



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**RODRIGO OLIVEIRA DE AQUINO**

**Determinação de motivos de ligação à quitina em vicilinas de  
*Canavalia ensiformis* e *Vigna unguiculata* através de métodos *in*  
*silico* e relação com suas toxicidades para o bruquídeo  
*Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae)**

**Natal/RN  
2009**

**RODRIGO OLIVEIRA DE AQUINO**

**Determinação de motivos de ligação à quitina em vicilinas de  
*Canavalia ensiformis* e *Vigna unguiculata* através de métodos *in*  
*silico* e relação com suas toxicidades para o bruquídeo  
*Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae)**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Dr. Maurício Pereira de Sales

**Natal/RN  
2009**

## **Dedico esta obra**

A Pedro Batista de Aquino, meu pai; Maria das Graças de Oliveira Aquino, minha mãe; Kleber Oliveira de Aquino, meu irmão; e à Daíse Gomes de Andrade Lopes, minha futura esposa.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado esta oportunidade ímpar de crescimento pessoal.

Ao meu orientador prof. Dr. Maurício Pereira de Sales pelos conhecimentos transmitidos os quais foram os mais importantes para o desenvolvimento deste trabalho. Ao meu co-orientador prof. Dr. Elizeu Antunes dos Santos pela dedicação e paciência que teve nos momentos mais difíceis. À minha “co-orientadora” Dra. Adeliara, que foi minha principal orientadora em outros aspectos. À profa. Dra. Selma Jerônimo pela compreensão e gentileza.

Ao meu melhor amigo e irmão Ludovico Migliolo por todos os momentos que passamos na vida acadêmica e fora dela, sempre um levantando a moral do outro.

Aos meus amigos de LQFPB ou BIOATIVOS: Hugo (meu primo), Norba, Leonardo (este me ajudou muito em praticamente toda a parte de bancada), Cley, Tici (que também me ajudou muito na parte de bancada), Fabiano, Anaya, Jan (que sabe um pouco de tudo), Daysoca, Ibinho e Sheyloca.

À minha turma de mestrado: Ana Celly, Adriana, Daniela, Lissandra, Ludovico, Micheline, Pablo, Sérgio, Videany e Vírínia. Uma turma que, apesar das diferenças, sempre se manteve unida.

Aos meus também melhores amigos Breno Dutra e Anderson Jácome.

Aos professores Hugo e Adriana, que comporam a banca de qualificação, pelas boas dicas durante esta.

***“Os impossíveis dos homens são possíveis para Deus.”***

Lucas 18:27

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig. 1</b> - Estrutura da quitina na forma $\alpha$ - .....	21
<b>Fig. 2</b> - Estrutura da quitina na forma $\beta$ - .....	22
<b>Fig. 3</b> - Modelo estrutural do domínio de ligação à quitina presente em proteínas cuticulares .....	29
<b>Fig. 4</b> - Estrutura da $\beta$ -conglucina descrita por Maruyama e col. (2001) .....	30
<b>Fig. 5</b> - Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas de monômeros das vicilinas de <i>V. unguiculata</i> (VuV) e <i>G. max</i> (1IPJ) .....	37
<b>Fig. 6</b> - Mapa de Ramachandran visto através do programa SPdbV .....	40
<b>Fig. 7</b> - Sobreposição das estruturas dos monômeros de VuV e GmV .....	41
<b>Fig. 8</b> - Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas da vicilina de <i>C. ensiformis</i> (CeV) e do domínio heveína (HD) .....	42
<b>Fig. 9</b> - Alinhamento entre as sequências aminoacídicas da vicilina de <i>C. ensiformis</i> (CeV) e do domínio heveína (HD) .....	43
<b>Fig. 10</b> - Modelo estrutural do monômero de CeV .....	44
<b>Fig. 11</b> - Modelo estrutural do monômero de VuV .....	45
<b>Fig. 12</b> - Alinhamento entre as sequências aminoacídicas da vicilina de <i>C. ensiformis</i> (CeV) e do domínio R&R consenso (R&R).....	46
<b>Fig. 13</b> - Alinhamento entre as sequências aminoacídicas da vicilina de <i>V. unguiculata</i> (VuV) e do domínio R&R consenso (R&R).....	47
<b>Fig. 14</b> - Modelo estrutural do monômero de CeV .....	48
<b>Fig. 15</b> - Modelo estrutural do monômero de VuV .....	49
<b>Fig. 16</b> - Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas da vicilina de <i>C. ensiformis</i> (CeV) e do domínio conglucina (CD) .....	50
<b>Fig. 17</b> - Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas da vicilina de <i>V. unguiculata</i> (VuV) e do domínio conglucina (CD) .....	51
<b>Fig. 18</b> - Modelo estrutural do monômero de CeV .....	53
<b>Fig. 19</b> - Modelo estrutural do monômero de VuV .....	54
<b>Fig. 20 (a)</b> - Modelo de interação do monômero de GmV com GlcNac descrito por Maruyama e col. (2001) .....	55

<b>Fig. 20 (b)</b> - Modelo de interação do monômero de CeV com GlcNac.....	56
<b>Fig. 21 (a)</b> - Modelo de interação do monômero de CeV com o carboidrato GlcNac.....	57
<b>Fig. 21 (b)</b> - Modelo de interação feito através de cristalografia de GmV com o mesmo carboidrato .....	57
<b>Fig. 22 (a)</b> - Modelo de interação do monômero de GmV com GlcNac descrito por Maruyama e col. (2001) .....	58
<b>Fig. 22 (b)</b> - Modelo de interação do monômero de CeV com GlcNac.....	59
<b>Fig. 23 (a)</b> - Modelo de interação do monômero de CeV com o carboidrato GlcNac.....	60
<b>Fig. 23 (b)</b> - Modelo de interação feito através de cristalografia de GmV com o mesmo carboidrato .....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tab. 1</b> - Relação do $WD_{50}$ de GmV, CeV e VuV com os tipos de ligação e tipos de aminoácidos que compõem o motivo CD de ligação à quitina .....	61
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

**CeV** – Vicilina de *Canavalia ensiformis*

**CD** – Motivo conglucina

**GmV** – Vicilina de *Glycine Max*

**GlcNac** - *N*-acetil-*D*-glicosamina

**HD** – Motivo heveína

**NeuNac** – Ácido *N*-acetil-*D*-neuramínico

**R&R** – Motivo R&R consenso

**VuV** – Vicilina de *Vigna unguiculata*

**WD<sub>50</sub>** – Quantidade de vicilina que reduz em 50% o peso das larvas

**WGA** – Aglutinina de gérmen de trigo

## RESUMO

A quitina (homopolímero linear contendo resíduos de  $\beta$ -1,4-*N*-acetil-*D*-glicosamina (GlcNac) é um importante componente estrutural da parede celular de fungos e exoesqueletos de muitos invertebrados pragas, tais como insetos e nematóides. Em sistemas digestórios de insetos forma uma matriz denominada de membrana peritrófica. Um dos mais estudados modelos de interação proteína-carboidrato é o modelo que envolve as proteínas ligantes à quitina. Dentre os motivos já caracterizados envolvidos nesta interação se destacam o motivo heveína (HD), obtida de *Hevea brasiliensis* (Seringueira), o motivo R&R consenso (R&R), encontrado em proteínas cuticulares de insetos, e o motivo denominado neste estudo como motivo conglicinina (CD), encontrado na estrutura cristalográfica da  $\beta$ -conglicinina complexada com GlcNac. Estes três motivos de ligação à quitina foram usados para determinar qual(is) deles poderia(m) estar envolvido(s) *in silico* na interação das vicilinas de *Canavalia ensiformis* e *Vigna unguiculata* com quitina, como também associar estes resultados com o WD<sub>50</sub> destas vicilinas para larvas de *Callosobruchus maculatus*. A técnica de modelagem comparativa foi utilizada para construção do modelo 3D da vicilina de *V. unguiculata*, que não foi encontrada nos bancos de dados. Através do programa ClustalW obteve-se a localização destes domínios na estrutura primária das vicilinas. Os domínios R&R e CD foram encontrados com maior homologia nas seqüências primárias das vicilinas e foram alvos de estudos de interação. Através do programa GRAMM foram obtidos modelos de interação (“dockings”) das vicilinas com GlcNac. Os resultados mostraram que, através de análises *in silico*, o motivo HD não faz parte da estrutura das vicilinas, comprovando o resultado obtido com o alinhamento das seqüências primárias; o motivo R&R, apesar de não ter semelhança estrutural nas vicilinas, provavelmente tem uma participação na atividade de interação destas com GlcNac; enquanto que o motivo CD participa diretamente na interação das vicilinas com GlcNac. Estes resultados *in silico* mostram que o número de aminoácidos, os tipos e a quantidade de ligações feitas pelo motivo CD com GlcNac parecem estar diretamente associados ao poder deletério que essas vicilinas possuem para larvas de *C. maculatus*. Isso pode constituir um passo inicial na elucidação de como as vicilinas

interagem com quitina *in vivo* e exercem seu poder tóxico para insetos que possuem membrana peritrófica.

Palavras chaves: modelagem comparativa; “docking”; *Canavalia ensiformis*; *Vigna unguiculata*; vicilina; *Callosobruchus maculatus*; quitina.

## ABSTRACT

Chitin is an important structural component of the cellular wall of fungi and exoskeleton of many invertebrate plagues, such as insects and nematodes. In digestory systems of insects it forms a named matrix of peritrophic membrane. One of the most studied interaction models protein-carbohydrate is the model that involves chitin-binding proteins. Among the involved characterized domains already in this interaction if they detach the hevein domain (HD), from of *Hevea brasiliensis* (Rubber tree), the R&R consensus domain (R&R), found in cuticular proteins of insects, and the motif called in this study as conglicinin motif (CD), found in the cristallography structure of the  $\beta$ -conglicinin bounded with GlcNac. These three chitin-binding domains had been used to determine which of them could be involved *in silico* in the interaction of *Canavalia ensiformis* and *Vigna unguiculata* vicilins with chitin, as well as associate these results with the  $WD_{50}$  of these vicilins for *Callosobruchus maculatus* larvae. The technique of comparative modeling was used for construction of the model 3D of the vicilin of *V. unguiculata*, that was not found in the data bases. Using the ClustalW program it was gotten localization of these domains in the vicilins primary structure. The domains R&R and CD had been found with bigger homology in the vicilins primary sequences and had been target of interaction studies. Through program GRAMM models of interaction (“dockings”) of the vicilins with GlcNac had been gotten. The results had shown that, through analysis *in silico*, HD is not part of the vicilins structures, proving the result gotten with the alignment of the primary sequences; the R&R domain, although not to have structural similarity in the vicilins, probably it has a participation in the activity of interaction of these with GlcNac; whereas the CD domain participates directly in the interaction of the vicilins with GlcNac. These results *in silico* show that the amino acid number, the

types and the amount of binding made for the CD motif with GlcNac seem to be directly associates to the deleterious power that these vicilins show for *C. maculatus* larvae. This can give an initial step in the briefing of as the vicilins interact with alive chitin in and exert its toxic power for insects that possess peritrophic membrane.

Key words: comparative modeling; docking; *Canavalia ensiformis*; *Vigna unguiculata*; vicilina; vicilin; *Callosobruchus maculatus*; chitin.

## SUMÁRIO

1. ....	C
<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	17
1.1. ....	M
<b>Modelagem de proteínas e análises <i>in silico</i> “docking”</b> .....	17
1.2. ....	U
<b>Uso do “docking” nas interações proteína-proteína e proteína-carboidrato</b> ..	19
1.3. ....	Q
<b>Quitina</b> .....	20
1.4. ....	M
<b>Mecanismos de defesas em plantas</b> .....	24
1.5. ....	25
<b>Proteínas vegetais ligantes à quitina</b> .....	25
1.6. ....	26
<b>Vicilinas</b> .....	26
1.7. ....	27
<b>Papéis das vicilinas em plantas</b> .....	27
1.8. ....	28
<b>Motivos de ligação à quitina: interação proteína-carboidrato</b> .....	28
2. ....	32
<b>OBJETIVOS</b> .....	32
2.1. ....	32
<b>Geral</b> .....	32
2.1. ....	32
<b>Específicos</b> .....	32
3. ....	33
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
3.1. <b>Construção e validação do modelo estrutural do monômero da vicilina de <i>V. unguiculata</i></b> .....	33
3.2. <b>Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas das vicilinas de <i>C. ensiformis</i> e <i>V. unguiculata</i> com os domínios HD, R&amp;R e CD</b> .....	34
3.3. <b>Localização dos domínios HD, R&amp;R e CD nos modelos estruturais das vicilinas de <i>C. ensiformis</i> e <i>V. unguiculata</i></b> .....	35

3.4.	Construção dos modelos de interação entre vicilinas de <i>C. ensiformis</i> e <i>V. unguiculata</i> com GlcNac .....	35
3.4.	Determinação da interface de interação entre GlcNac e os motivos de ligação à quitina.....	35
4.	.....	<b>RESULTADOS</b>
4.1.	Alinhamento entre as sequências aminoacídicas da vicilina de <i>V. unguiculata</i> e a proteína molde .....	37
4.2.	Avaliação do modelo estrutural do monômero da vicilina de <i>V. unguiculata</i> .....	39
4.3.	Alinhamento entre as sequências aminoacídicas da vicilina de <i>C. ensiformis</i> e do domínio heveína (HD).....	42
4.4.	Alinhamento das sequências aminoacídicas da vicilina de <i>V. unguiculata</i> e do domínio heveína (HD).....	43
4.5.	Localização do domínio HD nos modelos estruturais das vicilinas de <i>C. ensiformis</i> e <i>V. unguiculata</i> .....	43
4.6.	Alinhamento entre as sequências aminoacídicas da vicilina de <i>C. ensiformis</i> e do domínio R&R consenso (R&R).....	46
4.7.	Alinhamento entre as sequências aminoacídicas da vicilina de <i>V. unguiculata</i> e do domínio R&R consenso (R&R).....	46
4.8.	Localização do domínio R&R nos modelos estruturais das vicilinas de <i>C. ensiformis</i> e <i>V. unguiculata</i> .....	47
4.9.	Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas da vicilina de <i>C. ensiformis</i> e do domínio conglicinina (CD) .....	50
4.10.	Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas da vicilina de <i>V. unguiculata</i> e do domínio conglicinina (CD) .....	51
4.11.	Localização do domínio CD nos modelos estruturais das vicilinas de <i>C. ensiformis</i> e <i>V. unguiculata</i> .....	52
4.12.	Modelo de interação entre o monômero de CeV e GlcNac .....	55
4.13.	Modelo de interação entre monômero de VuV e GlcNac.....	57
4.14.	Determinação da interface de interação entre GlcNac e os motivos de ligação à quitina em relação ao WD <sub>50</sub> de GmV, CeV e VuV .....	60

5. ....	<b>DISCUSSÃO</b>	62
6. ....	<b>CONCLUSÕES</b>	66
7. ....	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	67



## 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1.1. Modelagem de proteínas e análises *in silico* “docking”

O procedimento baseado em comparações para a construção de modelos estruturais é conhecido como modelagem molecular por homologia estrutural ou modelagem comparativa (Deane & Blundell, 2003). Nos casos em que a elucidação de certa estrutura protéica não foi determinada por métodos experimentais como: ressonância magnética nuclear, difração de raios-X, etc., modelos virtuais desta estrutura podem ser elaborados por comparação da similaridade de sua seqüência aminoacídica com seqüências aminoacídicas de proteínas homólogas que tenham estruturas resolvidas por tais métodos, e que tenham sido depositadas em um banco de dados de bioinformática (Silva & Silva, 2007).

