

**JOÃO VITOR AGUILAR DE OLIVEIRA**

**DESENHO RACIONAL DE PEPTÍDEOS INIBIDORES COMO BIOPESTICIDAS  
PARA *Anticarsia gemmatalis* E *Spodoptera frugiperda***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título *Magister Scientiae*.

Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira

Coorientadores: Neilier Rodrigues da Silva-Júnior  
Yaremis Beatriz Meriño-Cabrera

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

O48d  
2023

Oliveira, João Vitor Aguilar de, 1998-  
Desenho racional de peptídeos inibidores como  
biopesticidas para *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera  
frugiperda* / João Vitor Aguilar de Oliveira. – Viçosa, MG, 2023.  
1 dissertação eletrônica (31 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2023.

Referências bibliográficas: f. 23-29.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.685>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Peptídeos. 2. Inibidores. 3. Bioinformática. 4. Relação  
inseto-planta. 5. Inseticidas biológicos. I. Oliveira, Maria Goreti  
de Almeida, 1956-. II. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 572.65

**JOÃO VITOR AGUILAR DE OLIVEIRA**

**DESENHO RACIONAL DE PEPTÍDEOS INIBIDORES COMO BIOPESTICIDAS  
PARA *Anticarsia gemmatalis* E *Spodoptera frugiperda***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2023.

Assentimento:

---

João Vitor Aguilar de Oliveira  
Autor

---

Maria Goreti de Almeida Oliveira  
Orientadora

## **AGRADECIMENTOS**

À vida, família e amigos que me trouxeram aqui e me apoiaram no caminho.

À Universidade Federal de Viçosa e o Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada pela oportunidade de realizar o curso e obter o título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao CNPq pelo apoio financeiro do projeto.

Aos colegas de laboratório e professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela ajuda e apoio profissional no desenvolvimento do projeto e realização dos experimentos.

Aos Laboratórios de Enzimologia e Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do BIOAGRO-Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária e do DBB-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, à Professora Maria Goreti de Almeida Oliveira e os coorientadores Neilier Rodrigues da Silva-Júnior e Yaremis Beatriz Meriño-Cabrera, pela orientação e apoio.

## RESUMO

OLIVEIRA, J. V. A., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Desenho racional de peptídeos inibidores como biopesticidas para *anticarsia gemmatalis* e *spodoptera frugiperda***. Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Neilier Rodrigues da Silva-Júnior e Yaremis Beatriz Meriño-Cabrera.

A soja (*Glicine max* L.) é uma das espécies hortícolas mais importantes do mundo e um dos principais produtos agrícolas de exportação do Brasil. A produção de soja é prejudicada pela predação por artrópodes-praga como a *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*, pragas normalmente controladas com o uso de pesticidas químicos. Esses pesticidas muitas vezes são danosos ao solo, corpos hídricos e biodiversidade da área ao redor da aplicação podendo causar danos sérios à saúde e ao ambiente e, portanto, estão sendo exploradas alternativas menos nocivas de controle de pragas. O uso de peptídeos com ação inseticida é uma das alternativas propostas e a pro-região de zimogênio tem potencial para a criação de inibidores eficazes e específicos. Tripsinas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* foram modeladas e validadas junto de tripsina de *Bos taurus* e *Homo sapiens* para predição de interação com inibidores conhecidos e patenteados. A constante de inibição ( $K_i$ ) calculada foi comparada com o  $K_i$  experimental registrado na literatura. A partir disso peptídeos de tamanhos variando de 5 a 10 aminoácidos foram desenhados a partir da pro-região de zimogênio de *A. gemmatalis* e submetidos às análises de docking para identificação de possíveis inibidores eficazes para controle de insetos-herbívoros. Os peptídeos apresentaram energia de ligação e  $K_i$  comparáveis a outros inibidores conhecidos e mostraram preferência por se ligar na região de sítio ativo e sítio de ligação das enzimas. Com isso, conclui-se que são possíveis inibidores com baixa toxicidade para o meio ambiente e com grande potencial para uso comercial na agricultura.

Palavras-chave: Inibidores. Bioinformática. Interação inseto-planta.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, J. V. A., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2023. **Rational design of inhibitors obtained from zymogen sequences to be used in biopesticide formulations of *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisers: Neilier Rodrigues da Silva-Júnior and Yaremis Beatriz Meriño-Cabrera.

Soybean (*Glycine max* L.) is one of the main crops and exportation products grown in Brazil. Soybean production is hampered by infestation with plagues such as *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*, insects commonly controlled by the use of chemical pesticides. These pesticides are often harmful to close by soil, bodies of water and biodiversity, possibly damaging the environment and population. Therefore, less harmful alternatives in pest control are being explored. The use of peptides with pesticide activity is one of the proposed alternatives and the pro-region of zymogen has potential for the creation of effective and specific inhibitors. We obtained trypsin sequences from *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda* and modelled and validated along with trypsin from *Bos taurus* and *Homo sapiens* for interaction prediction with known and patented inhibitors. We calculated inhibition constant ( $K_i$ ) and compared to experimental  $K_i$  registered in literature. From there, we designed peptides with sizes varying from 5 to 10 aminoacids using *A. gemmatalis* zymogen pro-region as template and submitted them to molecular docking analyses for identification of possible inhibitors to control infesting insects. The peptides have shown binding energy and  $K_i$  comparable to existing inhibitors and preference to binding with the active sites and binding sites of the enzyme. Thus, we conclude that the designed peptides are possible inhibitors with low toxicity to the environment and with great potential for use in agriculture.

Keywords: Inhibitors. Bioinformatics. Plant-insect interaction.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1. A SOJA COMO PRODUTO DE EXPORTAÇÃO.....	8
2.2. PRAGAS DA SOJA.....	8
2.3. CONTROLE DE PRAGAS E SEUS DANOS.....	9
2.4. EXEMPLOS DE BIOPESTICIDAS.....	10
2.5. BIOINFORMÁTICA E SIMULAÇÃO DE INTERAÇÕES.....	10
3. JUSTIFICATIVA.....	11
4. OBJETIVOS GERAIS.....	13
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
6. METODOLOGIA.....	13
6.1. ANÁLISE DE SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS.....	13
6.2. DESENHO DE PEPTÍDEO.....	13
6.3. MODELAGEM E VALIDAÇÃO DE ENZIMAS.....	13
6.4. DOCKING MOLECULAR.....	14
7. RESULTADOS.....	14
7.1. ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS.....	14
7.2. MODELAGEM E VALIDAÇÃO.....	15
7.3. DOCKING MOLECULAR.....	17
7.4. DESIGN DE PEPTÍDEOS.....	18
8. DISCUSSÃO.....	20
9. CONCLUSÃO.....	22
10. REFERENCIAS.....	24
11. APÊNDICES.....	30

## 1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L.) é uma das espécies hortícolas mais importantes do mundo, sendo produzida mundialmente e tendo o Brasil como um dos maiores produtores e exportadores da planta (FAOSTAT, 2020). No Brasil a exportação da soja em todas as suas formas gerou um valor de US\$ 60.927 bilhões, sendo os maiores produtores os estados Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás com mais de 50% da produção total do país (Embrapa, 2023). A soja é utilizada na alimentação de humanos, sendo uma boa fonte de proteína para pessoas alérgicas a leite e é usada na alimentação animal como fonte de lisina e gordura (Singh *et al*, 2008; Willis, 2003). O ataque por insetos é um dos principais fatores que podem prejudicar a qualidade dos grãos produzidos (Corrêa-Ferreira & de Azevedo, 2002; Turnipseed & Kogan, 1976).

Os principais artrópodes-herbívoros que atacam a soja são percevejos e lagartas. Espécies como o percevejo-verde-da-soja (*Nezara viridula*), o percevejo-marrom-da-soja (*Euchistus eros*), a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) e a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) causam danos às folhas e aos grãos resultando em perdas econômicas de qualidade e quantidade colhida (Corrêa-Ferreira & de Azevedo, 2002; Cruz *et al*, 1999; Ongaratto *et al*, 2021). O controle dessas pragas é feito principalmente por meio do uso de pesticidas químicos. O uso desses pesticidas pode ter efeito nocivo no solo, na água, na biodiversidade do ambiente onde ele é usado e até em humanos aos quais os produtos são destinados (Mahmood *et al*, 2016).

O uso de peptídeos tem sido considerado como uma alternativa menos nociva no controle de pragas em plantações. Peptídeos pouco tóxicos com propriedades antimicrobianas e inibidores espécie-específicos para enzimas essenciais de artrópodes-praga se provam uma forma eficaz de controle com impacto negativo reduzido no ambiente (Montesinos & Bardaji, 2008; Whetstone & Hammock, 2007). O grupo de enzimas escolhidos para inibição em insetos, são costumeiramente enzimas digestivas, cuja inatividade e reposição gera baixa absorção e esgotamento de nutrientes (Hemmati *et al*, 2021a). Os peptídeos em questão podem ser obtidos de outros organismos ou desenhados para inibição específica de cada espécie (Gressel, 2022; Jitonmon *et al*, 2012).

