

RAFAEL JÚNIOR DE ANDRADE

**MECANISMOS MOLECULARES DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PRAGAS
AGRÍCOLAS: *DESIGN*, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO DE
QUIMERA RECOMBINANTE DE INIBIDORES PEPTÍDICOS DE PROTEASES,
COM POTENCIAL BIOPESTICIDA, PARA O CONTROLE DE INSETOS**

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

Coorientadores: Humberto Josué de Oliveira
Ramos

Yaremis Beatriz Merinõ Cabrera

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

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

T

A553m
2024

Andrade, Rafael Júnior de, 1995-

Mecanismos moleculares da resistência de plantas a pragas agrícolas: design, expressão heteróloga e caracterização de quimera recombinantes de inibidores peptídicos de proteases, com potencial biopesticida para controle de insetos / Rafael Júnior de Andrade. – Viçosa, MG, 2024.

1 tese eletrônica (73 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.426>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cinética enzimática. 2. Soja - Doenças e pragas - Controle biológico. 3. Lagartas - Controle biológico. 4. Peptídeos - Purificação. 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. 572.744

RAFAEL JÚNIOR DE ANDRADE

**MECANISMOS MOLECULARES DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PRAGAS
AGRÍCOLAS: *DESIGN*, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO DE
QUIMERA RECOMBINANTE DE INIBIDORES PEPTÍDICOS DE PROTEASES,
COM POTENCIAL BIOPESTICIDA, PARA O CONTROLE DE INSETOS**

APROVADA: 26 de julho de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **RAFAEL JUNIOR DE ANDRADE**
Data: 30/07/2024 08:53:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rafael Júnior de Andrade
Autor

Documento assinado digitalmente
 **MARIA GORETI DE ALMEIDA OLIVEIRA**
Data: 30/07/2024 09:04:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Maria Goreti de Almeida Oliveira
Orientador

*Aos meus pais Nilda e Francisco, irmãos Júlio
e Hevetron e sobrinhos Jhulia, Cristhian, Drake e Tyler*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa (UFV), bem como ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, por me terem proporcionado um ambiente rico e de excelência em aprendizado em todas as áreas da minha vida.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro durante todo o processo desse trabalho.

Agradeço ao Bioagro - Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária e ao INCT – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Interações Planta-Praga, pelo ambiente de trabalho dinâmico e acolhedor.

Agradeço ao NuBioMol - Núcleo de Análises de Biomoléculas - CCB/UFV pelo suporte nas análises e execução de experimentos.

Expresso minha gratidão à professora Maria Goreti de Almeida Oliveira pela orientação, amizade e conselhos.

Aos coorientadores Humberto Josué de Oliveira Ramos e Yaremis Beatriz Meriño Cabrera, agradeço pela coorientação e todo suporte ao longo desses quatro anos.

Agradeço a todos do Laboratório de Enzimologia e Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, incluindo alunos de Iniciação Científica, mestrandos e doutorandos, pela amizade e pelos cafés da tarde.

Agradeço à doutora Angélica de Souza Gouveia, que me acolheu no início do meu doutoramento com bom grado e paciência, ensinando-me boa parte da metodologia de expressão heteróloga.

Ao professor Luciano Gomes Fietto, por ter me recebido tão bem no Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM), agradeço pelos conselhos e por esclarecer as dúvidas.

Agradeço ao LBM como um todo, bem como aos professores Tiago Antônio de Oliveira e Andréa de Oliveira Barros Ribon, e à pós-doutoranda Thays Vieira Bueno, que me deu suporte no momento de ambientação, e a todas as amigas feitas.

Agradeço muito a todas as amigas que conquistei nesse período de doutoramento, pelo apoio e pelos momentos de distração. Contudo, agradeço em especial a Halina Schutz e a Lucas Silva de Sousa, pois estar ao lado deles tornou essa caminhada mais leve.

"Para um bioquímico, o problema dos arranjos sequenciais de aminoácidos em proteínas é um desafio emocionante."

Frederick Sanger

RESUMO

ANDRADE, Rafael Júnior de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2024. **Mecanismos moleculares da resistência de plantas a pragas agrícolas: *design*, expressão heteróloga e caracterização de quimera recombinante de inibidores peptídicos de proteases, com potencial biopesticida, para o controle de insetos.** Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Humberto Josué de Oliveira Ramos, Yaremis Beatriz Merino Cabrera.

A soja é uma cultura de importância global, tendo o Brasil como um dos principais produtores. A lagarta *Anticarsia gemmatilis* é uma praga desfolhadora significativa, reduzindo consideravelmente a produtividade e a qualidade da soja. O controle de pragas geralmente depende de produtos fitossanitários e agroquímicos, mas seu uso excessivo impacta negativamente o meio ambiente e a saúde humana. As plantas produzem naturalmente metabólitos secundários e inibidores de protease (IPs) para se defender contra insetos. Esses IPs estão sendo estudados como alternativas potenciais aos inseticidas convencionais. Este estudo visa desenvolver e produzir por meio de expressão heteróloga um peptídeo quimérico recombinante (GORE 1,2T) com capacidade inseticida, potencialmente servindo como modelo para a produção de peptídeos miméticos ou para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a pragas. Uma sequência de nucleotídeos baseada em tripeptídeos inibidores de tripsina-like foi projetada e incorporada em um vetor plasmidial pET-41(a)+. Cepas de *E. coli* foram transformadas, e os peptídeos recombinantes foram expressos e purificados. A eficácia inibitória do peptídeo foi avaliada por meio de ensaios enzimáticos cinéticos utilizando extratos de intestino médio de *A. gemmatilis*. Além disso, análises de interação estrutural *in silico* entre o peptídeo e as tripsinas do inseto foram realizadas. A expressão e purificação do peptídeo recombinante foram alcançadas na cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli*. O peptídeo demonstrou capacidade inibitória competitiva contra tripsinas do intestino médio de *A. gemmatilis*, evidenciada pela alta afinidade do peptídeo pelos sítios de ligação da tripsina-like em ensaios *in vitro* e análises de *docking* molecular. O desenvolvimento e a expressão heteróloga do peptídeo GORE 1,2T provaram ser uma estratégia eficaz para inibir a atividade da protease digestiva em pragas agrícolas. Esses resultados abrem a possibilidade de usar tais peptídeos como uma alternativa sustentável aos inseticidas tradicionais, contribuindo para a proteção das culturas e reduzindo o impacto ambiental.

Palavras-chave: Cinética. Larvas. *Docking* molecular. Purificação. Tandem.

ABSTRACT

ANDRADE, Rafael Júnior de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2024. **Molecular mechanisms of plant resistance to agricultural pests: design, heterologous expression, and characterization of recombinant chimeric protease peptide inhibitors with biopesticide potential for insect control.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisers: Humberto Josué de Oliveira Ramos, Yaremis Beatriz Merino Cabrera.

Soybeans are a globally important crop, with Brazil as a leading producer. The caterpillar *Anticarsia gemmatilis* is a major defoliating pest, significantly reducing soybean yield and quality. Pest control typically relies on phytosanitary products and agrochemicals, but their overuse negatively impacts the environment and human health. Plants naturally produce secondary metabolites and protease inhibitors (PIs) to defend against insects. These PIs are being studied as potential alternatives to conventional insecticides. This study aims to develop and heterologous production of a recombinant chimeric peptide (GORE 1,2T) with insecticidal capacity, potentially serving as a model for producing mimetic peptides or developing transgenic pest-resistant plants. A nucleotide sequence based on trypsin inhibitor tripeptides was designed and incorporated into a pET-41(a)+ plasmid vector. *E. coli* strains were transformed, and the recombinant peptides were expressed and purified. The peptide's inhibition efficacy was evaluated through kinetic enzymatic assays using midgut extracts from *A. gemmatilis*. Additionally, *in silico* structural interaction analyses between the peptide and insect trypsins were performed. Successful expression and purification of the recombinant peptide were achieved in the BL21(DE3)pLysS strain of *E. coli*. The peptide demonstrated competitive inhibitory capacity against midgut trypsins from *A. gemmatilis*, evidenced by the peptide's high affinity for trypsin binding sites in *in vitro* assays and molecular *docking* analyses. The development and heterologous expression of GORE 1,2T peptide proved to be an effective strategy for inhibiting digestive protease activity in agricultural pests. These results open the possibility of using such peptides as a sustainable alternative to traditional insecticides, contributing to crop protection and reducing environmental impact.

Keywords: Kinetic. Larvae. Molecular docking. Purification. tandem.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
CAPÍTULO I.....	21
4. INTRODUÇÃO.....	22
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
CAPÍTULO II.....	34
7. INTRODUÇÃO.....	35
8. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
10. CONCLUSÃO.....	45
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXOS.....	52

1. INTRODUÇÃO

A soja é uma das principais *commodities* com maior impacto na economia mundial, e o Brasil desempenha um papel central em sua produção e comercialização (Hamza *et al.*, 2024). A lagarta *Anticarsia gemmatalis*, Hübner, 1918 (*Lepidoptera: Noctuidae*), representa a principal praga desfolhadora da cultura, afetando a produtividade e a qualidade do produto (Xiaoming & Qiong, 2018; De Menezes *et al.*, 2024). O controle dessa praga, assim como de outros insetos-praga da mesma ordem ou não, é realizado por meio de produtos fitossanitários, agroquímicos/inseticidas à base de moléculas orgânicas (mas não biomoléculas) ou cultivares transgênicas. Entretanto, o uso desses produtos tem se tornado indiscriminado e exacerbado, impactando negativamente o meio ambiente, as relações ecológicas e a saúde humana (Shao *et al.*, 2017; Baskar *et al.*, 2018).

Como mecanismo evolutivo de defesa contra o ataque de insetos, as plantas sintetizam várias moléculas, como metabólitos secundários e inibidores de proteases (IPs). Estes vêm sendo cada vez mais explorados por serem uma alternativa ao uso de inseticidas clássicos (Dhivya *et al.*, 2018). Os inibidores de proteases compreendem uma classe abundante de proteínas sintetizadas especialmente por plantas, que afetam o crescimento e desenvolvimento dos insetos pela inibição da atividade de proteases digestivas, acarretando uma privação de nutrientes (Saikhedkar *et al.*, 2018; Meriño-Cabrera *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2024). Entretanto, alguns insetos superam essas defesas naturais das plantas, seja por meio da expressão de proteases insensíveis ou da clivagem dos inibidores por outras proteases, uma vez que IPs naturais são moléculas grandes (Yang, 2009). Machado *et al.*, (2017) complementam que possivelmente os insetos superam esses inibidores naturais devido à baixa especificidade com o sítio ativo da protease alvo.

Em substituição aos defensivos agrícolas típicos e para resolver o problema das moléculas grandes de IPs, o desenvolvimento e a busca por IPs pequenos, altamente específicos e com capacidade de superar os mecanismos adaptativos vêm ocorrendo (Oliveira *et al.*, 1993; Krinski *et al.*, 2018; Meriño-Cabrera *et al.*, 2020). Este trabalho visa o desenho e a expressão de um peptídeo que atenda a todas essas demandas. No primeiro capítulo, serão abordados os aspectos relacionados ao desenho, clonagem, expressão e purificação do peptídeo denominado GORE1,2T. No segundo capítulo, discutiremos cinética e *docking* molecular, avaliando sua ação e modelo de inibição, bem como buscando melhor entendimento das regiões de interação entre o peptídeo GORE1,2T e as proteases tripsinas-like de *Anticarsia gemmatalis*. O peptídeo em questão tem sua sequência aminoacídica baseada em dois tripeptídeos, GORE 1 e GORE 2

(Barros *et al.*, 2021), que estão depositados em patente. Há perspectiva de serem utilizados em formulações biopesticidas, uma vez que demonstraram ser promissores para o controle de insetos.

Frente ao exposto, o presente estudo se justifica com base no aumento do uso indiscriminado de inseticidas não ecológicos no controle de insetos-praga, que causam danos ao meio ambiente e à saúde humana. Torna-se necessário o desenvolvimento de moléculas pequenas com capacidade de superar as adaptações aos inibidores de proteases presentes nesses insetos, e, com isso, utilizá-las no manejo da cultura da soja. Dessa forma, evita-se o uso indiscriminado de inseticidas convencionais, reduzindo os danos ao meio ambiente, à saúde humana e os prejuízos econômicos decorrentes do ataque de insetos-praga.

2. OBJETIVOS

Geral

Desenvolver um peptídeo quimérico recombinante com potencial biopesticida, que possua atividade inibitória de proteases digestivas do tipo tripsina-*like*, visando o controle de insetos lepidópteros, utilizando *Anticarsia gemmatalis* como modelo.

Específicos

- 1) Desenhar e clonar uma sequência de DNA-inserto contendo a sequência de bases do peptídeo recombinante a ser incorporado no vetor plasmidial de expressão;
- 2) Expressar de forma heteróloga em *E. coli* e purificar o peptídeo quimérico recombinante usando coluna de cromatografia de afinidade;
- 3) Confirmar a sequência do peptídeo quimérico por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS);
- 4) Extrair extrato bruto do intestino médio de *A. gemmatalis*
- 5) Determinar as constantes inibitórias (K_i) e os modelos de inibição do peptídeo recombinante purificado com proteases tripsina-*like* do extrato bruto do intestino médio de *A. gemmatalis* usando o substrato cromogênico L-BApNA.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Soja: interação planta-praga

A soja é a principal oleaginosa anual produzida e consumida no mundo e o principal produto do agronegócio brasileiro. Originária da Ásia, mais provavelmente do nordeste da China, onde surgiu como uma planta rasteira, muito distinta da soja comercial que cultivamos hoje. Quando a soja começou a ser realmente cultivada ainda é um mistério, entretanto a história da China relata que a soja tem importância desde 5.000 a.C. Contudo, foi na década de 1940 que o cultivo da soja cresceu no mundo, tendo os EUA liderado a produção e exportação mundial até os anos 1980. Dall'Agnol (2016) faz ressalva com relação ao salto na produção mundial de soja a partir dos anos 1960, em detrimento da queda da oferta de proteínas no mercado.

De Oliveira (2019) relata que “o primeiro registro de pesquisa de soja no Brasil data de 1882, mas não obteve êxito porque o material genético testado não era adaptado à região. O cultivo da soja teve início no Brasil na década de 40, no estado do Rio Grande do Sul, e se espalhou rapidamente pelo país nas décadas seguintes, tornando-se uma cultura bastante expressiva”. O aumento significativo da produtividade se deu devido à adoção de tecnologias e práticas agrícolas modernas (Hamza *et al.*, 2024). O cultivo da soja teve um impacto significativo na economia brasileira, uma vez que é uma cultura bastante produtiva, contribuindo para o aumento da produção de grãos no país. Além disso, a soja passou a ser um item de exportação relevante, trazendo divisas para o país. Contudo, há controvérsias sobre seus impactos ambientais e sociais, devido ao uso intensivo de defensivos agrícolas e às disputas por terras (Dall'Agnol 2016; De Oliveira, 2019).

A demanda por soja tem aumentado devido ao seu uso na alimentação animal e na produção de biocombustíveis. No entanto, há desafios, como o aumento da demanda por alimentos em um mundo em rápido crescimento populacional, a proteção do meio ambiente e a promoção da segurança alimentar. A pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias mais sustentáveis e produtivas são fundamentais para enfrentar esses desafios e garantir a continuidade do cultivo da soja (Hamza *et al.*, 2024).

As plantas, de modo geral, estão suscetíveis ao ataque de predadores artrópodes, bem como de entomopatógenos: nematoides, fungos, bactérias e vírus. Ao reconhecer um patógeno, as plantas demonstram uma notável capacidade de diferenciar o patógeno e, posteriormente,

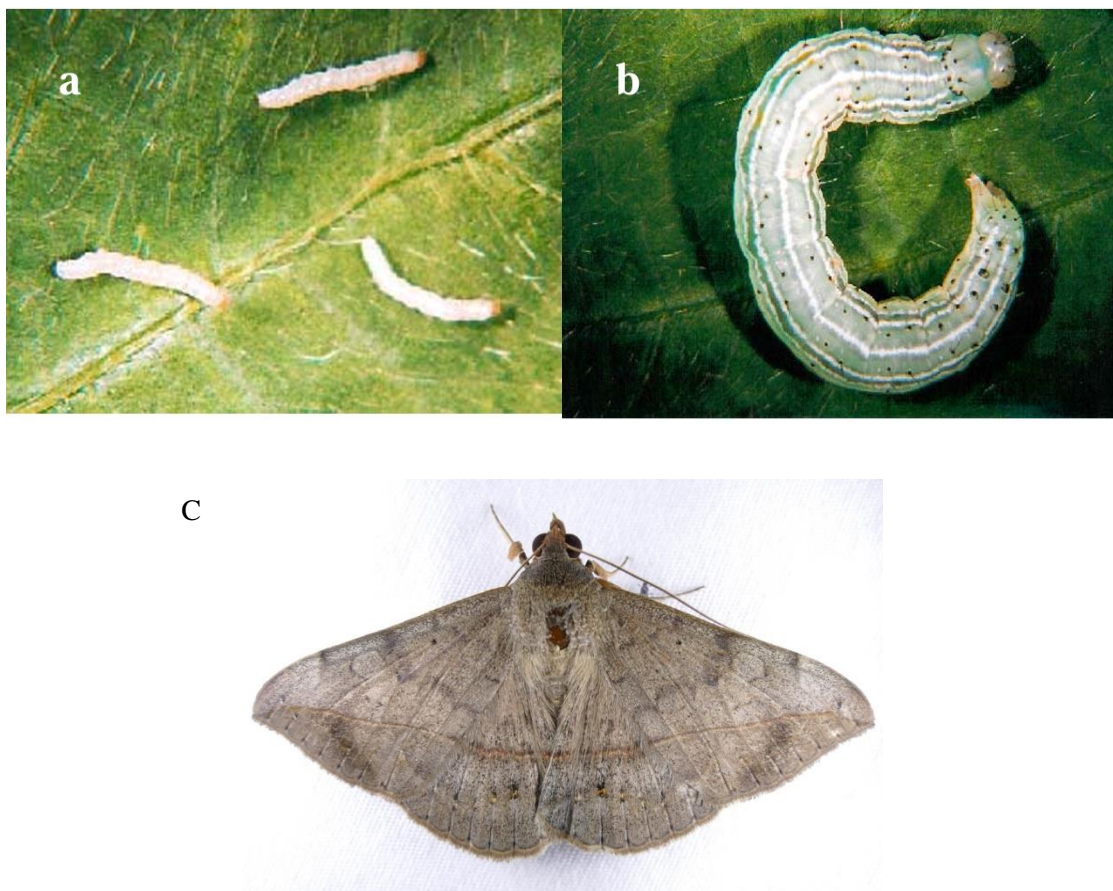
com base na natureza do patógeno, montar uma resposta de resistência destinada a cessar o crescimento do patógeno e o desenvolvimento da doença. As respostas de resistência das plantas incluem a ativação de defesas locais e sistêmicas (por exemplo, a expressão de proteínas relacionadas à patogênese) e a indução de morte celular localizada no local da infecção, denominada resposta hipersensível (HR). A HR é uma forma de morte celular programada (PCD) e compartilha algumas semelhanças moleculares e bioquímicas com a apoptose animal (Panneerselvam & Lakshmanan, 2009).

No caso da soja, o ataque por lepidópteros requer atenção, uma vez que esses indivíduos na fase juvenil são desfolhadores excepcionais, causando desfolhamento severo. Isso pode reduzir a área foliar disponível para a fotossíntese, comprometendo o crescimento e o desenvolvimento das plantas. O desfolhamento pode levar a uma diminuição na produção de grãos, pois as plantas ficam menos eficientes na produção de energia e nutrientes necessários para o desenvolvimento das vagens e grãos (Stojšin *et al.*, 2024). Em estágios mais avançados, as lagartas podem se alimentar diretamente das vagens, causando danos físicos que comprometem a qualidade e a quantidade dos grãos. O ataque contínuo e a perda de tecido foliar induzem um estresse fisiológico nas plantas, que podem redirecionar recursos para mecanismos de defesa em detrimento do crescimento e produção, ou seja, um estresse fisiológico. As lesões causadas pelas lagartas podem servir como porta de entrada para patógenos, aumentando a susceptibilidade das plantas a doenças. Os agricultores podem precisar recorrer a tratamentos químicos, aumentando os custos de produção, e potencialmente, causando impactos ambientais e problemas de resistência a inseticidas (Jiménez *et al.*, 2022). A lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*) está entre as principais desfolhadoras da cultura.

