

RAFAEL DE ALMEIDA BARROS

**DEFESA BIOQUÍMICA DE PLANTAS ÀS PRAGAS AGRÍCOLAS: DESENHO
RACIONAL DE INIBIDORES DE PROTEASES PEPTÍDICOS A SEREM
UTILIZADOS NAS FORMULAÇÕES BIOPESTICIDAS**

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

Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira

Coorientadora: Yaremis Beatriz Meriño
Cabrera

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

T

B277d
2022
Barros, Rafael de Almeida, 1994-
Defesa bioquímica de plantas às pragas agrícolas: desenho racional de inibidores de proteases peptídicos a serem utilizados nas formulações biopesticidas / Rafael de Almeida Barros. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (195 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.339>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Peptídeos - Inibidores. 2. Lagarta-da-soja. 3. Serina proteases. 4. Moléculas - Modelos. 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

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

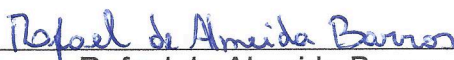
RAFAEL DE ALMEIDA BARROS

**DEFESA BIOQUÍMICA DE PLANTAS ÀS PRAGAS AGRÍCOLAS: DESENHO
RACIONAL DE INIBIDORES DE PROTEASES PEPTÍDICOS A SEREM
UTILIZADOS NAS FORMULAÇÕES BIOPESTICIDAS**

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

APROVADA: 27 de maio de 2022.

Assentimento:



Rafael de Almeida Barros

Autor



Maria Goreti de Almeida Oliveira

Orientadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro a este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa, ao departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Programa de pós-graduação em Bioquímica Aplicada, pela oportunidade de engrandecer meus estudos.

Ao Instituto de Biotecnologia aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e ao Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, por me permitir o desenvolvimento técnico e recursos chave para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Interações Planta-Praga (INCT-IPP), e Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro durante todo o processo desse trabalho.

À minha professora orientadora, Maria Goreti de Almeida Oliveira, um agradecimento especial pelas orientações de vida e acadêmica. Seus conhecimentos fizeram grande diferença no resultado final deste trabalho e na minha formação.

À minha coorientadora e amiga, Yaremis Beatriz Meriño Cabrera, pela disponibilidade e me acompanhar desde o início dos trabalhos para que esta tese fosse concluída. Suas contribuições foram essenciais para este trabalho, que não seria o mesmo sem sua participação.

Ao meu coorientador, Humberto Josué Ramos de Oliveira, pelo apoio e sua disponibilidade para sempre ajudar.

Ao Eduardo Monteiro, pela vigilância e assistência das etapas burocráticas.

A minha família, meus pais Hugo e Marisa, minha irmã Gabriele, meus sobrinhos Júlia e Vitor e meu cunhado Leomar, à Layla e aos avós. Obrigado por me apoiarem e me ajudar sempre. À minha namorada Fernanda, pelo apoio e conselhos que me ajudam, a cada dia, me tornar uma pessoa melhor.

A toda a equipe do Laboratório de Enzimologia: Yaremis, Neillier, Manuel, Halina, Rafael Andrade, Angélica, Camilo, Verônica, João e Cauê, pela ajuda, sugestões, piadas. Aos amigos da república Terreno Baldio: Mateus, Guilherme, André, Allysson, Saulo, Jamal, Paulo, Glauco e agregados.

RESUMO

Barros, Rafael de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2022. **Defesa bioquímica de plantas às pragas agrícolas: desenho racional de inibidores de proteases peptídicas a serem utilizados nas formulações biopesticidas.** Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadora: Yaremis Meriño Cabrera.

Os danos causados por insetos lepidópteros reduzem o rendimento e a qualidade das lavouras de soja devido à desfolha, impactando negativamente os lucros da agricultura. Para controlar essas pragas, muitos produtores de soja recorrem a grandes quantidades de agrotóxicos sintéticos e cultivares transgênicos contendo toxinas Bt. Os agrotóxicos sintéticos comumente utilizados, além de refratários, impactando negativamente o meio ambiente, muitas vezes estão relacionados a problemas de saúde humana. Além disso, a pressão seletiva em herbívoros causada pelo uso de um modo de ação único, como proteínas tóxicas de cultivares Bt transgênicas, gera pragas resistentes. Por isso, a busca por compostos biológicos ecologicamente corretos, com diferentes modos de ação e efeitos semelhantes aos dos agrotóxicos convencionais, tem ganhado atenção em todo o mundo devido ao seu apelo sustentável. Os inibidores de protease (IPs) fazem parte da defesa natural das plantas contra herbívoros e aparecem como um potencial agente de controle para complementar, ou mesmo substituir, os atuais agrotóxicos convencionais. Essas moléculas se ligam a proteases que clivam as proteínas da dieta em aminoácidos livres, prejudicando o ciclo de vida e a reprodução dos insetos. No entanto, devido à coevolução com as plantas, os herbívoros desenvolveram adaptações para retardar os efeitos dos IPs naturais, reduzindo sua eficácia no campo. Neste trabalho, primeiramente, foram avaliados os efeitos de dois inibidores de proteases peptídicos (GORE1 e GORE2) desenhados a partir de substratos tripeptídicos de tripsina-like contra *Anticarsia gemmatalis* através de estudos de *docking* e dinâmica molecular, ensaios enzimáticos *in vitro* e *in vivo* e testes biológicos. Posteriormente, foram avaliados os efeitos diferenciais de dois inibidores de proteases BPTI (*Bovine pancreatic trypsin inhibitor*) – *non-host* PI e SKTI (*Soybean kunitz trypsin inhibitor*) – *host* PI – nas respostas adaptativas e no ciclo de vida de *Anticarsia gemmatalis*. Além disso, foram realizados ensaios computacionais de dinâmica molecular proteína-proteína a fim de identificar os sítios reativos destas duas moléculas, visando o

desenho de outros novos peptídeos inibidores de proteases. Os inibidores peptídicos são potenciais candidatos para o manejo de insetos lepidópteros. A otimização dessas moléculas, por meio de modificações químicas estruturais, e a formulação de biopesticidas contendo uma variedade de peptídeos, com diferentes modos de ligação a serino-proteases, poderia viabilizar o uso desse tipo de moléculas na agricultura.

Palavras-chave: Lagarta-da-soja. Peptídeos. Inibidores proteicos. Serino-proteases. Docking molecular

ABSTRACT

Barros, Rafael de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2022. **Biochemical defense of plants against agricultural pests: rational design of peptide protease inhibitors to be used in biopesticide formulations.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-adviser: Yaremis Meriño Cabrera.

The damage caused by lepidopteran insects reduces the yield and quality of soybean crops due to defoliation, negatively impacting agricultural profits. To control these pests, many soybean farmers resort to large amounts of synthetic pesticides and transgenic cultivars containing Bt toxins. Commonly used synthetic pesticides, in addition to being refractory, negatively impacting the environment, are often related to human health problems. Furthermore, selective pressure on herbivores caused by the use of a unique mode of action, such as toxic proteins from transgenic Bt cultivars, generates resistant pests. Therefore, the search for ecologically correct biological compounds, with different modes of action and effects similar to those of conventional pesticides, has gained attention worldwide due to its sustainable appeal. Protease inhibitors (PIs) are part of the natural defense of plants against herbivores and appear as a potential control agent to complement, or even replace, current conventional pesticides. These molecules bind to proteases that cleave dietary proteins into free amino acids, disrupting the life cycle and reproduction of insects. However, due to coevolution with plants, herbivores have developed adaptations to delay the effects of natural IPs, reducing their effectiveness in the field. In this work, we first evaluated the effects of two peptide protease inhibitors (GORE1 and GORE2) designed from trypsin-like tripeptide substrates against *Anticarsia gemmatalis* through docking and molecular dynamics studies, in vitro and in vivo enzymatic assays and biological tests. Subsequently, the differential effects of two protease inhibitors BPTI (Bovine pancreatic trypsin inhibitor) – non-host PI and SKTI (Soybean kunitz trypsin inhibitor) – host PI – on the adaptive responses and life cycle of *Anticarsia gemmatalis* were evaluated. Furthermore, computational assays of protein-protein molecular dynamics were performed in order to identify the reactive sites of these two molecules, aiming at the design of other new protease inhibitor peptides. Peptide inhibitors are potential candidates for the management of lepidopteran insects. The optimization of these molecules, through chemical structural modifications, and the formulation of

biopesticides containing a variety of peptides, with different modes of binding to serine proteases, could enable the use of this type of molecules in agriculture.

Keywords: Velvet bean caterpillar. Peptides. Protein inhibitors. Serine-proteases. Molecular docking

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo Geral	14
2.2. Objetivos Específicos	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. A soja e os insetos lepidópteros.....	15
3.2. Proteases digestivas e insetos lepidópteros.....	15
3.3. Inibidores de proteases como potenciais biopesticidas.....	16
3.4. Peptídeos	18
3.5. BPTI (<i>Bovine pancreatic trypsin inhibitor</i>) e SKTI (<i>Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor</i>)	19
3.6. Modelagem molecular, docking e dinâmica molecular	20
4. REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO I: TRIPEPTÍDEOS INIBIDORES BASEADOS EM SUBSTRATOS DE PROTEASES TRIPSINAS-LIKE.....	37
CAPÍTULO I - ARTIGO I: Pequenos peptídeos inibem proteases tripsina-like do intestino e prejudicam a sobrevivência e o desenvolvimento de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Noctuidae).....	38
RESUMO.....	38
ABSTRACT	39
1. INTRODUÇÃO	40
2. MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1. Docking in silico dos tripeptídeos e tripsinas-like de Lepidoptera.....	42
2.1.1. Sequências e previsão da estrutura tridimensional	42
2.1.2. Molecular Docking.....	43
2.2. Análise in vitro do potencial inibitório dos peptídeos	43
2.2.1. Purificação parcial de tripsinas-like de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	43
2.2.2. Cinética de inibição	44
2.3. Sobrevivência, desenvolvimento e análise nutricional: abordagem in vivo	44
3. RESULTADOS	46
3.1. Docking molecular e perfil farmacofórico: abordagem in silico.....	46
3.2. Purificação parcial das tripsinas-like do intestino de <i>A. gemmatalis</i>	47

3.3. Cinética de inibição	48
4. DISCUSSÃO	50
5. REFERÊNCIAS.....	54
TABELAS	70
FIGURAS	72
CAPÍTULO I – ARTIGO II: Constante inibitória por dinâmica molecular e estabilidade de tripeptídeos inibidores de tripsinas-like da lagarta-da-soja, <i>Anticarsia gemmatalis</i>	77
RESUMO.....	77
ABSTRACT	79
1. INTRODUÇÃO	80
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	82
2.1. Análises in silico	82
2.1.1. ID Tripsinas-like, desenho dos peptídeos e formação dos complexos enzima-peptídeo	82
2.1.2. Simulações de dinâmica molecular de peptídeos em solução	82
2.1.3. Energia livre de ligação entre a enzima tripsina-like de <i>A. gemmatalis</i> e peptídeos.....	83
2.1.4. Cálculo do potencial de dissociação estimado <i>K_d</i>	83
2.2. Estabilidade em água à temperatura ambiente dos inibidores peptídicos: análises in vitro.....	84
2.3. Inibição endógena de tripsinas-like	84
2.4. Persistência da inibição de tripsinas-like e proteases totais por peptídeos e SKTI	85
3. RESULTADOS	87
3.1. Dinâmica molecular de peptídeos em solução e cálculo do potencial de dissociação.....	87
3.2. Perfil de ligação de peptídeos à enzima tripsina-like durante a simulação de 7,5 e 15ns	87
3.3. Estabilidade em água à temperatura ambiente de peptídeos e SKTI	88
3.4. Inibição endógena de enzimas tripsina-like por peptídeos e SKTI no intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	88
3.5. Persistência da enzima tripsina-like e inibição de proteases totais por peptídeos e SKTI no intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	89

4. DISCUSSÃO	90
5. REFERÊNCIAS.....	94
TABELAS	110
FIGURAS	111
CAPÍTULO II: EFEITO DE BPTI E SKTI SOBRE <i>Anticarsia gemmatalis</i> E DESENHO DE PEPTÍDEOS INIBIDORES	116
CAPÍTULO II – ARTIGO I: Inibidor de tripsina-like pancreática bovina e inibidor de tripsina Kunitz de soja: efeitos diferenciais sobre proteases e desenvolvimento larval da praga da soja <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	117
RESUMO.....	117
ABSTRACT	118
1. INTRODUÇÃO	119
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	121
2.1. Abordagem in silico: interação inibidores-tripsinas de <i>A. gemmatalis</i>	121
2.1.1. Determinação da estrutura tridimensional das proteínas: inibidores e enzimas	121
2.1.2. Interação proteína-proteína	121
2.1.3. Dinâmica molecular dos complexos proteína-proteína.....	122
2.2. Parâmetros cinéticos dos inibidores BPTI e SKTI.....	122
2.3. Criação de <i>A. gemmatalis</i> e exposição a inibidores de protease	123
2.4. Inibição de tripsinas-like por dieta artificial e extratos de fezes	123
2.5. Atividade proteolítica nos extratos de intestino médio após 24h de exposição	124
2.6. Perfil proteico dos extratos de intestino médio de lagartas expostas 24h aos inibidores	125
2.7. Processamento proteolítico de BPTI e SKTI por extratos do intestino médio de lagartas expostas 24h aos inibidores	125
2.8. Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier de larvas de <i>A. gemmatalis</i> expostas a BPTI e SKTI	125
3. RESULTADOS	127
3.1. Abordagem in silico: interação inibidores-tripsinas <i>A. gemmatalis</i>	127
3.2. Parâmetros cinéticos dos inibidores BPTI e SKTI em relação à tripsinas-like de <i>A. gemmatalis</i>	128
3.3. Verificação da inibição da tripsina por dieta artificial misturada com IPs	128
3.4. Atividades de proteases in vivo	128

3.5. Parâmetros de digestibilidade de larvas de <i>A. gemmatalis</i> expostas aos inibidores de proteases.....	129
3.6. Verificação da clivagem de PIs por extrato do intestino médio após exposição a BPTI e SKTI através de SDS-PAGE	129
3.7. Inibição das tripsinas-like por extratos de fezes de <i>A. gemmatalis</i> expostas aos inibidores.....	129
3.8. Análise de densitometria de gel carregado com extrato do intestino médio de larvas expostas aos inibidores	130
3.9. Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier para <i>A. gemmatalis</i> expostas a BPTI e SKTI.....	130
4. DISCUSSÃO	131
5. REFERÊNCIAS.....	136
TABELAS	151
FIGURES	152
CAPÍTULO II: ARTIGO II: Atividade inibitória de peptídeos desenhados com base em alças centrais reativas de proteínas BPTI e SKTI: ligação a tripsinas-like de pragas de lepidópteros.....	160
RESUMO.....	160
ABSTRACT	162
1. INTRODUÇÃO	163
2. MATERIAL E MÉTODOS	166
2.1. Proposta de peptídeos	166
2.2. Enzimas tripsinas-like alcalinas de insetos lepidópteros	166
2.3. Docking molecular e análise de dados.....	167
2.4. Avaliação da constante inibitória aparente (KI).....	167
3. RESULTADOS.....	169
3.1. Análise da energia livre de ligação.....	169
3.2. Perfis farmacofóricos.....	169
3.3. Cinética de inibição	170
4. DISCUSSÃO	171
5. REFERÊNCIAS.....	175
TABELAS	190
FIGURAS	191
CONCLUSÃO GERAL	195

1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae: Phaseoleae), é uma importante commodity mundial, sendo utilizada principalmente para a produção de alimentos e biodiesel. Atualmente, o Brasil se destaca como o maior produtor de soja no mundo. Até dezembro de 2021, as estimativas indicam que o Brasil plantou aproximadamente 31% da soja mundial, além de apresentar uma produtividade média 21,5% superior à média global (USDA, 2022). No entanto, mesmo atingindo recordes mundiais, há espaços para crescimento na sojicultura brasileira, tanto há nível de produtividade quanto em sustentabilidade. A título de exemplificação, entre 2019 e 2020, o país aprovou o uso de 475 novos pesticidas, sendo que apenas 8% destes são “biológicos” (BRAGA et al., 2020). Assim, ainda há um vasto campo para a exploração científica de novos compostos pesticidas ambientalmente seguros, capazes, ainda, de conciliar características de eficácia e eficiência equiparáveis aos produtos químicos sem derivativos biológicos.

Os métodos de controle de pragas convencionalmente utilizados no manejo de insetos lepidópteros na soja são constantemente desafiados por herbívoros resistentes, problemas relacionados à saúde e questões ambientais. Neste sentido, moléculas naturais, ambientalmente seguras, com novos modos de ação, precisam ser prospectadas e avaliadas para complementar, ou até mesmo substituir, os produtos químicos atuais utilizados no manejo de pragas (UMETSU; SHIRAI, 2020).

Os inibidores de proteases proteicas são moléculas promissoras para o melhoramento de culturas e manejo de herbívoros. Estas moléculas interagem com proteases e inibem sua atividade, podendo afetar a disponibilidade de aminoácidos livres para o desenvolvimento do inseto. No entanto, a redução do crescimento e da sobrevivência alcançada por estas moléculas raramente é suficiente para reduzir os danos dos insetos no campo (A. GATEHOUSE, 2011). Isso deve ao fato de que os herbívoros desenvolveram estratégias para contornar os efeitos tóxicos dessas moléculas ao longo da evolução. Dentre os mecanismos empregados por herbívoros, destacam-se a expressão de protease insensíveis, superprodução de proteases e clivagem/inativação do inibidor (SINGH et al., 2020; ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015). Neste sentido, inibidores de proteases de não-hospedeiros têm sido testados contra herbívoros, devido a não possuírem associação próxima com os alvos durante a evolução.

Por exemplo, inibidores de protease peptídicos contra insetos lepidópteros, desenvolvidos a partir de loops reativos de inibidores de proteases, identificados via docking molecular apresentaram resultados promissores (MERIÑO-CABRERA et al., 2020; SAIKHEDKAR et al., 2018, 2019). Nestes trabalhos, mesmo após a separação dos *loops* reativos da estrutura 3D dos inibidores de proteases de não-hospedeiros, os inibidores peptídicos reduziram a sobrevivência e afetaram parâmetros biológicos importantes de *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera cosmioides* e *Helicoverpa armigera*.

Moléculas menores, racionalmente desenhadas, baseadas em resultados de cinética enzimática e bioinformática podem auxiliar no desenvolvimento de moléculas capazes de compor formulações biopesticidas. Inibidores de proteases peptídicos são mais estáveis e, portanto, menos propensos à inativação por clivagem proteolítica e perda do sítio reativo. Além disso, peptídeos inibidores podem ser utilizados para gerar proteínas *tandem*. Proteínas em *tandem*, contendo sítio de clivagem para proteases, possivelmente produzem um aumento na concentração molar de peptídeos inibidores no lúmen do intestino de insetos.

Sendo assim, na primeira parte deste trabalho, utilizamos uma abordagem para desenvolver inibidores de proteases pequenos com base em substratos tripeptídicos cuja as afinidades foram determinadas em trabalhos anteriores. Para isso, os peptídeos foram sintetizados sem o sítio de clivagem -C terminal de arginina/lisina presentes na posição P1. Os peptídeos gerados então foram avaliados por análises *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. No segundo capítulo deste trabalho, comparamos os efeitos de inibidor proteico extraído do pâncreas de bovinos (BPTI) – *non-host* – com o inibidor proteico extraído de soja (SKTI) – *host* - na *Anticarsia gemmatalis* e vimos que os sítios reativos destes com tripsinas-*like* deste inseto apresentam potencial para gerar outros inibidores de proteases peptídicos. A prospecção de inibidores de proteases peptídicos pode auxiliar no desenvolvimento de um biopesticida de campo formulado à base de diversos peptídeos inibidores estáveis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar peptídeos e inibidores de proteases quanto ao potencial inseticida para futura composição de formulações biopesticidas e cultivares transgênicos a serem empregados no controle de insetos lepidópteros.

2.2. Objetivos Específicos

Capítulo I

ARTIGO I: Determinar a atividade inibitória dos peptídeos (GORE1 e GORE2) projetados com base em substratos de serino-proteases sobre as enzimas tripsina-*like* de *Anticarsia gemmatalis* mediante *docking* molecular, cinética enzimática e ensaio de sobrevivência.

ARTIGO II: Avaliar o comportamento dinâmico de GORE1 e GORE2 em solução com tripsinas-*like* e avaliar o potencial inibitório *in vivo* destas moléculas.

Capítulo II

ARTIGO I: Analisar por abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo* a viabilidade de utilização da proteína inibitória extraída de mamíferos (BPTI) como potencial inibidor de tripsinas-*like* de *Anticarsia gemmatalis*, comparando as respostas com o inibidor de soja (SKTI).

ARTIGO II: Avaliar as interações entre pentapeptídeos desenhados com base em RCLs (*Reactive center loops*) e tripsinas-*like* alcalinas de insetos lepidópteros, através de *docking molecular* e cinética enzimática.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A soja e os insetos lepidópteros

A soja, *Glycine Max*, é uma das principais commodities mundiais, sendo empregada na alimentação humana e animal. No entanto, este grão apresenta várias outras utilidades. Por exemplo, atualmente, devido aos elevados níveis de produtividade e produção de soja nos países produtores deste grão, o óleo de soja tem sido utilizado para a produção de biodiesel. O biodiesel é um combustível renovável e, portanto, têm contribuído para a sustentabilidade, reduzindo a emissão de gases poluentes no meio ambiente (MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014).

A soja pode ser atacada por inúmeras espécies de lepidópteros, incluindo *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Erebidae), *Chrysodeixis includens* (Walker), *Helicoverpa armigera* (Hübner) e *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) (MACHADO et al., 2022). A fase larval destes insetos, se não controlada, pode causar completa desfolha das plantas de soja, causando enormes prejuízos econômicos ao produtor devido à redução de produtividade e qualidade dos grãos.

Atualmente, o controle de espécies lepidópteras na soja conta com cultivares transgênicas que expressam proteínas entomotóxicas de *Bacillus thuringiensis* (toxina Bt) e uma ampla variedade de inseticidas, em sua maioria, sintéticos (Bueno et al., 2021). A tecnologia Bt é ameaçada devido a evolução de resistência pelas pragas e o aparecimento de pragas secundárias, resistentes as toxinas (TABASHNIK; CARRIÈRE, 2017). Por exemplo, áreas plantadas com cultivares contendo a toxina Cry1Ac, amplamente utilizada nos cultivares transgênicos, têm sofrido mais danos de pragas anteriormente secundárias, como *Rachiplusia nu* (Guenée) and *Crociosema aporema* (Walsingham) (HORIKOSHI et al., 2021). Estratégias de controle calendarizadas, que não levam em consideração as práticas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), causam enorme pressão de seleção nestes insetos e acelera o processo de perda das tecnologias atuais (Bueno et al., 2021).

3.2. Proteases digestivas e insetos lepidópteros

Plantas apresentam baixos conteúdos de proteínas e por este motivo, a digestão de proteínas por insetos fitófagos deve ser muito eficiente, sendo crucial para a o desenvolvimento, crescimento e reprodução destes organismos (NAPOLEÃO et

al., 2019). Sendo assim, os insetos contam com uma ampla variedade de enzimas digestivas, que são produzidas nas células epiteliais e secretadas no lúmen do intestino médio, entrando em contato com o bolo alimentar (HOLTOF et al., 2019).

Proteases pertencem a um grupo de enzimas que catalisam a quebra de proteínas em peptídeos menores e/ou aminoácidos livres. As enzimas proteases são organizadas de acordo com sua função, estrutura primária e natureza do sítio ativo. As principais classes de proteases presentes em insetos herbívoros são serina, treonina, cisteína, aspártico e metalo proteases (TERRA; FERREIRA, 1994). Larvas de insetos lepidópteros têm aproximadamente 95% de sua atividade proteolítica realizada por serino-proteases. Uma serino-protease típica tem uma tríade catalítica que consiste em Histidina, Aspartato e Serina no sítio ativo. O grupo hidroxila de um resíduo de Ser atua como o nucleófilo que ataca a ligação peptídica e um His atua como doador de prótons (HEDSTROM, 2002).

Analisando-se extratos de intestino médio de 12 espécies lepidópteros, constatou-se que a maioria das espécies utiliza um sistema digestivo baseado em serino-proteases do tipo tripsina-*like* e elastase-*like*, e outros dependem amplamente de quimotripsinas-*like* (CHRISTELLER et al., 1992). As enzimas do tipo tripsina-*like* apresentam as maiores eficiências catalíticas entre as serino-proteases nos últimos instares larvais (ou seja, quarto, quinto e sexto) de *A. gemmatalis*, onde ocorre 90% da alimentação do inseto (BOLDT; BIEVER; IGNOFFO, 1975; SILVA JÚNIOR et al., 2020).

3.3. Inibidores de proteases como potenciais biopesticidas

Inibidores de protease desempenham um papel crítico na defesa direta de plantas contra herbívoros e são produzidos sob demanda mediante ao ataque destes organismos (BROADWAY et al., 1986; FAUSTINO et al., 2021; KALLURE et al., 2022). Inibidores de proteases interagem e inibem a atividade de proteases, enzimas que promovem a clivagem de proteínas, transformando-as em aminoácidos livres ou polipeptídios menores. A inibição da atividade proteolítica afeta a disponibilidade de aminoácidos livres para que o inseto se desenvolva, cresça e reproduza (JAMAL et al., 2013).

Diversos trabalhos demonstraram os efeitos tóxicos de inibidores de proteases para herbívoros expostos cronicamente a estas moléculas, via cultivares

transgênicos e dietas artificiais (JADHAV et al., 2016; MENDONÇA et al., 2020; MERIÑO-CABRERA et al., 2019a; PANDEY et al., 2021). No entanto, os herbívoros desenvolveram estratégias para superar o efeito de inibidores de proteases, devido a coevolução com suas plantas hospedeiras. Por este motivo, insetos herbívoros desenvolveram diversos mecanismos para contrapor os efeitos tóxicos de metabólitos e proteínas anti-herbivoria produzidos por plantas, que incluem a reprogramação no set de proteases presente no intestino dos insetos. Por exemplo, para contornar os efeitos tóxicos de inibidores de proteases, destacam-se a expressão de proteases insensíveis, o aumento na síntese da protease alvo e a inativação molecular por proteólise endógena, dentro do intestino médio (SINGH et al., 2020; ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015).

Devido aos complexos mecanismos de adaptação a inibidores de proteases, para se obter resultados práticos relevantes no controle de insetos, se faz necessário a exposição crônica e altas concentrações molares. Por este motivo, a redução na performance de herbívoros expostos à inibidores de proteases, demonstradas pela redução de crescimento e aumento da mortalidade, raramente são suficientes para reduzir danos às culturas a um nível comercialmente aceito (A. GATEHOUSE, 2011). Sendo assim, para que a utilização de inibidores de proteases se torne uma realidade para a agricultura, as limitações associadas aos mecanismos adaptativos dos herbívoros, precisam ser superadas.

No sentido de adaptação de herbívoros à inibidores de proteases, organismos não hospedeiros, apresentam-se como potencial fonte destas moléculas, tendo em vista que os insetos não foram expostos aos inibidores destes organismos. A título de exemplificação, larvas de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) expostas à inibidores de proteases de plantas hospedeiras, apresentaram uma taxa de crescimento média 2,5 vezes maior do que quando expostas à inibidores de plantas não-hospedeiras (PARDE; SHARMA; KACHOLE, 2010). O gafanhoto-do-deserto, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae), apresentou maior redução de crescimento quando expostos à uma mistura de inibidores pacifastin-like, de origem não vegetal, do que quando expostos à inibidores de origem vegetal (SPIT et al., 2012). Além disso, recentemente, novos inibidores de proteases peptídicos altamente estáveis, têm sido racionalmente desenhados com base em regiões reativas de inibidores de proteases proteicos. Nestes trabalhos, loops reativos de serpins (*i.e.*, inibidores de serino-proteases), foram capazes de reduzir a sobrevivência, e afetar

parâmetros biológicos importantes de insetos lepidópteros (MERIÑO-CABRERA et al., 2020; SAIKHEDKAR et al., 2018, 2019).

3.4. Peptídeos

Peptídeos são fragmentos proteicos que afetam funções biológicas. Em sistemas fisiológicos, peptídeos atuam como sinalizadores e moduladores de vias metabólicas, e por isso, são importantes na manutenção da vida da forma como conhecemos (ELLERT-MIKLASZEWSKA; POLESZAK; KAMINSKA, 2017). Recentemente, estas moléculas vêm ganhando atenção devido à diversidade estrutural e flexibilidade, sendo utilizados para controlar interações específicas com seus alvos.

Diversos peptídeos já foram caracterizados quanto ao seu potencial biotecnológico, que incluem desde aplicações terapêuticas na medicina, a aplicações na agricultura. Peptídeos pequenos apresentam diversas vantagens em relação a seus análogos maiores, que incluem: síntese mais econômica tanto em pequena quanto em grande escala, ampla diversidade química, fácil modificação, alta bioatividade, absorvibilidade, acessibilidade, funcionalização ajustável, alta seletividade e especificidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade, alta segurança, baixa toxicidade. No entanto, estas moléculas também apresentam alguns pontos negativos que envolvem baixa estabilidade *in vivo*, devido à ação de proteases, impermeabilidade de membranas seletivas, que dificultam sua chegada aos alvos (APOSTOLOPOULOS et al., 2021).

No entanto, a facilidade de se modificar moléculas peptídicas, pode auxiliar na superação de pontos negativos destas moléculas. Modificações estruturais podem levar à melhoria de suas propriedades físico-químicas. Modificações simples resultam em maior estabilidade geral. Modificações em peptídeos que visam a melhora de estabilidade envolvem o uso de peptídeos contendo dupla ligação e ciclização. Estas modificações podem reduzir a flexibilidade do esqueleto peptídico e, conseqüentemente, diminuir a possibilidade de serem clivados por proteases (LEE et al., 2019). Além disso, variações no comprimento da sequência e cadeias laterais, modificação do esqueleto peptídico, amidação C-terminal, acetilação N-terminal, adição de estabilizantes (açúcares, sais, heparina) e agentes quelantes, por exemplo, ácido etilendiaminotetracético (EDTA), conjugações com grandes polímeros

biocompatíveis, como polietilenoglicol (PEG), ou ácidos graxos podem ser aplicados (HAGGAG, 2018).

No contexto de controle de insetos pragas, diversos trabalhos foram desenvolvidos a fim de prospectar peptídeos para compor formulações biopesticidas, devido ao elevado apelo sustentável deste tipo de molécula. Saikhedkar et al., 2018 testaram tripeptídeos desenhados com base no sítio reativo de inibidores de proteases de plantas não hospedeiras contra *Helicoverpa armigera*. Pequenas concentrações dos tripeptídeos, de 100 a 200 ppm, foram capazes de reduzir a atividade de serino-proteases e diminuir o fitness de larvas, que apresentaram menor peso e formaram adultos defeituosos. Os mesmo peptídeos que apresentam atividade anti-inseto foram posteriormente ciclizados por Saikhedkar et al., 2019 e discos foliares foram mergulhados (*leaf-dip assay*) em soluções de 10 μ M contendo os peptídeos. Neste ensaio, foram observados menor consumo foliar, diminuição do crescimento, parâmetros de digestibilidade e sobrevivência de larvas de *Spodoptera litura* e *Helicoverpa armigera*. Mais recentemente, um trabalho do grupo de pesquisa do laboratório de “Enzimologia e Bioquímica de Proteínas e Peptídeos” também demonstrou resultados promissores de peptídeos inibidores de proteases no controle de *Spodoptera cosmioides*. Neste trabalho, dois peptídeos desenhados com base no sítio reativo dos inibidores não hospedeiros de *Inga laurina trypsin inhibitor* (ILTI) e *Adenantha pavonina trypsin inhibitor* (APTI) reduziram a sobrevivência em 50% a sobrevivência de larvas de *Spodoptera cosmioides* após exposição crônica às moléculas (MERIÑO-CABRERA et al., 2020).

3.5. BPTI (Bovine pancreatic trypsin inhibitor) e SKTI (Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor)

A aprotinina é um inibidor de protease de 58 resíduos altamente estável, que contém três ligações dissulfeto. A aprotinina reage rapidamente com serino-proteases para formar complexos estáveis, inibindo assim as atividades das enzimas (BORJIGIN; NATHANS, 1993). A aprotinina é um membro clássico da família de proteínas dos inibidores de serino-protease do tipo Kunitz. Suas funções fisiológicas incluem a inibição protetora da principal enzima digestiva, tripsina quando são produzidas pequenas quantidades, pela clivagem do precursor do tripsinogênio durante o armazenamento no pâncreas (DAVIS; WHITTINGTON, 1995). A aprotinina

foi usada como um medicamento administrado por injeção para reduzir o sangramento durante cirurgias complexas, como cirurgias cardíacas e hepáticas. A droga foi temporariamente retirada em todo o mundo em 2007, depois que estudos sugeriram que seu uso, em casos cirúrgicos, aumentava o risco de complicações ou morte (BENNETT-GUERRERO et al., 2010).

O SKTI é um inibidor de protease proteico de enzimas tripsinas-*like*, presentes em altas concentrações nas sementes de soja e induzíveis nas folhas atacadas por insetos herbívoros (FAUSTINO et al., 2021). A proteína inibitória contém de 170 a 220 resíduos de aminoácidos e uma ou duas ligações dissulfeto intra-cadeia, que conferem estabilidade a molécula (ROYCHAUDHURI et al., 2003).

Os inibidores de serino-proteases requerem uma estrutura tridimensional específica para que inibam as proteases. Estas moléculas se ligam fortemente às proteases, bloqueando seu sítio ativo e formando instantaneamente um complexo altamente estável, interrompendo a digestão de certas proteínas. Neste sentido, o contato entre o sítio ativo dos inibidores de proteases com o sítio ativo das proteases alvo, são frequentemente relacionados à estrutura tridimensional. A dependência de inibidores de proteases naturais de sua estrutura tridimensional, é uma característica explorada por herbívoros para a inativação destes dentro do intestino médio (SINGH et al., 2020).

3.6. Modelagem molecular, docking e dinâmica molecular

A caracterização estrutural de sequências proteicas de interesse, prospectadas por técnicas como proteômica, genômica e transcriptômica podem ser preditas rapidamente por homologia. Na modelagem por homologia, a sequência alvo é predita de acordo com sua similaridade a uma proteína de estrutura conhecida (WATERHOUSE et al., 2018). Proteínas com estruturas conhecidas, geralmente, se encontram no PDB (Protein Data Bank) e foram determinadas por técnicas como cristalografia por raios-X e ressonância magnética nuclear. Estas técnicas, demandam elevado conhecimento e habilidade, além de demandar muito tempo. Por este motivo, vários pesquisadores das ciências da vida, recorrem à modelagem molecular para solucionar rapidamente, grandes quantidades de sequências de proteínas obtidas por técnicas ômicas.

A modelagem por homologia é possível graças à evolução de proteínas, que obedecem algumas regras como: sequências de aminoácidos semelhantes, resultam em estruturas 3D semelhantes; proteínas homólogas possuem regiões conservadas, que podem ser identificadas por alinhamento de sequências, as proteínas se agrupam em número limitado de famílias tridimensionais, possibilitando modelar as proteínas se já houver pelo menos um membro da família que já possui estrutura 3D determinada experimentalmente (WATERHOUSE et al., 2018).

Estruturas proteicas modeladas e/ou determinadas experimentalmente, podem ser utilizadas para compreender os mecanismos de reconhecimento molecular proteína-ligante *in silico*. O processo de *docking* envolve duas etapas básicas: previsão da conformação do ligante, bem como sua posição e orientação dentro dos sítios do receptor e avaliação da afinidade de ligação. Para isso, diversos algoritmos foram desenvolvidos, como por exemplo o CLUSPRO. Este servidor realiza o *docking* de corpo rígido e gera 109 complexos, realizando movimentos de rotação e translação de uma proteína (“ligante”) em relação a outra (“receptor”, mantido fixo) (KOZAKOV et al., 2017). A obtenção de uma descrição acurada e automatizada das interações entre moléculas, permite a redução de tempo e dos custos envolvidos no desenho racional de novas moléculas com potencial biotecnológico (DÍAZ et al., 2020).

A capacidade computacional atual, permitiu o desenvolvimento de ferramentas complementares ao *docking molecular* que possibilitam uma predição mais acurada das ligações entre ligante-receptor. Embora ainda muito utilizado, devido ao reduzido esforço computacional, o *docking molecular* apresenta confiabilidade reduzida quando comparado ao método computacional de dinâmica molecular. Isto se deve, principalmente, pelo fato de que os algoritmos para *docking molecular* não levam em consideração a flexibilidade do receptor. A dinâmica molecular permite avaliar a flexibilidade do complexo durante um intervalo de tempo. As interações do complexo nas simulações de dinâmica molecular são levadas em consideração de maneira mais realista que o *docking molecular* uma vez que receptores e ligantes podem “experimentar” diversas mudanças conformacionais durante o processo de reconhecimento molecular (SANTOS; FERREIRA; CAFFARENA, 2019).

4. REFERÊNCIAS

- A. GATEHOUSE, John. Prospects for Using Proteinase Inhibitors to Protect Transgenic Plants Against Attack by Herbivorous Insects. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 409–416, 2011. DOI: 10.2174/138920311796391142.
- A. JONGSMA, Maarten; BEEKWILDER, Jules. Co-Evolution of Insect Proteases and Plant Protease Inhibitors. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 437–447, 2011. DOI: 10.2174/138920311796391115.
- AHN, J. E.; SALZMAN, R. A.; BRAUNAGEL, S. C.; KOIWA, H.; ZHU-SALZMAN, K. Functional roles of specific bruchid protease isoforms in adaptation to a soybean protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, v. 13, n. 6, p. 649–657, 2004. DOI: 10.1111/j.0962-1075.2004.00523.x.
- ALMEIDA BARROS, Rafael; MERIÑO-CABRERA, Yaremis; VITAL, Camilo E.; SILVA JÚNIOR, Neilier R.; OLIVEIRA, Cauê N.; LESSA BARBOSA, Samuel; MARQUES GONÇALVES ASSIS, João V; RAMOS, Humberto JO; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. 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. DOI: 10.1002/ps.6191.
- AMBADAPADI, Sriram et al. Reactive Center Loop (RCL) Peptides Derived from Serpins Display Independent Coagulation and Immune Modulating Activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 6, p. 2874–2887, 2016. DOI: 10.1074/jbc.M115.704841.
- APOSTOLOPOULOS, Vasso et al. A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 430, 2021. DOI: 10.3390/molecules26020430.
- ARTHUR, David Ebuka; UZAIRU, Adamu. Molecular docking studies on the interaction of NCI anticancer analogues with human Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit. **Journal of King Saud University - Science**, v. 31, n. 4, p. 1151–1166, 2019. DOI: 10.1016/j.jksus.2019.01.011.
- ASCENZI, Paolo; BOCEDI, Alessio; BOLOGNESI, Martino; SPALLAROSSA, Andrea; COLETTA, Massimo; CRISTOFARO, Raimondo; MENEGATTI, Enea. The Bovine Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor (Kunitz Inhibitor): A Milestone Protein. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, n. 3, p. 231–251, 2003. DOI: 10.2174/1389203033487180.
- BALE, J. S.; VAN LENTEREN, J. C.; BIGLER, F. Biological control and sustainable food production. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1492, p. 761–776, 2008. DOI: 10.1098/rstb.2007.2182.
- BENNETT-GUERRERO, Elliott; SONG, Howard K.; ZHAO, Yue; FERGUSON, T. B.; GAMMIE, James S.; PETERSON, Eric D.; O'BRIEN, Sean M. Temporal Changes in the Use of Blood Products for Coronary Artery Bypass Graft Surgery in North America: An Analysis of the Society of Thoracic Surgeons Adult Cardiac

Database. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 24, n. 5, p. 814–816, 2010. DOI: 10.1053/j.jvca.2010.06.003.

BERGVINSON, David; GARCÍA-LARA, Silverio. **Genetic approaches to reducing losses of stored grain to insects and diseases. Current Opinion in Plant Biology**, 2004. DOI: 10.1016/j.pbi.2004.05.001.

BERNARDI, Roberta; TEDESCHI, Gabriella; RONCHI, Severino; PALMIERI, Sandro. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like enzyme from larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hu`bner (Lepidoptera: pyralidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 8–9, p. 883–889, 1996. DOI: 10.1016/S0965-1748(96)00057-4.

BEZERRA, César da Silva; OLIVEIRA, Carolina Turatti; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. Inga vera trypsin inhibitor interferes in the proteolytic activity and nutritional physiology of *Ephesia kuehniella* larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 2017. DOI: 10.1111/eea.12605.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistics Notes: Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). **BMJ**, v. 317, n. 7172, p. 1572–1580, 1998. DOI: 10.1136/bmj.317.7172.1572.

BOJKOVA, Denisa et al. Aprotinin Inhibits SARS-CoV-2 Replication. **Cells**, v. 9, n. 11, p. 2377, 2020. DOI: 10.3390/cells9112377.

BOLDT, P. E.; BIEVER, K. D.; IGNOFFO, C. M. Lepidopteran Pests of Soybeans: Consumption of Soybean Foliage and Pods and Development Time. **Journal of Economic Entomology**, v. 68, n. 4, p. 480–482, 1975. DOI: 10.1093/jee/68.4.480.

BOND, J. G.; RAMÍREZ-OSORIO, A.; MARINA, C. F.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; LIEDO, P.; DOR, A.; WILLIAMS, T. Efficiency of two larval diets for mass-rearing of the mosquito *Aedes aegypti*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187420, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0187420.

BORJIGIN, J.; NATHANS, J. Bovine pancreatic trypsin inhibitor-trypsin complex as a detection system for recombinant proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 1, p. 337–341, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.1.337.

BRAGA, Anna Rafaela Cavalcante; DE ROSSO, Veridiana Vera; HARAYASHIKI, Cyntia Ayumi Yokota; JIMENEZ, Paula Christine; CASTRO, Ítalo Braga. Global health risks from pesticide use in Brazil. **Nature Food**, v. 1, n. 6, p. 312–314, 2020. DOI: 10.1038/s43016-020-0100-3.

BREUGELMANS, Bert; SIMONET, Gert; VAN HOEF, Vincent; VAN SOEST, Sofie; VANDEN BROECK, Jozef. Pacifastin-related peptides: Structural and functional characteristics of a family of serine peptidase inhibitors. **Peptides**, v. 30, n. 3, p. 622–632, 2009. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.07.026.

BROADWAY, Roxanne M.; DUFFEY, Sean S.; PEARCE, Gregory; RYAN, Clarence A. Plant Proteinase inhibitors: A defense against herbivorous insects? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 41, n. 1, p. 33–38, 1986. DOI: 10.1111/j.1570-7458.1986.tb02168.x.

- BUENO, A. F.; PANIZZI, A. R.; HUNT, T. E.; DOURADO, P. M.; PITTA, R. M.; GONÇALVES, J. Challenges for Adoption of Integrated Pest Management (IPM): the Soybean Example. **Neotropical Entomology**, v. 50, n. 1, p. 5–20, 2021. DOI: 10.1007/s13744-020-00792-9.
- CARNEIRO, Eliane; SILVA, Luciana Barboza; SILVA, Alexandre Faria Da; LOPES, Gleidyane Novais; PAVAN, Bruno Ettore; RODRIGUES, Raimundo Henrique Ferreira; CARVALHINHO, Diego Tavares; MIELEZRSKI, Diego Fabio. Lepidopteran pests associated with the soybean cultivars phenology. **Bioscience Journal**, p. 112–121, 2018. DOI: 10.14393/BJ-v34n1a2018-37172.
- CASIDA, John E.; QUISTAD, Gary B. **Golden age of insecticide research: Past, present, or future?** **Annual Review of Entomology**, 1998. DOI: 10.1146/annurev.ento.43.1.1.
- CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; GRANT, W. P.; GREAVES, J.; TATCHELL, G. M. Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability. **Trends in Food Science and Technology**, 2008. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.12.009.
- CHRISTELLER, J. T.; LAING, W. A.; MARKWICK, N. P.; BURGESS, E. P. J. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: Dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, n. 7, p. 735–746, 1992. DOI: 10.1016/0965-1748(92)90052-G.
- CIEMNY, Maciej; KURCINSKI, Mateusz; KAMEL, Karol; KOLINSKI, Andrzej; ALAM, Nawsad; SCHUELER-FURMAN, Ora; KMIECIK, Sebastian. Protein–peptide docking: opportunities and challenges. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 8, p. 1530–1537, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.05.006>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644617305937>.
- COMEAU, S. R.; GATCHELL, D. W.; VAJDA, S.; CAMACHO, C. J. ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server, p. W96–W99, 2004. DOI: 10.1093/nar/gkh354.
- COPELAND, Robert A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. [s.l.] : Wiley, 2013. DOI: 10.1002/9781118540398.
- CRUZ, Ana C. B. et al. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from *Catanduva (Piptadenia moniliformis)* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 61–68, 2013. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.04.023.
- DANTZGER, Miriam; VASCONCELOS, Ilka Maria; SCORSATO, Valéria; APARICIO, Ricardo; MARANGONI, Sergio; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. Bowman–Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical properties and insecticidal potential. **Phytochemistry**, v. 118, p. 224–235, 2015. DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.08.013.
- DASTRANJ, M.; BORZOU, E.; BANDANI, A. R.; FRANCO, O. L. Inhibitory effects of an extract from non-host plants on physiological characteristics of two major cabbage pests. **Bulletin of Entomological Research**, v. 108, n. 3, p. 370–379, 2018. DOI: 10.1017/S0007485317000864.
- DAVIS, Rick; WHITTINGTON, Ruth. Aprotinin. **Drugs**, v. 49, n. 6, p. 954–983, 1995. DOI: 10.2165/00003495-199549060-00008.

- DE OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho; DE PAULA SOUZA, Thaís; PARRA, José Roberto Postali; MARANGONI, Sergio; DE CASTRO SILVA-FILHO, Marcio; MACEDO, Maria Ligia Rodrigues. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, 2013. DOI: 10.1016/j.cbpb.2013.02.008.
- DÍAZ, Katy; ESPINOZA, Luis; CARVAJAL, Rodrigo; CONDE-GONZÁLEZ, Marcos; NIEBLA, Vladimir; OLEA, Andrés F.; COLL, Yamilet. Biological Activities and Molecular Docking of Brassinosteroids 24-Norcholeane Type Analogs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1832, 2020. DOI: 10.3390/ijms21051832.
- DO AMARAL, Milena; FREITAS, Ana Camila Oliveira; SANTOS, Ariana Silva; DOS SANTOS, Everton Cruz; FERREIRA, Monaliza Macêdo; DA SILVA GESTEIRA, Abelmon; GRAMACHO, Karina Peres; MARINHO-PRADO, Jeanne Scardini; PIROVANI, Carlos Priminho. TcTI, a Kunitz-type trypsin inhibitor from cocoa associated with defense against pathogens. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 698, 2022. DOI: 10.1038/s41598-021-04700-y.
- DOSA, Stefan; STIRNBERG, Marit; LÜLSBORFF, Verena; HÄUSSLER, Daniela; MAURER, Eva; GÜTSCHOW, Michael. Active site mapping of trypsin, thrombin and matriptase-2 by sulfamoyl benzamidines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 21, p. 6489–6505, 2012. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.08.042.
- DUNSE, K. M.; KAAS, Q.; GUARINO, R. F.; BARTON, P. A.; CRAIK, D. J.; ANDERSON, M. A. Molecular basis for the resistance of an insect chymotrypsin to a potato type II proteinase inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 34, p. 15016–15021, 2010. DOI: 10.1073/pnas.1009327107.
- ELLERT-MIKLASZEWSKA, Aleksandra; POLESZAK, Katarzyna; KAMINSKA, Bozena. Short peptides interfering with signaling pathways as new therapeutic tools for cancer treatment. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 199–221, 2017. DOI: 10.4155/fmc-2016-0189.
- ELZEN, Gary W.; HARDEE, Dick D. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on managing insect resistance to insecticides. **Pest Management Science**, 2003. DOI: 10.1002/ps.659.
- ERLANGER, Bernard F.; KOKOWSKY, Nicholas; COHEN, William. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1961. a. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X.
- FATHIPOUR, Yaghoub; SEDARATIAN, Amin; BAGHERI, Abdoolnabi; TALAEI-HASSANLOUEI, Reza. Increased food utilization indices and decreased proteolytic activity in *Helicoverpa armigera* larvae fed sublethal *Bacillus thuringiensis* -treated diet. **Physiological Entomology**, v. 44, n. 3–4, p. 178–186, 2019. DOI: 10.1111/phen.12288.
- FAUSTINO, Verônica Aparecida et al. Soybean plants under simultaneous signals of drought and *Anticarsia gemmatalis* herbivory trigger gene expression and metabolic pathways reducing larval survival. **Environmental and Experimental Botany**, v. 190, p. 104594, 2021. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2021.104594.

- FIANDRA, L.; CASARTELLI, M.; CERMENATI, G.; BURLINI, N.; GIORDANA, B. The intestinal barrier in lepidopteran larvae: Permeability of the peritrophic membrane and of the midgut epithelium to two biologically active peptides. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 1, p. 10–18, 2009. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2008.09.005.
- FINN, Robert D. et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkv1344.
- GASTEIGER, E. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3784–3788, 2003. DOI: 10.1093/nar/gkg563.
- GEPPERT, Tim; HOY, Benjamin; WESSLER, Silja; SCHNEIDER, Gisbert. Context-Based Identification of Protein-Protein Interfaces and “Hot-Spot” Residues. **Chemistry & Biology**, v. 18, n. 3, p. 344–353, 2011. DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.01.005.
- GIRARD, Cécile; LE MÉTAYER, Martine; BONADÉ-BOTTINO, Michel; PHAM-DELÈGUE, Minh-Hà; JOUANIN, Lise. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 229–237, 1998. DOI: 10.1016/S0965-1748(98)00027-7.
- GIRI, Ashok P.; HARSULKAR, Abhay M.; DESHPANDE, Vasanti V.; SAINANI, Mohini N.; GUPTA, Vidya S.; RANJEKAR, Prabhakar K. Chickpea Defensive Proteinase Inhibitors Can Be Inactivated by Podborer Gut Proteinases1. **Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 393–401, 1998. DOI: 10.1104/pp.116.1.393.
- GLENNON, Richard A. et al. Binding of O -Alkyl Derivatives of Serotonin at Human 5-HT1D β Receptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 314–322, 1996. DOI: 10.1021/jm950498t.
- GRANDE, Marcela Laiz Mora; RANDO, Jael Simões Santos. Integrated pest control adopted by soybean and corn farmers in Londrina, Paraná state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, n. 0, 2018. DOI: 10.1590/1808-1657000242015.
- GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium123. **Journal of Economic Entomology**, 1976. DOI: 10.1093/jee/69.4.487.
- GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl, p. W270–W277, 2011. DOI: 10.1093/nar/gkr366.
- GROVER, Sheetanshu; KAUR, Satvir; GUPTA, Anil Kumar; TAGGAR, Gaurav Kumar; KAUR, Jagmeet. Characterization of Trypsin Like Protease from *Helicoverpa armigera* (Hubner) and Its Potential Inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 88, n. 1, p. 49–56, 2018. DOI: 10.1007/s40011-016-0732-0.
- GUO, Peng-Chao; DONG, Zhaoming; ZHAO, Ping; ZHANG, Yan; HE, Huawei; TAN, Xiang; ZHANG, Weiwei; XIA, Qingyou. Structural insights into the unique

- inhibitory mechanism of the silkworm protease inhibitor serpin18. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11863, 2015. DOI: 10.1038/srep11863.
- HAGGAG, Yusuf A. Peptides as Drug Candidates: Limitations and Recent Development Perspectives. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 8, n. 4, 2018. DOI: 10.26717/BJSTR.2018.08.001694.
- HANSSON, Tomas; MARELIUS, John; ÅQVIST, Johan. Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, 1998. DOI: 10.1023/A:1007930623000.
- HARTL, Markus; GIRI, Ashok P.; KAUR, Harleen; BALDWIN, Ian T. The multiple functions of plant serine protease inhibitors. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 7, p. 1009–1011, 2011. DOI: 10.4161/psb.6.7.15504.
- HEDSTROM, Lizbeth. Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501–4524, 2002. DOI: 10.1021/cr000033x.
- HEGEDUS, Dwayne; BALDWIN, Doug; O'GRADY, Michael; BRAUN, Lorraine; GLEDDIE, Steve; SHARPE, Andrew; LYDIATE, Derek; ERLANDSON, Martin. Midgut proteases from *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: Characterization, cDNA cloning, and expressed sequence tag analysis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 53, n. 1, p. 30–47, 2003. DOI: 10.1002/arch.10084.
- HEMATI, S. A.; NASERI, B.; GANBALANI, G. Nouri; DASTJERDI, H. Rafiee; GOLIZADEH, A. Effect of Different Host Plants on Nutritional Indices of the Pod Borer, *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Science**, v. 12, n. 55, p. 1–15, 2012. DOI: 10.1673/031.012.5501.
- HERREBOUT, W. A.; SUHM, M. A. Weak hydrogen bonds – strong effects? **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 31, p. 13858, 2011. DOI: 10.1039/c1cp90110a.
- HOLTOF, Michiel; LENAERTS, Cynthia; CULLEN, Darron; VANDEN BROECK, Jozef. Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut. **Cell and Tissue Research**, v. 377, n. 3, p. 397–414, 2019. DOI: 10.1007/s00441-019-03031-9.
- HORIKOSHI, Renato J. et al. Resistance status of lepidopteran soybean pests following large-scale use of MON 87701 × MON 89788 soybean in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 21323, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-00770-0.
- HUANG, Jing; RAUSCHER, Sarah; NAWROCKI, Grzegorz; RAN, Ting; FEIG, Michael; DE GROOT, Bert L.; GRUBMÜLLER, Helmut; MACKERELL, Alexander D. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. **Nature Methods**, v. 14, n. 1, p. 71–73, 2017. DOI: 10.1038/nmeth.4067.
- JADHAV, Abhilash R.; WAR, Abdul R.; NIKAM, Ashwini N.; ADHAV, Anmol S.; GUPTA, Vidya S.; SHARMA, Hari C.; GIRI, Ashok P.; TAMHANE, Vaijayanti A. Capsicum annuum proteinase inhibitor ingestion negatively impacts the growth of sorghum pest *Chilo partellus* and promotes differential protease expression. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 8, p. 302–309, 2016. DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.09.016.

- JAMAL, Farrukh; PANDEY, Prabhaskar K.; SINGH, Dushyant; KHAN, M. Y. **Serine protease inhibitors in plants: Nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochemistry Reviews***, 2013. DOI: 10.1007/s11101-012-9231-y.
- JANIN, Joël; HENRICK, Kim; MOULT, John; EYCK, Lynn Ten; STERNBERG, Michael J. E.; VAJDA, Sandor; VAKSER, Ilya; WODAK, Shoshana J. CAPRI: A critical assessment of PRedicted interactions. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, 2003. DOI: 10.1002/prot.10381.
- JANKOWSKA, Milena; ROGALSKA, Justyna; WYSZKOWSKA, Joanna; STANKIEWICZ, Maria. Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System—A Review. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 34, 2017. DOI: 10.3390/molecules23010034.
- JUNG, Hyun Ah; ALI, Md Yousof; CHOI, Ran Joo; JEONG, Hyong Oh; CHUNG, Hae Young; CHOI, Jae Sue. Kinetics and molecular docking studies of fucosterol and fucoxanthin, BACE1 inhibitors from brown algae *Undaria pinnatifida* and *Ecklonia stolonifera*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 89, p. 104–111, 2016. DOI: 10.1016/j.fct.2016.01.014.
- KAHLER, Ursula; FUCHS, Julian E.; GOETTIG, Peter; LIEDL, Klaus R. An unexpected switch in peptide binding mode: from simulation to substrate specificity. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2018. DOI: 10.1080/07391102.2017.1407674.
- KALLURE, Gopal S.; KUMARI, Archana; SHINDE, Balkrishna A.; GIRI, Ashok P. Characterized constituents of insect herbivore oral secretions and their influence on the regulation of plant defenses. **Phytochemistry**, v. 193, p. 113008, 2022. DOI: 10.1016/j.phytochem.2021.113008.
- KANT, M. R. et al. Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. **Annals of Botany**, v. 115, n. 7, p. 1015–1051, 2015. DOI: 10.1093/aob/mcv054.
- KASPAR, Allan A.; REICHERT, Janice M. **Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discovery Today***, 2013. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.05.011.
- KATOCH, Rajan. Insect Pest Resistance Factors in Rice Bean. *In: Ricebean*. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 233–270. DOI: 10.1007/978-981-15-5293-9_14.
- KELLEY, Lawrence A.; MEZULIS, Stefans; YATES, Christopher M.; WASS, Mark N.; STERNBERG, Michael J. E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.
- KHAN, Hafiz Azhar Ali. Characterization of permethrin resistance in a *Musca domestica* strain: resistance development, cross-resistance potential and realized heritability. **Pest Management Science**, v. 75, n. 11, p. 2969–2974, 2019. DOI: 10.1002/ps.5409.
- KIMURA, S. Roy; BROWER, Richard C.; VAJDA, Sandor; CAMACHO, Carlos J. Dynamical View of the Positions of Key Side Chains in Protein-Protein

- Recognition. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 2, p. 635–642, 2001. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)76044-4.
- KOIDE, Takehiko; IKENAKA, Tokuji; TSUNASAWA, Susumu. Studies on Soybean Trypsin Inhibitors. 2. Amino-Acid Sequence around the Reactive Site of Soybean Trypsin Inhibitor (Kunitz). **European Journal of Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 408–416, 1973. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb02623.x.
- KORTBEEK, Ruy W. J.; VAN DER GRAGT, Michelle; BLEEKER, Petra M. Endogenous plant metabolites against insects. **European Journal of Plant Pathology**, v. 154, n. 1, p. 67–90, 2019. DOI: 10.1007/s10658-018-1540-6.
- KOZAKOV, Dima; HALL, David R.; XIA, Bing; PORTER, Kathryn A.; PADHORNY, Dzmitry; YUEH, Christine; BEGLOV, Dmitri; VAJDA, Sandor. The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature Protocols**, v. 12, n. 2, p. 255–278, 2017. DOI: 10.1038/nprot.2016.169.
- KUWAR, Suyog S.; PAUCHET, Yannick; VOGEL, Heiko; HECKEL, David G. Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut of *Helicoverpa armigera* in response to a plant protease inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2015. DOI: 10.1016/j.ibmb.2015.01.016.
- LAND, Henrik; HUMBLE, Maria Svedendahl. YASARA: A tool to obtain structural guidance in biocatalytic investigations. *In: Methods in Molecular Biology*. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1007/978-1-4939-7366-8_4.
- LEE, Andy Chi-Lung; HARRIS, Janelle Louise; KHANNA, Kum Kum; HONG, Ji-Hong. A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2383, 2019. DOI: 10.3390/ijms20102383.
- LEWIS, Sidney D.; NG, Assunta S.; BALDWIN, John J.; FUSETANI, Nobuhiro; NAYLOR, Adel M.; SHAFER, Jules A. Inhibition of thrombin and other trypsin-like serine proteinases by cyclotheonamide A. **Thrombosis Research**, v. 70, n. 2, p. 173–190, 1993. DOI: 10.1016/0049-3848(93)90158-K.
- LIANG, Guyan; PHILLIP BOWEN, J. Development of Trypsin-Like Serine Protease Inhibitors as Therapeutic Agents: Opportunities, Challenges, and their Unique Structure-Based Rationales. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 13, p. 1506–1529, 2016. DOI: 10.2174/1568026615666150915121447.
- LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; MARANA, S. R.; JULIANO, L.; TERRA, W. R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 130–140, 2006. DOI: 10.1016/j.ibmb.2005.11.006.
- MACALINO, Stephani Joy Y.; BASITH, Shaherin; CLAVIO, Nina Abigail B.; CHANG, Hyerim; KANG, Soosung; CHOI, Sun. Evolution of In Silico Strategies for Protein-Protein Interaction Drug Discovery. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1963, 2018. DOI: 10.3390/molecules23081963.
- MACHADO, Eduardo P. et al. Interspecific Variation in Susceptibility to Insecticides by Lepidopteran Pests of Soybean, Cotton, and Maize Crops From Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 2022. DOI: 10.1093/jee/toab265.