Técnicas modernas de bioinformática permitem o desenho de inibidores altamente específicos para enzimas alvo usando como base desde outros inibidores até a própria enzima-alvo. Exemplo disso são os inibidores criados por Jitonmon *et al* (2012) e Hemmati *et al* (2021a), para controle de *Plutella xylostella* e *Spodoptera frugiperda* respectivamente. Os inibidores em questão, ambos produzidos a partir da pro-região de tripsinas de seus respectivos

organismos modelo, se mostraram promissores na inibição espécie-específica de enzimas digestivas. A pro-região de enzimas digestivas é um possível modelo para produção de inibidores. Ela é localizada na região N-terminal do zimogênio, atua na inibição da atividade enzimática e precisa ser clivada para ativação da enzima madura (Baker *et al*, 1992). Este projeto propõe a criação de um inibidor peptídico a partir da pro-região de tripsinas digestivas de *Anticarsia gemmatalis* e avaliar por predição bioinformática a sua eficácia.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. A SOJA COMO PRODUTO DE EXPORTAÇÃO**

A soja (*Glicine max* L.) é uma das espécies hortícolas mais importantes do mundo. O grão é uma grande fonte de proteína contendo todos os aminoácidos essenciais para humanos além de prover lipídeos, carboidratos, saponinas e isoflavonas que ajudam na prevenção do câncer. A presença de soja na dieta ajuda no tratamento de doença renal crônica, doença cardiovascular, ajuda a prevenir a diabetes tipo 2 e o câncer (O'keefe *et al*, 2015) e também é utilizada na alimentação de animais como suplemento proteico (Singh *et al*, 2008). Esta hortícola é amplamente cultivada no mundo com os quatro maiores produtores sendo Brasil, Estados Unidos, China e Argentina. Os Estados Unidos foram os maiores produtores de soja desde 1950, porém em 2018 a produção de soja no Brasil em toneladas ultrapassou a dos EUA (FAOSTAT, 2020; Pagano & Miransari, 2016).

No Brasil a produção de soja é concentrada em quatro estados. O levantamento de junho de 2023 mostra que o Brasil produziu 154.566,3 milhões de toneladas de soja. Mais de 50% dessa produção vem dos estados Mato Grosso (29,5%), Paraná (14,4%), Rio Grande do Sul (8,4%) e Goiás (11,4%). No ano de 2022 a exportação de soja equivaleu um total de US\$ 60.927 bilhões (Embrapa, 2023). Em 2022 a exportação de soja representou 27% do PIB do agronegócio nacional e gerou 2,05 milhões de empregos mostrando um grande aumento dos últimos anos (CEPEA, 2023). Um dos fatores que prejudica o cultivo da soja é o ataque de artrópodes-praga. A presença de insetos como a lagarta-da-soja e a lagarta-do-cartucho reduzem a qualidade e quantidade de grãos colhidos resultando em perdas econômicas (Cruz *et al*, 1999; Ongaratto *et al*, 2021).

### **2.2. PRAGAS DA SOJA**

A lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae)) é a principal espécie causadora de desfolha em cultivos de soja, podendo causar até 100% de perda das folhas (Meriño-Cabrera *et al*, 2020). É um inseto mastigador que injeta toxinas na planta enquanto se alimenta das folhas, pecíolos e haste da planta. O desfolhamento que lagarta causa compromete o enchimento das vagens da soja devido à redução da área fotossintética (Moscardi & Souza, 2002). Os danos econômicos fazem com que o controle desse inseto seja essencial para as lavouras (Silva, Costa & Boss, 2003).

A lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)) é outra espécie de artrópode-praga mastigador que causa grandes danos a planta. As lagartas de *S. frugiperda* começam a consumir a planta assim que eclodem de seus ovos, causando desfolha e podendo até destruí completamente pequenas plantas em instares avançados (Cruz *et al*, 1999). Esse inseto está presente no Brasil, Argentina, norte da América do Sul, a totalidade da América central, México e sul dos EUA, causando danos a plantações de todos os tipos como tomate, batatas, cana-de-açúcar, arroz e milho (Andrews, 1980). A principal forma de controle da *S. frugiperda* são os pesticidas químicos e seu uso indevido pode gerar danos ao meio ambiente (Paredes-Sánchez *et al*, 2021).

### **2.3. CONTROLE DAS PRAGAS DA SOJA E SEUS DANOS**

A principal forma de controle dos artrópodes-praga no Brasil envolve o uso de pesticidas químicos (Silva *et al*, 2014; Paredes-Sánchez *et al*, 2021; Guedes *et al*, 2012). O uso de pesticidas químicos gera problemas ambientais e para a saúde humana. As substâncias podem ser absorvidas pelas plantas, contaminar a água, ser absorvida por contato e se acumular em tecido lipídico. Esse acúmulo gera sintomas dermatológicos, gastrointestinais, respiratórios, reprodutivos, endócrinos, neurológicos e carcinogênicos (Rani *et al*, 2021; Nicolopoulou-Stamati *et al*, 2016). O uso indevido destes pesticidas pode ainda selecionar indivíduos resistentes nos grupos de insetos que tentam exterminar, tornando as substâncias menos eficazes (Hawkins *et al*, 2019). Atualmente um número considerável de pesticidas comprovadamente danosos à saúde humana são permitidos e usados largamente em território brasileiro (da Silva *et al*, 2020).

Os danos causados pelos pesticidas à saúde humana e meio ambiente geram a necessidade de alternativas. Biopesticidas são produtos naturais de organismos vivos diversos que limitam ou reduzem populações de praga. São mais específicos que os pesticidas químicos reduzindo os danos causados a outros organismos como mamíferos e pássaros (Samada & Tambunan,

2020). Podem ser desde produtos naturais extraídos diretamente, produtos sintéticos derivados de compostos naturais até organismos de biocontrole (Seiber *et al*, 2014).

## 2.4. EXEMPLOS DE BIOPESTICIDAS

Peptídeos com ação inseticida são exemplos de biopesticidas. A especificidade dos peptídeos permite com que eles ajam de forma eficaz sem causar danos colaterais, como um peptídeo extraído de veneno da aranha *Hadronyche versuta* fusionado a um carreador que tem ação inseticida contra as ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Hemiptera mas não causa dano a abelhas polinizadoras (Nakasu *et al*, 2014; Sukiran *et al*, 2021). Outros peptídeos têm ação bacteriolítica, tratando fitopatologias de forma mais eficaz, ou tem meios de entrega eficientes. Esses peptídeos podem ser desenhados *de novo*, de forma a conseguir o melhor biopesticida com o uso de técnicas bioinformáticas e bancos de dados (Badosa *et al*, 2022; Hughes, Dowd & Johnson, 2012).

Outros exemplos incluem Huang *et al* (2021) que identificou e testou um peptídeo capaz de conter infecções de huanglongbing e induzir imunidade inata em árvores do gênero Citrus. Sukiran *et al* (2022), através da fusão de um peptídeo recombinante de veneno de aranha com uma lectina da planta *Galanthus nivalis* melhorou a ação inseticida do peptídeo contra afídeos sem prejudicar a estabilidade termo-química e a resistência a proteólise que permite que o produto seja aplicado na forma de um spray foliar.

Peptídeos inibidores específicos já foram obtidos usando fragmentos reguladores específicos dos organismos alvo (Jintonmon *et al*, 2012; Hemmati *et al*, 2021a; Hemmati *et al*, 2021b). A pro-região do zimogênio é a região responsável pela inibição da atividade trípica e precisa ser clivada para a ativação da tripsina. Essa inibição permite que a atividade proteolítica esteja localizada e bem controlada, impedindo eventos celulares indesejados (Lazure, 2002). Dada a função fisiológica de inibição, a pro-região do zimogênio se tornou alvo de estudos para construção de inibidores específicos para o controle de pragas (Taylor & Lee, 1997).

Fruto desses estudos são os experimentos de Jintonmon *et al* (2012) e Hemmati *et al* (2021a; 2021b) que foram capazes de gerar peptídeos inibidores baseados em pro-região de tripsina de diferentes artrópodes-praga usando técnicas de bioinformática baseadas em predição de estrutura e ligação entre enzimas e possíveis inibidores. Os peptídeos gerados apresentaram bons parâmetros e fortes evidências de inibição indicando que seriam bons candidatos a uso na agricultura apesar de nenhum dos trabalhos ter realizado confirmação *in vitro* ou *in vivo* da eficácia dos peptídeos.