3.1.1. *Anticarsia gemmatalis*

No Brasil, as principais pragas desfolhadoras de soja são: a lagarta dasoja (*Anticarsia gemmatalis*) e a lagarta-falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*). Outras menos comuns também podem causar desfolha, como as lagartas-das-vagens, principalmente *Spodoptera cosmioides*, seguida de *Spodoptera eridania*, *Spodoptera albula* e *Spodoptera frugiperda* (Moscardi e Souza, 2002; Praça, 2006). A lagarta-da-soja (*A. gemmatalis*) (figura 1), movimenta as extremidades sincronizadamente e apresenta quatro pares de falsas pernas abdominais. Nos ínstares mais avançados, consome integralmente as folhas atacadas, inclusive as nervuras, e possui preferência por folíolos mais novos. Ocorre durante todo o ciclo da soja com tendência de apresentar maior densidade na fase inicial da cultura (Reginaldo, 2024).

Figura 1 - Larvas de segundo ínstar (a) de quinto ínstar (b) de *Anticarsia gemmatalis* e (c) Adulto



Fonte: Embrapa

PratissolI *et al.*, (2002) destaca que a presente espécie também ataca outras culturas, como da alfafa, do amendoim, do arroz, da ervilha, do feijão, do feijão-vagem e do trigo, atacando durante a fase vegetativa e, em alguns casos, até no período da floração. O crescimento-desenvolvimento da *A. gemmatilis* e seu consumo médio da área foliar é diretamente proporcional, na fase final de desenvolvimento que pode durar de 12 a 14 dias, 90cm² pode ser consumido até que seu desenvolvimento larval esteja completo (Gallo *et al.*, 2002; Praça, 2006). Aproximadamente em 30 dias, seu ciclo biológico está completo.

Para o controle da lagarta da soja, recomenda-se o manejo integrado de pragas, que envolve a integração de diversas técnicas de controle para a cultura, a fim de evitar a dependência exclusiva de produtos químicos (Gallo *et al.*, 2002; Matioli, 2016). Em substituição aos produtos químicos e ecologicamente correta, temos o controle biológico que abrange desde inimigos naturais, predadores, microrganismo a biomoléculas com peptídeos e proteínas (Oliveira, 2018).

Trabalhos como os de Moscardi (1999), Andrade (2004), Szewczyk *et al.*, (2006) Erlandson (2008) & Batista (2024) discutem o uso do baculovírus como forma de controle biológico, sendo uma alternativa ecológica. Contudo os mesmos autores apontam desvantagens como: baculovírus geralmente têm um tempo de ação mais lento em comparação com inseticidas químicos; A eficácia pode ser influenciada por fatores ambientais, como a exposição à luz solar (UV), temperatura e umidade; A aplicação pode ser mais complexa e requer técnicas específicas; A produção e a formulação em escala comercial podem ser dispendiosas; não tem uma persistência prolongada no ambiente, necessitando de reaplicações frequentes; menos comum do que com inseticidas químicos, existe a possibilidade de desenvolvimento de resistência por parte das populações de pragas; e são geralmente específicos para determinadas espécies de insetos, o que pode ser uma desvantagem em sistemas agrícolas onde múltiplas pragas estão presentes e precisam ser controladas simultaneamente.

Krinski *et al.*, (2018); Marinho-Prado *et al.*, (2019); Plata-Rueda *et al.*, (2022) discutem o uso de óleos essenciais como forma de controle, mas que também possuem desvantagens como: Óleos essenciais são altamente voláteis, o que pode reduzir sua eficácia ao longo do tempo; muitos óleos essenciais são sensíveis à luz; em quantidades suficientes para uso agrícola, pode ser cara a produção; há casos em que são necessárias concentrações relativamente altas de óleos essenciais para alcançar a eficácia desejada. Santos (2018) complementa que embora sejam naturais os óleos essenciais, podem ter efeitos negativos em organismos não alvo.

O uso de biomoléculas, como inibidores de proteases e peptídeos microbianos, oferece soluções sustentáveis e específicas para o manejo de pragas, sendo uma alternativa promissora

aos pesticidas químicos tradicionais (Samada *et al.*, 2020). A principal vantagem do uso de biomoléculas é a sua especificidade, uma vez que podem ser projetadas para serem altamente específicas para certas espécies de pragas, minimizando o impacto em organismos não alvo. Pesticidas químicos muitas vezes atuam por meio de mecanismos comuns, já os peptídeos e as proteínas podem ter modos de ação variados e específicos, dificultando a adaptação e o desenvolvimento de resistência pelas pragas. Pelo fato de muitas biomoléculas serem biodegradáveis, geralmente apresentam menor toxicidade para seres humanos e outros mamíferos (Hultmark, 1982; Jongsma & Bolter, 1997; Bravo *et al.*, 2011). Os mesmos autores que listaram as vantagens acima, também listam desafios e limitações, como: A produção em larga escala de peptídeos e proteínas bioinseticidas pode ser cara, o que pode limitar sua adoção em larga escala por pequenos agricultores; Biomoléculas podem ser instáveis sob condições ambientais adversas como altas temperaturas, luz ultravioleta (UV) e degradação microbiana, exigindo formulações especiais para proteger sua atividade; A aplicação eficiente de biomoléculas no campo pode ser desafiadora; Biomoléculas podem necessitar de tecnologias de liberação controlada para garantir sua eficácia. Em seu trabalho, Bravo *et al.*, (2011) revisa e descreve como as proteínas Cry, produzidas por *Bacillus thuringiensis* (Bt), são eficazes contra várias pragas, incluindo *A. gemmatilis*. As plantas transgênicas que expressam essas proteínas têm sido amplamente adotadas no controle de pragas.

O uso de biomoléculas, como peptídeos e proteínas, representa uma área promissora da biotecnologia agrícola no controle de pragas. De acordo com De Oliveira *et al.*, (2020), De Almeida Barros *et al.*, (2021), Meriño-Cabrera *et al.*, (2020; 2022) e Silva-Junior *et al.*, (2022), o uso de peptídeos e proteínas inibidoras da atividade tripsina-like do intestino médio de *Anticarsia gemmatilis* é abordado especificamente para seu controle.

3.2. Proteases

Denominadas também como proteinases ou peptidases, são enzimas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas em proteínas. Conforme sistema de classificação E.C. (Enzyme Commission numbers), proteases pertencem a classe 3, das hidrolases e subclasse 3.4, peptídeo-hidrolases ou peptidases. Sendo classificadas em várias famílias, tendo como base seu mecanismo de ação e local de clivagem (Bond *et al.* 2019). Podemos subdividir as proteases em exopeptidases (E.C. No 3.4.11-3.4.19) e endopeptidases (E.C. No 3.4.21-3.4.24, 3.4.99) a depender do tipo de reação temos as serino-proteases, cisteíno-proteases, aspártico-proteases, metaloproteases e tirosino-proteases (Gurumallesh *et al.*, 2019). Sendo seus nomes relacionado com o resíduo de aminoácido como nucleófilo no seu sítio ativo para hidrolisar ligações peptídicas. No caso das metaloproteases, dependem de um íon metálico, geralmente zinco, no seu sítio ativo.

As proteases desempenham papéis cruciais, incluindo digestão, regulação do ciclo celular, apoptose (morte celular programada), processamento de proteínas e sinalização celular. Enzimas como a pepsina no estômago, e a tripsina e quimotripsina no intestino delgado, quebram proteínas em peptídeos menores e aminoácidos, que são, então, absorvidos pelo corpo. As metaloproteinases da matriz (MMPs) são responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular, sendo essenciais em processos como cicatrização de feridas, crescimento e desenvolvimento tecidual, e em condições patológicas como o câncer. Muitas proteínas são sintetizadas como precursores inativos (proenzimas ou zimogênios) que são ativados por clivagem proteolítica. A tripsina, por exemplo, é ativada a partir do tripsinogênio por outra protease chamada enteropeptidase (Shukla *et al.*, 2022).

Amplamente presente na produção de alimentos, incluindo a fabricação de queijos e amaciamento de carnes, as proteases são também utilizadas no desenvolvimento de medicamentos, tanto como alvos terapêuticos em doenças como o câncer e a AIDS. As proteases são empregadas na produção de peptídeos bioativos e na engenharia de proteínas. As proteases são, portanto, essenciais para a vida e têm um impacto significativo na biologia, medicina e indústria (Bond *et al.*, 2019; Gurumallesh *et al.*, 2019).

No intestino médio de larvas de lepidópteros são enzimas que desempenham um papel crucial na digestão de proteínas, endopeptidases como tripsina e quimotripsina são as principais, exopeptidases também tem papel em larvas de lepidópteros, como exemplo temos as carboxipeptidases e aminopeptidases (Mahdavi *et al.*, 2013).

Pesquisas sobre as enzimas proteolíticas do intestino médio de lepidópteros mostraram que essas enzimas podem variar significativamente entre as espécies, possivelmente devido a diferenças na dieta e nas relações filogenéticas. Vatanparast & Kim. (2017) exploraram o uso de inibidores de proteases como meio de controle de pragas. Em seu trabalho avaliaram como inibidores quimostatina e tosil fenilalanil clorometil cetona (TPCK) impactam as taxas de sobrevivência das larvas ao inibir suas enzimas digestivas. Demonstrando que as proteases presentes no intestino médio de insetos lepidópteros podem ser alvos de estratégias de manejo de pragas uma vez que são essenciais para a digestão de proteínas.

3.2.1. Enzimas tripsina-*like* em insetos

A composição química da dieta ingerida pelos insetos normalmente está associada a diferentes enzimas digestivas em seu intestino médio. Os insetos podem possuir enzimas digestivas em grande variedade, cujas quantidades relativas podem mudar em resposta à dieta. Essa mudança pode ocorrer durante a alimentação de um indivíduo ou resultar da adaptação de um grupo taxonômico a uma determinada dieta, resultando na presença de enzimas cujas atividades são permanentemente maiores que outras (Levy *et al.*, 2004).

Da Silva Júnior *et al.*, (2020) demonstrou que o perfil proteolítico intestinal muda durante o desenvolvimento larval de lagartas de *Anticarsia gemmatalis*. A atividade das proteases de cisteína é mais intensa no primeiro ínstar e as serino proteases apresentaram atividades importantes nos estágios finais da fase larval. A digestão de proteínas em lepidópteros é realizada principalmente por serino proteases. O aumento na diversidade estrutural e funcional dos genes que codificam esta subclasse de enzimas pode ser atribuído ao mecanismo de resposta do inseto para contornar os inibidores de protease (IPs) (Meriño-Cabrera *et al.*, 2022).

As tripsinas (EC 3.4.21.4) são serino-proteases e são consideradas as principais proteases digestivas na maioria dos insetos. Participam da fase inicial da digestão de proteínas e são caracterizadas por uma tríade catalítica composta pelos resíduos de aminoácidos His46, Asp90 e Ser183 (tripsina bovina); na tripsina de *Anticarsia gemmatalis*, são Ser 229, His 85 e Asp 132 (Huber & Bode, 1978, Silva-Júnior *et al.*, 2021, Meriño-Cabrera *et al.*, 2022). Todas as serino proteases tripsina-*like* têm preferência por substratos com resíduos básicos em P1, como Lys ou Arg. Isso se deve essencialmente por carga negativa na base do sítio S1 resultante da presença de um Asp 189, sendo esta estrutura do sítio S1, altamente conservada entre essas proteases. Uma diferença notável é encontrada na posição 190, que pode ser Ser ou Ala,

servindo como ponto de identificação para subfamílias. A nomenclatura para resíduos de aminoácidos do substrato é $P_n, \dots, P_2, P_1, P_1', P_2', \dots, P_n'$, onde P_1 - P_1' denota a ligação hidrolisada. $S_n, \dots, S_2, S_1, S_1', S_2', \dots, S_n'$ denota os subsítios de ligação correspondentes da enzima (Schechter & Berger, 1968; Corey *et al.*, 1992; Perona *et al.*, 1995;).

Em insetos, as tripsinas possuem especificidade primária semelhante; contudo, nos lepidópteros, substratos contendo Arg hidrolisam mais eficientemente do que aqueles contendo Lys na posição P_1 . Os inibidores de protease produzidos pelas plantas têm uma região conhecida como sítio reativo, que interage com a enzima alvo. O alinhamento de sequências de vários inibidores de proteases vegetais indicou que os sítios reativos da maioria desses inibidores possuem um resíduo Lys na posição P_1 . A presença de Lys no sítio P_1 é uma estratégia de sobrevivência, pois esses inibidores atuariam inibindo as tripsinas da maioria dos insetos que preferencialmente hidrolisam Arg nessa posição (Silva-Júnior *et al.*, 2021; Meriño-Cabrera *et al.*, 2022).

Tripsinas de lepidópteros geralmente têm pH mais alto, correspondente ao alto valor de pH do conteúdo do intestino médio. Isoladas do intestino médio de vários insetos normalmente exibem massa molecular entre 20 e 35 kDa e atividade ideal em pH alcalino. A maioria das sequências de serino proteases de lepidópteros não contém resíduos de lisina. O resíduo de lisina na posição 188 é conservado em tripsinas de mamíferos e dípteros. Todavia, em lepidópteros, temos arginina substituindo esse resíduo. Especula-se que essa substituição seja uma adaptação necessária para a estabilidade da enzima no intestino desses insetos, uma vez que o valor do pH é elevado, associado à necessidade de as enzimas digestivas permanecerem protonadas (Bown *et al.*, 1997; Patarroyo-Vargas *et al.*, 2017; Silva-Júnior *et al.*, 2021).

3.2.2. Inibidores de proteases

Os inibidores de proteases (IPs) desempenham um papel crucial no controle de pragas agrícolas, oferecendo uma alternativa eficaz e sustentável aos pesticidas químicos tradicionais. Estes inibidores são classificados em várias famílias, cada uma com mecanismos de ação específicos e diferentes aplicações no manejo de pragas (Patarroyo-Vargas *et al.*, 2017, De Oliveira, 2020, De Almeida Barros *et al.*, 2021). Inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk são bem conhecidos pela sua ação sobre serino proteases (Kumar *et al.*, 2018). Esses inibidores bloqueiam a atividade das serino proteases, como a tripsina, interferindo na digestão de proteínas nos intestinos dos insetos. Sendo estes combustíveis para desenvolver plantas transgênicas com resistência. A exemplo, o inibidor de tripsina de girassol foi modificado para criar potentes inibidores de mesotripsina, eficazes contra pragas lepidópteras (Schlüter *et al.*, 2010).

Barbole *et al.* (2022) e Schlüter *et al.* (2010) discutem a aplicação de inibidores de proteases no controle de pragas, que envolve principalmente a modificação genética de plantas para expressar esses inibidores. O resultado são plantas transgênicas que são resistentes a uma variedade de insetos. A eficácia desses inibidores depende da especificidade da interação entre o inibidor e as proteases digestivas do inseto. Os inibidores de proteases representam uma estratégia promissora para o manejo sustentável de pragas agrícolas. Pesquisas contínuas são essenciais para otimizar seu uso e superar os desafios associados, garantindo sua eficácia a longo prazo na proteção das culturas.

Inibidores reduzem a necessidade de pesticidas químicos, proporcionando uma defesa contínua contra pragas e reduzindo perdas de colheitas. Além disso, são menos prejudiciais para humanos e outros organismos não alvo em comparação com pesticidas tradicionais. Contudo, existem desafios, como o desenvolvimento de resistência aos inibidores de proteases pelos insetos, assim como ocorre com pesticidas químicos. Além do mais é importante considerar que a produção e expressão eficaz desses inibidores em plantas pode ser complexa e custosa. Além disso, a necessidade de desenvolver inibidores específicos para diferentes pragas pode complicar o processo de engenharia genética (Barbole *et al.*, 2022).

CAPÍTULO I

Expressão Heteróloga do Peptídeo com Potencial Biopesticida GORE1,2T

4. INTRODUÇÃO

No presente capítulo, abordaremos o desenho e expressão do peptídeo denominado GORE1,2T. O peptídeo tem por base dois tripeptídeos GORE 1 e GORE 2 sob patente número do registro: BR1020200080652 (Barros *et al.*, 2021), cuja obtenção sempre foi por meio de síntese química. A expressão heteróloga surge como uma alternativa de baratear e aumentar a produção (Watts *et al.*, 2021). O vetor foi construído com regiões que possibilitam sua expressão tanto por bactérias como em plantas. A princípio esses dados serão tomados como base para avaliar o potencial de produção de plantas transgênicas.

Para clonagem e armazenamento do plasmídeo contendo o gene que expressa o peptídeo GORE1,2T, foi utilizado a cepa de *E. coli* DH5 α . Das cepas testadas para expressão, a BL21(DE3)pLysS foi a que melhor se adaptou para expressão do peptídeo. O mesmo se apresentou na fração insolúvel da extração, sendo purificado com base na proteína GST fusionada. Análises por SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*) (tris-tricina) Schagger e Jagow 16% gel de separação, 10% gel de fracionamento e 4% gel de empilhamento, demonstram que o mesmo não apresenta interação com Coomassie R250 devido as características físico-químicas atribuídas ao peptídeo devido sua composição aminoacídica, sendo necessária revelação usando prata como reagente. Massa teórica calculada, análise por SDS-PAGE e espectrometria de massa confirmaram sequência e massa de 5,9 kDa. Futuramente estratégias e metodologias mais refinadas e automatizadas serão empregadas para obtenção de um maior grau de pureza e rendimento, uma vez que para o presente estudo, tudo se deu de forma manual.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes utilizados para o preparo das soluções foram de grau analítico e compatível com o trabalho de biologia molecular. As águas utilizadas foram destiladas e deionizadas (água mili-Q). Materiais e soluções foram esterilizados a 120°C, por 15 minutos.

5.1. Expressão heteróloga do GORE1,2T

A sequência de bases do peptídeo quimérico recombinante foi elaborada com base na sequência de dois tripeptídeos com atividade inibitória de tripsina-*like* já bem caracterizados por trabalhos do grupo de pesquisa Interação Planta-Praga do Laboratório de Enzimologia e Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, que se encontra no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro) na Universidade Federal de Viçosa - UFV (Oliveira *et al.*, 1993, Patarroyo-Vargas *et al.*, 2017, De Oliveira, 2020, De Almeida Barros *et al.*, 2021). A sequência codificadora da quimera foi sintetizada e incorporada em vetor plasmidial pET-41(a)+ (FastBio Ltda), que também expressa um peptídeo derivado da glutathione S-transferase (GST), funcionando como uma etiqueta. Essa etiqueta permite sua purificação por meio de cromatografia de afinidade.

5.2. Linhagens de *E. coli* e Meios de Cultura

Todas as linhagens celulares empregadas nesta pesquisa, foram estocadas a -80° C, em meio Luria Bertani (LB) contendo 25% de glicerol. Para estocagem e purificação de plasmídeos foi utilizada a estirpe DH5 α , e para expressão heteróloga, BL21(DE3)pLysS. As linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio LB líquido e meio LB sólido.

5.3. Obtenção de células *E. coli* termocompetentes

As cepas de bactérias *E. coli* foram estriadas em placas de meio LB-ágar, e incubadas durante 16 horas, a 37 °C. Após este período, as colônias foram inoculadas em 5 mL de meio LB e mantidas sob agitação durante 16 horas. O inóculo foi diluído em 100 mL de meio LB e deixado sob agitação até atingir a densidade óptica ($D.O_{600nm} = 0,6$) (Tang *et al.*, 1994). A cultura foi incubada em gelo durante 10 min. O inóculo foi centrifugado e o *pellet* ressuspenso em solução gelada de CaCl₂ a 0,1 M. Após 15 min de incubação em gelo, a suspensão foi centrifugada e o *pellet* novamente ressuspenso em solução de CaCl₂ 0,1 M.

