidal Protein Resource Center (BPPRC). As 31 sequências proteicas obtidas no primeiro alinhamento foram submetidas à ferramenta de alinhamento do próprio banco, obtendo-se a porcentagem de identidade de cada uma (tabela 2). Das 31 sequências, 9 apresentaram uma identidade de 100%, indicado que já haviam sido encontradas em outras cepas (Cry1Ab18, Cry1Ja2, Cry1Bb1, Cry1Id1, Cry2Ad1, Cry3Aa12, Cry7Da1, Cry7Fb1, Cry1Ab1).

De acordo com Neil Crickmore (2021), conhecido por seu trabalho na classificação e nomenclatura das diversas toxinas produzidas por diferentes cepas de Bt, está bem estabelecido que proteínas que compartilham homologia de sequência, são susceptíveis de apresentar configurações estruturais semelhantes. Crickmore determinou que para sequências que compartilham 95% ou mais de identidade com uma sequência já na nomenclatura, nenhuma demonstração de atividade inseticida é necessária.

Tabela 1 – Sequências com alinhamentos significativos contra proteínas inseticidas.

Número de acesso	Cepa	Sequência referência	E-value
WP_000369820.1	IBL 200	AAA22353.1 (Cry1Aa1)	0
WP_001089637.1	IBL 200	ABR68091.1 (Cry2Aa)	0
WP_000405159.1	IBL 200	CAA68485.1 (Cry4Aa1)	1e-148
WP_000405158.1	IBL 200	AAA67694.1 (Cry5Aa1)	3e-046
WP_000203375.1	IBL 200	Q03749.1 (Cry7Aa1)	0
WP_000453539.1	IBL 200	AAA22353.1 (Cry1Aa1)	0
WP_000837623.1	IBL 200	O32321.1 (Cry20Aa1)	7e-057
WP_001066376.1	IBL 200	6V1V_A (Vip3)	0
WP_000255144.1	IBL 200	AGC08396.1 (Vpa)	0
WP_000727639.1	IBL 200	AGC08395.1 (Vpb)	0
WP_003308447.1	IBL 200	AKA64627.1 (Mpp)	2e-009
WP_001087541.1	IBL 200	AAA22353.1 (Cry1Aa1)	1e-163
WP_001087511.1	IBL 200	WP_087997148.1 (Cry9Aa1)	5e-067
WP_042972902.1	IBL 200	ABR68091.1 (Cry2Aa)	3e-024
WP_000728165.1	IBL 200	AGC08395.1 (Vpb)	0
WP_052574943.1	NB-176	Q03749.1 (Cry7Aa1)	1e-121
WP_086405553.1	NB-176	AKA64627.1 (Mpp)	1e-170
WP_086405659.1	NB-176	AKA64627.1 (Mpp)	1e-009
WP_000253776.1	NB-176	AGC08396.1 (Vpa)	0
WP_086405651.1	NB-176	AGC08396.1 (Vpa)	1e-157
WP_223697903.1	NB-176	AGC08396.1 (Vpa)	1e-151
WP_044798434.1	NB-176	AGC08396.1 (Vpa)	4e-027
WP_044798436.1	NB-176	AGC08396.1 (Vpa)	5e-014
WP_000727638.1	NB-176	AGC08395.1 (Vpb)	0
WP_080893310.1	NB-176	AGC08395.1 (Vpb)	0
WP_086405652.1	NB-176	AGC08395.1 (Vpb)	0
WP_080989235.1	HD521	Q03749.1 (Cry7Aa1)	0
WP_277680490.1	HD521	Q03749.1 (Cry7Aa1)	0
WP_050822470.1	HD521	Q03749.1 (Cry7Aa1)	0
WP_000811551.1	HD521	AGC08395.1 (Vpb)	2e-017
WP_000369819.1	FDAARGOS 801	AAA22353.1 (Cry1Aa1)	0

No início da descoberta das proteínas inseticidas de *B. thuringiensis*, elas eram classificadas de acordo com suas atividades inseticidas, com proteínas CryI sendo tóxicas para insetos lepidópteros, CryIIs para Lepidoptera e Diptera, CryIIIs para Coleoptera e CryIVs apenas para Diptera. Embora essa nomenclatura tenha se mostrado extremamente útil na classificação sistemática de proteínas que antes tinham recebido nomes arbitrários, logo ficou claro que havia limitações significativas. Uma dessas limitações era que proteínas que compartilhavam homologia de sequência frequentemente tinham especificidades inseticidas diferentes, exigindo que fossem colocadas em diferentes grupos de classificação primária. Outra limitação importante era a necessidade de obter dados abrangentes de bioensaio antes que uma proteína pudesse ser classificada. Para superar esses desafios, uma nomenclatura revisada foi introduzida em 1998, que classificou as proteínas apenas por similaridade de aminoácidos (Crickmore et al., 2021).

Neste sistema, as proteínas eram comparadas em um alinhamento de sequência múltiplo e um dendrograma era produzido para ilustrar essas relações. Os nomes foram derivados com base na localização do nó no qual a proteína se juntou ao dendrograma. Com base nisso, um sistema de nomenclatura de quatro níveis foi adotado no qual proteínas que compartilhavam até 44% de identidade de sequência foram colocadas no mesmo grupo de classificação primária (Cry1, Cry2 etc.). Os grupos primários foram então divididos de forma que proteínas que compartilhavam de 45% até 75% de identidade receberam diferentes classificações secundárias (Cry1A, Cry1B etc.). Um terceiro nível foi usado para proteínas dentro da classificação secundária que compartilhavam de 76% até 94% de identidade de sequência (Cry1Aa, Cry1Ab etc.). Finalmente, um quarto nível foi usado para proteínas dentro do mesmo nível terciário que compartilhavam 95% ou mais de identidade (Cry1Aa1, Cry1Aa2 etc.). Embora tenha-se julgado que esta abordagem de nomenclatura era potencialmente instável, à medida que mais proteínas eram adicionadas, ela provou ser robusta e ainda é usada a mais de 20 anos depois. (Crickmore et al., 2021).