## 2.5. BIOINFORMÁTICA E A SIMULAÇÃO DE INTERAÇÕES

A bioinformática é um conjunto de ferramentas relativamente novos e em constante desenvolvimento que auxiliam a pesquisa biológica ao tratar, de maneira eficaz, uma grande quantidade de dados (Li, Y. *et al*, 2019). Vários estudos em proteínas utilizam da bioinformática para realizar ou simular diversos processos que seriam custosos e demorados como auxiliar na determinação de parâmetros para experimentos em bancada (Kirkwood *et al*, 2015) ou prever estruturas complexas para escolha de uma molécula de interesse acadêmico ou econômico (Murumkar *et al*, 2023).

O docking molecular é uma técnica de predição e simulação de uma interação entre duas ou mais moléculas que prevê o tipo, posição e os resíduos que interagem entre as moléculas, assim como a afinidade da ligação (Fan, Fu & Zhang, 2019). O docking molecular tem sido muito utilizado no desenvolvimento de medicamentos com alvos específicos, modificação de proteínas no intuito de melhorar desempenho e criação de moléculas de interesse econômico (de Almeida Barros *et al*, 2021; Torres *et al*, 2019; Li, K. *et al*, 2019).

No momento existem 3 tipos de docking molecular: o rígido, o rígido-flexível e o flexível (Fan, Fu & Zhang, 2019). O docking rígido apenas muda as posições da molécula e do ligante mantendo ambas as estruturas rígidas. Essa técnica exige baixo poder computacional e é aplicável principalmente para docking entre moléculas grandes. O docking rígido-flexível mantém a estrutura do receptor rígida mas deixa flexível a estrutura do ligante numa tentativa de conseguir um resultado um pouco mais próximo do real. Exige um pouco mais de poder computacional e é o tipo de docking mais utilizado. O docking flexível flexibiliza tanto receptor quanto ligante para obter um resultado muito mais preciso, porém exige grande poder computacional e demanda muito tempo de cálculo (Agarwal & Mehrotra, 2016).

O docking rígido-flexível é o mais utilizado para trabalho com grande número de moléculas pequenas. Design, descoberta e melhoramento de peptídeos são parte importante do desenvolvimento de medicamento e biocompostos (Kan, Guo & Wang, 2012). A necessidade de maior poder computacional torna o docking flexível mais lento, de forma que estudos com grande número de ligantes sejam preferíveis de se realizar com um método mais rápido (Larsson, Hess & Lindahl, 2011).

## 3. JUSTIFICATIVA

Os danos que pesticidas químicos causam ao solo, corpos hídricos e à biodiversidade fazem com que seja necessária a criação de alternativas menos nocivas ao meio ambiente (Mahmood *et al*, 2016; Samada & Tambunan, 2020). Peptídeos com ação inseticida são considerados uma alternativa viável por agirem de forma eficaz no combate aos herbívoros-praga em plantações (Sukiran *et al*, 2022). O desenho racional de peptídeos inibidores permite a criação de compostos com ação inseticida que sejam altamente específicos e não sejam danosos ao solo ou água próximos do local de aplicação (Jintonmon *et al*, 2012; Hemmati *et al*, 2021a) sendo os primeiros peptídeos desenhados usando a região aminoterminal do zimogênio.

#### **4. OBJETIVOS GERAIS**

Este projeto visa o desenho de um ou mais peptídeos com ação inibidora contra enzimas digestivas de *Anticarsia gemmatalis*, outras pragas comuns da soja e possíveis contatos através de análises bioinformática.

#### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Modelar por homologia enzimas tripsina ou tripsina-like das espécies *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* utilizando como base sequências do transcriptoma dessas espécies.
- Validar os modelos criados usando programas que verificam as propriedades físico-químicas e estruturais dos resíduos e ligações presentes.
- Predizer interações enzima-inibidor usando técnicas de docking molecular, e cálculos teóricos de propriedades cinéticas.
- Desenhar peptídeos de 5 a 10 aminoácidos baseados na pro-região de tripsina de *Anticarsia gemmatalis* e modela-los apropriadamente.
- Selecionar através de docking e cálculos teóricos os melhores inibidores para controle de herbívoro-praga.

#### **6. METODOLOGIA**

##### **6.1. ANÁLISE DE SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS**

Foram selecionadas e modeladas enzimas de espécies relevantes ao cultivo da soja. *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* são pragas comuns e *Bos taurus* e *Homo sapiens* são possíveis consumidores da soja que podem, porventura, vir a ter contato com os inibidores propostos. As sequências de aminoácidos de enzimas não cristalizadas utilizadas foram obtidas da plataforma NCBI (Sayers *et al*, 2019; Pruitt *et al*, 2012). Sequências de aminoácidos de enzimas já cristalizadas foram obtidas de suas respectivas páginas no Protein Data Bank (PDB) (Berman *et al*, 2000). As múltiplas sequências foram alinhadas usando o programa Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014).

## 6.2. DESENHO DO PEPTÍDEO

A pro-região de tripsina tem forte ação inibidora no seu papel de controle fisiológico da proteólise (Baker *et al*, 1992; Jintonmon *et al*, 2012). Peptídeos de tamanhos variando de 5 a 10 aminoácidos foram feitos a partir da pro-região de tripsina de *Anticarsia gemmatalis* e modelados por homologia usando o programa PEP-FOLD3 (Lamiabile *et al*, 2016). Fragmentos que não apresentaram um homólogo aceitável para modelagem foram descartados. Foram considerados inviáveis fragmentos cujo melhor pareamento tenha menos que 80% de identidade e/ou semelhança.

## 6.3. MODELAGEM E VALIDAÇÃO DAS ENZIMAS

As enzimas que não possuem estrutura cristalizada tiveram suas estruturas modeladas por homologia usando o programa Phyre2 (Kelley *et al*, 2015). As estruturas usadas como modelo para cada sequência foram anotadas para auxiliar na validação. Os modelos produzidos foram validados através de diversos programas de análise estrutural.

O programa ERRAT faz distribuições não-aleatórias de átomos no modelo e diferencia estatisticamente as distribuições corretas das aleatórias geradas por erros de modelagem. Para esse teste é tido como aceitável um score acima de 50, indicando um modelo de alta qualidade (Colovos & Yeates, 1993).

VERIFY-3D avalia a compatibilidade de um modelo com a sua sequência de aminoácidos. A estrutura tridimensional é julgada com base no ambiente de cada aminoácido e um score de cada resíduo por sua coordenada atômica (Eisenberg *et al*, 1997). O programa produz um valor de score para cada resíduo com base nessa análise. Modelos com ao menos 80% dos resíduos com score acima de 0,2 são considerados de alta qualidade.

O Procheck verifica a estereoquímica de uma estrutura proteica analisando a distribuição dos ângulos Psi e Phi no gráfico de Ramachandran. A presença de mais de 90% dos ângulos em regiões permitidas incida um bom modelo (Laskowski *et al*, 1993).

O programa WHATCHECK checa a estrutura submetida para erros gerais, variando desde simetria inconsistente até erros em dimensão celular e comprimento de ligação além de outros parâmetros (Hoofst *et al*, 1996). Vários resultados são dados nessa análise mas considera-se que se uma estrutura tem os resíduos bem empacotados com um score acima de -5 ela é considerada confiável. Além dos modelos preditos, a triagem de validação foi realizada nas estruturas cristalizadas utilizadas como molde para a modelagem. Se em determinado teste o modelo recebeu uma pontuação igual ou melhor que o molde, mesmo que abaixo dos parâmetros padrões dos testes, foi considerado um modelo de boa qualidade.

#### **6.4. DOCKING MOLECULAR**

As interações proteína-proteína e proteína-peptídeo das enzimas com os inibidores escolhidos foram avaliadas através de docking molecular com os programas PyRx e AutoDock Vina (Dallakayan & Olson, 2015; Trott & Olson, 2010). Foram utilizadas as condições padrão para os dockings sempre que possível. Foram selecionados modelos de docking onde o peptídeo esteja ligando no sítio ativo das enzimas ou próximo deles. Para a análise dos peptídeos desenhados, foi considerado que quanto menor o número de aminoácidos e a energia de ligação, melhor o peptídeo. O tamanho dos peptídeos é um fator importante por estar diretamente relacionado com o custo de produção do peptídeo. Além dos peptídeos desenhados foram feitos dockings com os peptídeos inibidores *gore1* e *gore2*, desenvolvidos pelo Laboratório de Enzimologia e Bioquímica Proteínas e Peptídeos da Universidade Federal de Viçosa, e os inibidores proteicos BPTI (Inibidor de Tripsina Pancreático Bovino) e SKTI (Inibidor Tipo-Kunitz da Soja), ambos amplamente comercializados, para comparação e na comprovação da relação entre as predições por docking e os resultados calculados. Os resultados dos dockings foram analisados no programa Pymol para identificação dos resíduos que estão interagindo entre as moléculas.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS**

Foi feito um alinhamento múltiplo de sequências com as sequências de tripsina dos organismos escolhidos (Fig. 1). Quando comparadas com a sequência de tripsina de *B. taurus* as tripsinas de *A. gemmatalis*, *S. frugiperda* e *H. sapiens* apresentaram 30,8%, 38,8% e 74,9% de identidade respectivamente. As sequências de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* apresentaram 30% de identidade entre si. As regiões referentes aos sítios de ligação S4 – S3' se apresentaram conservadas em todas as sequências assim como os resíduos essenciais para hidrólise triptica.