- MACHADO, Suzy Wider; DE OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho; ZÉRIO, Neide Graciano; PARRA, José Roberto Postali; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. *Inga laurina* trypsin inhibitor (ILTI) obstructs *Spodoptera frugiperda* trypsins expressed during adaptive mechanisms against plant protease inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 95, n. 4, p. e21393, 2017. DOI: 10.1002/arch.21393.
- MARKUS DITTRICH; CHALERMPOL KANCHANAWARIN. **Case Study: BPTI2008**. p. 1–19.
- MEDIC, Jelena; ATKINSON, Christine; HURBURGH, Charles R. Current Knowledge in Soybean Composition. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 3, p. 363–384, 2014. DOI: 10.1007/s11746-013-2407-9.
- MENDONÇA, Eduardo G.; ALMEIDA BARROS, Rafael; CORDEIRO, Gláucia; SILVA, Carolina R.; CAMPOS, Wellington G.; OLIVEIRA, Joel A.; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Larval development and proteolytic activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to different soybean protease inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 1, 2020. DOI: 10.1002/arch.21637.
- MERIÑO-CABRERA, Yaremis; CASTRO, José Severiche; DE ALMEIDA BARROS, Rafael; DA SILVA JUNIOR, Neillier Rodrigues; DE OLIVEIRA RAMOS, Humberto; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Arginine-containing dipeptides decrease affinity of gut trypsins and compromise soybean pest development. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, p. 105107, 2022. DOI: 10.1016/j.pestbp.2022.105107.
- MERIÑO-CABRERA, Yaremis; OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Inhibition of digestive trypsins by plant Kunitz proteins reduces the viability of *Spodoptera cosmioides* larvae. **Annals of Applied Biology**, v. 175, n. 3, p. 336–349, 2019. a. DOI: 10.1111/aab.12539.
- MERIÑO-CABRERA, Yaremis; OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Inhibition of digestive trypsins by plant Kunitz proteins reduces the viability of *Spodoptera cosmioides* larvae. **Annals of Applied Biology**, v. 175, n. 3, p. 336–349, 2019. b. DOI: 10.1111/aab.12539.
- MERIÑO-CABRERA, Yaremis; SEVERICHE CASTRO, José Gregório; RIOS DIEZ, Juan Diego; RODRIGUES MACEDO, Maria Lígia; DE OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; GORETI DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria. Rational design of mimetic peptides based on the interaction between *Inga laurina* inhibitor and trypsins for *Spodoptera cosmioides* pest control. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, p. 103390, 2020. DOI: 10.1016/j.ibmb.2020.103390.
- MERSKI, Matthew; MOREIRA, Cátia; ABREU, Rui MV; RAMOS, Maria João; FERNANDES, Pedro A.; MARTINS, L. Miguel; PEREIRA, Pedro José Barbosa; MACEDO-RIBEIRO, Sandra. Molecular motion regulates the activity of the Mitochondrial Serine Protease HtrA2. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 10, p. e3119–e3119, 2017. DOI: 10.1038/cddis.2017.487.

- MICHAUD, D.; CANTIN, L.; VRAIN, T. C. Carboxy-Terminal Truncation of Oryzacystatin II by Oryzacystatin-Insensitive Insect Digestive Proteinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 322, n. 2, p. 469–474, 1995. DOI: 10.1006/abbi.1995.1490.
- MIRZAEI, Mahta; MIRDAMADI, Saeed; SAFAVI, Maliheh; SOLEYMANZADEH, Nazila. The stability of antioxidant and ACE-inhibitory peptides as influenced by peptide sequences. **LWT**, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109710.
- MOCZYDLOWSKI, Edward; MOSS, Guy W. J.; LUCCHESI, Kathryn J. Bovine pancreatic trypsin inhibitor as a probe of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels at an internal site of interaction. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 1, p. 21–28, 1992. DOI: 10.1016/0006-2952(92)90656-4.
- MOREIRA, Irina S.; FERNANDES, Pedro A.; RAMOS, Maria J. Hot spots-A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 68, n. 4, p. 803–812, 2007. DOI: 10.1002/prot.21396.
- NAPOLEÃO, Thiago H.; ALBUQUERQUE, Lidiane P.; SANTOS, Nataly DL; NOVA, Isabella CV; LIMA, Thâmarah A.; PAIVA, Patrícia MG; PONTUAL, Emmanuel V. Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. **Pest Management Science**, v. 75, n. 5, p. 1212–1222, 2019. DOI: 10.1002/ps.5233.
- NAUEN, Ralf; STEINBACH, Denise. Resistance to diamide insecticides in lepidopteran pests. *In: Advances in Insect Control and Resistance Management*. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1007/978-3-319-31800-4_12.
- NOWICKI, Patryk; KUCZER, Mariola; SCHROEDER, Grzegorz; CZARNIEWSKA, Elżbieta. Disruption of insect immunity using analogs of the pleiotropic insect peptide hormone Neb-colloostatin: a nanotech approach for pest control II. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 9459, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-87878-5.
- OERKE, E. C. **Crop losses to pests**. **Journal of Agricultural Science**, 2006. DOI: 10.1017/S0021859605005708.
- OLIVEIRA, M. G. A.; DE SIMONE, S. G.; XAVIER, L. P.; GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, n. 3, p. 369–380, 2005. DOI: 10.1016/j.cbpc.2004.10.018.
- OLIVEIRA, M. G.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. Identification by covalent labeling with p-diazoniumbenzamidinium and kinetic characterization of Tyr-151-(p-benzamidino)-azo-beta-trypsin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 36, p. 26893–26903, 1993. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)74195-7.
- OONINCX, Dennis G. A. B.; VAN BROEKHOVEN, Sarah; VAN HUIS, Arnold; VAN LOON, Joop J. A. Feed Conversion, Survival and Development, and Composition

- of Four Insect Species on Diets Composed of Food By-Products. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0144601, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0144601.
- OPPERT, Brenda; MORGAN, Tom D.; KRAMER, Karl J. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin and protease inhibitors against coleopteran storage pests. **Pest Management Science**, v. 67, n. 5, p. 568–573, 2011. DOI: 10.1002/ps.2099.
- PANDEY, Ankesh; YADAV, Reena; KUMAR, Sanoj; KUMAR, Anil; SHUKLA, Priya; YADAV, Ankita; SANYAL, Indraneel. Expression of the entomotoxic *Cocculus hirsutus* trypsin inhibitor (ChTI) gene in transgenic chickpea enhances its underlying resistance against the infestation of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 146, n. 1, p. 41–56, 2021. DOI: 10.1007/s11240-021-02041-2.
- PANDEY, Ankesh; YADAV, Reena; SANYAL, Indraneel. Evaluating the pesticidal impact of plant protease inhibitors: lethal weaponry in the co-evolutionary battle. **Pest Management Science**, 2021. DOI: 10.1002/ps.6659.
- PARDE, Vinod D.; SHARMA, Hari C.; KACHOLE, Manvendra S. In vivo inhibition of *Helicoverpa armigera* gut pro-proteinase activation by non-host plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 9, p. 1315–1324, 2010. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2010.04.003.
- PATARROYO-VARGAS, ADRIANA M.; CORDEIRO, GLÁUCIA; SILVA, CAROLINA R. Da; SILVA, CAMILA R. Da; MENDONÇA, EDUARDO G.; VISÓTTO, LILIANE E.; ZANUNCIO, JOSÉ C.; CAMPOS, WELLINGTON G.; OLIVEIRA, MARIA GORETI A. Inhibition kinetics of digestive proteases for *Anticarsia gemmatalis*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. suppl 1, 2020. DOI: 10.1590/0001-3765202020180477.
- PATARROYO-VARGAS, Adriana M.; MERINO-CABRERA, Yaremis B.; ZANUNCIO, Jose C.; ROCHA, Francelina; CAMPOS, Wellington G.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Kinetic Characterization of *Anticarsia gemmatalis* Digestive Serine-Proteases and the Inhibitory Effect of Synthetic Peptides. **Protein & Peptide Letters**, v. 24, n. 11, 2018. DOI: 10.2174/0929866524666170918103146.
- PILON, ANDERSON M.; CAMPOS, WELLINGTON G.; SILVA, CAROLINA R.; CORDEIRO, GLAÚCIA; SILVA, CAMILA R.; OLIVEIRA, MARIA GORETI A. Protease inhibitory, insecticidal and deterrent effects of the trypsin-inhibitor benzamidine on the velvetbean caterpillar in soybean. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3475–3482, 2018. DOI: 10.1590/0001-3765201820180159.
- PIMENTEL, David; BURGESS, Michael. Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States. *In: Integrated Pest Management*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 47–71. DOI: 10.1007/978-94-007-7796-5_2.
- REISIG, Dominic D.; KURTZ, Ryan. Bt Resistance Implications for *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) Insecticide Resistance Management in the United States. **Environmental Entomology**, 2018. DOI: 10.1093/ee/nvy142.

- ROBIN, Tal; REUVENI, Shlomi; URBAKH, Michael. Single-molecule theory of enzymatic inhibition. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 779, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-02995-6.
- ROBINSON, David; BLISS, Edward. A model of the direct and indirect effects of aprotinin administration on the overall costs of coronary revascularization surgery in a university teaching hospital cardiothoracic unit. **Clinical Therapeutics**, v. 24, n. 10, p. 1677–1689, 2002. DOI: 10.1016/S0149-2918(02)80071-6.
- ROYCHAUDHURI, Robin; SARATH, Gautam; ZEECE, Michael; MARKWELL, John. Reversible denaturation of the soybean Kunitz trypsin inhibitor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 412, n. 1, p. 20–26, 2003. DOI: 10.1016/S0003-9861(03)00011-0.
- SACZEWSKI, Franciszek; BALEWSKI, Łukasz. Biological activities of guanidine compounds. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, n. 10, p. 1417–1448, 2009. DOI: 10.1517/13543770903216675.
- SAIKHEDKAR, Nidhi S.; JOSHI, Rakesh S.; BHOITE, Ashiwini S.; MOHANDASAN, Radhika; YADAV, Amit Kumar; FERNANDES, Moneesha; KULKARNI, Kiran A.; GIRI, Ashok P. Tripeptides derived from reactive centre loop of potato type II protease inhibitors preferentially inhibit midgut proteases of *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 95, p. 17–25, 2018. DOI: 10.1016/j.ibmb.2018.02.001.
- SAIKHEDKAR, Nidhi S.; JOSHI, Rakesh S.; YADAV, Amit K.; SEAL, Shubhendu; FERNANDES, Moneesha; GIRI, Ashok P. Phyto-inspired cyclic peptides derived from plant Pin-II type protease inhibitor reactive center loops for crop protection from insect pests. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 2019. DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.05.003.
- SANTOS, Lucianna H. S.; FERREIRA, Rafaela S.; CAFFARENA, Ernesto R. Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. *In*: [s.l: s.n.], p. 13–34. DOI: 10.1007/978-1-4939-9752-7_2.
- SHAMSI, Tooba Naz; PARVEEN, Romana; FATIMA, Sadaf. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 1120–1133, 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.069.
- SILVA JÚNIOR, Neilier R.; VITAL, Camilo E.; ALMEIDA BARROS, Rafael; FAUSTINO, Verônica A.; MONTEIRO, Luana P.; BARROS, Edvaldo; OLIVEIRA, Eugênio E.; OLIVEIRA RAMOS, Humberto J.; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Intestinal proteolytic profile changes during larval development of *Anticarsia gemmatilis* caterpillars. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 1, 2020. DOI: 10.1002/arch.21631.
- SINGH, Raushan Kumar; TIWARI, Manish Kumar; KIM, In-Won; CHEN, Zhilei; LEE, Jung-Kul. Probing the Role of Sigma π Interaction and Energetics in the Catalytic Efficiency of Endo-1,4- β -Xylanase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8817–8821, 2012. DOI: 10.1128/AEM.02261-12.
- SINGH, Sujata; SINGH, Archana; KUMAR, Sumit; MITTAL, Pooja; SINGH, Indrakant K. **Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential**

biocontrol agent for insect pest management. Insect Science, 2020. DOI: 10.1111/1744-7917.12641.

- SOKALINGAM, Sriram; RAGHUNATHAN, Govindan; SOUNDARARAJAN, Nagasundarapandian; LEE, Sun-Gu. A Study on the Effect of Surface Lysine to Arginine Mutagenesis on Protein Stability and Structure Using Green Fluorescent Protein. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40410, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0040410.
- SONG, Hyun Kyu; SUH, Se Won. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator 1 Edited by R. Huber. **Journal of Molecular Biology**, v. 275, n. 2, p. 347–363, 1998. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1469.
- SOUTO, XÊNIA M.; BRANQUINHA, MARTA H.; SANTOS, ANDRÉ L. S. Chymotrypsin- and trypsin-like activities secreted by the multidrug-resistant yeasts forming the *Candida haemulonii* complex. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 3, 2019. DOI: 10.1590/0001-3765201920180735.
- SPIT, Jornt; BREUGELMANS, Bert; VAN HOEF, Vincent; SIMONET, Gert; ZELS, Sven; BROECK, Jozef Vanden. Growth-inhibition effects of pacifastin-like peptides on a pest insect: The desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Peptides**, v. 34, n. 1, p. 251–257, 2012. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.06.019.
- SRINIVASAN, Ajay; GIRI, Ashok; GUPTA, Vidya. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 11, n. 1, 2006. DOI: 10.2478/s11658-006-0012-8.
- SWEDBERG, Joakim E.; DE VEER, Simon J.; SIT, Kei C.; REBOUL, Cyril F.; BUCKLE, Ashley M.; HARRIS, Jonathan M. Mastering the Canonical Loop of Serine Protease Inhibitors: Enhancing Potency by Optimising the Internal Hydrogen Bond Network. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e19302, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0019302.
- TABASHNIK, Bruce E.; CARRIÈRE, Yves. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 10, p. 926–935, 2017. DOI: 10.1038/nbt.3974.
- TAYLOR, R. D.; JEWSBURY, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, n. 3, p. 151–166, 2002. DOI: 10.1023/A:1020155510718.
- TERRA, Walter R.; FERREIRA, Clélia. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 1–62, 1994. DOI: 10.1016/0305-0491(94)90141-4.
- TOMARELLI, R.; CHARNEY, J.; HARDING, M. The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 34, n. 3, p. 428–433, 1949.
- UMETSU, Noriharu; SHIRAI, Yuichi. Development of novel pesticides in the 21st century. **Journal of Pesticide Science**, v. 45, n. 2, p. 54–74, 2020. DOI: 10.1584/jpestics.D20-201.

USDA. **World Agricultural Production**. [s.l: s.n.].

VAJRAVIJAYAN, Senthilvadivel; PLETNEV, Sergei; PLETNEV, Vladimir Z.; NANDHAGOPAL, Narayanasamy; GUNASEKARAN, Krishnasamy. Crystal structure of a novel Kunitz type inhibitor, alocasin with anti- *Aedes aegypti* activity targeting midgut proteases. **Pest Management Science**, v. 74, n. 12, p. 2761–2772, 2018. DOI: 10.1002/ps.5063.

VOLPICELLA, Mariateresa; CORDEWENER, Jan; JONGSMA, Maarten A.; GALLERANI, Raffaele; CECI, Luigi R.; BEEKWILDER, Jules. Identification and characterization of digestive serine proteases from inhibitor-resistant *Helicoverpa zea* larval midgut. **Journal of Chromatography B**, v. 833, n. 1, p. 26–32, 2006. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.10.021.

WALDBAUER, G. P. The Consumption and Utilization of Food by Insects. *In*: [s.l: s.n.]. p. 229–288. DOI: 10.1016/S0065-2806(08)60230-1.

WAN, Shunzhou; KNAPP, Bernhard; WRIGHT, David W.; DEANE, Charlotte M.; COVENEY, Peter V. Rapid, Precise, and Reproducible Prediction of Peptide-MHC Binding Affinities from Molecular Dynamics That Correlate Well with Experiment. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 2015. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00179.

WANG, Bo; XIE, Ningning; LI, Bo. Influence of peptide characteristics on their stability, intestinal transport, and in vitro bioavailability: A review. **Journal of Food Biochemistry**, 2019. DOI: 10.1111/jfbc.12571.

WATERHOUSE, Andrew et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2018. DOI: 10.1093/nar/gky427.

WOLDEMARIAM, Melkamu G.; AHERN, Kevin; JANDER, Georg; TZIN, Vered. A role for 9-lipoxygenases in maize defense against insect herbivory. **Plant Signaling & Behavior**, v. 13, n. 1, p. e1422462, 2018. DOI: 10.1080/15592324.2017.1422462.

YANG, Limei; FANG, Zhiyuan; DICKE, Marcel; LOON, Joop J. A. van; JONGSMA, Maarten A. The diamondback moth, *Plutella xylostella*, specifically inactivates Mustard Trypsin Inhibitor 2 (MTI2) to overcome host plant defence. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2009. DOI: 10.1016/j.ibmb.2008.09.012.

ZHAO, Aiping; LI, Yin; LENG, Chunmeng; WANG, Ping; LI, Yiping. Inhibitory Effect of Protease Inhibitors on Larval Midgut Protease Activities and the Performance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Frontiers in Physiology**, v. 9, 2019. a. DOI: 10.3389/fphys.2018.01963.

ZHAO, Junnan; ZHU, Lu; ZHOU, Weineng; YIN, Lingfeng; WANG, Yuchen; FAN, Yuanrong; CHEN, Yadong; LIU, Haichun. In silico Prediction of Inhibitory Constant of Thrombin Inhibitors Using Machine Learning. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 21, n. 9, p. 662–669, 2019. b. DOI: 10.2174/1386207322666181220130232.

ZHAO, Ping; WANG, Gen Hong; DONG, Zhao Ming; DUAN, Jun; XU, Ping Zhen; CHENG, Ting Cai; XIANG, Zhong Huai; XIA, Qing You. Genome-wide identification and expression analysis of serine proteases and homologs in the

silkworm *Bombyx mori*. **BMC Genomics**, 2010. DOI: 10.1186/1471-2164-11-405.

ZHIRNOV, O. P.; KLENK, H. D.; WRIGHT, P. F. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. **Antiviral Research**, v. 92, n. 1, p. 27–36, 2011. DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.07.014.

ZHOU, Aiwu; CARRELL, Robin W.; HUNTINGTON, James A. The Serpin Inhibitory Mechanism Is Critically Dependent on the Length of the Reactive Center Loop. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 29, p. 27541–27547, 2001. DOI: 10.1074/jbc.M102594200.

ZHU-SALZMAN, Keyan; ZENG, Rensen. Insect Response to Plant Defensive Protease Inhibitors. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 233–252, 2015. DOI: 10.1146/annurev-ento-010814-020816.

**CAPÍTULO I: TRIPEPTÍDEOS INIBIDORES BASEADOS EM SUBSTRATOS DE
PROTEASES TRIPSINAS-LIKE**

ARTIGO I - Small peptides inhibit gut trypsin-like proteases and impair *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) survival and development – **Publicado na revista *Pest Management Science*** - <https://doi.org/10.1002/ps.6191>

ARTIGO II - Inhibition constant and stability of tripeptide inhibitors of gut trypsin-like enzyme of the soybean pest *Anticarsia gemmatalis* – **Publicado na revista *Archives of insect biochemistry and physiology*** - <https://doi.org/10.1002/arch.21887>

DEPÓSITO DE PATENTE DOS PEPTÍDEOS SOB O NÚMERO: BR 10 2021 009154
1

CAPÍTULO I - ARTIGO I

Pequenos peptídeos inibem proteases tripsina-*like* do intestino e prejudicam a sobrevivência e o desenvolvimento de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO

A fase larval de *Anticarsia gemmatalis* é desfolhadora e considerada uma praga-chave da cultura da soja. Os inseticidas inorgânicos, prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana, são as principais moléculas utilizadas no controle dessa praga. Neste sentido, têm-se buscado novos métodos de manejo mais sustentáveis, baseados em moléculas de origem natural, como os inibidores de proteases. Neste trabalho, foram realizados docking molecular, ensaios cinéticos e testes biológicos para avaliar a atividade inibitória de dois tripeptídeos (*i.e.*, GORE1 e GORE2) racionalmente desenhados para inibir enzimas tripsina-*like*, as principais proteases do intestino médio de *A. gemmatalis*. O *docking* molecular revelou a formação de ligações de hidrogênio entre os peptídeos e resíduos do sítio ativo de tripsinas-*like* de *A. gemmatalis* e outros lepidópteros. Além disso, os valores negativos da energia de ligação gerados pelo *docking* indicam que estas ligações de hidrogênio potencializam a formação do complexo enzima-peptídeos. O teste de inibição *in vitro* mostrou que GORE1 e GORE2 inibem a atividade de enzimas tripsina-*like* de *A. gemmatalis* sobre o substrato L-BApNA de modo competitivo, apresentando constantes de inibição (*K_I*) de 0,49 mM e 0,10 mM, respectivamente. Além disso, a exposição das larvas aos peptídeos indicou que estes prejudicam a sobrevivência dos insetos e apresentam efeitos em parâmetros de desenvolvimento e digestibilidade. Os resultados, além de fornecerem informações de base para o desenvolvimento de novos inibidores de tripsina-*like*, através de ferramentas de peptidomimética, sugerem que estas moléculas apresentam potencial para compor formulações biopesticidas contra *A. gemmatalis*.

Palavras-chave: Energia de ligação. Enzimas. Inibição. Perfil farmacofórico.

Small peptides inhibit gut trypsin-like proteases and impair *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) survival and development

ABSTRACT

Anticarsia gemmatalis larvae are key defoliating pests of soybean plants. Inorganic insecticides, harmful to the environment and human health, are the main molecules used in the control of this pest. To apply more sustainable management methods, organic molecules with high specificities, such as proteinaceous protease inhibitors, have been sought. Thus, molecular docking studies, kinetics assays, and biological tests were performed to evaluate the inhibitory activity of two peptides (i.e., GORE1 and GORE2) rationally designed to inhibit trypsin-like enzymes, which are the main proteases of *A. gemmatalis* midgut. The molecular docking simulations revealed critical hydrogen bonding patterns of the peptides with key active site residues of trypsin-like proteases of *A. gemmatalis* and other Lepidopteran insects. The negative values of binding energy indicate that hydrogen bonds potentiate the tight binding of the peptides with trypsin-like proteases, predicting an effective inhibition. The inhibition's rate constants (K_i) were 0.49 mM and 0.10 mM for GORE1 and GORE2, resulting in effective inhibition of the activity trypsin on the L-BApNA substrate in the *in vitro* tests, pointing at the peptide GORE2 has higher inhibitory capacity on the *A. gemmatalis* trypsins. In addition, the two peptides were determined to be reversible competitive inhibitors. The *in vivo* test demonstrated that the peptides harm the survival and development of *A. gemmatalis* larvae. These results suggest that the peptides are potential candidates in the management of *A. gemmatalis* larvae and provide baseline information for the design of new trypsin-like inhibitors based on peptidomimetic tools.

Keywords: Binding energy. Enzymes. Inhibition. Pharmacophoric profile.

1. INTRODUÇÃO

A expansão da produção de soja aumentou a vulnerabilidade da cultura a insetos-praga (CARNEIRO et al., 2018). Insetos desfolhadores, como a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) causam grandes prejuízos econômicos ao agronegócio mundial (GRANDE; RANDO, 2018). O manejo destas pragas envolve a pulverização de inseticidas sintéticos, que podem prejudicar a saúde humana e o meio-ambiente³. A fim de diminuir o uso de produtos químicos inorgânicos na agricultura, têm-se buscado novas moléculas derivadas de compostos naturais, que apresentem potencial inseticida e efetividade na agricultura (JANKOWSKA et al., 2017; MERIÑO-CABRERA et al., 2019a; SINGH et al., 2020; ZHAO et al., 2019a).

Neste contexto, os inibidores de proteases (IPs), moléculas que compõem a defesa multimecanística de plantas contra herbívoros, são uma alternativa promissora para reduzir o uso de defensivos químicos na agricultura (KORTBEEK; VAN DER GRAGT; BLEEKER, 2019; WOLDEMARIAM et al., 2018). Vários estudos demonstram o potencial inseticida de IPs, que podem afetar a sobrevivência, o desenvolvimento e a reprodução de insetos-praga que ingerem estas moléculas em elevadas quantidades (CRUZ et al., 2013; MENDONÇA et al., 2020; MERIÑO-CABRERA et al., 2019a). Os IPs prejudicam a atividade de proteases digestivas no intestino médio de insetos e diminuem a liberação de aminoácidos livres da dieta. Além disso, na tentativa de contrapor o efeito de IPs, aminoácidos livres são direcionados para a síntese proteica de proteases, reduzindo a oferta destes para outras rotas metabólicas de desenvolvimento (DE OLIVEIRA et al., 2013).

Na soja, os inibidores de serino-proteases são os mais abundantes no mecanismo de defesa contra herbívoros, possivelmente devido à coevolução com lepidópteros desfolhadores, que possuem aproximadamente 95% de sua atividade proteolítica larval realizada por proteases dessa classe (SRINIVASAN; GIRI; GUPTA, 2006). As enzimas tripsina-*like* apresentam a maior eficiência catalítica entre as serino-proteases nos últimos ínstares larvais (*i.e.*, quarto, quinto e sexto) de insetos lepidópteros, onde ocorre 90% da alimentação do inseto (BOLDT; BIEVER; IGNOFFO, 1975; GROVER et al., 2018; SILVA JÚNIOR et al., 2020). A exposição de larvas de insetos lepidópteros a inibidores de protease da soja, como SKTI (*i.e.*, *Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor*) e SBBI (*i.e.*, *Soybean Bowman-Birk Inhibitor*),

diminui a atividade de tripsinas-*like* e quimotripsinas-*like*, afetando a atividade proteolítica total no intestino médio (DANTZGER et al., 2015; KUWAR et al., 2015).

No entanto, embora os IPs prejudiquem o desenvolvimento dos insetos, a co-evolução com plantas permitiu que os herbívoros desenvolvessem mecanismos adaptativos contra essas moléculas específicas (PANDEY; YADAV; SANYAL, 2021). Os mecanismos adaptativos consistem principalmente na expressão de proteases insensíveis e na inativação através de clivagem proteolítica (SINGH et al., 2020; YANG et al., 2009; ZHAO et al., 2010). IPs naturais são moléculas proteicas, cujas as regiões de interação com a protease alvo muitas vezes é dependente de estrutura 3D. Neste sentido, a presença de ligações peptídicas entre resíduos passíveis de clivagem para outras proteases presentes no intestino médio do inseto, aumenta a probabilidade de os IPs serem clivados e inativados (YANG et al., 2009). O desenvolvimento de inibidores de proteases específicos para enzimas tripsina-*like* e não dependentes da estrutura 3D, podem auxiliar na superação de mecanismos adaptativos dos herbívoros.

Os subsítios S1, S2 e S3 presentes no sítio ativo de tripsinas-*like* são altamente importantes para sua atividade catalítica (HEDSTROM, 2002). Os subsítios S2 e S3 tornaram-se mais hidrofóbicos ao longo da evolução dos insetos lepidópteros e, portanto, têm afinidades maiores por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (LOPES et al., 2006). Enzimas tripsina-*like* purificadas de bovinos e *A. gemmatalis* mostraram altas afinidades por substratos peptídicos contendo aminoácidos hidrofóbicos nas posições P2 e P3 (Oliveira et al., 1993; Patarroyo-Vargas et al., 2020). Por outro lado, o subsítio S1 de proteases tripsina-*like* apresenta afinidade por resíduos de aminoácidos básicos (*i.e.*, lisina e arginina) (Souto et al., 2019). Assim, com base nessas informações, projetamos os peptídeos GORE1 e GORE2, ambos contendo os mesmos resíduos hidrofóbicos e variando apenas na posição P1, sendo o primeiro contendo lisina e o segundo arginina.

No presente estudo, dois tripeptídeos (GORE1 e GORE2), projetados com base nos subsítios S1, S2 e S3 de tripsinas-*like*, foram avaliados quanto a seu potencial inibitório e efeitos no ciclo larval de *A. gemmatalis*. Para isto, seguiu-se uma abordagem para avaliar essas moléculas investigando-se as possíveis interações enzima-receptor através de *docking molecular*, cinética enzimática e ensaios *in vivo*. Este trabalho fornece informações básicas para o desenvolvimento de biopesticidas alternativos ou complementares no manejo de insetos-praga.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Docking *in silico* dos tripeptídeos e tripsinas-*like* de Lepidoptera

2.1.1. Sequências e previsão da estrutura tridimensional

As sequências primárias de tripsinas-*like* foram obtidas pela tradução de genes de tripsina identificados por análises de zimograma e espectrometria de massa (SILVA JÚNIOR et al., 2020), utilizando-se a ferramenta *ExpasyTool* (GASTEIGER, 2003). Sequências de proteínas de tripsina-*like* de outras espécies de lepidópteros (*Helicoverpa armigera*, *Manduca sexta* e *Spodoptera frugiperda*) foram usadas para comparar a conservação do sítio de ligação com os peptídeos analisados. As sequências foram obtidas no site do NCBI (Tabela 1).

A confirmação da arquitetura de domínio da família da tripsina-*like* foi realizada usando o banco de dados Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>) (FINN et al., 2016).

A modelagem das estruturas tridimensionais das sequências primárias obtidas foi realizada através do servidor *Phyre2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Este servidor é um conjunto de ferramentas disponíveis na web para prever possíveis estruturas 3D de uma única sequência de proteína submetida. Essa técnica tem aproximadamente 80% de precisão se a sequência primária estiver correta (KELLEY et al., 2015). Os arquivos modelos em .pdb foram utilizados posteriormente para a realização do *docking* molecular.

A estrutura dos peptídeos inibidores de GORE1 e GORE2 foi projetada utilizando-se o software *Discovery Studio* (BIOVIA, 2017) e os hidrogênios foram adicionados usando o programa *Pymol*. As estruturas 3D de GORE1 e GORE2 foram armazenadas em .pdb para a realização do *docking* molecular.

A qualidade dos modelos preditos das proteínas foi avaliada quanto a geometria e estereoquímica, distribuição de energia e outras características do modelo 3D usando o pacote de análise P_{ROSA} (Protein Structure Analysis) do servidor web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.em/prosa.php>), ERRAT (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) e análise Ramachandran Plot (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

2.1.2. *Molecular Docking*

A predição das interações moleculares entre as proteases de lepidópteros-praga (moléculas alvo) e os inibidores de protease peptídicos (ligantes) foi realizada por *docking molecular* utilizando o software online Swissdock (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011). O Swissdock é baseado no mecanismo EADock DSS, combinado com *scripts* de configuração para curar problemas comuns e para preparar a proteína alvo e os arquivos de entrada do ligante (avaliação crítica da previsão de interações). O modo de ligação e a energia foram visualizados e analisados usando o programa PyMOL *Molecular Graphics System*, Versão 2.0 Schrödinger, LLC. Um perfil farmacofórico foi obtido do complexo com maior energia de afinidade usando o software Discovery Studio (BIOVIA, 2017).

2.2. Análise *in vitro* do potencial inibitório dos peptídeos

2.2.1. Purificação parcial de tripsinas-*like* de *Anticarsia gemmatalis*

Um total de 30 larvas de *A. gemmatalis* foram dissecadas e seus intestinos transferidos para uma solução de HCl 1 mM a 4°C na proporção de cinco intestinos (350 mg de amostra de intestino médio) por 1 mL. A maceração foi realizada com nitrogênio líquido. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 30 min a 4°C e filtradas usando uma membrana de 22 µm. O sobrenadante obtido foi armazenado a -20°C.

O procedimento de purificação parcial foi realizado em Cromatografia Líquida de Proteína Rápida (FPLC). O volume total da amostra/cromatografia foi de 2ml de extrato enzimático contendo o equivalente a 10 intestinos médios. As frações de tripsina-*like* enriquecidas foram obtidas utilizando coluna HiTrap Benzamidine (high sub) 5ml (GE Healthcare) equilibrada em tampão Tris-HCl 0,05 mol.L⁻¹ NaCl 0,5 mol.L⁻¹, pH 7,5. A eluição da proteína foi realizada com tampão Glicina 0,05 mol.L⁻¹, pH 3,0, em fluxo contínuo de 1 mL/min e coletada em frações de 2,0 mL. As atividades de tripsina-*like* das frações eluídas foram determinadas usando o L-BApNA como substrato (Erlanger et al., 1961; Patarroyo-Vargas et al., 2020). As frações correspondentes ao pico de eluição foram reunidas e armazenadas a -20°C para uso posterior em ensaios cinéticos enzimáticos. Em seguida, amostras de tripsina-*like*

enriquecidas foram submetidas à eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida a 12,5% na presença de SDS (0,1%). O gel foi corado com solução Commassie Blue.

2.2.2. Cinética de inibição

A redução dependente da concentração na atividade de tripsinas-*like* de *A. gemmatalis* foi estimada através do substrato cromogênico específico L-BApNA (Benzoil-L-arginil-p-nitroanilida). Os ensaios foram realizados em Tris-HCl 0,1 mol/L, CaCl₂ 20 mmol/L pH 8,2, usando concentrações de L-BApNA de 1,25, 2,50, 5,0, 10,0 e 20,0 mM. As concentrações de inibidores de peptídeo foram, inibidor de GORE1: 0,04, 0,08, 0,17, 0,35, 0,70, 1,40 mM e inibidor de GORE2: 0,04, 0,08, 0,16, 0,32, 0,64, 1,29 mM. As reações sem adição de inibidor foram utilizadas como controle enzimático. A concentração total de tripsina-*like* enriquecida foi de 0,2 µg/µL e foram utilizados 30 µL no meio reacional.

As velocidades de reação enzimática observadas versus dados de concentração de substrato (na presença e ausência de inibidores) foram ajustadas simultaneamente de acordo com o ajuste de regressão não-linear usando o software GraphPad Prism 5.033. Duas abordagens foram aplicadas a esta análise. Em uma instância, todos os dados foram analisados simultaneamente (K_{cat} , $[E]$ K_M e K_i). Esses valores foram então fixados no ajuste dos dados de taxa média obtidos dos experimentos de inibição para estimativa de K_i (COPELAND, 2013). A equação que descreve essa relação é:

$$\frac{K_M}{K_{cat}} = \frac{K_M \cdot [I]}{K_i \cdot K_{cat}} + \frac{K_M}{K_{cat}} \quad (1)$$

2.3. Sobrevivência, desenvolvimento e análise nutricional: abordagem in vivo

Por tratamento, foram utilizadas 30 larvas de *A. gemmatalis*. Cinco dias após a eclosão dos ovos, as larvas mais vigorosas foram selecionadas com auxílio de lupa e individualizadas em recipientes plásticos (3x3x5 cm), sendo alimentadas *ad libitum* com dieta artificial contendo ou não inibidores de protease a 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e sob 14 horas de luz:10- h fotoperíodo escuro (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976). Os tratamentos consistiram em quatro dietas diferentes: 1- Dieta artificial sem inibidor de protease (dieta controle); 2- Dieta artificial contendo 0,12%

(p/v) de GORE1; 3- Dieta artificial contendo 0,12% (p/v) de GORE2; 4- Dieta artificial contendo 0,12% (p/v) de SKTI.

A sobrevivência larval foi analisada em dias alternados por meio de estimulação mecânica com pinça ou pincel. Os dados de sobrevivência foram submetidos ao estimador de Kaplan-Meier (BLAND; ALTMAN, 1998) e as funções obtidas de cada tratamento foram comparadas pelo teste Log-rank. Além disso, a duração do ciclo larval, peso pupal, teor de proteína pupal e a relação entre teor de proteína pupal e peso pupal foram avaliados e os dados submetidos à Análise de Variância seguida de análise post-hoc usando o teste de Duncan. Para determinação de proteínas totais, as pupas foram maceradas com nitrogênio líquido e homogeneizadas na proporção de 1 pupa por 5 mL de solução de HCl 10-3 M e a concentração da proteína foi realizada no comprimento de onda de 595 nm pelo método de Bradford.

Por fim, dez larvas de *A. gemmatilis* recém chegadas ao quinto instar foram individualizadas para avaliação de parâmetros de digestibilidade. As larvas foram individualizadas em recipientes plásticos com 3g de dieta, contendo ou não IPs. Os insetos foram mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 14:10 h (claro/escuro). Após 3 dias, as larvas foram pesadas e a quantidades de pellets fecais produzida e a dieta restante foram registradas através de balança analítica de precisão. Foram avaliados os parâmetros nutricionais eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI), eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) e digestibilidade aproximada (AD) (WALDBAUER, 1968).

3. RESULTADOS

3.1. Docking molecular e perfil farmacofórico: abordagem *in silico*

Para explorar a interação molecular entre os peptídeos projetados e tripsinas-*like* de lepidópteros, a simulação *in silico* por docking molecular foi estudada usando Swissdock, um serviço *web* para prever as interações moleculares que podem ocorrer entre uma proteína alvo e uma pequena molécula, como os peptídeos analisados. O programa gerou vários complexos receptor-peptídeos, dos quais foram selecionadas as melhores conformações, com base no valor de afinidade (ou seja, os modelos com ΔG de ligação mais negativos). No *docking* proteína-peptídeo, apenas os graus de liberdade do ligante (movimentos translacionais e rotacionais da molécula) são explorados, mantendo rígido o centro de massa da proteína receptora.

Assim, cada peptídeo foi acoplado com seis tripsinas-*like* de *A. gemmatalis* e mais três tripsinas-*like* de Lepidopterós pragas (Tabela 1), gerando nove complexos para cada peptídeo (GORE1 e GORE2). A partir dos nove complexos, foi realizado o perfil farmacofórico (Fig. 1-4). Aproximadamente 97% das ligações formadas entre peptídeos e tripsinas-*like* são ligações H, incluindo ligações convencionais de hidrogênio, carbono-hidrogênio e Pi-hidrogênio (Fig. 1-4, Tabela 2). Especificamente, o peptídeo GORE2 interage com as tripsinas-*like* de *A. gemmatalis* através de ligações H com resíduos de aminoácidos como Cys72, Tyr45, Asp 116, Cys207, Gly208, interagindo com aminoácidos catalíticos diretamente e bloqueando espacialmente o sítio ativo (Fig. 3 e 4). Além disso, uma interação pi-sigma entre GORE2 e o resíduo Tyr88 de *A. gemmatalis* foi encontrada nas análises de docking realizadas.

A afinidade de ligação entre o peptídeo GORE2 e as tripsinas dos insetos lepidópteros é confirmada pelos valores de ΔG de ligação (Tabela 2), que foram todos negativos e inferiores a -7,5 Kcal/mol. Para a melhor pose do ligante associado à tripsina de *A. gemmatalis* o valor de ΔG de ligação foi de -9,87 Kcal/mol, sendo o maior valor de energia de afinidade entre GORE2 e os receptores tripsina-*like* (Tabela 2).

Para o peptídeo GORE1, verificou-se que 53% das ligações formadas com as tripsinas-*like* aqui analisadas são do tipo ligação de hidrogênio convencional, seguidas de 27% de ligações do tipo carbono-hidrogênio e 10% de ligações Pi-hidrogênio (Fig. 1 e 2). O peptídeo GORE1 interage com as tripsinas-*like* de *A. gemmatalis* através de

ligações de hidrogênio concencionais e carbono-hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Hys57, Val74, Ser211, Phe 208 e Cys208, todos próximos da tríade catalítica da tripsina. Assim, semelhante ao GORE2, este peptídeo inibidor também obstrui espacialmente o sítio ativo da enzima (Fig. 1 e 2).

A afinidade de ligação entre o peptídeo GORE1 e as tripsinas-*like* dos lepidópteros avaliados, é confirmada pelos valores de ΔG de ligação (Tabela 2), todos negativos, com valores variando entre -7,14 e -8,96 Kcal/mol. Para a melhor pose do ligante associado à tripsina de *A. gemmatalis* o valor da ligação ΔG foi de -8,96 Kcal/mol, sendo o maior valor de energia de afinidade entre GORE1 e os receptores tripsina-*like* (Tabela 2).

3.2. Purificação parcial das tripsinas-*like* do intestino de *A. gemmatalis*

Para abordar os parâmetros cinéticos de proteases de tipo tripsinas-*like* expostas a inibidores de peptídeos, purificamos parcialmente o extrato bruto do intestino médio de *A. gemmatalis* (Fig. 5). Em uma única etapa de purificação usando a coluna HiTrap Benzamide, apenas um pico (fração 4-7) com atividade de tripsina-*like* foi detectado no cromatograma, usando L-BAPNA como substrato. Neste pico, as atividades observadas variaram de 0,57 a 4,43 $\mu\text{M/s}$ (Fig. 5A).

Além disso, a concentração de proteína total (Abs 595 nm) refletiu o perfil de atividade trípica (Abs 410 nm) (Fig. 5B). A atividade específica de proteases tripsina-*like* entre amostras brutas e purificadas aumentou de 1,35 para 4,43 $\mu\text{Ms}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$, constituindo um fator de purificação de 3,28 (Tabela 3).

Em seguida, as frações enriquecidas contendo atividade de tripsina-*like* foram reunidas após passar pela coluna de cromatografia e avaliadas por SDS-PAGE. A canaleta 2 do gel, contendo o extrato purificado, apresentou um perfil de proteínas diferente quando comparada com a canaleta 3, contendo extrato bruto. No extrato purificado várias bandas adicionais, variando de 20 a 35 kDa, foram melhores visualizadas em relação ao extrato bruto, indicando a presença de enzimas tripsina-*like* e redução de outros tipos proteicos (Fig. 5C).

3.3. Cinética de inibição

Para avaliar a cinética de inibição dos peptídeos frente a enzimas tripsina-*like* de *A. gemmatalis*, um método de regressão não linear foi utilizado para determinar a constante de inibição K_i . Os dados de controle (sem inibidor) foram analisados por regressão não linear para obter os melhores valores de ajuste para K_{cat} e K_M (Fig. 6A e 6B). Esses valores foram então fixados na análise subsequente de todos os dados (dados de controle e inibição) para o cálculo de K_i . O valor de K_i foi de 0,49 mM para o inibidor de peptídeo GORE1 (Fig. 7C) e 0,10 mM para o inibidor de peptídeo GORE2 (Fig. 6D).

A análise de regressão indica que ambos os peptídeos exibiram inibição competitiva para as tripsinas de *A. gemmatalis*, GORE1 ($R=0,75$ $p<0,03$) e GORE2 ($R=0,9$ $p<0,0001$) como mostrado na análise de *Kinect enzymes* no software Graphpad prisma como mostrado na Fig. 6C e D.

3.4. Sobrevivência, desenvolvimento e análise nutricional

Para validar o efeito da inibição da tripsina-*like* sobre os insetos, a sobrevivência de larvas de *A. gemmatalis* alimentadas com dietas contendo GORE1 ou GORE2 e SKTI (controle positivo) a 0,12% p de inibidor/v de dieta, foi avaliada. As ingestões crônicas dos peptídeos e SKTI mostraram mortalidade aumentada quando comparadas ao controle (Log-rank $\chi^2 = 10,34$, $p = 0,0159$) (Fig. 7). No entanto, a presença do peptídeo GORE2 na dieta teve efeito mais pronunciado na sobrevivência das larvas ao final do ciclo larval (40% de sobrevivência) do que SKTI e GORE1 (60% de sobrevivência) (Fig. 7).

Os parâmetros biológicos larvais e pupal quanto ao período larval ($F=6,134$; $p=0,003$) e peso pupal ($F=3,919$; $p=0,022$) foram significativamente diferentes entre as larvas sobreviventes dos tratamentos. A duração do período larval dos insetos alimentados com a dieta controle foi de $14,667\pm 0,15$ dias, enquanto as larvas alimentadas com dieta contendo GORE2 foi de $15,75\pm 0,25$ dias, mostrando efeito de alongamento do ciclo larval causado por este peptídeo (Tabela 4). Por outro lado, o peso das pupas foi afetado negativamente apenas nas larvas expostas à dieta contendo o peptídeo GORE1, diminuindo aproximadamente 15% do peso (Tabela 4).

Embora o teor de proteína pupal tenha apresentado resultados semelhantes entre todos os tratamentos ($F=1,130$; $p=0,359$), quando se calculou o teor de proteína

pupal e a relação peso pupal, as pupas das larvas expostas ao GORE2 apresentaram menor acúmulo de proteína ($p < 0,001$) (Tabela 4). No geral, as análises nutricionais revelaram que os peptídeos GORE1 e GORE2 têm um efeito tóxico quando ingeridos por larvas de *A. gemmatilis* com parâmetros ECI, ECD e AD reduzidos ($p < 0,05$) (Fig. 8). O efeito dos peptídeos nos parâmetros nutricionais foi semelhante ao do SKTI (controle positivo), um inibidor de protease natural extraído da soja (Fig. 8A e 8B).

4. DISCUSSÃO

Plantas geneticamente modificadas portadoras de toxinas Bt e inseticidas inorgânicos são ferramentas indispensáveis e difundidas na agricultura intensiva para controlar pragas de insetos lepidópteros (KHAN, 2019; REISIG; KURTZ, 2018). No entanto, com o relato de insetos-praga resistentes ao Bt e os efeitos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente de inseticidas inorgânicos, pesquisas intensivas têm sido realizadas para encontrar moléculas ecologicamente corretas capazes de atuar no controle de insetos-praga (PANDEY; YADAV; SANYAL, 2021). Os inibidores de protease estão entre as moléculas de origem natural que podem ser utilizadas no manejo de herbívoros (SHAMSI; PARVEEN; FATIMA, 2016). Neste trabalho, avaliamos as interações *in silico*, a cinética e efeitos biológicos de GORE1 e GORE2, dois pequenos peptídeos racionalmente projetados para ligar e inibir proteases tripsina-*like*. Moléculas peptídicas apresentam uso potencial na agricultura, porque a estabilidade destas moléculas pode ser ajustada através de peptídeomimética. Sendo assim, estas moléculas podem ser ajustadas e carregadas para a cultura de forma a durarem o suficiente para controlar os herbívoros praga, mas também para degradar como demonstrado em outros estudos (MERIÑO-CABRERA et al., 2020). Isto significa que biopesticidas contendo peptídeos não causaria os problemas a longo prazo dos inseticidas convencionais sem derivativos biológicos. Além disso, a produção de peptídeos em larga escala é mais fácil por meio de síntese química em comparação com a de um inibidor proteico, como o SKTI, o que pode viabilizar a produção em larga escala.

Os resultados de docking previstos mostraram energias de ligação negativas para todos os complexos peptídeo-tripsina, indicando que essas moléculas se ligam a proteases tripsina-*like* e formam interações estáveis. As energias de ligação observadas para os complexos tripsina-peptídeos variaram de valores semelhantes a outros complexos ligante-receptor altamente estáveis, como enzimas BACE1 e fucoxantina e fucosterol (-7,0 kcal/mol e -10,1 kcal/mol) (JUNG et al., 2016). Os menores valores de energia de ligação observados para GORE2 (-7,57 a -9,87) do que GORE1 (-7,14 a -8,96) são possivelmente devido a interações eletrostáticas mais fortes entre os resíduos de tripsina-*like* e o grupo guanidínio duplamente carregado positivamente do resíduo de arginina presente nos primeiros (Oliveira et al., 1993; Saczewski & Balewski, 2009; Sokalingam et al., 2012). Enzimas tripsina-*like*

apresentam um resíduo de aspartato importante no sítio S1, responsável pela especificidade por aminoácidos básicos lisina e arginina (Hedstrom, 2002; Oliveira et al., 1993).

Neste estudo, as interações moleculares de cada resíduo nas proximidades do sítio de tripsinas-*like* de *A. gemmatalis* foram realizadas (distância menor que 4Å) para identificar aquelas que são importantes na formação do complexo tripsina-peptídeo inibidor. Aproximadamente três resíduos de aminoácidos receptores têm uma contribuição favorável, criando interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio convencionais, ligações de hidrogênio doador pi e ligações carbono-hidrogênio com os ligantes. Uma interação pi-sigma foi observada exclusivamente entre o peptídeo GORE2 e a tripsina 4 de *A. gemmatalis*. As interações do tipo pi-sigma podem contribuir para a redução da distância entre o ligante e o receptor, levando a uma maior estabilidade dos complexos enzima-inibidor (Singh et al., 2012).

A maioria das melhores poses obtidas para os complexos mostraram ligação com pelo menos um resíduo de aminoácido chave do sítio catalítico de enzimas tipo tripsina (LIANG; PHILLIP BOWEN, 2016). Embora algumas poses não tenham uma conexão direta com os resíduos conservados de ligação ao substrato e a tríade catalítica, as interações foram formadas com resíduos presentes no bolsão do sítio ativo, que podem bloquear espacialmente as interações com o substrato. O padrão de interação com os resíduos do sítio ativo indica um modelo de inibição competitiva, pois eles se ligam no mesmo local que o substrato natural das proteases tripsina-*like* (LEWIS et al., 1993). O tamanho dos peptídeos possivelmente confere uma vantagem na ligação competitiva em comparação com outros inibidores de proteases maiores, uma vez que o menor tamanho dessas moléculas poderia maximizar as interações com os sítios ativos de tripsina-*like* (SAIKHEDKAR et al., 2018).

A análise complementar de ensaios cinéticos enzimáticos confirmou o modelo de inibição competitiva para GORE1 e GORE2. Ambos os peptídeos se encaixam no modelo específico de inibição competitiva. A capacidade de GORE1 e GORE2 em inibir tripsinas-*like* de *A. gemmatalis in vitro* e as baixas constantes inibitórias (K_i) obtidas para a interação, indicam que estas moléculas apresentam potencial para serem utilizadas no controle de insetos-praga. Normalmente, um valor de K_i mais baixo indica uma ligação enzimática mais forte, portanto, um inibidor mais eficaz (Zhao et al., 2019). Os peptídeos GORE1 e GORE2 apresentaram um K_i dez e duas vezes menor que o K_i da Benzamidina e ApTI, dois fortes e eficazes inibidores

de protease com atividade inseticida contra insetos-praga lepidópteros (Meriño-Cabrera et al., 2019; Pilon et al., 2018). O valor K_i mais baixo do peptídeo GORE2 do que GORE1 mostra que enzimas tripsina-like de *A. gemmatalis* se ligam preferencialmente à arginina sobre a lisina na posição do substrato P1. Este resultado difere daquele apresentado por Lopes et al., 2005, que demonstrou que tripsinas-like de insetos lepidópteros não possuem diferenças na preferência por resíduos de arginina e lisina na posição P1.

A análise da cinética de inibição demonstrou que ambos os peptídeos apresentaram um modelo de inibição competitivo. Assim, resultados de *docking* molecular apoiaram os resultados experimentais, uma vez que a maioria das melhores poses para os complexos enzima-peptídeo mostraram interações com o sítio ativo de tripsinas-like. Desta forma, estudos de *docking* molecular estão se mostrando bons métodos para prever bolsões de ligação e tipos de interações para complexos ligante-receptor.

Larvas de *A. gemmatalis* alimentadas com dietas contendo os peptídeos GORE1 e GORE2 apresentaram sobrevivência reduzida, sendo explicada pelo fato de inibirem a principal protease digestiva (*i.e.*, tripsinas-like) de insetos lepidópteros (Oliveira et al., 2005; Silva Júnior et al., 2020). A inibição de proteases digestivas afeta negativamente a digestão proteica, causando deficiência de aminoácidos e reciclagem ineficiente de proteínas, o que desestabiliza o metabolismo larval (Singh et al., 2020). Outros inibidores de protease de enzimas tripsinas-like testados contra lepidópteros e outras larvas de insetos também mostraram redução na sobrevivência larval (MERIÑO-CABRERA et al., 2019b; VAJRAVIJAYAN et al., 2018; ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015). A maior redução da sobrevivência conferida pelo peptídeo GORE2 provavelmente se deve à sua maior capacidade de se ligar a enzimas tripsina-like, demonstrada pela sua menor constante de inibição (K_i). Além disso, o prolongamento do período larval causado pelo GORE2 aumenta a exposição das larvas a inimigos naturais, o que pode ajudar na redução da população de *A. gemmatalis no campo* (BOND et al., 2017). A menor relação teor de proteína pupal/peso pupal das larvas expostas ao GORE2 indica que este inibidor reduziu ainda, o acúmulo de proteína, o que pode afetar negativamente as trocas de instares e o desenvolvimento de insetos adultos (OONINCX et al., 2015).

Foi registrada uma queda na eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e digerido (ECD) quando os peptídeos foram incorporados à dieta das larvas.

Esses resultados corroboram o fato de que os inibidores de natureza proteica têm efeito prejudicial na digestão de alimentos por insetos. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos, como quando larvas de *Plutella xylostella* (L.) e *P.rapae* foram alimentadas com uma dieta contendo inibidores de proteases extraídos de trigo, canola, gergelim, feijão e triticales e apresentaram redução de ECI e ECD quando comparados às larvas controle (DASTRANJ et al., 2018). A eficiência inibitória dos peptídeos no ensaio *in vivo* é comparada com o inibidor de proteases SKTI, mostrando uma diminuição semelhante nos índices nutricionais.

Coletivamente, os resultados demonstram que os peptídeos GORE1 e GORE2 reduzem a sobrevivência de larvas de *A. gemmatalis* alimentadas cronicamente em dieta artificial contendo as moléculas. Os peptídeos inibidores impactaram parâmetros de desenvolvimento importantes do inseto, sendo os efeitos de GORE2 mais pronunciados. Além disso, foi demonstrado que enzimas tripsina-*like* de *A. gemmatalis* apresentam preferência por resíduos de arginina do que lisina na posição P1.

5. REFERÊNCIAS

- A. GATEHOUSE, John. Prospects for Using Proteinase Inhibitors to Protect Transgenic Plants Against Attack by Herbivorous Insects. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 409–416, 2011. DOI: 10.2174/138920311796391142.
- A. JONGSMA, Maarten; BEEKWILDER, Jules. Co-Evolution of Insect Proteases and Plant Protease Inhibitors. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 437–447, 2011. DOI: 10.2174/138920311796391115.
- AHN, J. E.; SALZMAN, R. A.; BRAUNAGEL, S. C.; KOIWA, H.; ZHU-SALZMAN, K. Functional roles of specific bruchid protease isoforms in adaptation to a soybean protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, v. 13, n. 6, p. 649–657, 2004. DOI: 10.1111/j.0962-1075.2004.00523.x.
- ALMEIDA BARROS, Rafael; MERIÑO-CABRERA, Yaremis; VITAL, Camilo E.; SILVA JÚNIOR, Neillier R.; OLIVEIRA, Cauê N.; LESSA BARBOSA, Samuel; MARQUES GONÇALVES ASSIS, João V; RAMOS, Humberto JO; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Small peptides inhibit gut trypsin-like proteases and impair *Anticarsia gemmatilis* (L</sc> epidoptera:N</sc> octuidae) survival and development. **Pest Management Science**, v. 77, n. 4, p. 1714–1723, 2021. DOI: 10.1002/ps.6191.
- AMBADAPADI, Sriram et al. Reactive Center Loop (RCL) Peptides Derived from Serpins Display Independent Coagulation and Immune Modulating Activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 6, p. 2874–2887, 2016. DOI: 10.1074/jbc.M115.704841.
- APOSTOLOPOULOS, Vasso et al. A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 430, 2021. DOI: 10.3390/molecules26020430.
- ARTHUR, David Ebuka; UZAIRU, Adamu. Molecular docking studies on the interaction of NCI anticancer analogues with human Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit. **Journal of King Saud University - Science**, v. 31, n. 4, p. 1151–1166, 2019. DOI: 10.1016/j.jksus.2019.01.011.
- ASCENZI, Paolo; BOCEDI, Alessio; BOLOGNESI, Martino; SPALLAROSSA, Andrea; COLETTA, Massimo; CRISTOFARO, Raimondo; MENEGATTI, Enea. The Bovine Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor (Kunitz Inhibitor): A Milestone Protein. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, n. 3, p. 231–251, 2003. DOI: 10.2174/1389203033487180.
- BALE, J. S.; VAN LENTEREN, J. C.; BIGLER, F. Biological control and sustainable food production. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1492, p. 761–776, 2008. DOI: 10.1098/rstb.2007.2182.