Em vista disso, é possível considerar que WP_000405159.1, WP_001066376.1, WP_000727639.1, WP_001087541.1, WP_000453539.1, WP_000255144.1 e WP_000727638.1 podem apresentar alta probabilidade de exibir atividade inseticida muito semelhante aos seus correspondentes de identidade, sem necessidade de comprovação por meio de bioensaios, uma vez que manifestam mais de 95% de identidade de sequência. Segundo Chakroun et al. (2016), toxinas que apresentam mais de 95% de identidade costumam ser produtos de formas “alélicas” do mesmo gene.

Tabela 2 – Identificação das proteínas inseticidas encontradas nas 4 cepas de *B. thuringiensis* analisadas. A identificação foi feita por alinhamento contra o banco Bacterial Pesticidal Protein Resource Center (BPPRC).

Número de acesso	Cepa	Identificação	Identidade (%)
WP_000369820.1	IBL 200	Cry1Ab18	100%
WP_000405158.1	IBL 200	Cry1Ja2	100%
WP_000203375.1	IBL 200	Cry1Bb1	100%
WP_000837623.1	IBL 200	Cry1Id1	100%
WP_001089637.1	IBL 200	Cry2Ad1	100%
WP_000405159.1	IBL 200	Cry1Da3	99.9%
WP_001066376.1	IBL 200	Vip3Af1	99.7%
WP_000727639.1	IBL 200	Vpb1Ca1	99.6%
WP_001087541.1	IBL 200	Cry1Nb1	99.3%
WP_000453539.1	IBL 200	Cry1Hb1	98.3%
WP_000255144.1	IBL 200	Vpa2Ac1	98.1%
WP_000728165.1	IBL 200	Vpb1Ba1	61.6%
WP_001087511.1	IBL 200	Cry1Ma2	38.7%
WP_003308447.1	IBL 200	Mpp83Aa1	28.2%
WP_042972902.1	IBL 200	Cry2Aa5	23.7%
WP_052574943.1	NB-176	Cry3Aa12	100%
WP_000727638.1	NB-176	Vpb1Ae1	99.7%
WP_000253776.1	NB-176	Vpa2Aa3	93.4%
WP_086405553.1	NB-176	Mpp5Ac1	78.3%
WP_086405651.1	NB-176	Vpa2Ba1	76.8%
WP_223697903.1	NB-176	Vpa2Bb1	71.6%
WP_080893310.1	NB-176	Vpb1Ad1	57.1%
WP_086405652.1	NB-176	Vpb1Ad1	55.3%
WP_086405659.1	NB-176	Mpp3Aa2	25.1%
WP_044798436.1	NB-176	Vpa2Ac1	22.5%
WP_044798434.1	NB-176	Vpa2Ah1	20.6%
WP_080989235.1	HD521	Cry7Da1	100%
WP_050822470.1	HD521	Cry7Fb1	100%
WP_277680490.1	HD521	Cry7Ga1	99.3%
WP_000811551.1	HD521	Vpb1Ea2	20.2%
WP_000369819.1	FDAARGOS 801	Cry1Ab1	100%

A maioria das cepas teve uma predominância de sequências com identidades próximas às toxinas do tipo Cry, entretanto a cepa *B. thuringiensis* serovar tenebrionis NB-176 teve, em sua maioria, sequências próximas às proteínas do tipo Vip.

Segundo Guo et al (2009), muitas das toxinas Cry compartilham baixa identidade de sequência de aminoácidos, entretanto, elas compartilham uma estrutura semelhante que consiste em três domínios. Dessa forma, apesar de algumas das sequências analisadas terem apresentado uma porcentagem de identidade baixa, não é descartada a possibilidade de haver atividade inseticida, sendo elas, provavelmente, novas toxinas inseticidas que precisam de classificação.

3.2 Parâmetros físico-químicos

Na caracterização de uma proteína potencialmente inseticida, é necessário verificar se ela atende aos parâmetros físico-químicos de proteínas tóxicas. Neste sentido, o ponto isoelétrico teórico, o peso molecular e o número de aminoácidos foram calculados e apresentados na tabela 3.

De acordo com Bravo et al (2015), genes Cry podem codificar para proteínas com peso molecular que varia de 50 a 140 kDa. Além disso, Maagd et al (2001) identificaram dois tipos de protoxinas Cry, as protoxinas curtas de cerca de 70 kDa e as longas de 130 kDa. Os pesos moleculares das proteínas candidatas que tiveram identidade próxima às toxinas do tipo Cry (WP_000405159.1, WP_001087541.1, WP_000453539.1, WP_001087511.1, WP_042972902.1 e WP_277680490.1) são 131,99108, 76,95773, 132,52237, 77,63439, 75,75094 e 126,89089 kDa respectivamente. É perceptível que os pesos moleculares dessas proteínas estão dentro da variação determinada por Bravo et al, como também, estão dentro do padrão de toxinas do tipo curto e longo, identificado por Maad et al. De acordo com Bravo et al (2015), Cry1Aa, Cry1Ac, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa, e Cry8Ea apresentam atividade inseticida bem conhecida, dessa forma, podendo ser utilizadas como padrão para comparação. Cry1Aa, Cry1Ac, Cry4Aa e Cry8Ea são toxinas Cry do tipo longo apresentando variação de 1164 até 1180 em número de aminoácidos. Já Cry3Aa e Cry3Bb são toxinas do tipo curto apresentando uma média de 652 aminoácidos nas suas sequências.