**Fig 1.** Alinhamento múltiplo de sequências. As sequências utilizadas são de *Homo sapiens* (PDB: 7QE9), *Bos taurus* (PDB:1TPA), *Anticarsia gemmatalis* (Sequência em processo de publicação, como transcrito) e *Spodoptera frugiperda* (Sequência em processo de publicação, como transcrito). Na imagem o início da enzima clivada e ativa é marcado pela seta (↓), os subsítios enzimáticos S4-S3' estão marcados com quadrados cobrindo a região do subsítio. Os resíduos ativos da estão marcados com uma estrela acima da linha das sequências. Alinhamento múltiplo feito usando a plataforma Clustal Omega nos parâmetros padrões.

## 7.2. MODELAGEM E VALIDAÇÃO

As estruturas tridimensionais das tripsinas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* foram feitas com base nas proteínas de maior identidade do banco de dados PDB, calculadas pelo próprio Phyre2. Para *A. gemmatalis* foi utilizada a estrutura com código PDB:4O03 e para *S. frugiperda* foi utilizada a estrutura com código PDB:1Z8G.

A qualidade das estruturas criadas foi verificada pelos programas ERRAT, VERIFY 3D, PROCHECK e WHATCHECK (Tabela 1). O gráfico de Ramachandran predito pelo PROCHECK mostra que, para a estrutura gerada de *A. gemmatalis*, 73,5% dos resíduos de aminoácido estão localizados nas regiões mais favoráveis e 21,4% estão localizados em regiões adicionais permitidas (Fig. 2a). Para a estrutura gerada de *S. frugiperda* 74,6% dos resíduos estão em regiões mais favoráveis e 21,4% estão localizadas em regiões adicionais permitidas (Fig. 2b). Na estrutura de *A. gemmatalis* nenhum resíduo estava em região não-permitida e na estrutura de *S. frugiperda* apenas 1 resíduo (0,5%) foi modelado em região não-permitida. A qualidade das interações não-covalentes das estruturas também foi checada usando a ferramenta ERRAT (Tabela 1). As estruturas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* apresentaram 58,49% e 53,81% de qualidade geral respectivamente. A ferramenta VERIFY-3D mostrou que ambas as estruturas criadas tinham acima de 80% dos resíduos com score acima de 0,2 (Tabela 1). Por fim, ambas as estruturas apresentaram um menor ou igual número de resíduos com scores abaixo de -5 quando comparados a seus moldes na ferramenta WHATCHECK (Tabela 1), com a enzima de *A. gemmatalis* apresentando 12 resíduos com empacotamento anormal, enquanto seu molde apresentou 32 e a enzima de *S. frugiperda* apresentando 13 resíduos com empacotamento anormal, o mesmo que seu molde. As tripsinas modeladas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* foram consideradas adequadas para prosseguir com os testes de docking molecular.

**Tabela 1.** Validação das estruturas geradas por Phyre2 e seus moldes. O programa ERRAT verifica a qualidade das interações não covalentes, sendo que acima de 50% dos resíduos com bom score classifica uma estrutura de qualidade. O programa VERIFY-3D avalia a estrutura tridimensional dos resíduos em relação ao ambiente em que eles se encontram, acusando boa qualidade se ao menos 80% dos resíduos apresentarem um score acima de 0,2. Procheck inspeciona a distribuição dos ângulos Phi/Psi no gráfico de Ramachandran, sendo que acima de 90% dos resíduos em regiões permitidas caracteriza estrutura de boa qualidade. WHATCHECK checa a estrutura por erros gerais como simetria inconsistente e empacotamento anormal de resíduos. A avaliação de qualidade do WHATCHECK foi feita por comparação com o molde.

	ERRAT (%)	VERIFY 3D (%)	PROCHECK	WHATCHECK
<i>A. gemmatalis</i>	58,49	94,14	96,7	12
<i>S. frugiperda</i>	53,81	88,11	96	13
<i>A. gemmatalis</i> molde	77,2	83,74	97,2	32
<i>S. frugiperda</i> molde	99,15	100	99,7	13



Enzimas	Inibidores	Energia de ligação (kcal/mol)	Ki teórico (mol)
Bovina	BPTI	-17,1	2,91289E-13
	SKTI	-16,7	5,72212E-13
Anticarsia	BPTI	-14,5	2,34603E-11
	SKTI	-10,6	1,69569E-08
Spodoptera	BPTI	-11,0	8,63207E-09
	SKTI	-16,0	1,86515E-12
Humana	BPTI	-14,6	1,98164E-11
	SKTI	-15,4	5,13525E-12

O docking proteína-peptídeo entre as tripsinas modeladas e os inibidores registrados pelo Laboratório de Enzimologia e Bioquímica de Proteínas e Peptídeos da UFV, *gore1* e *gore2* foram feitos pela ferramenta PyRx e a constante inibitória (Ki) foi obtida pela equação  $\Delta G = RT \ln Ki$ . Os resultados são apresentados na Tabela 3. Todos dockings enzima-peptídeo apresentaram Ki na ordem de  $\mu\text{M}$  com o menor sendo da inibição de tripsina de *A. gemmatalis* por *gore1* com 255,8  $\mu\text{M}$  e a maior sendo a inibição de tripsina de *H. sapiens* por *gore2* com 7,38  $\mu\text{M}$ .

**Tabela 3.** Docking molecular entre as enzimas de *B. taurus*, *A. gemmatalis*, *S. frugiperda* e *H. sapiens* com os inibidores peptídicos *gore1* e *gore2*, criados pelo Laboratório de Enzimologia e Bioquímica de Proteínas e Peptídeos da Universidade Federal de Viçosa. Análise feita pelo programa PyRx e Autodock Vina, usando as configurações padrões de análise e selecionando toda a extensão da molécula para ser analisada. Ki determinado matematicamente a partir da energia de ligação.

Enzimas	Inibidores	Energia de ligação (kcal/mol)	Ki teórico (mol)
Bovina	<i>gore1</i>	-6,2	2,85037E-05
	<i>gore2</i>	-6,8	1,03527E-05
Anticarsia	<i>gore1</i>	-5,2	0,000154164
	<i>gore2</i>	-5,6	7,84783E-05
Spodoptera	<i>gore1</i>	-6,1	3,3745E-05
	<i>gore2</i>	-6,7	1,22563E-05
Humana	<i>gore1</i>	-5,7	6,6289E-05
	<i>gore2</i>	-7	7,38647E-06