5.4. Transformação em *E. coli*

As bactérias foram transformadas utilizando o método de choque térmico. Para esta reação, foram adicionados 3 μ L do vetor resuspenso em 100 μ L de células competentes e mantida em gelo durante 10 min. Em seguida, a solução foi transferida para banho-maria a 42 °C, por 1 min, e novamente em banho de gelo por 5 min. Adicionou-se 100 μ L de meio LB às células transformadas e incubadas 1 hora, a 37 °C, sob agitação. Após esse período, as bactérias foram inoculadas em meio LB-ágar com os antibióticos nas respectivas concentrações: cloranfenicol 34 μ g/mL e canamicina 100 μ g/mL. Após 16 horas, a 37 °C, foram selecionadas algumas colônias de bactérias e estas foram inoculadas em 5 mL de meio LB, com os mesmos antibióticos anteriores, e incubadas a 37 °C por 16 horas, a 180 rpm. As transformações foram confirmadas por meio de um miniprep e observação do plasmídeo em gel de Agarose 0,8% (Engbrecht, 1991).

5.5. Expressão do peptídeo quimérico recombinante

Colônias bacterianas confirmadas quanto à presença do plasmídeo foram inoculadas em meio LB com cloranfenicol 34 μ g/mL e canamicina 100 μ g/mL, mantidas sob agitação de 180 rpm, durante 16 horas, a 37°C. Ao final deste período, a cultura foi diluída na proporção 1:50 em meio LB e mantida sob as mesmas condições de crescimento até atingir a fase midi-log de crescimento ($DO_{600} \sim 0,4-0,8$). Nesta faixa de absorbância foi adicionado o reagente isopropil β -D-Tiogalactopiranosídeo (IPTG) necessário para a ativação do promotor. Em seguida, a cultura foi fracionada e submetida às condições de crescimento: 4h, 8h, 12h e 16h a 37°C, e 20h a 18°C, sob agitação a 180 rpm.

5.6. Obtenção dos extratos de proteínas, solúveis e insolúveis

Encerrado o período de expressão, a cultura foi centrifugada a 4.100 rpm, por 20 min a 4 °C, o *pellet* de bactérias resuspenso em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,3 e submetido à lise celular em ultrassonicador (Sonics Vibra-Cell VCX 750) por 5 min, com intervalos de 20s ON / 10s OFF e potência de 100%, sempre em gelo. Essa suspensão foi centrifugada a 4.100 rpm, por 20 min a 4 °C e o sobrenadante estocado à -20 °C. O novo *pellet* foi solubilizado em solução idêntica à anterior, acrescido de 8M de ureia. Uma nova centrifugação foi realizada e o novo sobrenadante estocado como anteriormente.

5.7. Purificação do peptídeo GORE1,2T

A purificação baseando-se na técnica - *Batch purification* – compatível com Glutathione Sepharose 4B Affinity media (Cytiva), somada a colunas de rotação de ultrafiltração Vivaspin 10 e 3 MWCO (Cytiva). 1mL da resina foi transferida para tubo Falcon de 15mL, 5V de tampão PBS foi utilizado para equilíbrio e lavagem da mesma. 1,5 mL de tampão de eluição, Tris-HCl 0,05 M pH 8, acrescido de glutathione reduzida a 10 mM, foi utilizado (todos acrescidos de 8M de ureia). Rotação de 500 g foi aplicada para sedimentação da resina e recuperação do sobrenadante. Para clivagem da GST o resultado da eluição foi incubado com a enzima enteroquinase (Sigma Aldrich) a 37°C, por 16h. Na sequência foi aplicado os Vivaspin, colunas de centrifugação de ultrafiltração projetadas para concentração e dessalinização rápidas e não desnaturantes de proteínas e outras amostras biológicas.

5.8. Análises do peptídeo recombinante por SDS-PAGE e Espectrometria de massas

A análise do peptídeo foi realizada por eletroforese das amostras em SDS-PAGE, utilizando-se gel de fracionamento a 15% e empilhamento a 4%, conforme Laemmli (1970) (tris-glicina). Utilizou-se, também, o método de Schagger e Jagow (tris-tricina), descrito no trabalho de Haider *et al.*, (2011). Nesse método, foi empregado um gel de três camadas: 4% empilhamento, 10% espaçador e 16% fracionamento, sendo este o recomendado para análise de peptídeos. Foram analisadas amostras de cultura bacteriana com e sem ativação por IPTG, lise por ultrassonicação e amostras purificadas em coluna de afinidade. Após a eletroforese, os géis foram corados com solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 (GE Healthcare) e deixados sob baixa agitação por 20 minutos. Para a descoloração dos géis, foi utilizada uma solução descolorante de 40% etanol/10% ácido acético. Foi empregado o método de revelação com o reagente de prata, supersensível com fundo claro, descrito por Blum, Bier e Gross (1987).

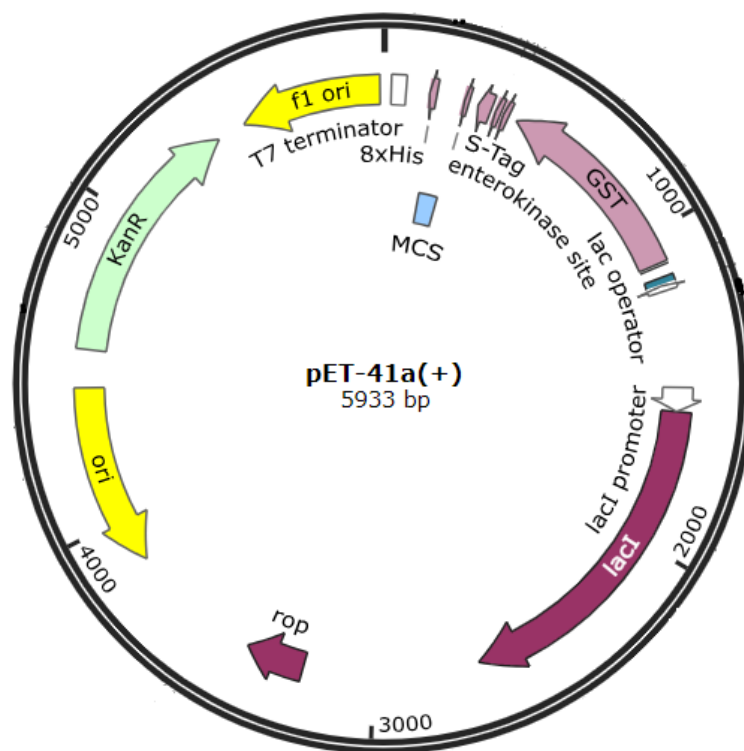
A espectrometria de massa foi realizada conforme descrito por Lima *et al.*, (2019) e Coutinho (2019). A digestão proteolítica foi realizada conforme descrito por Coutinho (2019) com solução de tripsina a 20 ng/μL, por 20 h, a 37 °C, utilizando o tampão de extração (50% acetonitrila, 5% ácido fórmico). Os peptídeos foram dissolvidos em ácido fórmico 0,1% (v/v) e analisados por LC-MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa) usando um sistema nano-UHPLC (nanoACQUITY-Waters) contendo uma coluna capilar C18 BEH130 1,7 μM -100 nm × 100 mm, operando a uma vazão de 0,5 uL/min. Os peptídeos eluídos do

UHPLC foram automaticamente injetados em um espectrômetro de massa ION TRAP (Amazon-Bruker), usando uma agulha de ionização nanoESI.

6. RESULTADO E DISCUSSÃO

A cepa de *E. coli* DH5 α foi utilizada como reservatório dos plasmídeos pelas alta eficiência de transformação, produção de clones e compatível com produção de células competentes por meio de tratamento com CaCl₂. Os íons Ca⁺² formam um complexo com os fosfatos carregados na membrana, cobrindo as cargas negativas, o que facilita a atração eletrostático com o material genético (Asif A *et al.*, 2017). O plasmídeo e o gene sintético incorporado podem ser observados nas figuras 2 e 3.

Figura 2 - Mapa plasmídeo pET-41a(+)



Fonte: pET & Duet Vectors (Novagen)

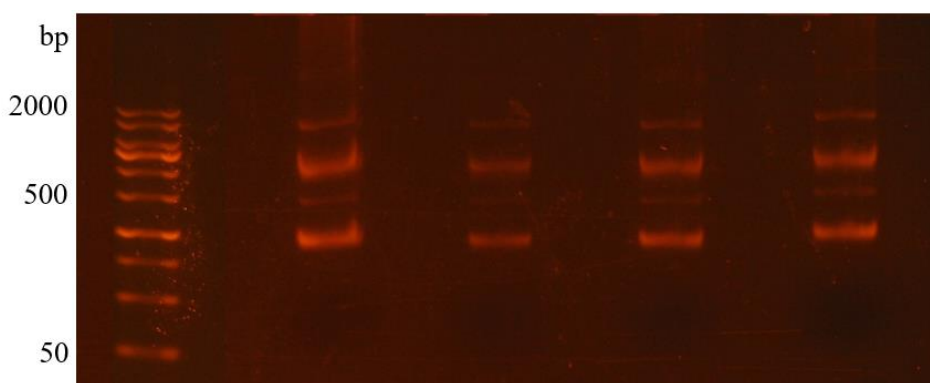
Figura 3 - Representação esquemática do desenho do gene sintético. A sequência em negrito corresponde ao peptídeo. Legenda: ¹BamHI; ²EcoRI; AttB1 e AttB2; Sequência Kozak; ATG do fragmento; Códon de parada do Fragmento.

```
GGATCC1GGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCACAATGGTTTTGAAGGTTTTG
AGAGTTTTGAAGGTTTTGAGAGTTTTGAAGGTTTTGAGAGTTTTGAAGGTTTTGAGA
GTTTTGAAGGTTTTGAGAGTTTTGAAGGTTTTGAGAGTTTTGAAGGTTTTGAGATAAG
ACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTCCCC2GAATTC
```

Fonte: Autoral

As cepas BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS e ArcticExpress (DE3) foram transformadas para expressão e subsequente avaliação de melhor rendimento do produto proteico. A confirmação da transformação foi realizada por meio de corrida das amostras resultante do miniprep em gel de agarose (Figura 4) em que é possível visualizar as quatro formas topológicas do DNA plasmidial (Higgins & Vologodskii, 2015).

Figura 4 - Confirmação da transformação das cepas, DH5 α , BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS e ArcticExpress (DE3) respectivamente em gel de agarose 0,8% 80V 50min. Marcador: Fisher Scientific.



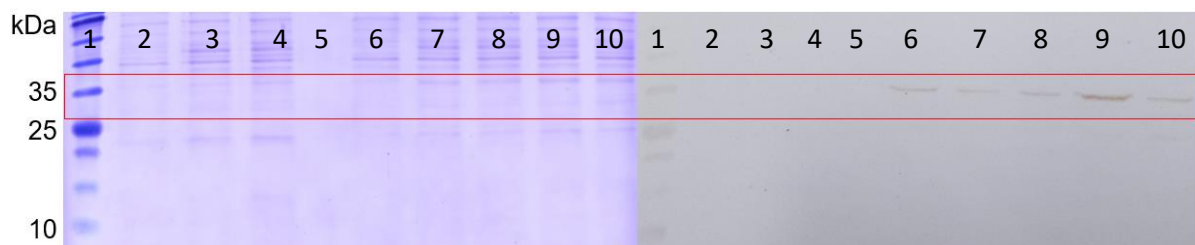
Fonte: Autoral.

A confirmação da expressão foi realizada a princípio por meio de uma alíquota do extrato bacteriano bruto em SDS-PAGE, seguido de *western blotting* com anticorpos específicos para GST-tag (Figura 5), uma vez o produto de interesse (Peptídeo-GST) se encontra indiferenciado das proteínas da bactéria. Nos ensaios pilotos de expressão e extração, o peptídeo fusionado a GST se apresentou na fração insolúvel. Ensaios a baixas temperaturas (Kim, 2008) e uso da cepa ArcticExpress (DE3) para melhorar a solubilidade foram realizados, sem sucesso. Nos trabalhos de Frangioni & Neel (1993) e (Jashandeep *et al.*, 2018) justifica que essa baixa solubilidade ocorre devido à composição aminoacídica da GST. Essa característica da GST, somada às características do peptídeo em questão, resultou na sua recuperação na fração insolúvel.

O uso da cepa de *E. coli* ArcticExpress não apresentou resultados satisfatórios de melhora na solubilidade e rendimento. A cepa BL21(DE3)pLysS foi a que apresentou uma melhor performance das três testadas. Por meio das figuras 6 e 7 é possível evidenciar que a fração insolúvel é expressivamente mais favorecida com o produto GST-peptídeo após o processo de extração. A GST somada ao peptídeo apresentou uma massa de 35,23 kDa, compatível ao observado em todos os géis. Experimentalmente, as melhores condições metodológicas para maior rendimento do produto foram 1,5 mM de IPTG e 16h de incubação a 37°C, a 180 rpm.

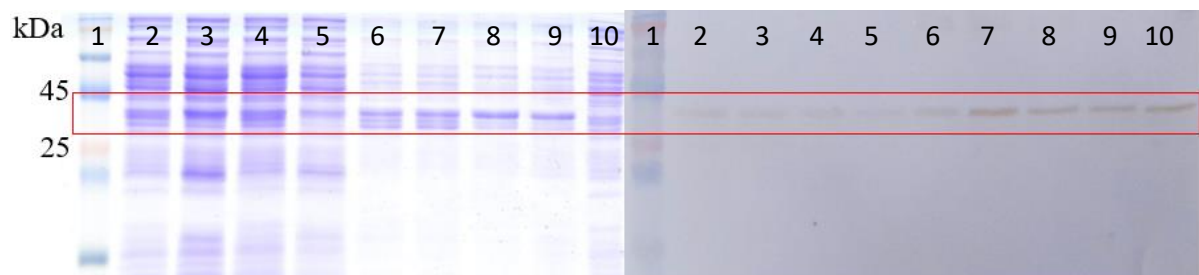
Observa-se que mesmo em pequena quantidade sem a adição do indutor, o produto está sendo expresso. Briand *et al.*, (2016) lista limitações quanto ao uso do IPTG para tal fim, visando a produção do peptídeo em larga escala e a inviabilidade econômica do indutor em questão, tal propriedade pode ser explorada visando obter melhores resultados, sem sua necessidade.

Figura 5 - Extrato bacteriano (BL21(DE3)pLysS) bruto em SDS-PAGE (Tris-Glicina) 15% e análise *Western blot* pelo método de coloração DAB. Legenda: Canaleta 1: MW; 2, 3 e 4: Controle 0h, 4h e 16h respectivamente após indução. 5: Vazio; 6, 7, 8, 9 e 10: pET-41a(+) 0 mM IPTG 4h; 1mM 4h e 16h; 1,5mM 4h e 16h respectivamente.



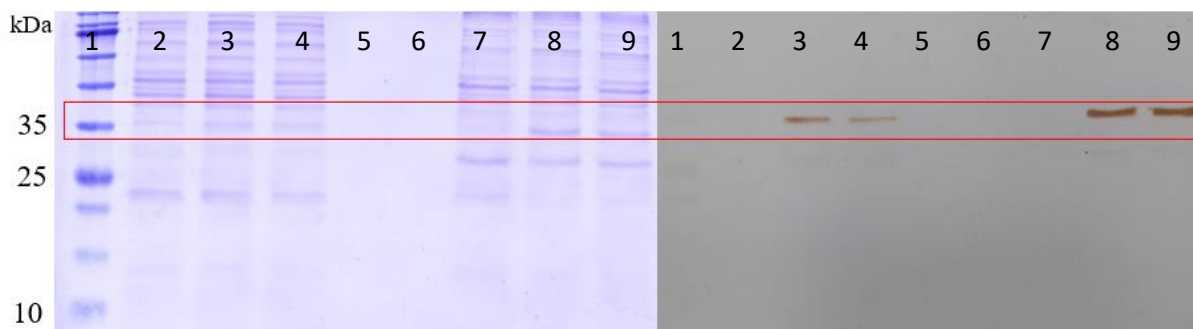
Fonte: Autoral.

Figura 6 - Frações solúvel e insolúvel em diferentes tempos de incubação resultante da extração por ultrassonicação/centrifugação em SDS-PAGE (Tris-Glicina) 15% e análise *Western blot* pelo método de coloração DAB. Legenda: canaleta 1: MW. 2: 0 mM IPTG 0h. 3, 4, 5 e 6: fração solúvel; 4h, 8h, 12h e 16h respectivamente de expressão. 7, 8, 9 e 10: fração insolúvel; 16h, 12h, 8h e 4h. 1,5 mM IPTG.



Fonte: Autoral.

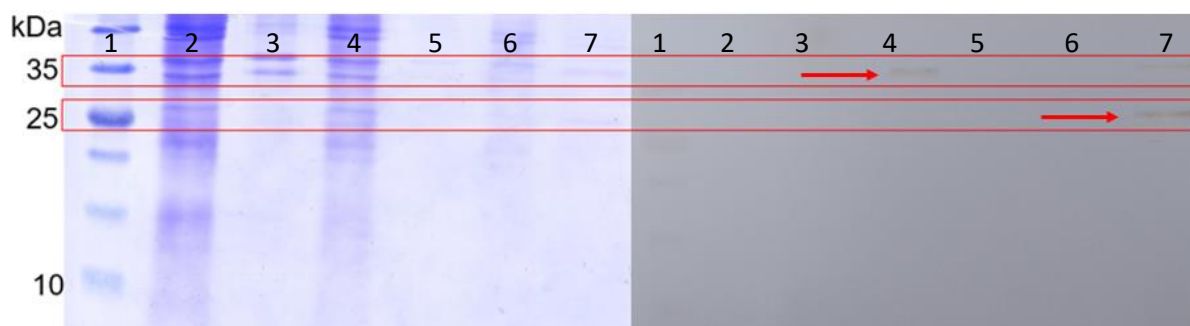
Figura 7 - Fração solúvel e insolúvel resultante da extração por ultrasonicação/centrifugação em SDS-PAGE (Tris-Glicina) 15% e análise *Western blot* pelo método de coloração DAB. Legenda: Canaleta 1: MW. 2: controle fração solúvel. 3 e 4: 1 mM e 1,5 mM IPTG 16h de expressão. 5 e 6: vazio. 7: controle insolúvel. 8 e 9: 1 mM e 1,5 mM IPTG 16h de expressão.



Fonte: Autoral

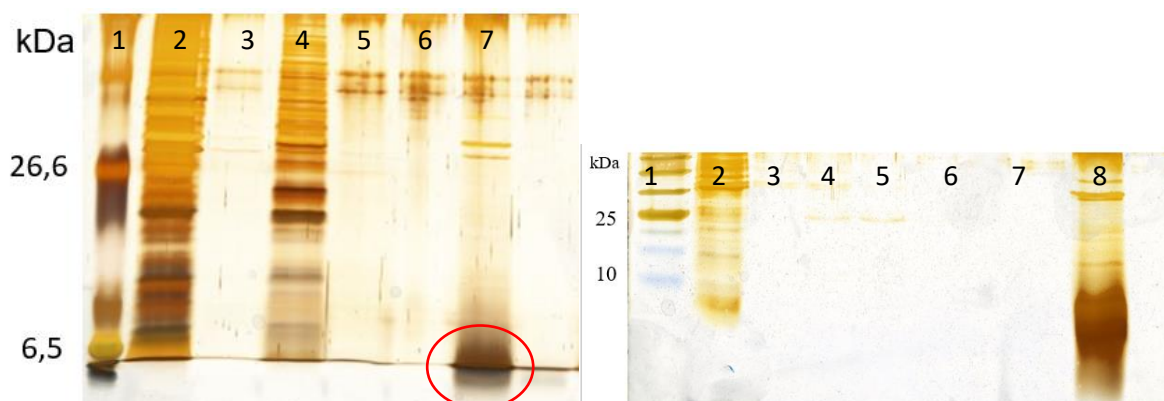
Para a purificação, 0,5 L de meio de cultura foi induzido e o *pellet* resultante foi resuspenso em 20mL de tampão PBS acrescido de 8M ureia. 2,3 mg, de 5mg de proteína total foi recuperado após contato com a resina. Uma proporção de 120mg por unidade de enteroquinase foi utilizado. Corrida em SDS-PAGE e WB (figura 8) confirmou a clivagem, sendo possível visualizar a transferência da banda referente ao produto GST-peptídeo em 35 kDa para 25 kDa, ou seja, apenas GST. Constatou-se que o peptídeo em questão não foi detectado pelo corante coomassie. Neuhoﬀ (1985) e Rosenfeld (1992) discutem que certos peptídeos não interagem com o corante devido à baixa afinidade de ligação, tamanho e hidrofobicidade. Sendo a coloração por prata mais eficiente para visualização do peptídeo em gel, como pode ser avaliado nas figuras 8 e 9. O método de coloração descrito por Switzer *et al.*, (1979) foi bem eficiente na detecção. Rabilloud, 2018 e Ahsan, 2017 discutem a sensibilidade superior da coloração por prata para pequenos peptídeos, independente da composição aminoacídica e as características físico-química atribuídas. Para melhor visualização do peptídeo, foi aplicado o método SDS-PAGE (Tris-Tricina) 16% descrito por Haider *et al.*, 2011. O resultado do gel em concordância com dados obtidos por espectrometria de massa, em que fora confirmado a sequência do peptídeo (protegido por questões de patente) a massa do mesmo resultou em 5,9 kDa.