Tabela 3 – Número de aminoácidos (aa), massa molecular em Da e ponto isoelétrico (pI) preditos das proteínas inseticidas identificadas.

Nº de acesso	Nº de aa	Massa molecular (Da)	pI
WP_000369820.1 (Cry)	1177	133340,00	4,98
WP_000405158.1 (Cry)	1167	132690,00	5,08
WP_000203375.1 (Cry)	1229	139770,00	5,07
WP_000837623.1 (Cry)	719	81400,00	5,74
WP_001089637.1 (Cry)	633	70750,00	8,17
WP_000405159.1 (Cry)	1167	131991,08	5,27
WP_001066376.1 (Vip3)	786	87792,17	5,19
WP_000727639.1 (Vpb)	772	86737,07	5,57
WP_001087541.1 (Cry)	671	76957,73	6,60
WP_000453539.1 (Cry)	1169	132522,37	5,07
WP_000255144.1 (Vpa)	453	51252,4	7,57
WP_000728165.1 (Vpb)	779	87140,45	5,58
WP_001087511.1 (Cry)	680	77634,39	5,87
WP_003308447.1 (Mpp)	282	31237,02	7,76
WP_042972902.1 (Cry)	667	75750,94	8,07
WP_052574943.1 (Cry)	644	73108,62	5,32
WP_000727638.1 (Vpb)	871	97428,82	5,68
WP_000253776.1 (Vpa)	453	51062,07	8,09
WP_086405553.1 (Mpp)	364	40788,97	8,90
WP_086405651.1 (Vpa)	446	50241,18	8,88
WP_223697903.1 (Vpa)	432	49286,16	8,88
WP_080893310.1 (Vpb)	999	111948,80	5,50
WP_086405652.1 (Vpb)	889	99505,84	5,13
WP_086405659.1 (Mpp)	323	35926,50	9,06
WP_044798436.1 (Vpa)	448	51222,75	9,19
WP_044798434.1 (Vpa)	274	31578,83	9,03
WP_080989235.1 (Cry)	1144	129731,53	5,16
WP_050822470.1 (Cry)	1162	132367,01	4,91
WP_277680490.1 (Cry)	1123	126890,89	5,01
WP_000811551.1 (Vpb)	738	81345,47	5,69
WP_000369819.1 (Cry)	1155	130623,66	5,03

O ponto isoelétrico dessas Cry já conhecidas varia de 4,95 até 5,59. WP_000405159.1, WP_000453539.1, WP_277680490.1 apresentam, respectivamente, 1167, 1169 e 1123 aminoácidos em suas sequências, tendo valores próximos às sequências do tipo longo. WP_001087541.1, WP_001087511.1 e WP_042972902.1 apresentam, respectivamente, 671, 680 e 667 aminoácidos em suas sequências, tendo valores próximos à média das toxinas do tipo curto. A maior parte das proteínas candidatas com identidade próxima a toxinas Cry apresentou uma média de ponto isoelétrico de 5,56, estando dentro da variação de pI das Cry já conhecidas. WP_042972902.1 apresentou um pI de 8,07, valor próximo ao pI de WP_001089637.1 (8,17), que é uma Cry já conhecida com 100% de identidade. Além disso, ao comparar os dados dos candidatos Cry (WP_000405159.1, WP_001087541.1, WP_000453539.1, WP_001087511.1, WP_042972902.1 e WP_277680490.1) com os das sequências de 100% de identidade Cry apresentados na tabela 3, é perceptível que os candidatos Cry estão de acordo com o padrão das Cry já conhecidas.

De acordo com Gupta et al (2021) e conforme nova nomenclatura atribuída pelo comitê de nomenclatura Bt, protoxinas do tipo Vip1/Vpb1 apresentam uma massa média de 100 kDa e 881 aa nas sequências, protoxinas Vip2/Vpa2 52 kDa e 462 aa, protoxinas Vip3 89 kDa e 788 aa e protoxinas Vip4 108 kDa e 951 aa em média. As proteínas candidatas a serem do tipo Vip1/Vpb1 são WP_000727639.1, WP_000728165.1, WP_000727638.1, WP_080893310.1, WP_086405652.1 e WP_000811551.1. O peso molecular de WP_000727638.1, WP_086405652.1 e WP_080893310.1 variou de 97,42882 até 111,94880 kDa, estando entre a média determinada para protoxinas Vpb1, entretanto o peso molecular de WP_000811551.1, WP_000727639.1, WP_000728165.1 variou de 81,34547 até 87,14045 kDa, não estando de acordo com a massa média de protoxinas Vpb1, mas sim com valores próximos a massa média da toxina Vpb1 na forma ativa, que é de 82 kDa. Em número de aminoácidos, WP_000727638.1 (871 aa) e WP_086405652.1 (889 aa) apresentaram a maior proximidade com o valor estabelecido para Vpb1, entretanto, os outros candidatos Vpb1 não apresentaram uma variação tão considerável em tamanho de sequência. Segundo Gupta et al (2021) o ponto isoelétrico das toxinas Vip1/Vpb1 varia de 4,93 até 6,06. O ponto isoelétrico dos candidatos Vpb1 variou de 5,03 até 5,68, estando dentro do padrão conhecido. As proteínas candidatas a serem do tipo Vip2/Vpa2 são WP_000255144.1, WP_000253776.1, WP_086405651.1, WP_223697903.1, WP_044798436.1 e WP_044798434.1. Com exceção de WP_044798434.1, o peso molecular de todas as candidatas Vpa2 apresentaram um valor muito próximo ao padrão estabelecido para protoxinas Vpa2, variando de 49,2861 até 51,2524 kDa, como também, o tamanho da sequência de aminoácidos foi muito próximo ao padrão para Vpa2. Gupta et al (2021) perceberam que