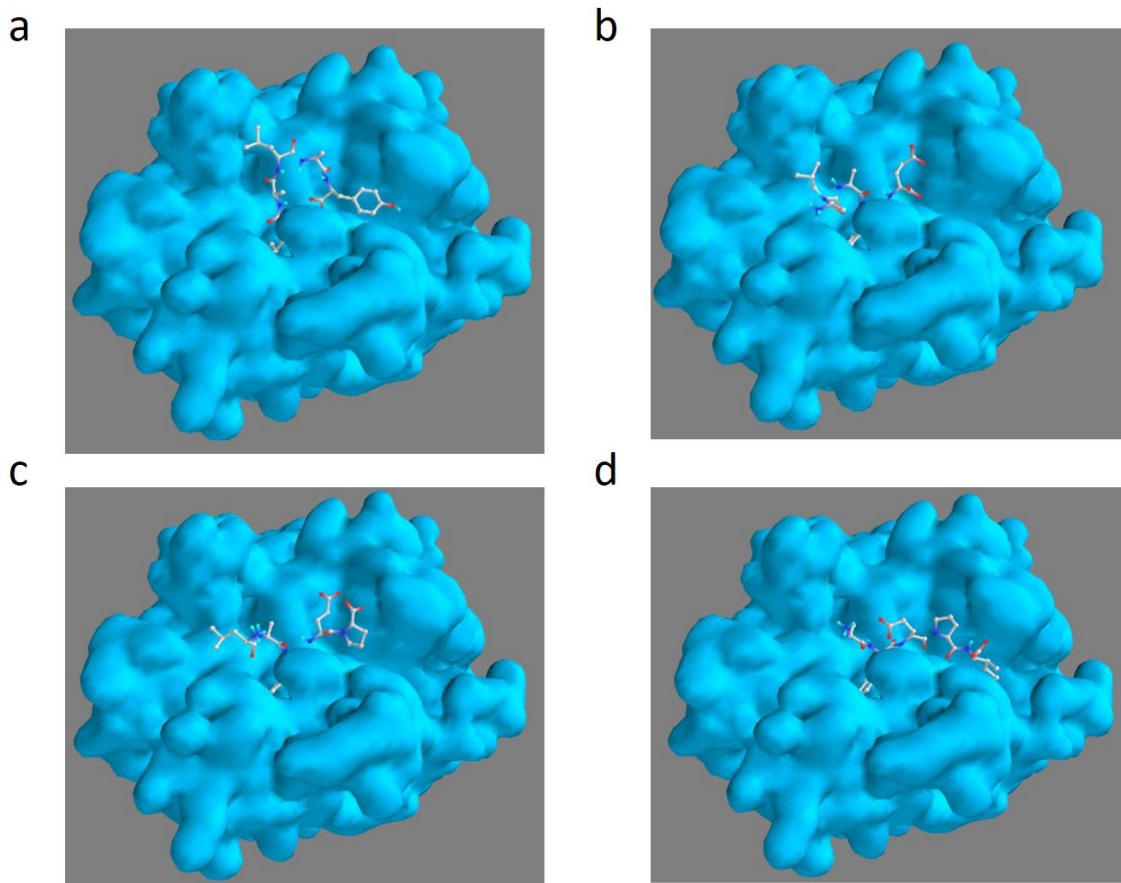
#### 7.4. DESIGN DE PEPTÍDEOS

Usando como base a pro-região de tripsina de *A. gemmatalis*, foram desenhados 8 decapeptídeos para serem testados como inibidores. Os peptídeos foram nomeados Pep1-8 e modelados no programa PEP-FOLD3. Foram feitos dockings dos peptídeos modelados com as quatro tripsinas selecionadas usando o programa PyRx e, a partir dos dados de energia livre obtidos, foram calculadas as constantes inibitórias usando a mesma equação citada anteriormente. Os peptídeos Pep2 e Pep6 foram considerados os melhores peptídeos com Ki's idênticos de 8,7  $\mu\text{M}$  para a tripsina de *A. gemmatalis* e 2,6  $\mu\text{M}$  e 0,69  $\mu\text{M}$  respectivamente para

tripsina de *S. frugiperda*. A partir dessas sequências foram desenhados 3 octapeptídeos nomeados Pep9-11. O peptídeo Pep11 com Ki de 8,7  $\mu\text{M}$  e 5,2  $\mu\text{M}$  para tripsinas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* respectivamente foi selecionado para continuar o processo de encurtamento. A partir disso foram desenhados 4 pentapeptídeos nomeados Pep12-15 e analisados por docking. Os valores de energia livre e constantes inibitórias são apresentados na Tabela 4. Os dockings com os pentapeptídeos foram analisados usando o programa Pymol para identificação de resíduos onde há interação. O Pep14 apresentou energia de ligação de -7,4 e -7,5 kcal/mol para as tripsinas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* respectivamente e Ki de 3,7  $\mu\text{M}$  e 3,1  $\mu\text{M}$ . Foram identificadas interações do peptídeo com os resíduos His<sup>63</sup>, Gln<sup>197</sup>, Gly<sup>198</sup> e Ser<sup>200</sup>, parte do sítio ativo e de ligação da tripsina. Os peptídeos Pep12-15 ligaram-se todos na mesma região da tripsina (Fig. 3).

**Tabela 4.** Docking molecular entre as enzimas escolhidas e os peptídeos desenhados a partir de pro-região de *A. gemmatalis*. Peptídeos 1-8 possuem 10 resíduos, 9-11 possuem 8 resíduos e 12-15 possuem 5 resíduos de aminoácidos. Os melhores peptídeos de cada tamanho foram usados no desenvolvimento dos peptídeos menores. Análise feita nos programas PyRx e Autodock Vina usando as configurações padrão e selecionando toda a extensão da molécula para ser analisada.

Peptídeos	Enzimas	Bovina		Anticarsia		Spodoptera		Humana	
		Nº de aa	Energia de Ligação	Ki teórico	Energia de Ligação	Ki teórico	Energia de Ligação	Ki teórico	Energia de Ligação
Pep1	10	-6	3,99501E-05	-4,9	0,000255803	-6,9	8,7447E-06	-6,4	2,03369E-05
Pep2	10	-7,3	4,45157E-06	-6,9	8,7447E-06	-7,6	2,6828E-06	-8,1	1,15358E-06
Pep3	10	-7,3	4,45157E-06	-6	3,99501E-05	-7,3	4,45157E-06	-7,2	5,27012E-06
Pep4	10	-6,9	8,7447E-06	-6,5	1,71782E-05	-6,8	1,03527E-05	-7,5	3,17612E-06
Pep5	10	-6,2	2,85037E-05	-6,3	2,40765E-05	-7,1	6,2392E-06	-7	7,38647E-06
Pep6	10	-6,2	2,85037E-05	-6,9	8,7447E-06	-8,4	6,95223E-07	-6,5	1,71782E-05
Pep7	10	-7,9	1,61683E-06	-6,6	1,45101E-05	-7,7	2,26611E-06	-7,6	2,6828E-06
Pep8	10	-7,4	3,76015E-06	-6,3	2,40765E-05	-6,9	8,7447E-06	-7,8	1,91414E-06
Pep9	8	-7,4	3,76015E-06	-5,6	7,84783E-05	-7,5	3,17612E-06	-7,1	6,2392E-06
Pep10	8	-7,7	2,26611E-06	-6,6	1,45101E-05	-7,7	2,26611E-06	-7,5	3,17612E-06
Pep11	8	-7,3	4,45157E-06	-6,9	8,7447E-06	-7,2	5,27012E-06	-7,2	5,27012E-06
Pep12	5	-6,9	8,7447E-06	-6,8	1,03527E-05	-6	3,99501E-05	-7,5	3,17612E-06
Pep13	5	-7,2	5,27012E-06	-6,6	1,45101E-05	-7,4	3,76015E-06	-7,7	2,26611E-06
Pep14	5	-7,4	3,76015E-06	-7,4	3,76015E-06	-7,5	3,17612E-06	-8,2	9,74407E-07
Pep15	5	-7,7	2,26611E-06	-7	7,38647E-06	-7,8	1,91414E-06	-7,5	3,17612E-06



**Fig 3.** Docking molecular entre tripsina de *B. taurus* e peptídeos inibidores Pep12 (a), Pep13 (b), Pep14 (c) e Pep15 (d). Os peptídeos se posicionaram de maneira semelhante de forma a interagir com o sítio de ligação de substrato e os sítios ativos His<sup>63</sup> e Ser<sup>200</sup>.

## 8. DISCUSSÃO

Todas as sequências analisadas apresentaram conservados os resíduos dos sítios de ligação de substrato Asp<sup>194</sup>, Ser<sup>195</sup>, Gln<sup>197</sup> e Gly<sup>198</sup> e resíduos ativos His<sup>63</sup>, Asp<sup>107</sup> e Ser<sup>200</sup> necessários para a catálise enzimática. Além disso, foram identificados em todas as tripsinas as sub-regiões S4-S3' que auxiliam na ligação e catálise do substrato (Marana *et al*, 2002; Hanish *et al*, 1987). A conservação dos resíduos catalíticos indica que as sequências catalisam a mesma reação e, portanto, são tripsinas (Ribeiro *et al*, 2020). No entanto a baixa homologia (30,8 e 38,8%) mostra que existem diferenças estruturais marcantes entre as tripsinas dos herbívoros-praga e dos mamíferos que pode contribuir para a especificidade dos inibidores (Hemmati *et al*, 2021a).

A modelagem pela ferramenta Phyre2 gerou estruturas viáveis para análise bioinformática. Estruturas cujos scores foram abaixo da nota de corte de cada uma das ferramentas de validação utilizadas tiveram seus scores comparados com os scores das enzimas molde, cuja estrutura pode ser considerada de qualidade se forem identificadas por cristalização de raio-X ou

espectroscopia de RMN (Kim *et al*, 2011). As estruturas utilizadas foram consideradas adequadas para uso. O gráfico de Ramachandran mostrou que 96,7% dos resíduos da tripsina de *A. gemmatalis* estavam em regiões permitidas sendo que 73,5% estavam nas regiões mais favoráveis e 96% dos resíduos da tripsina de *S. frugiperda* estavam localizados em regiões permitidas com 74,6% em regiões mais favoráveis. Dessa forma, com mais de 90% dos resíduos em regiões permitidas, as estruturas foram consideradas válidas para as análises bioinformáticas (Laskowski *et al*, 1993). A qualidade das interações não-covalentes foi verificada pela ferramenta ERRAT, que considera score acima de 50% como de boa qualidade (Colovos & Yeates, 1993). Ambas as estruturas geradas apresentaram boa qualidade com score de 58,49% para *A. gemmatalis* e 53,81% para *S. frugiperda*. A estrutura tridimensional e a compatibilidade do modelo foram julgadas pela ferramenta VERIFY-3D e ambas as estruturas apresentaram acima de 80% dos resíduos com score acima de 0,2, caracterizando uma estrutura de boa qualidade. Por último, ambas as estruturas foram consideradas válidas pela ferramenta WHATCHECK, por apresentarem menos resíduos com empacotamento anormal que seus moldes (Hooft *et al*, 1996). Ambas as estruturas foram consideradas válidas em todos os métodos de validação utilizados, indicando que os modelos criados foram adequados para o uso em bioinformática.