- BENNETT-GUERRERO, Elliott; SONG, Howard K.; ZHAO, Yue; FERGUSON, T. B.; GAMMIE, James S.; PETERSON, Eric D.; O'BRIEN, Sean M. Temporal Changes in the Use of Blood Products for Coronary Artery Bypass Graft Surgery in North America: An Analysis of the Society of Thoracic Surgeons Adult Cardiac Database. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 24, n. 5, p. 814–816, 2010. DOI: 10.1053/j.jvca.2010.06.003.
- BERGVINSON, David; GARCÍA-LARA, Silverio. **Genetic approaches to reducing losses of stored grain to insects and diseases. Current Opinion in Plant Biology**, 2004. DOI: 10.1016/j.pbi.2004.05.001.
- BERNARDI, Roberta; TEDESCHI, Gabriella; RONCHI, Severino; PALMIERI, Sandro. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like enzyme from larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hu"bner (Lepidoptera: pyralidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 8–9, p. 883–889, 1996. DOI: 10.1016/S0965-1748(96)00057-4.
- BEZERRA, César da Silva; OLIVEIRA, Carolina Turatti; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. Inga vera trypsin inhibitor interferes in the proteolytic activity and nutritional physiology of *Epehstia kuehniella* larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 2017. DOI: 10.1111/eea.12605.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistics Notes: Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). **BMJ**, v. 317, n. 7172, p. 1572–1580, 1998. DOI: 10.1136/bmj.317.7172.1572.
- BOJKOVA, Denisa et al. Aprotinin Inhibits SARS-CoV-2 Replication. **Cells**, v. 9, n. 11, p. 2377, 2020. DOI: 10.3390/cells9112377.
- BOLDT, P. E.; BIEVER, K. D.; IGNOFFO, C. M. Lepidopteran Pests of Soybeans: Consumption of Soybean Foliage and Pods and Development Time. **Journal of Economic Entomology**, v. 68, n. 4, p. 480–482, 1975. DOI: 10.1093/jee/68.4.480.
- BOND, J. G.; RAMÍREZ-OSORIO, A.; MARINA, C. F.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; LIEDO, P.; DOR, A.; WILLIAMS, T. Efficiency of two larval diets for mass-rearing of the mosquito *Aedes aegypti*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187420, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0187420.
- BORJIGIN, J.; NATHANS, J. Bovine pancreatic trypsin inhibitor-trypsin complex as a detection system for recombinant proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 1, p. 337–341, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.1.337.
- BRAGA, Anna Rafaela Cavalcante; DE ROSSO, Veridiana Vera; HARAYASHIKI, Cyntia Ayumi Yokota; JIMENEZ, Paula Christine; CASTRO, Ítalo Braga. Global health risks from pesticide use in Brazil. **Nature Food**, v. 1, n. 6, p. 312–314, 2020. DOI: 10.1038/s43016-020-0100-3.
- BREUGELMANS, Bert; SIMONET, Gert; VAN HOEF, Vincent; VAN SOEST, Sofie; VANDEN BROECK, Jozef. Pacifastin-related peptides: Structural and functional

- characteristics of a family of serine peptidase inhibitors. **Peptides**, v. 30, n. 3, p. 622–632, 2009. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.07.026.
- BROADWAY, Roxanne M.; DUFFEY, Sean S.; PEARCE, Gregory; RYAN, Clarence A. Plant Proteinase inhibitors: A defense against herbivorous insects? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 41, n. 1, p. 33–38, 1986. DOI: 10.1111/j.1570-7458.1986.tb02168.x.
- BUENO, A. F.; PANIZZI, A. R.; HUNT, T. E.; DOURADO, P. M.; PITTA, R. M.; GONÇALVES, J. Challenges for Adoption of Integrated Pest Management (IPM): the Soybean Example. **Neotropical Entomology**, v. 50, n. 1, p. 5–20, 2021. DOI: 10.1007/s13744-020-00792-9.
- CARNEIRO, Eliane; SILVA, Luciana Barboza; SILVA, Alexandre Faria Da; LOPES, Gleidyane Novais; PAVAN, Bruno Ettore; RODRIGUES, Raimundo Henrique Ferreira; CARVALHINHO, Diego Tavares; MIELEZRSKI, Diego Fabio. Lepidopteran pests associated with the soybean cultivars phenology. **Bioscience Journal**, p. 112–121, 2018. DOI: 10.14393/BJ-v34n1a2018-37172.
- CASIDA, John E.; QUISTAD, Gary B. **Golden age of insecticide research: Past, present, or future? Annual Review of Entomology**, 1998. DOI: 10.1146/annurev.ento.43.1.1.
- CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; GRANT, W. P.; GREAVES, J.; TATCHELL, G. M. Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability. **Trends in Food Science and Technology**, 2008. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.12.009.
- CHRISTELLER, J. T.; LAING, W. A.; MARKWICK, N. P.; BURGESS, E. P. J. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: Dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, n. 7, p. 735–746, 1992. DOI: 10.1016/0965-1748(92)90052-G.
- CIEMNY, Maciej; KURCINSKI, Mateusz; KAMEL, Karol; KOLINSKI, Andrzej; ALAM, Nawsad; SCHUELER-FURMAN, Ora; KMIĘCIK, Sebastian. Protein–peptide docking: opportunities and challenges. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 8, p. 1530–1537, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.05.006>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644617305937>.
- COMEAU, S. R.; GATCHELL, D. W.; VAJDA, S.; CAMACHO, C. J. ClusPro: a fully automated algorithm for protein–protein docking. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server, p. W96–W99, 2004. DOI: 10.1093/nar/gkh354.
- COPELAND, Robert A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. [s.l.] : Wiley, 2013. DOI: 10.1002/9781118540398.
- CRUZ, Ana C. B. et al. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from *Catanduva* (*Piptadenia moniliformis*) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 61–68, 2013. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.04.023.
- DANTZGER, Miriam; VASCONCELOS, Ilka Maria; SCORSATO, Valéria; APARICIO, Ricardo; MARANGONI, Sergio; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. Bowman–Birk

proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical properties and insecticidal potential. **Phytochemistry**, v. 118, p. 224–235, 2015. DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.08.013.

DASTRANJ, M.; BORZOU, E.; BANDANI, A. R.; FRANCO, O. L. Inhibitory effects of an extract from non-host plants on physiological characteristics of two major cabbage pests. **Bulletin of Entomological Research**, v. 108, n. 3, p. 370–379, 2018. DOI: 10.1017/S0007485317000864.

DAVIS, Rick; WHITTINGTON, Ruth. Aprotinin. **Drugs**, v. 49, n. 6, p. 954–983, 1995. DOI: 10.2165/00003495-199549060-00008.

DE OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho; DE PAULA SOUZA, Thaís; PARRA, José Roberto Postal; MARANGONI, Sergio; DE CASTRO SILVA-FILHO, Marcio; MACEDO, Maria Ligia Rodrigues. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, 2013. DOI: 10.1016/j.cbpb.2013.02.008.

DÍAZ, Katy; ESPINOZA, Luis; CARVAJAL, Rodrigo; CONDE-GONZÁLEZ, Marcos; NIEBLA, Vladimir; OLEA, Andrés F.; COLL, Yamilet. Biological Activities and Molecular Docking of Brassinosteroids 24-Norcholane Type Analogs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1832, 2020. DOI: 10.3390/ijms21051832.

DO AMARAL, Milena; FREITAS, Ana Camila Oliveira; SANTOS, Ariana Silva; DOS SANTOS, Everton Cruz; FERREIRA, Monaliza Macêdo; DA SILVA GESTEIRA, Abelmon; GRAMACHO, Karina Peres; MARINHO-PRADO, Jeanne Scardini; PIROVANI, Carlos Priminho. TcTI, a Kunitz-type trypsin inhibitor from cocoa associated with defense against pathogens. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 698, 2022. DOI: 10.1038/s41598-021-04700-y.

DOSA, Stefan; STIRNBERG, Marit; LÜLSDORFF, Verena; HÄUSSLER, Daniela; MAURER, Eva; GÜTSCHOW, Michael. Active site mapping of trypsin, thrombin and matriptase-2 by sulfamoyl benzamidines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 21, p. 6489–6505, 2012. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.08.042.

DUNSE, K. M.; KAAS, Q.; GUARINO, R. F.; BARTON, P. A.; CRAIK, D. J.; ANDERSON, M. A. Molecular basis for the resistance of an insect chymotrypsin to a potato type II proteinase inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 34, p. 15016–15021, 2010. DOI: 10.1073/pnas.1009327107.

ELLERT-MIKLASZEWSKA, Aleksandra; POLESZAK, Katarzyna; KAMINSKA, Bozena. Short peptides interfering with signaling pathways as new therapeutic tools for cancer treatment. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 199–221, 2017. DOI: 10.4155/fmc-2016-0189.

ELZEN, Gary W.; HARDEE, Dick D. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on managing insect resistance to insecticides. **Pest Management Science**, 2003. DOI: 10.1002/ps.659.

- ERLANGER, Bernard F.; KOKOWSKY, Nicholas; COHEN, William. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1961. a. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X.
- ERLANGER, Bernard F.; KOKOWSKY, Nicholas; COHEN, William. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, n. 2, p. 271–278, 1961. b. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X.
- FATHIPOUR, Yaghoub; SEDARATIAN, Amin; BAGHERI, Abdoolnabi; TALAEI-HASSANLOUEI, Reza. Increased food utilization indices and decreased proteolytic activity in *Helicoverpa armigera* larvae fed sublethal *Bacillus thuringiensis* -treated diet. **Physiological Entomology**, v. 44, n. 3–4, p. 178–186, 2019. DOI: 10.1111/phen.12288.
- FAUSTINO, Verônica Aparecida et al. Soybean plants under simultaneous signals of drought and *Anticarsia gemmatalis* herbivory trigger gene expression and metabolic pathways reducing larval survival. **Environmental and Experimental Botany**, v. 190, p. 104594, 2021. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2021.104594.
- FIANDRA, L.; CASARTELLI, M.; CERMENATI, G.; BURLINI, N.; GIORDANA, B. The intestinal barrier in lepidopteran larvae: Permeability of the peritrophic membrane and of the midgut epithelium to two biologically active peptides. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 1, p. 10–18, 2009. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2008.09.005.
- FINN, Robert D. et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkv1344.
- GASTEIGER, E. ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3784–3788, 2003. DOI: 10.1093/nar/gkg563.
- GEPPERT, Tim; HOY, Benjamin; WESSLER, Silja; SCHNEIDER, Gisbert. Context-Based Identification of Protein-Protein Interfaces and “Hot-Spot” Residues. **Chemistry & Biology**, v. 18, n. 3, p. 344–353, 2011. DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.01.005.
- GIRARD, Cécile; LE MÉTAYER, Martine; BONADÉ-BOTTINO, Michel; PHAM-DELÈGUE, Minh-Hà; JOUANIN, Lise. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 229–237, 1998. DOI: 10.1016/S0965-1748(98)00027-7.
- GIRI, Ashok P.; HARSULKAR, Abhay M.; DESHPANDE, Vasanti V.; SAINANI, Mohini N.; GUPTA, Vidya S.; RANJEKAR, Prabhakar K. Chickpea Defensive Proteinase Inhibitors Can Be Inactivated by Podborer Gut Proteinases1. **Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 393–401, 1998. DOI: 10.1104/pp.116.1.393.

- GLENNON, Richard A. et al. Binding of O -Alkyl Derivatives of Serotonin at Human 5-HT1D β Receptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 314–322, 1996. DOI: 10.1021/jm950498t.
- GRANDE, Marcela Laiz Mora; RANDO, Jael Simões Santos. Integrated pest control adopted by soybean and corn farmers in Londrina, Paraná state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, n. 0, 2018. DOI: 10.1590/1808-1657000242015.
- GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium¹²³. **Journal of Economic Entomology**, 1976. DOI: 10.1093/jee/69.4.487.
- GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl, p. W270–W277, 2011. DOI: 10.1093/nar/gkr366.
- GROVER, Sheetanshu; KAUR, Satvir; GUPTA, Anil Kumar; TAGGAR, Gaurav Kumar; KAUR, Jagmeet. Characterization of Trypsin Like Protease from *Helicoverpa armigera* (Hubner) and Its Potential Inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 88, n. 1, p. 49–56, 2018. DOI: 10.1007/s40011-016-0732-0.
- GUO, Peng-Chao; DONG, Zhaoming; ZHAO, Ping; ZHANG, Yan; HE, Huawei; TAN, Xiang; ZHANG, Weiwei; XIA, Qingyou. Structural insights into the unique inhibitory mechanism of the silkworm protease inhibitor serpin18. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11863, 2015. DOI: 10.1038/srep11863.
- HAGGAG, Yusuf A. Peptides as Drug Candidates: Limitations and Recent Development Perspectives. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 8, n. 4, 2018. DOI: 10.26717/BJSTR.2018.08.001694.
- HANSSON, Tomas; MARELIUS, John; ÅQVIST, Johan. Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, 1998. DOI: 10.1023/A:1007930623000.
- HARTL, Markus; GIRI, Ashok P.; KAUR, Harleen; BALDWIN, Ian T. The multiple functions of plant serine protease inhibitors. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 7, p. 1009–1011, 2011. DOI: 10.4161/psb.6.7.15504.
- HEDSTROM, Lizbeth. Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501–4524, 2002. DOI: 10.1021/cr000033x.
- HEGEDUS, Dwayne; BALDWIN, Doug; O'GRADY, Michael; BRAUN, Lorraine; GLEDDIE, Steve; SHARPE, Andrew; LYDIATE, Derek; ERLANDSON, Martin. Midgut proteases from *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: Characterization, cDNA cloning, and expressed sequence tag analysis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 53, n. 1, p. 30–47, 2003. DOI: 10.1002/arch.10084.
- HEMATI, S. A.; NASERI, B.; GANBALANI, G. Nouri; DASTJERDI, H. Rafiee; GOLIZADEH, A. Effect of Different Host Plants on Nutritional Indices of the Pod

- Borer, *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Science**, v. 12, n. 55, p. 1–15, 2012. DOI: 10.1673/031.012.5501.
- HERREBOUT, W. A.; SUHM, M. A. Weak hydrogen bonds – strong effects? **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 31, p. 13858, 2011. DOI: 10.1039/c1cp90110a.
- HOLTOF, Michiel; LENAERTS, Cynthia; CULLEN, Darron; VANDEN BROECK, Jozef. Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut. **Cell and Tissue Research**, v. 377, n. 3, p. 397–414, 2019. DOI: 10.1007/s00441-019-03031-9.
- HORIKOSHI, Renato J. et al. Resistance status of lepidopteran soybean pests following large-scale use of MON 87701 × MON 89788 soybean in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 21323, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-00770-0.
- HUANG, Jing; RAUSCHER, Sarah; NAWROCKI, Grzegorz; RAN, Ting; FEIG, Michael; DE GROOT, Bert L.; GRUBMÜLLER, Helmut; MACKERELL, Alexander D. CHARM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. **Nature Methods**, v. 14, n. 1, p. 71–73, 2017. DOI: 10.1038/nmeth.4067.
- JADHAV, Abhilash R.; WAR, Abdul R.; NIKAM, Ashwini N.; ADHAV, Anmol S.; GUPTA, Vidya S.; SHARMA, Hari C.; GIRI, Ashok P.; TAMHANE, Vaijayanti A. Capsicum annum proteinase inhibitor ingestion negatively impacts the growth of sorghum pest *Chilo partellus* and promotes differential protease expression. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 8, p. 302–309, 2016. DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.09.016.
- JAMAL, Farrukh; PANDEY, Prabhash K.; SINGH, Dushyant; KHAN, M. Y. **Serine protease inhibitors in plants: Nature's arsenal crafted for insect predators. Phytochemistry Reviews**, 2013. DOI: 10.1007/s11101-012-9231-y.
- JANIN, Joël; HENRICK, Kim; MOULT, John; EYCK, Lynn Ten; STERNBERG, Michael J. E.; VAJDA, Sandor; VAKSER, Ilya; WODAK, Shoshana J. CAPRI: A critical assessment of PRedicted interactions. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, 2003. DOI: 10.1002/prot.10381.
- JANKOWSKA, Milena; ROGALSKA, Justyna; WYSZKOWSKA, Joanna; STANKIEWICZ, Maria. Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System—A Review. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 34, 2017. DOI: 10.3390/molecules23010034.
- JUNG, Hyun Ah; ALI, Md Yousof; CHOI, Ran Joo; JEONG, Hyong Oh; CHUNG, Hae Young; CHOI, Jae Sue. Kinetics and molecular docking studies of fucosterol and fucoxanthin, BACE1 inhibitors from brown algae *Undaria pinnatifida* and *Ecklonia stolonifera*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 89, p. 104–111, 2016. DOI: 10.1016/j.fct.2016.01.014.
- KAHLER, Ursula; FUCHS, Julian E.; GOETTIG, Peter; LIEDL, Klaus R. An unexpected switch in peptide binding mode: from simulation to substrate specificity. **Journal**

of **Biomolecular Structure and Dynamics**, 2018. DOI: 10.1080/07391102.2017.1407674.

- KALLURE, Gopal S.; KUMARI, Archana; SHINDE, Balkrishna A.; GIRI, Ashok P. Characterized constituents of insect herbivore oral secretions and their influence on the regulation of plant defenses. **Phytochemistry**, v. 193, p. 113008, 2022. DOI: 10.1016/j.phytochem.2021.113008.
- KANT, M. R. et al. Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. **Annals of Botany**, v. 115, n. 7, p. 1015–1051, 2015. DOI: 10.1093/aob/mcv054.
- KASPAR, Allan A.; REICHERT, Janice M. **Future directions for peptide therapeutics development. Drug Discovery Today**, 2013. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.05.011.
- KATOCH, Rajan. Insect Pest Resistance Factors in Rice Bean. *In: Ricebean*. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 233–270. DOI: 10.1007/978-981-15-5293-9_14.
- KELLEY, Lawrence A.; MEZULIS, Stefans; YATES, Christopher M.; WASS, Mark N.; STERNBERG, Michael J. E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.
- KHAN, Hafiz Azhar Ali. Characterization of permethrin resistance in a *Musca domestica* strain: resistance development, cross-resistance potential and realized heritability. **Pest Management Science**, v. 75, n. 11, p. 2969–2974, 2019. DOI: 10.1002/ps.5409.
- KIMURA, S. Roy; BROWER, Richard C.; VAJDA, Sandor; CAMACHO, Carlos J. Dynamical View of the Positions of Key Side Chains in Protein-Protein Recognition. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 2, p. 635–642, 2001. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)76044-4.
- KOIDE, Takehiko; IKENAKA, Tokujji; TSUNASAWA, Susumu. Studies on Soybean Trypsin Inhibitors. 2. Amino-Acid Sequence around the Reactive Site of Soybean Trypsin Inhibitor (Kunitz). **European Journal of Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 408–416, 1973. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb02623.x.
- KORTBEEK, Ruy W. J.; VAN DER GRAGT, Michelle; BLEEKER, Petra M. Endogenous plant metabolites against insects. **European Journal of Plant Pathology**, v. 154, n. 1, p. 67–90, 2019. DOI: 10.1007/s10658-018-1540-6.
- KOZAKOV, Dima; HALL, David R.; XIA, Bing; PORTER, Kathryn A.; PADHORNY, Dzmity; YUEH, Christine; BEGLOV, Dmitri; VAJDA, Sandor. The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature Protocols**, v. 12, n. 2, p. 255–278, 2017. DOI: 10.1038/nprot.2016.169.
- KUWAR, Suyog S.; PAUCHET, Yannick; VOGEL, Heiko; HECKEL, David G. Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut of *Helicoverpa*

- armigera in response to a plant protease inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2015. DOI: 10.1016/j.ibmb.2015.01.016.
- LAND, Henrik; HUMBLE, Maria Svedendahl. YASARA: A tool to obtain structural guidance in biocatalytic investigations. *In: Methods in Molecular Biology*. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1007/978-1-4939-7366-8_4.
- LEE, Andy Chi-Lung; HARRIS, Janelle Louise; KHANNA, Kum Kum; HONG, Ji-Hong. A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2383, 2019. DOI: 10.3390/ijms20102383.
- LEWIS, Sidney D.; NG, Assunta S.; BALDWIN, John J.; FUSETANI, Nobuhiro; NAYLOR, Adel M.; SHAFER, Jules A. Inhibition of thrombin and other trypsin-like serine proteinases by cyclotheonamide A. **Thrombosis Research**, v. 70, n. 2, p. 173–190, 1993. DOI: 10.1016/0049-3848(93)90158-K.
- LIANG, Guyan; PHILLIP BOWEN, J. Development of Trypsin-Like Serine Protease Inhibitors as Therapeutic Agents: Opportunities, Challenges, and their Unique Structure-Based Rationales. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 13, p. 1506–1529, 2016. DOI: 10.2174/1568026615666150915121447.
- LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; MARANA, S. R.; JULIANO, L.; TERRA, W. R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 130–140, 2006. DOI: 10.1016/j.ibmb.2005.11.006.
- MACALINO, Stephani Joy Y.; BASITH, Shaherin; CLAVIO, Nina Abigail B.; CHANG, Hyerim; KANG, Soosung; CHOI, Sun. Evolution of In Silico Strategies for Protein-Protein Interaction Drug Discovery. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1963, 2018. DOI: 10.3390/molecules23081963.
- MACHADO, Eduardo P. et al. Interspecific Variation in Susceptibility to Insecticides by Lepidopteran Pests of Soybean, Cotton, and Maize Crops From Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 2022. DOI: 10.1093/jee/toab265.
- MACHADO, Suzy Wider; DE OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho; ZÉRIO, Neide Graciano; PARRA, José Roberto Postali; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. *Inga laurina* trypsin inhibitor (ILTI) obstructs *Spodoptera frugiperda* trypsins expressed during adaptive mechanisms against plant protease inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 95, n. 4, p. e21393, 2017. DOI: 10.1002/arch.21393.
- MARKUS DITTRICH; CHALERPOL KANCHANAWARIN. **Case Study: BPTI2008**. p. 1–19.
- MEDIC, Jelena; ATKINSON, Christine; HURBURGH, Charles R. Current Knowledge in Soybean Composition. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 3, p. 363–384, 2014. DOI: 10.1007/s11746-013-2407-9.
- MENDONÇA, Eduardo G.; ALMEIDA BARROS, Rafael; CORDEIRO, Gláucia; SILVA, Carolina R.; CAMPOS, Welligton G.; OLIVEIRA, Joel A.; ALMEIDA OLIVEIRA,

Maria G. Larval development and proteolytic activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to different soybean protease inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 1, 2020. DOI: 10.1002/arch.21637.

MERIÑO-CABRERA, Yaremis; CASTRO, José Severiche; DE ALMEIDA BARROS, Rafael; DA SILVA JUNIOR, Neilier Rodrigues; DE OLIVEIRA RAMOS, Humberto; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Arginine-containing dipeptides decrease affinity of gut trypsins and compromise soybean pest development. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, p. 105107, 2022. DOI: 10.1016/j.pestbp.2022.105107.

MERIÑO-CABRERA, Yaremis; OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; MACEDO, Maria Ligia Rodrigues; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Inhibition of digestive trypsins by plant Kunitz proteins reduces the viability of *Spodoptera cosmioides* larvae. **Annals of Applied Biology**, v. 175, n. 3, p. 336–349, 2019. a. DOI: 10.1111/aab.12539.

MERIÑO-CABRERA, Yaremis; OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; MACEDO, Maria Ligia Rodrigues; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Inhibition of digestive trypsins by plant Kunitz proteins reduces the viability of *Spodoptera cosmioides* larvae. **Annals of Applied Biology**, v. 175, n. 3, p. 336–349, 2019. b. DOI: 10.1111/aab.12539.

MERIÑO-CABRERA, Yaremis; SEVERICHE CASTRO, José Gregório; RIOS DIEZ, Juan Diego; RODRIGUES MACEDO, Maria Ligia; DE OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; GORETI DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria. Rational design of mimetic peptides based on the interaction between *Inga laurina* inhibitor and trypsins for *Spodoptera cosmioides* pest control. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, p. 103390, 2020. DOI: 10.1016/j.ibmb.2020.103390.

MERSKI, Matthew; MOREIRA, Cátia; ABREU, Rui MV; RAMOS, Maria João; FERNANDES, Pedro A.; MARTINS, L. Miguel; PEREIRA, Pedro José Barbosa; MACEDO-RIBEIRO, Sandra. Molecular motion regulates the activity of the Mitochondrial Serine Protease HtrA2. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 10, p. e3119–e3119, 2017. DOI: 10.1038/cddis.2017.487.

MICHAUD, D.; CANTIN, L.; VRAIN, T. C. Carboxy-Terminal Truncation of Oryzacystatin II by Oryzacystatin-Insensitive Insect Digestive Proteinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 322, n. 2, p. 469–474, 1995. DOI: 10.1006/abbi.1995.1490.

MIRZAEI, Mahta; MIRDAMADI, Saeed; SAFAVI, Maliheh; SOLEYMANZADEH, Nazila. The stability of antioxidant and ACE-inhibitory peptides as influenced by peptide sequences. **LWT**, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109710.

MOCZYDLOWSKI, Edward; MOSS, Guy W. J.; LUCCHESI, Kathryn J. Bovine pancreatic trypsin inhibitor as a probe of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels at an internal site of interaction. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 1, p. 21–28, 1992. DOI: 10.1016/0006-2952(92)90656-4.

- MOREIRA, Irina S.; FERNANDES, Pedro A.; RAMOS, Maria J. Hot spots-A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 68, n. 4, p. 803–812, 2007. DOI: 10.1002/prot.21396.
- NAPOLEÃO, Thiago H.; ALBUQUERQUE, Lidiane P.; SANTOS, Nataly DL; NOVA, Isabella CV; LIMA, Thâmarah A.; PAIVA, Patrícia MG; PONTUAL, Emmanuel V. Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. **Pest Management Science**, v. 75, n. 5, p. 1212–1222, 2019. DOI: 10.1002/ps.5233.
- NAUEN, Ralf; STEINBACH, Denise. Resistance to diamide insecticides in lepidopteran pests. *In: Advances in Insect Control and Resistance Management*. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1007/978-3-319-31800-4_12.
- NOWICKI, Patryk; KUCZER, Mariola; SCHROEDER, Grzegorz; CZARNIEWSKA, Elżbieta. Disruption of insect immunity using analogs of the pleiotropic insect peptide hormone Neb-colloostatin: a nanotech approach for pest control II. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 9459, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-87878-5.
- OERKE, E. C. **Crop losses to pests**. **Journal of Agricultural Science**, 2006. DOI: 10.1017/S0021859605005708.
- OLIVEIRA, M. G. A.; DE SIMONE, S. G.; XAVIER, L. P.; GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, n. 3, p. 369–380, 2005. DOI: 10.1016/j.cbpc.2004.10.018.
- OLIVEIRA, M. G.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. Identification by covalent labeling with p-diazoniumbenzamidinium and kinetic characterization of Tyr-151-(p-benzamidino)-azo-beta-trypsin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 36, p. 26893–26903, 1993. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)74195-7.
- OONINCX, Dennis G. A. B.; VAN BROEKHOVEN, Sarah; VAN HUIS, Arnold; VAN LOON, Joop J. A. Feed Conversion, Survival and Development, and Composition of Four Insect Species on Diets Composed of Food By-Products. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0144601, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0144601.
- OPPERT, Brenda; MORGAN, Tom D.; KRAMER, Karl J. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin and protease inhibitors against coleopteran storage pests. **Pest Management Science**, v. 67, n. 5, p. 568–573, 2011. DOI: 10.1002/ps.2099.
- PANDEY, Ankesh; YADAV, Reena; KUMAR, Sanoj; KUMAR, Anil; SHUKLA, Priya; YADAV, Ankita; SANYAL, Indraneel. Expression of the entomotoxic *Cocculus hirsutus* trypsin inhibitor (ChTI) gene in transgenic chickpea enhances its underlying resistance against the infestation of *Helicoverpa armigera* and

- Spodoptera litura. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 146, n. 1, p. 41–56, 2021. DOI: 10.1007/s11240-021-02041-2.
- PANDEY, Ankesh; YADAV, Reena; SANYAL, Indraneel. Evaluating the pesticidal impact of plant protease inhibitors: lethal weaponry in the co-evolutionary battle. **Pest Management Science**, 2021. DOI: 10.1002/ps.6659.
- PARDE, Vinod D.; SHARMA, Hari C.; KACHOLE, Manvendra S. In vivo inhibition of Helicoverpa armigera gut pro-proteinase activation by non-host plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 9, p. 1315–1324, 2010. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2010.04.003.
- PATARROYO-VARGAS, ADRIANA M.; CORDEIRO, GLÁUCIA; SILVA, CAROLINA R. Da; SILVA, CAMILA R. Da; MENDONÇA, EDUARDO G.; VISÔTTO, LILIANE E.; ZANUNCIO, JOSÉ C.; CAMPOS, WELLINGTON G.; OLIVEIRA, MARIA GORETI A. Inhibition kinetics of digestive proteases for Anticarsia gemmatalis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. suppl 1, 2020. DOI: 10.1590/0001-3765202020180477.
- PATARROYO-VARGAS, Adriana M.; MERINO-CABRERA, Yaremis B.; ZANUNCIO, Jose C.; ROCHA, Francelina; CAMPOS, Wellington G.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Kinetic Characterization of Anticarsia gemmatalis Digestive Serine-Proteases and the Inhibitory Effect of Synthetic Peptides. **Protein & Peptide Letters**, v. 24, n. 11, 2018. DOI: 10.2174/0929866524666170918103146.
- PILON, ANDERSON M.; CAMPOS, WELLINGTON G.; SILVA, CAROLINA R.; CORDEIRO, GLÁUCIA; SILVA, CAMILA R.; OLIVEIRA, MARIA GORETI A. Protease inhibitory, insecticidal and deterrent effects of the trypsin-inhibitor benzamidine on the velvetbean caterpillar in soybean. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3475–3482, 2018. DOI: 10.1590/0001-3765201820180159.
- PIMENTEL, David; BURGESS, Michael. Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States. *In: Integrated Pest Management*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 47–71. DOI: 10.1007/978-94-007-7796-5_2.
- REISIG, Dominic D.; KURTZ, Ryan. Bt Resistance Implications for Helicoverpa zea (Lepidoptera: Noctuidae) Insecticide Resistance Management in the United States. **Environmental Entomology**, 2018. DOI: 10.1093/ee/nvy142.
- ROBIN, Tal; REUVENI, Shlomi; URBAKH, Michael. Single-molecule theory of enzymatic inhibition. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 779, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-02995-6.
- ROBINSON, David; BLISS, Edward. A model of the direct and indirect effects of aprotinin administration on the overall costs of coronary revascularization surgery in a university teaching hospital cardiothoracic unit. **Clinical Therapeutics**, v. 24, n. 10, p. 1677–1689, 2002. DOI: 10.1016/S0149-2918(02)80071-6.

- ROYCHAUDHURI, Robin; SARATH, Gautam; ZEECE, Michael; MARKWELL, John. Reversible denaturation of the soybean Kunitz trypsin inhibitor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 412, n. 1, p. 20–26, 2003. DOI: 10.1016/S0003-9861(03)00011-0.
- SACZEWSKI, Franciszek; BALEWSKI, Łukasz. Biological activities of guanidine compounds. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, n. 10, p. 1417–1448, 2009. DOI: 10.1517/13543770903216675.
- SAIKHEDKAR, Nidhi S.; JOSHI, Rakesh S.; BHOITE, Ashiwini S.; MOHANDASAN, Radhika; YADAV, Amit Kumar; FERNANDES, Moneesha; KULKARNI, Kiran A.; GIRI, Ashok P. Tripeptides derived from reactive centre loop of potato type II protease inhibitors preferentially inhibit midgut proteases of *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 95, p. 17–25, 2018. DOI: 10.1016/j.ibmb.2018.02.001.
- SAIKHEDKAR, Nidhi S.; JOSHI, Rakesh S.; YADAV, Amit K.; SEAL, Shubhendu; FERNANDES, Moneesha; GIRI, Ashok P. Phyto-inspired cyclic peptides derived from plant Pin-II type protease inhibitor reactive center loops for crop protection from insect pests. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 2019. DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.05.003.
- SANTOS, Lucianna H. S.; FERREIRA, Rafaela S.; CAFFARENA, Ernesto R. Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. *In*: [s.l: s.n.]. p. 13–34. DOI: 10.1007/978-1-4939-9752-7_2.
- SHAMSI, Tooba Naz; PARVEEN, Romana; FATIMA, Sadaf. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 1120–1133, 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.069.
- SILVA JÚNIOR, Neilier R.; VITAL, Camilo E.; ALMEIDA BARROS, Rafael; FAUSTINO, Verônica A.; MONTEIRO, Luana P.; BARROS, Edvaldo; OLIVEIRA, Eugênio E.; OLIVEIRA RAMOS, Humberto J.; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Intestinal proteolytic profile changes during larval development of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 1, 2020. DOI: 10.1002/arch.21631.
- SINGH, Raushan Kumar; TIWARI, Manish Kumar; KIM, In-Won; CHEN, Zhilei; LEE, Jung-Kul. Probing the Role of Sigma π Interaction and Energetics in the Catalytic Efficiency of Endo-1,4- β -Xylanase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8817–8821, 2012. DOI: 10.1128/AEM.02261-12.
- SINGH, Sujata; SINGH, Archana; KUMAR, Sumit; MITTAL, Pooja; SINGH, Indrakant K. Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. **Insect Science**, 2020. DOI: 10.1111/1744-7917.12641.
- SOKALINGAM, Sriram; RAGHUNATHAN, Govindan; SOUNDARAJAN, Nagasundarapandian; LEE, Sun-Gu. A Study on the Effect of Surface Lysine to Arginine Mutagenesis on Protein Stability and Structure Using Green Fluorescent

Protein. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40410, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0040410.

SONG, Hyun Kyu; SUH, Se Won. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator 1 Edited by R. Huber. **Journal of Molecular Biology**, v. 275, n. 2, p. 347–363, 1998. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1469.

SOUTO, XÊNIA M.; BRANQUINHA, MARTA H.; SANTOS, ANDRÉ L. S. Chymotrypsin- and trypsin-like activities secreted by the multidrug-resistant yeasts forming the *Candida haemulonii* complex. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 3, 2019. DOI: 10.1590/0001-3765201920180735.

SPIT, Jornt; BREUGELMANS, Bert; VAN HOEF, Vincent; SIMONET, Gert; ZELS, Sven; BROECK, Jozef Vanden. Growth-inhibition effects of pacifastin-like peptides on a pest insect: The desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Peptides**, v. 34, n. 1, p. 251–257, 2012. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.06.019.

SRINIVASAN, Ajay; GIRI, Ashok; GUPTA, Vidya. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 11, n. 1, 2006. DOI: 10.2478/s11658-006-0012-8.

SWEDBERG, Joakim E.; DE VEER, Simon J.; SIT, Kei C.; REBOUL, Cyril F.; BUCKLE, Ashley M.; HARRIS, Jonathan M. Mastering the Canonical Loop of Serine Protease Inhibitors: Enhancing Potency by Optimising the Internal Hydrogen Bond Network. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e19302, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0019302.

TABASHNIK, Bruce E.; CARRIÈRE, Yves. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 10, p. 926–935, 2017. DOI: 10.1038/nbt.3974.

TAYLOR, R. D.; JEWSBURY, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, n. 3, p. 151–166, 2002. DOI: 10.1023/A:1020155510718.

TERRA, Walter R.; FERREIRA, Clélia. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 1–62, 1994. DOI: 10.1016/0305-0491(94)90141-4.

TOMARELLI, R.; CHARNEY, J.; HARDING, M. The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 34, n. 3, p. 428–433, 1949.

UMETSU, Noriharu; SHIRAI, Yuichi. Development of novel pesticides in the 21st century. **Journal of Pesticide Science**, v. 45, n. 2, p. 54–74, 2020. DOI: 10.1584/jpestics.D20-201.

USDA. **World Agricultural Production**. [s.l: s.n.].

- VAJRAVIJAYAN, Senthilvadivel; PLETNEV, Sergei; PLETNEV, Vladimir Z.; NANDHAGOPAL, Narayanasamy; GUNASEKARAN, Krishnasamy. Crystal structure of a novel Kunitz type inhibitor, alocasin with anti- *Aedes aegypti* activity targeting midgut proteases. **Pest Management Science**, v. 74, n. 12, p. 2761–2772, 2018. DOI: 10.1002/ps.5063.
- VOLPICELLA, Mariateresa; CORDEWENER, Jan; JONGSMA, Maarten A.; GALLERANI, Raffaele; CECI, Luigi R.; BEEKWILDER, Jules. Identification and characterization of digestive serine proteases from inhibitor-resistant *Helicoverpa zea* larval midgut☆. **Journal of Chromatography B**, v. 833, n. 1, p. 26–32, 2006. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.10.021.
- WALDBAUER, G. P. The Consumption and Utilization of Food by Insects. *In*: [s.l.: s.n.]. p. 229–288. DOI: 10.1016/S0065-2806(08)60230-1.
- WAN, Shunzhou; KNAPP, Bernhard; WRIGHT, David W.; DEANE, Charlotte M.; COVENEY, Peter V. Rapid, Precise, and Reproducible Prediction of Peptide-MHC Binding Affinities from Molecular Dynamics That Correlate Well with Experiment. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 2015. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00179.
- WANG, Bo; XIE, Ningning; LI, Bo. **Influence of peptide characteristics on their stability, intestinal transport, and in vitro bioavailability: A review**. **Journal of Food Biochemistry**, 2019. DOI: 10.1111/jfbc.12571.
- WATERHOUSE, Andrew et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2018. DOI: 10.1093/nar/gky427.
- WOLDEMARIAM, Melkamu G.; AHERN, Kevin; JANDER, Georg; TZIN, Vered. A role for 9-lipoxygenases in maize defense against insect herbivory. **Plant Signaling & Behavior**, v. 13, n. 1, p. e1422462, 2018. DOI: 10.1080/15592324.2017.1422462.
- YANG, Limei; FANG, Zhiyuan; DICKE, Marcel; LOON, Joop J. A. van; JONGSMA, Maarten A. The diamondback moth, *Plutella xylostella*, specifically inactivates Mustard Trypsin Inhibitor 2 (MTI2) to overcome host plant defence. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2009. DOI: 10.1016/j.ibmb.2008.09.012.
- ZHAO, Aiping; LI, Yin; LENG, Chunmeng; WANG, Ping; LI, Yiping. Inhibitory Effect of Protease Inhibitors on Larval Midgut Protease Activities and the Performance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Frontiers in Physiology**, v. 9, 2019. a. DOI: 10.3389/fphys.2018.01963.
- ZHAO, Junnan; ZHU, Lu; ZHOU, Weineng; YIN, Lingfeng; WANG, Yuchen; FAN, Yuanrong; CHEN, Yadong; LIU, Haichun. In silico Prediction of Inhibitory Constant of Thrombin Inhibitors Using Machine Learning. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 21, n. 9, p. 662–669, 2019. b. DOI: 10.2174/1386207322666181220130232.

- ZHAO, Ping; WANG, Gen Hong; DONG, Zhao Ming; DUAN, Jun; XU, Ping Zhen; CHENG, Ting Cai; XIANG, Zhong Huai; XIA, Qing You. Genome-wide identification and expression analysis of serine proteases and homologs in the silkworm *Bombyx mori*. **BMC Genomics**, 2010. DOI: 10.1186/1471-2164-11-405.
- ZHIRNOV, O. P.; KLENK, H. D.; WRIGHT, P. F. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. **Antiviral Research**, v. 92, n. 1, p. 27–36, 2011. DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.07.014.
- ZHOU, Aiwu; CARRELL, Robin W.; HUNTINGTON, James A. The Serpin Inhibitory Mechanism Is Critically Dependent on the Length of the Reactive Center Loop. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 29, p. 27541–27547, 2001. DOI: 10.1074/jbc.M102594200.
- ZHU-SALZMAN, Keyan; ZENG, Rensen. Insect Response to Plant Defensive Protease Inhibitors. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 233–252, 2015. DOI: 10.1146/annurev-ento-010814-020816.

TABELAS

Tabela 1. Sequências de tripsinas-like de pragas de Lepidoptera obtidas do banco de dados NCBI (*Anticarsia gemmatalis* 1, *Anticarsia gemmatalis* 2, *Helicoperva armígera*, *Manduca sexta* e *Spodoptera frugiperda*) e identificadas por Da Silva Junior et al. 2019 (*Anticarsia gemmatalis* 3-6)

GenBank	Species
AWL83213.1	<i>Anticarsia gemmatalis</i> 1
AWL83215.1	<i>Anticarsia gemmatalis</i> 2
GFUV01000200.1_218	<i>Anticarsia gemmatalis</i> 3
GFUV01000974.1_1027	<i>Anticarsia gemmatalis</i> 4
GFUV01001559.1_1635	<i>Anticarsia gemmatalis</i> 5
GFUV01004150.1_4332	<i>Anticarsia gemmatalis</i> 6
ACB54938.1	<i>Helicoperva armígera</i>
AAA29339.1	<i>Manduca sexta</i>
ACR25157.1	<i>Spodoptera frugiperda</i>

Tabela 2. Energia livre de ligação calculada para os complexos GORE1-tripsina e GORE2-tripsina de *Anticarsia gemmatalis* e outras tripsinas-like de insetos lepidópteros usando o software online Swissdock.

Trypsins	$\Delta G_{Binding}$ GORE1	$\Delta G_{Binding}$ GORE2
<i>A. gemmatalis</i> 1	-7.31	-7.65
<i>A. gemmatalis</i> 2	-7.14	-8.23
<i>A. gemmatalis</i> 3	-7.45	-8.41
<i>A. gemmatalis</i> 4	-7.66	-9.26
<i>A. gemmatalis</i> 5	-8.96	-9.87
<i>A. gemmatalis</i> 6	-7.77	-8.63
<i>H. armígera</i>	-6.77	-9.16
<i>M. sexta</i>	-8.26	-7.57
<i>S. frugiperda</i>	-7.20	-9.68

Tabela 3. Purificação parcial do extrato bruto do intestino de *A. gemmatalis* visando a obtenção de tripsinas-*like*.

Material	Total protein ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Total activity ($\mu\text{M}/\text{s}$)	Specific activity ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$)	Fold purification	Enzyme yield (%)
Extract	0.82	1.31	1.35	1.0	100
Purified	0.24	1.05	4.43	3.28	80

Tabela 4. Parâmetros de larvas e pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) expostos a dieta contendo 0,12% dos peptídeos GORE1 e GORE2, inibidor de SKTI (controle positivo) e dieta controle (sem inibidor). Os dados da tabela são médias \pm SE. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa em $P < 0,05$ avaliado pelo teste de Duncan.

Protease inhibitor	Larval period (days)	Pupal weight (g)	Pupal protein content ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Pupal protein content/ Pupal weight ratio
Control	14.667 \pm 0.150a	0.214 \pm 0.009a	1.107 \pm 0.0305a	5.347 \pm 0.150a
GORE1	14.833 \pm 0.167a	0.181 \pm 0.008b	1.152 \pm 0.0161a	6.380 \pm 0.249b
GORE2	15.750 \pm 0.250b	0.233 \pm 0.013a	1.173 \pm 0.0461a	4.603 \pm 0.155c
SKTI	14.833 \pm 0.149a	0.213 \pm 0.008a	1.101 \pm 0.0234a	5.182 \pm 0.130ac

FIGURAS

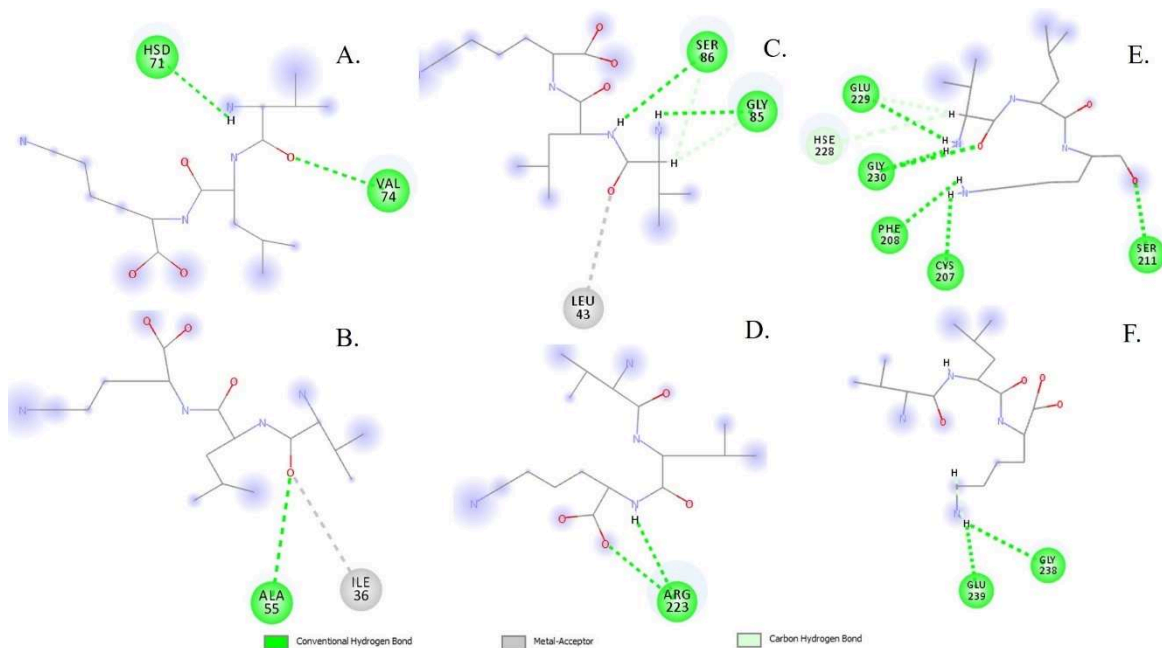


Figura 1. Perfil farmacofórico gerado pelo programa Discovery studio das interações entre tripsinas-like de *A. gemmatalis* e o peptídeo GORE1, obtidos por *docking* molecular.

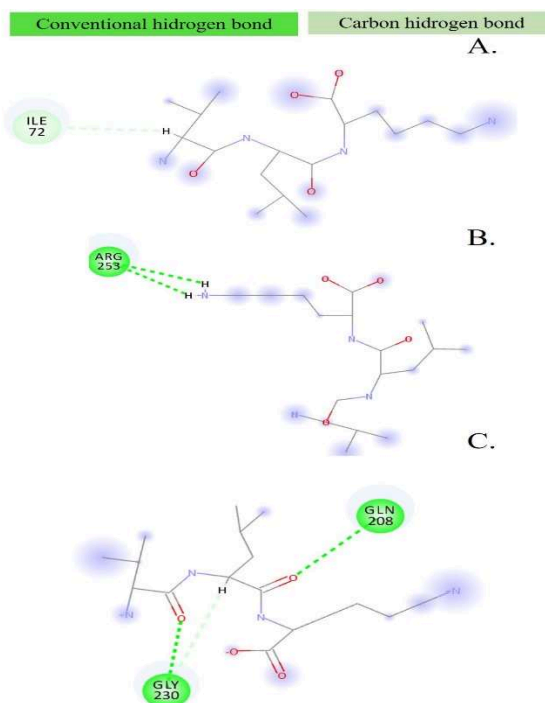


Figura 2. Perfil farmacofórico gerado pelo programa Discovery studio das interações entre tripsinas-like de (A) *Helicoverpa armigera* (B) *Manduca sexta* (C) *Spodoptera frugiperda* e o peptídeo GORE1, obtidos por *docking* molecular.

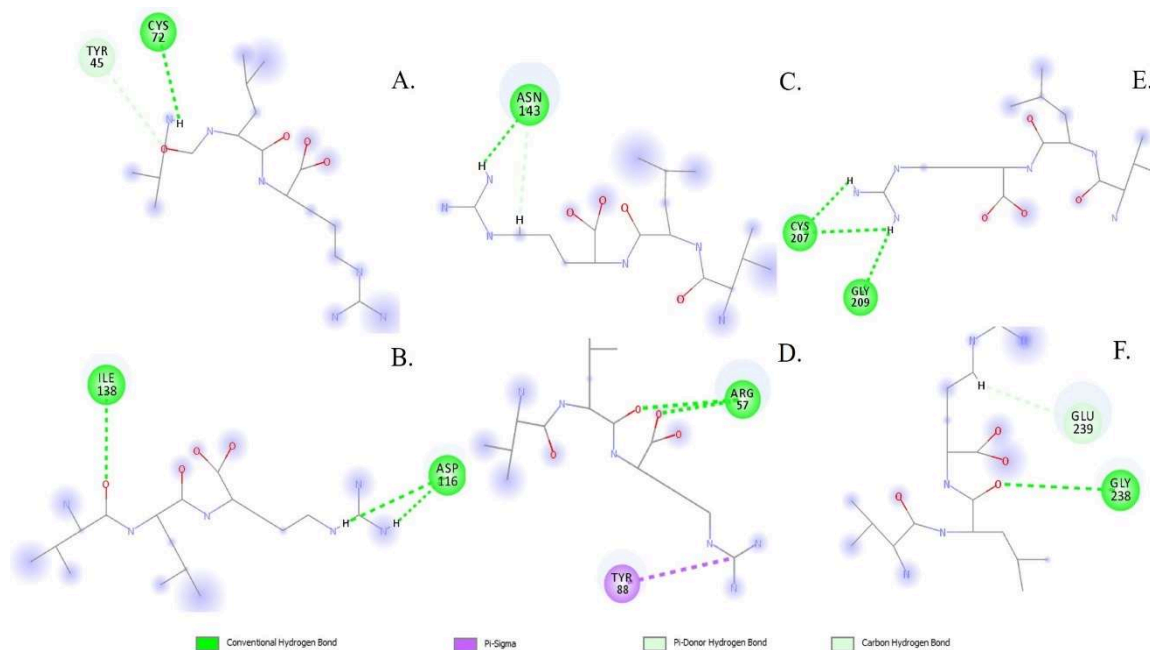


Figura 3. Perfil farmacofórico gerado pelo programa Discovery studio das interações entre tripsinas-like de *A. gemmatalis* e o peptídeo GORE2, obtidos por *docking* molecular.

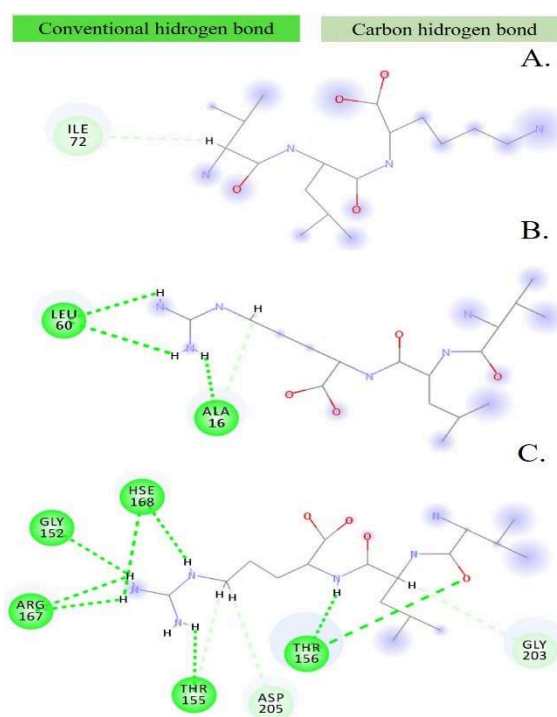


Figura 4. Perfil farmacofórico gerado pelo programa Discovery studio das interações entre tripsinas-like de (A) *Helicoverpa armigera* (B) *Manduca sexta* (C) *Spodoptera frugiperda* e o peptídeo GORE2, obtidos por *docking* molecular.

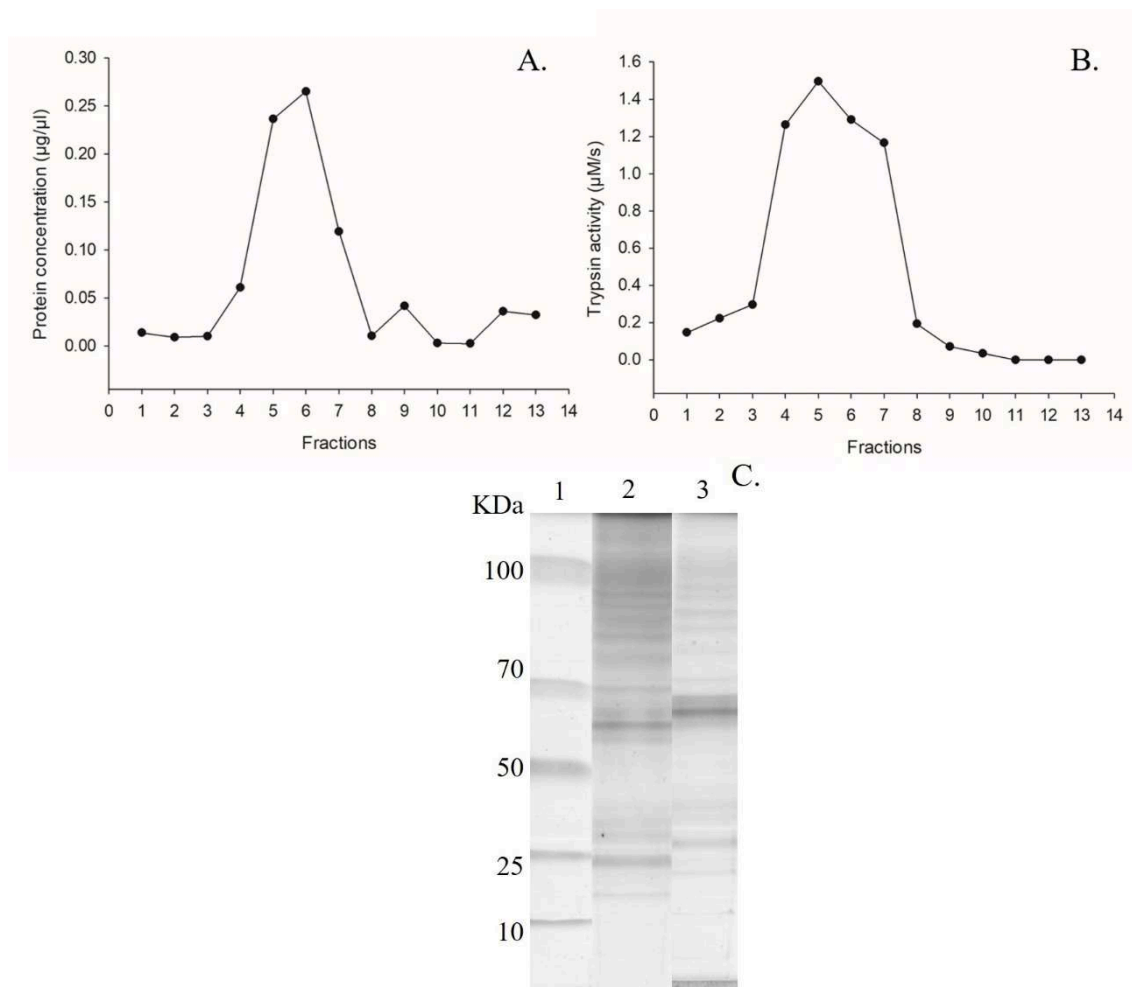


Figura 5. Perfil cromatográfico do extrato solúvel do intestino de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) em coluna HiTrap Benzamidine (high sub) (GE). A atividade de tripsina-*like* ($\mu\text{M/s}$) foi realizada usando o substrato L-BApNA (a). Concentração de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (b). Perfil eletroforético em eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) serino-protease 12% solúvel no intestino de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (c). Massa molecular padrão (Promega) (1). Fração solúvel do extrato bruto (2). Fração enzimática correspondente ao pico de atividade após purificação em coluna HiTrap Benzamidine (high sub) (GE) (3). A figura foi realizada usando o *software* Graphpad Prism.

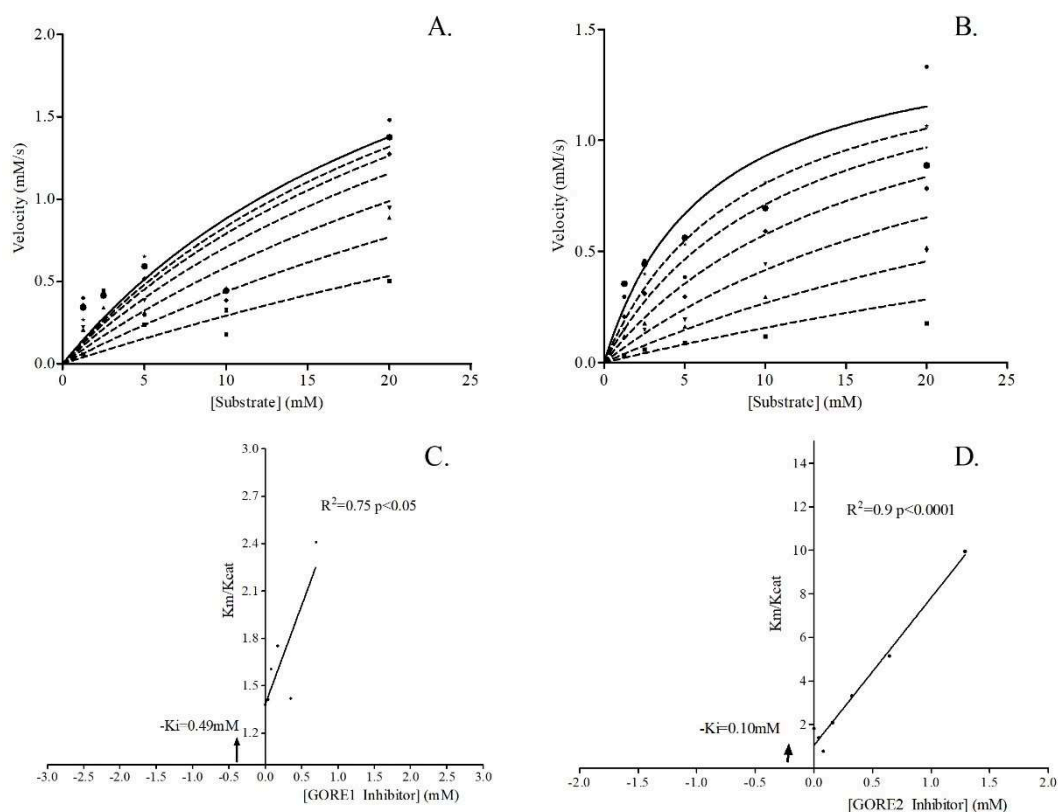


Figura 6. Método SNLR (Regressão Não Linear Simultânea) para análise da atividade inibitória competitiva dos peptídeos GORE1 (A e C) e GORE2 (B e D), sobre as proteases tripsina-like de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). A figura foi realizada usando o software Graphpad Prism.