toxinas Vpa2 costumam ter uma média maior de ponto isoelétrico comparada à média de pI das toxinas Vpb1. Com base nisso, é perceptível pelos dados da tabela 3 que a média de pI das candidatas Vpa2 (8,61) é maior que a média de pI das candidatas Vpb1 (5,53). O peso molecular e o número de aminoácidos de WP_001066376.1 são, respectivamente, 87,79217 kDa e 786 aa, valores próximos ao padrão de 89 kDa e 788 aa estabelecido para protoxinas Vip3.

Dados sobre proteínas do tipo Mpp no Bacterial Pesticidal Protein Resource Center (BPPRC) indicam um peso molecular médio aproximado de 35 kDa, tendo variação de toxinas com 30 kDa até 40 kDa e sequência com tamanho médio de 300 aminoácidos. O ponto isoelétrico das toxinas do tipo Mpp possuem uma alta variação, indo de 4,69 até 9,04. As 3 proteínas candidatas a serem do tipo Mpp (WP_003308447.1, WP_086405553.1 e WP_086405659.1) apresentaram, respectivamente, um peso molecular de 31,23702, 40,78897 e 35,92650 kDa, tamanho de sequência de 282, 364 e 323 aa e pI de 7,76, 8,90 e 9,06. Os dados das 3 proteínas candidatas estão dentro da média das toxinas Mpp já conhecidas.

3.3 Domínios conservados

Os domínios conservados representativos das sequências candidatas foram obtidos, juntamente com o código de acesso e o intervalo de cada domínio dentro da sequência (Figura 3). Os alinhamentos de todos os domínios obtiveram um E-value menor que 1e-05, indicando alinhamentos significativos.

Crickmore et al (2021), em vosso artigo sobre nomenclatura de proteínas pesticidas baseada em estrutura, reuniram os domínios conservados característicos de cada classe de toxina presente em *B. thuringiensis*. Os domínios pfam03945, pfam00555 e cd04085 costumam estar presentes em proteínas originalmente isoladas de cristais de Bt em cuja forma ativa normalmente consiste em três domínios, ou seja, domínios característicos de toxinas da classe Cry. Esses três domínios foram encontrados em WP_000453539.1, WP_000405159.1, WP_001087541.1, WP_001087511.1 e WP_277680490.1. Além disso, domínios como pfam18449 e pfam17997, comuns em endotoxinas, também estiveram presentes. Em contrapartida, WP_042972902.1 apresentou apenas o domínio pfam03945, sem manifestar os outros domínios característicos da classe Cry.

Os domínios pfam07691, pfam03495, pfam17475 e pfam17476 são característicos de proteínas relacionadas ao componente/função de ligação em toxinas binárias, ou seja, Vpb1 e Vpb4. Foi possível encontrar esses quatro domínios em WP_000727639.1, WP_000728165.1, WP_000727638.1, WP_080893310.1 e WP_086405652.1. WP_000811551.1 também

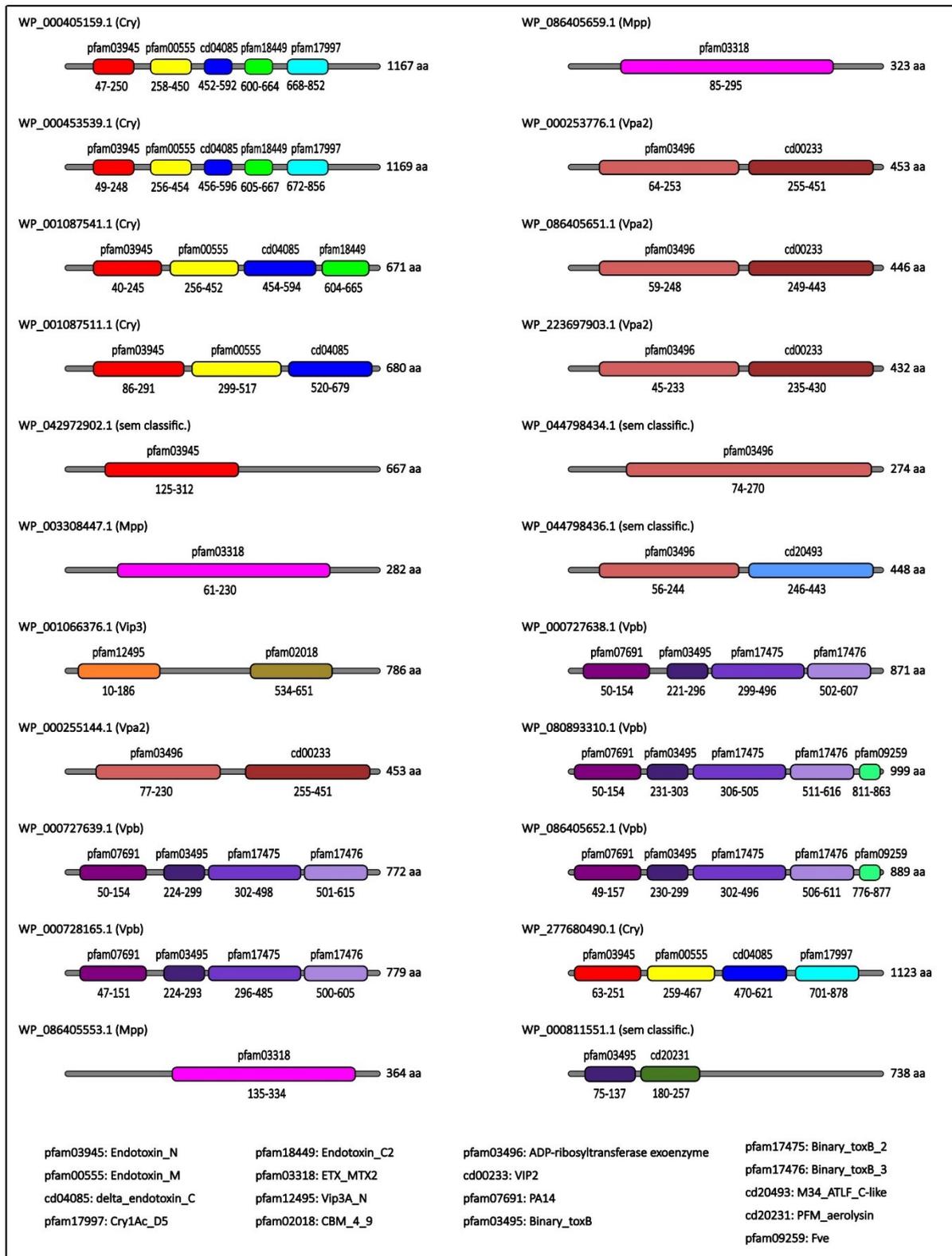
apresentou pfam03495, mas sem manifestar os outros três domínios característicos da classe Vpb, entretanto, apresentou o domínio cd20231, característico de proteínas poro-formadoras.