Os valores de  $K_i$  calculados pela energia de ligação obtida pelo docking não foram condizentes com a literatura. Foi calculado para tripsina bovina e os inibidores BPTI e SKTI os valores de  $K_i$  0,29 pM e 0,57 pM, enquanto na literatura os valores conhecidos são de 2,6 nM e 1,67  $\mu$ M (Xu *et al*, 2020; Yang *et al*, 2008). O BPTI comercializado pela Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich:A6106) é reportado ter um  $K_i$  de 0,06 pM, que foi mais próximo do calculado, mas quase 5 vezes menor. Para as enzimas de *A. gemmatalis* os valores de  $K_i$  calculados para BPTI e SKTI foram 23,4 pM e 16,9 nM, enquanto os encontrados na literatura foram de 0,5 nM e 2,5 nM respectivamente (Patarroyo-Vargas *et al*, 2020; de Almeida Barros *et al*, 2022). Entre os inibidores *gore1* e *gore2* e a tripsina de *A. gemmatalis* foram calculados  $K_i$  de 0,15 mM e 78,4  $\mu$ M respectivamente, enquanto, na literatura, os valores encontrados foram de 0,49 mM e 0,1 mM (de Almeida Barros *et al*, 2021). A diferença entre os valores calculados e os obtidos experimentalmente na literatura pode ser devido a diferenças em condições de temperatura e pH experimental e simulados, porém não foi possível observar nenhum tipo de padrão na variação. A menor discrepância entre os valores calculados e os da literatura para o *gore1* e *gore2* em relação ao docking de proteínas pode ser indicio de que os dockings de peptídeos

geram resultados mais próximos do real, mas testes adicionais, como cinética de inibição *in vitro*, seriam necessários para confirmação.

Os peptídeos desenhados foram todos modelados por homologia, e só foram escolhidos moldes com alta identidade e/ou semelhança. Mesmo os modelos com maior número de resíduos já apresentam resultados e potencial de inibição semelhantes ao *gore1* e *gore2* com Pep1-8 apresentando  $K_i$  na faixa de 0,15 mM até 8,7  $\mu$ M. Foram considerados melhores os peptídeos com menor energia de ligação e menor número de aminoácidos por apresentarem melhor custo-benefício na produção. A redução de sequência de 10 aminoácidos para 8 e até mesmo 5 aminoácidos apresentou uma melhora na energia de ligação, de forma que os melhores inibidores foram Pep12-15, com  $K_i$  variando de 14,5  $\mu$ M até 3,76  $\mu$ M. Usando métodos similares, Hemmati *et al* (2021a) desenharam peptídeos inibidores de tripsina de *Spodoptera frugiperda* com valores de  $K_i$  calculados entre 0,39  $\mu$ M e 0,77 nM evidenciando a eficácia do método e a competitividade dos inibidores encontrados.

Diferentes peptídeos se ligaram preferencialmente a uma mesma região de cada enzima testada. A análise dos pentapeptídeos mostrou interações com os resíduos His<sup>63</sup>, Gln<sup>197</sup>, Gly<sup>198</sup> e Ser<sup>200</sup>, todos resíduos necessários para a catálise da reação enzima-substrato como identificadas pelo banco de dados UniProt. Inibidores enzimáticos costumam agir pelo bloqueio ou distorção do sítio ativo da enzima (Kalman, 1981), dando fortes indícios da capacidade inibitória dos peptídeos. Por ser uma enzima proteolítica, a interação dos peptídeos com o sítio de ligação de substrato e sítio ativo da enzima pode ser uma indicação de que o peptídeo pode estar agindo como substrato ao invés de inibidor. Tripsinas, de maneira geral, fazem a hidrólise da ligação peptídica entre o grupo carboxil de uma arginina ou lisina e o grupo amino do aminoácido seguinte (Simpson, 2006). Os pentapeptídeos Pep12-15 não apresentam em sua estrutura nenhuma lisina ou arginina além de apresentar um resíduo de Prolina que costuma dificultar a reação de hidrólise, reforçando a possibilidade dos peptídeos agirem como inibidores eficazes.

## 9. CONCLUSÃO

Esse estudo verificou a possibilidade e eficiência da criação de biopesticidas baseados em sequências próprias do organismo alvo na tentativa de reduzir o uso de pesticidas convencionais e minimizar o impacto destes no meio ambiente. O uso de técnicas de bioinformática se mostrou um método eficiente e barato de testar múltiplas possibilidades de moléculas e identificar as

melhores para experimentos posteriores. Foram desenhados 15 peptídeos com propriedade inibitória teórica similar ou melhor que outros peptídeos inibidores já conhecidos e testados *in vitro* e *in vivo* e com bom custo benefício quando comparado com inibidores proteicos maiores. Os quatro menores peptídeos nomeados Pep12-15 foram considerados os mais promissores para testes complementares futuros, tanto em bioinformática quanto *in vitro* e *in vivo*. A semelhança entre os valores teóricos de energia de ligação e constante inibitória da ligação entre os peptídeos inibidores e as tripsinas dos herbívoros-praga e as de humano e boi dão indícios de promiscuidade na inibição que pode ser um fator limitante no uso dos peptídeos na agronomia, mas que podem ser contornados adotando métodos de aplicação adequados. Em conclusão, o estudo obteve sucesso em desenhar peptídeos inibidores de interesse econômico e bom custo-benefício para o controle de pragas da soja na agricultura.

## 10. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, Shweta; MEHROTRA, R. J. J. C. An overview of molecular docking. **JSM chem**, v. 4, n. 2, p. 1024-1028, 2016.
- ANDREWS, Keith L. The whorlworm, *Spodoptera frugiperda*. **Central America and neighboring areas. Florida Entomologist**, v. 63, n. 4, p. 456-467, 1980
- BADOSA, Esther et al. Synthetic peptides against plant pathogenic bacteria. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1784, 2022.
- BAKER, David; SILEN, Joy L.; AGARD, David A. Protease pro region required for folding is a potent inhibitor of the mature enzyme. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 12, n. 4, p. 339-344, 1992.
- CEPEA (2023). Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Brasil: Esalq/USP. Disponível em: <https://cepea.esalq.usp.br/br/releases/cepea-abiove-cadeia-da-soja-e-do-biodiesel-representou-27-do-pib-do-agronegocio-e-gerou-2-milhoes-de-empregos-em-2022.aspx> (verificado em 22 de setembro de 2023).
- COLOVOS, Chris; YEATES, Todd O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein science**, v. 2, n. 9, p. 1511-1519, 1993
- CORRÊA-FERREIRA, Beatriz S.; DE AZEVEDO, Joacir. Soybean seed damage by different species of stink bugs. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 4, n. 2, p. 145-150, 2002.

CRUZ, Ivan et al. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**, v. 45, n. 4, p. 293-296, 1999.

DA SILVA, Letícia Taís Marques et al. Os agrotóxicos permitidos no Brasil e seus impactos na saúde humana. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-ALAGOAS**, v. 6, n. 2, p. 213-213, 2020.

DALLAKYAN, Sargis; OLSON, Arthur J. Small-molecule library screening by docking with PyRx. In: **Chemical biology**. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 243-250

DE ALMEIDA BARROS, Rafael et al. Inhibition constant and stability of tripeptide inhibitors of gut trypsin-like enzyme of the soybean pest *Anticarsia gemmatilis*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 110, n. 2, p. e21887, 2022.

DE ALMEIDA BARROS, Rafael et al. Small peptides inhibit gut trypsin-like proteases and impair *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) survival and development. **Pest Management Science**, v. 77, n. 4, p. 1714-1723, 2021.

EISENBERG, David; LÜTHY, Roland; BOWIE, James U. [20] VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1997. p. 396-404

Embrapa (2023). Embrapa Empresa Brasileira de Pesquisa Agrícola. Brasil: Embrapa. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos> (verificado 27 de julho de 2023).

FAN, Jiyu; FU, Ailing; ZHANG, Le. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, p. 83-89, 2019.