Figura 8 - Análise em SDS-PAGE do processo de purificação, e análise *Western blot* pelo método de coloração DAB. Legenda: Canaleta 1: MW. 2 e 3: controle fração solúvel e insolúvel respectivamente. 4: V_0 alíquota da fração insolúvel antes de entrar em contato com a resina. 5: vazio. 6: V_1 volume não ligado à resina. 7: V_E alíquota do volume referente à eluição e digestão.



Fonte: Autoral

Figura 9 - (A) Análise em SDS-PAGE (Tris-Tricina) 16%, do processo de purificação. Coloração por prata. Legenda: Canaleta 1: MW. 2 e 3: controle fração solúvel e insolúvel respectivamente. 4: V_0 alíquota da fração insolúvel antes de entrar em contato com a resina. 5: vazio. 6: V_1 volume não ligado a resina. 7: V_E alíquota do volume referente à eluição e digestão com enteroquinase. (B) Canaleta 1: MW. 2: V_1 volume não ligado à resina. 3, 4 e 5: V_E eluição antes da digestão com enteroquinase, após 12 e 18h, a 37 °C. 8: concentrado da alíquota referente à eluição e digestão com enteroquinase.



Fonte: Autoral

Os espectros foram analisados usando o programa PEAKS 7.0 com um banco de dados de proteínas do Swissprot, contendo todas as proteínas anotadas. Uma sequência de aminoácidos contendo a fusão construída no vetor de expressão foi incluída no arquivo FASTA contendo todas as proteínas do banco Swissprot. No processo de digestão em gel, foram usadas duas proteases: a endoproteínase Lys-C, *Mass Spec Grade* (Promega) (Figura 10A), e a tripsina bovina, MS Grade (Sigma Aldrich) (Figura 10B).

Pelo resultado, constatou-se que a enzima Lys-C, uma endopeptidase que cliva especificamente na extremidade C-terminal dos resíduos de lisina (Lys), foi eficiente na clivagem na região correspondente ao peptídeo por meio do processo de fosforilação identificado. Já no resultado com a tripsina bovina, não foi observada essa clivagem. Rosenberg *et al.* (2013) discute a eficiência superior da Lys-C em relação às tripsinas tipicamente utilizadas devido à sua alta especificidade. Betancourt *et al.* (2018) reforça esse dado, deixando claro que a Lys-C funciona bem em condições adversas.

Como o GORE1,2T foi projetado para inibir proteases tripsina-like de *A. gemmatalis*, a ineficiência sob tripsina bovina se justifica pela similaridade e conservação da estrutura e sequência de aminoácidos entre as proteases de diferentes grupos de seres vivos. Contudo, associações de enzimas proteolíticas podem ser empregadas para melhorar essa cobertura de clivagem e obtenção de fragmentos menores. Entretanto, como o objetivo aqui era apenas a confirmação da sequência do peptídeo sintético, a Lys-C sozinha demonstrou-se eficiente.

CAPÍTULO II

Cinética de Inibição e *Docking* Molecular

7. INTRODUÇÃO

Nesta segunda parte, serão apresentados os dados obtidos da cinética enzimática, bem como do *docking* molecular. A cinética foi realizada tendo como base as tripsinas-*like* presentes no extrato bruto do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. Os dados foram avaliados tanto quantitativa quanto qualitativamente, utilizando-se tratamentos matemáticos como as equações de Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk e Dixon para o cálculo das constantes e a avaliação do modelo de inibição. O peptídeo GORE1,2T apresentou comportamento de inibidor competitivo, sendo evidente o aumento dos valores de K_M conforme aumenta a concentração do inibidor. Foi encontrado um K_I de 100 μM em relação ao substrato cromogênico, L-BApNA. Pelo *docking* molecular, foi evidenciada uma alta afinidade do peptídeo pelos sítios de ligação da tripsina.

8. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1. Extração do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*

Os ovos da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*, foram obtidos de uma criação base mantida no Laboratório de Criação de Insetos, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Após a eclosão dos ovos, as larvas foram alimentadas com dieta artificial e mantidas em câmara climatizada a 25 °C, umidade relativa do ar de 60±10% e fotoperíodo de 14h de luz e 10h de ausência de luz (Greene *et al.*, 1976). Foram dissecadas 25 lagartas de *A. gemmatalis* no 3º e 4º ínstar de desenvolvimento, em que seu intestino médio foi extraído, macerado com nitrogênio líquido e resuspenso em solução HCl 1mM, a 4°C. Foi utilizada a proporção de 5 intestinos para 1 mL de solução. As amostras foram centrifugadas a 10000 g por, 30 min, a 4°C e o sobrenadante filtrado com membrana de 22µm, sendo armazenado a -20°C. A proteína total foi quantificada por Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific™).

8.2. Cinética: constantes de Michaelis-Menten e inibição

O modelo de inibição enzimática e constantes inibitórias (K_i) entre o peptídeo recombinante e as tripsinas-like do extrato bruto de *A. gemmatalis* foram determinados utilizando o substrato cromogênico específico L-BApNA (benzoil-L-arginil-p-nitroanilida). Os ensaios foram realizados em tampão Tris-HCl 0,1 M, CaCl₂ 20 mM pH 8,2, variando as concentrações do substrato L-BApNA: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6 e 0,8 mM, e do peptídeo recombinante: 0, 10, 50, 100 e 200 mM. As velocidades observadas versus os dados de concentração de substrato (na presença e ausência de inibidores) foram ajustadas simultaneamente, de acordo com o ajuste de regressão não linear e linear, utilizando os programas Graphpad Prism 5.0 (Motulsky, 2007) e OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation). Os ensaios foram conduzidos em cubeta de Quartzo 1 cm de caminho ótico e volume de 1 mL. A atividade foi determinada com base na formação do produto p-nitroanilida, cujo coeficiente de extinção molar é 8.800 M⁻¹cm⁻¹ (Erlanger *et al.*, 1961). O ensaio foi conduzido a 25 °C, com um tempo de reação de 120 s, em triplicatas.

8.2.1. Parâmetros cinéticos

Para o presente estudo, foi empregado o modelo cinético uni-reacional simples. A equação geral para esse modelo, descrito por Michaelis-Menten, está representada na Equação 1. Foi aplicada a representação de Lineweaver-Burk, também chamada de representação dos duplos recíprocos, na qual a linearização está representada pela equação 2. O modelo de inibição competitiva foi determinado pelo gráfico de duplos recíprocos de Lineweaver-Burk onde, na presença de um inibidor competitivo, o valor de K_M é afetado por um fator $1+([I]/K_I)$ enquanto $V_{Máx}$ permanece inalterado (Equação 3). O gráfico duplo recíproco das inclinações (Equação 4) para inibição competitiva é a maneira mais precisa de calcular o valor de K_I , uma vez que leva em consideração um maior número de pontos (de Assis Leone, 2021). A Equação 5 representa o gráfico de Dixon, que também foi aplicado para calcular o valor de K_I e o modelo cinético de inibição. K_I foi obtido pela interseção das linhas correspondentes às concentrações de substrato (Dixon *et al.*, 1979).

$$V_0 = \frac{V_{Máx} [S]}{K_M [S]} \quad (1)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{Máx}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{Máx}} \quad (2)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{Máx}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{Máx}} \quad (3)$$

$$\text{Inclinação} = \frac{K_M}{V_{Máx}} + \frac{K_M}{V_{Máx} K_I} [I] \quad (4)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{Máx}} \left(1 + \frac{K_M}{[S]}\right) + \frac{K_M}{V_{Máx} [S] K_I} [I] \quad (5)$$

8.3. Análise de interação estrutural *in silico*: peptídeo GORE1,2t e tripsinas de *Anticarsia gemmatalis*

8.3.1. Peptídeo GORE 1-2t

O peptídeo GORE 1-2t, contendo as sequências GORE1 e GORE2 (De Almeida Barros *et al.*, 2021) repetidas sete vezes cada para formar uma estrutura helicoidal, possui um resíduo amino-terminal de valina (Val) e um resíduo carboxil-terminal de arginina (Arg). Sua estrutura tridimensional foi modelada utilizando o *software online* Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015).

8.3.2. Tripsinas em *Anticarsia gemmatalis*

Cinco sequências de tripsina de *A. gemmatalis* foram obtidas a partir do estudo sobre o perfil de proteases intestinais e sua ligação a inibidores (Silva-Júnior *et al.*, 2021) e foram modeladas utilizando o servidor *online* Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015). As estruturas tridimensionais das tripsinas de *A. gemmatalis* foram submetidas à análise de qualidade utilizando o servidor *web* PProSA (Protein Structure Analysis), ERRAT e análise do gráfico de Ramachandran.

8.3.3. Docking Molecular: Tripsina-Peptídeo GORE 1,2t

As tripsinas modeladas foram utilizadas como receptores na análise de docking utilizando o *software online* CLUSPRO (Kozakov *et al.*, 2017), que é usado para *docking* de proteína-proteína e proteína-peptídeo. Cada arquivo de tripsina foi carregado individualmente como receptor, e o ligante foi o peptídeo GORE 1-2t (Tabela 2). Cinco *dockings* foram realizados para o ligante, pois cinco receptores de tripsina foram testados. O DS Visualizer 4.0 (Studio, 2012) e o PyMOL (Molecular Graphics System, Versão 2.0 Schrodinger, LLC) foram utilizados para criar todas as figuras.

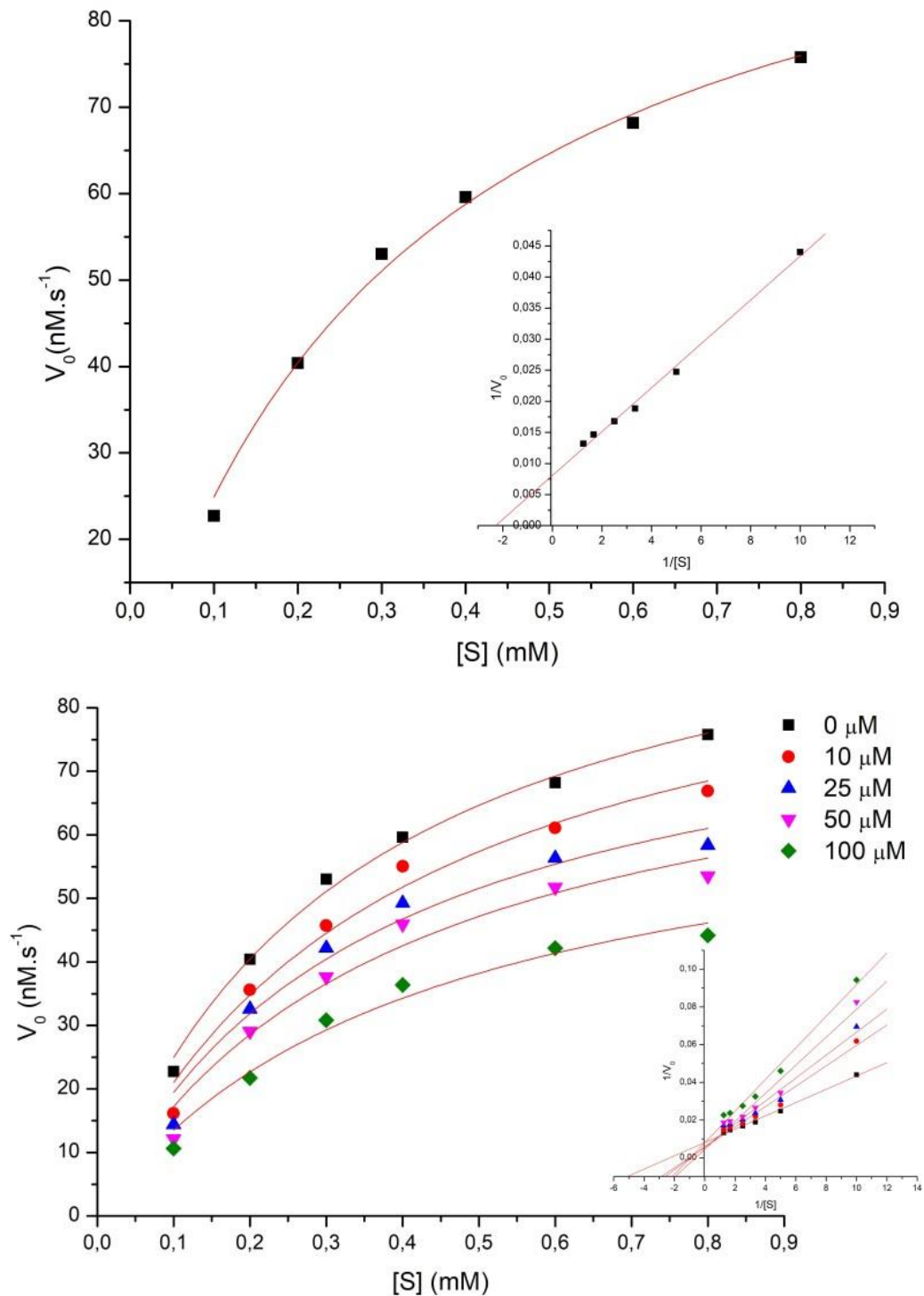
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os inibidores de protease (IPs) constituem uma classe de moléculas capazes de interferir negativamente na ação catalítica das proteases, sendo os inibidores do tipo Kunitz os mais bem caracterizados (Wang *et al.*, 2024). No controle de pragas, o desenvolvimento de inibidores específicos para proteases envolvidas no processo de digestão é uma estratégia que visa levar a morte do indivíduo por inanição, uma vez que a assimilação de nutrientes será afetada. Consequentemente, crescimento, desenvolvimento e reprodução (De Almeida Barros *et al.*, 2020; De Oliveira *et al.*, 2020; Meriño-Cabrera *et al.*, 2020) também são afetados.

Para o ensaio cinético, a fonte de enzimas tripsina-like foi a fração obtida da extração do intestino médio de *Anticarsia gemmatilis* como descrito na metodologia, e a quantificação total de proteína resultou em uma amostra com 6 mg/mL. Os ensaios foram conduzidos com 5 μ L da amostra. A escolha do volume baseou-se em ensaios preliminares com diferentes volumes e observação dos deltas de absorbância, priorizando um delta considerável com a menor quantidade de amostra. Para o presente estudo os parâmetros cinéticos obtidos são aparentes $K_{m,App}$ e $V_{máx,app}$, uma vez que não estamos trabalhando com um sistema puro (Copeland, 2023).

Em consonância com o trabalho de Oliveira (2005), que obteve o valor de K_M de 0,3 mM para o seu tratamento sem inibidor, o resultado obtido no presente estudo é condizente com o valor calculado e obtido. O tratamento dos dados por meio da matemática proposta por Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk e Dixon, confirmou o modelo de inibição competitiva para o peptídeo sintético (Figuras 11 e 12), na faixa de concentração de substrato e inibidor analisados. O inibidor competitivo aumenta o valor de K_M do substrato, exigindo uma maior concentração deste para que a enzima alcance qualquer fração de V_{max} . Este fator pode ser considerado crucial como um termo estatístico dependente da concentração do inibidor, descrevendo a distribuição da enzima na forma livre e na forma enzima-inibidor. Concentrações mais elevadas do inibidor resultam em um aumento tanto do K_m quanto na inclinação da curva, por este fator. Inibidor e substrato são exclusivos entre si, competindo pelo mesmo sítio de ligação na região do centro ativo da enzima (Patarroyo-Vargas, 2020). De Almeida Barros (2020) determinou separadamente para os tripeptídeos os valores de K_I (Tabela I) frente a tripsinas-like parcialmente purificadas do intestino médio de *Anticarsia gemmatilis*. Com base nesses dados podemos comparar os valores de K_I e o efeito de uma molécula maior, fruto da expressão heteróloga.

Figura 11 - (A) Gráfico Michaelis-Menten para hidrólise do substrato L-BApNA pelas enzimas tripsina-like do extrato bruto do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Inseto: gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk. R^2 de 0,99 para regressão linear e não linear. (B) Gráfico Michaelis-Menten de inibição das enzimas tripsina-like do extrato bruto do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) frente ao substrato L-BApNA em diferentes concentrações do inibidor. Inseto: gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk para os dados de inibição. R^2 de 0,99 para as concentrações de 0 e 100 μM do inibidor e 0,98 para 10, 25 e 50 μM .



Fonte: Autoral.

Tabela I. Parâmetros cinéticos de inibição obtidos para o peptídeo sintético e tripsina-like do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*.

[I] μM	K_m (mM)	$V_{\text{máx}}$ (nM.s ⁻¹)	Peptídeo	K_i
0	0,33	107	Gore 1(a)	490 μM
10	0,38	101	Gore 2(a)	100 μM
25	0,35	87	GORE1.2T	100 μM
50	0,38	83		
100	0,42	70		

Dados obtidos: a) De Almeida Barros (2020).

Fonte: Autoral.