Com o avanço de novas tecnologias para obtenção de resultados cada vez mais rápidos e confiáveis no que diz respeito à obtenção de estruturas de proteínas, seja para fins terapêuticos e/ou econômicos como, por exemplo, a descoberta de novos fármacos e de proteínas que tornam certos cultivares mais resistentes à pragas, etc., a modelagem molecular por homologia têm tido um grande avanço no que diz respeito à descoberta de tais estruturas.

A execução da estratégia de modelagem por homologia é um processo bem documentado na literatura. Essa estratégia baseia-se no conhecimento de que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada que sua seqüência de aminoácidos durante o processo evolutivo, e que pequenas mudanças na seqüência, em geral, resultam em, apenas, sutis modificações na estrutura tridimensional (Nayeem *et al.*, 2006). Se pelo menos uma seqüência homóloga para qual a estrutura tridimensional resolvida esteja disponível é encontrada, um dos métodos de escolha para predição da estrutura tridimensional de uma proteína-alvo seria a modelagem comparativa ou por homologia (Höltje *et al.*, 2003).

Os modelos de estruturas protéicas gerados por homologia podem ser aplicados para a identificação de sítios ativos de uma proteína-alvo, em que estudos de mutações pontuais são aliados a ensaios *in vitro* e *in vivo*, bem como simulações computacionais envolvendo as estruturas-alvo. Essa estratégia permite a identificação de resíduos de aminoácidos que são funcionalmente ou estruturalmente importantes na proteína-alvo. Tipicamente, os aminoácidos modificados por mutações são selecionados com relação ao alinhamento entre seqüências, em que são evidenciados os resíduos de aminoácidos mais conservados entre as seqüências de proteínas homólogas (Hillisch *et al.*, 2004).

Existem inúmeros exemplos do emprego de modelos de proteínas-alvo na descoberta de sítios de ligação com um substrato, principalmente com respeito à potência e à seletividade. Para se alcançar bons resultados em tais aplicações, um protocolo computacional pode envolver além da elaboração de modelos por homologia, simulações de “docking” e dinâmica molecular, bem como cálculos de perturbação de energia livre (Park & Lee, 2004).

Ainda no campo da modelagem molecular, o “docking” é um método que prediz a melhor orientação de uma molécula à uma segunda quando ligadas entre si de forma a ter um complexo estável (Lengauer & Rarey, 1996). As únicas aproximações computacionais que utilizam modelos de interação física entre proteínas são o “docking” (Vajda *et al.*, 1997; Sternberg *et al.*, 1998) e simulações de ligação (McCammon, 1998). O “docking”, ao contrário das simulações de ligação, não está relacionado com a modelagem das rotas de uma ligação, mas particularmente na configuração final do(s) complexo(s). Isso faz do “docking” eficiente computacionalmente e potencialmente adequado para análises estruturais de alto rendimento do tipo “primeira aproximação” (Tovchigrechko *et al.*, 2002).

## 1.2. Uso do “docking” nas interações proteína-proteína e proteína-carboidrato

Interações proteína-proteína estão envolvidas na maioria dos processos biológicos (Gosdidier & Fernandez-Recio, 2008). Como proteínas são moléculas 3D, a importância da análise 3D direta das interações proteína-proteína é óbvia. Tal análise é necessária para a predição destas interações, seu estudo adequado, e para aplicações adicionais (ex: desenhos de fármacos baseados em estruturas) (Tovchigrechko *et al.*, 2002). O número de interações potenciais proteína-proteína e a natureza das estruturas protéicas a serem “dockadas” atendem a fortes requisitos na execução das técnicas de “docking”. Devido à existência de um grande número de proteínas susceptíveis ao “docking”, este processo tem que ser rápido. Ao mesmo tempo, por causa da individualidade na estrutura de cada proteína, este processo também tem que ser capaz de prever complexos aceitáveis destes modelos de interação levando em consideração parâmetros previamente determinados (Jones & Kleywegt, 1999; Murzin, 1999).

Interações proteína-carboidrato estão envolvidas em uma ampla escala de processos biológicos possuem papéis funcionais e suas interações com proteínas têm chamado mais atenção que no passado, desde que foi reconhecido que os carboidratos, além de serem materiais simples de armazenamento (Shionyu-Mitsuyama *et al.*, 2003), são usados para carregar informações. Esses processos incluem, dentre outros, infecção por invasão de microorganismos e subsequente resposta imune, tráfego e infiltração de leucócitos, e metástase tumoral (Sharon & Lis, 1989; Karlsson, 1998).

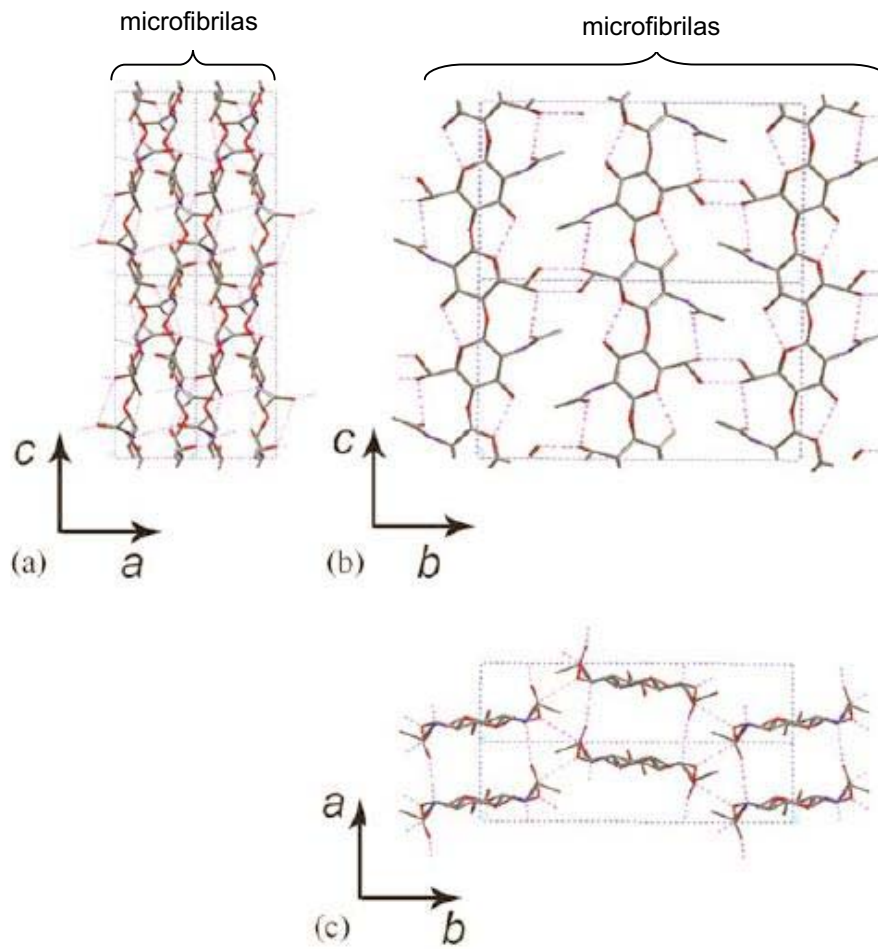
A identificação acurada de sítios de ligação a carboidratos *in silico* tem tido um papel importante na produção de fármacos-alvo. Diferentes aspectos no reconhecimento de carboidratos por proteínas têm sido exhaustivamente estudados (Rini, 1995; Neumann *et al.*, 2002). Entretanto, o uso da bioinformática como meta de previsões são relativamente raras (Shionyu-Mitsuyama *et al.*, 2003; Taroni *et al.*, 2000). Comparado com a abundância de métodos desenvolvidos para predição de interações proteína-ácido nucléico (Ahmad *et al.*, 2004; Yan *et al.*,

2006) ou proteína-proteína (Fariselli *et al.*, 2002; Hoskins *et al.*, 2006), ainda são poucos os métodos pra predição de interações proteína-carboidrato.

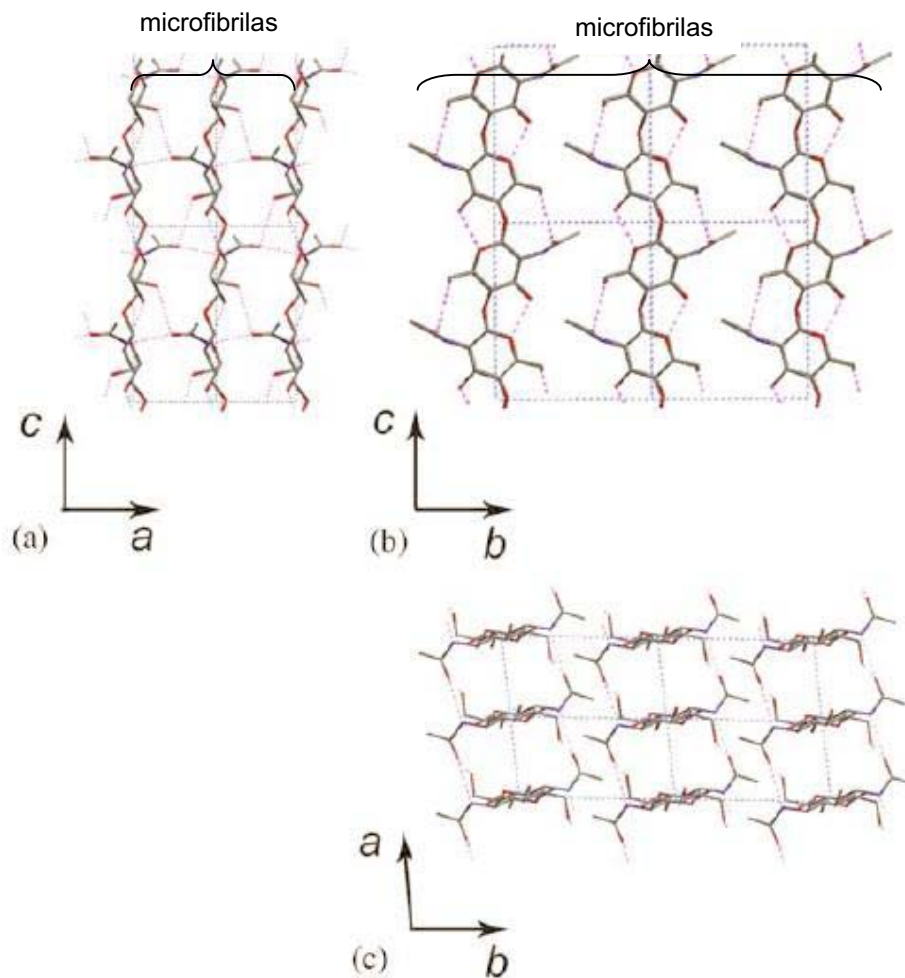
### 1.3. Quitina

Quitina é o aminopolissacarídeo natural mais encontrado na natureza, sendo sintetizada por fungos, nematóides e artrópodes. Alguns a consideram como um derivado da celulose por causa da grande similaridade entre os polímeros que as compõem, exceto que a celulose contém grupos hidroxil e a quitina contém um grupo *N*-acetil na posição C2 dos monômeros. Os dois polímeros podem servir como suporte a componentes estruturais celulares e superfície corpórea (Merzendorfer, 2005).

Quitina é um polímero linear composto por *N*-acetil-glucosaminas (GlcNac)  $\beta$ -(1-4)-ligadas que estão espontaneamente reunidas em microfibrilas de diâmetros e comprimento variados após a síntese do polímero e transporte para o espaço extracelular. Cadeias simples de microfibrilas são ligadas por pontes de hidrogênio entre os grupos amino e carbonil. Análises por difração de raios-X mostram que a quitina é polimórfica, ocorrendo em três formas cristalinas:  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ - (Rudall & Kenchington, 1973; Kramer & Koga, 1986; Imai *et al.*, 2003). As três variações podem diferir em seu grau de hidratação, no tamanho da unidade e no número de cadeias quitinosas por unidade. Na forma  $\alpha$ -, todas as cadeias exibem orientação antiparalela (Fig. 1); na forma  $\beta$ - as cadeias estão arranjadas de maneira paralela (Fig. 2); na forma  $\gamma$ -, duas folhas paralelas alternam com uma folha antiparalela (Vermeulen & Wessels, 1986).



**Fig. 1** – Estrutura da quitina na forma  $\alpha$ -. **(a)** Projeção no plano  $ac$ ; **(b)** Projeção no plano  $bc$ ; **(c)** Projeção no plano  $ab$ . Observa-se uma orientação antiparalela exibida pelas cadeias de microfibrilas e uma maior formação de ligações tipo pontes-de-hidrogênio intercadeia. (Rinaudo, 2006).



**Fig. 2** – Estrutura da quitina na forma  $\beta$ -. **(a)** Projeção no plano  $ac$ ; **(b)** Projeção no plano  $bc$ ; **(c)** Projeção no plano  $ab$ . Observa-se uma orientação paralela exibida pelas cadeias de microfibrilas e uma menor formação de ligações tipo pontes-de-hidrogênio intercadeia. (Rinaudo, 2006).