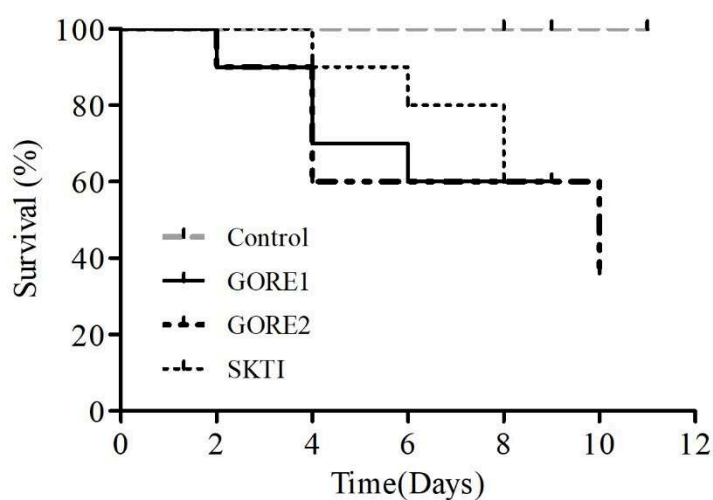


Figure 7. Gráficos de sobrevivência de larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) criadas em dieta contendo peptídeo GORE1, peptídeo GORE2, inibidores SKTI (controle positivo) na concentração de 0,12%. A dieta sem inibidores foi utilizada como controle negativo.

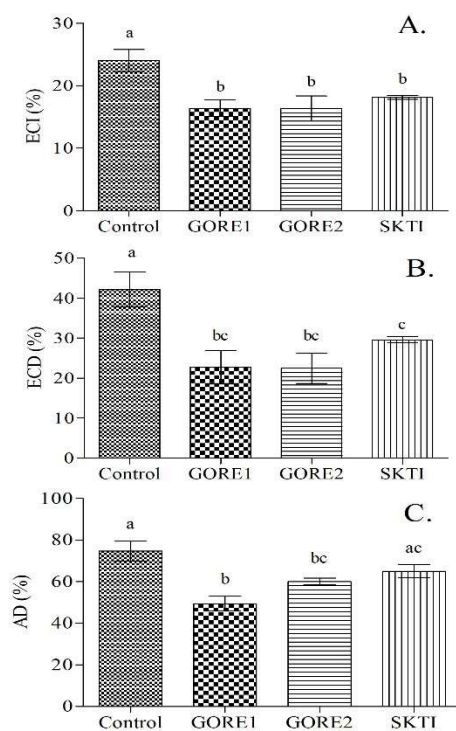


Figure 8. Índices nutricionais de larvas de *Anticarsia gemmatalis* expostas a dieta contendo 0,12% dos peptídeos GORE1 e GORE2, inibidor de SKTI (controle positivo) e dieta controle (sem inibidor). (A) Eficiência de conversão de alimentos ingeridos (ECI); (B) Eficiência de conversão de alimentos digeridos (ECD); e (C) Digestibilidade Aproximada (AD).

CAPÍTULO I – ARTIGO II

Constante inibitória por dinâmica molecular e estabilidade de tripeptídeos inibidores de tripsinas-*like* da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*.

RESUMO

Os insetos superam a ação dos IPs naturais devido a adaptações evolutivas por meio de proteólise endógena e reprogramação de proteases. As adaptações de insetos dificultam a formulação de produtos fitossanitários baseados em IP. No entanto, pequenos peptídeos desenhados com base no sítio ativo de enzimas têm mostrado resultados promissores que podem mudar esse cenário. GORE1 e GORE2 são tripeptídeos projetados que reduzem a sobrevivência de *Anticarsia gemmatalis* quando ingeridos por via oral. Neste artigo, a estabilidade e capacidade dos peptídeos de se ligar a tripsinas-*like* de *A. gemmatalis* foram avaliadas por simulações de dinâmica molecular (MD). A capacidade dos peptídeos de inibir enzimas tripsina-*like* in vivo foi comparada com a da proteína SKTI, expondo larvas de *A. gemmatalis* a diferentes concentrações dos PIs e verificando a persistência da exposição pelo tempo. Durante a simulação MD dos complexos enzima-ligante, ambos os peptídeos apresentaram uma pequena variação de RMSD e RMSF, sugerindo que essas moléculas atingem o equilíbrio ao formar um complexo com a enzima tripsina-*like*. Além disso, ambos os peptídeos formaram ligações de hidrogênio com resíduos do sítio ativo de tripsinas-*like* de *A. gemmatalis*, sendo que GORE2 foi a molécula que mais fez interações. Larvas de *A. gemmatalis* expostas aos peptídeos e SKTI apresentaram redução semelhante na atividade proteolítica, mas a persistência da inibição de tripsinas-*like* foi maior nos insetos alimentados com peptídeos. Apesar de seu tamanho, os peptídeos exibem importantes interações com o sítio ativo de tripsinas-*like*, estabilidade durante a formação do complexo e efeitos de estabilidade in vivo. Os resultados deste trabalho fornecem informações fundamentais para o desenvolvimento de moléculas miméticas e auxiliam na tomada de decisão para a seleção de métodos de *delivery* para experimentos de maior escala com moléculas semelhantes.

Palavras-chave: Persistência da inibição. Larvas. NAMD. Controle de pragas. Proteases totais.

ABSTRACT

Inhibition constant and stability of tripeptide inhibitors of gut trypsin-like enzyme of the soybean pest *Anticarsia gemmatalis*

Insects overcome the action of natural protease inhibitors (PIs) due to evolutionary adaptations through endogenous proteolysis and reprogramming proteases. Insect adaptations complicate the formulation of IP-based crop protection products. However, small peptides designed based on the active site of enzymes have shown promising results that could change this scenario. GORE1 and GORE2 are designed tripeptides that reduce the survival of *Anticarsia gemmatalis* when ingested orally. In this article, the stability and ability of the peptides to bind trypsin-like enzymes of *A. gemmatalis* were evaluated by molecular dynamics (MD) simulations. The ability of the peptides to inhibit trypsin-like enzymes in vivo was compared with the SKTI protein by feeding *A. gemmatalis* larvae at different concentrations, followed by an inhibition persistence assay. During the MD simulation of enzyme–ligand complexes, both peptides showed a small variation of root-mean-square deviation and root-mean-square fluctuation, suggesting that these molecules reach equilibrium when forming a complex with the trypsin-like enzyme. Furthermore, both peptides form hydrogen bonds with substrate recognition sites of *A. gemmatalis* trypsin-like enzyme, with GORE2 having more interactions than GORE1. Larvae of *A. gemmatalis* exposed to the peptides and SKTI showed a similar reduction in proteolytic activity, but the persistence of inhibition of trypsin-like enzyme was longer in peptide-fed insects. Despite their size, the peptides exhibit important active and substrate binding site interactions, stability during complex formation, and steadiness effects in vivo. The results provide fundamental information for the development of mimetic molecules and help in decision-making for the selection of delivery methods for larger-scale experiments regarding similar molecules.

Keyword: Persistence of inhibition. Larvae. NAMD. Pest control. Total proteases.

1. INTRODUÇÃO

Insetos-praga contribuem para a perda de grãos alimentares armazenados (BERGVINSON; GARCÍA-LARA, 2004), destroem a produção agrícola anual do mundo (OERKE, 2006), danificam estruturas humanas ao custo de milhões de dólares (ELZEN; HARDEE, 2003), e transmite uma série de patógenos humanos e veterinários (Gratz, 1999). Desde a introdução do DDT na década de 1940, a agricultura tem feito uso de inseticidas químicos (CASIDA; QUISTAD, 1998). No entanto, o desenvolvimento de resistência a insetos e impactos ambientais e na saúde humana têm estimulado a busca por novos compostos inseticidas, novos alvos moleculares e métodos alternativos de controle (NAUEN; STEINBACH, 2016; REISIG; KURTZ, 2018). Assim, este estudo propõe a utilização de peptídeos inibidores de protease para inibir proteases de insetos lepidópteros.

Os inibidores de protease (IPs) são moléculas naturais proteicas com atividade inseticida que apresentam expressão gênica aumentada pelas plantas de acordo com o nível de herbivoria. Essas moléculas se ligam ao sítio ativo das proteases prevenindo a proteólise no intestino médio dos insetos (SINGH et al., 2020). A exposição de insetos a essas moléculas pode causar efeitos antialimentares, atraso no ciclo larval, diminuição da oviposição, malformação de adultos e morte (ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015). O prejuízo negativo no *fitness* dos insetos ocorre principalmente devido à redução na disponibilidade de aminoácidos livres. Além disso, os IPs podem afetar o desenvolvimento dos insetos por meio de um mecanismo de *feedback* que leva a um aumento na produção de proteases que deslocam aminoácidos de rotas metabólicas de desenvolvimento (DE OLIVEIRA et al., 2013).

Muitos estudos têm demonstrado os efeitos anti-insetos dos IPs contra insetos lepidópteros, incluindo a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), uma importante praga da soja na região neotropical (CRUZ et al., 2013; MENDONÇA et al., 2020; MERIÑO-CABRERA et al., 2019a; PANDEY; YADAV; SANYAL, 2021). No entanto, a aplicação de IPs em campos agrícolas é infrutífera devido à baixa estabilidade das moléculas e aos mecanismos adaptativos dos insetos desenvolvidos ao longo da evolução com as plantas.

Os principais mecanismos adaptativos exibidos por insetos lepidópteros após exposição à IPs incluem superprodução de proteases alvo e insensíveis e inativação por clivagem proteolítica (KUWAR et al., 2015; SINGH et al., 2020). A maioria dos IPs

que são objeto de estudos contra insetos Lepidoptera são moléculas grandes e pouco estáveis que fornecem sítios de clivagem para proteases não-alvo, o que pode levar à sua inativação (SINGH et al., 2020; YANG et al., 2009).

Assim, dados os mecanismos adaptativos acima mencionados, exibidos por insetos lepidópteros quando expostos a proteínas do tipo PIs, moléculas menores e específicas têm sido propostas como inibidoras de suas principais proteases no intestino (MERIÑO-CABRERA et al., 2020; SAIKHEDKAR et al., 2018, 2019; SPIT et al., 2012). Neste trabalho, caracterizamos a estabilidade *in silico* por dinâmica molecular e *in vitro* dos tripeptídeos previamente propostos GORE1 e GORE2 (ALMEIDA BARROS et al., 2021; PATARROYO-VARGAS et al., 2018). Além disso, os efeitos *in vivo* sobre as enzimas tripsina-like de *A. gemmatalis* foram avaliados. Informações mais refinadas sobre os grupos funcionais dos peptídeos através da dinâmica molecular foram geradas, o que pode ajudar a definir peptídeos miméticos com estabilidade e afinidade ainda maiores para enzimas tripsina-like em trabalhos futuros.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Análises *in silico*

2.1.1. ID Tripsinas-like, desenho dos peptídeos e formação dos complexos enzima-peptídeo

Para obter dados de dinâmica molecular, docking molecular entre tripsinas-like e os peptídeos ligantes foi realizado (ALMEIDA BARROS et al., 2021) e os melhores complexos foram escolhidos para o ensaio dinâmico. O ensaio de dinâmica molecular foi feito entre os ligantes GORE1 e GORE2 e a tripsina-1-like (XM_004931762.2), identificada por LC-MS/MS em zimograma carregado com extrato do intestino médio de *A. gemmatalis* (SILVA JÚNIOR et al., 2020). A estrutura 3D da proteína tripsina-1-like foi modelada usando o servidor *Phyre2* (KELLEY et al., 2015), e o modelo usado para modelagem foi C6esoA, confiança 100,0 e % i.d. de 34 (Arquivo .pdf suplementar). GORE1 e GORE2 foram projetados usando o software Discovery Studio (BIOVIA, 2017) e átomos de hidrogênio foram adicionados usando o software *Pymol*.

2.1.2. Simulações de dinâmica molecular de peptídeos em solução

As simulações foram realizadas usando o campo de força CHARMM36 do pacote computacional NAMD 2.12 (HUANG et al., 2017). O modelo teórico validado para GORE1 e GORE2 foi utilizado como estrutura inicial nas simulações e posteriormente imerso em moléculas de água em uma caixa cúbica. Para manter a neutralidade da carga total do sistema, moléculas de cloreto de sódio e cálcio foram usadas como fonte de íons. A inserção de íons foi realizada usando a ferramenta Autoionize do VMD. Após 1000 etapas de minimização, o sistema foi simulado a 310 K e pressão de 1 atm no conjunto de pressão constante (NPT). Para as interações não ligadas, o corte foi ajustado para 12 Å e para o longo alcance, o sistema foi modelado usando o método Particle Mesh Ewald (PME). Os sistemas com energia minimizada, temperatura e pressão equilibradas foram submetidos à simulação de dinâmica molecular (MD) ao longo de 15 ns.

2.1.3. Energia livre de ligação entre a enzima tripsina-like de *A. gemmatalis* e peptídeos

Para cada complexo (tripsina-GORE1 e tripsina-GORE2), foi realizada uma simulação MD com solvente explícito. As estruturas iniciais foram retiradas dos resultados de *docking* com o software online Swissdock (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011) e da minimização do complexo com YASARA (LAND; HUMBLE, 2018). Os sistemas com energia mínima, temperatura e pressão equilibradas, foram submetidos a uma simulação de dinâmica molecular (MD) ao longo de 15 ns.

O cálculo da energia livre de ligação foi realizado pelo método da energia de interação linear (HANSSON; MARELIUS; ÅQVIST, 1998). Os valores das energias livres absolutas de ligação e hidratação a partir de simulações de dinâmica molecular do estado inicial (solução peptídica) e do estado final (complexo enzimático-peptídeo em solução) foram fornecidos pelo método com pouco esforço computacional. Dentro desta aproximação, a energia livre de ligação ligante-proteína foi dada da seguinte forma:

$$\Delta G_{Bind} = \beta(\langle V_{l-s}^{el} \rangle_{bound} - \langle V_{l-s}^{el} \rangle_{free}) + \alpha(\langle V_{l-s}^{vdw} \rangle_{bound} - \langle V_{l-s}^{vdw} \rangle_{free}) + \gamma \quad (1),$$

onde $\langle V_{l-s}^{el} \rangle_Y$ e são os valores médios das interações eletrostáticas e de van der Waals entre o ligante (l) e seus arredores (s) no estado do ligante Y, que pode estar livre em solução ou ligado à proteína. Os parâmetros α e β são, respectivamente, dispersão e fatores de escala de energia eletrostática ajustável e γ é um termo constante. Eles são dependentes da natureza química da dispersão e dos fatores de escala de energia eletrostática ajustável do ligante.

2.1.4. Cálculo do potencial de dissociação estimado K_d

O processo de reconhecimento celular entre enzima e ligante é dirigido pela combinação de efeitos entrópicos e entálpicos. Estes efeitos podem ser estimados pela energia livre de Gibbs ΔG_{Bind} das interações enzima-ligante, que está diretamente relacionada com o potencial de dissociação K_d pela seguinte equação (2):

$$\Delta G_{Bind} = RT \ln K_d \quad (2)$$

2.2. Estabilidade em água à temperatura ambiente dos inibidores peptídicos: análises in vitro

O efeito inibitório dos peptídeos (GORE1 e GORE2) foi estudado por 12 dias em temperatura ambiente (25-30 °C). Todas as análises experimentais foram comparadas com o inibidor de tripsina SKTI (*Soybean Kunitz trypsin inhibitor*), por se tratar de uma proteína estável que em condições fisiológicas se liga ao sítio ativo de tripsinas-*like* de pragas da soja como *A. gemmatalis* e foi caracterizada por ser um inibidor competitivo (Koide et al., 1973; Patarroyo-Vargas et al., 2020). Foram preparadas três soluções aquosas (6,5 mg/mL) de inibidores. Em dias alternados, uma alíquota de 20 µL das amostras foi misturada com 100 µl de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 e 20 mM de CaCl₂ e 40 µL de substrato L-BApNA (1,2 mM). Além disso, 30 µl de extrato bruto de intestino médio de *A. gemmatalis* (contendo cerca de 30 µg de proteína total), preparado por esmagamento de cinco intestinos médios com nitrogênio líquido e solução de HCl (10⁻³ M), foi adicionado. A mistura do extrato do intestino médio, solução tampão, substrato e inibidores foi incubada por 2 min para medir a atividade da enzima tripsina-*like* a 410 nm usando SpectraMax ABS Plus (ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961b). Os dados foram submetidos a uma análise *two-way* ANOVA e teste t de Student para avaliar dois fatores: a inibição da enzima tripsina-*like* por diferentes inibidores e a estabilidade do efeito inibitório ao longo dos dias.

2.3. Inibição endógena de tripsinas-*like*

GORE1, GORE2 e SKTI foram misturados em quatro concentrações diferentes (0,015, 0,030, 0,060 e 0,12% p/p) em uma dieta artificial (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976). As lagartas foram alimentadas *ad libitum* por um período de 12 horas. Além disso, foi preparada uma dieta controle sem inibidores. Quatro larvas de 4^a e 5^a instares de *A. gemmatalis* foram colocadas em um pote de plástico, com cada pool (*e.g.*, contendo quatro intestinos médios) representando uma réplica. Um total de 24 intestinos médios foram coletados para cada tratamento, totalizando 6 repetições. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente

casualizado (CRD). Para a atividade de enzimas do tipo tripsina, 20 µL do extrato foi adicionado a 100 µL de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 solução tampão contendo 20 mM CaCl₂ e 40 µL do substrato L-BApNA a 1,2 mM em Tris-HCl 50 mM, tampão pH 8,0. A absorbância foi medida a 410 nm por 2 min. Os dados obtidos sobre a atividade de tripsina-*like* foram submetidos à análise de regressão utilizando o pacote 'ExpDes.pt' no software R.

2.4. Persistência da inibição de tripsinas-*like* e proteases totais por peptídeos e SKTI

Para determinar quanto tempo dura a inibição endógena de enzimas tripsina-*like* e proteases totais no intestino médio de *A gemmatalis* por GORE1 (G1), GORE2 (G2) e SKTI (SK), larvas de quarto/quinto instar foram divididas em três grupos e expostas aos inibidores por 12, 24 e 48 horas. Os insetos do grupo de 12 horas foram divididos em quatro tratamentos e alimentados com dieta controle (C-12H) e dietas contendo inibidores (G1/12H, G2/12H, SK/12H). Para os insetos dos grupos de 24 e 48 horas, além dos controles (C-24H e C-48H) e exposição ininterrupta (G1/24H, G2/24H, SK24 e G2/48H, G1/48H, S / 48H), foram estabelecidos seis tratamentos adicionais em que as dietas contendo os inibidores foram substituídas por dietas controle após 12 horas de exposição: G1/C-12/12H, G2/C-12/12H, SK/C-12/12H e G1/C-12/36H, G2/C-12/36H, SK/C-12/36H. O intestino médio foi dissecado, congelado com nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C para análise enzimática. Cada tratamento compreende quatro réplicas biológicas, cada uma consistindo em dois intestinos dissecados. A atividade de tripsina-*like* foi medida como descrito acima. A atividade proteolítica total foi determinada usando azocaseína a uma concentração final de 0,5% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, CaCl₂ 20 mM a 37°C. A mistura de reação consistiu em 80 µL do substrato e 60 µL do extrato enzimático. Após 30 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 240 µL 10% (p/v) de ácido tricloroacético. As amostras foram então homogeneizadas em vórtex, mantidas em gelo por 15 min e centrifugadas a 8.000 g por 5 min a 25°C para remoção do precipitado. Uma alíquota de 240 µL do sobrenadante foi transferida para microtubos contendo 280 µL 1 M NaOH. A absorvância foi medida a 440 nm. Para atividades tripsina-*like* e proteases totais, três repetições técnicas foram realizadas durante a

análise enzimática. Os efeitos de cada tratamento foram comparados com os grupos controle usando o teste de Dunnet ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Dinâmica molecular de peptídeos em solução e cálculo do potencial de dissociação

A estabilidade global dos peptídeos foi avaliada calculando o RMSD. Em todas as simulações, os RMSDs convergiram durante os 15 ns em uma faixa de 0,02-2,2 Å para ambos os peptídeos (Fig. 1A). Devido à semelhança das AUCs (área sob a curva) (AUC-GORE2 = 20,59 e AUC-GORE1 = 20,97), não houve diferenças entre os RMSDs de peptídeos totais calculados na caixa de água (Fig. 1A).

Ao avaliar a estabilidade dos peptídeos complexados com a enzima tripsina-*like* de *A. gemmatalis*, os valores de RMSD permaneceram na mesma faixa de 0,02-2,2 Å, mas um maior número de valores próximos a 1 Å e menores que 1 Å foram registrados ao longo da simulação, resultando em uma diminuição nas AUCs (Fig. 1B).

Para identificar o comportamento dinâmico da enzima tipo tripsina, os valores de RMSD e RMSF foram calculados separadamente para a proteína individual que interage com os peptídeos (Fig. 1C e 1D). Quando o peptídeo GORE1 foi ligado ao receptor, a proteína foi tão flexível quanto quando ligada a GORE2, como mostrado pela semelhança da AUC do RMSD (Fig. 1C). O RMSF da tripsina complexada com GORE1 mostra que os maiores movimentos estão concentrados no início da cadeia protéica, entre os resíduos 1 e 30. Para GORE2, os maiores movimentos estão concentrados entre os resíduos 110 e 120. Vale ressaltar que os principais sítios da tripsina avaliada incluem os resíduos Y70, D115, S211 (sítio ativo) e S205, S226, H228 (sítio de ligação do substrato) (Fig. 1D).

Além disso, a energia permaneceu estável durante toda a fase de produção (Fig. 1E). Esses resultados mostram que o protocolo de simulação de dinâmica molecular utilizado foi bom e encontrou a conformação com o mínimo de energia global nas corridas de produção dos complexos estudados (Fig. 1E).

3.2. Perfil de ligação de peptídeos à enzima tripsina-*like* durante a simulação de 7,5 e 15ns

A dinâmica molecular permitiu a determinação das melhores poses de cada complexo em 7,5 e 15 ns e o cálculo da energia livre de ligação (Fig. 2 e Tabela 1). A

partir dos valores de energia livre de ligação, foi estimada uma constante inibitória teórica (K_i), que é 0,96 mM para GORE2 e 1,11 mM para GORE1. Ambos os peptídeos se ligam aos sítios de ligação do substrato compreendendo os resíduos próximos ao intervalo entre S205 e H228. O peptídeo GORE2 interage adicionalmente com S211 da tríade catalítica e com D238 no subsítio S1. GORE1 interage com R54 em um local secundário por meio de uma ligação C-H fraca. O modo de interação predominante entre ligante e receptor foi a ligação de hidrogênio, com maior número de interações no complexo GORE2-tripsina.

3.3. Estabilidade em água à temperatura ambiente de peptídeos e SKTI

Para avaliar a estabilidade e capacidade inibitória dos peptídeos e SKTI quando mantidos em temperatura ambiente misturados com água, a inibição da atividade da enzima tripsina-*like* de *A. gemmatalis* foi avaliada *in vitro* por 11 dias (Fig. 3). A atividade da enzima tripsina-*like* no extrato do intestino médio de *A. gemmatalis* misturado com peptídeos e SKTI foi menor que a do controle durante todo o período experimental, sendo o efeito inibitório de GORE2 e SKTI mais pronunciado que o de GORE1. A capacidade dos peptídeos e SKTI de inibir tripsinas-*like* permaneceu praticamente inalterada ao longo dos dias, exceto no dia 11, quando a inibição por GORE2 no extrato do intestino médio mostrou um efeito mais forte.

3.4. Inibição endógena de enzimas tripsina-*like* por peptídeos e SKTI no intestino médio de *A. gemmatalis*.

O efeito dos inibidores nas enzimas tripsina-*like* foi dose-dependente, pois as atividades variaram com o aumento da concentração das moléculas (Fig. 4). Para GORE1, a atividade inibitória *in vivo* seguiu uma curva de regressão de primeiro grau, enquanto SKTI e GORE2 seguiram curvas de regressão de segundo e terceiro grau, respectivamente. Além disso, GORE2 apresentou a maior atividade inibitória (60% de inibição), em comparação com 40% de inibição de SKTI e GORE1 na maior concentração avaliada, *i.e.*, 0,12% (p/v), que foi posteriormente utilizada no ensaio de persistência de inibição.

3.5. Persistência da enzima tripsina-*like* e inibição de proteases totais por peptídeos e SKTI no intestino médio de *A. gemmatalis*

O perfil de atividade de enzimas tripsina-*like* permaneceu quase inalterado ao longo do tempo para GORE1 e GORE2, com as larvas expostas aos peptídeos apresentando atividades inibidas mesmo em tratamentos em que foram alimentadas com dieta controle por um tempo (Fig. 5A e 5C). Curiosamente, a atividade da enzima tripsina-*like* retornou aos níveis normais (*i.e.*, semelhante à atividade de controle) em larvas tratadas com dieta SKTI por 12 horas e depois substituídas pela dieta de controle e alimentadas por mais 36 horas (Fig. 5E). Além disso, o padrão de atividade proteolítica total ao longo do tempo e sob as diferentes condições de exposição às moléculas refletiu a atividade da enzima tripsina-*like*, como esperado. A exceção foi a exposição contínua de 48 horas de larvas a GORE2, onde a atividade proteolítica geral se assemelhava à do controle (Fig. 5B, 5D e 5F).

4. DISCUSSÃO

Uma variedade de peptídeos e proteínas têm sido usados para produzir biopesticidas contra microorganismos e pragas de insetos. A função desses peptídeos é influenciada por características estruturais, como peso molecular, hidrofobicidade, carga e sequência peptídica (WANG; XIE; LI, 2019). As características estruturais dos peptídeos afetam suas propriedades funcionais e são um fator importante para a estabilidade. Aqui, a estabilidade estrutural por dinâmica molecular e a persistência da inibição de enzimas tripsina-*like* no intestino de *A. gemmatalis* foram caracterizadas quando expostas aos peptídeos GORE1 e GORE2. Além disso, as interações de ligação foram avaliadas por simulações dinâmicas para melhor avaliar os grupos funcionais presentes nos peptídeos que são importantes para a inibição de enzimas tipo tripsina, fornecendo informações de base refinadas para o desenvolvimento de moléculas miméticas.

A dinâmica molecular (MD) é uma técnica que permite simulações de átomos inteiros de biomoléculas. As simulações de MD levam em consideração a flexibilidade não apenas dos ligantes, mas também dos receptores, neste caso, enzimas tripsina-*like* identificadas em *A. gemmatalis* (JANIN et al., 2003; KAHLER et al., 2018; WAN et al., 2015). Para ambos os peptídeos, GORE1 e GORE2, o menor RMSD das conformações não ligadas obtidas das simulações moleculares variou de 0,02 a 2,2 Å ao longo do período de simulação, o que representa previsões de boa qualidade de acordo com os critérios de Avaliação Crítica da Predição de Interações (CAPRI) e apresenta alta estabilidade em água (CIEMNY et al., 2018). Em comparação com resultados anteriores (Barros et al., 2021), esses resultados de MD confirmam que a ligação do peptídeo à enzima tripsina-*like* de *A. gemmatalis* é estável. Em contraste com o encaixe molecular, as simulações de MD foram capazes de explicar a flexibilidade de peptídeos e refinar as posições de encaixe (MIRZAEI et al., 2020) de peptídeos em enzimas tripsina-*like* de *A. gemmatalis*.

O RMSF é uma medida numérica de quanto um determinado resíduo se move durante o período de simulação e indica a posição dos resíduos que mais contribuem para o movimento molecular. Nossos resultados mostraram que após a ligação aos peptídeos GORE1 e GORE2, o maior movimento molecular foi encontrado em resíduos que não fazem parte do sítio ativo ou região de ligação do substrato da enzima tripsina-*like*. Desde que GORE1 e GORE2 estejam ligados principalmente na

região de ligação ao substrato e S211 do sítio ativo, os resultados de RMSF indicam que essas moléculas estão estabilizadas nessas regiões, enquanto o movimento ocorre principalmente em outras partes da enzima. O movimento do sítio ativo e das regiões de ligação ao substrato é importante para a atividade enzimática, como nas enzimas tripsina-*like* de *A. gemmatalis*, e isso foi confirmado em outros trabalhos, para outras enzimas. Por exemplo, mutações nas alças que cercam o sítio ativo de uma enzima, que limitam significativamente sua mobilidade, levam a uma redução acentuada na atividade da enzima (MERSKI et al., 2017).

Os perfis de ligação de GORE1 e GORE2 à enzima tripsina-*like* de *A. gemmatalis* mostram que o complexo é formado em resíduos chave da protease. No entanto, a dinâmica molecular previu um número maior de interações de ligação para GORE2 do que para GORE1. Ambos os peptídeos se ligam na região S1 da enzima tripsina-*like*, com GORE1 gerando 80% menos interações do que GORE2. Com base nesses dados, foi razoável supor que ambos os peptídeos se ligam à enzima tripsina-*like* por mecanismos diferentes e que GORE2 tem uma afinidade maior. De fato, a constante de inibição (K_i) calculada pelo potencial de dissociação previsto (K_D) mostrou uma maior afinidade de GORE2, o que é consistente com os resultados anteriores de cinética de inibição com substrato L-BApNA (ALMEIDA BARROS et al., 2021). A dupla carga do grupo guanidínio da arginina presente em GORE2 pode ser a principal razão pela qual essa molécula tem maior afinidade por enzimas tripsina-*like* do que GORE1, que possui apenas uma única carga negativa devido à lisina (LOPES et al., 2006). A bolsa S1 de enzimas tripsina-*like* contém um ácido aspártico, que é responsável pela afinidade dessa bolsa com cargas positivas (DOSA et al., 2012). A estabilidade da capacidade inibitória peptídica foi avaliada *in vitro* e ambos os peptídeos apresentaram estabilidade ao longo do tempo, assim como o SKTI. No entanto, o peptídeo GORE2 contendo arginina na posição P1 apresentou maior atividade inibitória sobre tripsinas-*like* do que GORE1. Embora ambas as moléculas sejam tripeptídeos, as diferenças encontradas entre GORE1 e GORE2 podem ser devido a diferentes características dos peptídeos, incluindo hidrofobicidade, propriedade ácido/base e tipo de aminoácidos C- ou N-terminais (WANG; XIE; LI, 2019). Tanto GORE1 quanto GORE2 possuem um resíduo de aminoácido C-terminal carregado positivamente, mas o resíduo encontrado em GORE2 apresenta um ponto isoelétrico mais alto e um índice de hidropatia mais negativo, ou seja, o aminoácido é mais solúvel em água.

Em geral, as interações peptídeo (GORE2) - proteína exibem uma maior densidade de ligações de hidrogênio (em comparação com GORE1) e empacotamento altamente complementar devido ao elevado número de interações, resultando em alta afinidade de ligação. Além disso, a ligação ocorre apenas quando associada a uma energia livre de ligação de Gibbs negativa (ΔG), que é mais negativa quanto maior o número de interações ligante-proteína que ocorrem (KASPAR; REICHERT, 2013). Nossos resultados mostram que ambos os peptídeos se ligam a enzimas tripsina-*like*, devido aos valores negativos de energia livre de ligação na MD.

Embora existam diferenças na capacidade inibitória *in vitro* entre os dois peptídeos e SKTI, a inibição de enzimas tripsina-*like* alcançada foi semelhante quando larvas de *A. gemmatalis* foram alimentadas com a dieta contendo os inibidores, exceto na concentração mais alta testada (*i.e*, 0,12%), onde GORE2 inibiu mais do que SKTI e GORE1. Assim, os resultados sugerem que essas moléculas relativamente pequenas contribuem significativamente para a inibição da enzima tripsina-*like* de *A. gemmatalis*, com potencial semelhante a interações proteína-proteína. As alças centrais reativas de inibidores de protease do tipo batata II (Pin-II PIs) isoladas em tripeptídeos de sua estrutura nativa mantiveram sua capacidade inibitória independente da estrutura tridimensional do PI (SAIKHEDKAR et al., 2018), demonstrando também o potencial dos peptídeos na inibição de enzimas semelhante à de proteínas.

As larvas de *A. gemmatalis* alimentadas com os peptídeos por 12 horas retiveram a inibição das enzimas tripsina-*like* mesmo quando a dieta foi substituída por dieta livre de inibidor. Ao contrário dos insetos expostos aos peptídeos, as enzimas tripsinas-*like* e proteases totais retornaram aos níveis normais em insetos que se alimentaram de SKTI por 12 horas e tiveram sua dieta substituída por uma dieta livre de inibidor. Isso pode ser devido ao fato de que a SKTI é uma proteína contendo 181 resíduos de aminoácidos (SONG; SUH, 1998) e, portanto, contém sítios de clivagem para outras enzimas que podem estar presentes no intestino médio de *A. gemmatalis* e causar a inativação das moléculas por proteólise. Por outro lado, os tripeptídeos exibem retenção mais longa e alta estabilidade no intestino do inseto, como mostrado em outros trabalhos (SAIKHEDKAR et al., 2018). O mecanismo de inativação de IPs por clivagem proteolítica está presente em outros insetos, como *Otiorynchus sulcatus* contra a orizacistatina II (MICHAUD; CANTIN; VRAIN, 1995), *Phaedon cochleariae* contra orizacistatina I e inibidor de Bowman-Birk (BBI) (GIRARD et al., 1998),

Helicoverpa armigera contra inibidor de tripsina de grão de bico (GIRI et al., 1998), *Spodoptera exigua* contra inibidor de proteinase de batata II (PI2) (A. JONGSMA; BEEKWILDER, 2011) e *Plutella xylostella* contra MTI-2 (YANG et al., 2009). Como esperado, a atividade proteolítica geral do intestino médio de *A. gemmatalis* refletiu a de enzimas tripsinas-*like*, exceto quando *A. gemmatalis* foi alimentada com dieta contendo GORE2 continuamente por 48 horas. Isso provavelmente se deve a uma troca de diferentes classes de proteases para compensar a perda parcial da atividade proteolítica, o que poderia levar a uma depleção de aminoácidos essenciais (BEZERRA; OLIVEIRA; MACEDO, 2017; CRUZ et al., 2013).

Este estudo permitiu confirmar o potencial inibitório dos peptídeos GORE1 e GORE2 e determinar a estabilidade estrutural por dinâmica molecular e a persistência da inibição de enzimas tripsinas-*like* no intestino de *A. gemmatalis* para analisar os efeitos a curto e médio prazo dos peptídeos. A inibição de enzimas tripsina-*like* de *A. gemmatalis* pode alcançar resultados semelhantes aos da proteína SKTI, sugerindo que essas pequenas moléculas inibem enzimas tripsina-*like* de *A. gemmatalis* com potencial semelhante a inibidores proteicos. Nossas simulações de MD fornecem informações refinadas que podem ajudar no projeto de moléculas miméticas baseadas em peptídeos. Acreditamos que esse tipo de molécula pode ser incorporado na formulação de defensivos agrícolas quando combinado com métodos de *delivery* apropriados e nanotecnologia que permite a liberação lenta e de longo prazo desses produtos nos campos de cultivo.

5. REFERÊNCIAS

- A. GATEHOUSE, John. Prospects for Using Proteinase Inhibitors to Protect Transgenic Plants Against Attack by Herbivorous Insects. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 409–416, 2011. DOI: 10.2174/138920311796391142.
- A. JONGSMA, Maarten; BEEKWILDER, Jules. Co-Evolution of Insect Proteases and Plant Protease Inhibitors. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 437–447, 2011. DOI: 10.2174/138920311796391115.
- AHN, J. E.; SALZMAN, R. A.; BRAUNAGEL, S. C.; KOIWA, H.; ZHU-SALZMAN, K. Functional roles of specific bruchid protease isoforms in adaptation to a soybean protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, v. 13, n. 6, p. 649–657, 2004. DOI: 10.1111/j.0962-1075.2004.00523.x.
- ALMEIDA BARROS, Rafael; MERIÑO-CABRERA, Yaremis; VITAL, Camilo E.; SILVA JÚNIOR, Neilier R.; OLIVEIRA, Cauê N.; LESSA BARBOSA, Samuel; MARQUES GONÇALVES ASSIS, João V; RAMOS, Humberto JO; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Small peptides inhibit gut trypsin-like proteases and impair *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:Noctuidae) survival and development. **Pest Management Science**, v. 77, n. 4, p. 1714–1723, 2021. DOI: 10.1002/ps.6191.
- AMBADAPADI, Sriram et al. Reactive Center Loop (RCL) Peptides Derived from Serpins Display Independent Coagulation and Immune Modulating Activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 6, p. 2874–2887, 2016. DOI: 10.1074/jbc.M115.704841.
- APOSTOLOPOULOS, Vasso et al. A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 430, 2021. DOI: 10.3390/molecules26020430.
- ARTHUR, David Ebuka; UZAIRU, Adamu. Molecular docking studies on the interaction of NCI anticancer analogues with human Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit. **Journal of King Saud University - Science**, v. 31, n. 4, p. 1151–1166, 2019. DOI: 10.1016/j.jksus.2019.01.011.
- ASCENZI, Paolo; BOCEDI, Alessio; BOLOGNESI, Martino; SPALLAROSSA, Andrea; COLETTA, Massimo; CRISTOFARO, Raimondo; MENEGATTI, Enea. The Bovine Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor (Kunitz Inhibitor): A Milestone Protein. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, n. 3, p. 231–251, 2003. DOI: 10.2174/1389203033487180.
- BALE, J. S.; VAN LENTEREN, J. C.; BIGLER, F. Biological control and sustainable food production. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1492, p. 761–776, 2008. DOI: 10.1098/rstb.2007.2182.
- BENNETT-GUERRERO, Elliott; SONG, Howard K.; ZHAO, Yue; FERGUSON, T. B.; GAMMIE, James S.; PETERSON, Eric D.; O'BRIEN, Sean M. Temporal Changes

in the Use of Blood Products for Coronary Artery Bypass Graft Surgery in North America: An Analysis of the Society of Thoracic Surgeons Adult Cardiac Database. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 24, n. 5, p. 814–816, 2010. DOI: 10.1053/j.jvca.2010.06.003.

BERGVINSON, David; GARCÍA-LARA, Silverio. Genetic approaches to reducing losses of stored grain to insects and diseases. **Current Opinion in Plant Biology**, 2004. DOI: 10.1016/j.pbi.2004.05.001.

BERNARDI, Roberta; TEDESCHI, Gabriella; RONCHI, Severino; PALMIERI, Sandro. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like enzyme from larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hu"bner (Lepidoptera: pyralidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 8–9, p. 883–889, 1996. DOI: 10.1016/S0965-1748(96)00057-4.

BEZERRA, César da Silva; OLIVEIRA, Carolina Turatti; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. *Inga vera* trypsin inhibitor interferes in the proteolytic activity and nutritional physiology of *Ephestia kuehniella* larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 2017. DOI: 10.1111/eea.12605.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistics Notes: Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). **BMJ**, v. 317, n. 7172, p. 1572–1580, 1998. DOI: 10.1136/bmj.317.7172.1572.

BOJKOVA, Denisa et al. Aprotinin Inhibits SARS-CoV-2 Replication. **Cells**, v. 9, n. 11, p. 2377, 2020. DOI: 10.3390/cells9112377.

BOLDT, P. E.; BIEVER, K. D.; IGNOFFO, C. M. Lepidopteran Pests of Soybeans: Consumption of Soybean Foliage and Pods and Development Time. **Journal of Economic Entomology**, v. 68, n. 4, p. 480–482, 1975. DOI: 10.1093/jee/68.4.480.

BOND, J. G.; RAMÍREZ-OSORIO, A.; MARINA, C. F.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; LIEDO, P.; DOR, A.; WILLIAMS, T. Efficiency of two larval diets for mass-rearing of the mosquito *Aedes aegypti*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187420, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0187420.

BORJIGIN, J.; NATHANS, J. Bovine pancreatic trypsin inhibitor-trypsin complex as a detection system for recombinant proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 1, p. 337–341, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.1.337.

BRAGA, Anna Rafaela Cavalcante; DE ROSSO, Veridiana Vera; HARAYASHIKI, Cyntia Ayumi Yokota; JIMENEZ, Paula Christine; CASTRO, Ítalo Braga. Global health risks from pesticide use in Brazil. **Nature Food**, v. 1, n. 6, p. 312–314, 2020. DOI: 10.1038/s43016-020-0100-3.

BREUGELMANS, Bert; SIMONET, Gert; VAN HOEF, Vincent; VAN SOEST, Sofie; VANDEN BROECK, Jozef. Pacifastin-related peptides: Structural and functional characteristics of a family of serine peptidase inhibitors. **Peptides**, v. 30, n. 3, p. 622–632, 2009. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.07.026.

- BROADWAY, Roxanne M.; DUFFEY, Sean S.; PEARCE, Gregory; RYAN, Clarence A. Plant Proteinase inhibitors: A defense against herbivorous insects? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 41, n. 1, p. 33–38, 1986. DOI: 10.1111/j.1570-7458.1986.tb02168.x.
- BUENO, A. F.; PANIZZI, A. R.; HUNT, T. E.; DOURADO, P. M.; PITTA, R. M.; GONÇALVES, J. Challenges for Adoption of Integrated Pest Management (IPM): the Soybean Example. **Neotropical Entomology**, v. 50, n. 1, p. 5–20, 2021. DOI: 10.1007/s13744-020-00792-9.
- CARNEIRO, Eliane; SILVA, Luciana Barboza; SILVA, Alexandre Faria Da; LOPES, Gleidyane Novais; PAVAN, Bruno Ettore; RODRIGUES, Raimundo Henrique Ferreira; CARVALHINHO, Diego Tavares; MIELEZRSKI, Diego Fabio. Lepidopteran pests associated with the soybean cultivars phenology. **Bioscience Journal**, p. 112–121, 2018. DOI: 10.14393/BJ-v34n1a2018-37172.
- CASIDA, John E.; QUISTAD, Gary B. Golden age of insecticide research: Past, present, or future? **Annual Review of Entomology**, 1998. DOI: 10.1146/annurev.ento.43.1.1.
- CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; GRANT, W. P.; GREAVES, J.; TATCHELL, G. M. Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability. **Trends in Food Science and Technology**, 2008. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.12.009.
- CHRISTELLER, J. T.; LAING, W. A.; MARKWICK, N. P.; BURGESS, E. P. J. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: Dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, n. 7, p. 735–746, 1992. DOI: 10.1016/0965-1748(92)90052-G.
- CIEMNY, Maciej; KURCINSKI, Mateusz; KAMEL, Karol; KOLINSKI, Andrzej; ALAM, Nawsad; SCHUELER-FURMAN, Ora; KMIECIK, Sebastian. Protein–peptide docking: opportunities and challenges. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 8, p. 1530–1537, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.05.006>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644617305937>.
- COMEAU, S. R.; GATCHELL, D. W.; VAJDA, S.; CAMACHO, C. J. ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server, p. W96–W99, 2004. DOI: 10.1093/nar/gkh354.
- COPELAND, Robert A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. [s.l.] : Wiley, 2013. DOI: 10.1002/9781118540398.
- CRUZ, Ana C. B. et al. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from Catanduva (*Piptadenia moniliformis*) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 61–68, 2013. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.04.023.
- DANTZGER, Miriam; VASCONCELOS, Ilka Maria; SCORSATO, Valéria; APARICIO, Ricardo; MARANGONI, Sergio; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. Bowman–Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical

properties and insecticidal potential. **Phytochemistry**, v. 118, p. 224–235, 2015. DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.08.013.

DASTRANJ, M.; BORZOU, E.; BANDANI, A. R.; FRANCO, O. L. Inhibitory effects of an extract from non-host plants on physiological characteristics of two major cabbage pests. **Bulletin of Entomological Research**, v. 108, n. 3, p. 370–379, 2018. DOI: 10.1017/S0007485317000864.

DAVIS, Rick; WHITTINGTON, Ruth. Aprotinin. **Drugs**, v. 49, n. 6, p. 954–983, 1995. DOI: 10.2165/00003495-199549060-00008.

DE OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho; DE PAULA SOUZA, Thaís; PARRA, José Roberto Postalí; MARANGONI, Sergio; DE CASTRO SILVA-FILHO, Marcio; MACEDO, Maria Ligia Rodrigues. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, 2013. DOI: 10.1016/j.cbpb.2013.02.008.

DÍAZ, Katy; ESPINOZA, Luis; CARVAJAL, Rodrigo; CONDE-GONZÁLEZ, Marcos; NIEBLA, Vladimir; OLEA, Andrés F.; COLL, Yamilet. Biological Activities and Molecular Docking of Brassinosteroids 24-Norcholane Type Analogs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1832, 2020. DOI: 10.3390/ijms21051832.

DO AMARAL, Milena; FREITAS, Ana Camila Oliveira; SANTOS, Ariana Silva; DOS SANTOS, Everton Cruz; FERREIRA, Monaliza Macêdo; DA SILVA GESTEIRA, Abelmon; GRAMACHO, Karina Peres; MARINHO-PRADO, Jeanne Scardini; PIROVANI, Carlos Priminho. TcTI, a Kunitz-type trypsin inhibitor from cocoa associated with defense against pathogens. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 698, 2022. DOI: 10.1038/s41598-021-04700-y.

DOSA, Stefan; STIRNBERG, Marit; LÜLSBORFF, Verena; HÄUSSLER, Daniela; MAURER, Eva; GÜTSCHOW, Michael. Active site mapping of trypsin, thrombin and matriptase-2 by sulfamoyl benzamidines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 21, p. 6489–6505, 2012. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.08.042.

DUNSE, K. M.; KAAS, Q.; GUARINO, R. F.; BARTON, P. A.; CRAIK, D. J.; ANDERSON, M. A. Molecular basis for the resistance of an insect chymotrypsin to a potato type II proteinase inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 34, p. 15016–15021, 2010. DOI: 10.1073/pnas.1009327107.

ELLERT-MIKLASZEWSKA, Aleksandra; POLESZAK, Katarzyna; KAMINSKA, Bożena. Short peptides interfering with signaling pathways as new therapeutic tools for cancer treatment. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 199–221, 2017. DOI: 10.4155/fmc-2016-0189.

ELZEN, Gary W.; HARDEE, Dick D. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on managing insect resistance to insecticides. **Pest Management Science**, 2003. DOI: 10.1002/ps.659.

- ERLANGER, Bernard F.; KOKOWSKY, Nicholas; COHEN, William. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1961. a. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X.
- ERLANGER, Bernard F.; KOKOWSKY, Nicholas; COHEN, William. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, n. 2, p. 271–278, 1961. b. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X.
- FATHIPOUR, Yaghoub; SEDARATIAN, Amin; BAGHERI, Abdoolnabi; TALAEI-HASSANLOUEI, Reza. Increased food utilization indices and decreased proteolytic activity in *Helicoverpa armigera* larvae fed sublethal *Bacillus thuringiensis* -treated diet. **Physiological Entomology**, v. 44, n. 3–4, p. 178–186, 2019. DOI: 10.1111/phen.12288.
- FAUSTINO, Verônica Aparecida et al. Soybean plants under simultaneous signals of drought and *Anticarsia gemmatalis* herbivory trigger gene expression and metabolic pathways reducing larval survival. **Environmental and Experimental Botany**, v. 190, p. 104594, 2021. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2021.104594.
- FIANDRA, L.; CASARTELLI, M.; CERMENATI, G.; BURLINI, N.; GIORDANA, B. The intestinal barrier in lepidopteran larvae: Permeability of the peritrophic membrane and of the midgut epithelium to two biologically active peptides. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 1, p. 10–18, 2009. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2008.09.005.
- FINN, Robert D. et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkv1344.
- GASTEIGER, E. ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3784–3788, 2003. DOI: 10.1093/nar/gkg563.
- GEPPERT, Tim; HOY, Benjamin; WESSLER, Silja; SCHNEIDER, Gisbert. Context-Based Identification of Protein-Protein Interfaces and “Hot-Spot” Residues. **Chemistry & Biology**, v. 18, n. 3, p. 344–353, 2011. DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.01.005.
- GIRARD, Cécile; LE MÉTAYER, Martine; BONADÉ-BOTTINO, Michel; PHAM-DELÈGUE, Minh-Hà; JOUANIN, Lise. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 229–237, 1998. DOI: 10.1016/S0965-1748(98)00027-7.
- GIRI, Ashok P.; HARSULKAR, Abhay M.; DESHPANDE, Vasanti V.; SAINANI, Mohini N.; GUPTA, Vidya S.; RANJEKAR, Prabhakar K. Chickpea Defensive Proteinase Inhibitors Can Be Inactivated by Podborer Gut Proteinases1. **Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 393–401, 1998. DOI: 10.1104/pp.116.1.393.

- GLENNON, Richard A. et al. Binding of O -Alkyl Derivatives of Serotonin at Human 5-HT1D β Receptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 314–322, 1996. DOI: 10.1021/jm950498t.
- GRANDE, Marcela Laiz Mora; RANDO, Jael Simões Santos. Integrated pest control adopted by soybean and corn farmers in Londrina, Paraná state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, n. 0, 2018. DOI: 10.1590/1808-1657000242015.
- GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium¹²³. **Journal of Economic Entomology**, 1976. DOI: 10.1093/jee/69.4.487.
- GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl, p. W270–W277, 2011. DOI: 10.1093/nar/gkr366.
- GROVER, Sheetanshu; KAUR, Satvir; GUPTA, Anil Kumar; TAGGAR, Gaurav Kumar; KAUR, Jagmeet. Characterization of Trypsin Like Protease from *Helicoverpa armigera* (Hubner) and Its Potential Inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 88, n. 1, p. 49–56, 2018. DOI: 10.1007/s40011-016-0732-0.
- GUO, Peng-Chao; DONG, Zhaoming; ZHAO, Ping; ZHANG, Yan; HE, Huawei; TAN, Xiang; ZHANG, Weiwei; XIA, Qingyou. Structural insights into the unique inhibitory mechanism of the silkworm protease inhibitor serpin18. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11863, 2015. DOI: 10.1038/srep11863.
- HAGGAG, Yusuf A. Peptides as Drug Candidates: Limitations and Recent Development Perspectives. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 8, n. 4, 2018. DOI: 10.26717/BJSTR.2018.08.001694.
- HANSSON, Tomas; MARELIUS, John; ÅQVIST, Johan. Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, 1998. DOI: 10.1023/A:1007930623000.
- HARTL, Markus; GIRI, Ashok P.; KAUR, Harleen; BALDWIN, Ian T. The multiple functions of plant serine protease inhibitors. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 7, p. 1009–1011, 2011. DOI: 10.4161/psb.6.7.15504.
- HEDSTROM, Lizbeth. Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501–4524, 2002. DOI: 10.1021/cr000033x.
- HEGEDUS, Dwayne; BALDWIN, Doug; O'GRADY, Michael; BRAUN, Lorraine; GLEDDIE, Steve; SHARPE, Andrew; LYDIATE, Derek; ERLANDSON, Martin. Midgut proteases from *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: Characterization, cDNA cloning, and expressed sequence tag analysis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 53, n. 1, p. 30–47, 2003. DOI: 10.1002/arch.10084.
- HEMATI, S. A.; NASERI, B.; GANBALANI, G. Nouri; DASTJERDI, H. Rafiee; GOLIZADEH, A. Effect of Different Host Plants on Nutritional Indices of the Pod

- Borer, *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Science**, v. 12, n. 55, p. 1–15, 2012. DOI: 10.1673/031.012.5501.
- HERREBOUT, W. A.; SUHM, M. A. Weak hydrogen bonds – strong effects? **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 31, p. 13858, 2011. DOI: 10.1039/c1cp90110a.
- HOLTOF, Michiel; LENAERTS, Cynthia; CULLEN, Darron; VANDEN BROECK, Jozef. Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut. **Cell and Tissue Research**, v. 377, n. 3, p. 397–414, 2019. DOI: 10.1007/s00441-019-03031-9.
- HORIKOSHI, Renato J. et al. Resistance status of lepidopteran soybean pests following large-scale use of MON 87701 × MON 89788 soybean in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 21323, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-00770-0.
- HUANG, Jing; RAUSCHER, Sarah; NAWROCKI, Grzegorz; RAN, Ting; FEIG, Michael; DE GROOT, Bert L.; GRUBMÜLLER, Helmut; MACKERELL, Alexander D. CHARM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. **Nature Methods**, v. 14, n. 1, p. 71–73, 2017. DOI: 10.1038/nmeth.4067.
- JADHAV, Abhilash R.; WAR, Abdul R.; NIKAM, Ashwini N.; ADHAV, Anmol S.; GUPTA, Vidya S.; SHARMA, Hari C.; GIRI, Ashok P.; TAMHANE, Vaijayanti A. Capsicum annum proteinase inhibitor ingestion negatively impacts the growth of sorghum pest *Chilo partellus* and promotes differential protease expression. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 8, p. 302–309, 2016. DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.09.016.
- JAMAL, Farrukh; PANDEY, Prabhash K.; SINGH, Dushyant; KHAN, M. Y. **Serine protease inhibitors in plants: Nature's arsenal crafted for insect predators. Phytochemistry Reviews**, 2013. DOI: 10.1007/s11101-012-9231-y.
- JANIN, Joël; HENRICK, Kim; MOULT, John; EYCK, Lynn Ten; STERNBERG, Michael J. E.; VAJDA, Sandor; VAKSER, Ilya; WODAK, Shoshana J. CAPRI: A critical assessment of PRedicted interactions. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, 2003. DOI: 10.1002/prot.10381.
- JANKOWSKA, Milena; ROGALSKA, Justyna; WYSZKOWSKA, Joanna; STANKIEWICZ, Maria. Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System—A Review. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 34, 2017. DOI: 10.3390/molecules23010034.
- JUNG, Hyun Ah; ALI, Md Yousof; CHOI, Ran Joo; JEONG, Hyong Oh; CHUNG, Hae Young; CHOI, Jae Sue. Kinetics and molecular docking studies of fucosterol and fucoxanthin, BACE1 inhibitors from brown algae *Undaria pinnatifida* and *Ecklonia stolonifera*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 89, p. 104–111, 2016. DOI: 10.1016/j.fct.2016.01.014.
- KAHLER, Ursula; FUCHS, Julian E.; GOETTIG, Peter; LIEDL, Klaus R. An unexpected switch in peptide binding mode: from simulation to substrate specificity. **Journal**

of **Biomolecular Structure and Dynamics**, 2018. DOI: 10.1080/07391102.2017.1407674.

- KALLURE, Gopal S.; KUMARI, Archana; SHINDE, Balkrishna A.; GIRI, Ashok P. Characterized constituents of insect herbivore oral secretions and their influence on the regulation of plant defenses. **Phytochemistry**, v. 193, p. 113008, 2022. DOI: 10.1016/j.phytochem.2021.113008.
- KANT, M. R. et al. Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. **Annals of Botany**, v. 115, n. 7, p. 1015–1051, 2015. DOI: 10.1093/aob/mcv054.
- KASPAR, Allan A.; REICHERT, Janice M. Future directions for peptide therapeutics development. **Drug Discovery Today**, 2013. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.05.011.
- KATOCH, Rajan. Insect Pest Resistance Factors in Rice Bean. *In: Ricebean*. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 233–270. DOI: 10.1007/978-981-15-5293-9_14.
- KELLEY, Lawrence A.; MEZULIS, Stefans; YATES, Christopher M.; WASS, Mark N.; STERNBERG, Michael J. E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.
- KHAN, Hafiz Azhar Ali. Characterization of permethrin resistance in a *Musca domestica* strain: resistance development, cross-resistance potential and realized heritability. **Pest Management Science**, v. 75, n. 11, p. 2969–2974, 2019. DOI: 10.1002/ps.5409.
- KIMURA, S. Roy; BROWER, Richard C.; VAJDA, Sandor; CAMACHO, Carlos J. Dynamical View of the Positions of Key Side Chains in Protein-Protein Recognition. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 2, p. 635–642, 2001. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)76044-4.
- KOIDE, Takehiko; IKENAKA, Tokuji; TSUNASAWA, Susumu. Studies on Soybean Trypsin Inhibitors. 2. Amino-Acid Sequence around the Reactive Site of Soybean Trypsin Inhibitor (Kunitz). **European Journal of Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 408–416, 1973. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb02623.x.
- KORTBEEK, Ruy W. J.; VAN DER GRAGT, Michelle; BLEEKER, Petra M. Endogenous plant metabolites against insects. **European Journal of Plant Pathology**, v. 154, n. 1, p. 67–90, 2019. DOI: 10.1007/s10658-018-1540-6.
- KOZAKOV, Dima; HALL, David R.; XIA, Bing; PORTER, Kathryn A.; PADHORN, Dzmity; YUEH, Christine; BEGLOV, Dmitri; VAJDA, Sandor. The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature Protocols**, v. 12, n. 2, p. 255–278, 2017. DOI: 10.1038/nprot.2016.169.
- KUWAR, Suyog S.; PAUCHET, Yannick; VOGEL, Heiko; HECKEL, David G. Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut of *Helicoverpa armigera* in response to a plant protease inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2015. DOI: 10.1016/j.ibmb.2015.01.016.