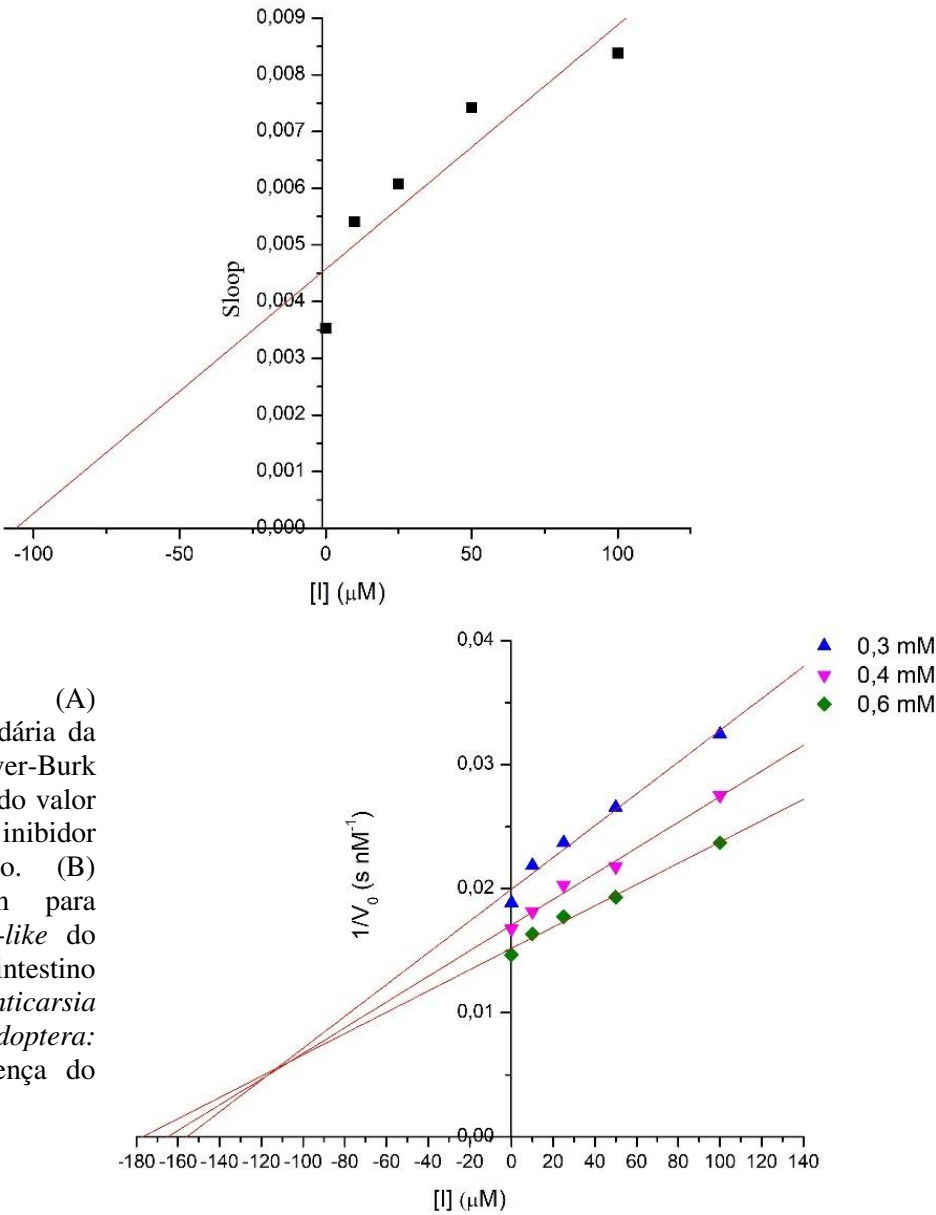


Figura 12 - (A) Representação secundária da equação de Lineweaver-Burk para a determinação do valor de K_i para um inibidor competitivo clássico. (B) Gráfico de Dixon para inibição de tripsina-like do extrato bruto do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* (*Lepidoptera: Noctuidae*) na presença do substrato L-BApNA.

Fonte: Autoral.

Sendo a composição do peptídeo GORE 1-2t uma quimera dos tripeptídeos, o valor de 100 μM para o K_i encontrado é coerente ao tripeptídeo denominado de GORE 2. O peptídeo sintético teve ação inibitória para protease e prejudicou a ação de tripsinas-like de *Anticarsia gemmatalis*. O fato de possuir sítios de ligação para os três subsítios de enzimas semelhantes à tripsina, Oliveira *et al.*, 1993, Patarroyo-Vargas *et al.*, 2017, De Almeida Barros *et al.*, 2020; De Oliveira *et al.*, 2020; discutem que inibidores proteicos são cineticamente mais eficientes que moléculas menores como a benzamidina, um importante inibidor de protease que se liga apenas ao subsítio S1. Com o decorrer da evolução, subsítios S2 e S3 em insetos da ordem Lepidoptera, se tornaram mais hidrofóbicos (Lopes *et al.*, 2006). Desta forma moléculas capazes de interagir fortemente com esses dois subsítios mais hidrofóbicos são requeridas para uma ação inibitória expressivamente efetiva.

9.1. Análise de Interação Estrutural *In Silico*: Peptídeo GORE 1-2T e Tripsinas de *Anticarsia gemmatalis*

O peptídeo investigado, contendo os tripeptídeos GORE1 e GORE2, apresenta dois resíduos de aminoácidos hidrofóbicos posicionados na segunda e terceira posições, diferindo apenas no resíduo que se liga ao centro ativo. Essa composição estrutural confere ao peptídeo GORE 1,2T uma afinidade específica e eficaz pelos sítios de ligação tipo tripsina, permitindo atuar como um potente inibidor da atividade enzimática.

Os resultados de *docking* entre GORE 1,2 T e as tripsinas estão apresentados na Tabela 2. Esta tabela ilustra o tamanho (ou seja, o número de membros), o escore de energia ponderado do centro do *cluster* (ou seja, a estrutura com o maior número de estruturas vizinhas no *cluster*) e o escore de energia da estrutura de energia mais baixa no *cluster* (Kozakov *et al.*, 2017). É importante destacar que o maior *cluster*, com 145 membros (Tripsina1), é significativamente maior do que o segundo maior *cluster*, que possui 132 membros. Essa diferença indica um conjunto bem definido de complexos de encontro (Tabela 2).

Os valores negativos dos escores de energia validam ainda mais a interação de ligação entre GORE 1,2T e as tripsinas (Tabela 2). Valores negativos de energia geralmente indicam uma interação de ligação favorável, corroborando a eficácia do peptídeo como inibidor. Os gráficos de interação 2D gerados usando o visualizador *Pymol* revelam que o peptídeo se liga ao sítio ativo ou a uma região próxima, 70% do tempo (Figura 13). Esta alta frequência de ligação perto do sítio ativo destaca o mecanismo de inibição competitiva observado em análises

experimentais. A afinidade de GORE 1,2T por enzimas tipo tripsina é uma descoberta significativa.

Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos desempenham um papel crucial na melhoria dessa afinidade, facilitando interações com os bolsos hidrofóbicos do sítio ativo da enzima. Esta interação é essencial para a ação inibitória, permitindo que o peptídeo compita eficazmente com substratos naturais pela ligação ao sítio ativo.

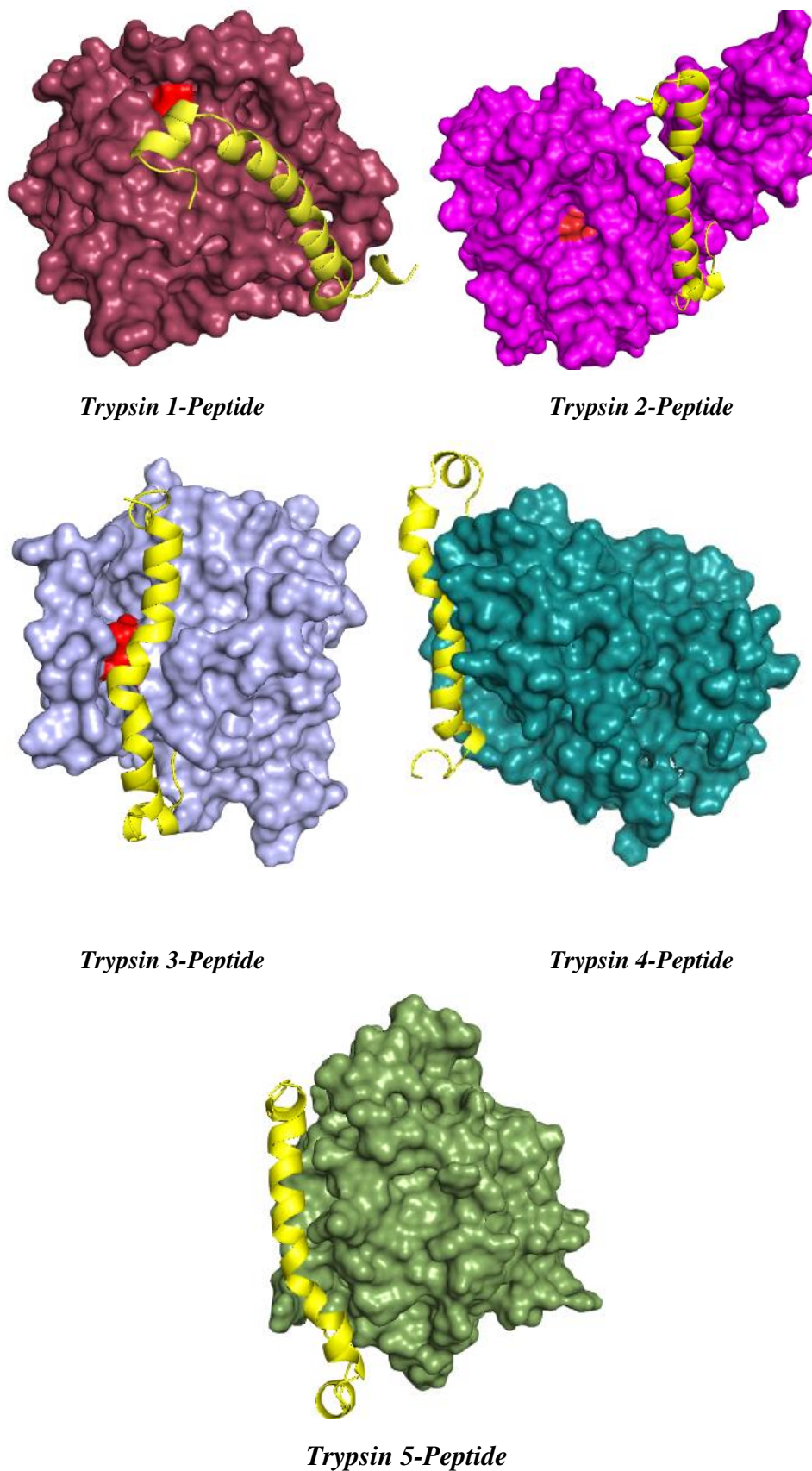
O sítio ativo é caracterizado pela presença da triade catalítica His-Asp-Ser. As numerações desses resíduos variam dependendo da espécie e isoforma da tripsina, mas os seus posicionamentos, na região do centro ativo são conservados. Na tripsina 1 de *A. gemmatalis*, utilizada como modelo para as figuras, esses aminoácidos estão localizados nas posições His89, Asp135 e Ser237 (Figura 13A).

Table II. Resultados de *docking* entre GORE 1,2T e tripsinas usando o software *Cluspro online*.

<i>Cluster</i>	<i>Members</i>	<i>Representative</i>	<i>Weighted Score</i>
<i>Trypsin 1</i>	145	Center	-997.5
		Lowest Energy	-1143.9
<i>Trypsin 2</i>	61	Center	-1060.9
		Lowest Energy	-1175.0
<i>Trypsin 3</i>	99	Center	-974.0
		Lowest Energy	-1096.4
<i>Trypsin 4</i>	79	Center	-991.6
		Lowest Energy	-1194.0
<i>Trypsin 5</i>	132	Center	-785.6
		Lowest Energy	-932.8

Fonte: Autoral.

Figure 13 - Representação gráfica dos complexos de *docking* tripsina-peptídeo GORE1-2t utilizando o programa *Pymol*. As tripsinas 1-5 de *A. gemmatalis* são representadas em superfície com cores variadas, enquanto o peptídeo GORE1-2t é mostrado em modo *cartoon* amarelo. O sítio ativo de cada tripsina, representado pela triade catalítica His-Asp-Ser, é destacado em vermelho.



10. CONCLUSÃO

Fica evidente a necessidade da descoberta e desenvolvimento de moléculas mais ecológicas no controle de pragas agrícolas frente à demanda mundial em relação às questões ambientais em debate. Biomoléculas têm demonstrado ser um caminho viável para tal objetivo. O peptídeo GORE 1,2 τ , com características hidrofóbicas e apolares, demonstrou ser um inibidor satisfatório da atividade de tripsina-*like* frente ao substrato L-BApNA e às condições experimentais estabelecidas no presente estudo. Esses resultados abrem perspectivas de desenvolvimento de um produto comerciável a ser utilizados em formulações biopesticidas como também para produção de Plantas modificadas com a presença de GORE1-2 τ . Esse é um caminho que se apresentou promissor no mecanismo de defesa de plantas à insetos na agricultura, abrindo caminho para entendimento dos mecanismos moleculares de resistência e a produção de peptídeos inibidores de enzimas digestivas de pragas agrícola.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, F. G., *et al.*, "Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (hübner, 1818) relacionados ao controle biológico por Baculovirus anticarsia (agmnpv)." *Arquivos do Instituto Biológico* 71.3 (2004): 391-398.

Barbole, R., *et al.* "Plant peptides as protease inhibitors for therapeutic and agricultural applications." *Natural products as enzyme inhibitors: An industrial perspective*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. 25-57.

Barros, R. A., *et al.* Tripeptídeos inibidores de proteases tripsinas-like, composições e usos.. 2021, brasil. Patente: privilégio de inovação. Número do registro: br1020200080652, título: "tripeptídeos inibidores de proteases tripsinas-like, composições e usos." , instituição de registro: inpi - instituto nacional da propriedade industrial. Depósito pct: 11/05/2021

Baskar, K., *et al.* "Toxicity and antifeedant activity of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb.(Caesalpiniaceae) extracts and fractions against the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* Hub.(Lepidoptera: Noctuidae)." *Physiological and molecular plant pathology* 101 (2018): 69-74.

Batista, F. C. M., *et al.* "Evaluation of Chrysodeixis baculovirus infectivity in suspension cultured Sf21 cell line." *OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA* 22.6 (2024): e5523-e5523.

Bond, J. S. "Proteases: History, discovery, and roles in health and disease." *Journal of Biological Chemistry* 294.5 (2019): 1643-1651.

Bown, D. P., *et al.* "Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27.7 (1997): 625-638.

Bravo, A., *et al.* (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7), 423-431.

Briand, L., *et al.* "A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*." *Scientific reports* 6.1 (2016): 33037.

Copeland, Robert A. *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. John Wiley & Sons, 2023.

Corey, D. R. & Craik, C. S. "An investigation into the minimum requirements for peptide hydrolysis by mutation of the catalytic triad of trypsin." *Journal of the American Chemical Society* 114.5 (1992): 1784-1790.

Cory, J. S., & Myers, J. H. (2003). The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 239-272. Reviews the persistence and the need for repeated applications of baculoviruses in field conditions.

Coutinho, H. D. M.. UPLC-MS-ESI-QTOF Characterization and evaluation of the. Avaliação de bioatividades e da ação dos extratos, p. 44, 2019.

Dall'Agnol, A. "A Embrapa Soja no contexto do desenvolvimento da soja no Brasil: histórico e contribuições." (2016).

Da Silva Júnior, N. R., *et al.* "Intestinal proteolytic profile changes during larval development of *Anticarsia gemmatilis* caterpillars." *Archives of insect biochemistry and physiology* 103.1 (2020): e21631.

De Assis Leone, F. *Fundamentos de cinética enzimática*. Editora Appris, 2021.

De Almeida Barros, R., *et al.* Small peptides inhibit gut trypsin-like proteases and impair *Anticarsia gemmatilis* (L epidoptera: Noctuidae) survival and development. *Pest Management Science*, v. 77, n. 4, p. 1714-1723, 2021.

De Menezes, C. H. M., *et al.* "Exposure to insecticides cause mortality, respiratory disturbs, and antifeeding effects in *Anticarsia gemmatilis*." *Phytoparasitica* 52.1 (2024): 1-10.

De Oliveira, G. *et al.* Inhibitory effects of tripeptides to enzymatic activity and life cycle parameters of *Anticarsia gemmatilis*. *Phytoparasitica*, v. 48, n. 5, p. 823-831, 2020.

De Oliveira, A. B. *et al.* Soja: o produtor pergunta, a Embrapa responde / editores técnicos. – Brasília, DF: Embrapa, 2019.

Dixon, M., *et al.* "Inhibition and activation in enzymes." *NY Acad. Sci.* 1979.

Betancourt, Lazaro Hiram, *et al.* "Quantitative assessment of urea in-solution Lys-C/trypsin digestions reveals superior performance at room temperature over traditional proteolysis at 37 C." *Journal of proteome research* 17.7 (2018): 2556-2561.

Erlandson, M. (2008). Insect pest control by viruses. *Encyclopedia of Virology*, 287-297.

Fernandez-Lima, F. A. "Applications of native nESI-TIMS-MS for structural biology." *ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*. Vol. 257. 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA: AMER CHEMICAL SOC, 2019.

Gallo, D. *et al.* Entomologia Agrícola. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

Gurumalles, P., *et al.* "A systematic reconsideration on proteases." *International journal of biological macromolecules* 128 (2019): 254-267.

Haider, S. R., *et al.* "A comparison of Tris-glycine and Tris-tricine buffers for the electrophoretic separation of major serum proteins." *Journal of separation science* 34.18 (2011): 2463-2467.

Hamza, M., *et al.* "Global Impact of Soybean Production: A Review." *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* 16.2 (2024): 12-20.

Hultmark, D., *et al.* (1982). Cecropin, an antibacterial protein from the hemolymph of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry*, 127(1), 207-217.

Huber, R. & Bode, W. "Structural basis of the activation and action of trypsin." *Accounts of Chemical Research* 11.3 (1978): 114-122.

Frangioni, J. V. & Neel, B.G. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins, *Anal. Biochem.* 210 (1) (1993) 179–187.

Jongsma, M. A., & Bolter, C. (1997). The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, 43(10), 885-895.

Jiménez, M. F., *et al.* "A biocontrol agent as a commensal in a plant-pest interaction." *Ecological Modelling* 468 (2022): 109957.

Kozakov, Dima, *et al.* "The ClusPro web server for protein–protein docking." *Nature protocols* 12.2 (2017): 255-278.

Kaur J., *et al.* "Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements." *International journal of biological macromolecules* 106 (2018): 803-822.

Kumar, V., *et al.* "Comparative assessment of trypsin inhibitor vis-à-vis Kunitz trypsin inhibitor and Bowman-Birk inhibitor activities in soybean." *Food analytical methods* 11.9 (2018): 2431-2437.

Kim, S., & Lee S. B. "Soluble expression of archaeal proteins in Escherichia coli by using fusion-partners." *Protein Expression and Purification* 62.1 (2008): 116-119.

Krinski, D., *et al.* "Ovicidal effect of the essential oils from 18 Brazilian Piper species: controlling *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Erebidae) at the initial stage of development." *Acta Scientiarum. Agronomy* 40 (2018): e35273.

Koppert biological systems, *Anticarsia gemmatalis*, Lagarta da soja. Disponível em: Koppert. Acesso em: 25 fev. 2021.

Lima, B. S. A., *et al.* "Abamectin induces mortality, inhibits food consumption, and causes histological changes in the midgut of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)." *Journal of Pest Science* 97.1 (2024): 213-227.

Levy, S. M., *et al.* "Morphological study of the hindgut in larvae of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)." *Neotropical Entomology* 33 (2004): 427-431.

Mahdavi, A., *et al.* "Identification and partial characterization of midgut proteases in the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis*." *Journal of insect science* 13.1 (2013): 81.

Matioli, T. Lagartas na soja: Como identificar e controlar (2016). Disponível em: BlogAegro: <https://elevagro.com/blog/diferenca-entre-os-danos-das-lagartas-da-soja-anticarsia-gemmatalis-e-falsa-medideira-chrysodeixis-includens-em-soja/> Acesso em: 30 fev. 2024.

Machado, S. W., *et al.* "Inga laurina trypsin inhibitor (ILTI) obstructs *Spodoptera frugiperda* trypsins expressed during adaptive mechanisms against plant protease inhibitors." *Archives of insect biochemistry and physiology* 95.4 (2017): e21393.

Meriño-Cabrera, Y., *et al.* Noncompetitive tight-binding inhibition of *Anticarsia gemmatalis* trypsins by *Adenanthera pavonina* protease inhibitor affects larvae survival. *Archives of insect biochemistry and physiology*, v. 104, n. 3, p. e21687, 2020.

Meriño-Cabrera, Y., *et al.* "Inhibition of digestive trypsins by plant Kunitz proteins reduces the viability of *Spodoptera cosmioides* larvae." *Annals of Applied Biology* 175.3 (2019): 336-349.

Meriño-Cabrera, Y. B. & Oliveira, M. G. de A. "Trypsins: Structural Characterization and Inhibition Focus in Insects." *Hydrolases* (2022): 53.

Marinho-Prado, J. S., *et al.* Pazianotto. "Efeito deletério de óleos essenciais sobre *Anticarsia gemmatalis* e *Helicoverpa armigera*." (2019).

Moscardi, F. & Souza M.L. Baculovírus para o controle de pragas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. nº 24- janeiro/fevereiro 2002.

Moscardi, F. (1999). Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 44(1), 257-289. Examines the impact of environmental factors such as UV radiation on the effectiveness of baculoviruses.