O arranjo antiparalelo das cadeias quitinosas na forma  $\alpha$ - promovem um firme empacotamento entre as microfibrilas quitinosas, que consiste em dez ou mais polímeros simples estabilizados por um alto número de pontes de hidrogênio (Kramer & Koga, 1986; Lehane, 1997). O alinhamento antiparalelo pode contribuir significativamente para a força mecânica e estabilidade da cutícula de artrópodes que contém predominantemente quitina  $\alpha$ - (Giraud-Guille & Bouligand, 1986). Em contraste, em cadeias  $\beta$ - e  $\gamma$ - há um redução do grau de empacotamento e o

número de pontes-de-hidrogênio intercadeia é reduzido, mas o número de pontes-de-hidrogênio formado com moléculas de água aumenta. Conseqüentemente, o alto grau de hidratação e a redução do grau de empacotamentos firmes resultam numa estrutura quitinosa macia e flexível, tal como a das matrizes peritróficas e casulos (Rudall & Kenchington, 1973; Peters, 1992).

Em insetos, a síntese de quitina é crucial para o crescimento e desenvolvimento, desde que é a quitina que dá forma aos exoesqueletos de muitos animais ocorrendo regularmente a retirada e recolocando uma nova cutícula quitinosa (Merzendorfer & Zimoch, 2003). Quitina também é encontrada nas estruturas internas de insetos, ocorrendo em cutículas traqueais, e também constituindo parte das matrizes peritróficas e da superfície interna de intestinos de muitos insetos e outros invertebrados, protegendo o epitélio intestinal contra rupturas mecânicas, espécies radicais de oxigênio e invasão de microorganismos (Peters, 1992; Lehane, 1997; Barbehenn & Stannard, 2004). A formação de quitina em insetos vem atraindo interesse, não somente pela fundamental importância na fisiologia destes, mas também pela sua relevância como recurso renovável na indústria químico-farmacêutica (Pittermann *et al.*, 1997). Adicionalmente, enzimas sintetizadoras de quitina e estruturas quitinosas dos insetos podem ser alvos potenciais para descoberta de novos inseticidas.

As proteínas que podem interagir com quitina formando complexos bem definidos na ausência de disjuntores de pontes-de-hidrogênio sugerem que a hidrofobicidade é um importante fator na estabilização dessa interação; em geral, proteínas de insetos mais altamente evoluídos tendem a ser menos hidrofóbicas (Hillerton & Vincent, 1983). Segundo Vincent & Wegst (2004), muitas das proteínas cuticulares, especialmente em cutículas macias, mais hidratadas, podem ser extraídas com solventes como tampões simples; a quantidade extraída aumenta significativamente à baixas temperaturas, comportamento característico de proteínas hidrofóbicas. Em algumas cutículas, mais de 70% do total de proteínas pode ser extraído dessa forma.

Diversas proteínas envolvidas nos mecanismos de defesa de plantas são agrupadas na família de proteínas que podem interagir com quitina e são

denominadas de proteínas ligantes à quitina, entre elas se destacam as quitinases, lectinas específicas à *N*-acetil-glucosamina e vicilinas.

#### **1.4. Mecanismos de defesa em plantas**

As plantas são susceptíveis ao ataque de diferentes organismos, como fungos, bactérias, vírus, nematóides, insetos, entre outros e até mesmo ao ataque de outras plantas. Como forma de defesa, as plantas apresentam diferentes estratégias quando atacadas ou quando submetidas à condições bióticas e/ou abióticas adversas, ou até mesmo à estresse momentâneo.

A resistência de uma planta é a capacidade que esta tem de se prevenir, restringir ou retardar a invasão de um patógeno ou praga em seus tecidos. De um modo geral as defesas em plantas superiores podem ser classificadas em físicas (acúleos, tricomas, espinhos, etc.) e químicas (alcalóides, terpenóides, glicosídeos cianogênicos, lectinas, inibidores, etc.) (Xavier-filho, 1993).

Existem duas categorias de mecanismos químicos de defesa das plantas superiores contra agentes bióticos ou abióticos, elas podem ser: induzidas, ou constitutivas. As defesas induzidas ocorrem quando a planta sintetiza metabólitos em resposta a injúrias ou estímulos ambientais causados quando atacadas por patógenos e/ou pragas. As defesas constitutivas ocorrem quando a planta expressa resistência contra o herbívoro ou patógeno de forma contínua e não dependente da presença ou ação do mesmo (Thaler *et al.*, 1999).

Existem diversas proteínas relacionadas com o processo de defesa de plantas que podem ser sintetizadas durante a patogênese e herbivoria, incluindo proteínas da parede celular, enzimas envolvidas no metabolismo de flavonóides e fenilpropanóides, proteínas tóxicas, inibidores de enzimas, proteínas com atividade antimicrobiana, enzimas líticas e um grupo heterogêneo de proteínas conhecidas coletivamente como PRP (Proteínas Relacionadas à Patogênese) (San Segundo *et al.*, 1994). Este grupo está representado pelas glucanases e quitinases, que juntas estão relacionadas com a atividade antifúngica, além de



lectinas que se ligam à quitina de insetos pragas e fungos (Svendsen *et al.*, 1991; Gomes *et al.*, 1997).

### 1.5. Proteínas vegetais ligantes à quitina

Quitina é um importante componente estrutural da parede celular de fungos e exoesqueletos de muitos invertebrados considerados pragas, tais como insetos e nematóides. Em sistemas digestórios de insetos forma também uma matriz denominada de membrana peritrófica que é uma barreira contra choques e abrasões de partículas de alimentos e ancoragem de enzimas digestivas (Terra *et al.*, 1990).

As atividades biológicas de defesa das proteínas com afinidade à quitina se agrupam em dois tipos: (1) atividade antifúngica e (2) tóxica e/ou antinutricional para insetos. Algumas lectinas que se ligam à quitina possuem atividade antifúngica, tais como as lectinas purificadas de batata e de tomate (Schlumbaum *et al.*, 1986), lectinas purificadas de urtiga, heveína de látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*) e os Ac-AMPs (peptídeos antimicrobianos de *Amaranthus sp.*) que exibem propriedades antifúngicas diferentes das quitinases, sendo que os mecanismos de inibição do crescimento de fungos não estão totalmente esclarecidos (Broekaert *et al.*, 1989; Van Parijs *et al.*, 1991).

Estudos recentes demonstram que proteínas que se ligam à quitina, tais como vicilinas, quando incorporadas a dietas artificiais para larvas de insetos, inibem o crescimento larval e são letais para estes insetos pragas (Macedo *et al.*, 1993; Sales *et al.*, 1996; Sales *et al.*, 2001; Macedo *et al.*, 2004). A mais estudada entres estas proteínas ligante à quitina é a WGA (aglutinina de gérmen de trigo) que, quando adicionada à dieta, na quantidade de 10mg/g, foi detrimental às larvas de *Callosobruchus maculatus* (Czapala & Lang, 1990; Murdock *et al.*, 1990). WGA também produziu 50% de mortalidade em pragas do milho, *Ostrinia nubialis* (Czapala & Lang, 1990) e *Diabrotica undecimpunctata*. Resultados semelhantes têm sido obtidos com lectinas de arroz e lectinas de urtiga (Huesing *et al.*, 1991).

Até o início da década de 90 não se tinha conhecimento do modo de ação destas proteínas, especulava-se que o efeito deletério ocorria pela interação destas proteínas com a quitina presente nas membranas peritróficas do intestino médio das larvas, pois a ligação destas proteínas a estes componentes poderia alterar as propriedades físicas ou prevenir a formação da membrana (Raikhel *et al.*, 1993).

As proteínas que se ligam à quitina, quitinases, proteínas tipo heveína, lectinas  $\beta$ -1,4-*N*-acetil-*D*-glicosamina específicas, até agora estudadas estruturalmente apresentam um domínio de 30-43 aminoácidos com várias cisteínas e glicinas em posições conservadas. Este domínio presente na proteína ligante à quitina ancestral, a heveína, foi apresentado como o responsável pela especificidade da ligação à matriz de quitina e também a vários glicoconjugados contendo *N*-acetil-glicosamina (GlcNac) ou ácido *N*-acetil-*D*-neuramínico (NeuNac) na estrutura (Raikhel *et al.*, 1993). Algumas vicilinas do tipo 7S, entretanto, apesar de possuírem a característica de ligação à quitina, não apresentam esse domínio.

## 1.6. Vicilinas

As proteínas da semente são divididas em quatro grandes grupos de acordo com sua solubilidade (Osborne & Campbell, 1985): albuminas, globulinas, prolaminas e gluteínas que são respectivamente solúveis em água, soluções salinas, álcoois e soluções ácidas ou básicas. As principais proteínas de reserva das dicotiledôneas são as globulinas, em sementes maduras as proteínas de reserva são encontradas no interior de pequenas organelas denominadas corpos protéicos. As globulinas são divididas em duas classes: leguminas e vicilinas (Khan *et al.*, 1980).

As vicilinas, que são as mais abundantes em grãos de leguminosas, são geralmente caracterizadas pelo coeficiente de sedimentação 7S a 9S, de organização trimérica, de massa molecular entre 150 kDa e 200 kDa, compostas por três subunidades com massas moleculares em média de 50 kDa cada

(Deshpande & Damodaran, 1991), possuem um nível muito baixo de aminoácidos sulfurados como cisteína, e portanto não há formação de pontes dissulfeto (Derbyshire *et al.*, 1976; Khan *et al.*, 1980), e metionina, e em muitos casos podem conter açúcares neutros como manose e glucosamina, Além disso, elas mostram uma heterogeneidade em massa molecular das sub-unidades que permite uma divisão em quatro tipos: A, B, C e D (Schlesier, 1984). Essas proteínas são, na sua maioria, alteradas por proteólises durante o processamento pós-traducional e por isto apresentam um grande número de pequenos polipeptídios associados às subunidades majoritárias (Higgins, 1984). Esta característica pode também ser resultado da adição incompleta ou da degradação parcial da ligação dos oligossacarídeos nas cadeias laterais dos peptídeos (Chee *et al.*, 1991; Macedo *et al.*, 1995).

### **1.7. Papéis das vicilinas em plantas**

As proteínas de reserva podem ser definidas como proteínas que são acumuladas em quantidades significativas durante o processo de maturação das sementes e que durante a germinação são rapidamente hidrolisadas fornecendo nitrogênio na forma de aminoácidos precursores de proteínas estruturais, metabólicas e de outros constituintes celulares utilizados nos primeiros estágios de desenvolvimento das plântulas (Higgins, 1984). Apesar da grande variação estrutural, as proteínas de reserva de vegetais superiores apresentam um grande número de propriedades comuns, entre elas a síntese em níveis elevados em tecidos específicos em certos estágios de desenvolvimento e a presença em sementes maduras em vacúolos especiais denominados de corpos protéicos.

Diversos trabalhos realizados anteriormente indicam que as vicilinas não são somente fonte de aminoácidos precursores para sementes em germinação, mas também atuam como linha de defesa nas sementes quiescentes. Sales e col. (1996) mostraram que vicilinas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) e de outras sementes de leguminosas se ligavam fortemente à quitina, quitosana e quitina

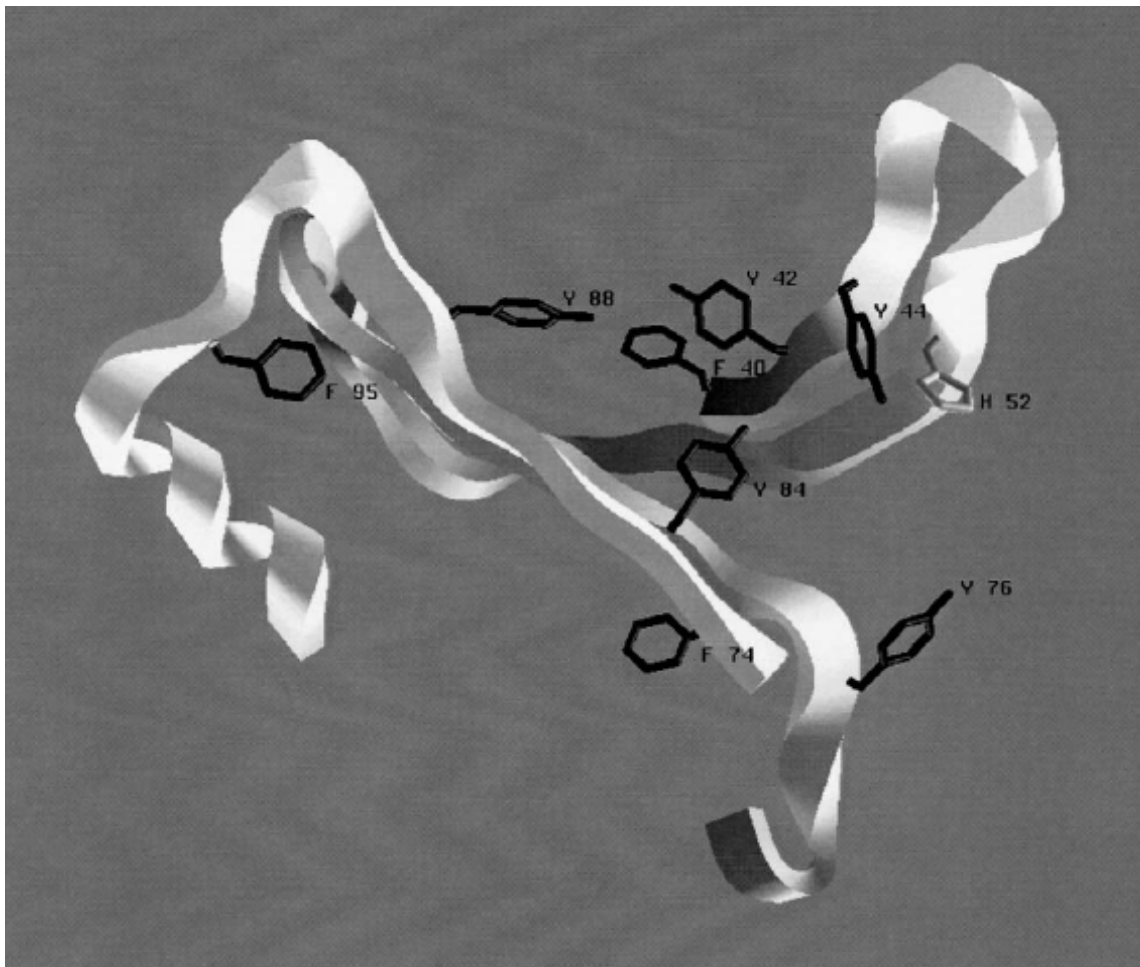
altamente acetilada e exercem uma forte ação deletéria sobre as larvas dos bruquídeos (*C. maculatus*) predadores de sementes de feijão. Posteriormente, o mecanismo de ação destas proteínas foi observado por imunocitoquímica e foi visto que estas se ligavam à quitina presente nos intestinos médios dessas larvas (Sales *et al.*, 2001). Em seguida foi observado que as vicilinas quando adicionadas às dietas de larvas de lepidópteros, *Diatraea sacharalis* (Mota *et al.*, 2003) e *Plodia interpunctella* (Amorim *et al.*, 2008); e à dieta do díptera *Ceratitis capitata* (Macedo *et al.*, 2008), foram fortemente letais a estes insetos pragas. Também foi observado por imunocitoquímica que as vicilinas se ligavam à quitina presente na membrana peritrófica destes insetos.