FAOSTAT (2020). FAOSTAT Statistical Database. Rome: FAO. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> (verificado 12 de dezembro 2022).

GRESSEL, Jonathan. Perspective: It is time to consider new ways to attack unpesticidable (undruggable) target sites by designing peptide pesticides. **Pest management science**, 2022.

GUEDES, Jerson VC et al. Sistemas de aplicação e inseticidas no controle de *Anticarsia gemmatilis* na soja. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, p. 910-914, 2012.

H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. The Protein Data Bank . 2000

HANISCH, U.-K. et al. Characterization of the S'subsite specificity of trypsin. **Biocatalysis**, v. 1, n. 2, p. 129-136, 1987.

HAWKINS, Nichola J. et al. The evolutionary origins of pesticide resistance. **Biological Reviews**, v. 94, n. 1, p. 135-155, 2019

HEMMATI, Seyed Ali et al. Inhibitory potential of a designed peptide inhibitor based on zymogen structure of trypsin from *Spodoptera frugiperda*: in silico insights. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 27, n. 3, p. 1677-1687, 2021b.

HEMMATI, Seyed Ali et al. The trypsin inhibitor pro-peptide induces toxic effects in Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 171, p. 104730, 2021a.

HOOFT, Rob WW et al. Errors in protein structures. **Nature**, v. 381, n. 6580, p. 272-272, 1996

HUANG, Chien-Yu et al. A stable antimicrobial peptide with dual functions of treating and preventing citrus Huanglongbing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 6, p. e2019628118, 2021.

HUGHES, Stephen R.; DOWD, Patrick F.; JOHNSON, Eric T. Cell-penetrating recombinant peptides for potential use in agricultural pest control applications. **Pharmaceuticals**, v. 5, n. 10, p. 1054-1063, 2012

JITONNOM, Jitrayut; LOMTHAISONG, Khemika; LEE, Vannajan S. Computational design of peptide inhibitor based on modifications of proregion from *Plutella xylostella* midgut trypsin. **Chemical biology & drug design**, v. 79, n. 4, p. 583-593, 2012

KALMAN, Thomas I. Enzyme inhibition as a source of new drugs. **Drug Development Research**, v. 1, n. 4, p. 311-328, 1981.

KANG, Ling; GUO, Quan; WANG, Xicheng. A hierarchical method for molecular docking using cloud computing. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 21, p. 6568-6572, 2012.

KELLEY, Lawrence A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature protocols**, v. 10, n. 6, p. 845-858, 2015

- KIM, Youngchang et al. High-throughput protein purification and quality assessment for crystallization. **Methods**, v. 55, n. 1, p. 12-28, 2011.
- KIRKWOOD, Jobie et al. Using isoelectric point to determine the pH for initial protein crystallization trials. **Bioinformatics**, v. 31, n. 9, p. 1444-1451, 2015.
- LAMIABLE, Alexis et al. PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W449-W454, 2016
- LARSSON, Per; HESS, Berk; LINDAHL, Erik. Algorithm improvements for molecular dynamics simulations. **Wiley interdisciplinary reviews: computational molecular science**, v. 1, n. 1, p. 93-108, 2011.
- LASKOWSKI, Roman A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of applied crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.
- LAZURE, Claude. The peptidase zymogen proregions: nature's way of preventing undesired activation and proteolysis. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 7, p. 511-531, 2002.
- LI, Kan et al. Rational design of novel phosphoinositide 3-Kinase Gamma (PI3K $\gamma$ ) selective inhibitors: A computational investigation integrating 3D-QSAR, molecular docking and molecular dynamics simulation. **Chemistry & biodiversity**, v. 16, n. 7, p. e1900105, 2019.
- LI, Yu et al. Deep learning in bioinformatics: Introduction, application, and perspective in the big data era. **Methods**, v. 166, p. 4-21, 2019.
- MAHMOOD, Isra et al. Effects of pesticides on environment. In: **Plant, soil and microbes**. Springer, Cham, 2016. p. 253-269.
- MARANA, Sandro Roberto et al. Subsites of trypsin active site favor catalysis or substrate binding. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 290, n. 1, p. 494-497, 2002.
- MEDEIROS, Lenice; MEGIER, Gabriela A. Ocorrência e desempenho de *Euschistus heros* (F.)(Heteroptera: Pentatomidae) em plantas hospedeiras alternativas no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 4, p. 459-463, 2009
- MONTESINOS, Emilio; BARDAJI, Eduard. Synthetic antimicrobial peptides as agricultural pesticides for plant-disease control. **Chemistry & biodiversity**, v. 5, n. 7, p. 1225-1237, 2008.

MOSCARDI, F.; SOUZA, ML de. *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) biologia, amostragem e métodos de controle Baculovirus para o controle de pragas. **Brasília: EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2002.

MUCCEE, Fatima et al. In-silico characterization of estrogen reactivating  $\beta$ -glucuronidase enzyme in git associated microbiota of normal human and breast cancer patients. **Genes**, v. 13, n. 9, p. 1545, 2022.

MURUMKAR, Prashant R. et al. Selection of Suitable Protein Structure from Protein Data Bank: An Important Step in Structure-based Drug Design Studies. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 246-264, 2023.

NAKASU, Erich YT et al. Novel biopesticide based on a spider venom peptide shows no adverse effects on honeybees. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1787, p. 20140619, 2014

NICOLOPOULOU-STAMATI, Polyxeni et al. Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. **Frontiers in public health**, v. 4, p. 148, 2016

O'KEEFE, Sean F.; BIANCHI, L.; SHARMAN, J. Soybean nutrition. 2015.

OLIVEIRA, M. G. et al. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. Identification by covalent labeling with p-diazoniumbenzamidine and kinetic characterization of Tyr-151-(p-benzamidino)-azo-beta-trypsin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 36, p. 26893-26903, 1993.

ONGARATTO, S. et al. Resistance of Soybean Genotypes to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae): Antixenosis and Antibiosis Characterization. **Journal of Economic Entomology**, v. 114, n. 6, p. 2571-2580, 2021.

PAGANO, Marcela Claudia; MIRANSARI, Mohammad. The importance of soybean production worldwide. In: **Abiotic and biotic stresses in soybean production**. Academic Press, 2016. p. 1-26.

PAREDES-SÁNCHEZ, Francisco A. et al. Advances in Control Strategies against Spodoptera frugiperda. A Review. **Molecules**, v. 26, n. 18, p. 5587, 2021

PATARROYO-VARGAS, Adriana M. et al. Inhibition kinetics of digestive proteases for *Anticarsia gemmatalis*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, 2020.

PONTIUS, Joan; RICHELLE, Jean; WODAK, Shoshana J. Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. **Journal of molecular biology**, v. 264, n. 1, p. 121-136, 1996

PRUITT, Kim D. et al. NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. D130-D135, 2012.

RANI, Lata et al. An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. **Journal of Cleaner Production**, v. 283, p. 124657, 2021

RIBEIRO, António JM et al. A global analysis of function and conservation of catalytic residues in enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 2, p. 314-324, 2020.

SAMADA, Lukmanul Hakim; TAMBUNAN, Usman Sumo Friend. Biopesticides as promising alternatives to chemical pesticides: A review of their current and future status. **Online J. Biol. Sci**, v. 20, p. 66-76, 2020.

SAYERS, Eric W. et al. Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic acids research**, v. 47, n. Database issue, p. D23, 2019.

SEIBER, James N. et al. Biopesticides: state of the art and future opportunities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 48, p. 11613-11619, 2014

SIEVERS, Fabian; HIGGINS, Desmond G. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. In: **Multiple sequence alignment methods**. Humana Press, Totowa, NJ, 2014. p. 105-116

SILVA, Mauro Tadeu Braga da; COSTA, Ervandil Corrêa; BOSS, Adriano. Controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) com reguladores de crescimento de insetos. **Ciência Rural**, v. 33, p. 601-605, 2003.

SILVA, Valvenarg Pereira da et al. Monitoramento do percevejo marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) por feromônio sexual em lavoura de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, p. 844-852, 2014.

SIMPSON, Richard J. Fragmentation of protein using trypsin. **CSH protocols**, v. 2006, n. 5, p. pdb. prot4550-pdb. prot4550, 2006.

SINGH, Preeti et al. Functional and edible uses of soy protein products. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 7, n. 1, p. 14-28, 2008

SUKIRAN, Nur Afifah et al. Enhancing the oral and topical insecticidal efficacy of a commercialized spider venom peptide biopesticide via fusion to the carrier snowdrop lectin (*Galanthus nivalis agglutinin*). **Pest Management Science**, 2022.