Neuhoff, V., *et al.* (1985). "Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis." *Electrophoresis*, 6(9), 427-448

Oliveira, M. G., *et al.* "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* 268.36 (1993): 26893-26903.

Oliveira, M. G. A., *et al.* "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* 140.3 (2005): 369-380.

Oliveira, J. C. "Seleção de bacillus spp. da Amazonia brasileira portadores do gene Chi (quitinase) para o controle biológico de *Aedes (stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)." (2018).

Praça, L. B. *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (lepidoptera: Noctuidae). Biologia, amostragem e métodos de controle. / Lílian Botelho Praça, Sebastião Pedro da Silva Neto e Rose Gomes Monnerat. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 18 p.

Pratissoli, D., *et al.* "Leaf consumption and duration of instars of the cassava defoliator *Erinnyis ello* (L., 1758)(Lepidoptera, Sphingidae)." *Revista Brasileira de Entomologia* 46 (2002): 251-254.

Patarroyo-vargas, A. M., *et al.* (2017). Kinetic Characterization of *Anticarsia gemmatalis* Digestive Serine-Proteases and the Inhibitory Effect of Synthetic Peptides. *Protein and peptide letters*, 24(11), 1040-1047.

- Patarroyo-vargas, A. M., *et al.* Inhibition kinetics of digestive proteases for *Anticarsia gemmatalis*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 92, n. suppl 1, p. e20180477, 2020.
- Higgins, P. N., & Vologodskii A. V. "Topological behavior of plasmid DNA." *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery* (2015): 105-131.
- Panneerselvam, R., & Lakshmanan, R. "Plant-pest interaction: an overview." *Middle-East. J. Sci. Res* 4 (2009): 57-60.
- Plata-Rueda, A., *et al.* "Lemongrass essential oil and its components cause effects on survival, locomotion, ingestion, and histological changes of the midgut in *Anticarsia gemmatalis* caterpillars." *Toxin Reviews* 41.1 (2022): 208-217.
- Perona, J. J., & Craik, C. S. "Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold." *Journal of Biological Chemistry* 272.48 (1997): 29987-29990.
- Perona, J. J. & Craik, C. S. "Structural basis of substrate specificity in the serine proteases." *Protein Science* 4.3 (1995): 337-360.
- Rabilloud, T. (2018). "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: A general overview." In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1853, pp. 61-73).
- Rodriguez, Jon-Marc G., *et al.* "Michaelis–Menten graphs, Lineweaver–Burk plots, and reaction schemes: Investigating introductory biochemistry students’ conceptions of representations in enzyme kinetics." *Journal of Chemical Education* 96.9 (2019): 1833-1845.
- Rosenfeld, J., *et al.* (1992). "In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis." *Analytical Biochemistry*, 203(1), 173-179.
- Rosenberg, I. M. *Protein analysis and purification: benchtop techniques*. Springer Science & Business Media, 2013.
- Reginaldo, N. L. N., *et al.* "MANEJO DE *Anticarsia gemmatalis* NA CULTURA DA SOJA: UMA REVISÃO.
- Silva-Júnior, N. R. *et al.* Intestinal proteases profiling from *Anticarsia gemmatalis* and their binding to inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 3, p. e21792, 2021.
- Samada, L. H., *et al.* "Biopesticides as promising alternatives to chemical pesticides: A review of their current and future status." *Online J. Biol. Sci* 20.2 (2020): 66-76.
- Santos, S. A. O., *et al.* (2016). Ecological aspects of plant volatiles. *Current Organic Chemistry*, 20(18), 1908-1937.
- Silva-Junior, N. R., *et al.* "Use of Protease Inhibitors as a Promising Alternative for Pest Control." *Natural Products as Enzyme Inhibitors: An Industrial Perspective*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. 137-151.

Szewczyk, B., *et al.* (2006). Baculoviruses—re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances*, 24(2), 143-160.

Shukla, E. *et al.* Gaikwad. *Hydrolases: the most diverse class of enzymes*. London: IntechOpen, 2022.

Schlüter, U., *et al.* "Recombinant protease inhibitors for herbivore pest control: a multitrophic perspective." *Journal of experimental botany* 61.15 (2010): 4169-4183.

Saikhedkar, N. S., *et al.* "Tripeptides derived from reactive centre loop of potato type II protease inhibitors preferentially inhibit midgut proteases of *Helicoverpa armigera*." *Insect biochemistry and molecular biology* 95 (2018): 17-25.

Srinivasan, B. "A guide to the Michaelis–Menten equation: steady state and beyond." *The FEBS journal* 289.20 (2022): 6086-6098.

Shao, En-si, *et al.* "Identification of transcripts involved in digestion, detoxification and immune response from transcriptome of *Empoasca vitis* (Hemiptera: Cicadellidae) nymphs." *Genomics* 109.1 (2017): 58-66.

Shea, Z., *et al.* "Soybean production, versatility, and improvement." *Legume crops-prospects, production and uses* (2020): 29-50.

Switzer III, R. C., *et al.* "A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels." *Analytical biochemistry* 98.1 (1979): 231-237.

Singh, I. K., & Archana S. *Plant-pest interactions: from molecular mechanisms to: chemical ecology*. New York NY: Springer, 2021.

Stojšin, D. *et al.* "Plant characterization of insect-protected soybean." *Transgenic Research* (2024): 1-12.

Vatanparast, M, & Yonggyun K. "Optimization of recombinant bacteria expressing dsRNA to enhance insecticidal activity against a lepidopteran insect, *Spodoptera exigua*." *PLoS One* 12.8 (2017): e0183054.

Xiaoming, Z & Qiong, L. "A Brief Introduction of Main Diseases and Insect Pests in Soybean Production in the Global Top Five Soybean Producing Countries." *Plant Diseases & Pests* 9.1 (2018).

Wang, Y., *et al.* "An Effective Modification Strategy to Build Multifunctional Peptides Based on a Trypsin Inhibitory Peptide of the Kunitz Family." *Pharmaceutics* 16.5 (2024): 597.

Watts, A. *et al.* "Optimizing protein expression in heterologous system: Strategies and tools." *Meta Gene* 29 (2021): 100899.

ANEXOS

Artigo submetido a revista ACS Chemical Biology

Characterization and heterologous expression of a bioinsecticidal peptide targeting the soybean pest *Anticarsia gemmatalis*

Rafael Júnior de Andrade^{1,2}, Yaremis Meriño-Cabrera^{2,3*}, Halina Schultz^{2,4}, Geisiane Aparecida Mariano^{1,2}, José Severiche Castro^{2,5}, Maria Clara Neves Gomes Rodrigues^{1,2}, Ian Lucas Batista Santos^{1,2}, Luciano Gomes Fietto¹; Humberto Josué de Oliveira Ramos^{1,2} & Maria Goreti de Almeida Oliveira^{1,2*}.

¹Departamento de Bioquímica e Biologia molecular, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil. ²Instituto de Biotecnologia aplicada à Agropecuária, BIOAGRO-UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. ³Departamento de Biología, Grupo de investigación en Biología de Micoorganismos (GIBM), Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia. ⁴Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil. ⁵Departamento de Física, Grupo interdisciplinar de Física teórica y aplicada (GIFTA), Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia.

*Corresponding authors

- PhD. Yaremis Meriño Cabrera

E-mail: yaremisbmc@gmail.com

Phone: +57 3022498595

- PhD. Maria Goreti de Almeida Oliveira

E-mail: malmeida@ufv.br

Phone: +55 31 9916-9036

Adress: UFV, Universidade Federal de Viçosa- Campus Viçosa, Avenida PH Rolfs Campus Universitário, Viçosa-Minas Gerais- CEP 36570000

ABSTRACT

Soybeans are a globally important crop, with Brazil as a leading producer. The caterpillar *Anticarsia gemmatalis* is a major defoliating pest, significantly reducing soybean yield and quality. Pest control typically relies on phytosanitary products and agrochemicals, but their overuse negatively impacts the environment and human health. Plants naturally produce secondary metabolites and protease inhibitors (PIs) to defend against insects. These PIs are being studied as potential alternatives to conventional insecticides. This study aims to develop and heterologous production of a recombinant chimeric peptide (GORE 1,2*t*) with insecticidal

capacity, potentially serving as a model for producing mimetic peptides or developing transgenic pest-resistant plants. A nucleotide sequence based on trypsin inhibitor tripeptides was designed and incorporated into a pET-41(a)+ plasmid vector. *E. coli* strains were transformed, and the recombinant peptides were expressed and purified. The peptide's inhibition efficacy was evaluated through kinetic enzymatic assays using midgut extracts from *A. gemmatalis*. Additionally, in silico structural interaction analyses between the peptide and insect trypsins were performed. Successful expression and purification of the recombinant peptide were achieved in the BL21(DE3)pLysS strain of *E. coli*. The peptide demonstrated competitive inhibitory capacity against midgut trypsins from *A. gemmatalis*, evidenced by the peptide's high affinity for trypsin binding sites in vitro assays and molecular docking analyses. The development and heterologous expression of GORE 1,2*t* peptide proved to be an effective strategy for inhibiting digestive protease activity in agricultural pests. These results open the possibility of using such peptides as a sustainable alternative to traditional insecticides, contributing to crop protection and reducing environmental impact.

Key-words: Kinetic, larvae, molecular docking, purification, tandem.

INTRODUCTION

Soybean is one of the primary commodities with a significant impact on the global economy, with Brazil playing a central role in its production and commercialization (Hamza, 2024). The caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1918) (Lepidoptera: Noctuidae) is the main defoliating pest of soybeans, affecting both productivity and product quality (Xiaoming & Qiong, 2018; De Menezes, 2024). Control of this pest, as well as other insect pests, is primarily achieved using phytosanitary products and agrochemicals/insecticides based on organic molecules rather than biomolecules, or transgenic cultivars. However, the indiscriminate and excessive use of these products has had a negative impact on the environment, ecological relationships, and human health (Shao et al., 2017; Baskar et al., 2018).

As an evolutionary defense mechanism against insects, plants synthesize various molecules, such as secondary metabolites and protease inhibitors (PIs). These PIs are increasingly explored as an alternative to conventional insecticides (Dhivya et al., 2018). PIs are an abundant class of proteins synthesized especially by plants, affecting insect growth and development by inhibiting digestive protease activity, leading to nutrient deprivation (Saikhedkar et al., 2018; Meriño-Cabrera et al., 2019; Lima et al., 2024).

However, some insects have developed mechanisms to overcome these natural plant defenses, either through the expression of insensitive proteases or cleavage of the inhibitors by other proteases, as natural PIs are large molecules (Yang, 2009). Machado et al. (2017) noted that insects likely overcome these natural inhibitors due to low specificity with the target protease active site. To replace typical agricultural defensives and solve the problem of large PI molecules, the development and search for small, highly specific PIs capable of overcoming insect adaptive mechanisms is underway (Oliveira et al., 1993; Krinski et al., 2018; Meriño-Cabrera et al., 2020; Meriño-Cabrera et al., 2022).

To address these challenges in pest insect control, the development of small amino acid chain PIs with high specificity for important midgut proteases of herbivores will aid in their control and be easily degradable by soil microorganisms. Previously characterized tripeptidic substrates (Oliveira et al., 1993; Patarroyo-Vargas et al., 2017; De Oliveira, 2020; De Almeida Barros et al., 2021) have shown high affinity for trypsin-like proteases, being strong candidates as inhibitors of this enzyme if the cleavage site is removed. These tripeptidic substrates were designed based on their affinity for hydrophobic residues of subsites S3, S2, and S1 (Schechter & Berger, 1968) of trypsin-like proteases present in the midgut of *A. gemmatalis*.

The production of these tripeptidic substrates has traditionally been achieved through organic synthesis, but their heterologous expression is a more economical and feasible alternative. Heterologous expression involves producing proteins in an organism different from the one that originally produces them, taking advantage of more efficient and scalable biological systems such as bacteria, yeasts, or mammalian cells. This not only reduces production costs but also allows greater precision and control in the design of the molecules (Demain & Vaishnav, 2009).

Furthermore, heterologous expression enables the production of peptides in large quantities, which is crucial for practical field applications (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Using heterologous expression systems, such as *E. coli* or yeasts, offers several advantages, including the ability to produce recombinant proteins with specific post-translational modifications, essential for the biological activity of inhibitory peptides (Terpe, 2006). Additionally, these systems enable the rapid and large-scale production of highly pure peptides, which is essential for functional studies and practical applications in pest control (Walsh & Headon, 1994). Therefore, the objective of this work was the synthetic development and heterologous expression of a recombinant chimeric peptide with insecticidal capacity, which could also be used as a model for the production of mimetic peptides or generate data for the development of transgenic plants for pest management, as they would be easily degradable by soil microorganisms.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and solution preparation

All reagents used for solution preparation were of analytical grade and suitable for molecular biology work. Water used was distilled and deionized (Milli-Q water). Materials and solutions were sterilized at 120°C for 15 minutes.

Heterologous expression of recombinant chimera

The nucleotide sequence of the recombinant chimeric peptide was designed based on sequences of two tripeptides with trypsin-like inhibitory activity previously characterized in earlier studies (Oliveira et al., 1993; Patarroyo-Vargas et al., 2017; De Oliveira, 2020; De Almeida Barros et al., 2021). The chimera encoding sequence was synthesized and incorporated into the plasmid vector pET-41(a)+, containing codons optimized for expression in *E. coli*, along with a GST tag (Glutathione-S-transferase) for purification.

***E. coli* strains and culture media**

All bacterial strains used in this research were stored at -80°C in Luria Bertani (LB) medium supplemented with 25% glycerol. DH5 α strain was used for plasmid storage and purification, while BL21(DE3)pLysS strain was employed for heterologous expression. *E. coli* strains were cultured in both liquid and solid LB medium.

Preparation of *E. coli* competent cells

E. coli strains were streaked on LB-agar plates and incubated for 16 hours at 37°C. Colonies were then inoculated into 5 mL of LB medium and grown with shaking for 16 hours. The inoculum was diluted into 100 mL of LB medium and grown until reaching an optical density (OD_{600nm} = 0.6) (Tang et al., 1994). The culture was chilled on ice for 10 minutes. After centrifugation, the pellet was resuspended in chilled 0.1 M CaCl₂ solution. Following 15 minutes of incubation on ice, the suspension was centrifuged again, and the pellet was resuspended in 0.1 M CaCl₂ solution.

Transformation in *E. coli*

Bacteria were transformed using the heat shock method. 3 μ L of plasmid vector was added to 100 μ L of competent cells and kept on ice for 10 minutes, followed by heat shock at 42°C for 1 minute and then placed back on ice for 5 minutes. 100 μ L of LB medium was added to the transformed cells, and they were incubated at 37°C with shaking for 1 hour. Transformed bacteria were then streaked onto LB-agar plates supplemented with chloramphenicol (34 μ g/mL) and kanamycin (100 μ g/mL) and incubated for 16 hours at 37°C. Selected colonies were inoculated into 5 mL of LB medium with the same antibiotics and grown at 37°C for 16 hours at 180 rpm. Transformations were confirmed by miniprep and plasmid observation on 0.8% agarose gel (Engebrecht, 1991).

Expression of recombinant chimera peptide

Confirmed colonies containing the plasmid were inoculated into LB medium with chloramphenicol (34 µg/mL) and kanamycin (100 µg/mL) and grown at 37°C with shaking at 180 rpm for 16 hours. The culture was diluted 1:50 in LB medium and grown to mid-log phase (OD₆₀₀ ~ 0.4-0.8). At this point, IPTG was added to induce promoter activation. The culture was fractionated and subjected to growth conditions of 4, 8, 12, and 16 hours at 37°C, and 20 hours at 18°C, all under 180 rpm shaking.

Preparation of protein extracts, soluble and insoluble

After expression period, the culture was centrifuged at 4,100 rpm for 20 minutes at 4°C. The pellet was resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.3 and subjected to cell lysis by sonication (Sonics Vibra-Cell VCX 750) for 5 minutes, with 20 seconds ON / 10 seconds OFF intervals, 100% power, always on ice. The suspension was centrifuged again at 4,100 rpm for 20 minutes at 4°C, and the supernatant stored at -20°C. The new pellet was solubilized in the same solution as before plus 8 M urea, centrifuged again, and the new supernatant stored as previously.

Peptide purification

Purification was performed using Batch Purification technique with Glutathione Sepharose 4B Affinity media (Cytiva) and Vivaspin 10 and 3 MWCO ultrafiltration columns (Cytiva). 1 mL of resin was transferred to a 15 mL Falcon tube, equilibrated, and washed with 5 volumes of PBS buffer. 1.5 mL of elution buffer (Tris-HCl 0.05 M pH 8 supplemented with reduced glutathione 10 mM) was used. For GST cleavage, the eluate was incubated with enterokinase (Sigma Aldrich) at 37°C for 16 hours. The sample was then concentrated and buffer exchanged using Vivaspin columns, removing urea.

Analysis of recombinant peptide by SDS-PAGE and mass spectrometry

Analysis was conducted by SDS-PAGE gel electrophoresis, using 15% separation gel and 4% stacking gel (Laemmli, 1970). Bacterial culture samples with and without IPTG activation,

sonication lysis, and purified samples were analyzed. Following electrophoresis, gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (GE Healthcare) and destained with 40% ethanol/10% acetic acid solution. Proteolytic digestion was performed as described by Coutinho et al. (2019) with trypsin solution at 20 ng/ μ L for 20 hours at 37°C, using extraction buffer (50% acetonitrile, 5% formic acid). Peptides were dissolved in 0.1% formic acid (v/v) and analyzed by LC-MS using a nano-UHPLC system (nanoACQUITY-Waters) with a C18 BEH130 1.7 μ M - 100 nm $\times$ 100 mm capillary column, operating at a flow rate of 0.5 μ L/min. Eluted peptides were automatically injected into an ION TRAP mass spectrometer (Amazon-Bruker), using nanoESI ionization needle. Mass spectrometry was conducted as described by Lima et al. (2019) and Coutinho et al. (2019).

In vitro analysis of inhibitory effect of purified recombinant peptide

Extraction of midgut from *Anticarsia gemmatalis*

Eggs of the caterpillar, *A. gemmatalis*, were obtained from a colony maintained at the Insect Rearing Laboratory, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Viçosa. After egg hatching, larvae were fed on artificial diet and kept in a climate chamber at 25°C with relative humidity of 60 $\pm$ 10% and a photoperiod of 14h light and 10h dark (Greene et al., 1976). Twenty-five larvae in the 3rd and 4th instar stages had their midguts extracted, homogenized with liquid nitrogen, and resuspended in 1 mM HCl solution at 4°C, using a ratio of 5 midguts per 1 mL of solution. Samples were centrifuged at 10,000g for 30 minutes at 4°C, and the supernatant was filtered through a 22 μ m membrane, then stored at -20°C. Total protein was quantified using Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific™).

Enzymatic inhibition model

The enzymatic inhibition model and inhibition constants (K_i) between the recombinant peptide and trypsin-like enzymes from crude extract of *A. gemmatalis* were determined using the specific chromogenic substrate D,L-BApNA (benzoyl-D,L-arginyl-p-nitroanilide). Assays were conducted in 0.1 M Tris – HCl buffer, 20 mM CaCl₂, pH 8.2, varying D,L-BApNA substrate

concentrations from 0.1 to 0.8 mM and recombinant peptide concentrations from 0 to 200 mM. Chloramphenicol hydrate (Sigma Aldrich) was used as a control relative to the peptide. Observed velocities versus substrate concentrations (in the presence and absence of inhibitors) were simultaneously fitted using non-linear and linear regression in GraphPad Prism 5.0 (Motulsky, 2007) and OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation). Assays were conducted in 1 cm path length quartz cuvettes with a volume of 1 mL. Enzymatic activity was determined based on the formation of p-nitroanilide product, using a molar extinction coefficient of 8800 M⁻¹cm⁻¹ (Erlanger et al., 1961).

***In Silico* structural interaction analysis: peptide GORE 1-2t and *Anticarsia gemmatalis* trypsins**

Peptide GORE 1-2t

The peptide GORE 1,2t, containing the GORE1 and GORE2 sequences (de Almeida Barros et al. 2021) repeated seven times each to form a helical structure, has an amino-terminal residue of valine (Val) and a carboxyl-terminal residue of arginine (Arg). Its three-dimensional structure was modeled using the online software Phyre2 (Kelley et al. 2015).