### 1.8. Motivos de ligação à quitina: interação proteína-carboidrato

Um dos mais estudados modelos de interação proteína-carboidrato é o modelo que envolve as proteínas ligantes à quitina. Entre os motivos já caracterizados envolvidos nesta interação destacam-se o motivo heveína e o motivo R&R consenso.

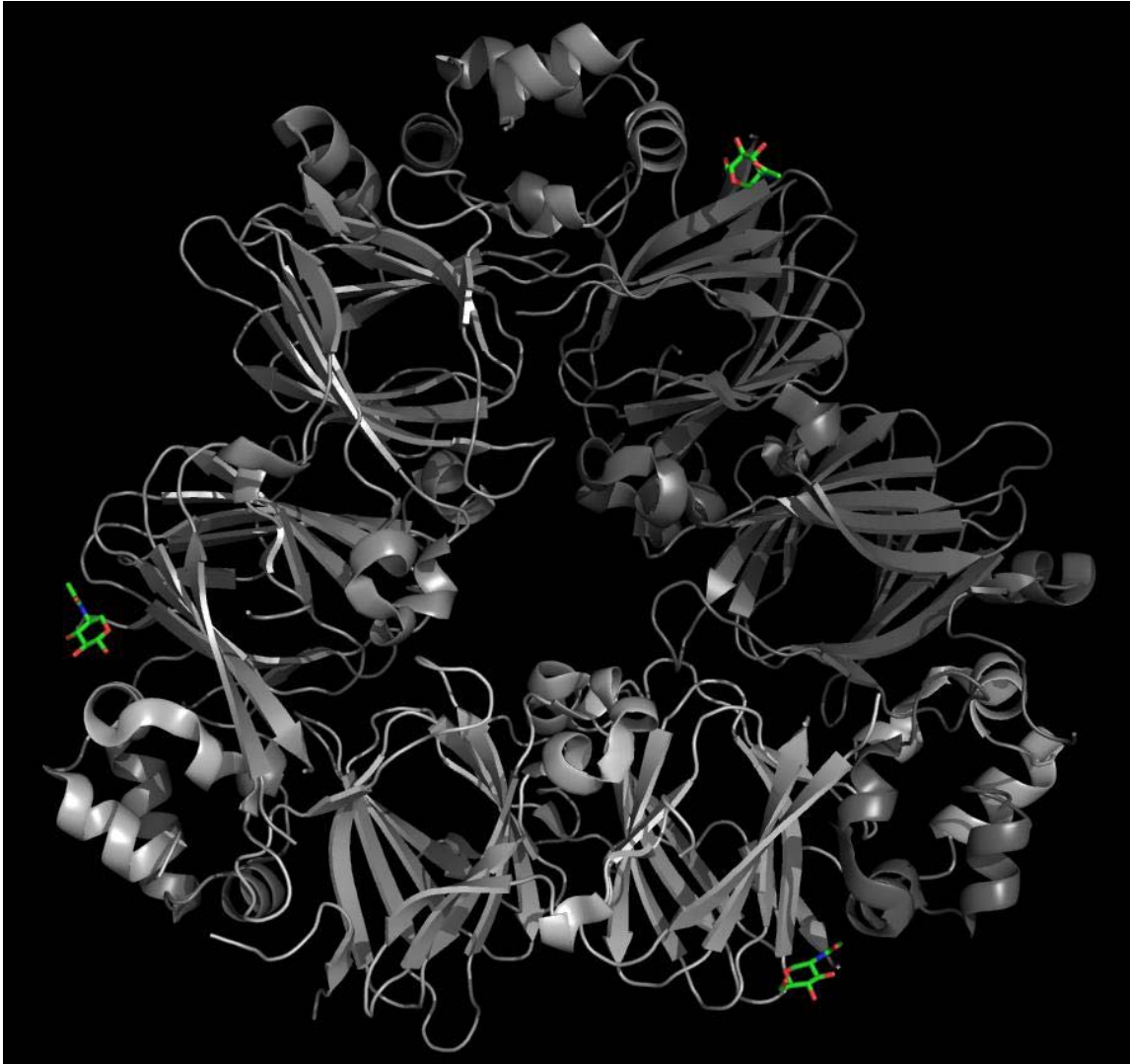
O motivo heveína é um motivo estrutural de 30-43 aminoácidos e tem, comumente, como característica de sua estrutura uma serina e três resíduos de aminoácidos aromáticos em adição de oito ou seis cisteínas formando pontes dissulfeto em posições conservadas (Michiro *et al.*, 2000). Proteínas que possuem este domínio têm a capacidade de ligação à matrizes quitinosas.

Rebers & Riddiford (1988) identificaram um motivo (R&R consensus sequence) em sete proteínas cuticulares de insetos composto por aproximadamente 68 aminoácidos (Fig. 3) que lhes confere a capacidade de ligação à matriz quitinosa: G-x(8)-G-x(6)-Y-x-A-x-E-x-G-Y-x(7)-P-x(2)-P ou a modificação G-x(7)-[DEN]-G-x(6)-[FY]-x-A-[DGN]-x(2,3)-G-[FY]-x-[AP]-x(6) (Willis, 1999).



**Fig. 3** – Modelo estrutural do domínio de ligação à quitina presente em proteínas cuticulares. Observa-se uma estrutura em forma de meio-barril  $\beta$  com a superfície do “vale” contendo resíduos aromáticos característico de interações proteína-quitina em cutículas (Hamodrakas *et al.*, 2002).

Recentemente, Maruyama e col. (2001) cocrystalizaram a vicilina de soja denominada de  $\beta$ -conglucina com *N*-acetil-glucosamina (monômero de quitina) (Fig. 4). Os resultados mostraram um motivo de ligação ao monossacarídeo que foi composto pelos seguintes aminoácidos: Asn157, Ile158, Thr161, Gly260, Leu262, Asn283, Asn329, Thr331 e Ala393.



**Fig. 4** – Estrutura da  $\beta$ -conglycinina descrita por Maruyama e col. (2001). Observa-se em verde os monossacarídeos de GlcNac ligados às regiões com estruturas em  $\beta$ -folha em cada um dos três monômeros da vicilina.

Estes três motivos de ligação à quitina descritos anteriormente foram usados neste estudo para determinar *in silico* qual(is) deles poderia(m) estar envolvido(s) na interação das vicilinas com a quitina (*N*-acetil-glucosamina). Estes resultados poderiam esclarecer e fortalecer o conhecimento sobre o papel de defesa destas proteínas em plantas contra insetos pragas e indicar porque que

algumas vicilinas são mais deletérias do que outras quando adicionadas à dietas das larvas destes insetos.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1. Geral

- I. Determinar *in silico* que motivos de ligação à quitina (Heveína, R&R ou Conglicinina) estariam envolvidos na interação de vicilinas de *Glycine max* (GmV), *Canavalia ensiformis* (CeV) e *Vigna unguiculata* (VuV) com quitina (N-acetil-glucosamina) e estabelecer os modelos de interação desses motivos à quitina através de “docking”.

## 2.2. Específicos

- I. Propor um modelo estrutural, através de técnicas de modelagem por homologia, para a vicilina de *V. unguiculata*.
- II. Analisar *in silico* a seqüência primária dessas proteínas, procurando o provável sítio de interação com quitina baseando-se nos motivos de ligação a quitina: heveína (HD), R&R consenso (R&R) e conglicinina (CD).
- III. Propor, *in silico*, modelos de interação entre vicilinas de *C. ensiformis* e *V. unguiculata* e quitina.
- IV. Associar a força de interação (número de aminoácidos, número e tipos de ligações) observada *in silico* com o efeito de vicilinas isoladas das leguminosas *G. max*, *C. ensiformis* e *V. unguiculata*, *in vivo* sobre o desenvolvimento de larvas de *Callosobruchus maculatus*.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS



### **3.1. Construção e validação do modelo estrutural do monômero da vicilina de *V. unguiculata***

Como etapa inicial do processo de modelagem comparativa, foram identificadas sequências aminoacídicas de todas as proteínas relacionadas à sequência alvo, selecionando, em seguida, qual seria usada como sequência molde. A sequência aminoacídica correspondente à uma vicilina que tenha sua estrutura resolvida por métodos experimentais como RMN, raio-X, etc. com alto percentual de identidade foi selecionada para a criação do modelo tridimensional da vicilina de *V. unguiculata*.

O programa BlastP (Altschul *et al.*, 1997), que busca por regiões contendo similaridade local entre duas seqüências, foi utilizado na busca por estas seqüências molde. Este programa tem por objetivo comparar as seqüências de proteínas em bancos de dados de bioinformática.

Após a definição da seqüência molde, foi realizado o alinhamento múltiplo entre as seqüências aminoacídicas da vicilina de *V. unguiculata* depositada no banco de dados de bioinformática NCBI (National Center for Biotechnology Information) com GI 160332746, e da vicilina com estrutura resolvida na etapa anterior, utilizando o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), com as configurações padrões.

O método de modelagem pela satisfação de restrições espaciais foi utilizado para a construção do modelo 3D da vicilina de *V. unguiculata*. Este método calcula as restrições espaciais da estrutura molde e, usando o alinhamento múltiplo, as aplica à seqüência alvo. O modelo é derivado da minimização das violações das restrições espaciais, e construído pela imposição dessas restrições de ângulos e distâncias na seqüência alvo, derivadas do alinhamento com o molde.

O programa SWISS-MODEL (Guex & Peitsch, 1997; Schwed *et al.*, 2003; Kopp & Schwede 2004; Arnold *et al.*, 2006), foi utilizado na construção do modelo tridimensional da proteína alvo, este programa automático on-line utiliza a seqüência no formato PDB adquirida do alinhamento com o molde pelo programa

SPdbV (Guex *et al.*, 1999), para a construção do modelo levando em conta os parâmetros estereoquímicos anteriormente citados e otimiza a estrutura através da minimização de energia (minimização mecânica).

A etapa final do processo de modelagem comparativa consiste em avaliar os diferentes níveis de organização estrutural. Nessa etapa analisam-se os vários níveis de empacotamento global da proteína, os possíveis erros estruturais em regiões localizadas e os parâmetros estequiométricos.

O programa utilizado na avaliação dos parâmetros estereoquímicos foi o PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), o qual avalia os comprimentos de ligação, os ângulos planos, a planaridade dos anéis de cadeias laterais e das ligações peptídicas, a quiralidade, as conformações das cadeias laterais, os ângulos torcionais da cadeia principal e das cadeias laterais, o impedimento estérico entre pares de átomos não ligados e a qualidade do Mapa de Ramachandran (Ramachandran & Sasisekharan, 1968).

O programa 3DSS (Sumathi *et al.*, 2005), foi usado para o cálculo do RMSD e a sobreposição estrutural do modelo obtido por modelagem comparativa e a estrutura resolvida por difração de raios-X utilizada como molde.

### **3.2. Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas das vicilinas de *C. ensiformis* e *V. unguiculata* com os domínios HD, R&R e CD**

Através do programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), seqüências aminoacídicas das vicilinas de *C. ensiformis* e *V. unguiculata* foram alinhadas separadamente com as seqüências dos domínios CD, HD e R&R a fim de localizar tais domínios em suas sequências primárias.

### **3.3. Localização dos domínios HD, R&R e CD nos modelos estruturais das vicilinas de *C. ensiformis* e *V. unguiculata***

O modelo estrutural da vicilina de *C. ensiformis* foi obtido através do banco de dados PDB com o ID 1CAV, o modelo estrutural da vicilina de *V. unguiculata* foi obtido através da técnica de modelagem estrutural por homologia de sequências conforme descrita anteriormente.

Através do programa PyMol, os domínios de ligação à quitina HD, R&R e CD foram destacados nas estruturas das vicilinas de *C. ensiformis* e *V. unguiculata* baseados nos alinhamentos feitos com as sequências primárias descritos anteriormente.

#### **3.4. Construção dos modelos de interação das vicilinas de *C. ensiformis* e *V. unguiculata* com GlcNac**

Para construção dos modelos de interação entre as vicilinas e GlcNac foi utilizado o programa GRAMM (Global Range Molecular Matching) versão 1.03 (Vakser & Aflalo, 1994; Vakser, 1995,1996,1997; Vakser *et al.*, 1999). Os dockings foram realizados com os parâmetros de alta resolução, utilização da superfície e das cargas das proteínas e hidrofobicidade. Foram construídas 100 soluções para cada modelo de interação, sendo cada uma destas analisadas buscando resultados mais condizentes com a natureza da proteína.