O domínio cd00233 é característico de proteínas que atuam como componente ativo da ADP-ribosiltransferase de toxinas binárias, ou seja, Vpa2. Esse domínio foi encontrado em WP_000255144.1, WP_000253776.1, WP_086405651.1 e WP_223697903.1. Juntamente com o domínio cd00233, essas 4 proteínas apresentaram o domínio pfam03496, característico de ADP-ribosiltransferases, que são presentes em toxinas do tipo Vpa2. WP_044798434.1 e WP_044798436.1 também apresentaram o domínio pfam03496, entretanto, não apresentaram o domínio cd00233, que é o característico de Vpa2. Além disso, foi encontrado em WP_044798436.1 o domínio cd20493, que é característico da família de peptidase M34 (também conhecida como família do fator letal do antraz). Segundo Chakroun et al (2016), toxinas vegetativas inseticidas de bactérias entomopatogênicas como a *B. thuringiensis*, apresentam identidade de sequência moderada com componentes de toxinas de *C. botulinum*, *C. perfringens* e *C. spiroforme*, antígeno protetor de *B. anthracis* e toxina B de *C. difficile*, o que pode explicar a detecção do domínio cd20493 em WP_044798436.1.

Os domínios pfam12495 e pfam02018 são característicos de proteínas multi-domínio do tipo Vip3. WP_001066376.1 foi a única sequência a apresentar esses dois domínios.

O domínio pfam03318 é típico de proteínas pesticidas beta formadoras de poros da família ETX/Mtx2, ou seja, característico da classe Mpp. Esse domínio foi encontrado em WP_003308447.1, WP_086405553.1 e WP_086405659.1.

Figura 3. Domínios conservados encontrados nas proteínas inseticidas identificadas.



Fonte: Autor

3.4 Estrutura tridimensional

Na figura 4, são apresentados modelos tridimensionais das proteínas candidatas, simulados a partir do SWISS-MODEL, que também forneceu informações sobre o estado oligomérico da proteína, presença de ligantes, quantidade e tipo de conformações presentes e identidade estrutural. Além disso, o SWISS-MODEL fornece o GMQE (Global Model Quality Estimation) de cada modelo, que é uma estimativa de qualidade que combina os atributos de alinhamento de modelo-alvo e métodos de busca de modelo. A pontuação GMQE resultante é expressa como um número entre 0 e 1, refletindo a precisão esperada do modelo construído usando esse alinhamento e a cobertura do alvo.

A estrutura tridimensional de nove toxinas Cry (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb1, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry8Ea1 e Cry5B) foi determinada por cristalografia de raios X. O espectro inseticida dessas toxinas inclui espécies de insetos e nematoides nas ordens de Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Strongylida e Ascaridata. Apesar de suas diferentes especificidades, essas toxinas compartilham uma estrutura consistindo em três domínios. O domínio I costuma ser um feixe de hélices composto por 5 a 7 α -hélices. O domínio II consiste em três β -folhas antiparalelas com topologias semelhantes compactadas em torno de um núcleo hidrofóbico. Já O domínio III é um β -sanduíche que compreende duas β -folhas e contém um módulo de ligação à galactose (JING et al., 2019).

Dentre as proteínas candidatas a serem do tipo Cry, WP_000405159.1 (GMQE: 0.84), WP_000453539.1 (GMQE: 0.71), WP_001087541.1 (GMQE: 0.87), WP_001087511.1 (GMQE: 0.73) e WP_277680490.1 (GMQE: 0.88) apresentaram alta identidade estrutural com toxinas da classe, manifestando o padrão de conformações α -hélices e β -folhas que compõem os três domínios característicos da Cry. Em contrapartida, WP_042972902.1 (GMQE: 0.48) apresentou baixa identidade estrutural (28.76% com a estrutura de Cry11Aa) comparada às outras candidatas Cry. Além disso, WP_000453539.1 foi representada como um homo-dímero, contendo quatro ligantes, sendo dois íons de cálcio (cada um ligado aos resíduos Asp-970, Ser-994 e Asp-1160 de cada uma das duas cadeias) e dois íons de potássio (cada um ligado aos resíduos Glu-728, Ser-729 e Glu-731 de cada uma das duas cadeias). Já o restante dos candidatos Cry foram representados como monômero sem ligantes.