- LAND, Henrik; HUMBLE, Maria Svedendahl. YASARA: A tool to obtain structural guidance in biocatalytic investigations. *In: Methods in Molecular Biology*. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1007/978-1-4939-7366-8_4.
- LEE, Andy Chi-Lung; HARRIS, Janelle Louise; KHANNA, Kum Kum; HONG, Ji-Hong. A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2383, 2019. DOI: 10.3390/ijms20102383.
- LEWIS, Sidney D.; NG, Assunta S.; BALDWIN, John J.; FUSETANI, Nobuhiro; NAYLOR, Adel M.; SHAFER, Jules A. Inhibition of thrombin and other trypsin-like serine proteinases by cyclotheonamide A. **Thrombosis Research**, v. 70, n. 2, p. 173–190, 1993. DOI: 10.1016/0049-3848(93)90158-K.
- LIANG, Guyan; PHILLIP BOWEN, J. Development of Trypsin-Like Serine Protease Inhibitors as Therapeutic Agents: Opportunities, Challenges, and their Unique Structure-Based Rationales. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 13, p. 1506–1529, 2016. DOI: 10.2174/1568026615666150915121447.
- LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; MARANA, S. R.; JULIANO, L.; TERRA, W. R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 130–140, 2006. DOI: 10.1016/j.ibmb.2005.11.006.
- MACALINO, Stephani Joy Y.; BASITH, Shaherin; CLAVIO, Nina Abigail B.; CHANG, Hyerim; KANG, Soosung; CHOI, Sun. Evolution of In Silico Strategies for Protein-Protein Interaction Drug Discovery. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1963, 2018. DOI: 10.3390/molecules23081963.
- MACHADO, Eduardo P. et al. Interspecific Variation in Susceptibility to Insecticides by Lepidopteran Pests of Soybean, Cotton, and Maize Crops From Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 2022. DOI: 10.1093/jee/toab265.
- MACHADO, Suzy Wider; DE OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho; ZÉRIO, Neide Graciano; PARRA, José Roberto Postali; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. *Inga laurina* trypsin inhibitor (ILTI) obstructs *Spodoptera frugiperda* trypsins expressed during adaptive mechanisms against plant protease inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 95, n. 4, p. e21393, 2017. DOI: 10.1002/arch.21393.
- MARKUS DITTRICH; CHALERMPOL KANCHANAWARIN. **Case Study: BPTI2008**. p. 1–19.
- MEDIC, Jelena; ATKINSON, Christine; HURBURGH, Charles R. Current Knowledge in Soybean Composition. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 3, p. 363–384, 2014. DOI: 10.1007/s11746-013-2407-9.
- MENDONÇA, Eduardo G.; ALMEIDA BARROS, Rafael; CORDEIRO, Gláucia; SILVA, Carolina R.; CAMPOS, Welligton G.; OLIVEIRA, Joel A.; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Larval development and proteolytic activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to different soybean protease

inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 1, 2020. DOI: 10.1002/arch.21637.

MERIÑO-CABRERA, Yaremis; CASTRO, José Severiche; DE ALMEIDA BARROS, Rafael; DA SILVA JUNIOR, Neilier Rodrigues; DE OLIVEIRA RAMOS, Humberto; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Arginine-containing dipeptides decrease affinity of gut trypsins and compromise soybean pest development. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, p. 105107, 2022. DOI: 10.1016/j.pestbp.2022.105107.

MERIÑO-CABRERA, Yaremis; OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; MACEDO, Maria Ligia Rodrigues; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Inhibition of digestive trypsins by plant Kunitz proteins reduces the viability of *Spodoptera cosmioides* larvae. **Annals of Applied Biology**, v. 175, n. 3, p. 336–349, 2019. a. DOI: 10.1111/aab.12539.

MERIÑO-CABRERA, Yaremis; OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; MACEDO, Maria Ligia Rodrigues; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Inhibition of digestive trypsins by plant Kunitz proteins reduces the viability of *Spodoptera cosmioides* larvae. **Annals of Applied Biology**, v. 175, n. 3, p. 336–349, 2019. b. DOI: 10.1111/aab.12539.

MERIÑO-CABRERA, Yaremis; SEVERICHE CASTRO, José Gregório; RIOS DIEZ, Juan Diego; RODRIGUES MACEDO, Maria Ligia; DE OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; GORETI DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria. Rational design of mimetic peptides based on the interaction between *Inga laurina* inhibitor and trypsins for *Spodoptera cosmioides* pest control. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, p. 103390, 2020. DOI: 10.1016/j.ibmb.2020.103390.

MERSKI, Matthew; MOREIRA, Cátia; ABREU, Rui MV; RAMOS, Maria João; FERNANDES, Pedro A.; MARTINS, L. Miguel; PEREIRA, Pedro José Barbosa; MACEDO-RIBEIRO, Sandra. Molecular motion regulates the activity of the Mitochondrial Serine Protease HtrA2. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 10, p. e3119–e3119, 2017. DOI: 10.1038/cddis.2017.487.

MICHAUD, D.; CANTIN, L.; VRAIN, T. C. Carboxy-Terminal Truncation of Oryzacystatin II by Oryzacystatin-Insensitive Insect Digestive Proteinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 322, n. 2, p. 469–474, 1995. DOI: 10.1006/abbi.1995.1490.

MIRZAEI, Mahta; MIRDAMADI, Saeed; SAFAVI, Maliheh; SOLEYMANZADEH, Nazila. The stability of antioxidant and ACE-inhibitory peptides as influenced by peptide sequences. **LWT**, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109710.

MOCZYDLOWSKI, Edward; MOSS, Guy W. J.; LUCCHESI, Kathryn J. Bovine pancreatic trypsin inhibitor as a probe of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels at an internal site of interaction. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 1, p. 21–28, 1992. DOI: 10.1016/0006-2952(92)90656-4.

MOREIRA, Irina S.; FERNANDES, Pedro A.; RAMOS, Maria J. Hot spots-A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. **Proteins:**

- Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 68, n. 4, p. 803–812, 2007. DOI: 10.1002/prot.21396.
- NAPOLEÃO, Thiago H.; ALBUQUERQUE, Lidiane P.; SANTOS, Nataly DL; NOVA, Isabella CV; LIMA, Thâmarah A.; PAIVA, Patrícia MG; PONTUAL, Emmanuel V. Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. **Pest Management Science**, v. 75, n. 5, p. 1212–1222, 2019. DOI: 10.1002/ps.5233.
- NAUEN, Ralf; STEINBACH, Denise. Resistance to diamide insecticides in lepidopteran pests. *In: Advances in Insect Control and Resistance Management*. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1007/978-3-319-31800-4_12.
- NOWICKI, Patryk; KUCZER, Mariola; SCHROEDER, Grzegorz; CZARNIEWSKA, Elżbieta. Disruption of insect immunity using analogs of the pleiotropic insect peptide hormone Neb-colloostatin: a nanotech approach for pest control II. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 9459, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-87878-5.
- OERKE, E. C. **Crop losses to pests**. **Journal of Agricultural Science**, 2006. DOI: 10.1017/S0021859605005708.
- OLIVEIRA, M. G. A.; DE SIMONE, S. G.; XAVIER, L. P.; GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, n. 3, p. 369–380, 2005. DOI: 10.1016/j.cbpc.2004.10.018.
- OLIVEIRA, M. G.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. Identification by covalent labeling with p-diazoniumbenzamidino and kinetic characterization of Tyr-151-(p-benzamidino)-azo-beta-trypsin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 36, p. 26893–26903, 1993. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)74195-7.
- OONINCX, Dennis G. A. B.; VAN BROEKHOVEN, Sarah; VAN HUIS, Arnold; VAN LOON, Joop J. A. Feed Conversion, Survival and Development, and Composition of Four Insect Species on Diets Composed of Food By-Products. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0144601, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0144601.
- OPPERT, Brenda; MORGAN, Tom D.; KRAMER, Karl J. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin and protease inhibitors against coleopteran storage pests. **Pest Management Science**, v. 67, n. 5, p. 568–573, 2011. DOI: 10.1002/ps.2099.
- PANDEY, Ankesh; YADAV, Reena; KUMAR, Sanoj; KUMAR, Anil; SHUKLA, Priya; YADAV, Ankita; SANYAL, Indraneel. Expression of the entomotoxic *Cocculus hirsutus* trypsin inhibitor (ChTI) gene in transgenic chickpea enhances its underlying resistance against the infestation of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 146, n. 1, p. 41–56, 2021. DOI: 10.1007/s11240-021-02041-2.

- PANDEY, Ankesh; YADAV, Reena; SANYAL, Indraneel. Evaluating the pesticidal impact of plant protease inhibitors: lethal weaponry in the co-evolutionary battle. **Pest Management Science**, 2021. DOI: 10.1002/ps.6659.
- PARDE, Vinod D.; SHARMA, Hari C.; KACHOLE, Manvendra S. In vivo inhibition of *Helicoverpa armigera* gut pro-proteinase activation by non-host plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 9, p. 1315–1324, 2010. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2010.04.003.
- PATARROYO-VARGAS, ADRIANA M.; CORDEIRO, GLÁUCIA; SILVA, CAROLINA R. Da; SILVA, CAMILA R. Da; MENDONÇA, EDUARDO G.; VISÔTTO, LILIANE E.; ZANUNCIO, JOSÉ C.; CAMPOS, WELLINGTON G.; OLIVEIRA, MARIA GORETI A. Inhibition kinetics of digestive proteases for *Anticarsia gemmatalis*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. suppl 1, 2020. DOI: 10.1590/0001-3765202020180477.
- PATARROYO-VARGAS, Adriana M.; MERINO-CABRERA, Yaremis B.; ZANUNCIO, Jose C.; ROCHA, Francelina; CAMPOS, Wellington G.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Kinetic Characterization of *Anticarsia gemmatalis* Digestive Serine-Proteases and the Inhibitory Effect of Synthetic Peptides. **Protein & Peptide Letters**, v. 24, n. 11, 2018. DOI: 10.2174/0929866524666170918103146.
- PILON, ANDERSON M.; CAMPOS, WELLINGTON G.; SILVA, CAROLINA R.; CORDEIRO, GLAÚCIA; SILVA, CAMILA R.; OLIVEIRA, MARIA GORETI A. Protease inhibitory, insecticidal and deterrent effects of the trypsin-inhibitor benzamidine on the velvetbean caterpillar in soybean. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3475–3482, 2018. DOI: 10.1590/0001-3765201820180159.
- PIMENTEL, David; BURGESS, Michael. Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States. *In: Integrated Pest Management*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 47–71. DOI: 10.1007/978-94-007-7796-5_2.
- REISIG, Dominic D.; KURTZ, Ryan. Bt Resistance Implications for *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) Insecticide Resistance Management in the United States. **Environmental Entomology**, 2018. DOI: 10.1093/ee/nvy142.
- ROBIN, Tal; REUVENI, Shlomi; URBAKH, Michael. Single-molecule theory of enzymatic inhibition. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 779, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-02995-6.
- ROBINSON, David; BLISS, Edward. A model of the direct and indirect effects of aprotinin administration on the overall costs of coronary revascularization surgery in a university teaching hospital cardiothoracic unit. **Clinical Therapeutics**, v. 24, n. 10, p. 1677–1689, 2002. DOI: 10.1016/S0149-2918(02)80071-6.
- ROYCHAUDHURI, Robin; SARATH, Gautam; ZEECE, Michael; MARKWELL, John. Reversible denaturation of the soybean Kunitz trypsin inhibitor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 412, n. 1, p. 20–26, 2003. DOI: 10.1016/S0003-9861(03)00011-0.

- SACZEWSKI, Franciszek; BALEWSKI, Łukasz. Biological activities of guanidine compounds. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, n. 10, p. 1417–1448, 2009. DOI: 10.1517/13543770903216675.
- SAIKHEDKAR, Nidhi S.; JOSHI, Rakesh S.; BHOITE, Ashiwini S.; MOHANDASAN, Radhika; YADAV, Amit Kumar; FERNANDES, Moneesha; KULKARNI, Kiran A.; GIRI, Ashok P. Tripeptides derived from reactive centre loop of potato type II protease inhibitors preferentially inhibit midgut proteases of *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 95, p. 17–25, 2018. DOI: 10.1016/j.ibmb.2018.02.001.
- SAIKHEDKAR, Nidhi S.; JOSHI, Rakesh S.; YADAV, Amit K.; SEAL, Shubhendu; FERNANDES, Moneesha; GIRI, Ashok P. Phyto-inspired cyclic peptides derived from plant Pin-II type protease inhibitor reactive center loops for crop protection from insect pests. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 2019. DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.05.003.
- SANTOS, Lucianna H. S.; FERREIRA, Rafaela S.; CAFFARENA, Ernesto R. Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. *In*: [s.l.: s.n.], p. 13–34. DOI: 10.1007/978-1-4939-9752-7_2.
- SHAMSI, Tooba Naz; PARVEEN, Romana; FATIMA, Sadaf. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 1120–1133, 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.069.
- SILVA JÚNIOR, Neillier R.; VITAL, Camilo E.; ALMEIDA BARROS, Rafael; FAUSTINO, Verônica A.; MONTEIRO, Luana P.; BARROS, Edvaldo; OLIVEIRA, Eugênio E.; OLIVEIRA RAMOS, Humberto J.; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Intestinal proteolytic profile changes during larval development of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 1, 2020. DOI: 10.1002/arch.21631.
- SINGH, Raushan Kumar; TIWARI, Manish Kumar; KIM, In-Won; CHEN, Zhilei; LEE, Jung-Kul. Probing the Role of Sigma π Interaction and Energetics in the Catalytic Efficiency of Endo-1,4- β -Xylanase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8817–8821, 2012. DOI: 10.1128/AEM.02261-12.
- SINGH, Sujata; SINGH, Archana; KUMAR, Sumit; MITTAL, Pooja; SINGH, Indrakant K. Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. **Insect Science**, 2020. DOI: 10.1111/1744-7917.12641.
- SOKALINGAM, Sriram; RAGHUNATHAN, Govindan; SOUNDARARAJAN, Nagasundarapandian; LEE, Sun-Gu. A Study on the Effect of Surface Lysine to Arginine Mutagenesis on Protein Stability and Structure Using Green Fluorescent Protein. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40410, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0040410.
- SONG, Hyun Kyu; SUH, Se Won. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the

- interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator 1 Edited by R. Huber. **Journal of Molecular Biology**, v. 275, n. 2, p. 347–363, 1998. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1469.
- SOUTO, XÊNIA M.; BRANQUINHA, MARTA H.; SANTOS, ANDRÉ L. S. Chymotrypsin- and trypsin-like activities secreted by the multidrug-resistant yeasts forming the *Candida haemulonii* complex. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 3, 2019. DOI: 10.1590/0001-3765201920180735.
- SPLIT, Jornt; BREUGELMANS, Bert; VAN HOEF, Vincent; SIMONET, Gert; ZELS, Sven; BROECK, Jozef Vanden. Growth-inhibition effects of pacifastin-like peptides on a pest insect: The desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Peptides**, v. 34, n. 1, p. 251–257, 2012. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.06.019.
- SRINIVASAN, Ajay; GIRI, Ashok; GUPTA, Vidya. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 11, n. 1, 2006. DOI: 10.2478/s11658-006-0012-8.
- SWEDBERG, Joakim E.; DE VEER, Simon J.; SIT, Kei C.; REBOUL, Cyril F.; BUCKLE, Ashley M.; HARRIS, Jonathan M. Mastering the Canonical Loop of Serine Protease Inhibitors: Enhancing Potency by Optimising the Internal Hydrogen Bond Network. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e19302, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0019302.
- TABASHNIK, Bruce E.; CARRIÈRE, Yves. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 10, p. 926–935, 2017. DOI: 10.1038/nbt.3974.
- TAYLOR, R. D.; JEWSBURY, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, n. 3, p. 151–166, 2002. DOI: 10.1023/A:1020155510718.
- TERRA, Walter R.; FERREIRA, Clélia. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 1–62, 1994. DOI: 10.1016/0305-0491(94)90141-4.
- TOMARELLI, R.; CHARNEY, J.; HARDING, M. The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 34, n. 3, p. 428–433, 1949.
- UMETSU, Noriharu; SHIRAI, Yuichi. Development of novel pesticides in the 21st century. **Journal of Pesticide Science**, v. 45, n. 2, p. 54–74, 2020. DOI: 10.1584/jpestics.D20-201.
- USDA. **World Agricultural Production**. [s.l.: s.n.].
- VAJRAVIJAYAN, Senthilvadivel; PLETNEV, Sergei; PLETNEV, Vladimir Z.; NANDHAGOPAL, Narayanasamy; GUNASEKARAN, Krishnasamy. Crystal structure of a novel Kunitz type inhibitor, alocasin with anti-*Aedes aegypti* activity targeting midgut proteases. **Pest Management Science**, v. 74, n. 12, p. 2761–2772, 2018. DOI: 10.1002/ps.5063.

- VOLPICELLA, Mariateresa; CORDEWENER, Jan; JONGSMA, Maarten A.; GALLERANI, Raffaele; CECI, Luigi R.; BEEKWILDER, Jules. Identification and characterization of digestive serine proteases from inhibitor-resistant *Helicoverpa zea* larval midgut☆. **Journal of Chromatography B**, v. 833, n. 1, p. 26–32, 2006. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.10.021.
- WALDBAUER, G. P. The Consumption and Utilization of Food by Insects. *In*: [s.l.: s.n.]. p. 229–288. DOI: 10.1016/S0065-2806(08)60230-1.
- WAN, Shunzhou; KNAPP, Bernhard; WRIGHT, David W.; DEANE, Charlotte M.; COVENEY, Peter V. Rapid, Precise, and Reproducible Prediction of Peptide-MHC Binding Affinities from Molecular Dynamics That Correlate Well with Experiment. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 2015. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00179.
- WANG, Bo; XIE, Ningning; LI, Bo. Influence of peptide characteristics on their stability, intestinal transport, and in vitro bioavailability: A review. **Journal of Food Biochemistry**, 2019. DOI: 10.1111/jfbc.12571.
- WATERHOUSE, Andrew et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2018. DOI: 10.1093/nar/gky427.
- WOLDEMARIAM, Melkamu G.; AHERN, Kevin; JANDER, Georg; TZIN, Vered. A role for 9-lipoxygenases in maize defense against insect herbivory. **Plant Signaling & Behavior**, v. 13, n. 1, p. e1422462, 2018. DOI: 10.1080/15592324.2017.1422462.
- YANG, Limei; FANG, Zhiyuan; DICKE, Marcel; LOON, Joop J. A. van; JONGSMA, Maarten A. The diamondback moth, *Plutella xylostella*, specifically inactivates Mustard Trypsin Inhibitor 2 (MTI2) to overcome host plant defence. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2009. DOI: 10.1016/j.ibmb.2008.09.012.
- ZHAO, Aiping; LI, Yin; LENG, Chunmeng; WANG, Ping; LI, Yiping. Inhibitory Effect of Protease Inhibitors on Larval Midgut Protease Activities and the Performance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Frontiers in Physiology**, v. 9, 2019. a. DOI: 10.3389/fphys.2018.01963.
- ZHAO, Junnan; ZHU, Lu; ZHOU, Weineng; YIN, Lingfeng; WANG, Yuchen; FAN, Yuanrong; CHEN, Yadong; LIU, Haichun. In silico Prediction of Inhibitory Constant of Thrombin Inhibitors Using Machine Learning. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 21, n. 9, p. 662–669, 2019. b. DOI: 10.2174/1386207322666181220130232.
- ZHAO, Ping; WANG, Gen Hong; DONG, Zhao Ming; DUAN, Jun; XU, Ping Zhen; CHENG, Ting Cai; XIANG, Zhong Huai; XIA, Qing You. Genome-wide identification and expression analysis of serine proteases and homologs in the silkworm *Bombyx mori*. **BMC Genomics**, 2010. DOI: 10.1186/1471-2164-11-405.

- ZHIRNOV, O. P.; KLENK, H. D.; WRIGHT, P. F. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. **Antiviral Research**, v. 92, n. 1, p. 27–36, 2011. DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.07.014.
- ZHOU, Aiwu; CARRELL, Robin W.; HUNTINGTON, James A. The Serpin Inhibitory Mechanism Is Critically Dependent on the Length of the Reactive Center Loop. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 29, p. 27541–27547, 2001. DOI: 10.1074/jbc.M102594200.
- ZHU-SALZMAN, Keyan; ZENG, Rensen. Insect Response to Plant Defensive Protease Inhibitors. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 233–252, 2015. DOI: 10.1146/annurev-ento-010814-020816.

TABELAS

Tabela 1. Potencial de dissociação calculado por simulação dinâmica molecular (MD) e constante de inibição experimental e teórica K_i para a interação entre os Peptídeos 1 e 2 e a proteína tripsina-like de *Anticarsia gemmatalis*.

Peptide	K_D (Dissociation Potencial) (MD)	K_i experimental	K_i theoretical
GORE2	-3.75	0.1	0.94
GORE1	6.83	0.5	1.11

FIGURAS

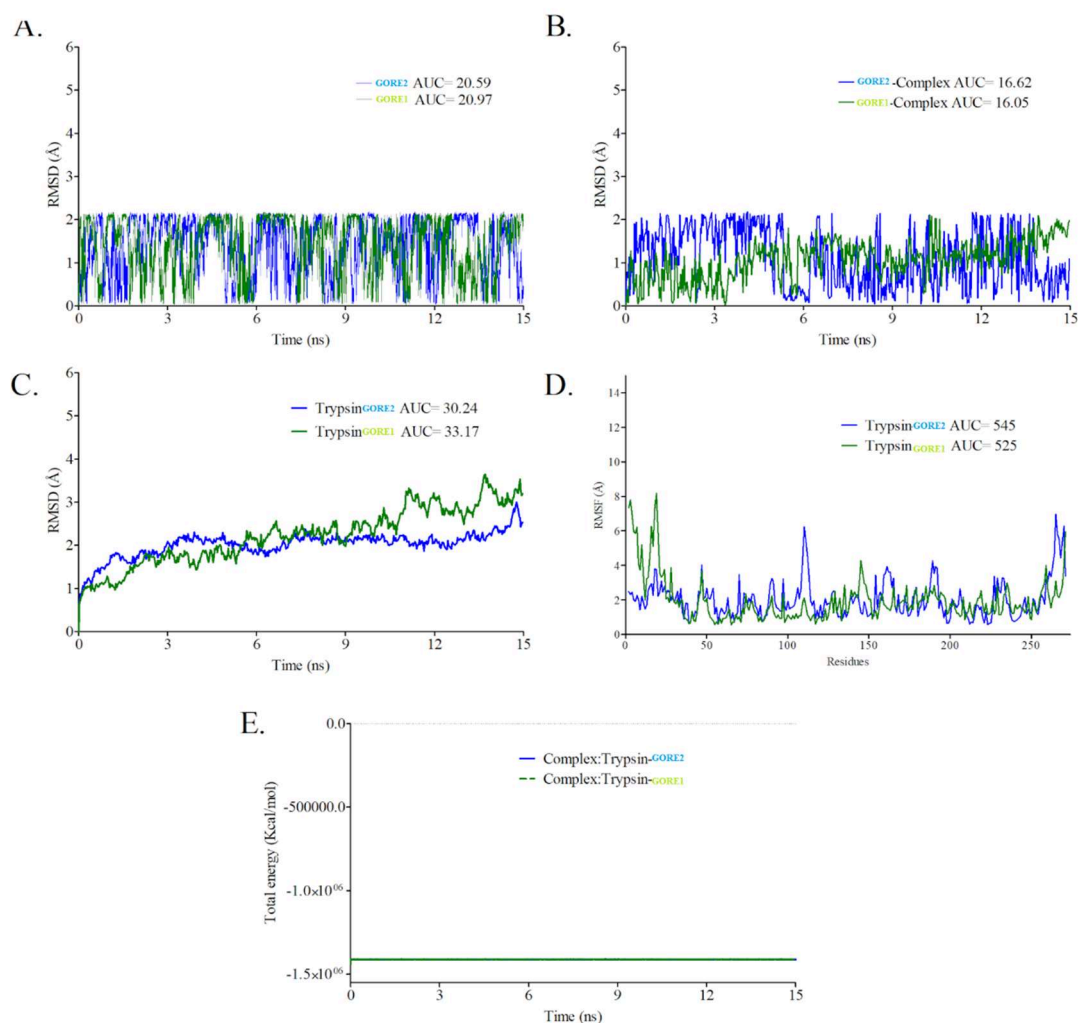


Figura 1. Valores de RMSD (A e B) dos peptídeos GORE1 e GORE2 livres (A) e ligados a tripsinas-like de *Anticarsia gemmatalis* (B); Valores de RMSD e RMSF (C e D) da tripsina em estado livre (C) e ligado (D) a peptídeos, obtidos a partir de simulações de dinâmica molecular em caixa d'água. Energia total (E) dos complexos de tripsina e peptídeos após simulação de dinâmica molecular em caixa d'água.

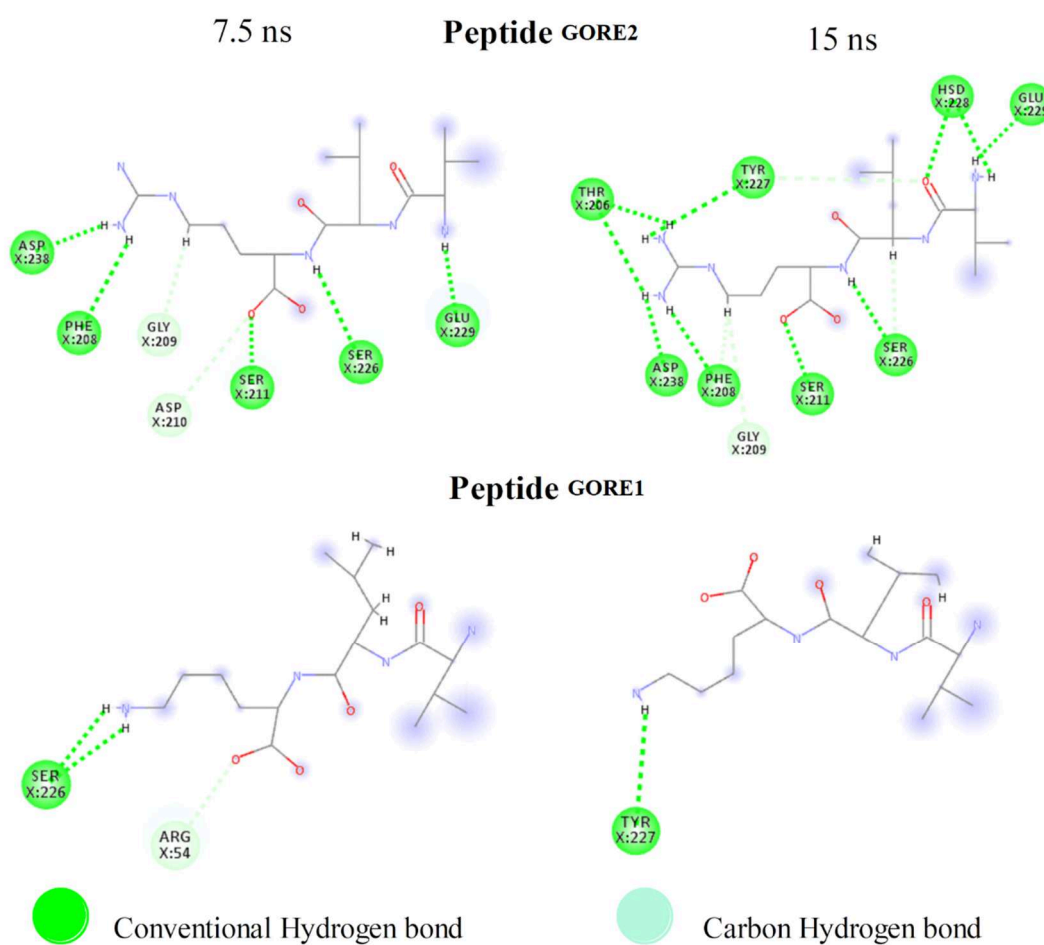


Figura 2. Interações entre ligantes (GORE1 e GORE2) e tripsina-*like* no meio (7,5 ns) e no final (15 ns) da simulação de dinâmica molecular em caixa d'água. A bola colorida e a linha pontiaguda indicam o tipo de interação entre os peptídeos e as cadeias laterais dos resíduos de tripsina-*like* de *Anticarsia gemmatalis*.

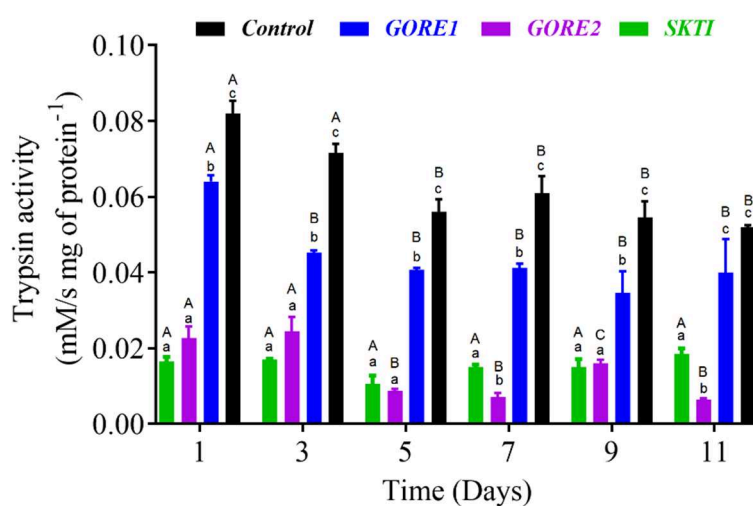


Figura 3. Atividade inibitória dos peptídeos GORE1, GORE2 e do inibidor de protease SKTI em solução aquosa ao longo do tempo. As barras indicam média \pm SE; $n = 3$. Letras maiúsculas indicam diferença estatística dentro de um mesmo inibidor, ao longo do tempo. Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os inibidores, no mesmo tempo.

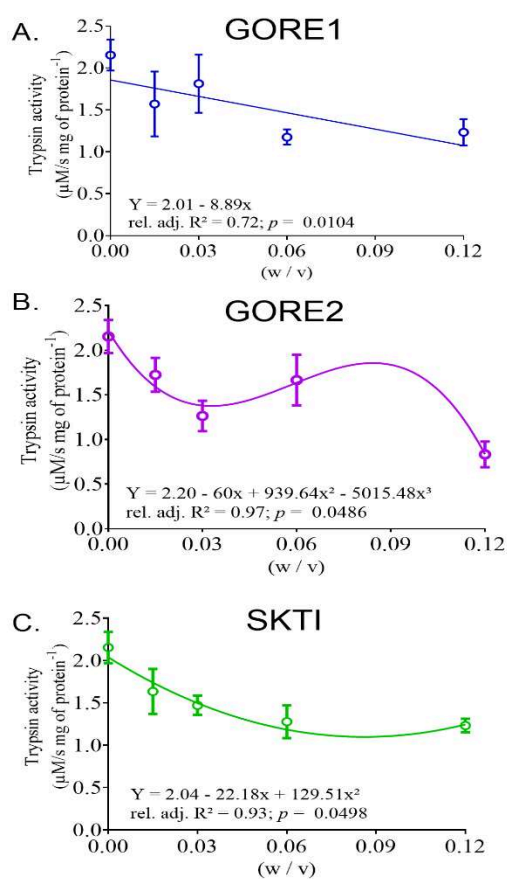


Figure 4. Inibição in vivo de tripsinas-*like* após 12h de exposição de larvas de *A. gemmatalis* a diferentes concentrações dos peptídeos GORE1 e GORE2 e do inibidor de protease SKTI misturado em uma dieta artificial. (A) atividade tripsina-*like* e (B) percentual de inibição de tripsinas-*like*. Barras (média \pm SE; n = 6).

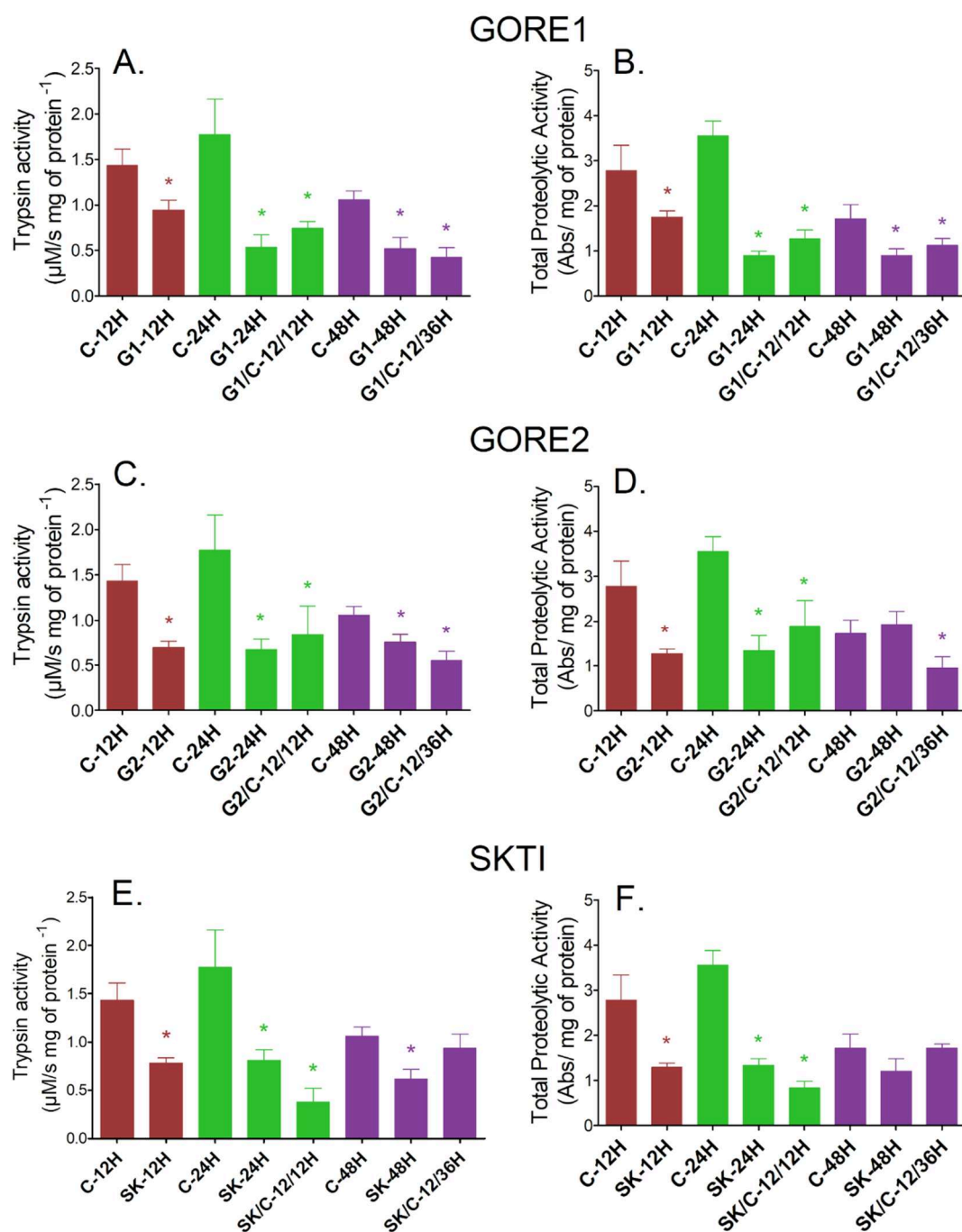


Figure 5. Persistência dos peptídeos GORE1 e GORE2 e do inibidor de protease SKTI na atividade proteolítica total e de tripsina-like. A, C e E representam os efeitos proteolíticos totais de GORE1, GORE2 e SKTI, respectivamente. B, D e E representam os efeitos nas tripsinas-like de GORE1, GORE2 e SKTI, respectivamente. As barras indicam média \pm SE; n = 4). * Acima das barras estão indicadas as diferenças estatísticas pelo teste de Dunnet $P < 0,05$.

**CAPÍTULO II: EFEITO DE BPTI E SKTI SOBRE *Anticarsia gemmatalis* E
DESENHO DE PEPTÍDEOS INIBIDORES**

ARTIGO I - Bovine Pancreatic Trypsin inhibitor and Soybean Kunitz Trypsin inhibitor: differential effects on proteases and larval development of the soybean pest *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) – **Submetido na revista *Pesticide Biochemistry and Physiology***

ARTIGO II – Inhibitory activity of peptides designed based on reactive center loops of BPTI and SKTI proteins: binding to trypsin-like enzymes of lepidopteran pests – **Submetido na revista *Bioorganic Chemistry***

CAPÍTULO II – ARTIGO III

Inibidor de tripsina-*like* pancreática bovina e inibidor de tripsina *Kunitz* de soja: efeitos diferenciais sobre proteases e desenvolvimento larval da praga da soja *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO

O manejo de pragas é desafiado por herbívoros resistentes e problemas relacionados à saúde humana e questões ambientais. De fato, o maior desafio para a agricultura moderna é proteger as plantações das pragas e ainda manter a qualidade ambiental. Este estudo teve como objetivo analisar por abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo* a viabilidade do uso da proteína inibitória extraída de mamíferos (BPTI) como um potencial inibidor de tripsinas digestivas da praga *A. gemmatalis* e comparar os resultados com os do inibidor da soja (hospedeiro) SKTI. BPTI e SKTI são inibidores competitivos, bloqueando a entrada do substrato através de ligações hidrofóbicas e hidrofóbicas, como interações alquila. Larvas de *A. gemmatalis* expostas ao BPTI não apresentaram dois mecanismos adaptativos comuns, ou seja, degradação proteolítica e superprodução de proteases, apresentando atividade de tripsina-*like* altamente reduzida. Por outro lado, as larvas alimentadas com SKTI não apresentaram redução na atividade de tripsinas-*like*, apresentando superprodução de proteases e digestão proteolítica do SKTI. Além disso, a sobrevivência larval foi reduzida pelo BPTI de forma semelhante ao SKTI, e adicionalmente causou uma diminuição na viabilidade pupal, evidenciada pela queda no peso analisado. Assim, o BPTI pode ser um candidato promissor para uso no manejo de *A. gemmatalis* ou no desenho racional de novas moléculas ou peptídeos menores.

Palavras-chave: Inibição. Cinética enzimática. Dinâmica molecular. Inibidores de protease. Eletroforese. Adaptação.

Bovine Pancreatic Trypsin inhibitor and Soybean Kunitz Trypsin inhibitor: differential effects on proteases and larval development of the soybean pest *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)

ABSTRACT

Pest management is challenged with resistant herbivores and problems regarding health and environmental issues. Indeed, the greatest challenge to modern agriculture is to protect crops from pests and still maintain environmental quality. This study aimed to analyze by *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* approaches the feasibility of using the inhibitory protein extracted from mammals (BPTI) as a potential inhibitor of digestive trypsin-like enzymes from the pest *Anticarsia gemmatalis* and comparing the results with the host-plant inhibitor SKTI. BPTI and SKTI interact with *A. gemmatalis* trypsin-like enzyme competitively, through hydrogen and hydrophobic bonds. *A. gemmatalis* larvae exposed to BPTI did not show two common adaptive mechanisms i.e., proteolytic degradation and overproduction of proteases, presenting highly reduced trypsin-like activity. On the other hand, SKTI-fed larvae did not show reduced trypsin-like activity, presenting overproduction of proteases and SKTI digestion. In addition, the larval survival was reduced by BPTI similarly to SKTI, and additionally caused a decrease in pupal viability, evidenced by the drop in the analyzed weight. The non-plant protease inhibitor BPTI presents intriguing elements to compose biopesticide formulations to help decrease the use of conventional refractory pesticides into integrated pest management programs.

Key-words: Inhibition. Kinetic enzymatic. Molecular dynamics. Protease inhibitors. Electrophoresis. Adaptation.

1. INTRODUÇÃO

As práticas de manejo da sojicultura contam com cultivares transgênicas que expressam proteínas entomotóxicas de *Bacillus thuringiensis*, além de uma grande quantidade de químicos disponíveis para controlar os danos causados por herbívoros (Bueno et al., 2021). No entanto, essas abordagens de manejo de pragas estão sendo constantemente desafiadas com herbívoros resistentes e problemas relacionados à saúde e questões ambientais. De fato, o maior desafio para a agricultura moderna é proteger as plantações de pragas e ainda manter a qualidade ambiental. Assim, novas moléculas, com diferentes modos de ação, têm sido buscadas e avaliadas para complementar, ou mesmo substituir, os atuais produtos químicos utilizados no manejo de pragas (ALMEIDA BARROS et al., 2021; MERIÑO-CABRERA et al., 2020; SAIKHEDKAR et al., 2018, 2019).

Enzimas proteolíticas como serino, cisteíno, aspartil e metaloproteases são encontradas no trato alimentar de insetos fitófagos, com sua predominância e eficiência catalítica variando muito entre as diferentes ordens de insetos e comportamentos alimentares (A. JONGSMA; BEEKWILDER, 2011). A digestão eficiente de proteínas vegetais por insetos herbívoros é crucial para suas necessidades de nitrogênio, uma vez que eles têm relações carbono/nitrogênio nos tecidos muito mais baixas do que as plantas (KANT et al., 2015). A inibição de enzimas proteolíticas é uma abordagem promissora para o melhoramento de culturas e manejo de pragas de insetos. Para alcançar a redução do *fitness* de pragas agrícolas devido ao comprometimento da digestão de proteínas da dieta, muitos pesquisadores estudam inibidores de proteases naturais (IPs), principalmente aqueles de origem vegetal, que geralmente fazem parte do sistema de defesa natural de plantas contra herbivoria (SINGH et al., 2020). No entanto, em detrimento da coevolução com as plantas, os herbívoros desenvolveram estratégias multicamadas para lidar com estes IPs, *i.e.*, superexpressão de proteases alvo, expressão de proteases insensíveis à IPs e degradação de IPs, dificultando a utilização destas moléculas na agricultura (SINGH et al., 2020; ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015).

De fato, os complexos mecanismos que os insetos possuem para contornar os IPs são gargalos a serem superados pelos pesquisadores para viabilizar a incorporação desse tipo de moléculas na agricultura. No entanto, inibidores de proteases proteicos não vegetais, como IPs de mamíferos, fungos, bactérias e outros

artrópodes e, até mesmo peptídeos sintéticos racionalmente projetados, podem ser uma faísca de luz para otimizar essa abordagem no controle de herbívoros. Uma mistura contendo inibidores de protease relacionados à pacifastina resultou em maior supressão de insetos em comparação com inibidores derivados de plantas em ensaios de alimentação (BREUGELMANS et al., 2009). Insetos lepidópteros expostos a diferentes pequenos peptídeos, racionalmente projetados para inibir suas serino-proteases, apontaram maior supressão quando comparados com inibidores de proteases de origem vegetal, como o SKTI (ALMEIDA BARROS et al., 2021; MERIÑO-CABRERA et al., 2020; SAIKHEDKAR et al., 2018).

Dentre os insetos-praga que atacam as lavouras de soja ao redor do globo, as da ordem dos lepidópteros têm participação destacada na geração de prejuízos econômicos para a economia global (Bueno et al., 2021). A digestibilidade das proteínas da dieta em insetos lepidópteros depende fortemente de serino-proteases, principalmente tripsinas-*like* e quimotripsinas-*like* (SRINIVASAN; GIRI; GUPTA, 2006). A *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae), é uma praga-chave neotropical dos campos de soja, e um exemplo de inseto lepidóptero em que sua atividade proteolítica total no trato alimentar depende principalmente de tripsinas-*like* (MENDONÇA et al., 2020; SILVA JÚNIOR et al., 2020).

O Inibidor de Tripsina Pancreática Bovina (BPTI) é um inibidor de protease de 58 resíduos altamente estável, que contém três ligações dissulfeto. O BPTI reage rapidamente com serina proteases para formar complexos estáveis, inibindo assim as atividades das enzimas (BORJIGIN; NATHANS, 1993). Proteases semelhantes a tripsina parcialmente purificadas extraídas de larvas de quarto/quinto ínstar de *A. gemmatalis* apresentaram sua atividade enzimática reduzida pela metade por concentrações de até 1,92 μM de BPTI (OLIVEIRA et al., 2005). Acreditamos que a exposição de *A. gemmatalis* ao BPTI possa causar maior impacto na aptidão das larvas do que aquelas que evoluíram intimamente com o inseto, como o SKTI (Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor). Possivelmente, os mecanismos utilizados por *A. gemmatalis* são menos adaptáveis a um inibidor de protease completamente estranho, como o BPTI.

Assim, este estudo teve como objetivo analisar por abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo* a viabilidade do uso da proteína inibitória extraída de mamíferos (BPTI) como um potencial inibidor de tripsinas digestivas da praga *A. gemmatalis* e comparar os resultados com os do inibidor de proteases de soja SKTI.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Abordagem *in silico*: interação inibidores-tripsinas de *A. gemmatalis*

2.1.1. Determinação da estrutura tridimensional das proteínas: inibidores e enzimas

Para analisar o potencial inibitório das proteínas BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) e SKTI (Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor) sobre as enzimas de tripsina de *A. gemmatalis* por abordagem *in silico*, primeiramente, as sequências de enzimas de aminoácidos foram obtidas pela tradução de genes de tripsina identificados por análises de zimograma e espectrometria de massa (SILVA JÚNIOR et al., 2020), utilizando a ferramenta Expasy (Gasteiger et al., 2003); as regiões conservadas das tripsinas foram confirmadas usando o banco de dados Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>) (FINN et al., 2016). Em seguida, o software online Phyre2 foi usado para prever as estruturas tridimensionais das seis (6) sequências semelhantes à tripsina (KELLEY et al., 2015).

A avaliação da geometria e estereoquímica das enzimas modeladas foi realizada pelo pacote de análise dos servidores web PProSA (Protein Structure Analysis) (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), ERRAT (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) e Ramachandran Plot (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

As estruturas cristalinas BPTI e SKTI foram obtidas do banco de dados de proteínas (PDB) usando os códigos 3LDJ e 1AVX, respectivamente. Os ligantes ou receptores de proteína associados às proteínas foram removidos e os hidrogênios adicionados usando Pymol Molecular Graphics System, Versão 2.0 Schrödinger, LLC.

2.1.2. Interação proteína-proteína

A interação proteína-proteína entre tripsinas de *A. gemmatalis* (moléculas alvo) e as proteínas inibidoras SKTI e BPTI (ligantes) foi realizada por docking molecular usando Cluspro, um programa online para o docking computacional de estruturas proteicas (COMEAU et al., 2004). A pose de ligação e a energia mais baixa dos complexos foram obtidas; a visualização e análise dos complexos foi realizada

com Pymol. Um perfil farmacofórico foi obtido do complexo com maior energia de afinidade usando o software Discovery Studio (BIOVIA, 2017).

2.1.3. Dinâmica molecular dos complexos proteína-proteína

Simulações de dinâmica molecular para proteínas BPTI e SKTI em complexo com tripsinas de *A. gemmatalis* foram realizadas em uma caixa cúbica de água, utilizando *Water TIP3P* (potencial intermolecular transferível com 3 pontos). Essas simulações dinâmicas foram realizadas para avaliar as propriedades dos complexos em termos de sua estrutura e as interações microscópicas entre eles. Foi utilizado o campo de força CHARMM36 do pacote computacional NAMD 2.12 (HUANG et al., 2017). A neutralidade da carga total das moléculas do sistema foi suportada pelos íons sódio, cálcio e cloro, pela adição de cálcio e cloreto de sódio. A inserção dos íons foi realizada utilizando a ferramenta *Autoionize* da VMD. Após 1000 etapas de minimização, o sistema foi simulado a 310 K e pressão de 1 atm no conjunto de pressão constante (NPT). Para as interações não ligadas, o corte foi ajustado para 12 Å e para o longo alcance o corte foi modelado usando o método *Particle Mesh Ewald* (PME). Os complexos BPTI-Tripsina e SKTI-Tripsina com energias minimizadas e temperatura e pressão equilibradas foram submetidos à simulação de dinâmica molecular (MD) durante 20 ns.

2.2. Parâmetros cinéticos dos inibidores BPTI e SKTI

Os parâmetros cinéticos, especificamente constantes de inibição (K_i) de proteínas SKTI e BPTI foram calculados usando Tris-HCl 0,1 M, CaCl₂ 20 mM, tampão pH 8,2, substrato cromogênico L-BApNA e uma fração contendo tripsinas de *A. gemmatalis* após purificação em coluna HiTrap Benzamidina acoplada a FPLC (ALMEIDA BARROS et al., 2021) e, as proteínas SKTI e BPTI.

A inibição de tripsinas-like de *A. gemmatalis* foi avaliada com as seguintes concentrações: 20 µg de tripsina-like; 4130, 2060, 1030, 520 e 260 µM de L-BApNA; 12,4, 6,2, 3,1, 1,55 e 0,77 µM de BPTI e 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 de SKTI e o controle sem inibidores. As velocidades iniciais de reação foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida a 410 nm durante 150 s usando o coeficiente de extinção molar específico 8800 M⁻¹cm⁻¹.

2.3. Criação de *A. gemmatalis* e exposição a inibidores de protease

Larvas de *A. gemmatalis* foram obtidas a partir de criação em massa no Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Trinta larvas foram individualizadas em células quadradas (5 x 5 cm), alimentadas com uma dieta artificial preparada de acordo com (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976) e mantidas em uma sala com condições controladas, ou seja, 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e 14 h de luz: 10 h de fotoperíodo escuro. Após os insetos atingirem o quinto ínstar, foram deixados sem alimento durante 12 h e submetidos a três tratamentos distintos: (a) dieta artificial sem inibidor de protease (dieta controle); (b) dieta artificial contendo BPTI (0,3 mM) e; (c) dieta artificial contendo SKTI (0,3 mM). Para a mistura de inibidores de protease na dieta, primeiro derreteu-se a dieta em banho-maria durante 10 min e posteriormente adicionou-se a solução de inibidor de protease (água destilada) quando as dietas atingiram 45 °C. Cada tratamento consistiu de 10 larvas de quinto ínstar alimentando-se à vontade durante 24h. A produção de fezes, o ganho de peso larval e o consumo de dieta foram medidos. Além disso, o intestino médio e as fezes de cada larva foram coletados e armazenados a -80 °C para avaliar proteases e inibição proteolítica, respectivamente.

2.4. Inibição de tripsinas-like por dieta artificial e extratos de fezes

Para avaliar a atividade inibitória das fezes das larvas, após exposição aos inibidores de proteases, as fezes de cada tratamento foram agrupadas. Depois disso, quatro soluções diferentes foram preparadas em cinco concentrações diferentes. As soluções consistiram de 250, 125, 62,6 e 0 miligramas (Controle) de fezes misturadas com 1 mL de água destilada ajustada para pH 3 com HCl para evitar a autoproteólise nas amostras. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min e o sobrenadante foi recuperado como extrato de fezes. A inibição da protease foi avaliada pela adição de 70µL de extrato de fezes em 120 µL de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 solução tamponada contendo 20 mM de CaCl₂ e $4,7 \times 10^{-5}$ M de tripsina bovina (T1426, Sigma-Aldrich®) e incubando em temperatura ambiente por 5 minutos. Após o período de incubação, 50 µL de substrato L-BApNA 1,2 mM (B4875, Sigma-Aldrich®) foram adicionados e o aumento na absorbância da solução devido à ação das tripsinas avaliada em SpectraMax ABS Plus® a 410 nm durante 2 min. A inibição

percentual foi calculada dividindo as Absorbância dos tratamentos pela absorbância do controle enzimático (ou seja, incubação com 70 μ L de água destilada pH 3 em vez de extratos de fezes). Os efeitos na inibição da tripsina para cada concentração foram analisados em triplicata (n=3).

A mesma abordagem foi feita para confirmar a capacidade de extratos de dieta artificial para inibir tripsinas in vitro após a adição dos inibidores de protease. Neste caso, as soluções consistiram em 500, 250, 125, 67,5 e 0 miligramas (Controle) de dieta artificial, misturadas com 1 mL de água ajustada para pH 3.

2.5. Atividade proteolítica nos extratos de intestino médio após 24h de exposição

Para cada tratamento, 10 insetos foram mantidos se alimentando das dietas preparadas para cada tratamento. Seus intestinos médios foram dissecados e agrupados em pares para avaliar a atividade proteolítica (ou seja, tripsinas, quimotripsinas e proteases totais), totalizando 5 repetições. Os intestinos médios foram triturados mecanicamente com auxílio de pistilo e nitrogênio líquido. Para cada amostra (ou seja, dois intestinos médios, uma repetição) 500 μ L de água destilada pH 3 foram adicionados e centrifugados por 30 min a 10.000 g. O sobrenadante foi recolhido e analisado no mesmo dia.

Para a atividade de tripsinas, 10 μ L do extrato foi adicionado em 70 μ L de Tris-HCl 50 mM, solução tampão pH 8,0 com 20 mM de CaCl₂ e 50 μ L do substrato L-BApNA a 1,2 mM. A absorbância foi medida a 410 nm por 2 min. Para a atividade de quimotripsina, 10 μ L do extrato foi adicionado em 70 μ L de Tris-HCl pH 8,5 com 20% de DMSO (v/v) e 50 μ L de L-BTpNA (B6760, Sigma-Aldrich®). A absorbância também foi medida a 410 nm por 2 min. A atividade proteolítica total foi avaliada usando Azocaseína na concentração final de 0,5% (p/v) como substrato em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo CaCl₂ 20 mM, a 37 °C. A mistura de reação consistiu em 80 μ L do substrato e 60 μ L de extrato enzimático. Após 30 min de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 240 μ L de ácido tricloroacético a 10% (p/v). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vórtex, mantidas em gelo por 15 min, centrifugadas a 8.000 g por 5 min a 25°C para remoção do precipitado. Uma alíquota de 240 μ L do sobrenadante foi transferida para microtubos contendo 280 μ L

de NaOH 1 M. A absorvância foi medida a 440 nm. Em seguida, a absorvância foi obtida no comprimento de onda de 440 nm.

Todas as atividades proteolíticas medidas foram divididas pela absorvância do teor de proteína total das amostras para obter atividades específicas. A proteína total foi determinada através do ensaio de Bradford a 595 nm usando diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA) para estabelecer a curva padrão (TOMARELLI; CHARNEY; HARDING, 1949).

2.6. Perfil proteico dos extratos de intestino médio de lagartas expostas 24h aos inibidores

Quinze microgramas de proteína total de cada uma das três réplicas biológicas (n = 3) foram carregados em um gel de eletroforese SDSPAGE a 12%. O perfil de banda foi analisado através de análise de densitometria de pixel (software ImageLab) comparando os grupos controle com os grupos expostos aos inibidores de protease SKTI e BPTI.

2.7. Processamento proteolítico de BPTI e SKTI por extratos do intestino médio de lagartas expostas 24h aos inibidores

Para avaliar se as proteases de larvas de *A. gemmatalis* alteram sua capacidade de digerir os inibidores de protease após 24 h de alimentação em dietas que os contêm, incubamos 3 µg de proteínas MJ de cada tratamento com 0,3 µg de BPTI ou SKTI solubilizado em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 com CaCl₂ 20 mM, durante 2 h. Após o período de incubação, essas amostras misturadas com BPTI e SKTI foram carregadas em SDS-PAGE 14% e 12%, respectivamente. As amostras foram passadas pelo gel usando um sistema de eletroforese Mini-protean II – Biorad, seguindo as instruções do fabricante.

2.8. Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier de larvas de *A. gemmatalis* expostas a BPTI e SKTI

Por tratamento, 25 larvas de *A. gemmatalis* foram individualizadas em recipientes plásticos (5 x 5 cm), 5 dias após a eclosão dos ovos. Os tratamentos consistiram em (a) dieta artificial sem inibidor de protease (dieta controle); (b) dieta artificial contendo BPTI (0,3 mM) e; (c) dieta artificial contendo SKTI (0,3 mM). As dietas artificiais foram preparadas da mesma forma mencionada acima, na seção 2.3

deste manuscrito. Os insetos foram expostos a dietas artificiais contendo inibidores de protease durante quatro dias após o início do experimento. Após isso, todas as larvas, independente do tratamento, foram mantidas alimentando-se em dieta controle até a fase de pupa. A sobrevivência larval foi analisada diariamente por meio de estimulação mecânica com pinças ou pincéis. Os dados de sobrevivência foram submetidos ao estimador de Kaplan-Meier e as funções obtidas de cada tratamento foram comparadas pelo teste Log-rank. Além disso, os pesos após a pupação foram registrados e analisados por ANOVA seguido do teste de Tukey.

3. RESULTADOS

3.1. Abordagem *in silico*: interação inibidores-tripsinas *A. gemmatalis*

Para o sistema BPTI-tripsina, foi determinado por docking molecular e simulações dinâmicas que a interação entre BPTI e tripsinas de *A. gemmatalis* é mediada por um único sítio reativo no inibidor. Os resíduos de aminoácidos que fazem parte deste sítio reativo são Tyr, Gly, Gly, Cys, Arg e Ala (YGGCRA), partindo da posição 35 a 40. As análises de *docking* apontaram que o inibidor bloqueia o sítio S1 da tripsina, caracterizada pela presença da tríade catalítica His70, Asp107 e Ser214 (Fig. 1).

A validação da ligação da proteína inibidora à tripsina de *A. gemmatalis* foi realizada por docking molecular utilizando Cluspro seguido de simulação dinâmica. O docking mostrou que o BPTI possui baixas energias, variando entre -831,5 e -1086,2 (Tabela 1), e a dinâmica confirmou o sítio de ligação do BPTI à tripsina (Fig. 1).

O perfil farmacofórico foi realizado após docking e simulação de dinâmica molecular. As ligações determinadas pelo perfil farmacofórico estiveram presentes entre o sítio reativo do inibidor e resíduos de aminoácidos próximos à tríade catalítica das enzimas receptoras, como Cys63, Asn173, Arg174, Thr251 e Cys255 (Fig. 1). Dois tipos de interações foram registrados entre o sítio reativo e os resíduos de aminoácidos do receptor, ligação de hidrogênio convencional e alquila. Essas interações são as que mais estabilizam a formação do complexo BPTI-Tripsina conforme determinado pelo docking e na análise temporal por simulações dinâmicas.