#### **3.5. Determinação da interface de interação entre GlcNac e os motivos de ligação à quitina**

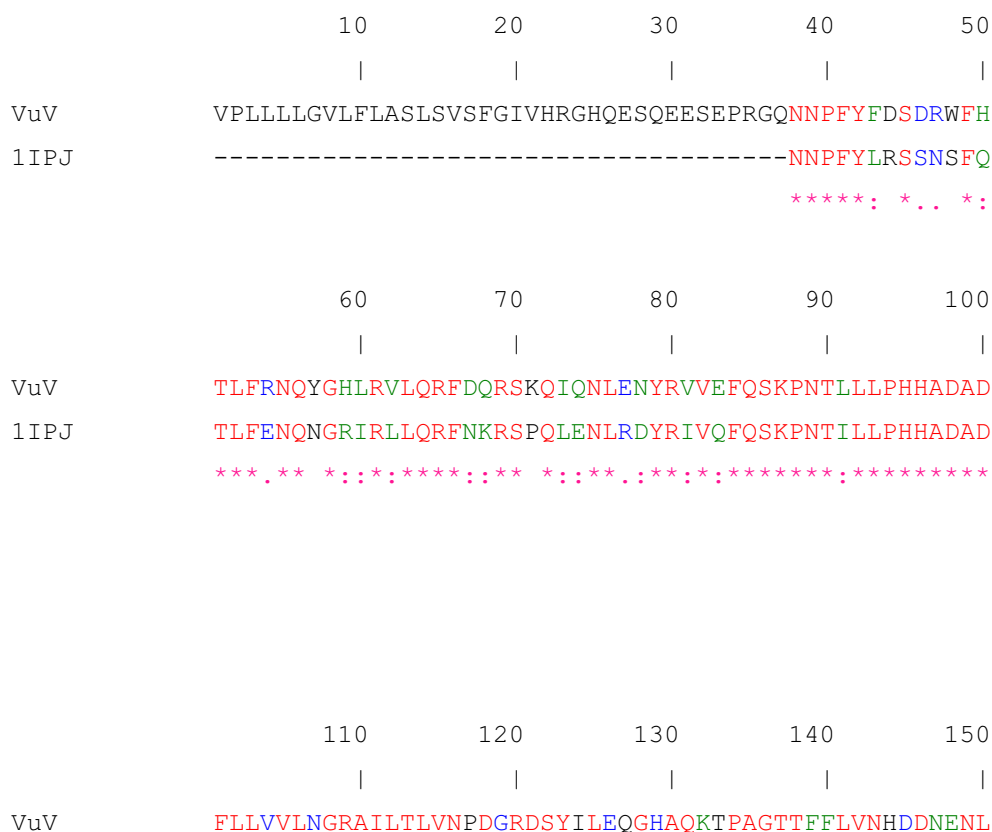
A interface do carboidrato e os motivos de ligação à quitina foram visualizados com o programas PyMol e Ligand Explorer. O número de aminoácidos envolvidos e os tipos de interações foram relacionados com o WD<sub>50</sub> das vicilinas de *G. Max*, *C. ensiformis* e *V. unguiculata* para *C. maculatus* extraídos do trabalho realizado por Yunes e col. (1998).

#### **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas da vicilina de *V. unguiculata* e a proteína molde

O programa BlastP (Altschul *et al.*, 1997) foi utilizado na construção do modelo estrutural tridimensional. A seqüência primária dessa vicilina foi comparada com as seqüências aminoacídicas de vicilinas que possuíam estruturas resolvidas experimentalmente e depositadas no banco de dados de proteínas (PDB). Por apresentar 84,45% de identidade com a seqüência da vicilina de *V. unguiculata*, a seqüência aminoacídica da vicilina de *G. Max* foi escolhida como molde. Essa vicilina possui a estrutura tridimensional resolvida por difração de raios-X, com resolução de 2,7 Å, com ID 1IPJ de acesso ao PDB.

O alinhamento seqüencial foi realizado no programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) com a finalidade de construir um perfil sequencial da vicilina de *V. unguiculata*. A vicilina apresentou 22,99% dos resíduos similares à seqüência primária da vicilina de *G. max*, sendo 60,46% desses resíduos idênticos (Fig. 5).



```

1IPJ      FLLFVLSGRAILTLVNNDDRDSYNLHPGDAQRI PAGTTYLVNPHDHQNL
          ***.*.*.***** *.*.*** *.*.***: *****:*** .*:***
          160      170      180      190      200
          |        |        |        |        |
VuV       RIVKLAVPVNPHRFQDFFLSSTEAAQSYLQGFSGKNILEASFDSDFKEIN
1IPJ      KIIKLAI PVNKPGRYDFFLSSTQAQSYLQGFSGHNILETSFHSEFEEIN
          :*:***:***:* *.:*****:*****:*****:***:*.*:***
          210      220      230      240      250
          |        |        |        |        |
VuV       RVLFGEEEQKQQDEESQQEGVIVQLKREQUIRELMKHAKSTSKKSLSTQNE
1IPJ      RVLFGEEE-----EQRQQEGVIVELSKEQIRQLSRRAKSSSRKTISSEDE
          ***:*** *.:*****:*.:***:* :*:***:***:***:***
          260      270      280      290      300
          |        |        |        |        |
VuV       PFNLRSQKPIYSNKFGRLHEITPEKNPQLRDLVDVFLTSVDIKEGGLLMPN
1IPJ      PFNLRSRNPIYSNNGKFFFEITPEKNPQLRDLDFLSSVDINEGALLLPH
          *****:***:***:*.:*****:***:***:***:***:***
          310      320      330      340      350
          |        |        |        |        |
VuV       YNSKAIVILVNVKGEANIELVGQREQQQQQ--QEESWEVQRYRAEVSDDD
1IPJ      FNSKAIVILVINEGDANIELVGIKEQQQKQKQEEPLEVQRYRAELSEDD
          :*****:*.:***** :***:* :*. *****:***
          360      370      380      390      400
          |        |        |        |        |
VuV       VVFI PASYPVAITATSNLNFIAFGINAENNRNFLAGEEDNMSEIPTTEV
1IPJ      VVFI PAAYPFV VV NATSNLNFIAFGINAENNRNFLAGEKDNVVRQIERQV
          *****.*.*.:. *****:*****:***: * *
          410      420      430
          |        |        |
VuV       LDVTFPASGEKVEKLINKQSDSHFTDHSSKREERV

```

```

1IPJ      QELAFPGSAQDVERLLKKQRESYFVDA-----
          : : * * . * . : . * * : * : * *   : * : * . *

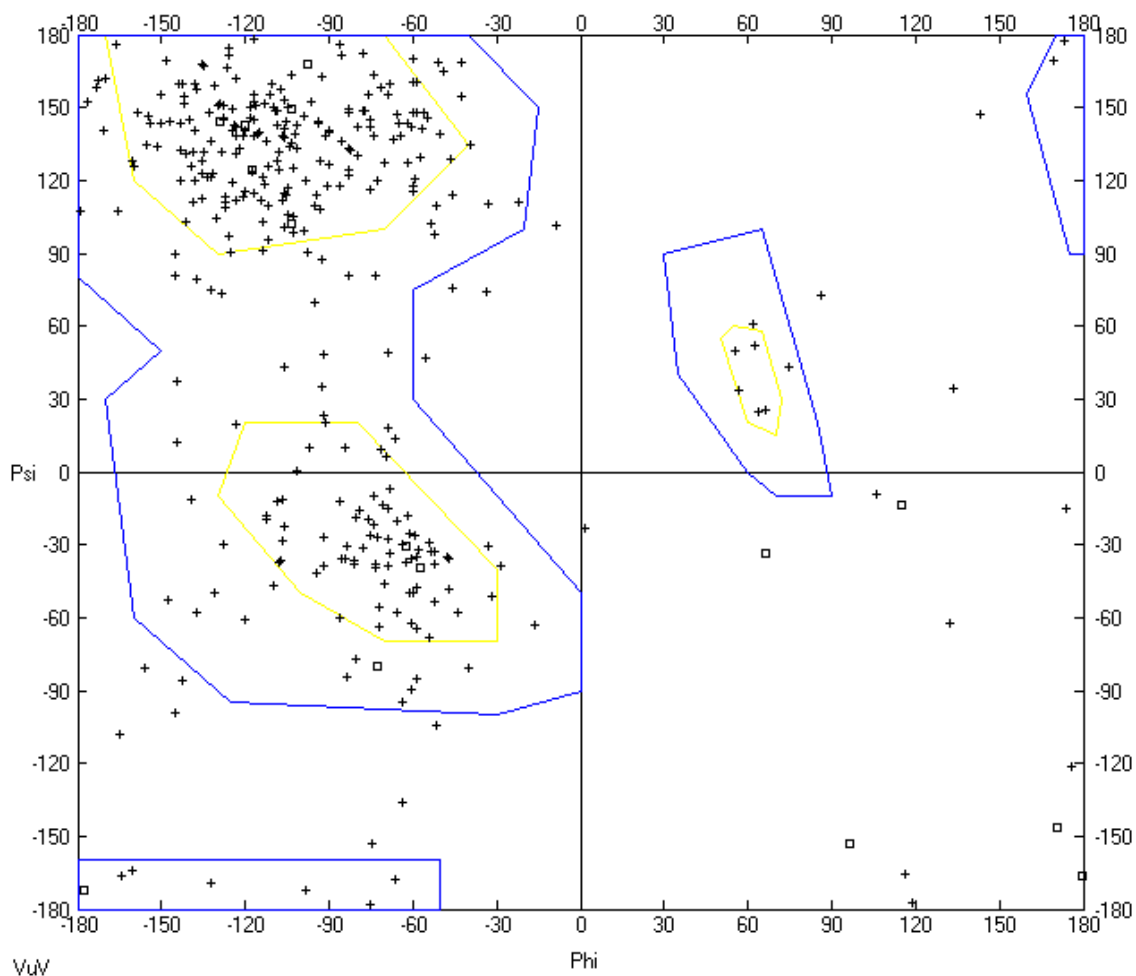
```

**Fig. 5** - Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas de monômeros das vicilinas de *V. unguiculata* (VuV) e *G. max* (1IPJ). Resíduos com identidade (em vermelho) totalizaram 60,46%; similaridade forte (em verde) totalizaram 17,93%; similaridade fraca (em azul) totalizaram 5,06%.

#### 4.2. Avaliação do modelo estrutural do monômero da vicilina de *V. unguiculata*

O modelo da vicilina de *V. unguiculata* foi construído por modelagem comparativa utilizando o programa SWISS-MODEL (Guex & Peitsch, 1997; Schwed *et al.*, 2003; Kopp & Schwede 2004; Arnold *et al.*, 2006), e sua estrutura resultante foi validada pelo programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), que avalia diversos parâmetros estereoquímicos, tais como ângulos torsionais da cadeia principal Phi ( $\Phi$ ) e Psi ( $\Psi$ ), ângulos torsionais das cadeias laterais, maus contatos (ou impedimentos estéricos), energias das ligações de hidrogênio, planaridade das ligações peptídicas, desvios em relação à geometria tetraédrica dos carbonos- $\alpha$ , dentre outros.

A avaliação do modelo apresentado pelo mapa de Ramachandran apresentou um modelo confiável com grande parte dos resíduos que compõem um monômero da vicilina em regiões fisicamente aceitáveis do mapa (Fig. 6).

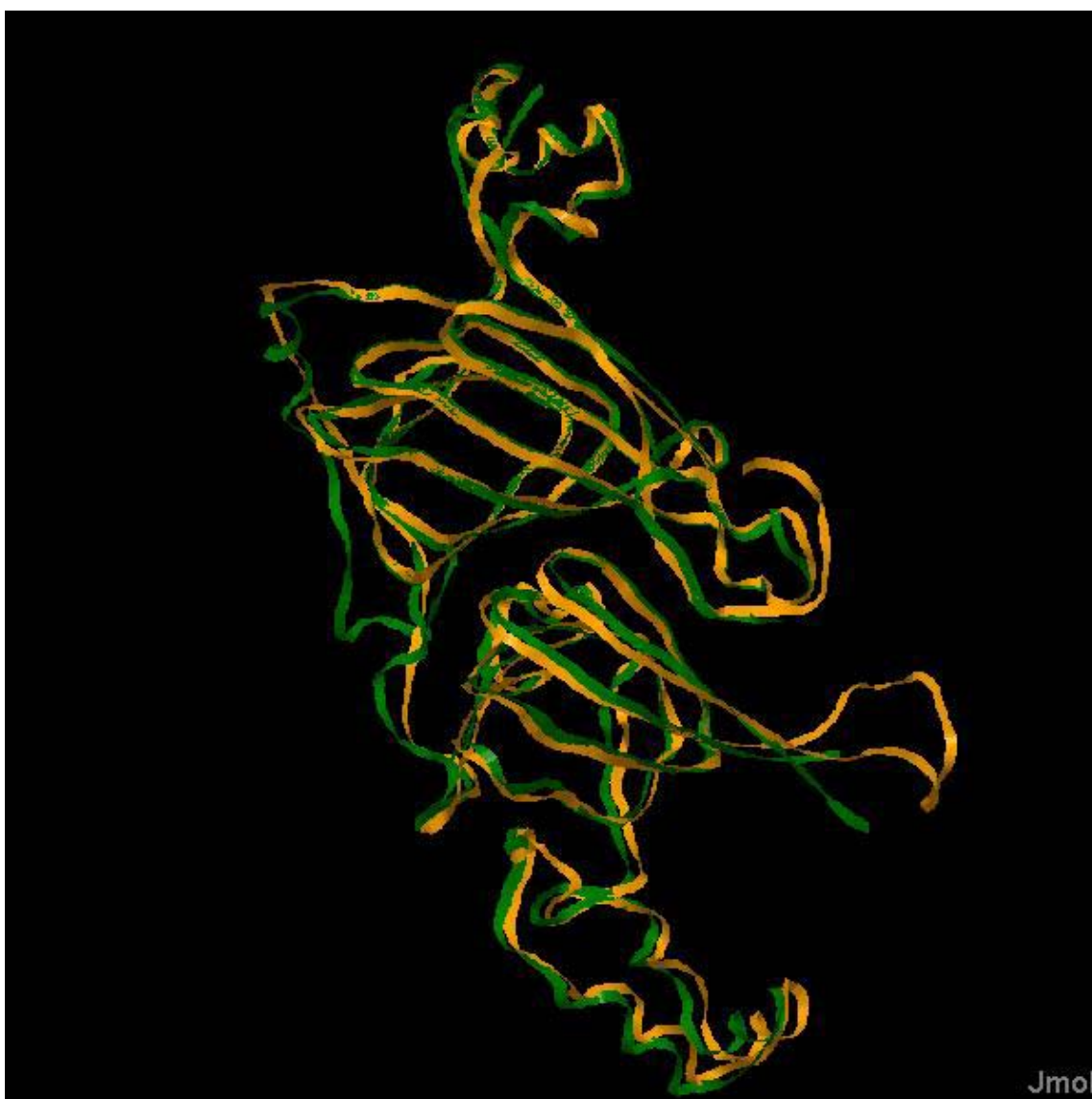


**Fig. 6** - Mapa de Ramachandran visto através do programa SPdbV mostra as regiões fisicamente permitidas para os aminoácidos do modelo estrutural da vicilina de *V. unguiculata*. As regiões de estrutura secundária dentro do perímetro em amarelo são mais favoráveis na estrutura; as regiões de estrutura secundária dentro do perímetro em azul são mais aceitáveis na estrutura.