Análises de sequência revelaram que proteínas da classe Vpa/Vip2 possuem dois domínios distintos; domínio N-terminal (60 a 265 aminoácidos) e domínio C-terminal (266 a 461 aminoácidos) que é um domínio de ligação a NAD. Embora ambos os domínios do Vpa2 compartilhem pouca homologia de sequência, a análise da estrutura cristalográfica revela que

eles têm homologia estrutural entre si. O núcleo de cada domínio é criado principalmente pelo empacotamento vertical de um misto de 5 β -folhas com um complexo de 3 β -folhas antiparalelas. Quatro α -hélices consecutivas flanqueiam o complexo de 3 β -folhas, enquanto uma α -hélice adicional flanqueia o misto de 5 β -folhas. Os peptídeos sinal N-terminais são clivados durante a secreção e as proteínas maduras são liberadas (GUPTA; KUMAR; KAUR, 2021).

Dentre as candidatas a serem do tipo Vpa2, WP_000255144.1 (GMQE: 0.91), WP_000253776.1 (GMQE: 0.91), WP_086405651.1 (GMQE: 0,90), e WP_223697903.1 (GMQE: 0,92) apresentaram alta identidade estrutural com as toxinas dessa classe, atendendo aos parâmetros apresentados na literatura. WP_044798436.1 (GMQE: 0,87) apresentou alinhamento considerável com várias estruturas do fator letal da toxina do antraz. Já WP_044798434.1 apresentou baixa identidade estrutural com toxinas Vpa2, tendo um alinhamento geral com várias ADP-ribosiltransferases como a Certhrax de *B. cereus*, enterotoxina CPILÉ-a de *C. perfringens* etc. Além disso, todas as candidatas foram representadas como monômero sem ligantes.

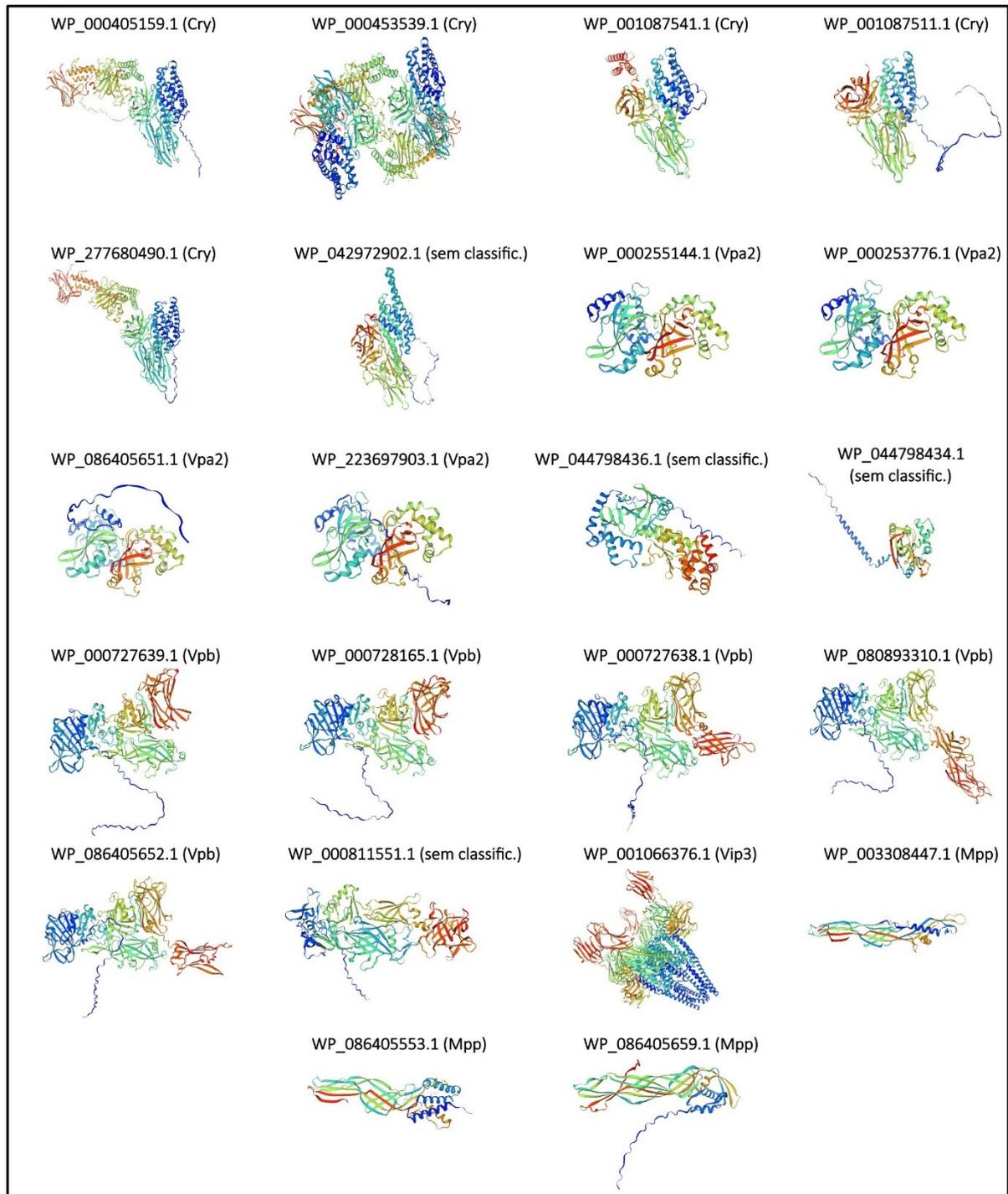
Sabe-se que Vpb1 e Vpa2 operam como uma toxina binária. Vip1 atua como uma toxina B (domínio de ligação) responsável pela translocação de Vip2 dentro das células do intestino médio dos insetos. Dentre as candidatas para a classe Vpb1, WP_000727639.1 (GMQE: 0.85), WP_000728165.1 (GMQE: 0.86), WP_000727638.1 (GMQE: 0.87), WP_080893310.1 (GMQE: 0.85) e WP_086405652.1 (GMQE: 0.84) apresentaram alta identidade estrutural com as toxinas da classe. Em contrapartida, WP_000811551.1 não apresentou correspondência estrutural com Vpb1 e uma porção de seu modelo estrutural teve alinhamento geral, principalmente, com as estruturas do componente de ligação de ADP-ribosiltransferases e antígeno protetor da toxina do antraz. Todas as candidatas Vpb1 foram representadas como monômero sem ligantes.