Para o sistema SKTI-tripsina, foi determinado por docking molecular e simulações dinâmicas que a interação entre SKTI e tripsinas de *A. gemmatalis* é mediada por duas alças que bloqueiam o sítio ativo da enzima. A visão detalhada na figura mostra apenas a alça mais próxima da enzima, que contribui mais para o bloqueio do sítio ativo (Fig. 2). Essa alça é composta pelos resíduos de aminoácidos Val, Ile, Met, Leu, Cys, Val, Gly e Ile (VIMLCVGI), começando da posição 82 a 88 (Fig. 2).

O docking mostrou que o SKTI possui baixas energias variando entre -953,1 e -1057,6 (Tabela 1) e que a dinâmica confirmou o sítio de ligação de SKTI à tripsina (Fig. 2). O teste t de Student não mostrou diferenças significativas ($P = 0,0765$) entre as energias mais baixas dos complexos BPTI-tripsina e SKTI-tripsina.

As ligações determinadas pelo perfil farmacofórico foram encontradas entre o sítio reativo do inibidor e resíduos de aminoácidos da tríade catalítica nas enzimas do receptor, como Hys71 e Asp161 (tríade catalítica) e próximo a esses resíduos, como Trp53, Arg55, Cys56, Ser164 etc (Fig. 2). Quatro tipos de interações foram registrados entre o sítio reativo e os resíduos de aminoácidos do receptor, ligação de hidrogênio convencional, alquil, Pi-cation e Sulfur-X. Essas interações são as que mais estabilizam a formação do complexo SKTI-Tripsina conforme determinado pelo docking e na análise temporal por simulações dinâmicas.

3.2. Parâmetros cinéticos dos inibidores BPTI e SKTI em relação à tripsinas-like de *A. gemmatalis*

As curvas de Lineweaver-Burk para BPTI e SKTI foram maiores que as do controle (sem inibidor) (Fig. 3B e 3D). Os valores de K_i foram de 0,50 μM e 0,85 μM para inibidor de BPTI e SKTI, respectivamente. Esses resultados cinéticos mostraram que ambos os inibidores são competitivos demonstrados pelo alto R^2 (BPTI ($R^2=0,926$) e SKTI (0,911)). Valores obtido ao ajustar os dados em um modelo de inibição competitiva (Fig. 3).

3.3. Verificação da inibição da tripsina por dieta artificial misturada com IPs

Extratos da dieta com IPs (ou seja, BPTI e SKTI) resultaram em inibição de tripsina de até 40% nas duas concentrações mais baixas, chegando a 70% nas três últimas concentrações (Fig. 4). O extrato da dieta controle atingiram cerca de 20% de inibição na maior concentração (Fig. 4), possivelmente devido aos IPs já presentes nos ingredientes da dieta, que contém proteínas de soja. Esses resultados mostram que o preparo das dietas mistas foi bem feito e, portanto, podem exercer inibição sobre as tripsinas de *A. gemmatalis*.

3.4. Atividades de proteases *in vivo*

A atividade da tripsina foi fortemente reduzida após 24h de exposição das larvas de *A. gemmatalis* ao BPTI. As larvas expostas ao SKTI apresentaram atividades semelhantes ao grupo controle (Fig. 5A). A ingestão de IPs pelos insetos não alterou a atividade das quimotripsinas (Fig. 5B). No entanto, não mostra exatamente que as quimotripsinas não tenham efeito sobre o mecanismo adaptativo de *A. gemmatalis*,

pois a expressão de outras isoformas de quimotripsinas pode ter sido alterada. Como esperado, desde que as enzimas tripsina-like contribuem com a maior parte da proteólise total de *A. gemmatalis*, o padrão de atividade das tripsinas espelha o da atividade proteolítica total (Fig 5C).

3.5. Parâmetros de digestibilidade de larvas de *A. gemmatalis* expostas aos inibidores de proteases.

O ganho de peso larval durante 24 h não diferiu entre as larvas expostas ou não ao BPTI e SKTI (Figura 6A). O consumo de dieta foi semelhante entre as larvas que se alimentaram das dietas controle e BPTI. No entanto, as larvas expostas ao SKTI aumentaram ligeiramente o consumo de dieta em relação às demais (Figura 6B). A produção de fezes foi menor nas larvas que se alimentaram com dietas BPTI (Figura 6C). Além disso, as larvas expostas ao BPTI também apresentaram a maior digestibilidade aproximada (AD) (Figura 6D).

3.6. Verificação da clivagem de PIs por extrato do intestino médio após exposição a BPTI e SKTI através de SDS-PAGE

Quando o extrato de larvas expostas ao SKTI foi incubado com a proteína purificada, ocorreu degradação das moléculas. É mostrado pela densidade de cor reduzida da banda na faixa S. No entanto, quando o SKTI purificado foi incubado com extrato das larvas expostas ao BPTI e controle, não ocorreu a digestão proteolítica (Figura 7A). Por outro lado, quando o extrato das larvas expostas a qualquer uma das dietas foi incubado com BPTI purificado, não foi detectada degradação (Figura 7B).

3.7. Inibição das tripsinas-like por extratos de fezes de *A. gemmatalis* expostas aos inibidores

A porcentagem de inibição exercida sobre tripsinas por pelo menos uma concentração de extrato de fezes contendo IPs indica que parte dessas moléculas ainda está ativa após passar pelo lúmen do intestino médio de *A. gemmatalis* (Figura 8).

3.8. Análise de densitometria de gel carregado com extrato do intestino médio de larvas expostas aos inibidores

Os extratos de larvas expostas às dietas controle, BPTI e SKTI foram carregados em gel de página SDS 12% para verificar a abundância de bandas em peso molecular de proteases comuns presentes no intestino médio de *A. gemmatalis* e outros lepidópteros (Fig. 9 e Fig. 10). A densidade de pixels nas bandas de gel variando de 20-30,1 kDa aumentou nas pistas carregadas com amostras de insetos alimentados com SKTI quando comparados aos perfis do grupo controle. Por outro lado, as pistas carregadas com amostras alimentadas com BPTI não apresentaram aumento na densidade de pixels quando comparadas ao grupo controle. Para proteína variando de 30,1-45 kDa, as pistas carregadas com amostras alimentadas com BPTI e alimentadas com SKTI não mostraram diferença do grupo controle.

3.9. Análise de sobrevivência de Kaplan-Meier para *A. gemmatalis* expostas a BPTI e SKTI

O gráfico de sobrevivência para larvas de *A. gemmatalis* criadas em dieta contendo inibidor de proteínas BPTI e SKTI em uma concentração de 0.3 mM é mostrado na Fig. 11. As curvas de sobrevivência obtidas usando estimadores de Kaplan-Meier indicaram diferenças significativas na sobrevivência entre as larvas expostas aos diferentes inibidores (Log-Rank $X^2=7,009$; $df = 2$; $P= 0,03$) (Fig. 11A). A maior mortalidade alcançada foi de 40% pelo inibidor SKTI (Fig. 11A).

Os pesos após a pupação foram registrados e analisados por ANOVA seguido do teste de Tukey (Fig. 11B) e foram encontradas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre o peso das larvas alimentadas com BPTI e os demais tratamentos, indicando foi mais afetada por este inibidor (Fig. 11B).

4. DISCUSSÃO

Aprotinina ou inibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) é um inibidor de serino protease de amplo espectro com um peso molecular de 6512 Da que foi isolado pela primeira vez da glândula parotis de vaca e pâncreas na década de 1930 (MOCZYDLOWSKI; MOSS; LUCCHESI, 1992). O BPTI é utilizado para modular respostas inflamatórias e prevenir perda sanguínea, fibrinólise e ação da trombina em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca (ROBINSON; BLISS, 2002) e atualmente ganhou fama como possível opção de tratamento para vírus influenza e coronavírus em humanos (BOJKOVA et al., 2020; ZHIRNOV; KLENK; WRIGHT, 2011). No manejo de pragas, o BPTI inibiu parcialmente a atividade de extratos brutos de proteases do intestino médio de *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera) (OPPERT; MORGAN; KRAMER, 2011) e *A. gemmatalis*, em que foi demonstrada uma redução notável nas atividades dos extratos do intestino médio (OLIVEIRA et al., 2005). Aqui, usamos várias abordagens para analisar a interação entre o inibidor de BPTI não hospedeiro e tripsinas de *A. gemmatalis*, comparando com o inibidor SKTI da planta hospedeira. Além disso, ensaios biológicos de curto e longo prazo foram estabelecidos para avaliar o efeito dos IPs em parâmetros de importância biológica para o inseto. Demonstramos que BPTI se liga ao sítio ativo de enzimas semelhantes a tripsina com menos interações do que SKTI, mas ainda com a mesma energia de alta afinidade. Esses resultados demonstram a alta eficiência do BPTI, possivelmente devido ao seu *scaffold* menor que o SKTI e interações específicas mais fortes, sendo um candidato promissor para ser usado como uma molécula biorracional ou como linha de base para o projeto de novos inibidores de tripsina. Além disso, as análises *in vitro* confirmaram a capacidade do BPTI de se ligar e inibir as tripsinas de *A. gemmatalis* em um mecanismo de inibição competitiva, apresentando uma constante inibitória (K_i) ligeiramente inferior ao SKTI.

No nível estrutural, quando se analisa a interação proteína-proteína (PPI) e especificamente a região de interface, ou seja, a superfície de contato quando se forma o complexo proteína-proteína, certas cadeias laterais proteicas contribuem principalmente para a energia de Gibbs da ligação proteína-proteína. Esses resíduos chamados de hot-spots geralmente se sobrepõem a regiões estruturalmente conservadas e representam uma característica comum das interfaces PPI (GEPPERT et al., 2011; MOREIRA; FERNANDES; RAMOS, 2007). Em nosso estudo, as

interfaces entre tripsina-BPTI e tripsina-SKTI foram analisadas por docking e simulações de dinâmica molecular. Quatro tipos de interações foram registrados entre o sítio reativo de SKTI e os resíduos de aminoácidos do receptor, ligação de hidrogênio convencional, alquil, Pi-cation e Sulfur-X; essas interações e o número de resíduos de aminoácidos participantes foram maiores em comparação com BPTI-tripsina. Isso pode ser possível porque o BPTI é uma das menores proteínas globulares (Dittrich & Kanchanawarin, 2008), e o bloco de construção do peptídeo que se liga ao sítio ativo da tripsina de *A. gemmatalis* é menor (Tyr, Gly, Gly, Cys, Arg e Ala : Y-G-G-C-R-A). No entanto, como observado nos resultados, esse número menor de interações é suficiente para igualar a afinidade do SKTI, uma proteína inibidora de massa maior com um número maior de interações com tripsina do que BPTI.

As sequências que se ligam às tripsinas de *A. gemmatalis* fazem parte de uma alça única (BPTI) ou duas alças (SKTI), estabilizadas por ligações de hidrogênio ou hidrofóbicas, conforme demonstrado no perfil farmacofórico após dinâmica molecular. Essas alças são comuns em inibidores de protease e são chamadas de RCL (Reactive Center Loops) e medeiam as interações entre BPTI e SKTI com tripsinas de *A. gemmatalis* (SWEDBERG et al., 2011). A análise de energia via docking e experimentos de dinâmica molecular destacou este segmento de alta afinidade no BPTI (Y-G-G-C-R-A), onde cada um dos resíduos de aminoácidos teve uma contribuição energética diferente na formação do complexo, entrando no conceito de hot-spots (KIMURA et al., 2001; MACALINO et al., 2018) para o complexo BPTI-tripsina e candidatos a peptídeos inibitórios, ou pelo menos pistas promissoras para projetar pequenas moléculas e peptídeos inibitórios com maior afinidade, estabilidade e biodisponibilidade.

O BPTI tem uma especificidade relativamente ampla, inibindo tripsinas, quimotripsina e serina proteases do tipo elastase. O BPTI reage rapidamente com serino proteases para formar complexos estáveis, mas a formação do complexo enzima inibidor pode envolver vários intermediários correspondentes a etapas discretas da reação (ASCENZI et al., 2003); na praga *A. gemmatalis*, o inibidor mamífero BPTI não inibiu a atividade da quimotripsina, apenas as tripsinas apresentaram 70% de redução em sua atividade. Este resultado possivelmente pode ser explicado pela expressão de quimotripsinas que apresentam características moleculares neste inserto que contribuem para a resistência a BPTI e SKTI. Sabe-se que os insetos produzem tripsinas e quimotripsinas resistentes à IPs em resposta ao

consumo destes (DUNSE et al., 2010; KATOCH, 2020; VOLPICELLA et al., 2006), e pode ser uma forma de suprimir as necessidades de proteólise e obtenção de aminoácidos livres.

É bem conhecido que o grau de utilização dos alimentos depende da digestibilidade destes e da eficiência com que os alimentos digeridos são convertidos em biomassa (FATHIPOUR et al., 2019). A exposição de larvas de *A. gemmatalis* aos inibidores também afetou os parâmetros dietéticos, onde observou-se redução no consumo de dieta artificial e aumento de fezes em insetos expostos ao BPTI; além disso, a digestibilidade aproximada (AD) foi maior quando alimentados com dieta contendo BPTI. Esse aumento da AD pode ser uma estratégia para mitigar os efeitos inibitórios do BPTI sobre as tripsinas e a atividade das proteases totais, bem como a redução do consumo alimentar. Tem sido relatado em outras espécies de Lepidoptera que o aumento da AD geralmente pode ser gerado para compensar outros efeitos negativos nos parâmetros alimentares, levando a uma redução no crescimento do inseto (HEMATI et al., 2012).

No ensaio de atividade inibitória utilizando SKTI e BPTI coletados de fezes, identificamos que uma parte dos inibidores é eliminada nas fezes, demonstrada pela redução da atividade da tripsina quando a concentração de fezes aumenta no extrato. O SKTI é o que está sendo mais excretado, pois o BPTI possui um K_i menor (sendo necessárias menos moléculas para inibir a mesma quantidade de atividade) do que a proteína vegetal e atinge uma redução semelhante na atividade das tripsinas apenas na concentração mais alta nas fezes. O aumento da capacidade inibitória das fezes de insetos lepidópteros expostos a inibidores de protease também foi observado para outros inibidores de proteínas, como o inibidor de tripsina *Inga laurina* (ILTI) (MACHADO et al., 2017); o resultado também demonstra a alta estabilidade dos inibidores avaliados, que mesmo após passarem pelo trato digestivo do inseto, ainda mantêm parte de sua estabilidade e capacidade de inibir tripsinas.

Os mecanismos adaptativos de insetos aos IPs de plantas geralmente incluem três estratégias principais: superprodução de enzimas digestivas existentes, síntese de isoformas de proteases insensíveis a inibidores e ativação de proteases específicas que desintoxicam os IPs por clivagem proteolítica (AHN et al., 2004; MACHADO et al., 2017; ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015). A análise de densitometria das bandas de gel mostrou um aumento de proteínas variando de 20,1 a 30 kDa, nas quais as isoformas serino proteases de muitos insetos lepidópteros são

predominantemente encontradas (ALMEIDA BARROS et al., 2021; BERNARDI et al., 1996; HEGEDUS et al., 2003; MERIÑO-CABRERA et al., 2020). Um padrão semelhante não foi observado na análise densitométrica desses extratos de intestino médio obtidos de larvas expostas ao BPTI, acendendo uma luz na hipótese de que apenas o SKTI estimula esse mecanismo adaptativo relativamente bem descrito em relação à exposição de IPs de plantas (ou seja, superprodução de enzimas digestivas) (SINGH et al., 2020). Além disso, verificamos a capacidade do extrato extraído dos insetos que se alimentaram 24 h em dietas contendo ou não inibidores de protease em digerir as proteínas BPTI e SKTI purificadas. O fato de que apenas os extratos de larvas expostas ao SKTI digeriram o inibidor de protease no ensaio de digestão indica que após 24 h de exposição, enzimas proteolíticas que são potenciais desintoxicantes podem estar especificamente presentes apenas quando *A. gemmatalis* ingere o inibidor de seu hospedeiro (ou seja, SKTI). Um fenômeno semelhante foi observado para *Plutella xylostella* degradando especificamente o inibidor de tripsina da planta hospedeira MTI2 e não o inibidor de tripsina não hospedeiro SKTI, quando o extrato do intestino foi incubado com ambos os inibidores de protease durante 3 h (YANG et al., 2009). Inferimos dos resultados de densitometria e processamento de digestão que SKTI estimula mais os mecanismos adaptativos do que BPTI, possivelmente devido à origem do BPTI e falta de relação evolutiva entre a praga *A. gemmatalis* e este inibidor de mamífero. A falta de relação evolutiva pode ser considerada uma vantagem para o uso do BPTI no manejo integrado de pragas e no projeto de novas moléculas de bioinseticidas.

A curva de Kaplan-Meier mostrou que os insetos expostos a ambos, SKTI e BPTI, apresentaram sobrevivência reduzida quando comparados ao grupo controle. Esperávamos uma maior supressão da sobrevivência em larvas expostas a BPTI do que em larvas expostas a SKTI, desde que, ao contrário do inibidor da planta hospedeira, o inibidor de proteína não hospedeira exerce uma forte redução na atividade da tripsina, mostrando menos sinais de adaptação proteolítica mecanismos. Isso indica que o efeito sobre a sobrevivência dos inibidores de protease não depende apenas da capacidade da molécula de reduzir a atividade proteolítica, uma vez que, embora a SKTI não tenha reduzido a atividade proteolítica total, exerceu impactos semelhantes na sobrevivência larval. Além de mediar diretamente a expressão de enzimas proteolíticas digestivas para compensar os efeitos da inibição proteolítica, sabe-se que os inibidores de proteases afetam outras partes do metabolismo, como o

metabolismo de carboidratos e o sistema imunológico, podendo eventualmente causar a morte do inseto (KUWAR et al., 2015). No entanto, embora o SKTI tenha apresentado impactos na sobrevivência semelhantes ao inibidor não hospedeiro, apenas o BPTI exerceu efeitos negativos sobre o peso pupal. O menor peso pupal pode ser um reflexo dos efeitos do BPTI na incorporação de proteína no tecido do inseto, o que pode afetar o desenvolvimento de insetos adultos, sendo uma possível vantagem em relação ao SKTI quanto ao seu uso no manejo integrado de pragas (BOND et al., 2017).

O estudo analisou *in silico*, *in vitro* e *in vivo* aborda a viabilidade do uso da proteína inibitória extraída de mamíferos (BPTI) como potencial inibidor de tripsinas digestivas de *A. gemmatalis*, comparando os resultados com os do inibidor vegetal SKTI. Aqui, demonstramos que tanto o BPTI quanto o SKTI são inibidores competitivos que se ligam ao sítio ativo da enzima com alta afinidade, bloqueando a entrada do substrato através de ligações hidrofóbicas e hidrofóbicas, como interações alquila. *A. gemmatalis* apresentou mecanismos menos adaptativos quando expostos ao BPTI, possivelmente devido à origem do BPTI e à falta de relação evolutiva com as tripsinas do inseto. A sobrevivência de larvas expostas a SKTI e BPTI é igualmente reduzida, mas o inibidor não hospedeiro causa um efeito negativo adicional no peso das pupas, o que pode prejudicar a viabilidade dos adultos. Coletivamente, mostramos que o BPTI apresenta características interessantes que o tornam um candidato promissor para uso no manejo de pragas de lepidópteros ou como informação de base para projetar racionalmente novos inibidores menores com propriedades inseticidas.

5. REFERÊNCIAS

- A. GATEHOUSE, John. Prospects for Using Proteinase Inhibitors to Protect Transgenic Plants Against Attack by Herbivorous Insects. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 409–416, 2011. DOI: 10.2174/138920311796391142.
- A. JONGSMA, Maarten; BEEKWILDER, Jules. Co-Evolution of Insect Proteases and Plant Protease Inhibitors. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 437–447, 2011. DOI: 10.2174/138920311796391115.
- AHN, J. E.; SALZMAN, R. A.; BRAUNAGEL, S. C.; KOIWA, H.; ZHU-SALZMAN, K. Functional roles of specific bruchid protease isoforms in adaptation to a soybean protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, v. 13, n. 6, p. 649–657, 2004. DOI: 10.1111/j.0962-1075.2004.00523.x.
- ALMEIDA BARROS, Rafael; MERIÑO-CABRERA, Yaremis; VITAL, Camilo E.; SILVA JÚNIOR, Neilier R.; OLIVEIRA, Cauê N.; LESSA BARBOSA, Samuel; MARQUES GONÇALVES ASSIS, João V; RAMOS, Humberto JO; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Small peptides inhibit gut trypsin-like proteases and impair *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) survival and development. **Pest Management Science**, v. 77, n. 4, p. 1714–1723, 2021. DOI: 10.1002/ps.6191.
- AMBADAPADI, Sriram et al. Reactive Center Loop (RCL) Peptides Derived from Serpins Display Independent Coagulation and Immune Modulating Activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 6, p. 2874–2887, 2016. DOI: 10.1074/jbc.M115.704841.
- APOSTOLOPOULOS, Vasso et al. A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 430, 2021. DOI: 10.3390/molecules26020430.
- ARTHUR, David Ebuka; UZAIRU, Adamu. Molecular docking studies on the interaction of NCI anticancer analogues with human Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit. **Journal of King Saud University - Science**, v. 31, n. 4, p. 1151–1166, 2019. DOI: 10.1016/j.jksus.2019.01.011.
- ASCENZI, Paolo; BOCEDI, Alessio; BOLOGNESI, Martino; SPALLAROSSA, Andrea; COLETTA, Massimo; CRISTOFARO, Raimondo; MENEGATTI, Enea. The Bovine Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor (Kunitz Inhibitor): A Milestone Protein. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, n. 3, p. 231–251, 2003. DOI: 10.2174/1389203033487180.
- BALE, J. S.; VAN LENTEREN, J. C.; BIGLER, F. Biological control and sustainable food production. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1492, p. 761–776, 2008. DOI: 10.1098/rstb.2007.2182.
- BENNETT-GUERRERO, Elliott; SONG, Howard K.; ZHAO, Yue; FERGUSON, T. B.; GAMMIE, James S.; PETERSON, Eric D.; O'BRIEN, Sean M. Temporal Changes in the Use of Blood Products for Coronary Artery Bypass Graft Surgery in North America: An Analysis of the Society of Thoracic Surgeons

- Adult Cardiac Database. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 24, n. 5, p. 814–816, 2010. DOI: 10.1053/j.jvca.2010.06.003.
- BERGVINSON, David; GARCÍA-LARA, Silverio. Genetic approaches to reducing losses of stored grain to insects and diseases. **Current Opinion in Plant Biology**, 2004. DOI: 10.1016/j.pbi.2004.05.001.
- BERNARDI, Roberta; TEDESCHI, Gabriella; RONCHI, Severino; PALMIERI, Sandro. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like enzyme from larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hu"bner (Lepidoptera: pyralidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 8–9, p. 883–889, 1996. DOI: 10.1016/S0965-1748(96)00057-4.
- BEZERRA, César da Silva; OLIVEIRA, Carolina Turatti; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. Inga vera trypsin inhibitor interferes in the proteolytic activity and nutritional physiology of *Ephestia kuehniella* larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 2017. DOI: 10.1111/eea.12605.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistics Notes: Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). **BMJ**, v. 317, n. 7172, p. 1572–1580, 1998. DOI: 10.1136/bmj.317.7172.1572.
- BOJKOVA, Denisa et al. Aprotinin Inhibits SARS-CoV-2 Replication. **Cells**, v. 9, n. 11, p. 2377, 2020. DOI: 10.3390/cells9112377.
- BOLDT, P. E.; BIEVER, K. D.; IGNOFFO, C. M. Lepidopteran Pests of Soybeans: Consumption of Soybean Foliage and Pods and Development Time. **Journal of Economic Entomology**, v. 68, n. 4, p. 480–482, 1975. DOI: 10.1093/jee/68.4.480.
- BOND, J. G.; RAMÍREZ-OSORIO, A.; MARINA, C. F.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; LIEDO, P.; DOR, A.; WILLIAMS, T. Efficiency of two larval diets for mass-rearing of the mosquito *Aedes aegypti*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187420, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0187420.
- BORJIGIN, J.; NATHANS, J. Bovine pancreatic trypsin inhibitor-trypsin complex as a detection system for recombinant proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 1, p. 337–341, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.1.337.
- BRAGA, Anna Rafaela Cavalcante; DE ROSSO, Veridiana Vera; HARAYASHIKI, Cyntia Ayumi Yokota; JIMENEZ, Paula Christine; CASTRO, Ítalo Braga. Global health risks from pesticide use in Brazil. **Nature Food**, v. 1, n. 6, p. 312–314, 2020. DOI: 10.1038/s43016-020-0100-3.
- BREUGELMANS, Bert; SIMONET, Gert; VAN HOEF, Vincent; VAN SOEST, Sofie; VANDEN BROECK, Jozef. Pacifastin-related peptides: Structural and functional characteristics of a family of serine peptidase inhibitors. **Peptides**, v. 30, n. 3, p. 622–632, 2009. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.07.026.
- BROADWAY, Roxanne M.; DUFFEY, Sean S.; PEARCE, Gregory; RYAN, Clarence A. Plant Proteinase inhibitors: A defense against herbivorous insects? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 41, n. 1, p. 33–38, 1986. DOI: 10.1111/j.1570-7458.1986.tb02168.x.

- BUENO, A. F.; PANIZZI, A. R.; HUNT, T. E.; DOURADO, P. M.; PITTA, R. M.; GONÇALVES, J. Challenges for Adoption of Integrated Pest Management (IPM): the Soybean Example. **Neotropical Entomology**, v. 50, n. 1, p. 5–20, 2021. DOI: 10.1007/s13744-020-00792-9.
- CARNEIRO, Eliane; SILVA, Luciana Barboza; SILVA, Alexandre Faria Da; LOPES, Gleidyane Novais; PAVAN, Bruno Ettore; RODRIGUES, Raimundo Henrique Ferreira; CARVALHINHO, Diego Tavares; MIELEZRSKI, Diego Fabio. Lepidopteran pests associated with the soybean cultivars phenology. **Bioscience Journal**, p. 112–121, 2018. DOI: 10.14393/BJ-v34n1a2018-37172.
- CASIDA, John E.; QUISTAD, Gary B. Golden age of insecticide research: Past, present, or future? **Annual Review of Entomology**, 1998. DOI: 10.1146/annurev.ento.43.1.1.
- CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; GRANT, W. P.; GREAVES, J.; TATCHELL, G. M. Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability. **Trends in Food Science and Technology**, 2008. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.12.009.
- CHRISTELLER, J. T.; LAING, W. A.; MARKWICK, N. P.; BURGESS, E. P. J. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: Dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, n. 7, p. 735–746, 1992. DOI: 10.1016/0965-1748(92)90052-G.
- CIEMNY, Maciej; KURCINSKI, Mateusz; KAMEL, Karol; KOLINSKI, Andrzej; ALAM, Nawsad; SCHUELER-FURMAN, Ora; KMIECIK, Sebastian. Protein–peptide docking: opportunities and challenges. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 8, p. 1530–1537, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.05.006>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644617305937>.
- COMEAU, S. R.; GATCHELL, D. W.; VAJDA, S.; CAMACHO, C. J. ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server, p. W96–W99, 2004. DOI: 10.1093/nar/gkh354.
- COPELAND, Robert A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. [s.l.] : Wiley, 2013. DOI: 10.1002/9781118540398.
- CRUZ, Ana C. B. et al. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from *Catanduva (Piptadenia moniliformis)* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 61–68, 2013. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.04.023.
- DANTZGER, Miriam; VASCONCELOS, Ilka Maria; SCORSATO, Valéria; APARICIO, Ricardo; MARANGONI, Sergio; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. Bowman–Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical properties and insecticidal potential. **Phytochemistry**, v. 118, p. 224–235, 2015. DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.08.013.
- DASTRANJ, M.; BORZOU, E.; BANDANI, A. R.; FRANCO, O. L. Inhibitory effects of an extract from non-host plants on physiological characteristics of two major cabbage pests. **Bulletin of Entomological Research**, v. 108, n. 3, p. 370–379, 2018. DOI: 10.1017/S0007485317000864.
- DAVIS, Rick; WHITTINGTON, Ruth. Aprotinin. **Drugs**, v. 49, n. 6, p. 954–983, 1995. DOI: 10.2165/00003495-199549060-00008.

- DE OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho; DE PAULA SOUZA, Thaís; PARRA, José Roberto Postali; MARANGONI, Sergio; DE CASTRO SILVA-FILHO, Marcio; MACEDO, Maria Ligia Rodrigues. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, 2013. DOI: 10.1016/j.cbpb.2013.02.008.
- DÍAZ, Katy; ESPINOZA, Luis; CARVAJAL, Rodrigo; CONDE-GONZÁLEZ, Marcos; NIEBLA, Vladimir; OLEA, Andrés F.; COLL, Yamilet. Biological Activities and Molecular Docking of Brassinosteroids 24-Norcholane Type Analogs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1832, 2020. DOI: 10.3390/ijms21051832.
- DO AMARAL, Milena; FREITAS, Ana Camila Oliveira; SANTOS, Ariana Silva; DOS SANTOS, Everton Cruz; FERREIRA, Monaliza Macêdo; DA SILVA GESTEIRA, Abelmon; GRAMACHO, Karina Peres; MARINHO-PRADO, Jeanne Scardini; PIROVANI, Carlos Priminho. TcTI, a Kunitz-type trypsin inhibitor from cocoa associated with defense against pathogens. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 698, 2022. DOI: 10.1038/s41598-021-04700-y.
- DOSA, Stefan; STIRNBERG, Marit; LÜLSendorff, Verena; HÄUSSLER, Daniela; MAURER, Eva; GÜTSCHOW, Michael. Active site mapping of trypsin, thrombin and matriptase-2 by sulfamoyl benzamidines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 21, p. 6489–6505, 2012. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.08.042.
- DUNSE, K. M.; KAAS, Q.; GUARINO, R. F.; BARTON, P. A.; CRAIK, D. J.; ANDERSON, M. A. Molecular basis for the resistance of an insect chymotrypsin to a potato type II proteinase inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 34, p. 15016–15021, 2010. DOI: 10.1073/pnas.1009327107.
- ELLERT-MIKLASZEWSKA, Aleksandra; POLESZAK, Katarzyna; KAMINSKA, Bozena. Short peptides interfering with signaling pathways as new therapeutic tools for cancer treatment. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 199–221, 2017. DOI: 10.4155/fmc-2016-0189.
- ELZEN, Gary W.; HARDEE, Dick D. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on managing insect resistance to insecticides. **Pest Management Science**, 2003. DOI: 10.1002/ps.659.
- ERLANGER, Bernard F.; KOKOWSKY, Nicholas; COHEN, William. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1961. a. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X.
- ERLANGER, Bernard F.; KOKOWSKY, Nicholas; COHEN, William. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, n. 2, p. 271–278, 1961. b. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X.
- FATHIPOUR, Yaghoob; SEDARATIAN, Amin; BAGHERI, Abdoolnabi; TALAEI-HASSANLOUEI, Reza. Increased food utilization indices and decreased proteolytic activity in *Helicoverpa armigera* larvae fed sublethal *Bacillus thuringiensis*-treated diet. **Physiological Entomology**, v. 44, n. 3–4, p. 178–186, 2019. DOI: 10.1111/phen.12288.

- FAUSTINO, Verônica Aparecida et al. Soybean plants under simultaneous signals of drought and *Anticarsia gemmatalis* herbivory trigger gene expression and metabolic pathways reducing larval survival. **Environmental and Experimental Botany**, v. 190, p. 104594, 2021. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2021.104594.
- FIANDRA, L.; CASARTELLI, M.; CERMENATI, G.; BURLINI, N.; GIORDANA, B. The intestinal barrier in lepidopteran larvae: Permeability of the peritrophic membrane and of the midgut epithelium to two biologically active peptides. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 1, p. 10–18, 2009. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2008.09.005.
- FINN, Robert D. et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkv1344.
- GASTEIGER, E. ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3784–3788, 2003. DOI: 10.1093/nar/gkg563.
- GEPPERT, Tim; HOY, Benjamin; WESSLER, Silja; SCHNEIDER, Gisbert. Context-Based Identification of Protein-Protein Interfaces and “Hot-Spot” Residues. **Chemistry & Biology**, v. 18, n. 3, p. 344–353, 2011. DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.01.005.
- GIRARD, Cécile; LE MÉTAYER, Martine; BONADÉ-BOTTINO, Michel; PHAM-DELÈGUE, Minh-Hà; JOUANIN, Lise. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 229–237, 1998. DOI: 10.1016/S0965-1748(98)00027-7.
- GIRI, Ashok P.; HARSULKAR, Abhay M.; DESHPANDE, Vasanti V.; SAINANI, Mohini N.; GUPTA, Vidya S.; RANJEKAR, Prabhakar K. Chickpea Defensive Proteinase Inhibitors Can Be Inactivated by Podborer Gut Proteinases1. **Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 393–401, 1998. DOI: 10.1104/pp.116.1.393.
- GLENNON, Richard A. et al. Binding of O-Alkyl Derivatives of Serotonin at Human 5-HT_{1D}β Receptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 314–322, 1996. DOI: 10.1021/jm950498t.
- GRANDE, Marcela Laiz Mora; RANDO, Jael Simões Santos. Integrated pest control adopted by soybean and corn farmers in Londrina, Paraná state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, n. 0, 2018. DOI: 10.1590/1808-1657000242015.
- GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium123. **Journal of Economic Entomology**, 1976. DOI: 10.1093/jee/69.4.487.
- GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl, p. W270–W277, 2011. DOI: 10.1093/nar/gkr366.
- GROVER, Sheetanshu; KAUR, Satvir; GUPTA, Anil Kumar; TAGGAR, Gaurav Kumar; KAUR, Jagmeet. Characterization of Trypsin Like Protease from *Helicoverpa armigera* (Hubner) and Its Potential Inhibitors. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, v. 88, n. 1, p. 49–56, 2018. DOI: 10.1007/s40011-016-0732-0.

GUO, Peng-Chao; DONG, Zhaoming; ZHAO, Ping; ZHANG, Yan; HE, Huawei; TAN, Xiang; ZHANG, Weiwei; XIA, Qingyou. Structural insights into the unique inhibitory mechanism of the silkworm protease inhibitor serpin18. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11863, 2015. DOI: 10.1038/srep11863.

HAGGAG, Yusuf A. Peptides as Drug Candidates: Limitations and Recent Development Perspectives. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 8, n. 4, 2018. DOI: 10.26717/BJSTR.2018.08.001694.

HANSSON, Tomas; MARELIUS, John; ÅQVIST, Johan. Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, 1998. DOI: 10.1023/A:1007930623000.

HARTL, Markus; GIRI, Ashok P.; KAUR, Harleen; BALDWIN, Ian T. The multiple functions of plant serine protease inhibitors. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 7, p. 1009–1011, 2011. DOI: 10.4161/psb.6.7.15504.

HEDSTROM, Lizbeth. Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501–4524, 2002. DOI: 10.1021/cr000033x.

HEGEDUS, Dwayne; BALDWIN, Doug; O'GRADY, Michael; BRAUN, Lorraine; GLEDDIE, Steve; SHARPE, Andrew; LYDIATE, Derek; ERLANDSON, Martin. Midgut proteases from *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: Characterization, cDNA cloning, and expressed sequence tag analysis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 53, n. 1, p. 30–47, 2003. DOI: 10.1002/arch.10084.

HEMATI, S. A.; NASERI, B.; GANBALANI, G. Nouri; DASTJERDI, H. Rafiee; GOLIZADEH, A. Effect of Different Host Plants on Nutritional Indices of the Pod Borer, *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Science**, v. 12, n. 55, p. 1–15, 2012. DOI: 10.1673/031.012.5501.

HERREBOUT, W. A.; SUHM, M. A. Weak hydrogen bonds – strong effects? **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 31, p. 13858, 2011. DOI: 10.1039/c1cp90110a.

HOLTOF, Michiel; LENAERTS, Cynthia; CULLEN, Darron; VANDEN BROECK, Jozef. Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut. **Cell and Tissue Research**, v. 377, n. 3, p. 397–414, 2019. DOI: 10.1007/s00441-019-03031-9.

HORIKOSHI, Renato J. et al. Resistance status of lepidopteran soybean pests following large-scale use of MON 87701 × MON 89788 soybean in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 21323, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-00770-0.

HUANG, Jing; RAUSCHER, Sarah; NAWROCKI, Grzegorz; RAN, Ting; FEIG, Michael; DE GROOT, Bert L.; GRUBMÜLLER, Helmut; MACKERELL, Alexander D. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. **Nature Methods**, v. 14, n. 1, p. 71–73, 2017. DOI: 10.1038/nmeth.4067.

- JADHAV, Abhilash R.; WAR, Abdul R.; NIKAM, Ashwini N.; ADHAV, Anmol S.; GUPTA, Vidya S.; SHARMA, Hari C.; GIRI, Ashok P.; TAMHANE, Vijayanti A. *Capsicum annuum* proteinase inhibitor ingestion negatively impacts the growth of sorghum pest *Chilo partellus* and promotes differential protease expression. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 8, p. 302–309, 2016. DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.09.016.
- JAMAL, Farrukh; PANDEY, Prabhash K.; SINGH, Dushyant; KHAN, M. Y. Serine protease inhibitors in plants: Nature's arsenal crafted for insect predators. **Phytochemistry Reviews**, 2013. DOI: 10.1007/s11101-012-9231-y.
- JANIN, Joël; HENRICK, Kim; MOULT, John; EYCK, Lynn Ten; STERNBERG, Michael J. E.; VAJDA, Sandor; VAKSER, Ilya; WODAK, Shoshana J. CAPRI: A critical assessment of PRedicted interactions. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, 2003. DOI: 10.1002/prot.10381.
- JANKOWSKA, Milena; ROGALSKA, Justyna; WYSZKOWSKA, Joanna; STANKIEWICZ, Maria. Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System—A Review. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 34, 2017. DOI: 10.3390/molecules23010034.
- JUNG, Hyun Ah; ALI, Md Yousof; CHOI, Ran Joo; JEONG, Hyong Oh; CHUNG, Hae Young; CHOI, Jae Sue. Kinetics and molecular docking studies of fucosterol and fucoxanthin, BACE1 inhibitors from brown algae *Undaria pinnatifida* and *Ecklonia stolonifera*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 89, p. 104–111, 2016. DOI: 10.1016/j.fct.2016.01.014.
- KAHLER, Ursula; FUCHS, Julian E.; GOETTIG, Peter; LIEDL, Klaus R. An unexpected switch in peptide binding mode: from simulation to substrate specificity. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2018. DOI: 10.1080/07391102.2017.1407674.
- KALLURE, Gopal S.; KUMARI, Archana; SHINDE, Balkrishna A.; GIRI, Ashok P. Characterized constituents of insect herbivore oral secretions and their influence on the regulation of plant defenses. **Phytochemistry**, v. 193, p. 113008, 2022. DOI: 10.1016/j.phytochem.2021.113008.
- KANT, M. R. et al. Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. **Annals of Botany**, v. 115, n. 7, p. 1015–1051, 2015. DOI: 10.1093/aob/mcv054.
- KASPAR, Allan A.; REICHERT, Janice M. Future directions for peptide therapeutics development. **Drug Discovery Today**, 2013. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.05.011.
- KATOCH, Rajan. Insect Pest Resistance Factors in Rice Bean. *In: Ricebean*. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 233–270. DOI: 10.1007/978-981-15-5293-9_14.
- KELLEY, Lawrence A.; MEZULIS, Stefans; YATES, Christopher M.; WASS, Mark N.; STERNBERG, Michael J. E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.

- KHAN, Hafiz Azhar Ali. Characterization of permethrin resistance in a *Musca domestica* strain: resistance development, cross-resistance potential and realized heritability. **Pest Management Science**, v. 75, n. 11, p. 2969–2974, 2019. DOI: 10.1002/ps.5409.
- KIMURA, S. Roy; BROWER, Richard C.; VAJDA, Sandor; CAMACHO, Carlos J. Dynamical View of the Positions of Key Side Chains in Protein-Protein Recognition. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 2, p. 635–642, 2001. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)76044-4.
- KOIDE, Takehiko; IKENAKA, Tokuji; TSUNASAWA, Susumu. Studies on Soybean Trypsin Inhibitors. 2. Amino-Acid Sequence around the Reactive Site of Soybean Trypsin Inhibitor (Kunitz). **European Journal of Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 408–416, 1973. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb02623.x.
- KORTBEEK, Ruy W. J.; VAN DER GRAGT, Michelle; BLEEKER, Petra M. Endogenous plant metabolites against insects. **European Journal of Plant Pathology**, v. 154, n. 1, p. 67–90, 2019. DOI: 10.1007/s10658-018-1540-6.
- KOZAKOV, Dima; HALL, David R.; XIA, Bing; PORTER, Kathryn A.; PADHORN, Dzmity; YUEH, Christine; BEGLOV, Dmitri; VAJDA, Sandor. The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature Protocols**, v. 12, n. 2, p. 255–278, 2017. DOI: 10.1038/nprot.2016.169.
- KUWAR, Suyog S.; PAUCHET, Yannick; VOGEL, Heiko; HECKEL, David G. Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut of *Helicoverpa armigera* in response to a plant protease inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2015. DOI: 10.1016/j.ibmb.2015.01.016.
- LAND, Henrik; HUMBLE, Maria Svedendahl. YASARA: A tool to obtain structural guidance in biocatalytic investigations. *In: Methods in Molecular Biology*. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1007/978-1-4939-7366-8_4.
- LEE, Andy Chi-Lung; HARRIS, Janelle Louise; KHANNA, Kum Kum; HONG, Ji-Hong. A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2383, 2019. DOI: 10.3390/ijms20102383.
- LEWIS, Sidney D.; NG, Assunta S.; BALDWIN, John J.; FUSETANI, Nobuhiro; NAYLOR, Adel M.; SHAFER, Jules A. Inhibition of thrombin and other trypsin-like serine proteinases by cyclotheonamide A. **Thrombosis Research**, v. 70, n. 2, p. 173–190, 1993. DOI: 10.1016/0049-3848(93)90158-K.
- LIANG, Guyan; PHILLIP BOWEN, J. Development of Trypsin-Like Serine Protease Inhibitors as Therapeutic Agents: Opportunities, Challenges, and their Unique Structure-Based Rationales. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 13, p. 1506–1529, 2016. DOI: 10.2174/1568026615666150915121447.
- LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; MARANA, S. R.; JULIANO, L.; TERRA, W. R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 130–140, 2006. DOI: 10.1016/j.ibmb.2005.11.006.

- MACALINO, Stephani Joy Y.; BASITH, Shaherin; CLAVIO, Nina Abigail B.; CHANG, Hyerim; KANG, Soosung; CHOI, Sun. Evolution of In Silico Strategies for Protein-Protein Interaction Drug Discovery. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1963, 2018. DOI: 10.3390/molecules23081963.
- MACHADO, Eduardo P. et al. Interspecific Variation in Susceptibility to Insecticides by Lepidopteran Pests of Soybean, Cotton, and Maize Crops From Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 2022. DOI: 10.1093/jee/toab265.
- MACHADO, Suzy Wider; DE OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho; ZÉRIO, Neide Graciano; PARRA, José Roberto Postali; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. *Inga laurina* trypsin inhibitor (ILTI) obstructs *Spodoptera frugiperda* trypsins expressed during adaptive mechanisms against plant protease inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 95, n. 4, p. e21393, 2017. DOI: 10.1002/arch.21393.
- MARKUS DITTRICH; CHALERMPOL KANCHANAWARIN. **Case Study: BPTI2008**. p. 1–19.
- MEDIC, Jelena; ATKINSON, Christine; HURBURGH, Charles R. Current Knowledge in Soybean Composition. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 3, p. 363–384, 2014. DOI: 10.1007/s11746-013-2407-9.
- MENDONÇA, Eduardo G.; ALMEIDA BARROS, Rafael; CORDEIRO, Gláucia; SILVA, Carolina R.; CAMPOS, Welligton G.; OLIVEIRA, Joel A.; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Larval development and proteolytic activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to different soybean protease inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 1, 2020. DOI: 10.1002/arch.21637.
- MERIÑO-CABRERA, Yaremis; CASTRO, José Severiche; DE ALMEIDA BARROS, Rafael; DA SILVA JUNIOR, Neilier Rodrigues; DE OLIVEIRA RAMOS, Humberto; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Arginine-containing dipeptides decrease affinity of gut trypsins and compromise soybean pest development. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, p. 105107, 2022. DOI: 10.1016/j.pestbp.2022.105107.
- MERIÑO-CABRERA, Yaremis; OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Inhibition of digestive trypsins by plant Kunitz proteins reduces the viability of *Spodoptera cosmioides* larvae. **Annals of Applied Biology**, v. 175, n. 3, p. 336–349, 2019. a. DOI: 10.1111/aab.12539.
- MERIÑO-CABRERA, Yaremis; OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Inhibition of digestive trypsins by plant Kunitz proteins reduces the viability of *Spodoptera cosmioides* larvae. **Annals of Applied Biology**, v. 175, n. 3, p. 336–349, 2019. b. DOI: 10.1111/aab.12539.
- MERIÑO-CABRERA, Yaremis; SEVERICHE CASTRO, José Gregório; RIOS DIEZ, Juan Diego; RODRIGUES MACEDO, Maria Lígia; DE OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; GORETI DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria. Rational design of mimetic peptides based on the interaction between *Inga laurina* inhibitor and trypsins for *Spodoptera cosmioides* pest control. **Insect Biochemistry and**

Molecular Biology, v. 122, p. 103390, 2020. DOI: 10.1016/j.ibmb.2020.103390.

- MERSKI, Matthew; MOREIRA, Cátia; ABREU, Rui MV; RAMOS, Maria João; FERNANDES, Pedro A.; MARTINS, L. Miguel; PEREIRA, Pedro José Barbosa; MACEDO-RIBEIRO, Sandra. Molecular motion regulates the activity of the Mitochondrial Serine Protease HtrA2. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 10, p. e3119–e3119, 2017. DOI: 10.1038/cddis.2017.487.
- MICHAUD, D.; CANTIN, L.; VRAIN, T. C. Carboxy-Terminal Truncation of Oryzacystatin II by Oryzacytatin-Insensitive Insect Digestive Proteinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 322, n. 2, p. 469–474, 1995. DOI: 10.1006/abbi.1995.1490.
- MIRZAEI, Mahta; MIRDAMADI, Saeed; SAFAVI, Maliheh; SOLEYMANZADEH, Nazila. The stability of antioxidant and ACE-inhibitory peptides as influenced by peptide sequences. **LWT**, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109710.
- MOCZYDLOWSKI, Edward; MOSS, Guy W. J.; LUCCHESI, Kathryn J. Bovine pancreatic trypsin inhibitor as a probe of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels at an internal site of interaction. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 1, p. 21–28, 1992. DOI: 10.1016/0006-2952(92)90656-4.
- MOREIRA, Irina S.; FERNANDES, Pedro A.; RAMOS, Maria J. Hot spots-A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 68, n. 4, p. 803–812, 2007. DOI: 10.1002/prot.21396.
- NAPOLEÃO, Thiago H.; ALBUQUERQUE, Lidiane P.; SANTOS, Nataly DL; NOVA, Isabella CV; LIMA, Thâmarah A.; PAIVA, Patrícia MG; PONTUAL, Emmanuel V. Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. **Pest Management Science**, v. 75, n. 5, p. 1212–1222, 2019. DOI: 10.1002/ps.5233.
- NAUEN, Ralf; STEINBACH, Denise. Resistance to diamide insecticides in lepidopteran pests. *In: Advances in Insect Control and Resistance Management*. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1007/978-3-319-31800-4_12.
- NOWICKI, Patryk; KUCZER, Mariola; SCHROEDER, Grzegorz; CZARNIEWSKA, Elżbieta. Disruption of insect immunity using analogs of the pleiotropic insect peptide hormone Neb-colloostatin: a nanotech approach for pest control II. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 9459, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-87878-5.
- OERKE, E. C. **Crop losses to pests**. **Journal of Agricultural Science**, 2006. DOI: 10.1017/S0021859605005708.
- OLIVEIRA, M. G. A.; DE SIMONE, S. G.; XAVIER, L. P.; GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, n. 3, p. 369–380, 2005. DOI: 10.1016/j.cbpc.2004.10.018.
- OLIVEIRA, M. G.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate

- activation binding site of bovine trypsin. Identification by covalent labeling with p-diazoniumbenzamidino and kinetic characterization of Tyr-151-(p-benzamidino)-azo-beta-trypsin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 36, p. 26893–26903, 1993. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)74195-7.
- OONINCX, Dennis G. A. B.; VAN BROEKHOVEN, Sarah; VAN HUIS, Arnold; VAN LOON, Joop J. A. Feed Conversion, Survival and Development, and Composition of Four Insect Species on Diets Composed of Food By-Products. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0144601, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0144601.
- OPPERT, Brenda; MORGAN, Tom D.; KRAMER, Karl J. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin and protease inhibitors against coleopteran storage pests. **Pest Management Science**, v. 67, n. 5, p. 568–573, 2011. DOI: 10.1002/ps.2099.
- PANDEY, Ankesh; YADAV, Reena; KUMAR, Sanoj; KUMAR, Anil; SHUKLA, Priya; YADAV, Ankita; SANYAL, Indraneel. Expression of the entomotoxic *Cocculus hirsutus* trypsin inhibitor (ChTI) gene in transgenic chickpea enhances its underlying resistance against the infestation of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 146, n. 1, p. 41–56, 2021. DOI: 10.1007/s11240-021-02041-2.
- PANDEY, Ankesh; YADAV, Reena; SANYAL, Indraneel. Evaluating the pesticidal impact of plant protease inhibitors: lethal weaponry in the co-evolutionary battle. **Pest Management Science**, 2021. DOI: 10.1002/ps.6659.
- PARDE, Vinod D.; SHARMA, Hari C.; KACHOLE, Manvendra S. In vivo inhibition of *Helicoverpa armigera* gut pro-proteinase activation by non-host plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 9, p. 1315–1324, 2010. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2010.04.003.
- PATARROYO-VARGAS, ADRIANA M.; CORDEIRO, GLÁUCIA; SILVA, CAROLINA R. Da; SILVA, CAMILA R. Da; MENDONÇA, EDUARDO G.; VISÔTTO, LILIANE E.; ZANUNCIO, JOSÉ C.; CAMPOS, WELLINGTON G.; OLIVEIRA, MARIA GORETI A. Inhibition kinetics of digestive proteases for *Anticarsia gemmatalis*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. suppl 1, 2020. DOI: 10.1590/0001-3765202020180477.
- PATARROYO-VARGAS, Adriana M.; MERINO-CABRERA, Yaremis B.; ZANUNCIO, Jose C.; ROCHA, Francelina; CAMPOS, Wellington G.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Kinetic Characterization of *Anticarsia gemmatalis* Digestive Serine- Proteases and the Inhibitory Effect of Synthetic Peptides. **Protein & Peptide Letters**, v. 24, n. 11, 2018. DOI: 10.2174/0929866524666170918103146.
- PILON, ANDERSON M.; CAMPOS, WELLINGTON G.; SILVA, CAROLINA R.; CORDEIRO, GLAÚCIA; SILVA, CAMILA R.; OLIVEIRA, MARIA GORETI A. Protease inhibitory, insecticidal and deterrent effects of the trypsin-inhibitor benzamidino on the velvetbean caterpillar in soybean. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3475–3482, 2018. DOI: 10.1590/0001-3765201820180159.

- PIMENTEL, David; BURGESS, Michael. Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States. *In: Integrated Pest Management*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 47–71. DOI: 10.1007/978-94-007-7796-5_2.
- REISIG, Dominic D.; KURTZ, Ryan. Bt Resistance Implications for *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) Insecticide Resistance Management in the United States. *Environmental Entomology*, 2018. DOI: 10.1093/ee/nvy142.
- ROBIN, Tal; REUVENI, Shlomi; URBACH, Michael. Single-molecule theory of enzymatic inhibition. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, p. 779, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-02995-6.
- ROBINSON, David; BLISS, Edward. A model of the direct and indirect effects of aprotinin administration on the overall costs of coronary revascularization surgery in a university teaching hospital cardiothoracic unit. *Clinical Therapeutics*, v. 24, n. 10, p. 1677–1689, 2002. DOI: 10.1016/S0149-2918(02)80071-6.
- ROYCHAUDHURI, Robin; SARATH, Gautam; ZEECE, Michael; MARKWELL, John. Reversible denaturation of the soybean Kunitz trypsin inhibitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 412, n. 1, p. 20–26, 2003. DOI: 10.1016/S0003-9861(03)00011-0.
- SACZEWSKI, Franciszek; BALEWSKI, Łukasz. Biological activities of guanidine compounds. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 19, n. 10, p. 1417–1448, 2009. DOI: 10.1517/13543770903216675.
- SAIKHEDKAR, Nidhi S.; JOSHI, Rakesh S.; BHOITE, Ashiwini S.; MOHANDASAN, Radhika; YADAV, Amit Kumar; FERNANDES, Moneesha; KULKARNI, Kiran A.; GIRI, Ashok P. Tripeptides derived from reactive centre loop of potato type II protease inhibitors preferentially inhibit midgut proteases of *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 95, p. 17–25, 2018. DOI: 10.1016/j.ibmb.2018.02.001.
- SAIKHEDKAR, Nidhi S.; JOSHI, Rakesh S.; YADAV, Amit K.; SEAL, Shubhendu; FERNANDES, Moneesha; GIRI, Ashok P. Phyto-inspired cyclic peptides derived from plant Pin-II type protease inhibitor reactive center loops for crop protection from insect pests. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 2019. DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.05.003.
- SANTOS, Lucianna H. S.; FERREIRA, Rafaela S.; CAFFARENA, Ernesto R. Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. *In: [s.l.: s.n.]*. p. 13–34. DOI: 10.1007/978-1-4939-9752-7_2.
- SHAMSI, Tooba Naz; PARVEEN, Romana; FATIMA, Sadaf. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 91, p. 1120–1133, 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.069.
- SILVA JÚNIOR, Neilier R.; VITAL, Camilo E.; ALMEIDA BARROS, Rafael; FAUSTINO, Verônica A.; MONTEIRO, Luana P.; BARROS, Edvaldo; OLIVEIRA, Eugênio E.; OLIVEIRA RAMOS, Humberto J.; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Intestinal proteolytic profile changes during larval development of

Anticarsia gemmatalis caterpillars. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 1, 2020. DOI: 10.1002/arch.21631.

- SINGH, Raushan Kumar; TIWARI, Manish Kumar; KIM, In-Won; CHEN, Zhilei; LEE, Jung-Kul. Probing the Role of Sigma π Interaction and Energetics in the Catalytic Efficiency of Endo-1,4- β -Xylanase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8817–8821, 2012. DOI: 10.1128/AEM.02261-12.
- SINGH, Sujata; SINGH, Archana; KUMAR, Sumit; MITTAL, Pooja; SINGH, Indrakant K. **Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. Insect Science**, 2020. DOI: 10.1111/1744-7917.12641.
- SOKALINGAM, Sriram; RAGHUNATHAN, Govindan; SOUNDRARAJAN, Nagasundarapandian; LEE, Sun-Gu. A Study on the Effect of Surface Lysine to Arginine Mutagenesis on Protein Stability and Structure Using Green Fluorescent Protein. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40410, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0040410.
- SONG, Hyun Kyu; SUH, Se Won. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator 1 Edited by R. Huber. **Journal of Molecular Biology**, v. 275, n. 2, p. 347–363, 1998. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1469.
- SOUTO, XÊNIA M.; BRANQUINHA, MARTA H.; SANTOS, ANDRÉ L. S. Chymotrypsin- and trypsin-like activities secreted by the multidrug-resistant yeasts forming the *Candida haemulonii* complex. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 3, 2019. DOI: 10.1590/0001-3765201920180735.
- SPIT, Jornt; BREUGELMANS, Bert; VAN HOEF, Vincent; SIMONET, Gert; ZELS, Sven; BROECK, Jozef Vanden. Growth-inhibition effects of pacifastin-like peptides on a pest insect: The desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Peptides**, v. 34, n. 1, p. 251–257, 2012. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.06.019.
- SRINIVASAN, Ajay; GIRI, Ashok; GUPTA, Vidya. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 11, n. 1, 2006. DOI: 10.2478/s11658-006-0012-8.
- SWEDBERG, Joakim E.; DE VEER, Simon J.; SIT, Kei C.; REBOUL, Cyril F.; BUCKLE, Ashley M.; HARRIS, Jonathan M. Mastering the Canonical Loop of Serine Protease Inhibitors: Enhancing Potency by Optimising the Internal Hydrogen Bond Network. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e19302, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0019302.
- TABASHNIK, Bruce E.; CARRIÈRE, Yves. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 10, p. 926–935, 2017. DOI: 10.1038/nbt.3974.
- TAYLOR, R. D.; JEWSBURY, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, n. 3, p. 151–166, 2002. DOI: 10.1023/A:1020155510718.

- TERRA, Walter R.; FERREIRA, Clélia. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 1–62, 1994. DOI: 10.1016/0305-0491(94)90141-4.
- TOMARELLI, R.; CHARNEY, J.; HARDING, M. The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 34, n. 3, p. 428–433, 1949.
- UMETSU, Noriharu; SHIRAI, Yuichi. Development of novel pesticides in the 21st century. **Journal of Pesticide Science**, v. 45, n. 2, p. 54–74, 2020. DOI: 10.1584/jpestics.D20-201.
- USDA. **World Agricultural Production**. 2022.
- VAJRAVIJAYAN, Senthilvadivel; PLETNEV, Sergei; PLETNEV, Vladimir Z.; NANDHAGOPAL, Narayanasamy; GUNASEKARAN, Krishnasamy. Crystal structure of a novel Kunitz type inhibitor, alocasin with anti- *Aedes aegypti* activity targeting midgut proteases. **Pest Management Science**, v. 74, n. 12, p. 2761–2772, 2018. DOI: 10.1002/ps.5063.
- VOLPICELLA, Mariateresa; CORDEWENER, Jan; JONGSMA, Maarten A.; GALLERANI, Raffaele; CECI, Luigi R.; BEEKWILDER, Jules. Identification and characterization of digestive serine proteases from inhibitor-resistant *Helicoverpa zea* larval midgut. **Journal of Chromatography B**, v. 833, n. 1, p. 26–32, 2006. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.10.021.
- WALDBAUER, G. P. The Consumption and Utilization of Food by Insects. *In*: [s.l.: s.n.]. p. 229–288. DOI: 10.1016/S0065-2806(08)60230-1.
- WAN, Shunzhou; KNAPP, Bernhard; WRIGHT, David W.; DEANE, Charlotte M.; COVENEY, Peter V. Rapid, Precise, and Reproducible Prediction of Peptide-MHC Binding Affinities from Molecular Dynamics That Correlate Well with Experiment. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 2015. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00179.
- WANG, Bo; XIE, Ningning; LI, Bo. Influence of peptide characteristics on their stability, intestinal transport, and in vitro bioavailability: A review. **Journal of Food Biochemistry**, 2019. DOI: 10.1111/jfbc.12571.
- WATERHOUSE, Andrew et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2018. DOI: 10.1093/nar/gky427.
- WOLDEMARIAM, Melkamu G.; AHERN, Kevin; JANDER, Georg; TZIN, Vered. A role for 9-lipoxygenases in maize defense against insect herbivory. **Plant Signaling & Behavior**, v. 13, n. 1, p. e1422462, 2018. DOI: 10.1080/15592324.2017.1422462.
- YANG, Limei; FANG, Zhiyuan; DICKE, Marcel; LOON, Joop J. A. van; JONGSMA, Maarten A. The diamondback moth, *Plutella xylostella*, specifically inactivates Mustard Trypsin Inhibitor 2 (MTI2) to overcome host plant defence. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2009. DOI: 10.1016/j.ibmb.2008.09.012.