A diferença entre a estrutura cristalizada da vicilina de *G. max* e a estrutura da vicilina de *V. unguiculata* resultante do processo de modelagem comparativa foi calculada pela sobreposição de ambas as estruturas foi feita através do programa 3DSS (Sumathi *et al*, 2005) (Fig. 7). O valor de RMSD (raiz quadrada do desvio médio) entre a estrutura resolvida por difração de raios-X e o modelo da vicilina de *V. unguiculata* foi calculado através do carbono alfa e a cadeia principal resultando em 0,36Å. Este resultado mede a acurácia do modelo (quando igual a zero indica



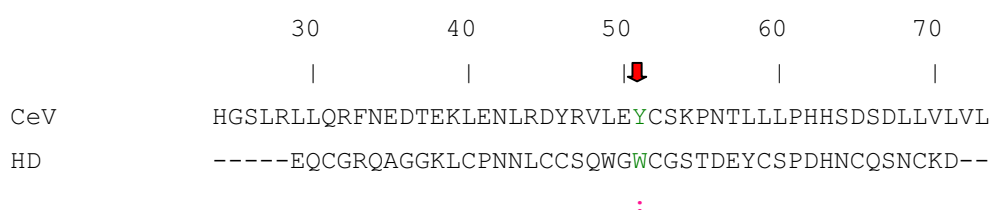
um ajuste perfeito) e indicou uma pequena variabilidade entre o modelo da vicilina de *V. unguiculata* e a estrutura experimental (vicilina de *G. max*) que por conseqüência refletiu a forte similaridade no padrão de dobramento entre esses inibidores.



**Fig. 7** – Sobreposição das estruturas dos monômeros de VuV (em amarelo) e GmV (em verde). Observa-se uma grande semelhança entre as estruturas que formam a subunidade, mostrando o quanto elas são conservadas. Além disso, as regiões em  $\beta$ -folha que são responsáveis pela união e integridade das duas cadeias para formar um monômero estão bem conservadas.

#### 4.3. Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas da vicilina de *C. ensiformis* e do domínio heveína (HD)

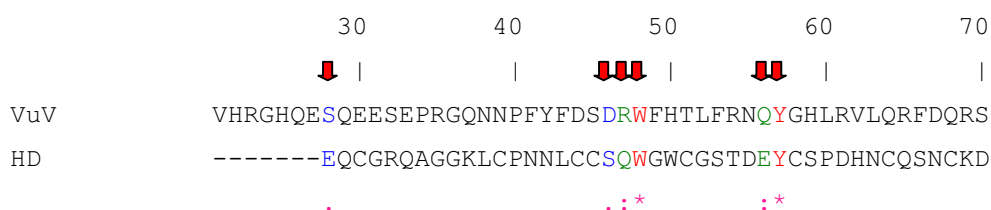
O alinhamento realizado entre as seqüências aminoacídicas de CeV e HD mostrou que dos sete aminoácidos responsáveis pela interação deste domínio com GlcNac (Glu1, Ser19, Gln20, Trp21, Trp23, Glu29 e Tyr30), apenas um em CeV (Tyr91) está em posição conservada e com forte similaridade (Fig. 8).



**Fig. 8** - Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas da vicilina de *C. ensiformis* (CeV) e do domínio heveína (HD). O alinhamento mostra uma identidade de 48%, sendo que apenas um dos sete resíduos que fazem parte da interação de HD com quitina está em posição conservada nas seqüências. Os resíduos indicados pela seta vermelha estão em posições conservadas em ambas as seqüências (resíduos com similaridade forte em verde).

#### 4.4. Alinhamento das seqüências aminoacídicas da vicilina de *V. unguiculata* e do domínio heveína (HD)

O alinhamento realizado entre as sequências aminoacídicas de VuV e HD mostrou que dos sete aminoácidos responsáveis pela interação deste domínio com GlcNac (Glu1, Ser19, Gln20, Trp21, Trp23, Glu29 e Tyr30), seis em VuV (Ser28, Asp46, Arg47, Trp48, Gln56 e Tyr57) estão em posições conservadas e com alterações (Fig. 9).

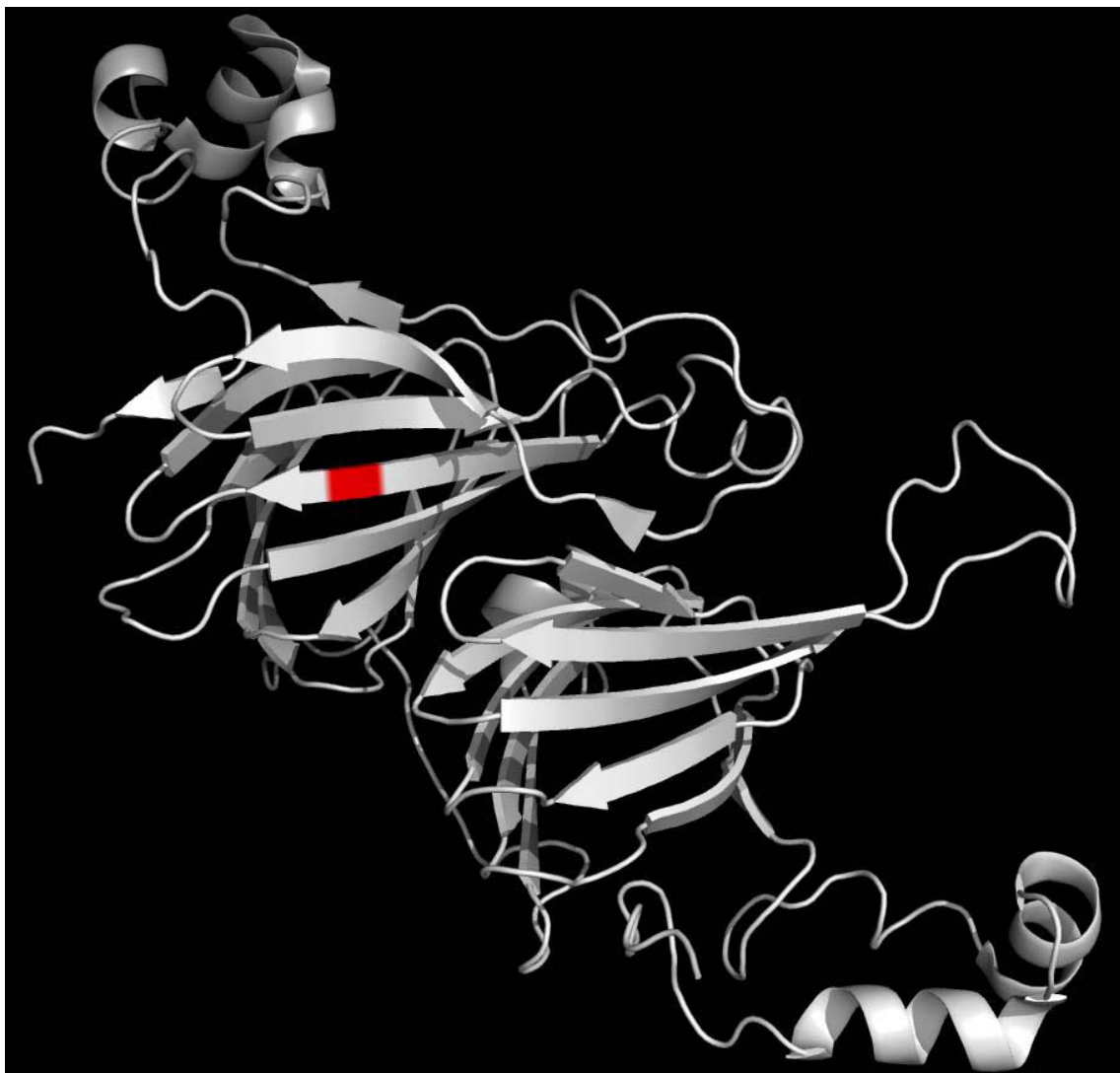


**Fig. 9** - Alinhamento entre as sequências aminoacídicas da vicilina de *V. unguiculata* (VuV) e do domínio heveína (HD). O alinhamento mostra uma identidade de 47%, sendo que seis resíduos dos sete que fazem parte da interação de HD com quitina estão em posições conservadas nas sequências. Os resíduos indicados pelas setas vermelhas são conservados em ambas as sequências (resíduos com identidade em vermelho; similaridade forte em verde; similaridade fraca em azul).

#### 4.5. Localização do domínio HD nos modelos estruturais das vicilinas de *C. ensiformis* e *V. unguiculata*

Com base nos alinhamentos feitos entre o domínio HD e as sequências aminoacídicas de CeV e VuV, obteve-se a localização deste domínio nos modelos estruturais destas vicilinas. Em CeV, apesar do resíduo estar localizado numa estrutura secundária em  $\beta$ -folha semelhante à encontrada na estrutura da heveína, a região onde ele está localizado é responsável pela interação entre as duas cadeias que formam o monômero da vicilina, o que o impede de ter uma possível interação com quitina. Em VuV, apesar de seis resíduos estarem em posições conservadas, eles estão localizados numa estrutura em alça, o que difere do modelo da heveína em que o domínio de ligação à quitina está localizado numa

estrutura em  $\beta$ -folha. Além disso, a presença deste domínio em locais diferentes nos modelos estruturais afere que este não faz parte da região que é responsável pela interação dessas vicilinas com quitina (Figs. 10 e 11).



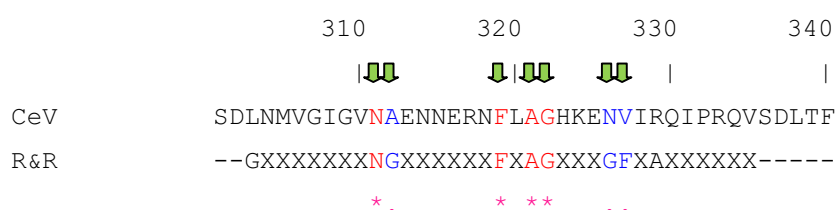
**Fig. 10** – Modelo estrutural do monômero de CeV. O resíduo em vermelho que corresponde à Tyr91 em CeV está em posição conservada com o resíduo Trp23 em HD e está localizado numa região de estrutura em  $\beta$ -folha.



**Fig. 11** – Modelo estrutural do monômero de VuV. Os resíduos em vermelho que correspondem à Ser28, Asp46, Arg47, Trp48, Gln56 e Tyr57 em VuV estão em posições conservadas com os resíduos Glu1, Ser19, Gln20, Trp21, Glu29 e Tyr30 em HD e estão localizados numa região de estrutura em alça.

#### 4.6. Alinhamento entre as sequências aminoacídicas da vicilina de *C. ensiformis* e do domínio R&R consenso (R&R)

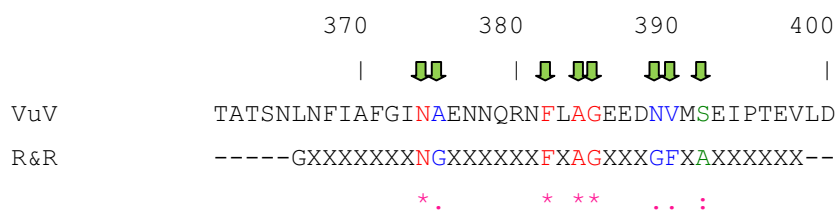
O alinhamento realizado entre as sequências aminoacídicas de CeV e R&R mostrou que dos nove aminoácidos que fazem parte deste domínio, sete estão em posições conservadas em CeV com algumas alterações. São eles: Asn311, Ala312(Gly), Phe319, Ala321, Gly322, Asn326(Gly) e Val327(Phe) (Fig. 12).



**Fig. 12** - Alinhamento entre as sequências aminoacídicas da vicilina de *C. ensiformis* (CeV) e do domínio R&R consenso (R&R). X indica que pode ser qualquer resíduo na seqüência. Os resíduos indicados pelas setas verdes estão em posições conservadas em ambas as sequências (resíduos com identidade em vermelho; similaridade fraca em azul).