Em solução, proteínas da classe Vip3 (protoxina e forma ativa) costumam existir como um homotetrâmero, sendo que cada monômero apresenta 5 domínios. A estrutura secundária prevista para proteínas Vip3 mostrou que a região C-terminal era composta de β -folhas resistentes à protease e o restante da proteína era composta de α -hélices (GUPTA; KUMAR; KAUR, 2021). WP_001066376.1 (GMQE: 0.82) apresentou alta correspondência com toxinas da classe Vip3, manifestando alta identidade estrutural com as toxinas já conhecidas, 5 domínios, forma oligomérica de homotetrâmero, e estrutura secundária conforme literatura.

WP_003308447.1 (GMQE: 0.92), WP_086405553.1 (GMQE: 0.78) e WP_086405659.1 (GMQE: 0.83) apresentaram estruturas semelhantes às das toxinas da classe

Mpp. WP_003308447.1 teve maior proximidade estrutural com Mpp75Aa1, WP_086405553.1 com toxinas Sip (secreted insecticidal protein) e WP_086405659.1 com ETX (epsilon toxin). Na classificação atual, a nomenclatura Sip e ETX foi descartada, renomeando e classificando tais toxinas como Mpp (Crickmore et al., 2021).

Figura 4. Modelo tridimensional das proteínas candidatas



Fonte: Autor

3.5 Classificação

Com base no sistema de nomenclatura implementado por Crickmore e fundamentado em similaridade de sequência, como também, por meio de análises comparativas de propriedades físico-químicas, domínios conservados e estrutura proteica, foi considerada uma possível classificação para as proteínas obtidas nas cepas selecionadas.

O sistema de nomenclatura de Crickmore, baseado em similaridade de sequência, foi aplicado nas proteínas que atenderam aos parâmetros das análises comparativas, obtendo-se então as seguintes classificações na tabela 4.

WP_042972902.1 apresentou apenas um dos três domínios característicos de toxinas Cry (pfam03945), como também, demonstrou baixa correspondência estrutural comparado aos outros candidatos Cry, sendo descartada a possibilidade de ser uma Cry. WP_044798436.1 não apresentou o domínio cd00233, característico de toxinas Vpa2, mas sim o domínio cd20493, que é comum em toxinas do antraz. Segundo Chakroun et al (2016), toxinas Vip de *B. thuringiensis* podem compartilhar identidade de sequência com componentes de toxinas de *B. anthracis*, entretanto a possibilidade de WP_044798436.1 ser Vpa2 é descartada devido à ausência do domínio cd00233 e por apresentar alinhamento considerável com várias estruturas do fator letal da toxina do antraz. A possibilidade de WP_044798434.1 ser Vpa2 também foi descartada, uma vez que seu peso molecular e número de aminoácidos não estão dentro do padrão para toxinas Vpa2, o domínio cd00233 não foi obtido e por baixa correspondência estrutural com toxinas da classe. A possibilidade de WP_000811551.1 ser uma Vpb foi descartada uma vez que esta proteína apresentou apenas um (pfam03495) dos quatro domínios característicos da classe e por não demonstrar correspondência estrutural com toxinas Vpb, mas sim com ADP-ribosiltransferases no geral.

Tabela 4. Classificação das proteínas inseticidas ausentes no banco de dados Bacterial Pesticidal Protein Resource Center (BPPRC).

Número de acesso	Cepa	Classificação
WP_000405159.1	IBL 200	Cry1Da3
WP_001066376.1	IBL 200	Vip3Af1
WP_000727639.1	IBL 200	Vpb1Ca1
WP_001087541.1	IBL 200	Cry1Nb1
WP_000453539.1	IBL 200	Cry1Hb1
WP_000255144.1	IBL 200	Vpa2Ac1
WP_000728165.1	IBL 200	Vpb1B
WP_001087511.1	IBL 200	Cry1
WP_003308447.1	IBL 200	Mpp83
WP_000727638.1	NB-176	Vpb1Ae1
WP_277680490.1	HD521	Cry7Ga1
WP_000253776.1	NB-176	Vpa2Aa
WP_086405553.1	NB-176	Mpp5Ac
WP_086405651.1	NB-176	Vpa2Ba
WP_223697903.1	NB-176	Vpa2B
WP_086405659.1	NB-176	Mpp3
WP_080893310.1	NB-176	Vpb1A
WP_086405652.1	NB-176	Vpb1A