TAYLOR, Mark AJ; LEE, Michael J. Trypsin isolated from the midgut of the tobacco hornworm, *manduca sexta*, is inhibited by synthetic pro-peptides *in vitro*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 235, n. 3, p. 606-609, 1997

TORRES, Pedro HM et al. Key topics in molecular docking for drug design. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4574, 2019.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

TURNIPSEED, Sam G.; KOGAN, Marcos. Soybean entomology. **Annual review of Entomology**, v. 21, n. 1, p. 247-282, 1976.

WHETSTONE, Paul A.; HAMMOCK, Bruce D. Delivery methods for peptide and protein toxins in insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 576-596, 2007.

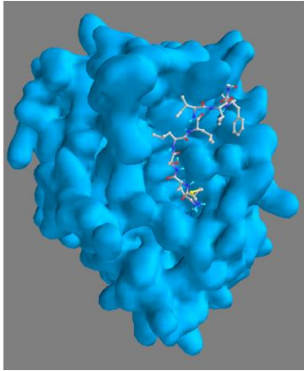
WILLIS, Sara. The use of soybean meal and full fat soybean meal by the animal feed industry. In: **12th Australian soybean conference. Soy Australia, Bundaberg**. 2003.

XU, Yanji et al. Preparation and irreversible inhibition mechanism insight into a recombinant kunitz trypsin inhibitor from *glycine max L.* seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 191, p. 1207-1222, 2020.

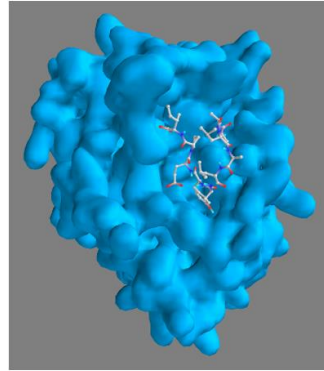
YANG, Lili et al. Expression and purification of natural N-terminal recombinant bovine pancreatic trypsin inhibitor from *Pichia pastoris*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 9, p. 1680-1685, 2008.

**11. APÊNDICE A – IMAGENS COMPLEMENTARES**

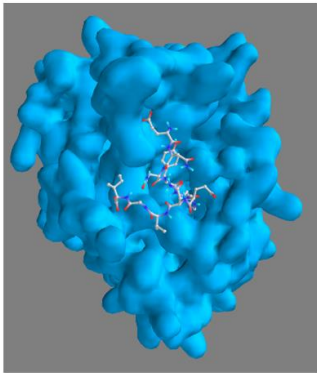
a



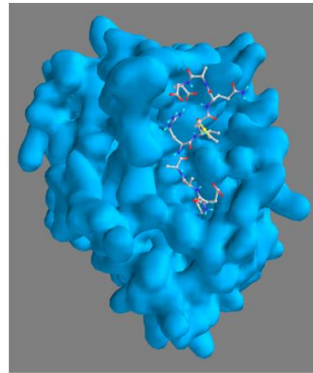
b



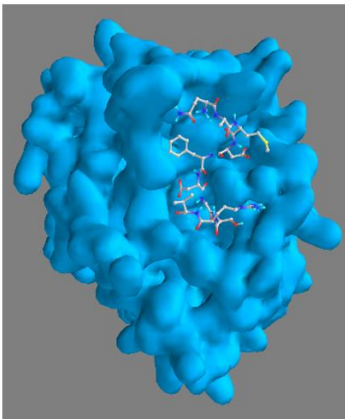
c



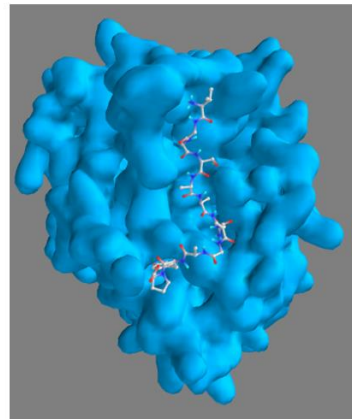
d



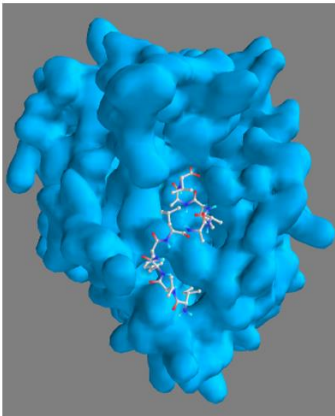
e



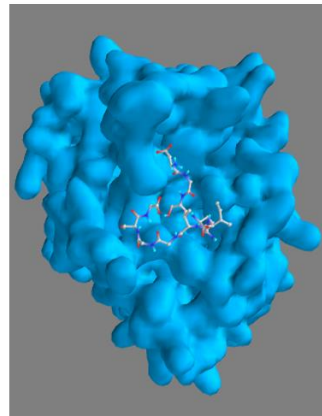
f

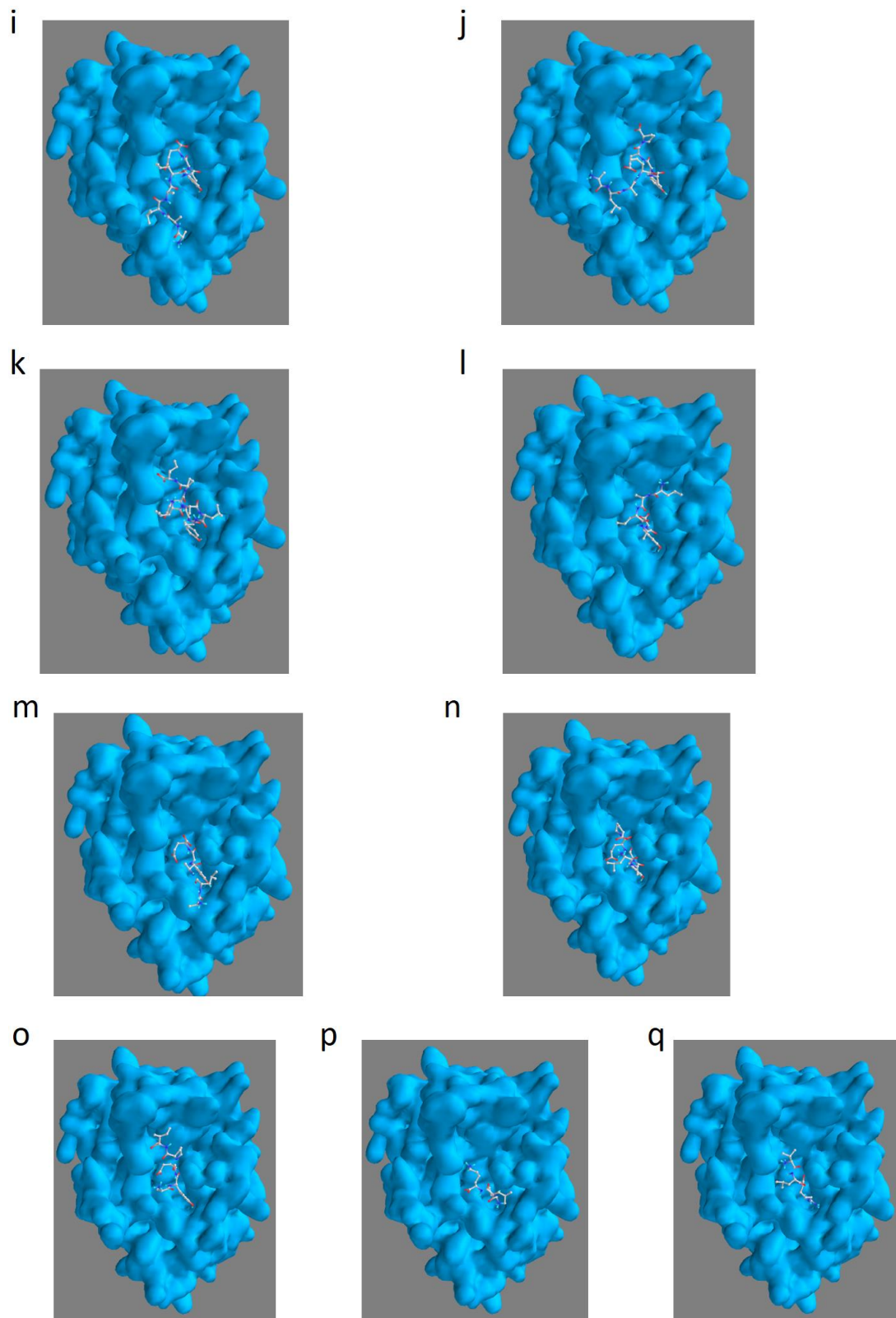


g



h





**Fig 5.** Docking molecular entre tripsina de *S. frugiperda* e os peptídeos Pep1-15 (a-o) e *gore1* (p) e *gore2* (q). as imagens do docking evidenciam que todos os peptídeos se ligam próximos da mesma região da enzima.