Trypsins in *Anticarsia gemmatalis*

Five trypsin sequences from *A. gemmatalis* were obtained from the study on intestinal proteases profiling and their binding to inhibitors (Silva-Júnior et al. 2021) and were modeled using the online Phyre2 server (Kelley et al. 2015). The three-dimensional structures of the *A. gemmatalis* trypsins were subjected to quality analysis using the PROSA (Protein Structure Analysis) webserver, ERRAT, and Ramachandran plot analysis.

Molecular docking: trypsin-peptide GORE 1-2t

The modeled tryptins were used as receptors in the docking analysis using the online software CLUSPRO, which is used for protein-protein and protein-peptide docking. Each trypsin file was uploaded individually as a receptor, and the ligand was the peptide GORE 1-2t (Table 2). Five dockings were performed for the ligand because five trypsin receptors were tested. DS Visualizer 4.0 (Studio, 2012) and PyMOL (Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrodinger, LLC) were used to create all figures.

RESULTS AND DISCUSSION

Expression and purification of the recombinant peptide

The expression and purification of recombinant peptides are critical steps in biotechnology and research, particularly when studying protein-protein interactions and enzyme kinetics. In this study, we evaluated various *Escherichia coli* strains for their effectiveness in expressing a GST-tagged peptide. The strains DH5 α , BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, and ArcticExpress (DE3) were selected based on their transformation efficiency and protein expression capabilities.

The *E. coli* strain DH5 α was chosen as the plasmid reservoir due to its high transformation efficiency, ability to produce clones, and compatibility with competent cell production through CaCl₂ treatment. Ca⁺² ions form a complex with the charged phosphates in the membrane, neutralizing the negative charges and facilitating electrostatic attraction with genetic material (Asif et al., 2017). BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, and ArcticExpress (DE3) strains were transformed for the expression of the recombinant peptide and subsequent evaluation of protein product yield. Transformation confirmation was performed using agarose gel electrophoresis of miniprep samples (Figure 1), where the four topologies of plasmid DNA were visualized (Higgins, 2015).

Initial expression confirmation involved analyzing the crude bacterial extract via SDS-PAGE followed by western blotting with antibodies specific to the GST tag (Figure 2), since the expressed product (GST-peptide) is indistinguishable from bacterial proteins. Despite attempts to express at lower temperatures (Kim, 2008) and using the ArcticExpress (DE3) strain to improve solubility, no significant improvements were observed. Previous studies (Frangioni, 1993; Jashandeep, 2018) attributed this low solubility to the amino acid composition of GST. The combination of GST characteristics with the peptide in question resulted in its recovery in the insoluble fraction. Using ArcticExpress did not provide satisfactory improvements in solubility; instead, the BL21(DE3)pLysS strain demonstrated superior performance among the three tested. Figures 3 and 4 clearly show the preferential accumulation of the GST-peptide product in the insoluble fraction after extraction. The GST, along with the peptide, presented a mass of 35.23 kDa, consistently observed in all gels. The optimized methodological conditions to maximize product yield were 1.5 mM IPTG for 16 hours at 37°C with shaking at 180 rpm. Notably, even in minimal amounts without the addition of inducer, the product was expressed. Briand (2016) discussed the limitations associated with using IPTG for large-scale peptide production due to economic concerns, suggesting alternatives to improve results without the need for this inducer.

In the purification, SDS-PAGE and WB analysis (Figure 5) confirmed cleavage, with the 35 kDa GST-peptide band transferring to 25 kDa, corresponding only to GST. It is important to note that the peptide of interest was not detected by Coomassie staining, consistent with findings discussed by Neuhoff (1985) and Rosenfeld (1992), attributing this to low binding affinity, size, and hydrophobicity. Silver staining proved more effective for visualizing the peptide in gels, as illustrated in Figures 6 and 7. The silver staining method described by Switzer (1979) was particularly efficient, with Rabilloud (2018) and Ahsan (2017) noting its superior sensitivity for small peptides, regardless of amino acid composition and physicochemical characteristics. For better visualization, 16% SDS-PAGE (Tris-Tricine) described by Haider (2011) was applied.

The gel results were corroborated by mass spectrometry, confirming the peptide sequence (patent-protected) with a mass of 5.9 kDa. The spectra were analyzed using PEAKS 7.0 software against a Swissprot protein database containing all annotated proteins. A sequence containing the fusion construct in the expression vector was included in the FASTA file containing all Swissprot proteins. Database searches included methionine oxidation as a variable modification, cysteine carbamidation as a fixed modification, missed cleavages, 2+, 3+, 4+ charge states, trypsin cleavage enzyme, and a mass error of 0.15 Da. Only protein identification results with a false discovery rate (FDR) below 1.0% were considered.

Inhibition kinetics

Protease inhibitors (PIs) are a class of molecules capable of negatively interfering with the catalytic action of proteases, with Kunitz-type inhibitors being the most characterized (Wang, 2024). In pest control, developing specific inhibitors for proteases involved in the digestive process is a strategy aimed at inducing starvation and, consequently, affecting growth, development, and reproduction (De Almeida Barros et al., 2020; De Oliveira et al., 2020; Meriño-Cabrera et al., 2020).

For the kinetic assay, trypsin-like enzyme fractions obtained from the midgut of *A. gemmatalis* were used as described in the methodology, with a total protein quantification resulting in a 6 mg/mL sample. The assays were performed with 5 μ L of the sample, chosen based on preliminary assays with different volumes and the observation of absorbance deltas, prioritizing a significant delta with the least amount of sample. In this study, the apparent kinetic parameters $K_{m,App}$ and $V_{max,App}$ were obtained since we are not working with a pure system (Copeland, 2023).

Consistent with Oliveira (2005), the K_m value found for the treatment without inhibitor is appropriate. Data treatment using the Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk (Rodriguez, 2019), and Dixon (Dixon et al., 1979) mathematical models confirmed a competitive inhibition model

for the synthetic peptide (Figures 7 and 8). The competitive inhibitor increases the substrate K_m value, requiring a higher concentration to reach any fraction of V_{max} . This factor can be considered crucial as a statistical term dependent on $[I]$, describing the enzyme distribution in free form and EI form. Higher inhibitor concentrations result in an increase in both K_m and the curve slope by this factor. Inhibitor and substrate are mutually exclusive, competing for the same binding site in the enzyme's active center region (Patarroyo-Vargas, 2020). De Almeida Barros (2020) separately determined the K_i values (Table I) against partially purified trypsin-like enzymes from the midgut of *A. gemmatalis*.

Since the synthetic peptide is composed as a tripeptide chimera, the K_i value of 100 μM found is consistent and similar to the known tripeptide GORE 2. The synthetic peptide demonstrated inhibitory action against the protease, affecting the action of trypsin-like enzymes of *A. gemmatalis*. The synthetic peptide showed potent inhibitory action against proteases, highlighting its ability to interfere with the activity of trypsin-like enzymes of *A. gemmatalis*. This effect is attributed to the presence of binding sites for the three subsites of the trypsin-like enzymes, as discussed by Patarroyo-Vargas et al. (2017), De Almeida Barros et al. (2020), De Oliveira et al. (2020), and Oliveira et al. (1993). Comparatively, protein inhibitors like the studied peptide are kinetically more efficient than smaller molecules such as benzamidine, which bind only to the S1 subsite. This phenomenon can be attributed to the evolution of S2 and S3 subsites in Lepidoptera insects, which have become more hydrophobic over time (Lopes et al., 2006).

***In silico* structural interaction analysis: peptide GORE 1-2t and *Anticarsia gemmatalis* trypsins**

The investigated peptide, containing the tripeptides GORE1 and GORE2, includes two hydrophobic amino acid residues positioned in the second and third positions, differing only in the residue binding to the active center. This structural composition grants the peptide GORE 1,2t a specific and effective affinity for trypsin-like binding sites, enabling it to act as a potent inhibitor of enzymatic activity.

Docking results between GORE 1,2t and trypsins are presented in Table 2. This table illustrates the size (i.e., the number of members), the weighted energy score of the cluster center (i.e., the structure with the highest number of neighboring structures in the cluster), and the energy score of the lowest energy structure in the cluster (Kozakov et al., 2017). It is noteworthy that the top cluster, with 145 members (Trypsin1), is significantly larger than the second largest cluster, which has 132 members. This difference indicates a well-defined set of encounter complexes (Table 2).

The negative values of the energy scores further validate the binding interaction between GORE 1,2t and trypsins (Table 2). Negative energy scores typically indicate a favorable binding interaction, corroborating the peptide's effectiveness as an inhibitor. The 2D interaction plots generated using the Pymol visualizer reveal that the peptide binds to the active site or a nearby region 70% of the time (Fig 9). This high binding frequency near the active site underscores the competitive inhibition mechanism observed in experimental analyses. The affinity of GORE 1,2t for trypsin-like enzymes is a significant finding. The hydrophobic amino acid residues play a crucial role in enhancing this affinity by facilitating interactions with the hydrophobic pockets of the enzyme's active site. This interaction is essential for the inhibitory action, as it allows the peptide to effectively compete with natural substrates for binding to the active site. The active site is characterized by the presence of the catalytic triad His-Asp-Ser. The positions of these residues vary depending on the species and trypsin isoform. In *A. gemmatalis* trypsin 1, used as the model for the figures, these amino acid residues are found at positions His89, Asp135, and Ser237 (Fig 9A).

CONCLUSION

The study successfully expressed and purified a recombinant GORE 1,2t peptide using various *E. coli* strains, with BL21(DE3)pLysS demonstrating superior performance. Despite attempts to enhance solubility with ArcticExpress (DE3), the peptide predominantly accumulated in the insoluble fraction. Optimized conditions involved 1.5 mM IPTG induction at

37°C for 16 hours. SDS-PAGE and western blotting confirmed expression, with mass spectrometry verifying the peptide sequence. The kinetic assays showed the synthetic peptide acted as a competitive inhibitor against *A. gemmatalis* midgut trypsin-like enzymes, with a K_i value of 100 μ M. In silico analysis revealed the peptide's high affinity for trypsin binding sites, facilitated by hydrophobic residues, supporting its potential as a potent protease inhibitor. The findings suggest that this recombinant peptide could serve as an effective and sustainable alternative to traditional insecticides, contributing to environmentally friendly pest control strategies in soybean cultivation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Rafael Junior de Andrade: Conceptualization, Methodology, Investigation, Validation, Formal Analysis, Writing - Original Draft. **Yaremis Meriño-Cabrera:** Formal Analysis and Writing - Review & Editing. **Halina Shultz:** Investigation, Validation, Conceptualization, Methodology. **Geisiane Mariano:** Methodology. **José Severiche Castro:** Investigation and simulations **Maria Clara:** Investigation, Validation. **Ian Lucas:** Investigation, Validation. **Luciano Fietto:** Methodology, Investigation, Validation, Conceptualization, Funding acquisition. **Humberto Josué Ramos de Oliveira:** Methodology, Investigation, Validation, Conceptualization, Writing – Review, Funding acquisition. **Maria Goreti de Almeida Oliveira:** Funding acquisition, Conceptualization, Investigation, Validation, Writing – Review.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

CONFLICT OF INTEREST AND INFORMED CONSENT

The authors declare that they have no conflict of interest. All the authors of this manuscript accepted that the paper is submitted for publication in the *ACS Chemical Biology*, and report that this paper has not been published or accepted for publication in another journal, and it is not under consideration at another journal.

ETHICAL APPROVAL

All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were considered in the present investigation.

REFERENCES

- Baskar, Kathirvelu, et al. "Toxicity and antifeedant activity of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb.(Caesalpiniaceae) extracts and fractions against the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* Hub.(Lepidoptera: Noctuidae)." *Physiological and molecular plant pathology* 101 (2018): 69-74.
- Briand, Loïc, et al. "A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*." *Scientific reports* 6.1 (2016): 33037.
- Copeland, Robert A. *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. John Wiley & Sons, 2023.
- Coutinho, Henrique Douglas Melo. UPLC-MS-ESI-QTOF Characterization and evaluation of the. *Avaliação de bioatividades e da ação dos extratos*, p. 44, 2019.
- De Almeida Barros, Rafael *et al.* Small peptides inhibit gut trypsin-like proteases and impair *Anticarsia gemmatilis* (L epidoptera: Noctuidae) survival and development. *Pest Management Science*, v. 77, n. 4, p. 1714-1723, 2021.
- De Menezes, Carlos Henrique Martins, et al. "Exposure to insecticides cause mortality, respiratory disturbs, and antifeeding effects in *Anticarsia gemmatilis*." *Phytoparasitica* 52.1 (2024): 1-10.
- De Oliveira, Giordani *et al.* Inhibitory effects of tripeptides to enzymatic activity and life cycle parameters of *Anticarsia gemmatilis*. *Phytoparasitica*, v. 48, n. 5, p. 823-831, 2020.
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297-306.
- Fernandez-Lima, Francisco Alberto. "Applications of native nESI-TIMS-MS for structural biology." *ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*. Vol. 257. 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA: AMER CHEMICAL SOC, 2019.
- Haider, Syed R., Barry L. Sharp, and Helen J. Reid. "A comparison of Tris-glycine and Tris-tricine buffers for the electrophoretic separation of major serum proteins." *Journal of separation science* 34.18 (2011): 2463-2467.
- Hamza, Muhammad, et al. "Global Impact of Soybean Production: A Review." *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* 16.2 (2024): 12-20.
- J.V. Frangioni, B.G. Neel, Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins, *Anal. Biochem.* 210 (1) (1993) 179–187.
- Kaur Jashandeep, Arbind Kumar, and Jagdeep Kaur. "Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements." *International journal of biological macromolecules* 106 (2018): 803-822.
- Kim, Seonghun, and Sun Bok Lee. "Soluble expression of archaeal proteins in *Escherichia coli* by using fusion-partners." *Protein Expression and Purification* 62.1 (2008): 116-119.
- Krinski, Diones, Luís Amilton Foerster, and Cicero Deschamps. "Ovicidal effect of the essential oils from 18 Brazilian Piper species: controlling *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera, Erebidæ) at the initial stage of development." *Acta Scientiarum. Agronomy* 40 (2018): e35273.

Lima, Bárbara Soares Amoroso, et al. "Abamectin induces mortality, inhibits food consumption, and causes histological changes in the midgut of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)." *Journal of Pest Science* 97.1 (2024): 213-227.

Machado, Suzy Wider, et al. "Inga laurina trypsin inhibitor (ILTI) obstructs *Spodoptera frugiperda* trypsins expressed during adaptive mechanisms against plant protease inhibitors." *Archives of insect biochemistry and physiology* 95.4 (2017): e21393.

Meriño-Cabrera, Yaremis. *et al.* Noncompetitive tight-binding inhibition of *Anticarsia gemmatalis* trypsins by *Adenanthera pavonina* protease inhibitor affects larvae survival. *Archives of insect biochemistry and physiology*, v. 104, n. 3, p. e21687, 2020.

Meriño-Cabrera, Yaremis, et al. "Inhibition of digestive trypsins by plant Kunitz proteins reduces the viability of *Spodoptera cosmioides* larvae." *Annals of Applied Biology* 175.3 (2019): 336-349.

Meriño-Cabrera, Y., Castro, J. S., de Almeida Barros, R., da Silva Junior, N. R., de Oliveira Ramos, H., & de Almeida Oliveira, M. G. (2022). Arginine-containing dipeptides decrease affinity of gut trypsins and compromise soybean pest development. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 184, 105107.

Neuhoff, V., Stamm, R., & Eibl, H. (1985). "Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis." *Electrophoresis*, 6(9), 427-448

Oliveira, M. G., et al. "Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. Identification by covalent labeling with p-diazoniumbenzamidine and kinetic characterization of Tyr-151-(p-benzamidino)-azo-beta-trypsin." *Journal of Biological Chemistry* 268.36 (1993): 26893-26903.

Oliveira, M. G. A., et al. "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* 140.3 (2005): 369-380.

Patarroyo-vargas, A. M.; merino-cabrera, y. b.; zanuncio, j. c., rocha, f., campos, w. g., oliveira, m. g. de a. (2017). Kinetic Characterization of *Anticarsia gemmatalis* Digestive Serine-Proteases and the Inhibitory Effect of Synthetic Peptides. *Protein and peptide letters*, 24(11), 1040-1047.

Patarroyo-vargas, Adriana M. et al. Inhibition kinetics of digestive proteases for *Anticarsia gemmatalis*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 92, n. suppl 1, p. e20180477, 2020.

Patrick Higgins, N., and Alexander V. Vologodskii. "Topological behavior of plasmid DNA." *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery* (2015): 105-131.

Rabilloud, T. (2018). "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: A general overview." In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1853, pp. 61-73).

Rodriguez, Jon-Marc G., et al. "Michaelis–Menten graphs, Lineweaver–Burk plots, and reaction schemes: Investigating introductory biochemistry students' conceptions of representations in enzyme kinetics." *Journal of Chemical Education* 96.9 (2019): 1833-1845.

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in microbial systems. *Frontiers in Microbiology*, 5, 341.

Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C., & Ferrara, P. (1992). "In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis." *Analytical Biochemistry*, 203(1), 173-179.

Saikhedkar, Nidhi S., et al. "Tripeptides derived from reactive centre loop of potato type II protease inhibitors preferentially inhibit midgut proteases of *Helicoverpa armigera*." *Insect biochemistry and molecular biology* 95 (2018): 17-25. Shao, En-si, et al. "Identification of transcripts involved in digestion, detoxification and immune response from transcriptome of *Empoasca vitis* (Hemiptera: Cicadellidae) nymphs." *Genomics* 109.1 (2017): 58-66.

Switzer III, Robert C., Carl R. Merrill, and Sidney Shifrin. "A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels." *Analytical biochemistry* 98.1 (1979): 231-237.

Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 211-222.

Walsh, G., & Headon, D. R. (1994). Protein biotechnology. *Biotechnology Advances*, 12(4), 569-598.

Wang, Ying, et al. "An Effective Modification Strategy to Build Multifunctional Peptides Based on a Trypsin Inhibitory Peptide of the Kunitz Family." *Pharmaceutics* 16.5 (2024): 597.

Xiaoming, Z; Qiong, L. "A Brief Introduction of Main Diseases and Insect Pests in Soybean Production in the Global Top Five Soybean Producing Countries." *Plant Diseases & Pests* 9.1 (2018).

Tables

Table I. Kinetic inhibition parameters obtained for the synthetic peptide and trypsin-like enzymes from the midgut of *Anticarsia gemmatalis*.

[Inhibitor] μM	K_m (mM)	$V_{\text{máx}}$ (nM.s ⁻¹)	Inhibitor	K_i
0	0,33	107	Gore 1(a)	490 μM
10	0,38	101	Gore 2(a)	100 μM
25	0,35	87		
50	0,38	83		
100	0,42	70		

Data obtained from: (a) De Almeida Barros (2020).

Tabela II. Docking results between GORE 1,2t and trypsins using Cluspro software online.

<i>Cluster</i>	<i>Members</i>	<i>Representative</i>	<i>Weighted Score</i>
<i>Trypsin 1</i>	145	Center	-997.5
		Lowest Energy	-1143.9
<i>Trypsin 2</i>	61	Center	-1060.9
		Lowest Energy	-1175.0
<i>Trypsin 3</i>	99	Center	-974.0
		Lowest Energy	-1096.4
<i>Trypsin 4</i>	79	Center	-991.6
		Lowest Energy	-1194.0
<i>Trypsin 5</i>	132	Center	-785.6
		Lowest Energy	-932.8

Figures

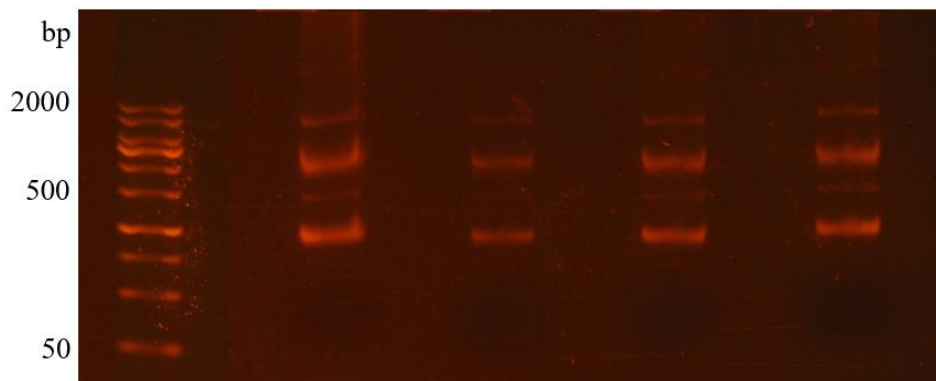


Figure 1. Confirmation of the transformation of strains DH5 α , BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, and ArcticExpress (DE3), respectively, on 0.8% agarose gel, 80V for 50 minutes. Marker: Fisher Scientific.