4. CONCLUSÃO

Nas 4 cepas, foram identificadas toxinas inseticidas já conhecidas, sendo Cry1Ab18, Cry1Ja2, Cry1Bb1, Cry1Id1 e Cry2Ad1 na cepa IBL 200, Cry3Aa12 na cepa serovar tenebrionis NB-176, Cry7Da1 e Cry7Fb1 na cepa serovar indiana HD521 e Cry1Ab1 na cepa FDAARGOS 801. As toxinas que apresentaram mais de 95% de identidade com alguma toxina já conhecida, apresentam alta possibilidade de serem produtos alélicos do mesmo gene. Foram identificadas também 18 novas proteínas inseticidas nas cepas IBL 200, NB-176 e HD521, sendo 5 Crys, 1 Vip3, 4 Vpas, 5 Vpbs e 3 Mpps (Tabela 4). Para as proteínas com menos de 95% de identidade, são necessários bioensaios para dar continuidade na classificação e obter por completo até o quarto nível de classificação determinado por Crickmore. 4 proteínas não atenderam aos parâmetros das análises comparativas com toxinas já conhecidas e, provavelmente, não são proteínas com propriedades inseticidas.

Os resultados mostram a diversidade genômica de genes inseticidas em diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Dentre as cepas analisadas, duas delas apresentaram um considerável número de genes de toxinas inseticidas, as cepas IBL 200 com uma predominância de genes Cry e NB-176 com uma predominância de genes Vip, sendo assim cepas com grande potencial inseticida, apresentando possibilidades de aplicação como agentes de biocontrole. Como também, tais resultados aceleram e facilitam o processo de seleção de cepas e toxinas ideias para criação de novos bioprodutos como organismos geneticamente modificados.

REFERÊNCIAS

- ALIPPI, A. M. et al. Identification, phylogenetic analysis, and genome mining of the tetracycline-resistant *Bacillus thuringiensis* strain m401 reveal its potential for biotechnological and biocontrol applications. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 55, n. 4, p. 317–331, 1 out. 2023.
- ALVES, G. B. et al. Comparative genomic analysis and mosquito larvicidal activity of four *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis strains. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.
- BONATERRA, A. et al. Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. **MicroorganismsMDPI**, 1 set. 2022.
- BRAVO, A. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis*-endotoxin family proteins and their functional domains. **Journal of Bacteriology**. [s.l: s.n.].
- BURALLI, R. J. et al. Occupational exposure to pesticides and health symptoms among family farmers in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 54, p. 133, [s.d.].
- CHAKROUN, M. et al. Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 2, p. 329–350, jun. 2016.
- CRICKMORE, N. et al. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 186, 1 nov. 2021.
- GUPTA, M.; KUMAR, H.; KAUR, S. Vegetative Insecticidal Protein (Vip): A Potential Contender From *Bacillus thuringiensis* for Efficient Management of Various Detrimental Agricultural Pests. **Frontiers in Microbiology**Frontiers Media S.A., 13 maio 2021.
- HE, D. C. et al. Biological control of plant diseases: An evolutionary and eco-economic consideration. **PathogensMDPI**, 1 out. 2021.
- JING, X. et al. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry7Ca1 toxin active against *Locusta migratoria manilensis*. **Protein Science**, v. 28, n. 3, p. 609–619, 1 mar. 2019.
- LAHLALI, R. et al. Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. **MicroorganismsMDPI**, 1 mar. 2022.

LIU, P. et al. Computational identification and evolutionary analysis of toxins in Mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strain S2160-1. **3 Biotech**, v. 8, n. 7, 1 jul. 2018.

LOPES-FERREIRA, M. et al. Impact of Pesticides on Human Health in the Last Six Years in Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 6, p. 3198, 1 jan. 2022.

MARIA, J. et al. Monitoring residues of pesticides in food in Brazil: A multiscale analysis of the main contaminants, dietary cancer risk estimative and mechanisms associated. **Frontiers in Public Health**, v. 11, 22 fev. 2023.

ONOFRE, J. et al. The cyt1aa toxin from *Bacillus thuringiensis* inserts into target membranes via different mechanisms in insects, red blood cells, and lipid liposomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 28, p. 9606–9617, 10 jul. 2020

PALMA, L. et al. *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. **ToxinsMDPI**, 2014.

QUEIROZ, P. R. et al. Sistema de Informação de Agravos de Notificação e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, 2019.

RANG, J. et al. Comparative analysis of genomics and proteomics in *Bacillus thuringiensis* 4.0718. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 17 mar. 2015.

SANTOS, E. N. et al. *Bacillus thuringiensis*: From biopesticides to anticancer agents. **BiochimieElsevier B.V.** 1 jan. 2022.

SAUKA, D. H. et al. *Bacillus thuringiensis* Bt_UNVM-84, a Novel Strain Showing Insecticidal Activity against *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). **Toxins**, v. 16, n. 1, 1 jan. 2024.

SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**. [s.l.: s.n.].

SILVERIO A. S.; CUNHA, M. C.; GAMA, M. V. The health Care Management of farmers who use pesticides in Northeast Brazil: use of pesticides and the Care Management. **BMC Health Services Research**, v. 23, n. 1, 21 jul. 2023.

SIMÓN, O. et al. Baculovirus Expression and Functional Analysis of Vpa2 Proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Toxins**, v. 12, n. 9, 1 set. 2020.

SYED, T. et al. Current insights on vegetative insecticidal proteins (Vip) as next generation pest killers. **ToxinsMDPI**, 1 ago. 2020.