- ZHAO, Aiping; LI, Yin; LENG, Chunmeng; WANG, Ping; LI, Yiping. Inhibitory Effect of Protease Inhibitors on Larval Midgut Protease Activities and the Performance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Frontiers in Physiology**, v. 9, 2019. a. DOI: 10.3389/fphys.2018.01963.
- ZHAO, Junnan; ZHU, Lu; ZHOU, Weineng; YIN, Lingfeng; WANG, Yuchen; FAN, Yuanrong; CHEN, Yadong; LIU, Haichun. In silico Prediction of Inhibitory Constant of Thrombin Inhibitors Using Machine Learning. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 21, n. 9, p. 662–669, 2019. b. DOI: 10.2174/1386207322666181220130232.
- ZHAO, Ping; WANG, Gen Hong; DONG, Zhao Ming; DUAN, Jun; XU, Ping Zhen; CHENG, Ting Cai; XIANG, Zhong Huai; XIA, Qing You. Genome-wide identification and expression analysis of serine proteases and homologs in the silkworm *Bombyx mori*. **BMC Genomics**, 2010. DOI: 10.1186/1471-2164-11-405.
- ZHIRNOV, O. P.; KLENK, H. D.; WRIGHT, P. F. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. **Antiviral Research**, v. 92, n. 1, p. 27–36, 2011. DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.07.014.
- ZHOU, Aiwu; CARRELL, Robin W.; HUNTINGTON, James A. The Serpin Inhibitory Mechanism Is Critically Dependent on the Length of the Reactive Center Loop. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 29, p. 27541–27547, 2001. DOI: 10.1074/jbc.M102594200.
- ZHU-SALZMAN, Keyan; ZENG, Rensen. Insect Response to Plant Defensive Protease Inhibitors. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 233–252, 2015. DOI: 10.1146/annurev-ento-010814-020816.

TABELAS

Tabela 1. Valores de pesos de coeficiente de ancoragem pelo software online Cluspro dos inibidores BPTI e SKTI e das enzimas tripsinas de *Anticarsia gemmatalis*. O teste t para comparação entre as energias mais baixas dos complexos Aprotinina-tripsina e SKTI-Tripsina não demonstrou diferenças significativas (P=0,0765).

		Members of the Cluster	Cluster Center	Lowest Energy
Complex Aprotinin- Trypsin	1	106	-722.9	-906.1
	2	189	-752.1	-831.5
	3	369	-696.5	-922.8
	4	247	-737.5	-924.9
	5	172	-807.8	-1086.2
	6	96	-765.2	-912.1
Complex SKTI- Trypsin	1	165	-915.6	-1057.6
	2	124	-959.7	-985.0
	3	152	-848.3	-1050.2
	4	96	-820.7	-953.1
	5	149	-887.9	-1018.4
	6	132	-833.7	-990.2

FIGURES

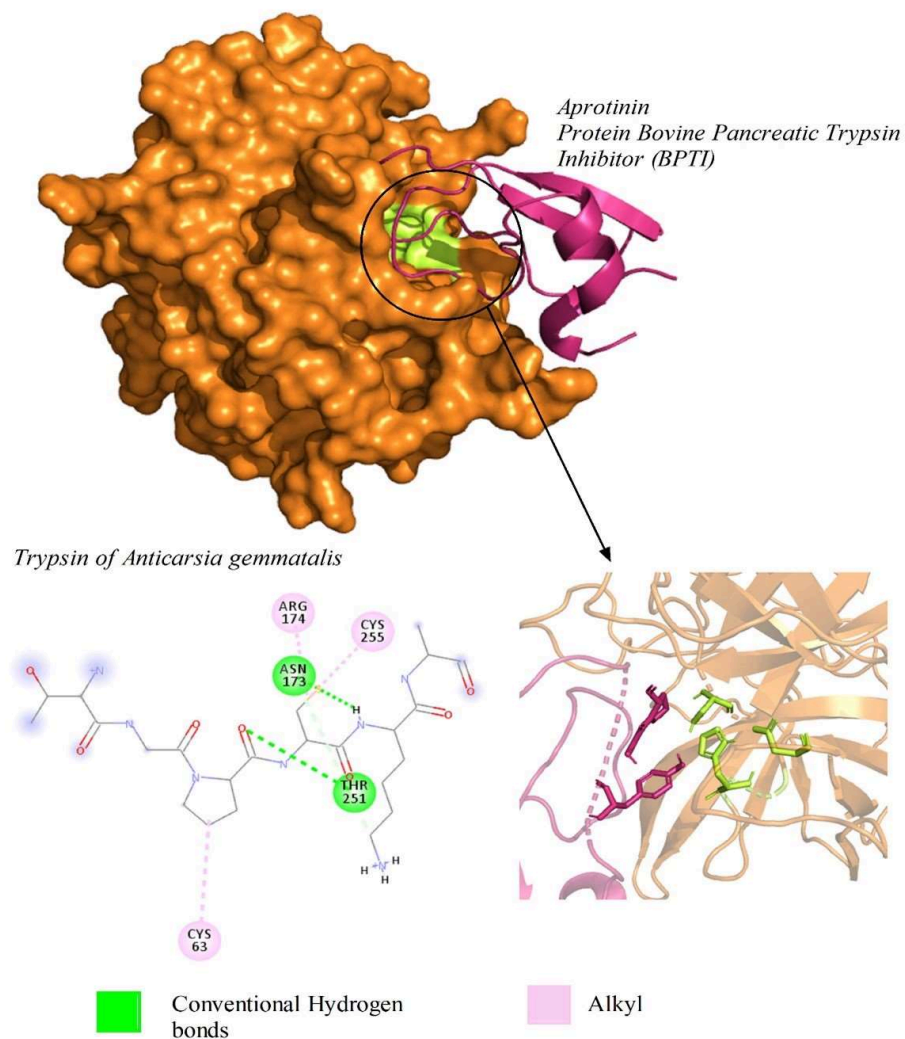


Figura 1. No topo: Visão geral da pose de ancoragem mais bem classificada da ligação do inibidor pancreático bovino (BPTI) à tripsina digestiva *Anticarsia gemmatalis*. Forma da superfície representando a tripsina em laranja e o BPTI em roxo. No canto inferior direito: aminoácidos catalíticos em bastões verdes e os resíduos reativos do inibidor em bastões roxos envolvidos na interação tripsina-BPTI. No canto inferior esquerdo: perfil farmacofórico do complexo BPTI-tripsina após docking molecular. Círculos coloridos e as linhas pontiagudas indicam o tipo de interação entre a sequência reativa do BPTI e a cadeia lateral dos resíduos da tripsina.

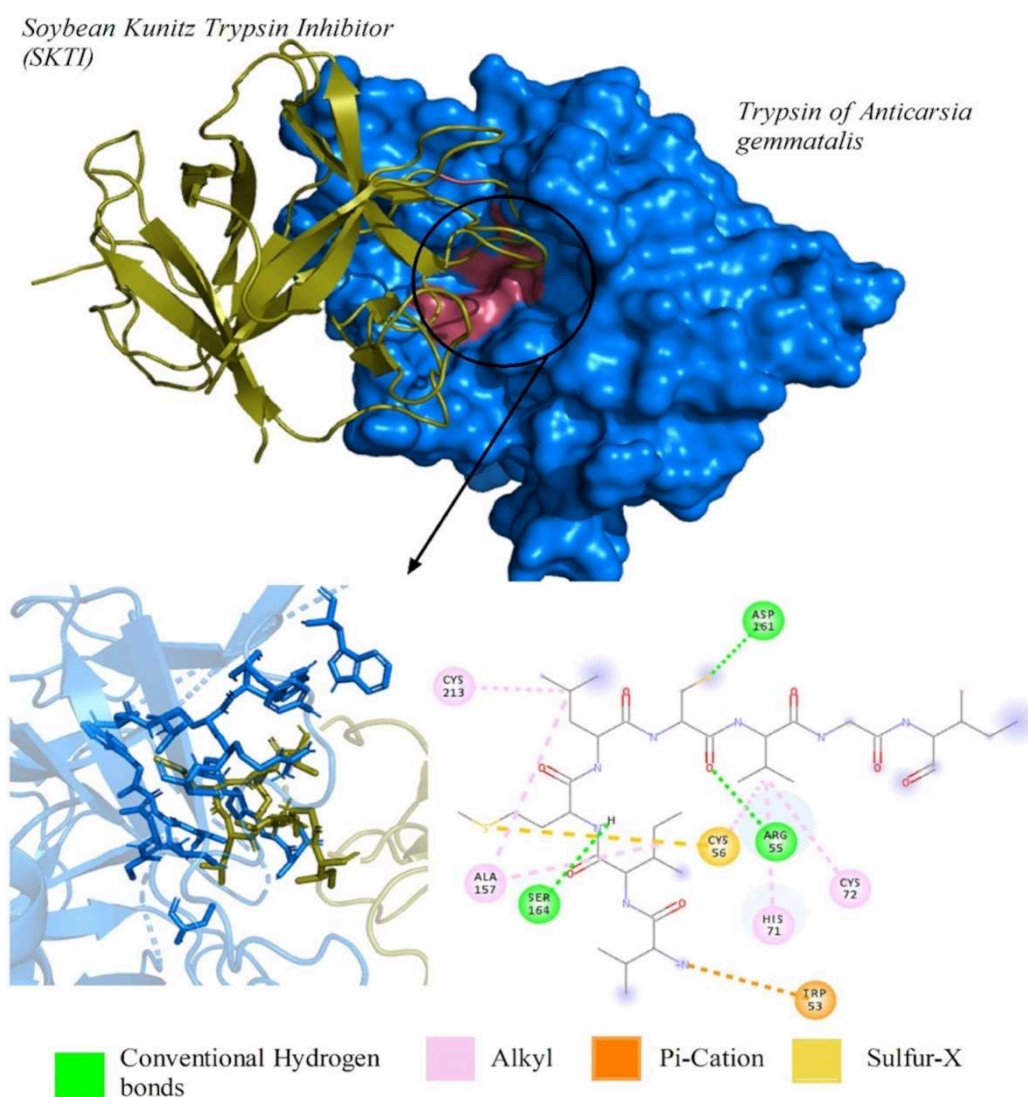


Figura 2. No topo: Visão geral da pose de encaixe mais bem classificada da ligação do inibidor de tripsina Kunitz (SKTI) de soja com tripsina digestiva *Anticarsia gemmatalis*. Forma da superfície representando a tripsina em azul e o SKTI em verde. No canto inferior esquerdo: aminoácidos enzimáticos em bastões azuis e os resíduos reativos do inibidor em bastões verdes envolvidos na interação tripsina-SKTI. No canto inferior direito: perfil farmacofórico do complexo SKTI-tripsina após docking molecular. Círculos coloridos e as linhas pontiaguda indicam o tipo de interação entre a sequência reativa SKTI e a cadeia lateral dos resíduos da tripsina.

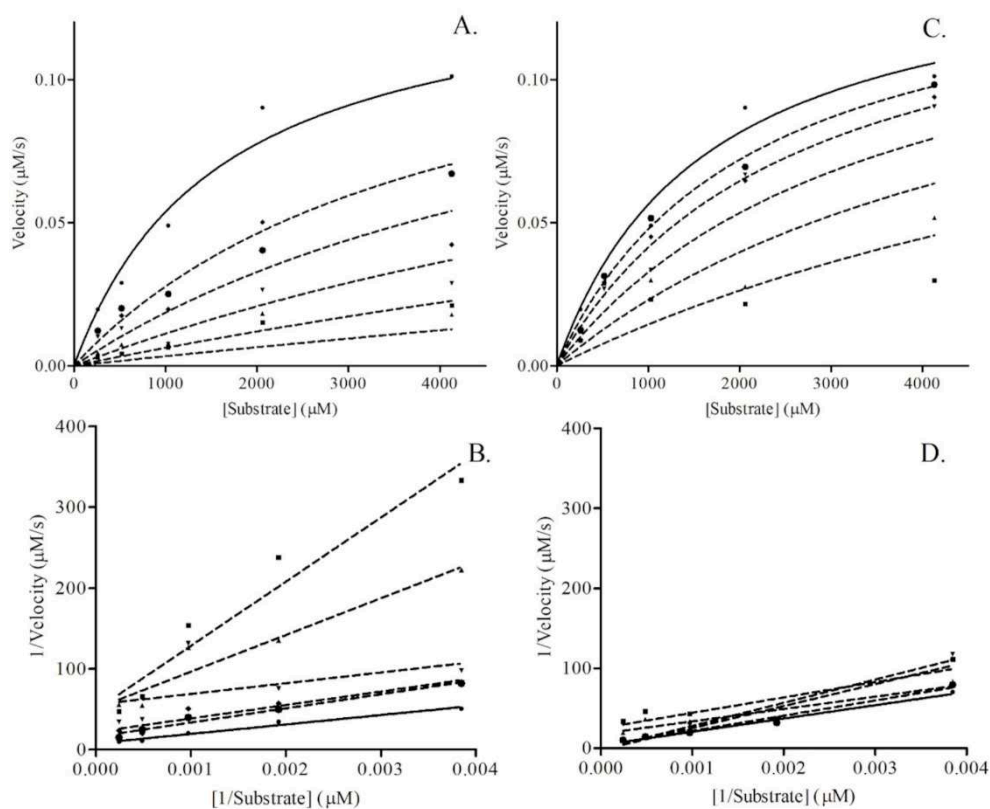


Figura 3. Gráfico de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk da inibição intestinal de tripsina-like em *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) pelas proteínas BPTI (A e B) e SKTI (C e D) na presença do substrato L-BApNA.

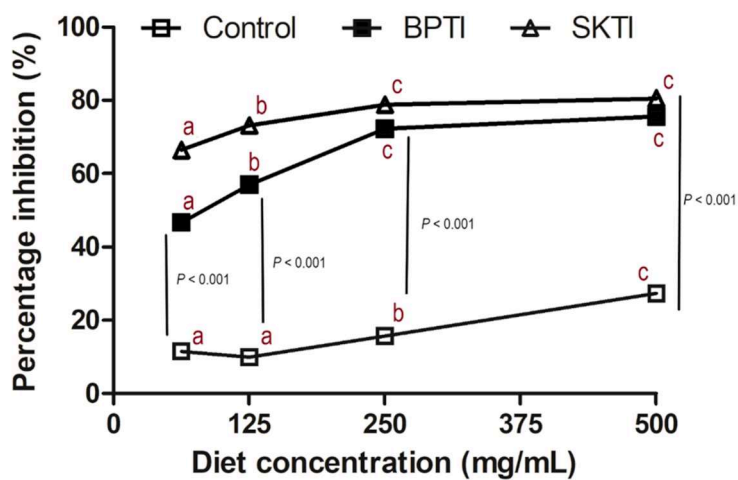


Figura 4. Inibição percentual de enzimas tripsina-like do intestino médio de *A. gemmatalis* por extratos de dieta contendo ou não IPs em diferentes concentrações.

As letras indicam diferenças entre as concentrações do mesmo tratamento. As linhas verticais seguidas dos valores de p indicam diferenças entre os diferentes tratamentos.

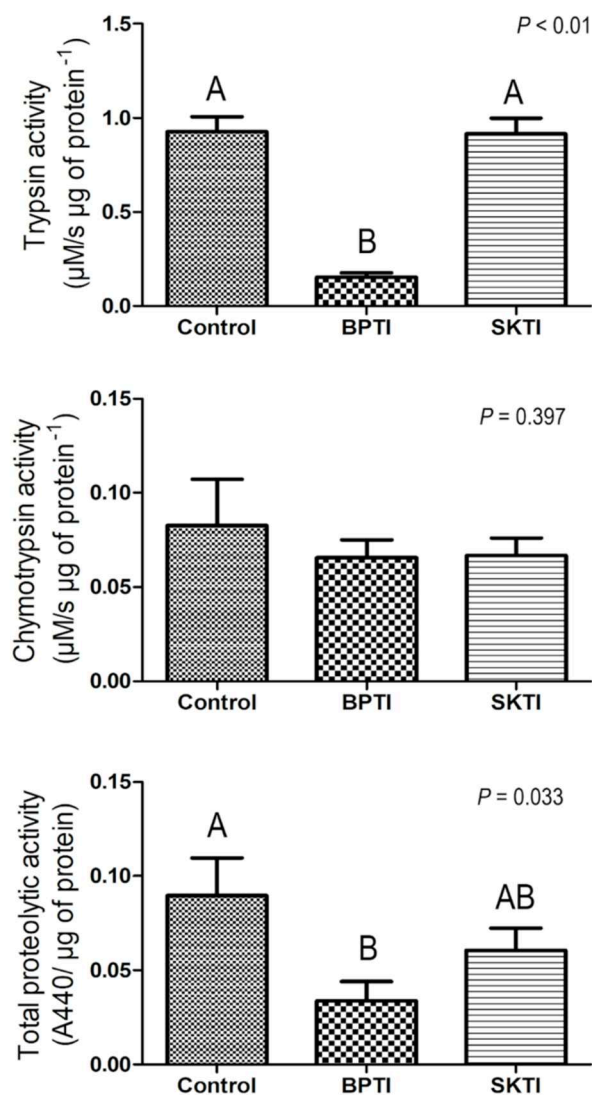


Figura 5. Atividades de tripsinas, quimotripsinas e proteases totais de extratos do intestino médio de *A. gemmatalis* expostos ou não à IPs (BPTI e SKTI). Os valores são a média \pm S.E. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos.

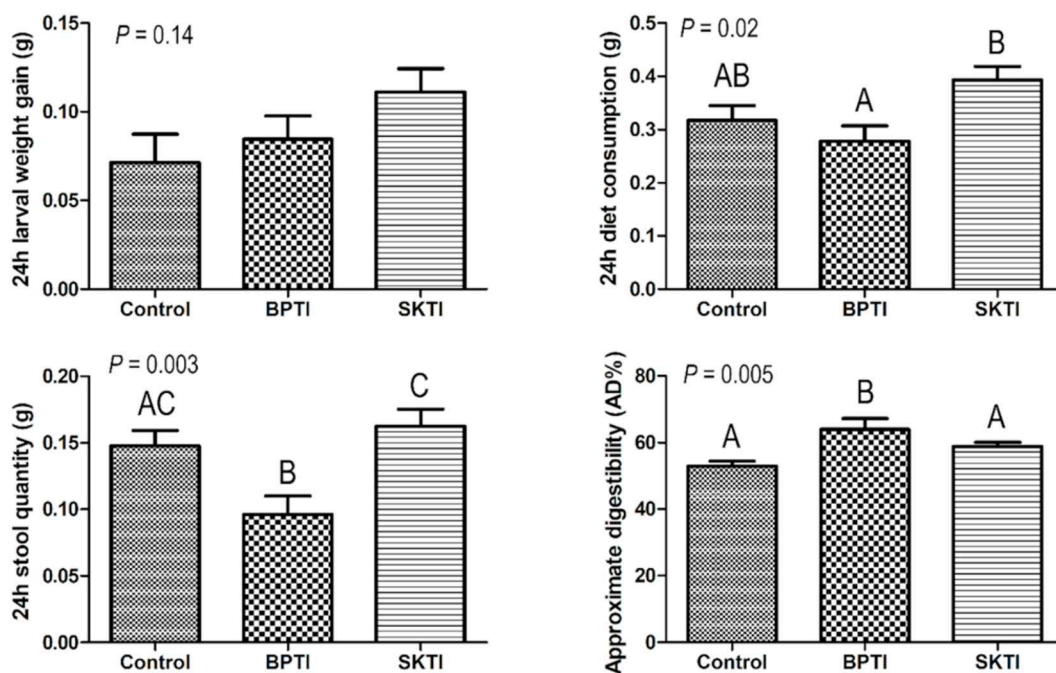


Figure 6. Biological parameters from *A. gemmatalis* larvae exposed or not to protease inhibitors. Values are mean \pm S.E. Different letters indicate statistical significance between treatments.

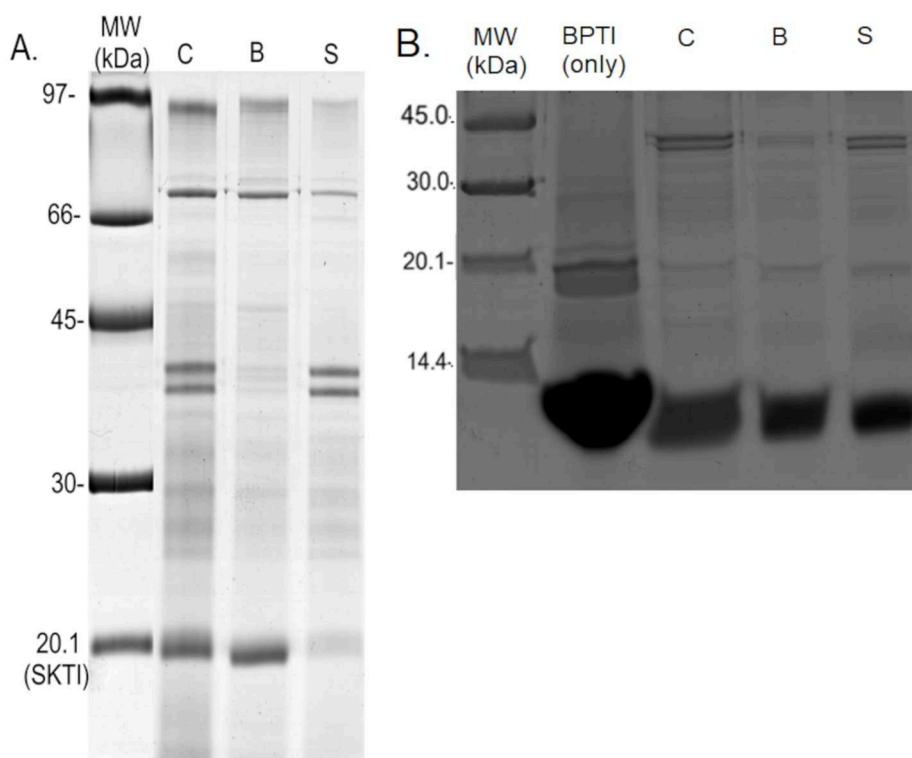


Figura 7. Perfil SDS-PAGE da digestão de BPTI e SKTI por extrato do intestino médio de lagartas expostas ou não aos. As letras acima dos canais indicam que SKTI (A) e

BPTI (B) foram expostos a extratos extraído de larvas expostas às dietas controle (C), SKTI (S) e BPTI (B).

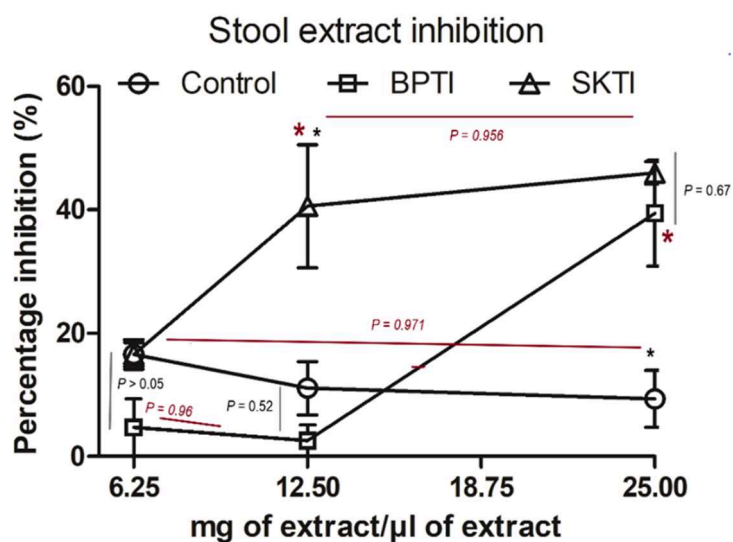


Figura 8. Inibição percentual de tripsinas por extratos de fezes de insetos expostos aos IPs. Os valores são a média \pm S.E. O maior * (em vermelho) indica diferença estatística entre as diferentes concentrações das fezes coletadas do mesmo tratamento. O menor * (em preto) indica diferença estatística entre a inibição pelas fezes coletadas de diferentes tratamentos, mas na mesma concentração.

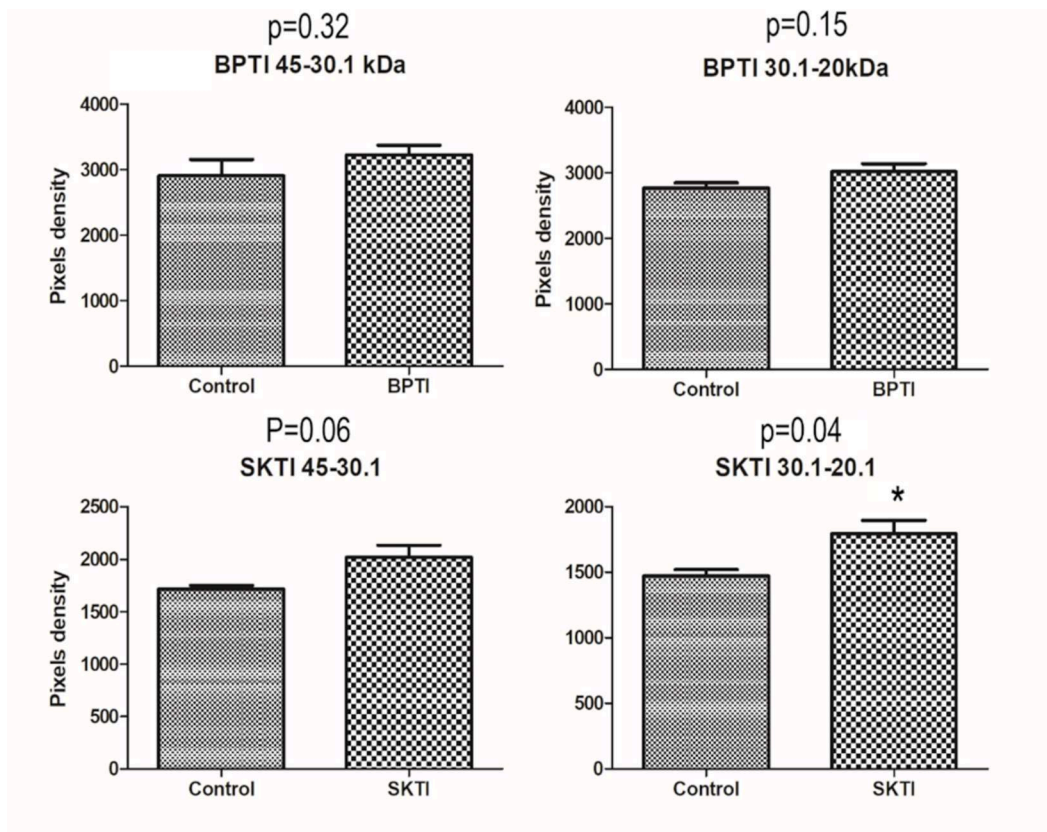


Figura 9. Análise de densitometria dos pixels do SDS-PAGE 12% do extrato de *A. gemmatalis* expostos ou não a inibidores de protease SKTI e BPTI. Os valores são as médias \pm S.E. * indica diferenças significativas entre os grupos expostos aos inibidores de protease e controle.

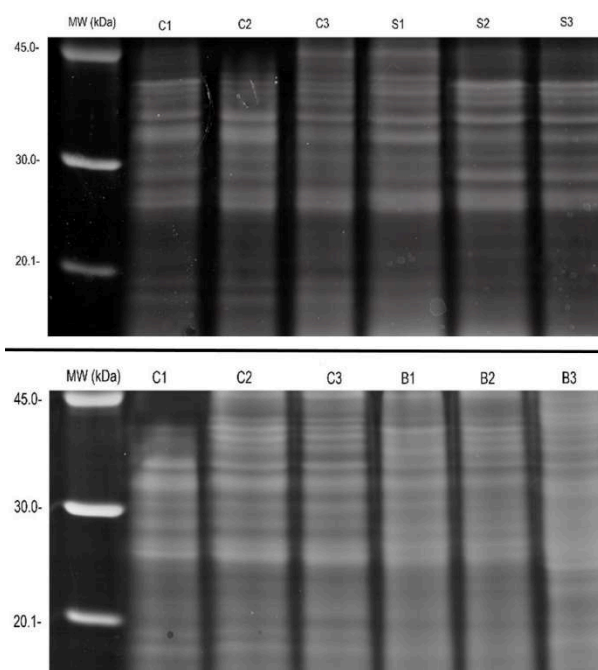


Figura 10. 12% SDS-PAGE carregado com extratos do intestino de *A. gemmatalis* expostos ou não a inibidores de protease. As letras maiúsculas acima dos canais indicam de qual tratamento as amostras vieram, ou seja, S para larvas expostas a SKTI, B para larvas expostas a BPTI e C para larvas expostas a controle.

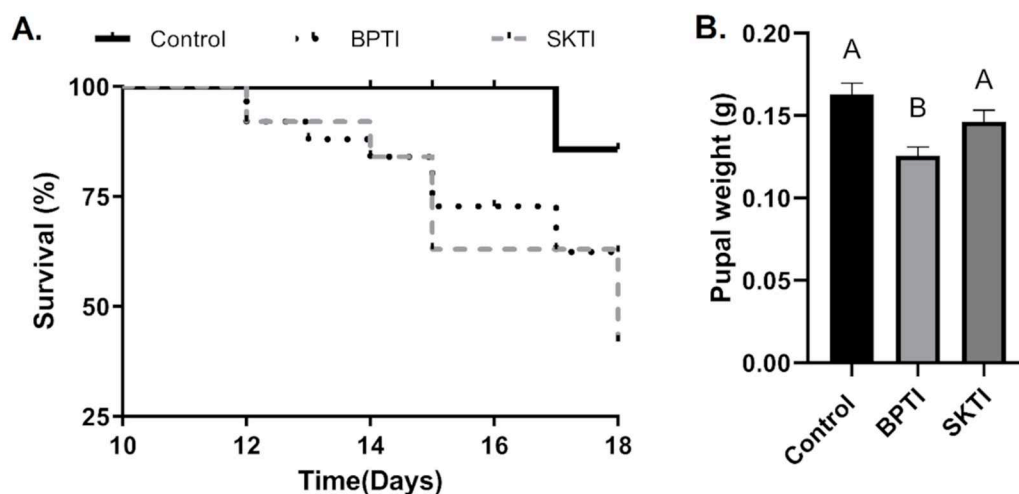


Figura 11. Survival plots (A) and pupal weight (B) of the *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae reared on diet containing BPTI and SKTI inhibitors. The treatments consisted of (a) artificial diet without protease inhibitor (control diet); (b) artificial diet containing BPTI (30 mM) and; (c) artificial diet containing SKTI (30 mM). Survival data were submitted to the Kaplan-Meier estimator and the functions obtained from each treatment were compared using Log-rank test. The weights after pupation were recorded and analyzed by ANOVA followed by Tukey's test, with different letters indicating significant differences ($p \leq 0.05$).

CAPÍTULO II: ARTIGO IV

Atividade inibitória de peptídeos desenhados com base em alças centrais reativas de proteínas BPTI e SKTI: ligação a tripsinas-like de pragas de lepidópteros.

RESUMO

Os inibidores de protease (IPs) são fontes potenciais para o desenvolvimento de novos pesticidas contra insetos Lepidoptera. A exposição de lepidópteros a essas moléculas afeta os parâmetros do ciclo de vida com algumas limitações, como ação lenta e adaptações fisiológicas, que incluem percepção e reprogramação do perfil de proteases que podem levar à inativação. No entanto, pequenos peptídeos projetados com base em IPs naturais podem superar o mecanismo de adaptação do inseto devido à sua alta estabilidade, baixo peso molecular e falta de associação próxima (coevolução). A este respeito, quatro peptídeos baseados nas alças do centro reativo de PIs BPTI (TGPK e TGPKR) e SKTI (SKTI) (AVIMK e AVIMR) foram projetados. Nossos resultados demonstraram a influência crucial de tipos específicos de ligações químicas na afinidade de ligação dos ligantes com isoformas de tripsina-like de insetos Lepidoptera por análises *in silico* e de correlação. Em geral, o número de interações pi-sigma está correlacionado com maior afinidade para AVIMK, enquanto as ligações alquil/pi-alquil e C-H estão correlacionadas com menor afinidade para peptídeos AVIMR e TGPK, respectivamente. Além disso, o número de interações com resíduos-chave de enzimas semelhantes a tripsina, ou seja, His57, Asp102, Ser195, Asp189, S195 e G197 (numeração de quimotripsinogênio), está fortemente correlacionado com suas energias de ligação. Ensaio de inibição com extrato do intestino médio de *A. gemmatalis* mostraram que todos os peptídeos exibiram uma inibição competitiva. No entanto, apenas os peptídeos derivados do BPTI, principalmente o TGPK, mostraram grande capacidade de inibir atividades de tripsinas-like. Esses resultados sugerem que TGPK poderia contribuir para o controle de *A. gemmatalis*. No entanto, os outros peptídeos não podem ser descartados contra tripsinas de outros insetos lepidópteros porque o encaixe molecular previu grande ligação com isoformas semelhantes a tripsinas-like de vários lepidópteros.

Palavras-chave: *Anticarsia gemmatalis*. Docking molecular. Constante inibitória. Farmacofórico. Pentapeptídeo

Inhibitory activity of peptides designed based on reactive center loops of BPTI and SKTI proteins: binding to trypsins-like of lepidopteran pests.

ABSTRACT

Protease inhibitors (PIs) are potential sources for the development of new pesticides against Lepidoptera insects. Exposure of lepidopterans to these molecules affects life cycle parameters with some limitations, such as lower action and adaptation by counteracting mechanisms, which include perception and reprogramming of the protease profile that could lead to inactivation. However, small peptides designed based on natural PIs could overcome the insect adaptation mechanism due to their high stability, low molecular weight, and lack of close association (co-evolution). In this regard, four peptides based on the reactive center loops of BPTI (TGPCCK and TGPCR) and SKTI (SKTI) (AVIMK and AVIMR) PIs were designed. Our results underlined the crucial influence of specific types of chemical bonds on the binding affinity of the ligands with trypsin-like isoforms of Lepidoptera insects by *in silico* and correlation analyzes. In general, the number of pi-sigma interactions is correlated with higher affinity for AVIMK, whereas alkyl/pi-alkyl and C-H bonds are correlated with lower affinity for AVIMR and TGPCCK peptides, respectively. Moreover, the number of interactions with key residues of trypsin-like enzymes, i.e., His57, Asp102, Ser195, Asp189, S195, and G197 (chymotrypsinogen numbering), is strongly correlated with their binding energies. Inhibition experiments with midgut extract of *A. gemmatalis* showed that all peptides exhibited a competitive inhibition. However, only BPTI-derived peptides, mainly TGPCCK, showed great ability to inhibit trypsin-like activities. These results suggest that TGPCCK could contribute to the control of *A. gemmatalis*. However, the other peptides cannot be discarded against other Lepidopteran insects trypsins because molecular docking predicted great binding with trypsin-like isoforms of several Lepidoptera.

Key-words: *Anticarsia gemmatalis*. Molecular docking. Inhibitory constant.

Pharmacoforic. Pentapeptide

1. INTRODUÇÃO

A produção agrícola em todo o mundo é constantemente ameaçada por herbívoros, que reduzem os rendimentos agrícolas e a qualidade dos grãos. Enormes quantidades de pesticidas sintéticos são usadas nos campos para reduzir o impacto da herbivoria nas culturas agrícolas. Recentemente, o Brasil facilitou a regulamentação de 475 agrotóxicos, dos quais apenas 8% são considerados produtos biológicos (BRAGA et al., 2020). O uso indiscriminado de agrotóxicos convencionais não está apenas associado a problemas de saúde e ambientais (PIMENTEL; BURGESS, 2014), mas também acelera a perda de tecnologias atuais devido a insetos resistentes (NAUEN; STEINBACH, 2016). Portanto, a busca por moléculas biológicas que possam ser otimizadas para fornecer estratégias alternativas/adicionais de controle de pragas, que sejam tão eficientes quanto os inseticidas convencionais, é de grande importância para a sustentabilidade mundial (Bale et al., 2008).

Nesse contexto, enzimas digestivas de insetos-praga são consideradas alvos potenciais para o desenvolvimento de novos pesticidas. A digestão de proteínas por pragas de Lepidoptera é altamente dependente de serino-proteases, principalmente enzimas tripsina- e quimotripsina-like (NAPOLEÃO et al., 2019; SILVA JÚNIOR et al., 2020). Quando insetos lepidópteros são expostos a inibidores de proteases tripsina-like, o ciclo é frequentemente atrasado e a sobrevivência e reprodução são reduzidas devido a um déficit de aminoácidos livres e desregulação metabólica (PANDEY; YADAV; SANYAL, 2021). No entanto, apesar de seu potencial inseticida, os inibidores de proteases ainda não são usados na prática porque os insetos lepidópteros desenvolveram mecanismos adaptativos baseados na superexpressão de proteases sensíveis e insensíveis e na clivagem proteolítica endógena de inibidores de proteases (SINGH et al., 2020).

Os inibidores de protease são induzidos pelas plantas como um mecanismo natural de defesa quando atacados por herbívoros. Os herbívoros estimulam o metabolismo secundário das plantas para se defenderem. Isso ocorre pela presença de elicitores na saliva do inseto e os danos mecânicos causados por estes, o que aumenta a quantidade de inibidores de protease no tecido vegetal. De fato, a exposição crônica de herbívoros a inibidores naturais de proteases vegetais resulta em desempenho reduzido (HARTL et al., 2011). No entanto, o uso de inibidores de

protease na agricultura ainda não é uma realidade devido a muitos gargalos, como exposição prolongada para obter efeitos *knockdown*, adaptações de insetos e estabilidade ambiental (SINGH et al., 2020; ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015). Os inibidores naturais de proteases são moléculas relativamente grandes e, portanto, exibem baixa estabilidade quando expostos a elementos ambientais e proteases não-alvo encontradas no intestino médio de insetos lepidópteros. Apesar de seu tamanho, os inibidores de protease interagem com a protease através de pequenas partes da proteína chamada RCL (reactive center loops) (ZHOU; CARRELL; HUNTINGTON, 2001). Para resolver alguns dos gargalos que impedem o uso de inibidores de protease na agricultura, os RCLs podem ser estudados e isolados em pequenos peptídeos que apresentam maior estabilidade ambiental e fisiológica, além de possibilitarem modificações químicas pontuais na estrutura química. Encontrar peptídeos derivados de RCLs que exibem função biológica é uma estratégia comum para avançar na descoberta de medicamentos. Peptídeos RCL derivados de SERPINS (inibidores de serino proteases) mostraram funções imunomoduladoras aprimoradas em comparação com os efeitos da proteína inteira (AMBADAPADI et al., 2016). Além disso, pequenos peptídeos com atividades inibitórias já foram testados contra insetos-praga e prejudicaram o *fitness* de diferentes herbívoros (Fiandra et al., 2009; Meriño-Cabrera et al., 2020; Patarroyo-Vargas et al., 2020; Saikhedkar et al., 2018, 2019; Spit et al., 2012).

O desenvolvimento de inibidores de proteases não hospedeiros, como peptídeos RCL capazes de inibir a função biológica de proteases de herbívoros vitais, poderia ajudar a superar as adaptações que os insetos desenvolveram durante a coevolução com as plantas. Formulações de pesticidas contendo uma variedade de inibidores de peptídeos otimizados para eficácia e estabilidade podem transformar o uso de proteases digestivas de insetos em alvos eficientes para o controle de pragas (NOWICKI et al., 2021). Além disso, a construção de genótipos de plantas transgênicas resistentes com base em tais tecnologias pode se tornar viável se contiverem múltiplas regiões inibitórias de RCL de inibidores peptídicos.

Neste artigo, peptídeos de cinco resíduos derivados de dois RCLs de BPTI (*Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*) e SKTI (*Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor*) foram testados quanto às suas interações com enzimas alcalinas tripsina de insetos Lepidoptera, que são um grande problema para a agricultura. A busca por novos

peptídeos capazes de inibir proteases vitais no intestino médio de insetos Lepidoptera certamente ajudará na formulação de biopesticidas sustentáveis à base de proteínas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Proposta de peptídeos

Quatro pentapeptídeos foram desenvolvidos com base nos RCLs de BPTI (*Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*) e SKTI (*Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor*). A partir da SKTI, dois pentapeptídeos (ou seja, AVIMK e AVIMR) foram projetados com base na visão geral e local das poses de *docking molecular* mais bem classificadas entre SKTI e várias isoformas de tripsinas-like identificadas em dados proteômicos de *A. gemmatalis* (SILVA JÚNIOR et al., 2020). Dois pentapeptídeos foram projetados a partir de BPTI (ou seja, com base no BLASTp de BPTI, cadeia I (número de acesso NCBI: 1CBW) e a identificação do "sítio de interação com tripsinas - TGPKK". O último resíduo do pentapeptídeo foi sempre substituído por "Arg" ou "Lys" (resíduos que se ligam ao bolso S1 de enzimas semelhantes a tripsina). A estrutura 3D dos peptídeos foi projetada usando a ferramenta *wizard* do software Biovia Discovery Studio® e salva como um arquivo no formato "pdbqt".

2.2. Enzimas tripsinas-like alcalinas de insetos lepidópteros

Oito sequências FASTA de enzimas tripsina-like de *A. gemmatalis*, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) foram recuperadas do banco de dados de proteínas do NCBI (Tabela 1.). A estrutura 3D das tripsinas foi modelada usando o software online Phyre2 (KELLEY et al., 2015). A estrutura tridimensional das tripsinas foi submetida à análise de qualidade usando o servidor web Protein Structure Analysis (PRoSA) (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), ERRAT (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) e análises de plotagem de Ramachandran (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>). Enzimas tripsina-like foram submetidas a BlastP no NCBI para definir os aminoácidos que são críticos para a atividade de enzimas tripsina-like (numeração do quimotripsinogênio). A Figura 1 mostra o resumo do diagrama NCBI BlastP para tripsinogênio bovino (precursor mamífero para enzimas tripsinas-like) e uma enzima tripsina-like-alcalina C de *A. gemmatalis*.

2.3. Docking molecular e análise de dados

Após modelagem e minimização de energia, os peptídeos e arquivos pdbqt de tripsinas-like foram carregados na ferramenta de triagem virtual PyRx como macromoléculas (receptor) e ligantes, respectivamente. A grade automática que aparece após o carregamento das moléculas para encaixe na extensão *Vina Wizard* no PyRx foi mantida como configuração padrão. Para cada tripsina de lepidópteros, uma pose com a melhor classificação foi determinada para cada peptídeo. Um total de oito poses foram geradas para cada peptídeo usando diferentes enzimas tripsina-like de lepidópteros. Após o *docking* molecular, foram determinados os valores de energia de afinidade das melhores poses estruturais dos ligantes em cada encaixe. Os perfis farmacofóricos foram gerados usando o DS *Visualizer* 4.0 (Studio, 2012).

Os valores de energia de afinidade de cada peptídeo e do substrato L-BApNA com várias tripsinas de Lepidoptera foram avaliados por ANOVA e teste post-hoc de Duncan. Além disso, os valores de energia de afinidade foram correlacionados com o número de interações, tipo de interação e ligação a resíduos conservados no sítio ativo de cada modelo de tripsina pelo teste de correlação de Pearson (r).

2.4. Avaliação da constante inibitória aparente (K_i)

O valor do K_i aparente dos peptídeos foi calculado medindo-se a atividade de tripsina-like do extrato bruto do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) utilizando-se o substrato L-BApNA. Para obter os extratos brutos, cinco larvas de *A. gemmatalis* de quinto ínstar cresceram de acordo com (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976) e foram dissecados para remover o trato intestinal. Posteriormente 1 ml de uma solução aquosa ajustada para pH 3 com HCl 1M foi adicionado para lise utilizando TissueLyser II - Qiagen®. Após a lise dos intestinos, o extrato bruto foi centrifugado a 10.000 g, 4° C, por 30 minutos e o sobrenadante foi coletado para dosagem de proteína total pelo método de Bradford.

A diminuição dependente da concentração na atividade de tripsina do extrato bruto de *A. gemmatalis* foi analisada utilizando-se diferentes concentrações de L-BApNA (2,56 mM, 1,28 mM, 0,64 mM, 0,32 mM) e peptídeos (0, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM). As atividades foram medidas usando um espectrofotômetro SpectraMax M2 a 410 nm por 2 minutos. A mistura de reação na placa de 96 poços consistiu de Tris-HCl 0,05 M e CaCl₂ 20mM, 30 µg de proteínas do extrato do intestino médio de

A. gemmatalis e os peptídeos e substrato nas concentrações acima citadas, totalizando 250 μ L. Os dados foram analisados usando o pacote de regressão não linear (ajuste de curva) do GraphPad Prisma 5.0, com dados categorizados em diferentes modos de inibição (ou seja, inibição competitiva, inibição não competitiva e inibição mista).

3. RESULTADOS

3.1. Análise da energia livre de ligação

A influência de um tipo particular de ligação química entre os peptídeos e os resíduos de tripsina na $\Delta G_{\text{BINDING}}$ da formação do complexo foi analisada por correlação de Pearson (r) e mostrada em mapas de calor para cada peptídeo (Figura 2). Para peptídeos baseados em SKTI, o número de interações pi-sigma entre AVIMK e tripsinas-like de Lepidoptera se correlacionou com um $\Delta G_{\text{BINDING}}$ mais baixo, enquanto que para AVIMR, a presença de interações alquil com resíduos de tripsina foi correlacionada com um $\Delta G_{\text{BINDING}}$ mais alto (Figura 2A. e 2B.). Por outro lado, para peptídeos baseados em BPTI, a formação de ligações C-H entre resíduos de tripsina e TGPCR foi significativamente correlacionada com um maior $\Delta G_{\text{BINDING}}$ de formação de complexo, enquanto que para complexos TGPCR-tripsina, nenhuma correlação foi encontrada entre qualquer tipo de ligação química e $\Delta G_{\text{BINDING}}$ (Figura 2C. e 2D.).

A energia livre de ligação (Kcal/mol) de peptídeos e L-BApNA e várias tripsinas de Lepidoptera foi menor para os peptídeos baseados em BPTI e o substrato do que para peptídeos SKTI (Tabela 2). O número total de interações para formar os complexos não apresentou correlação significativa com a energia livre de ligação ($r = -0,289$; $t_{\text{test-5\%}} = -1,655$; $P > 0,05$). A influência da ligação a resíduos do sítio ativo conservado de enzimas tripsina-like na energia livre de ligação do complexo peptídeo-tripsina também foi capturada pela correlação de Pearson (r). O número de interações com His57, Asp102, Ser195, Asp189, S195 e G197 (numeração de quimotripsinogênio) mostrou uma forte correlação com a energia livre de ligação da formação do complexo. Quanto maior o número de interações com resíduos críticos para a especificidade da tripsina, menor a energia livre de ligação (ou seja, maior afinidade) - ($r = -0,558$; $t_{\text{test-5\%}} = -3,679$; $P < 0,00045$).

3.2. Perfis farmacofóricos

Todos os peptídeos interagiram diretamente com pelo menos um dos resíduos do sítio ativo conservados, exceto para os complexos formados entre a isoforma 1TryAg e os peptídeos AVIMK, AVIMR e TGPCR (Figura 4., Material Suplementar 1.). No entanto, algumas peculiaridades podem ser observadas entre os peptídeos em relação à natureza das interações químicas com outros resíduos na região do sítio

ativo (Figura 5.). Em geral, ligações H, ligações C-H e alquil/Pi alquil predominam nas interações entre os quatro peptídeos e enzimas tripsinas-like. Vale a pena notar que se prevê que o peptídeo TGPCR tem um número significativamente maior de ligações C-H do que outros peptídeos formados com enzimas tripsinas-like de insetos Lepidoptera. Além disso, os peptídeos contendo lisina (K) na posição P1 apresentaram uma ligação significativamente maior através de ligações pi-sigma. A frequência de ligação desfavorável foi maior para o peptídeo TGPCR, que apresentou três possíveis ligações desfavoráveis no sítio ativo de tripsinas de lepidópteros, em comparação com uma para TGPCCK e AVIMK e duas para AVIMR.

3.3. Cinética de inibição

As constantes de inibição (K_i) calculadas para o meio reacional contendo substrato L-BApNA, extratos brutos do intestino médio de *A. gemmatalis* e os peptídeos indicam que aqueles derivados de BPTI são inibidores mais potentes do que aqueles derivados de SKTI. Os valores de K_i foram 14,4 mM para AVIMK, 26,2 mM para AVIMR, 2,2 mM para TGPCCK e 8,8 mM para TGPCR. Para todos os peptídeos, os dados da constante de inibição mostraram um melhor ajuste para o modo competitivo de inibição do que para os modelos não competitivos e mistos. Os coeficientes R^2 foram 0,87, 0,77, 0,81 e 0,94 para AVIMK, AVIMR, TGPCCK e TGPCR, respectivamente (Figura 6.).

4. DISCUSSÃO

O uso generalizado de pesticidas sintéticos para controlar pragas de Lepidoptera na agricultura levanta grandes preocupações sobre o impacto dessas moléculas na sustentabilidade. Além disso, os insetos desenvolveram resistência aos pesticidas comumente utilizados, exigindo um uso ainda maior do ingrediente ativo em campos agrícolas ao redor do mundo (CASIDA; QUISTAD, 1998; NAUEN; STEINBACH, 2016). O avanço das técnicas biotecnológicas possibilitou o desenvolvimento de formulações compostas por derivados biológicos. No entanto, a maioria dos agrotóxicos disponíveis comercialmente na agricultura são baseados em formulações contendo *Bacillus thuringiensis* com proteínas Vip e Cry e outros organismos entomopatogênicos como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (CHANDLER et al., 2008; UMETSU; SHIRAI, 2020). A diversidade limitada dos modos de ação dos agrotóxicos já existentes no mercado está levando a comunidade científica a buscar novos compostos biológicos com atividade inseticida e diferentes modos de ação.

As afinidades (kcal/mol) dos peptídeos baseados em SKTI - AVIMK e AVIMR -para enzimas tripsina-like de insetos Lepidoptera foram fortemente correlacionadas com a presença de Pi-sigma (correlação negativa) e alquil (correlação positiva), respectivamente. As interações pi-sigma são tipos de ligações covalentes formadas pela sobreposição dos orbitais pi e sigma que ajudam a estabilizar as cargas no sítio ativo das enzimas, geralmente aumentando a afinidade do ligante (ARTHUR; UZAIRU, 2019). As ligações alquil são interações hidrofóbicas importantes para a ligação a bolsões hidrofóbicos, como os subsítios S2 e S3 no sítio ativo das tripsinas. As interações de alquil são flexíveis e suportam flexibilidade conformacional quando o ligante está enterrado no sítio ativo. No entanto, em alguns casos, essa flexibilidade do sítio ativo pode interferir na forte ligação entre um complexo enzima-ligante. Por exemplo, derivados de 5-(alquiloxi)-triptamina com uma proporção maior de interações alquil ligam-se com menor afinidade aos receptores de serotonina 5-HT1D do que grupos com cadeias alquil menores (GLENNON et al., 1996). No peptídeo TGPKK, as ligações C-H estão associadas a uma menor afinidade por enzimas do tripsina-like. De fato, as ligações C-H são mais fracas do que as ligações de hidrogênio convencionais e a formação dessas interações pode reduzir a formação de ligações de hidrogênio mais fortes. No entanto, embora mais fracas que as ligações H

convencionais, as ligações C-H podem ser facilmente formadas entre dois átomos e têm fortes efeitos na retenção de ligantes, assim como as ligações H (HERREBOUT; SUHM, 2011).

A similaridade da energia livre de ligação de peptídeos derivados de BPTI ao L-BApNA sugere que TGPK e TGPCR se ligam com alta afinidade a tripsinas de lepidópteros desde que este substrato é eficientemente utilizado para avaliar as atividades de enzimas tripsina-like, como mostrado em outros lugares (do Amaral et al., 2022; Oliveira et al., 1993; Patarroyo-Vargas et al., 2020). Embora os peptídeos derivados de SKTI tenham apresentado uma energia livre de ligação negativa, sugerindo interação espontânea com tripsinas de insetos Lepidoptera, altas concentrações no meio reacional (fisiológico e *in vitro*) podem ser necessárias para inibir eficientemente a interação de substratos semelhantes ao L-BApNA com as enzimas. A energia livre de ligação dos peptídeos e enzimas examinados neste estudo não se correlacionou com o número de interações que essas moléculas fizeram no sítio de interação, mas sim com a ligação a aminoácidos específicos do sítio ativo de enzimas semelhantes a tripsina (isto é, His57, Asp102, Ser195, Asp189, S195 e G197 (numeração de quimotripsinogênio). A interação direta com esses resíduos indicou boa incorporação no sítio ativo, pois são resíduos-chave para atividade de tripsinas-like - His57, Asp102 e Ser195 formam a tríade catalítica de tripsina - Asp189 está localizada na parte inferior do subsítio S1 e confere especificidade para aminoácidos básicos à enzima - S195 e G197 são dois resíduos que contribuem para a estabilização da carga parcial em evolução no intermediário tetraédrico durante o ciclo catalítico (HEDSTROM, 2002; OLIVEIRA et al., 1993).

As previsões de docking molecular indicaram que a maioria dos complexos peptídeo-tripsina fez contato direto com os principais resíduos do sítio ativo (HEDSTROM, 2002) de todas as isoformas de enzimas tipo tripsina de Lepidoptera, sugerindo um modo competitivo de inibição. Na inibição competitiva, o inibidor e o substrato ligam-se no mesmo local, e mudanças na molaridade do substrato podem abolir o efeito inibitório (ROBIN; REUVENI; URBACH, 2018). A presença de ligação desfavorável pode resultar na dificuldade de encaixar os peptídeos no sítio ativo devido a conflitos estéricos, o que pode afetar o efeito inibitório dos peptídeos. No entanto, uma interação desfavorável no encaixe molecular não significa necessariamente que o composto não seja um bom inibidor. Há muitas razões para isto (TAYLOR; JEWsbury; ESSEX, 2002), como: a flexibilidade do receptor não é

levada em consideração no encaixe molecular pelo PyRx, então, pode ser que o composto se encaixe devido ao efeito de encaixe induzido; outros efeitos pouco levados em conta na docagem molecular podem ter um papel crucial nas interações (solvente, entropia, interação com outros compostos do meio fisiológico, etc.); o composto pode ter um modo de ação inesperado.

Os peptídeos derivados de BPTI são inibidores mais potentes de enzimas tripsina-like de *A. gemmatalis* do que os inibidores derivados de SKTI. Os K_i aparentes dos peptídeos AVIMK e AVIMR são muito altos para serem considerados bons inibidores de peptídeos de enzimas tripsinas-like de lepidópteros. Outros estudos sobre inibidores peptídicos de RCLs de inibidores de protease com atividades anti-insetos mostram que o K_i varia de 0,005 mM a 4,31 mM (Meriño-Cabrera et al., 2022; Almeida Barros et al., 2022; Almeida Barros et al., 2021; Meriño-Cabrera et al., 2020; Saikhedkar et al., 2018, 2019; Spit et al., 2012). De fato, RCLs podem ser completamente dependentes da estrutura 3D de sua proteína parental. Por exemplo, o RCL do inibidor de protease SERPIN18 de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Noctuidae) é dependente do movimento da cadeia para inserir o RCL móvel em um domínio de folha β de seu alvo (GUO et al., 2015). Por outro lado, peptídeos derivados de BPTI, especialmente TGPCCK, apresentaram considerável capacidade em inibir enzimas tripsina-like de *A. gemmatalis*, evidenciado por constantes de inibição mais baixas do que peptídeos derivados de SKTI. Surpreendentemente, o peptídeo derivado de BPTI com lisina na posição P1 (isto é, TGPCCK) apresentou um K_i aproximadamente 4x menor do que o dos inibidores contendo arginina (isto é, TGPCR). Outros estudos sobre a cinética de *A. gemmatalis* sugerem que tripeptídeos e dipeptídeos contendo arginina na posição P1 apresentam maior afinidade do que aqueles contendo lisina (ALMEIDA BARROS et al., 2021; MERIÑO-CABRERA et al., 2022). No entanto, um estudo em que se variou o resíduo de aminoácido na posição P1 de um substrato contendo oito aminoácidos não mostrou preferência entre Arg e Lys nesta posição para tripsinas-like de insetos lepidópteros (LOPES et al., 2006). Além disso, os perfis farmacofóricos previram um maior número de ligações desfavoráveis entre TGPCR do que TGPCCK com tripsinas de lepidópteros. É possível que o grupo guanídio dos resíduos de arginina em peptídeos maiores possa promover impedimentos estéricos, prejudicando a capacidade da molécula de inibir a enzima.