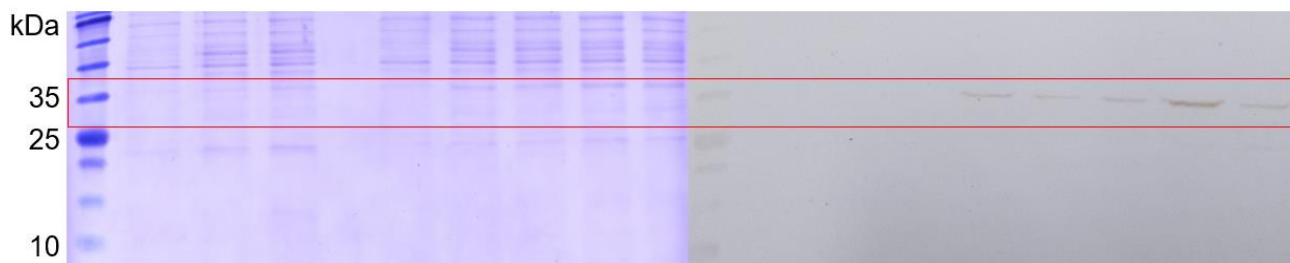


Figure 2. Crude bacterial extract (BL21(DE3)pLysS) in 15% SDS-PAGE (Tris-Glycine) and Western blot analysis using the DAB staining method. Legend: Lane 1: MW; Lanes 2, 3, and 4: Control at 0h, 4h, and 16h respectively after induction. Lane 5: Empty; Lanes 6, 7, 8, 9, and 10: pET-41a(+) 0 mM IPTG at 4h; 1mM at 4h and 16h; 1.5mM at 4h and 16h respectively. Source: author.

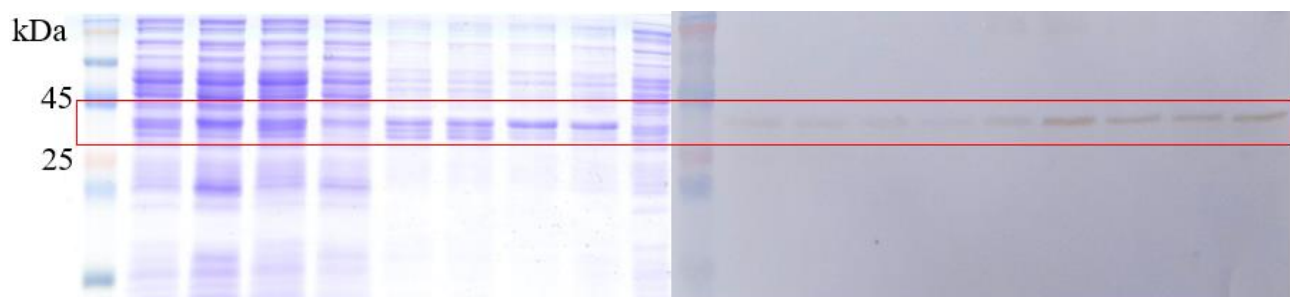


Figure 3. Soluble and insoluble fractions at different incubation times resulting from extraction by ultrasonication/centrifugation in 15% SDS-PAGE (Tris-Glycine) and Western blot analysis using the DAB staining method. Legend: Lane 1: MW. Lane 2: 0 mM IPTG at 0h. Lanes 3, 4, 5, and 6: Soluble fraction at 4h, 8h, 12h, and 16h of expression, respectively. Lanes 7, 8, 9, and 10: Insoluble fraction at 16h, 12h, 8h, and 4h. 1.5 mM IPTG.

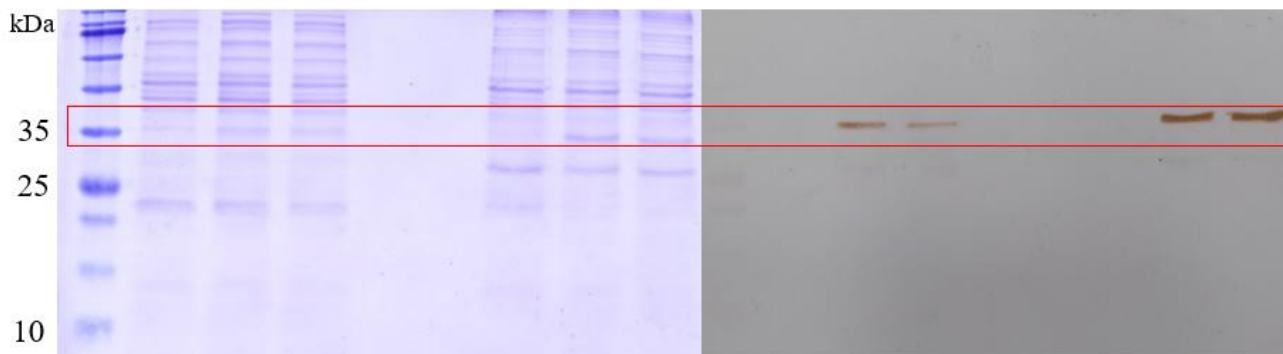


Figure 4. Soluble and insoluble fractions resulting from extraction by ultrasonication/centrifugation in 15% SDS-PAGE (Tris-Glycine) and Western blot analysis using the DAB staining method. Legend: Lane 1: MW. Lane 2: Soluble fraction control. Lanes 3 and 4: 1 mM and 1.5 mM IPTG, 16h of expression. Lanes 5 and 6: Empty. Lane 7: Insoluble fraction control. Lanes 8 and 9: 1 mM and 1.5 mM IPTG, 16h of expression.

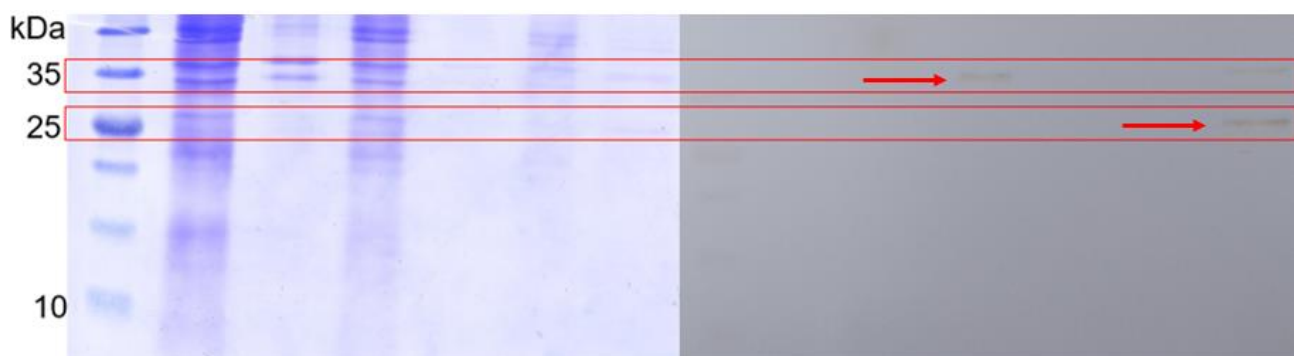


Figure 5. SDS-PAGE analysis of the purification process and Western blot analysis using the DAB staining method. Legend: Lane 1: MW. Lanes 2 and 3: Soluble and insoluble fraction controls, respectively. Lane 4: V0 aliquot of the insoluble fraction before contact with the resin. Lane 5: Empty. Lane 6: V1 volume not bound to the resin. Lane 7: VE aliquot of the elution and digestion volume.

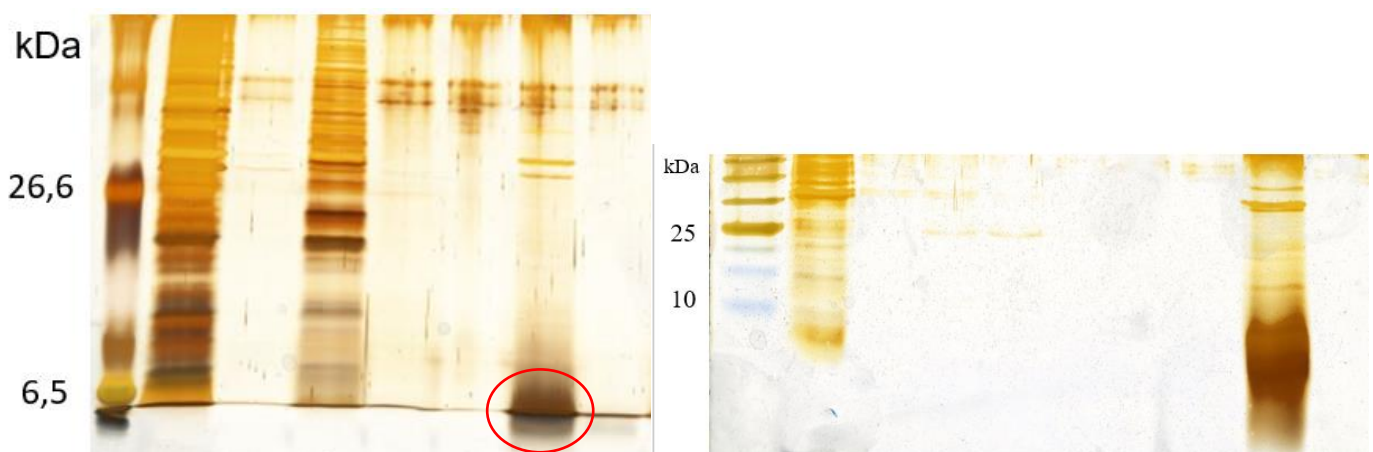


Figure 6. (Left) SDS-PAGE analysis (Tris-Tricine) 16%, of the purification process. Silver staining. Legend: Lane 1: MW. Lanes 2 and 3: Soluble and insoluble fraction controls, respectively. Lane 4: V0 aliquot of the insoluble fraction before contact with the resin. Lane 5: Empty. Lane 6: V1 volume not bound to the resin. Lane 7: VE aliquot of the elution and digestion volume with enterokinase. (Right) Lane 1: MW. Lane 2: V1 volume not bound to the resin. Lanes 3, 4, and 5: VE elution before digestion with enterokinase, after 12 and 18h at 37°C. Lane 9: Concentrate of the aliquot corresponding to the elution and digestion with enterokinase.

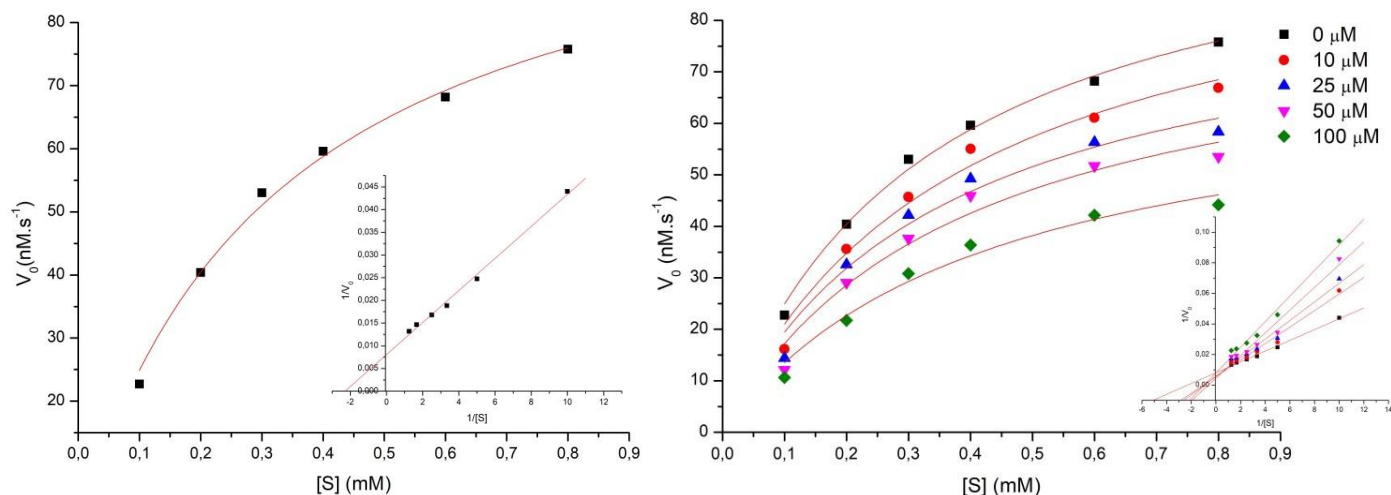


Figure 7. (Left) Michaelis-Menten plot for the hydrolysis of D,L-BApNA substrate by trypsin-like enzymes from the crude extract of the midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Inset: Lineweaver-Burk double reciprocal plot. R² of 0.99 for both linear and non-linear regression. (Right) Michaelis-Menten inhibition plot of trypsin-like enzymes from the crude extract of the midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) against D,L-BApNA substrate at different inhibitor concentrations. Inset: Lineweaver-Burk double reciprocal plot for inhibition data. R² of 0.99 for 0 and 100 μ M inhibitor concentrations, and 0.98 for 10, 25, and 50 μ M.

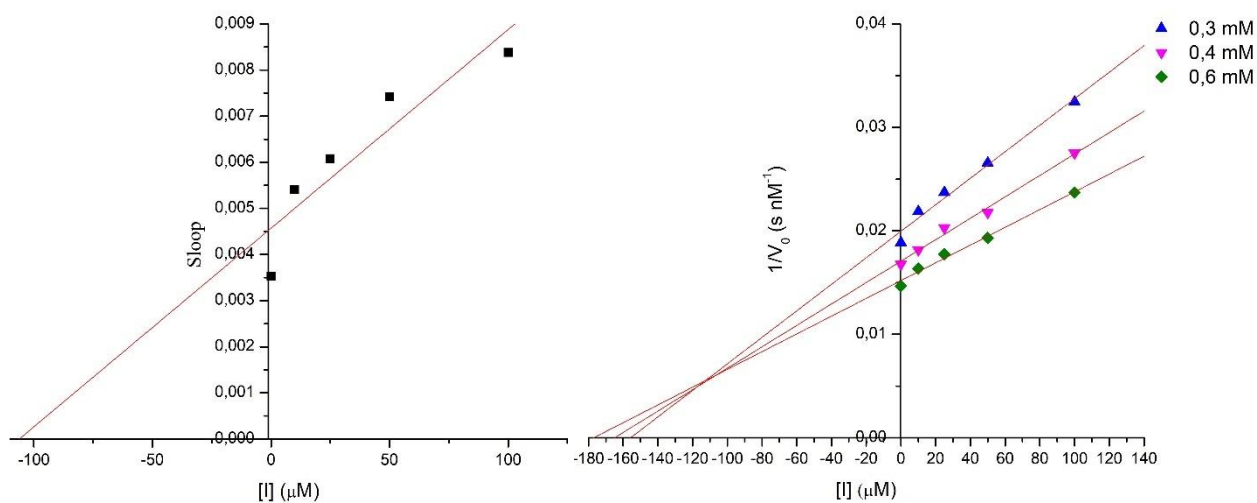


Figure 8. Dixon plot for inhibition of trypsin-like enzymes from the crude extract of the midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) in the presence of D,L-BApNA substrate.

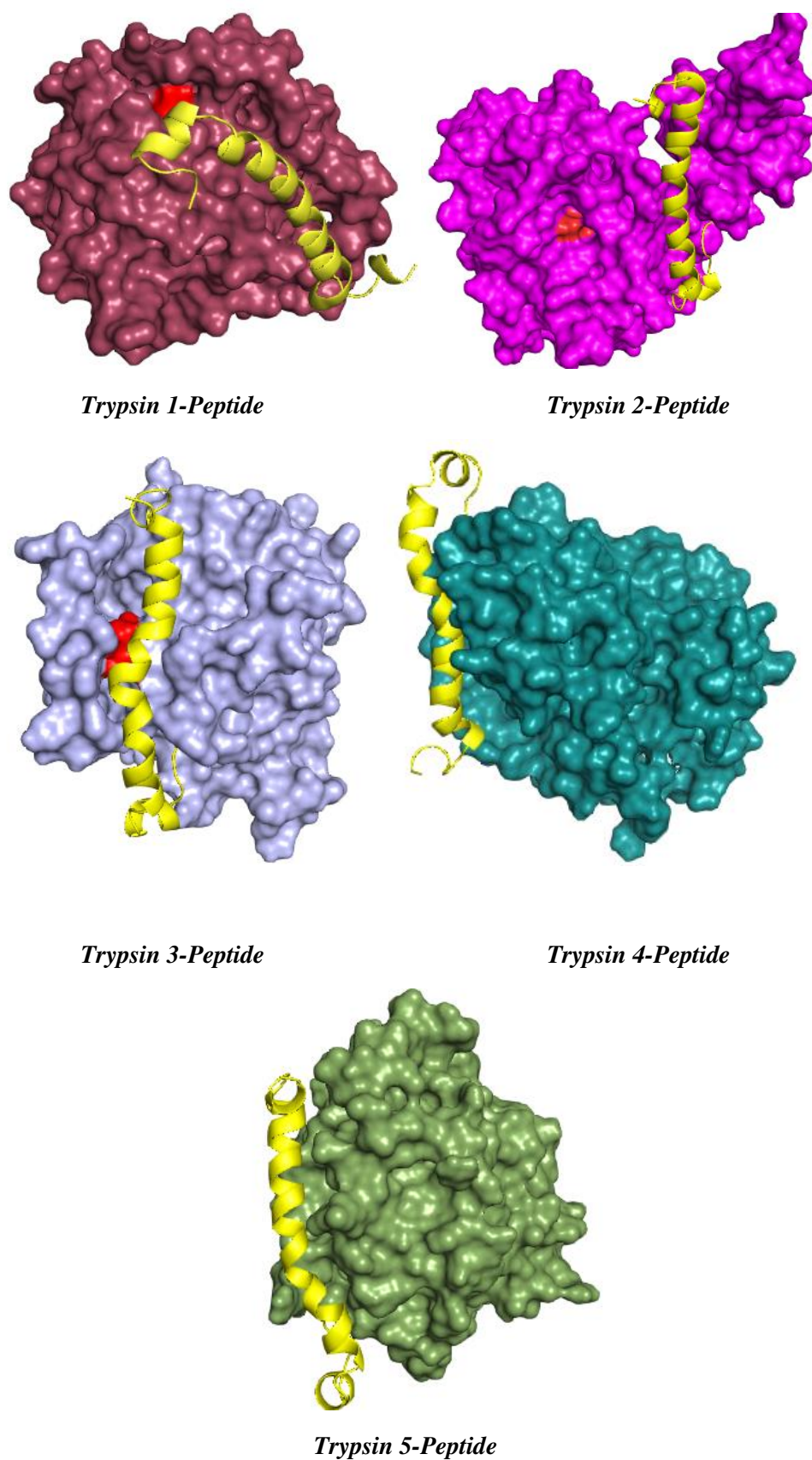


Figure 9. Graphical representation of the docked complexes trypsin-peptide GORE1-2t using the Pymol program. Trypsins 1-5 from *A. gemmatalis* are depicted in surface representation with various colors, while the peptide GORE1-2t is shown in yellow cartoon mode. The active site of each trypsin, represented by the catalytic triad His-Asp-Ser, is highlighted in red.