#### 4.7. Alinhamento entre as sequências aminoacídicas da vicilina de *V. unguiculata* e do domínio R&R consenso (R&R)

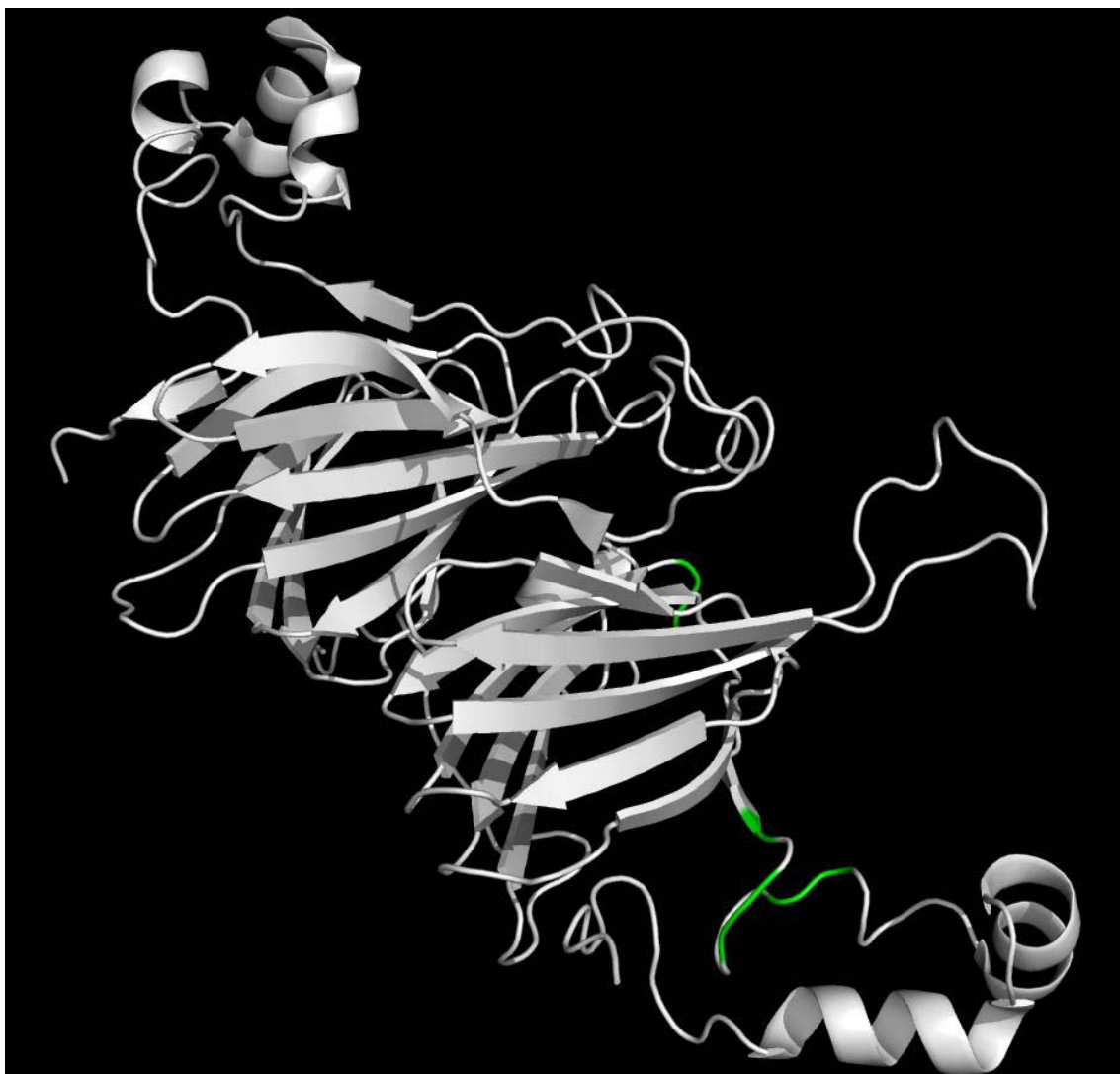
O alinhamento realizado entre as sequências aminoacídicas de VuV e R&R mostrou que dos nove aminoácidos que fazem parte deste domínio, oito estão em posições conservadas em VuV com algumas alterações. São eles: Asn374, Ala375(Gly), Phe382, Ala384, Gly385, Asn389(Gly), Val390(Phe) e Ser392(Ala) (Fig. 13).



**Fig. 13** - Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas da vicilina de *V. unguiculata* (VuV) e do domínio R&R consenso (R&R). X indica que pode ser qualquer resíduo na seqüência. Os resíduos indicados pelas setas verdes são conservados em ambas as seqüências (resíduos com identidade em vermelho; similaridade forte em verde; similaridade fraca em azul).

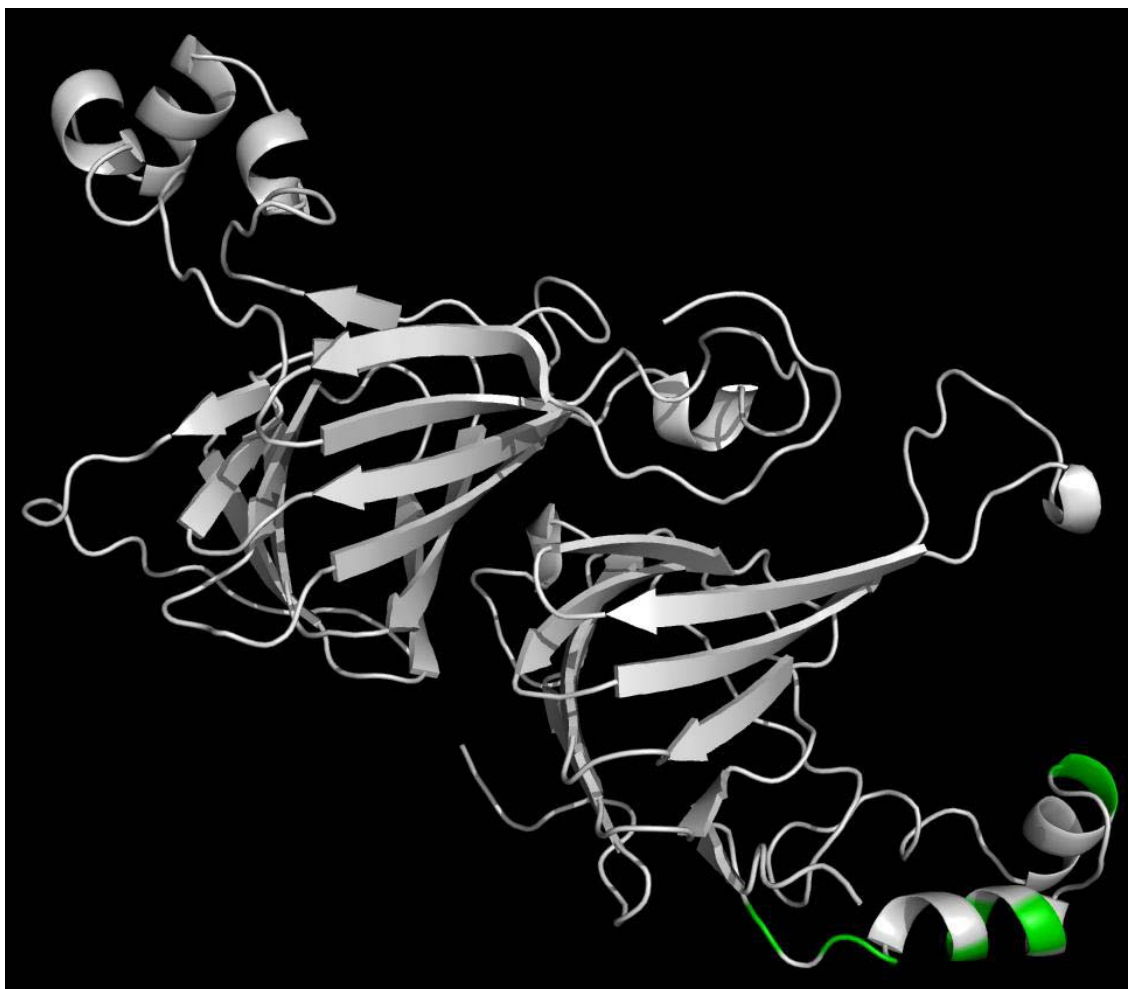
#### 4.8. Localização do domínio R&R nos modelos estruturais das vicilinas de *C. ensiformis* e *V. unguiculata*

Com base nos alinhamentos feitos entre o domínio R&R e as seqüências aminoacídicas de CeV e VuV, obteve-se a localização deste domínio nos modelos estruturais destas vicilinas. Em CeV os resíduos estão localizados numa estrutura secundária em alça, o que difere do modelo estrutural em forma de meio-barril  $\beta$  do domínio R&R. Em VuV, apesar dos resíduos estarem em posições conservadas, eles estão localizados numa estrutura em  $\alpha$ -hélice, o que também difere do modelo estrutural em forma de meio-barril  $\beta$  do domínio R&R. Apesar da diferença estrutural, a presença deste domínio em locais próximos nos modelos estruturais afere que este pode fazer parte da região que é responsável pela interação dessas vicilinas com quitina (Figs. 14 e 15).



**Fig. 14** – Modelo estrutural do monômero de CeV. Os resíduos em verde que correspondem à Asn311, Ala312, Phe319, Ala321, Gly322, Asn326 e Val327 em CeV estão em posições conservadas com os resíduos Asn09, Gly10, Phe17, Ala19, Gly20, Gly24 e Phe25 em R&R e estão localizados numa região de estrutura em alça.

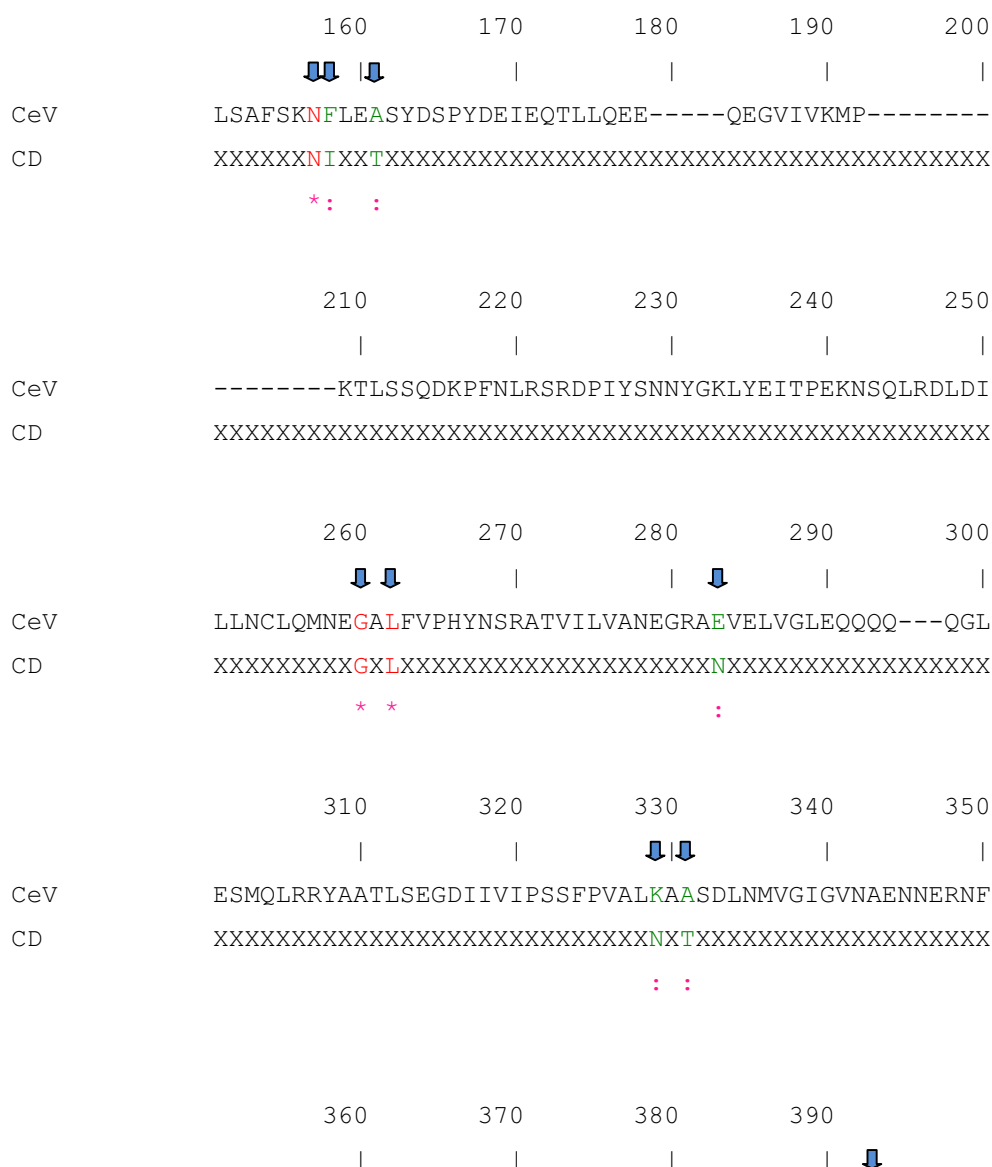




**Fig. 15** – Modelo estrutural do monômero de VuV. Os resíduos em verde que correspondem à Asn374, Ala375, Phe382, Ala384, Gly385, Asn389, Val390 e Ser392 em VuV estão em posições conservadas com os resíduos Asn09, Gly10, Phe17, Ala19, Gly20, Gly24, Phe25 e Ala 27 em R&R e estão localizados numa região de estrutura em  $\alpha$ -hélice..

#### 4.9. Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas da vicilina de *C. ensiformis* e do domínio conglicina (CD)

O alinhamento realizado entre as seqüências aminoacídicas de CeV e CD mostrou que os nove aminoácidos responsáveis pela interação deste domínio com GlcNac estão em posições conservadas em CeV, com algumas alterações. São eles: Asn157 – Asn150, Ile158 – Phe151, Thr161 – Ala154, Gly260 – Gly232, Leu262 – Leu234, Asn283 – Glu255, Asn329 – Lys298, Thr331 – Ala300 e Ala393 – Gly362, respectivamente (Fig. 16).



```

CeV      LAGHKENVIRQIPRQVSDLTFPGSGEEVEELLENQKESYFVDGQPR
CD       XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXA---

```

**Fig. 16** - Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas da vicilina de *C. ensiformis* (CeV) e do domínio conglicinina (CD). X indica que pode ser qualquer resíduo na seqüência. Os resíduos indicados pelas setas azuis estão em posições conservadas em ambas as seqüências (resíduos com identidade em vermelho; similaridade forte em verde; similaridade fraca em azul).

#### 4.10. Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas da vicilina de *V. unguiculata* e do domínio conglicinina (CD)

O alinhamento realizado entre as seqüências aminoacídicas de VuV e CD mostrou um percentual de homologia alto (Fig x). Além disso, dos nove aminoácidos responsáveis pela interação deste domínio com GlcNac, oito estão em posições conservadas em VuV, com algumas alterações. São eles: Asn157 – Asn186, Ile158 – Ile187, Thr161 – Ala190, Gly260 – Gly194, Leu262 – Leu196, Asn283 – Asn317, Asn329 – Thr361 e Thr331 – Thr363, respectivamente (Fig. 17).