Nossos resultados sugerem que peptídeos derivados do RCL de BPTI, especialmente TGPCCK, são candidatos promissores para otimização e uso no controle

integrado de *A. gemmatalis*. No entanto, são necessários ensaios biológicos para confirmar a capacidade inseticida. Embora os experimentos de inibição não tenham revelado boa atividade inibitória de tripsinas-like de *A. gemmatalis* para os peptídeos SKTI, ainda assim vale a pena testar suas atividades contra tripsinas de outros lepidópteros, tendo em vista que as análises *in silico* mostraram bons indicadores de afinidade. Os *insights* sobre a afinidade e o modo de ligação de isoformas de tripsinas-like alcalinas de insetos lepidópteros com pequenos peptídeos que podem ajudar no desenvolvimento de novas e aprimoradas formulações baseadas em IPs. Além disso, peptídeos com potencial inibitório também podem fazer parte de genes sintéticos contendo peptídeos em *tandem*.

5. REFERÊNCIAS

- A. GATEHOUSE, John. Prospects for Using Proteinase Inhibitors to Protect Transgenic Plants Against Attack by Herbivorous Insects. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 409–416, 2011. DOI: 10.2174/138920311796391142.
- A. JONGSMA, Maarten; BEEKWILDER, Jules. Co-Evolution of Insect Proteases and Plant Protease Inhibitors. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 437–447, 2011. DOI: 10.2174/138920311796391115.
- AHN, J. E.; SALZMAN, R. A.; BRAUNAGEL, S. C.; KOIWA, H.; ZHU-SALZMAN, K. Functional roles of specific bruchid protease isoforms in adaptation to a soybean protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, v. 13, n. 6, p. 649–657, 2004. DOI: 10.1111/j.0962-1075.2004.00523.x.
- ALMEIDA BARROS, Rafael; MERIÑO-CABRERA, Yaremis; VITAL, Camilo E.; SILVA JÚNIOR, Neilier R.; OLIVEIRA, Cauê N.; LESSA BARBOSA, Samuel; MARQUES GONÇALVES ASSIS, João V; RAMOS, Humberto JO; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. 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. DOI: 10.1002/ps.6191.
- AMBADAPADI, Sriram et al. Reactive Center Loop (RCL) Peptides Derived from Serpins Display Independent Coagulation and Immune Modulating Activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 6, p. 2874–2887, 2016. DOI: 10.1074/jbc.M115.704841.
- APOSTOLOPOULOS, Vasso et al. A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 430, 2021. DOI: 10.3390/molecules26020430.
- ARTHUR, David Ebuka; UZAIRU, Adamu. Molecular docking studies on the interaction of NCI anticancer analogues with human Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit. **Journal of King Saud University - Science**, v. 31, n. 4, p. 1151–1166, 2019. DOI: 10.1016/j.jksus.2019.01.011.
- ASCENZI, Paolo; BOCEDI, Alessio; BOLOGNESI, Martino; SPALLAROSSA, Andrea; COLETTA, Massimo; CRISTOFARO, Raimondo; MENEGATTI, Enea. The Bovine Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor (Kunitz Inhibitor): A Milestone Protein. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, n. 3, p. 231–251, 2003. DOI: 10.2174/1389203033487180.
- BALE, J. S.; VAN LENTEREN, J. C.; BIGLER, F. Biological control and sustainable food production. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1492, p. 761–776, 2008. DOI: 10.1098/rstb.2007.2182.
- BENNETT-GUERRERO, Elliott; SONG, Howard K.; ZHAO, Yue; FERGUSON, T. B.; GAMMIE, James S.; PETERSON, Eric D.; O'BRIEN, Sean M. Temporal Changes in the Use of Blood Products for Coronary Artery Bypass Graft Surgery in North America: An Analysis of the Society of Thoracic Surgeons Adult Cardiac

- Database. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 24, n. 5, p. 814–816, 2010. DOI: 10.1053/j.jvca.2010.06.003.
- BERGVINSON, David; GARCÍA-LARA, Silverio. **Genetic approaches to reducing losses of stored grain to insects and diseases. Current Opinion in Plant Biology**, 2004. DOI: 10.1016/j.pbi.2004.05.001.
- BERNARDI, Roberta; TEDESCHI, Gabriella; RONCHI, Severino; PALMIERI, Sandro. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like enzyme from larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Huñbner (Lepidoptera: pyralidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 8–9, p. 883–889, 1996. DOI: 10.1016/S0965-1748(96)00057-4.
- BEZERRA, César da Silva; OLIVEIRA, Carolina Turatti; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. Inga vera trypsin inhibitor interferes in the proteolytic activity and nutritional physiology of *Ephesia kuehniella* larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 2017. DOI: 10.1111/eea.12605.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistics Notes: Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). **BMJ**, v. 317, n. 7172, p. 1572–1580, 1998. DOI: 10.1136/bmj.317.7172.1572.
- BOJKOVA, Denisa et al. Aprotinin Inhibits SARS-CoV-2 Replication. **Cells**, v. 9, n. 11, p. 2377, 2020. DOI: 10.3390/cells9112377.
- BOLDT, P. E.; BIEVER, K. D.; IGNOFFO, C. M. Lepidopteran Pests of Soybeans: Consumption of Soybean Foliage and Pods and Development Time. **Journal of Economic Entomology**, v. 68, n. 4, p. 480–482, 1975. DOI: 10.1093/jee/68.4.480.
- BOND, J. G.; RAMÍREZ-OSORIO, A.; MARINA, C. F.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; LIEDO, P.; DOR, A.; WILLIAMS, T. Efficiency of two larval diets for mass-rearing of the mosquito *Aedes aegypti*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187420, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0187420.
- BORJIGIN, J.; NATHANS, J. Bovine pancreatic trypsin inhibitor-trypsin complex as a detection system for recombinant proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 1, p. 337–341, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.1.337.
- BRAGA, Anna Rafaela Cavalcante; DE ROSSO, Veridiana Vera; HARAYASHIKI, Cyntia Ayumi Yokota; JIMENEZ, Paula Christine; CASTRO, Ítalo Braga. Global health risks from pesticide use in Brazil. **Nature Food**, v. 1, n. 6, p. 312–314, 2020. DOI: 10.1038/s43016-020-0100-3.
- BREUGELMANS, Bert; SIMONET, Gert; VAN HOEF, Vincent; VAN SOEST, Sofie; VANDEN BROECK, Jozef. Pacifastin-related peptides: Structural and functional characteristics of a family of serine peptidase inhibitors. **Peptides**, v. 30, n. 3, p. 622–632, 2009. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.07.026.
- BROADWAY, Roxanne M.; DUFFEY, Sean S.; PEARCE, Gregory; RYAN, Clarence A. Plant Proteinase inhibitors: A defense against herbivorous insects? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 41, n. 1, p. 33–38, 1986. DOI: 10.1111/j.1570-7458.1986.tb02168.x.

- BUENO, A. F.; PANIZZI, A. R.; HUNT, T. E.; DOURADO, P. M.; PITTA, R. M.; GONÇALVES, J. Challenges for Adoption of Integrated Pest Management (IPM): the Soybean Example. **Neotropical Entomology**, v. 50, n. 1, p. 5–20, 2021. DOI: 10.1007/s13744-020-00792-9.
- CARNEIRO, Eliane; SILVA, Luciana Barboza; SILVA, Alexandre Faria Da; LOPES, Gleidyane Novais; PAVAN, Bruno Ettore; RODRIGUES, Raimundo Henrique Ferreira; CARVALHINHO, Diego Tavares; MIELEZRSKI, Diego Fabio. Lepidopteran pests associated with the soybean cultivars phenology. **Bioscience Journal**, p. 112–121, 2018. DOI: 10.14393/BJ-v34n1a2018-37172.
- CASIDA, John E.; QUISTAD, Gary B. **Golden age of insecticide research: Past, present, or future?** **Annual Review of Entomology**, 1998. DOI: 10.1146/annurev.ento.43.1.1.
- CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; GRANT, W. P.; GREAVES, J.; TATCHELL, G. M. Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability. **Trends in Food Science and Technology**, 2008. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.12.009.
- CHRISTELLER, J. T.; LAING, W. A.; MARKWICK, N. P.; BURGESS, E. P. J. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: Dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, n. 7, p. 735–746, 1992. DOI: 10.1016/0965-1748(92)90052-G.
- CIEMNY, Maciej; KURCINSKI, Mateusz; KAMEL, Karol; KOLINSKI, Andrzej; ALAM, Nawsad; SCHUELER-FURMAN, Ora; KMIECIK, Sebastian. Protein–peptide docking: opportunities and challenges. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 8, p. 1530–1537, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.05.006>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644617305937>.
- COMEAU, S. R.; GATCHELL, D. W.; VAJDA, S.; CAMACHO, C. J. ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server, p. W96–W99, 2004. DOI: 10.1093/nar/gkh354.
- COPELAND, Robert A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. [s.l.] : Wiley, 2013. DOI: 10.1002/9781118540398.
- CRUZ, Ana C. B. et al. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from *Catanduva* (*Piptadenia moniliformis*) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 61–68, 2013. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.04.023.
- DANTZGER, Miriam; VASCONCELOS, Ilka Maria; SCORSATO, Valéria; APARICIO, Ricardo; MARANGONI, Sergio; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. Bowman–Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical properties and insecticidal potential. **Phytochemistry**, v. 118, p. 224–235, 2015. DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.08.013.
- DASTRANJ, M.; BORZOU, E.; BANDANI, A. R.; FRANCO, O. L. Inhibitory effects of an extract from non-host plants on physiological characteristics of two major cabbage pests. **Bulletin of Entomological Research**, v. 108, n. 3, p. 370–379, 2018. DOI: 10.1017/S0007485317000864.
- DAVIS, Rick; WHITTINGTON, Ruth. Aprotinin. **Drugs**, v. 49, n. 6, p. 954–983, 1995. DOI: 10.2165/00003495-199549060-00008.

- DE OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho; DE PAULA SOUZA, Thaís; PARRA, José Roberto Postali; MARANGONI, Sergio; DE CASTRO SILVA-FILHO, Marcio; MACEDO, Maria Ligia Rodrigues. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, 2013. DOI: 10.1016/j.cbpb.2013.02.008.
- DÍAZ, Katy; ESPINOZA, Luis; CARVAJAL, Rodrigo; CONDE-GONZÁLEZ, Marcos; NIEBLA, Vladimir; OLEA, Andrés F.; COLL, Yamilet. Biological Activities and Molecular Docking of Brassinosteroids 24-Norcholane Type Analogs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1832, 2020. DOI: 10.3390/ijms21051832.
- DO AMARAL, Milena; FREITAS, Ana Camila Oliveira; SANTOS, Ariana Silva; DOS SANTOS, Everton Cruz; FERREIRA, Monaliza Macêdo; DA SILVA GESTEIRA, Abelmon; GRAMACHO, Karina Peres; MARINHO-PRADO, Jeanne Scardini; PIROVANI, Carlos Priminho. TcTI, a Kunitz-type trypsin inhibitor from cocoa associated with defense against pathogens. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 698, 2022. DOI: 10.1038/s41598-021-04700-y.
- DOSA, Stefan; STIRNBERG, Marit; LÜLSENDORFF, Verena; HÄUSSLER, Daniela; MAURER, Eva; GÜTSCHOW, Michael. Active site mapping of trypsin, thrombin and matriptase-2 by sulfamoyl benzamidines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 21, p. 6489–6505, 2012. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.08.042.
- DUNSE, K. M.; KAAS, Q.; GUARINO, R. F.; BARTON, P. A.; CRAIK, D. J.; ANDERSON, M. A. Molecular basis for the resistance of an insect chymotrypsin to a potato type II proteinase inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 34, p. 15016–15021, 2010. DOI: 10.1073/pnas.1009327107.
- ELLERT-MIKLASZEWSKA, Aleksandra; POLESZAK, Katarzyna; KAMINSKA, Bozena. Short peptides interfering with signaling pathways as new therapeutic tools for cancer treatment. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 199–221, 2017. DOI: 10.4155/fmc-2016-0189.
- ELZEN, Gary W.; HARDEE, Dick D. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on managing insect resistance to insecticides. **Pest Management Science**, 2003. DOI: 10.1002/ps.659.
- ERLANGER, Bernard F.; KOKOWSKY, Nicholas; COHEN, William. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1961. a. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X.
- ERLANGER, Bernard F.; KOKOWSKY, Nicholas; COHEN, William. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, n. 2, p. 271–278, 1961. b. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X.
- FATHIPOUR, Yaghub; SEDARATIAN, Amin; BAGHERI, Abdoolnabi; TALAEI-HASSANLOUEI, Reza. Increased food utilization indices and decreased proteolytic activity in *Helicoverpa armigera* larvae fed sublethal *Bacillus thuringiensis* -treated diet. **Physiological Entomology**, v. 44, n. 3–4, p. 178–186, 2019. DOI: 10.1111/phen.12288.

- FAUSTINO, Verônica Aparecida et al. Soybean plants under simultaneous signals of drought and *Anticarsia gemmatalis* herbivory trigger gene expression and metabolic pathways reducing larval survival. **Environmental and Experimental Botany**, v. 190, p. 104594, 2021. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2021.104594.
- FIANDRA, L.; CASARTELLI, M.; CERMENATI, G.; BURLINI, N.; GIORDANA, B. The intestinal barrier in lepidopteran larvae: Permeability of the peritrophic membrane and of the midgut epithelium to two biologically active peptides. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 1, p. 10–18, 2009. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2008.09.005.
- FINN, Robert D. et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkv1344.
- GASTEIGER, E. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3784–3788, 2003. DOI: 10.1093/nar/gkg563.
- GEPPERT, Tim; HOY, Benjamin; WESSLER, Silja; SCHNEIDER, Gisbert. Context-Based Identification of Protein-Protein Interfaces and “Hot-Spot” Residues. **Chemistry & Biology**, v. 18, n. 3, p. 344–353, 2011. DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.01.005.
- GIRARD, Cécile; LE MÉTAYER, Martine; BONADÉ-BOTTINO, Michel; PHAM-DELÈGUE, Minh-Hà; JOUANIN, Lise. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 229–237, 1998. DOI: 10.1016/S0965-1748(98)00027-7.
- GIRI, Ashok P.; HARSULKAR, Abhay M.; DESHPANDE, Vasanti V.; SAINANI, Mohini N.; GUPTA, Vidya S.; RANJEKAR, Prabhakar K. Chickpea Defensive Proteinase Inhibitors Can Be Inactivated by Podborer Gut Proteinases1. **Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 393–401, 1998. DOI: 10.1104/pp.116.1.393.
- GLENNON, Richard A. et al. Binding of *O*-Alkyl Derivatives of Serotonin at Human 5-HT_{1Dβ} Receptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 314–322, 1996. DOI: 10.1021/jm950498t.
- GRANDE, Marcela Laiz Mora; RANDO, Jael Simões Santos. Integrated pest control adopted by soybean and corn farmers in Londrina, Paraná state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, n. 0, 2018. DOI: 10.1590/1808-1657000242015.
- GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium¹²³. **Journal of Economic Entomology**, 1976. DOI: 10.1093/jee/69.4.487.
- GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl, p. W270–W277, 2011. DOI: 10.1093/nar/gkr366.
- GROVER, Sheetanshu; KAUR, Satvir; GUPTA, Anil Kumar; TAGGAR, Gaurav Kumar; KAUR, Jagmeet. Characterization of Trypsin Like Protease from *Helicoverpa armigera* (Hubner) and Its Potential Inhibitors. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, v. 88, n. 1, p. 49–56, 2018. DOI: 10.1007/s40011-016-0732-0.

- GUO, Peng-Chao; DONG, Zhaoming; ZHAO, Ping; ZHANG, Yan; HE, Huawei; TAN, Xiang; ZHANG, Weiwei; XIA, Qingyou. Structural insights into the unique inhibitory mechanism of the silkworm protease inhibitor serpin18. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11863, 2015. DOI: 10.1038/srep11863.
- HAGGAG, Yusuf A. Peptides as Drug Candidates: Limitations and Recent Development Perspectives. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 8, n. 4, 2018. DOI: 10.26717/BJSTR.2018.08.001694.
- HANSSON, Tomas; MARELIUS, John; ÅQVIST, Johan. Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, 1998. DOI: 10.1023/A:1007930623000.
- HARTL, Markus; GIRI, Ashok P.; KAUR, Harleen; BALDWIN, Ian T. The multiple functions of plant serine protease inhibitors. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 7, p. 1009–1011, 2011. DOI: 10.4161/psb.6.7.15504.
- HEDSTROM, Lizbeth. Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501–4524, 2002. DOI: 10.1021/cr000033x.
- HEGEDUS, Dwayne; BALDWIN, Doug; O'GRADY, Michael; BRAUN, Lorraine; GLEDDIE, Steve; SHARPE, Andrew; LYDIATE, Derek; ERLANDSON, Martin. Midgut proteases from *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: Characterization, cDNA cloning, and expressed sequence tag analysis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 53, n. 1, p. 30–47, 2003. DOI: 10.1002/arch.10084.
- HEMATI, S. A.; NASERI, B.; GANBALANI, G. Nouri; DASTJERDI, H. Rafiee; GOLIZADEH, A. Effect of Different Host Plants on Nutritional Indices of the Pod Borer, *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Science**, v. 12, n. 55, p. 1–15, 2012. DOI: 10.1673/031.012.5501.
- HERREBOUT, W. A.; SUHM, M. A. Weak hydrogen bonds – strong effects? **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 31, p. 13858, 2011. DOI: 10.1039/c1cp90110a.
- HOLTOF, Michiel; LENAERTS, Cynthia; CULLEN, Darron; VANDEN BROECK, Jozef. Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut. **Cell and Tissue Research**, v. 377, n. 3, p. 397–414, 2019. DOI: 10.1007/s00441-019-03031-9.
- HORIKOSHI, Renato J. et al. Resistance status of lepidopteran soybean pests following large-scale use of MON 87701 × MON 89788 soybean in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 21323, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-00770-0.
- HUANG, Jing; RAUSCHER, Sarah; NAWROCKI, Grzegorz; RAN, Ting; FEIG, Michael; DE GROOT, Bert L.; GRUBMÜLLER, Helmut; MACKERELL, Alexander D. CHARM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. **Nature Methods**, v. 14, n. 1, p. 71–73, 2017. DOI: 10.1038/nmeth.4067.
- JADHAV, Abhilash R.; WAR, Abdul R.; NIKAM, Ashwini N.; ADHAV, Anmol S.; GUPTA, Vidya S.; SHARMA, Hari C.; GIRI, Ashok P.; TAMHANE, Vaijayanti A.

Capsicum annum proteinase inhibitor ingestion negatively impacts the growth of sorghum pest *Chilo partellus* and promotes differential protease expression. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 8, p. 302–309, 2016. DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.09.016.

JAMAL, Farrukh; PANDEY, Prabhash K.; SINGH, Dushyant; KHAN, M. Y. **Serine protease inhibitors in plants: Nature's arsenal crafted for insect predators. Phytochemistry Reviews**, 2013. DOI: 10.1007/s11101-012-9231-y.

JANIN, Joël; HENRICK, Kim; MOULT, John; EYCK, Lynn Ten; STERNBERG, Michael J. E.; VAJDA, Sandor; VAKSER, Ilya; WODAK, Shoshana J. CAPRI: A critical assessment of PRedicted interactions. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, 2003. DOI: 10.1002/prot.10381.

JANKOWSKA, Milena; ROGALSKA, Justyna; WYSZKOWSKA, Joanna; STANKIEWICZ, Maria. Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System—A Review. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 34, 2017. DOI: 10.3390/molecules23010034.

JUNG, Hyun Ah; ALI, Md Yousof; CHOI, Ran Joo; JEONG, Hyong Oh; CHUNG, Hae Young; CHOI, Jae Sue. Kinetics and molecular docking studies of fucosterol and fucoxanthin, BACE1 inhibitors from brown algae *Undaria pinnatifida* and *Ecklonia stolonifera*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 89, p. 104–111, 2016. DOI: 10.1016/j.fct.2016.01.014.

KAHLER, Ursula; FUCHS, Julian E.; GOETTIG, Peter; LIEDL, Klaus R. An unexpected switch in peptide binding mode: from simulation to substrate specificity. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2018. DOI: 10.1080/07391102.2017.1407674.

KALLURE, Gopal S.; KUMARI, Archana; SHINDE, Balkrishna A.; GIRI, Ashok P. Characterized constituents of insect herbivore oral secretions and their influence on the regulation of plant defenses. **Phytochemistry**, v. 193, p. 113008, 2022. DOI: 10.1016/j.phytochem.2021.113008.

KANT, M. R. et al. Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. **Annals of Botany**, v. 115, n. 7, p. 1015–1051, 2015. DOI: 10.1093/aob/mcv054.

KASPAR, Allan A.; REICHERT, Janice M. **Future directions for peptide therapeutics development. Drug Discovery Today**, 2013. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.05.011.

KATOCH, Rajan. Insect Pest Resistance Factors in Rice Bean. *In: Ricebean*. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 233–270. DOI: 10.1007/978-981-15-5293-9_14.

KELLEY, Lawrence A.; MEZULIS, Stefans; YATES, Christopher M.; WASS, Mark N.; STERNBERG, Michael J. E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.

KHAN, Hafiz Azhar Ali. Characterization of permethrin resistance in a *Musca domestica* strain: resistance development, cross-resistance potential and

- realized heritability. **Pest Management Science**, v. 75, n. 11, p. 2969–2974, 2019. DOI: 10.1002/ps.5409.
- KIMURA, S. Roy; BROWER, Richard C.; VAJDA, Sandor; CAMACHO, Carlos J. Dynamical View of the Positions of Key Side Chains in Protein-Protein Recognition. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 2, p. 635–642, 2001. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)76044-4.
- KOIDE, Takehiko; IKENAKA, Tokujji; TSUNASAWA, Susumu. Studies on Soybean Trypsin Inhibitors. 2. Amino-Acid Sequence around the Reactive Site of Soybean Trypsin Inhibitor (Kunitz). **European Journal of Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 408–416, 1973. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb02623.x.
- KORTBEEK, Ruy W. J.; VAN DER GRAGT, Michelle; BLEEKER, Petra M. Endogenous plant metabolites against insects. **European Journal of Plant Pathology**, v. 154, n. 1, p. 67–90, 2019. DOI: 10.1007/s10658-018-1540-6.
- KOZAKOV, Dima; HALL, David R.; XIA, Bing; PORTER, Kathryn A.; PADHORN, Dzmity; YUEH, Christine; BEGLOV, Dmitri; VAJDA, Sandor. The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature Protocols**, v. 12, n. 2, p. 255–278, 2017. DOI: 10.1038/nprot.2016.169.
- KUWAR, Suyog S.; PAUCHET, Yannick; VOGEL, Heiko; HECKEL, David G. Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut of *Helicoverpa armigera* in response to a plant protease inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2015. DOI: 10.1016/j.ibmb.2015.01.016.
- LAND, Henrik; HUMBLE, Maria Svedendahl. YASARA: A tool to obtain structural guidance in biocatalytic investigations. *In: Methods in Molecular Biology*. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1007/978-1-4939-7366-8_4.
- LEE, Andy Chi-Lung; HARRIS, Janelle Louise; KHANNA, Kum Kum; HONG, Ji-Hong. A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2383, 2019. DOI: 10.3390/ijms20102383.
- LEWIS, Sidney D.; NG, Assunta S.; BALDWIN, John J.; FUSETANI, Nobuhiro; NAYLOR, Adel M.; SHAFER, Jules A. Inhibition of thrombin and other trypsin-like serine proteinases by cyclotheonamide A. **Thrombosis Research**, v. 70, n. 2, p. 173–190, 1993. DOI: 10.1016/0049-3848(93)90158-K.
- LIANG, Guyan; PHILLIP BOWEN, J. Development of Trypsin-Like Serine Protease Inhibitors as Therapeutic Agents: Opportunities, Challenges, and their Unique Structure-Based Rationales. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 13, p. 1506–1529, 2016. DOI: 10.2174/1568026615666150915121447.
- LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; MARANA, S. R.; JULIANO, L.; TERRA, W. R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 130–140, 2006. DOI: 10.1016/j.ibmb.2005.11.006.
- MACALINO, Stephani Joy Y.; BASITH, Shaherin; CLAVIO, Nina Abigail B.; CHANG, Hyerim; KANG, Soosung; CHOI, Sun. Evolution of In Silico Strategies for Protein-Protein Interaction Drug Discovery. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1963, 2018. DOI: 10.3390/molecules23081963.

- MACHADO, Eduardo P. et al. Interspecific Variation in Susceptibility to Insecticides by Lepidopteran Pests of Soybean, Cotton, and Maize Crops From Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 2022. DOI: 10.1093/jee/toab265.
- MACHADO, Suzy Wider; DE OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho; ZÉRIO, Neide Graciano; PARRA, José Roberto Postali; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. *Inga laurina* trypsin inhibitor (ILTI) obstructs *Spodoptera frugiperda* trypsins expressed during adaptive mechanisms against plant protease inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 95, n. 4, p. e21393, 2017. DOI: 10.1002/arch.21393.
- MARKUS DITTRICH; CHALERMPOOL KANCHANAWARIN. **Case Study: BPTI2008**. p. 1–19.
- MEDIC, Jelena; ATKINSON, Christine; HURBURGH, Charles R. Current Knowledge in Soybean Composition. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 3, p. 363–384, 2014. DOI: 10.1007/s11746-013-2407-9.
- MENDONÇA, Eduardo G.; ALMEIDA BARROS, Rafael; CORDEIRO, Gláucia; SILVA, Carolina R.; CAMPOS, Wellington G.; OLIVEIRA, Joel A.; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Larval development and proteolytic activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to different soybean protease inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 1, 2020. DOI: 10.1002/arch.21637.
- MERIÑO-CABRERA, Yaremis; CASTRO, José Severiche; DE ALMEIDA BARROS, Rafael; DA SILVA JUNIOR, Neilier Rodrigues; DE OLIVEIRA RAMOS, Humberto; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Arginine-containing dipeptides decrease affinity of gut trypsins and compromise soybean pest development. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, p. 105107, 2022. DOI: 10.1016/j.pestbp.2022.105107.
- MERIÑO-CABRERA, Yaremis; OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Inhibition of digestive trypsins by plant Kunitz proteins reduces the viability of *Spodoptera cosmioides* larvae. **Annals of Applied Biology**, v. 175, n. 3, p. 336–349, 2019. a. DOI: 10.1111/aab.12539.
- MERIÑO-CABRERA, Yaremis; OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Inhibition of digestive trypsins by plant Kunitz proteins reduces the viability of *Spodoptera cosmioides* larvae. **Annals of Applied Biology**, v. 175, n. 3, p. 336–349, 2019. b. DOI: 10.1111/aab.12539.
- MERIÑO-CABRERA, Yaremis; SEVERICHE CASTRO, José Gregório; RIOS DIEZ, Juan Diego; RODRIGUES MACEDO, Maria Lígia; DE OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; GORETI DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria. Rational design of mimetic peptides based on the interaction between *Inga laurina* inhibitor and trypsins for *Spodoptera cosmioides* pest control. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, p. 103390, 2020. DOI: 10.1016/j.ibmb.2020.103390.
- MERSKI, Matthew; MOREIRA, Cátia; ABREU, Rui MV; RAMOS, Maria João; FERNANDES, Pedro A.; MARTINS, L. Miguel; PEREIRA, Pedro José Barbosa; MACEDO-RIBEIRO, Sandra. Molecular motion regulates the activity of the

- Mitochondrial Serine Protease HtrA2. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 10, p. e3119–e3119, 2017. DOI: 10.1038/cddis.2017.487.
- MICHAUD, D.; CANTIN, L.; VRAIN, T. C. Carboxy-Terminal Truncation of Oryzacysatin II by Oryzacytatin-Insensitive Insect Digestive Proteinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 322, n. 2, p. 469–474, 1995. DOI: 10.1006/abbi.1995.1490.
- MIRZAEI, Mahta; MIRDAMADI, Saeed; SAFAVI, Maliheh; SOLEYMANZADEH, Nazila. The stability of antioxidant and ACE-inhibitory peptides as influenced by peptide sequences. **LWT**, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109710.
- MOCZYDLOWSKI, Edward; MOSS, Guy W. J.; LUCCHESI, Kathryn J. Bovine pancreatic trypsin inhibitor as a probe of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels at an internal site of interaction. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 1, p. 21–28, 1992. DOI: 10.1016/0006-2952(92)90656-4.
- MOREIRA, Irina S.; FERNANDES, Pedro A.; RAMOS, Maria J. Hot spots-A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 68, n. 4, p. 803–812, 2007. DOI: 10.1002/prot.21396.
- NAPOLEÃO, Thiago H.; ALBUQUERQUE, Lidiane P.; SANTOS, Nataly DL; NOVA, Isabella CV; LIMA, Thâmarah A.; PAIVA, Patrícia MG; PONTUAL, Emmanuel V. Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. **Pest Management Science**, v. 75, n. 5, p. 1212–1222, 2019. DOI: 10.1002/ps.5233.
- NAUEN, Ralf; STEINBACH, Denise. Resistance to diamide insecticides in lepidopteran pests. *In: Advances in Insect Control and Resistance Management*. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1007/978-3-319-31800-4_12.
- NOWICKI, Patryk; KUCZER, Mariola; SCHROEDER, Grzegorz; CZARNIEWSKA, Elżbieta. Disruption of insect immunity using analogs of the pleiotropic insect peptide hormone Neb-colloostatin: a nanotech approach for pest control II. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 9459, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-87878-5.
- OERKE, E. C. **Crop losses to pests**. **Journal of Agricultural Science**, 2006. DOI: 10.1017/S0021859605005708.
- OLIVEIRA, M. G. A.; DE SIMONE, S. G.; XAVIER, L. P.; GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, n. 3, p. 369–380, 2005. DOI: 10.1016/j.cbpc.2004.10.018.
- OLIVEIRA, M. G.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. Identification by covalent labeling with p-diazoniumbenzamidinium and kinetic characterization of Tyr-151-(p-benzamidino)-azo-beta-trypsin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 36, p. 26893–26903, 1993. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)74195-7.

- OONINCX, Dennis G. A. B.; VAN BROEKHOVEN, Sarah; VAN HUIS, Arnold; VAN LOON, Joop J. A. Feed Conversion, Survival and Development, and Composition of Four Insect Species on Diets Composed of Food By-Products. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0144601, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0144601.
- OPPERT, Brenda; MORGAN, Tom D.; KRAMER, Karl J. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin and protease inhibitors against coleopteran storage pests. **Pest Management Science**, v. 67, n. 5, p. 568–573, 2011. DOI: 10.1002/ps.2099.
- PANDEY, Ankesh; YADAV, Reena; KUMAR, Sanoj; KUMAR, Anil; SHUKLA, Priya; YADAV, Ankita; SANYAL, Indraneel. Expression of the entomotoxic *Cocculus hirsutus* trypsin inhibitor (ChTI) gene in transgenic chickpea enhances its underlying resistance against the infestation of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 146, n. 1, p. 41–56, 2021. DOI: 10.1007/s11240-021-02041-2.
- PANDEY, Ankesh; YADAV, Reena; SANYAL, Indraneel. Evaluating the pesticidal impact of plant protease inhibitors: lethal weaponry in the co-evolutionary battle. **Pest Management Science**, 2021. DOI: 10.1002/ps.6659.
- PARDE, Vinod D.; SHARMA, Hari C.; KACHOLE, Manvendra S. In vivo inhibition of *Helicoverpa armigera* gut pro-proteinase activation by non-host plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 9, p. 1315–1324, 2010. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2010.04.003.
- PATARROYO-VARGAS, ADRIANA M.; CORDEIRO, GLÁUCIA; SILVA, CAROLINA R. Da; SILVA, CAMILA R. Da; MENDONÇA, EDUARDO G.; VISÔTTO, LILIANE E.; ZANUNCIO, JOSÉ C.; CAMPOS, WELLINGTON G.; OLIVEIRA, MARIA GORETI A. Inhibition kinetics of digestive proteases for *Anticarsia gemmatalis*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. suppl 1, 2020. DOI: 10.1590/0001-3765202020180477.
- PATARROYO-VARGAS, Adriana M.; MERINO-CABRERA, Yaremis B.; ZANUNCIO, Jose C.; ROCHA, Francelina; CAMPOS, Wellington G.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, Maria Goreti. Kinetic Characterization of *Anticarsia gemmatalis* Digestive Serine-Proteases and the Inhibitory Effect of Synthetic Peptides. **Protein & Peptide Letters**, v. 24, n. 11, 2018. DOI: 10.2174/0929866524666170918103146.
- PILON, ANDERSON M.; CAMPOS, WELLINGTON G.; SILVA, CAROLINA R.; CORDEIRO, GLAÚCIA; SILVA, CAMILA R.; OLIVEIRA, MARIA GORETI A. Protease inhibitory, insecticidal and deterrent effects of the trypsin-inhibitor benzamidine on the velvetbean caterpillar in soybean. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3475–3482, 2018. DOI: 10.1590/0001-3765201820180159.
- PIMENTEL, David; BURGESS, Michael. Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States. *In: Integrated Pest Management*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 47–71. DOI: 10.1007/978-94-007-7796-5_2.
- REISIG, Dominic D.; KURTZ, Ryan. Bt Resistance Implications for *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) Insecticide Resistance Management in the United States. **Environmental Entomology**, 2018. DOI: 10.1093/ee/nvy142.

- ROBIN, Tal; REUVENI, Shlomi; URBAKH, Michael. Single-molecule theory of enzymatic inhibition. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 779, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-02995-6.
- ROBINSON, David; BLISS, Edward. A model of the direct and indirect effects of aprotinin administration on the overall costs of coronary revascularization surgery in a university teaching hospital cardiothoracic unit. **Clinical Therapeutics**, v. 24, n. 10, p. 1677–1689, 2002. DOI: 10.1016/S0149-2918(02)80071-6.
- ROYCHAUDHURI, Robin; SARATH, Gautam; ZEECE, Michael; MARKWELL, John. Reversible denaturation of the soybean Kunitz trypsin inhibitor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 412, n. 1, p. 20–26, 2003. DOI: 10.1016/S0003-9861(03)00011-0.
- SACZEWSKI, Franciszek; BALEWSKI, Łukasz. Biological activities of guanidine compounds. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, n. 10, p. 1417–1448, 2009. DOI: 10.1517/13543770903216675.
- SAIKHEDKAR, Nidhi S.; JOSHI, Rakesh S.; BHOITE, Ashiwini S.; MOHANDASAN, Radhika; YADAV, Amit Kumar; FERNANDES, Moneesha; KULKARNI, Kiran A.; GIRI, Ashok P. Tripeptides derived from reactive centre loop of potato type II protease inhibitors preferentially inhibit midgut proteases of *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 95, p. 17–25, 2018. DOI: 10.1016/j.ibmb.2018.02.001.
- SAIKHEDKAR, Nidhi S.; JOSHI, Rakesh S.; YADAV, Amit K.; SEAL, Shubhendu; FERNANDES, Moneesha; GIRI, Ashok P. Phyto-inspired cyclic peptides derived from plant Pin-II type protease inhibitor reactive center loops for crop protection from insect pests. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 2019. DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.05.003.
- SANTOS, Lucianna H. S.; FERREIRA, Rafaela S.; CAFFARENA, Ernesto R. Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. *In*: [s.l: s.n.], p. 13–34. DOI: 10.1007/978-1-4939-9752-7_2.
- SHAMSI, Tooba Naz; PARVEEN, Romana; FATIMA, Sadaf. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 1120–1133, 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.069.
- SILVA JÚNIOR, Neilier R.; VITAL, Camilo E.; ALMEIDA BARROS, Rafael; FAUSTINO, Verônica A.; MONTEIRO, Luana P.; BARROS, Edvaldo; OLIVEIRA, Eugênio E.; OLIVEIRA RAMOS, Humberto J.; ALMEIDA OLIVEIRA, Maria G. Intestinal proteolytic profile changes during larval development of *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 1, 2020. DOI: 10.1002/arch.21631.
- SINGH, Raushan Kumar; TIWARI, Manish Kumar; KIM, In-Won; CHEN, Zhilei; LEE, Jung-Kul. Probing the Role of Sigma π Interaction and Energetics in the Catalytic Efficiency of Endo-1,4- β -Xylanase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8817–8821, 2012. DOI: 10.1128/AEM.02261-12.
- SINGH, Sujata; SINGH, Archana; KUMAR, Sumit; MITTAL, Pooja; SINGH, Indrakant K. **Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential**

biocontrol agent for insect pest management. *Insect Science*, 2020. DOI: 10.1111/1744-7917.12641.

- SOKALINGAM, Sriram; RAGHUNATHAN, Govindan; SOUNDARARAJAN, Nagasundarapandian; LEE, Sun-Gu. A Study on the Effect of Surface Lysine to Arginine Mutagenesis on Protein Stability and Structure Using Green Fluorescent Protein. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40410, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0040410.
- SONG, Hyun Kyu; SUH, Se Won. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator 1. Edited by R. Huber. **Journal of Molecular Biology**, v. 275, n. 2, p. 347–363, 1998. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1469.
- SOUTO, XÊNIA M.; BRANQUINHA, MARTA H.; SANTOS, ANDRÉ L. S. Chymotrypsin- and trypsin-like activities secreted by the multidrug-resistant yeasts forming the *Candida haemulonii* complex. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 3, 2019. DOI: 10.1590/0001-3765201920180735.
- SPIT, Jornt; BREUGELMANS, Bert; VAN HOEF, Vincent; SIMONET, Gert; ZELS, Sven; BROECK, Jozef Vanden. Growth-inhibition effects of pacifastin-like peptides on a pest insect: The desert locust, *Schistocerca gregaria*. **Peptides**, v. 34, n. 1, p. 251–257, 2012. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.06.019.
- SRINIVASAN, Ajay; GIRI, Ashok; GUPTA, Vidya. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 11, n. 1, 2006. DOI: 10.2478/s11658-006-0012-8.
- SWEDBERG, Joakim E.; DE VEER, Simon J.; SIT, Kei C.; REBOUL, Cyril F.; BUCKLE, Ashley M.; HARRIS, Jonathan M. Mastering the Canonical Loop of Serine Protease Inhibitors: Enhancing Potency by Optimising the Internal Hydrogen Bond Network. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e19302, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0019302.
- TABASHNIK, Bruce E.; CARRIÈRE, Yves. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 10, p. 926–935, 2017. DOI: 10.1038/nbt.3974.
- TAYLOR, R. D.; JEWSBURY, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, n. 3, p. 151–166, 2002. DOI: 10.1023/A:1020155510718.
- TERRA, Walter R.; FERREIRA, Clélia. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 1–62, 1994. DOI: 10.1016/0305-0491(94)90141-4.
- TOMARELLI, R.; CHARNEY, J.; HARDING, M. The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 34, n. 3, p. 428–433, 1949.
- UMETSU, Noriharu; SHIRAI, Yuichi. Development of novel pesticides in the 21st century. **Journal of Pesticide Science**, v. 45, n. 2, p. 54–74, 2020. DOI: 10.1584/jpestics.D20-201.

- USDA. **World Agricultural Production**. [s.l: s.n.].
- VAJRAVIJAYAN, Senthilvadivel; PLETNEV, Sergei; PLETNEV, Vladimir Z.; NANDHAGOPAL, Narayanasamy; GUNASEKARAN, Krishnasamy. Crystal structure of a novel Kunitz type inhibitor, alocasin with anti- *Aedes aegypti* activity targeting midgut proteases. **Pest Management Science**, v. 74, n. 12, p. 2761–2772, 2018. DOI: 10.1002/ps.5063.
- VOLPICELLA, Mariateresa; CORDEWENER, Jan; JONGSMA, Maarten A.; GALLERANI, Raffaele; CECI, Luigi R.; BEEKWILDER, Jules. Identification and characterization of digestive serine proteases from inhibitor-resistant *Helicoverpa zea* larval midgut☆. **Journal of Chromatography B**, v. 833, n. 1, p. 26–32, 2006. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.10.021.
- WALDBAUER, G. P. The Consumption and Utilization of Food by Insects. *In*: [s.l: s.n.]. p. 229–288. DOI: 10.1016/S0065-2806(08)60230-1.
- WAN, Shunzhou; KNAPP, Bernhard; WRIGHT, David W.; DEANE, Charlotte M.; COVENEY, Peter V. Rapid, Precise, and Reproducible Prediction of Peptide-MHC Binding Affinities from Molecular Dynamics That Correlate Well with Experiment. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 2015. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00179.
- WANG, Bo; XIE, Ningning; LI, Bo. **Influence of peptide characteristics on their stability, intestinal transport, and in vitro bioavailability: A review**. **Journal of Food Biochemistry**, 2019. DOI: 10.1111/jfbc.12571.
- WATERHOUSE, Andrew et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2018. DOI: 10.1093/nar/gky427.
- WOLDEMARIAM, Melkamu G.; AHERN, Kevin; JANDER, Georg; TZIN, Vered. A role for 9-lipoxygenases in maize defense against insect herbivory. **Plant Signaling & Behavior**, v. 13, n. 1, p. e1422462, 2018. DOI: 10.1080/15592324.2017.1422462.
- YANG, Limei; FANG, Zhiyuan; DICKE, Marcel; LOON, Joop J. A. van; JONGSMA, Maarten A. The diamondback moth, *Plutella xylostella*, specifically inactivates Mustard Trypsin Inhibitor 2 (MTI2) to overcome host plant defence. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2009. DOI: 10.1016/j.ibmb.2008.09.012.
- ZHAO, Aiping; LI, Yin; LENG, Chunmeng; WANG, Ping; LI, Yiping. Inhibitory Effect of Protease Inhibitors on Larval Midgut Protease Activities and the Performance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Frontiers in Physiology**, v. 9, 2019. a. DOI: 10.3389/fphys.2018.01963.
- ZHAO, Junnan; ZHU, Lu; ZHOU, Weineng; YIN, Lingfeng; WANG, Yuchen; FAN, Yuanrong; CHEN, Yadong; LIU, Haichun. In silico Prediction of Inhibitory Constant of Thrombin Inhibitors Using Machine Learning. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 21, n. 9, p. 662–669, 2019. b. DOI: 10.2174/1386207322666181220130232.
- ZHAO, Ping; WANG, Gen Hong; DONG, Zhao Ming; DUAN, Jun; XU, Ping Zhen; CHENG, Ting Cai; XIANG, Zhong Huai; XIA, Qing You. Genome-wide identification and expression analysis of serine proteases and homologs in the

silkworm *Bombyx mori*. **BMC Genomics**, 2010. DOI: 10.1186/1471-2164-11-405.

ZHIRNOV, O. P.; KLENK, H. D.; WRIGHT, P. F. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. **Antiviral Research**, v. 92, n. 1, p. 27–36, 2011. DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.07.014.

ZHOU, Aiwu; CARRELL, Robin W.; HUNTINGTON, James A. The Serpin Inhibitory Mechanism Is Critically Dependent on the Length of the Reactive Center Loop. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 29, p. 27541–27547, 2001. DOI: 10.1074/jbc.M102594200.

ZHU-SALZMAN, Keyan; ZENG, Rensen. Insect Response to Plant Defensive Protease Inhibitors. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 233–252, 2015. DOI: 10.1146/annurev-ento-010814-020816.

TABELAS

Tabela 1. Sequências de tripsinas-like obtidas do banco de dados NCBI.

Denomination	Species	NCBI Identifier
AgTry1	<i>A.</i>	AWL83213.1
AgTry2	<i>gemmatalis</i>	XP_012549322.3
SfTry1	<i>S. frugiperda</i>	XP_035433891.1
SfTry2		XP_035433885.1
HaTry1	<i>H. armigera</i>	XP_021200143.1
HaTry2		XP_021199089.1
SITry1	<i>S. litura</i>	XP_022815737.1
SITry2		XP_022814598.1

Tabela 2. Energia livre de ligação (Kcal/mol) da formação do complexo entre peptídeos /BApNA e enzimas alcalinas tripsina-like de insetos lepidópteros.

Receptor	Ligands				
	AVIMK	AVIMR	TGPCK	TGPCR	BApNA
AgTry1	-4,2	-4,4	-4,9	-4,6	-6,5
AgTry2	-5,9	-6	-6,5	-6,9	-5,8
SfTry1	-6,5	-6,7	-7,6	-7,7	-7,7
SfTry2	-4,9	-6,1	-6,8	-7	-6,9
HaTry1	-6,5	-6,7	-7	-6,6	-7,9
HaTry2	-4,8	-2,1	-5,7	-6	-7,3
SITry1	-5,3	-5,6	-6,6	-7	-6
SITry2	-3,9	-4,9	-4	-6,6	-5,4
Duncan's test	-5,25 ± 0,35A	-5,31 ± 0,54A	-6,14 ± 0,42B	-6,55 ± 0,33B	-6,69 ± 0,32B

Figura 2. Mapa de calor para análise de correlação de Pearson (r) entre os tipos de ligação química $\Delta G_{\text{BINDING}}$ envolvidos na formação do complexo entre os peptídeos (A) AVIMK, (B) AVIMR, (C) TGPCCK e (D) TGPCR e enzimas tripsina-like de insetos lepidópteros.

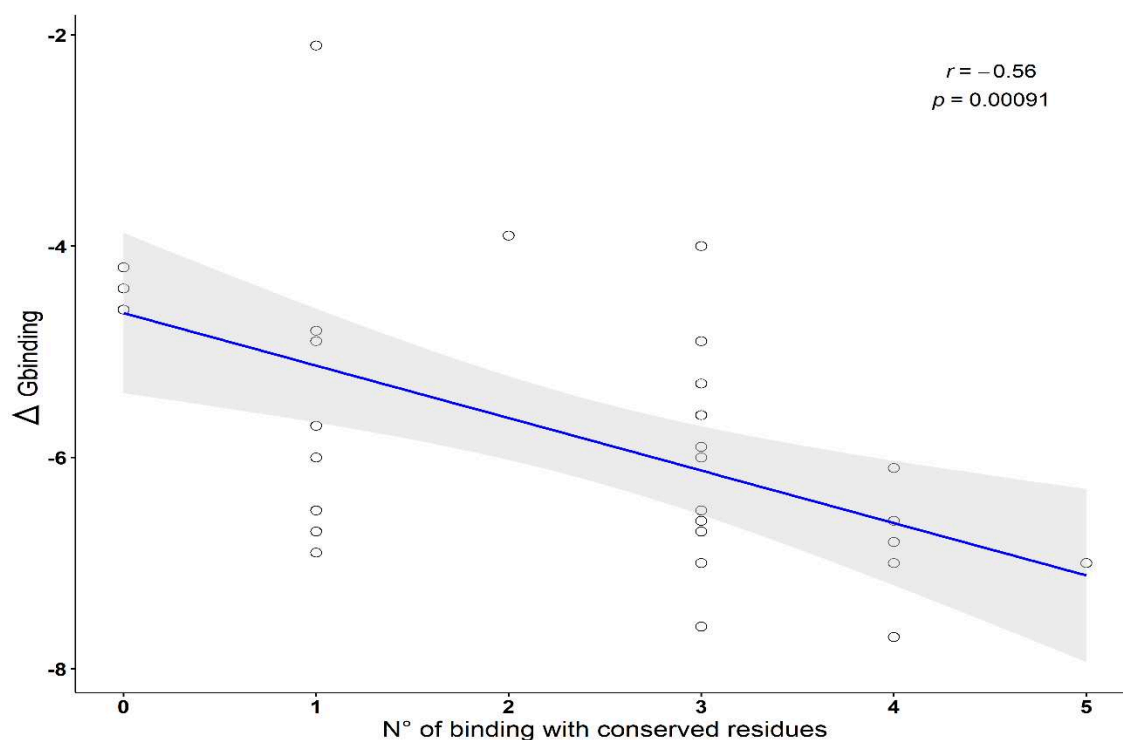


Figura 3. Representação da análise de correlação entre n° de ligação com resíduos conservados e energia livre de ligação. Os círculos abertos representam a energia livre de ligação e o número de interações com os resíduos do sítio ativo, isto é, His57, Asp102, Ser195, Asp189, S195 e G197 (numeração de Quimotripsinogênio) para cada um dos complexos formados entre tripsinas de lepidópteros e os peptídeos.

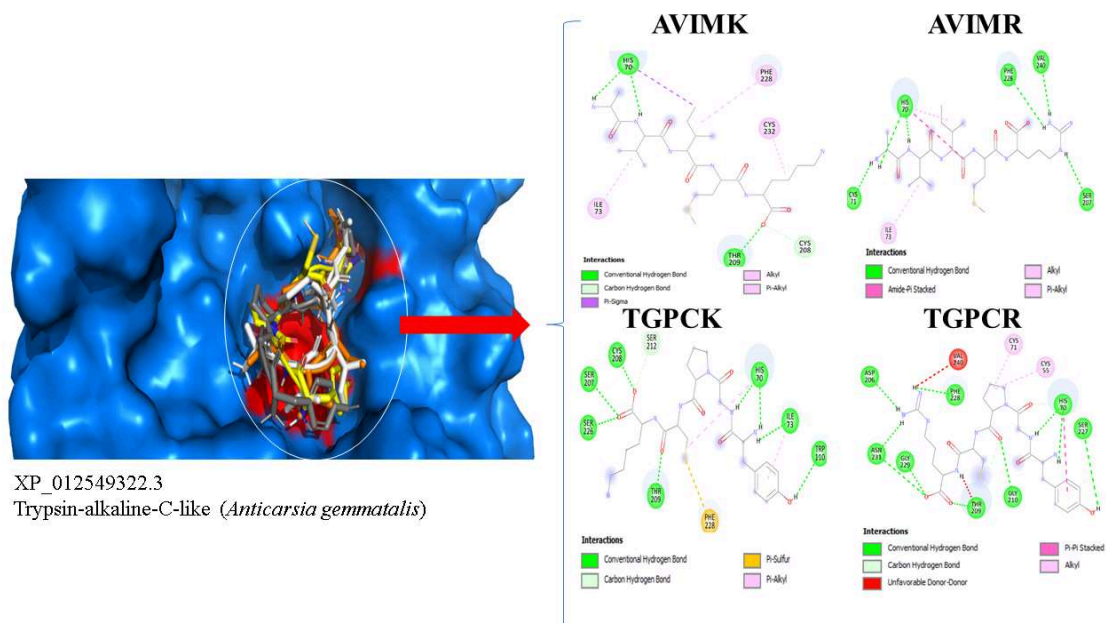


Figura 4. Representação farmacofórica de uma enzima tripsina-like (1TryAg) e peptídeos.

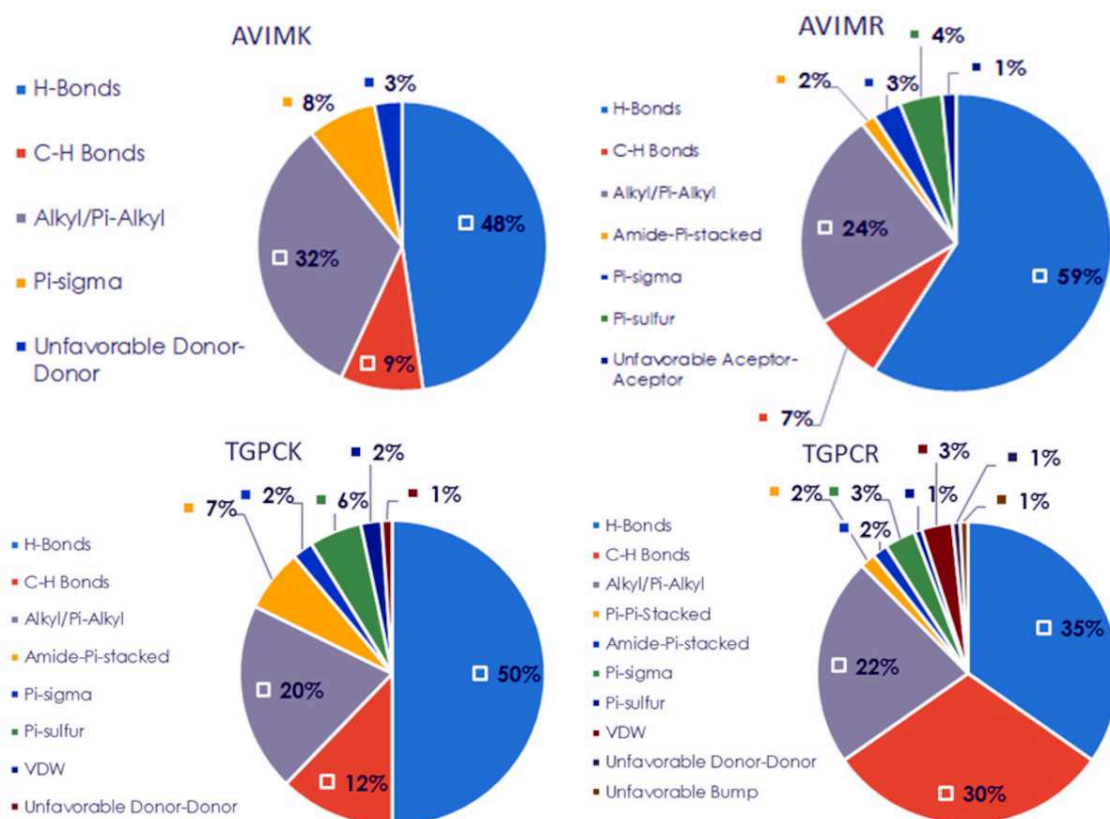


Figura 5. Tipos de ligações químicas formadas entre peptídeos e múltiplas isoformas de tripsina-like de insetos lepidópteros.

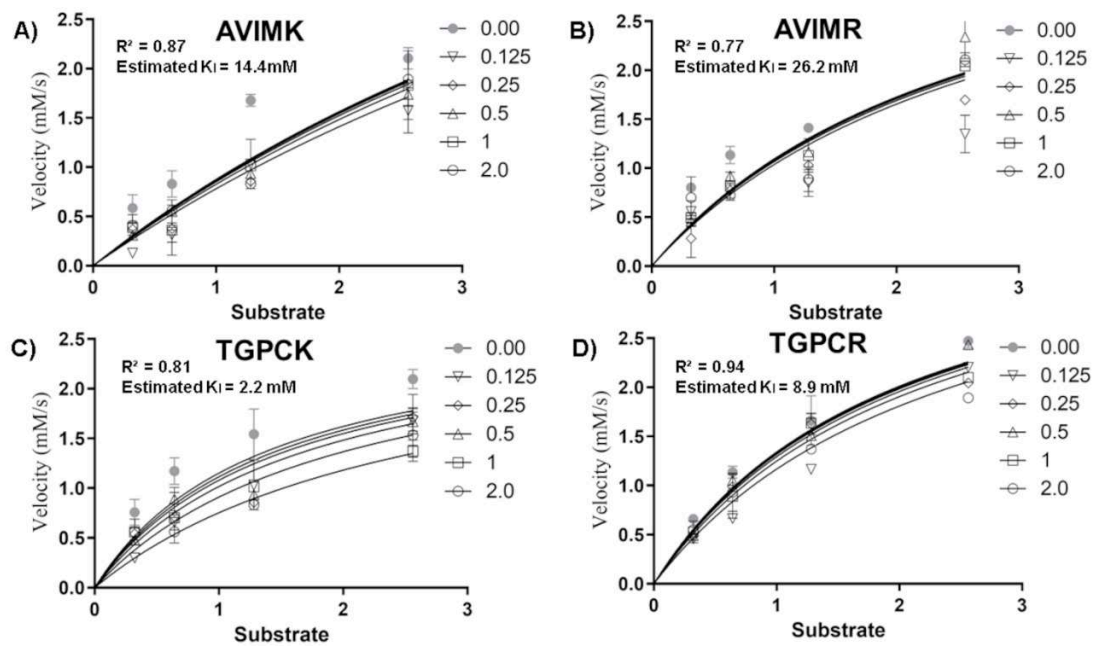


Figura 6. Método SNLR (Regressão Não Linear Simultânea) para análise de modelo de inibição competitiva dos peptídeos AVIMK e AVIMR (A e B) e TGPCCK e TGPCR (C e D), em proteases tripsina-like de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho, buscou-se avaliar a capacidade inibitória de inibidores de proteases proteicos sem associação próxima com pragas lepidópteros. Neste sentido, duas abordagens foram utilizadas para o desenvolvimento de novos inibidores peptídicos capazes de inibirem enzimas tripsinas-like de insetos lepidópteros.

Primeiramente, foram desenhados dois tripeptídeos com base em substratos aminoacil p-nitroanilina que apresentaram alta afinidade com tripsinas-like de *Anticarsia gemmatalis* em trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa. Após analisar a capacidade inibitória por meio de docking molecular e cinética enzimática destas moléculas, verificamos que a exposição crônica de larvas de *A. gemmatalis* por meio de dieta artificial aos peptídeos prejudicou o ciclo larval. Além disso, verificou-se que a capacidade inibitória de tripeptídeos é mais prolongada do que do SKTI, um inibidor de tripsinas-like naturalmente presente na soja.

No segundo capítulo, foram demonstrados os potenciais efeitos inseticidas do inibidor proteico de mamífero BPTI, que apresentou capacidade inseticida similar ao do SKTI, mas com efeito extra na redução de peso das pupas. Além disso, foram propostos e avaliados, novos potenciais peptídeos inibidores com base nos centros reativos do BPTI e SKTI. Neste caso, verificamos que os peptídeos baseados na estrutura do BPTI, apresentaram maior capacidade inibitória de tripsinas-like do que aqueles inspirados no SKTI.

Coletivamente, os resultados deste trabalho demonstram que peptídeos inibidores de proteases são uma promissora fonte de moléculas biológicas com potencial inseticida. Além disso, a avaliação do modo de interação com tripsinas-like de insetos lepidópteros fornece informações preciosas que podem ser utilizadas na otimização destas moléculas.

Os próximos passos para possibilitar a utilização de moléculas similares na agricultura devem envolver pesquisas que busquem melhorar parâmetros de estabilidade ambiental/fisiológica e toxicidade, que envolvam tecnologias de nanoencapsulamento e modificações estruturais moleculares. Além disso, genes sintéticos podem ser montados com base em peptídeos inibidores, para se criar proteínas inseticidas potentes, com múltiplos domínios inibitórios, que possam ser utilizadas para gerar organismos geneticamente modificados resistentes a lepidópteros.