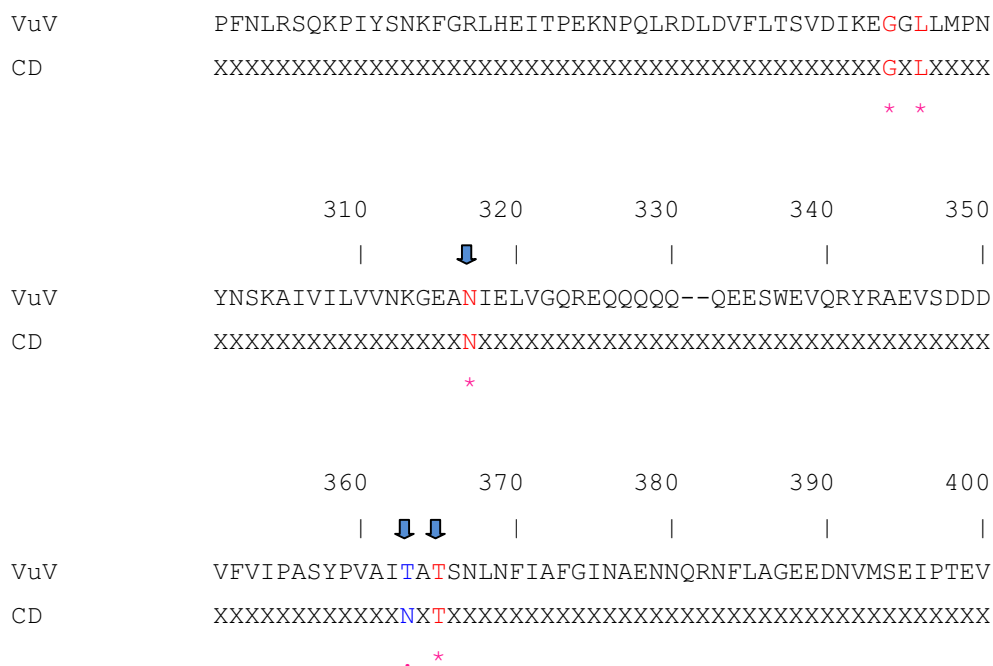
```

                160      170      180      190      200
                |        |        |        ↓↓ ↓        |
VuV      RIVKLA V P V N N P H R F Q D F F L S S T E A Q Q S Y L Q G F S K N I L E A S F D S D F K E I N
CD       XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXN I X X T XXXXXXXXXXXXX
                * *      ;

                210      220      230      240      250
                |        |        |        |        |
VuV      R V L F G E E E Q K Q Q D E E S Q Q E G V I V Q L K R E Q I R E L M K H A K S T S K K S L S T Q N E
CD       XXXXXXXX-----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

                260      270      280      290      300
                |        |        |        |        ↓↓ ↓        |

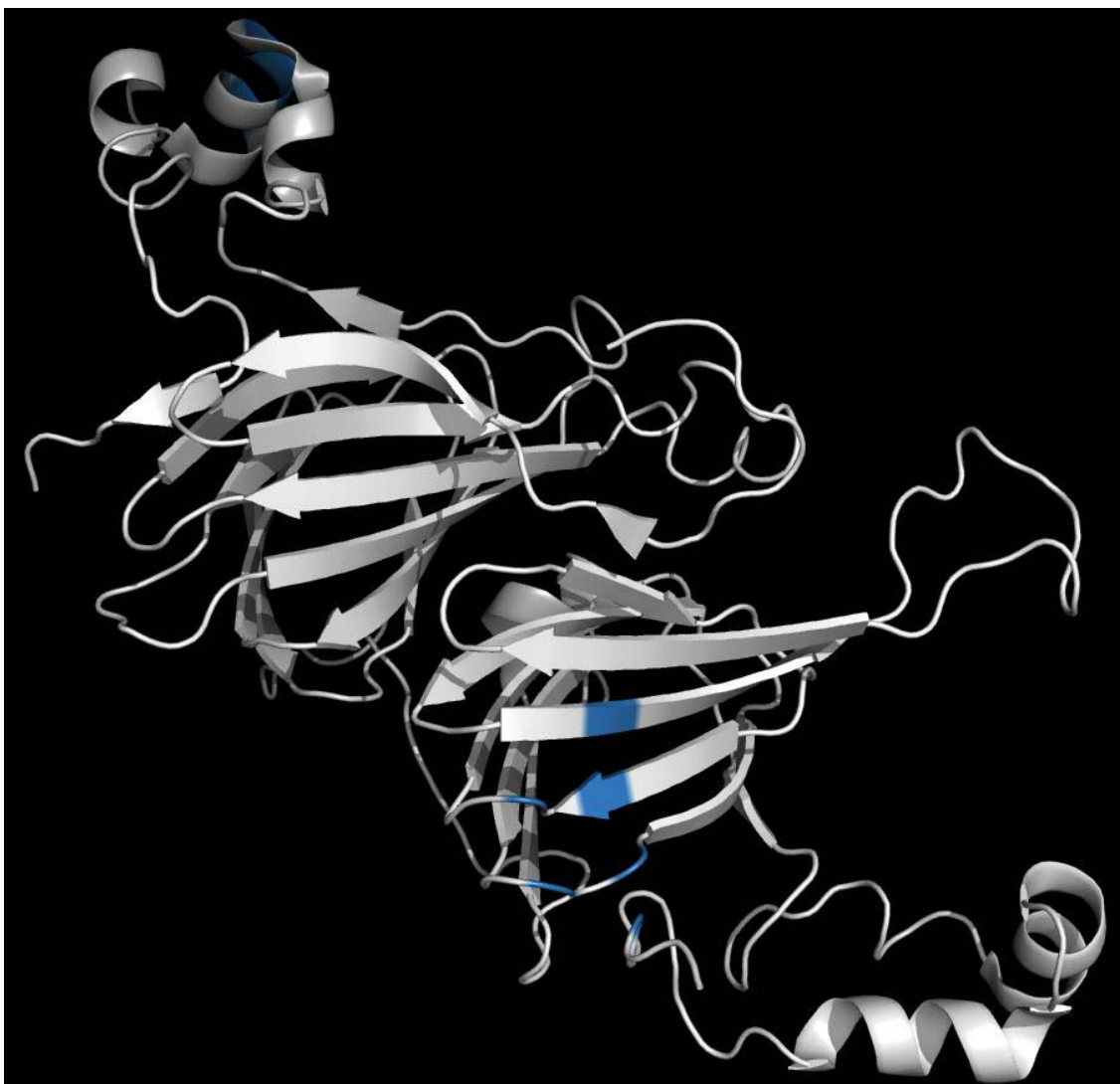
```



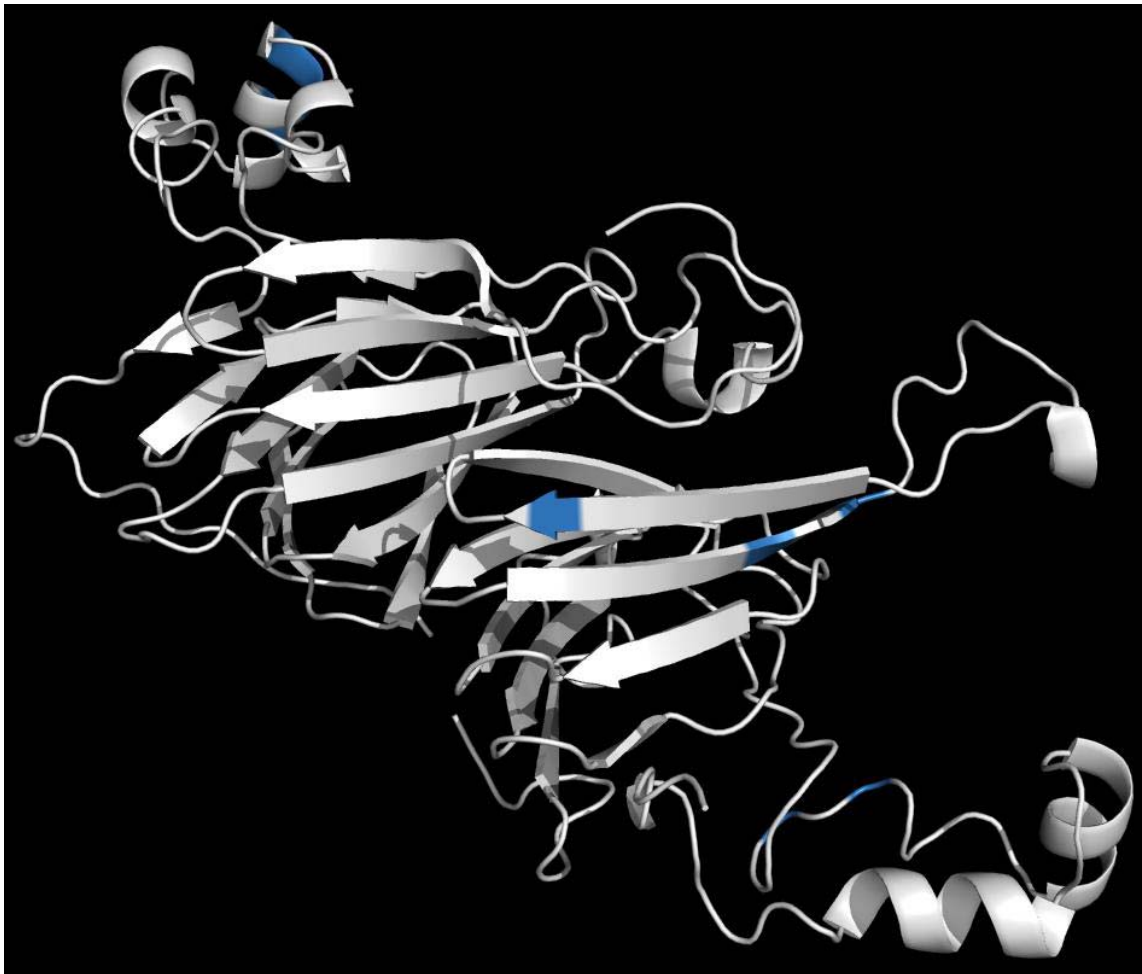
**Fig. 17** - Alinhamento entre as seqüências aminoacídicas da vicilina de *V. unguiculata* (VuV) e do domínio conglicina (CD). X indica que pode ser qualquer resíduo na seqüência. Os resíduos indicados pelas setas azuis estão em posições conservadas em ambas as seqüências (resíduos com identidade em vermelho; similaridade forte em verde; similaridade fraca em azul).

#### 4.11. Localização do domínio CD nos modelos estruturais das vicilinas de *C. ensiformis* e *V. unguiculata*

Com base nos alinhamentos feitos entre o domínio CD e as seqüências aminoacídicas de CeV e VuV, obteve-se a localização deste domínio nos modelos estruturais destas vicilinas. A presença deste domínio em locais muito próximos nos modelos estruturais, a localização e a grande semelhança estrutural com o domínio CD afere que este é o principal candidato a fazer parte da região que é responsável pela interação dessas vicilinas com quitina (Figs. 18 e 19).



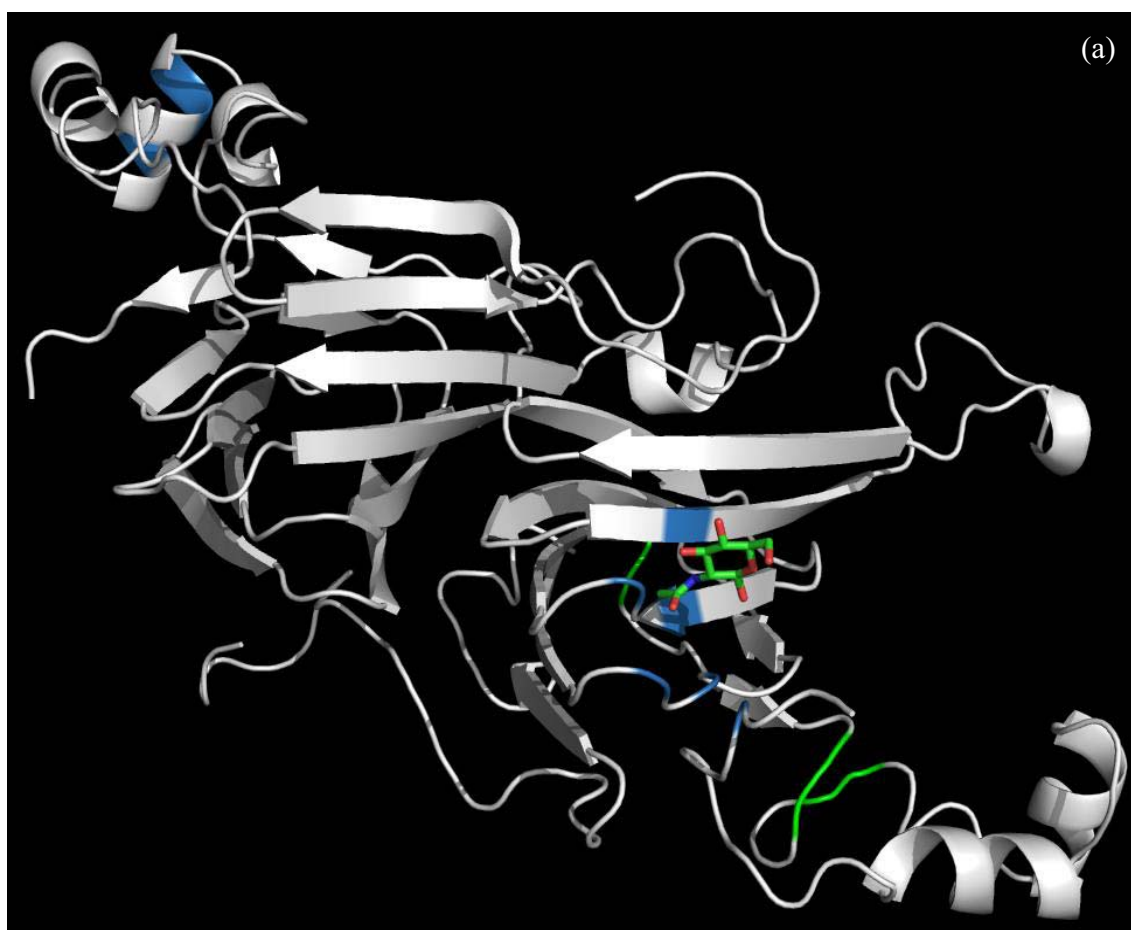
**Fig. 18** – Modelo estrutural do monômero de CeV. Os resíduos em azul que correspondem à Asn150, Phe151, Ala154, Gly232, Leu234, Glu255, Lys298, Ala300 e Gly362 em CeV estão em posições conservadas com os resíduos Asn157, Ile158, Thr161, Gly260, Leu262, Asn283, Asn329, Thr331 e Ala393 em CD e estão localizados em regiões de estruturas bastante semelhantes.

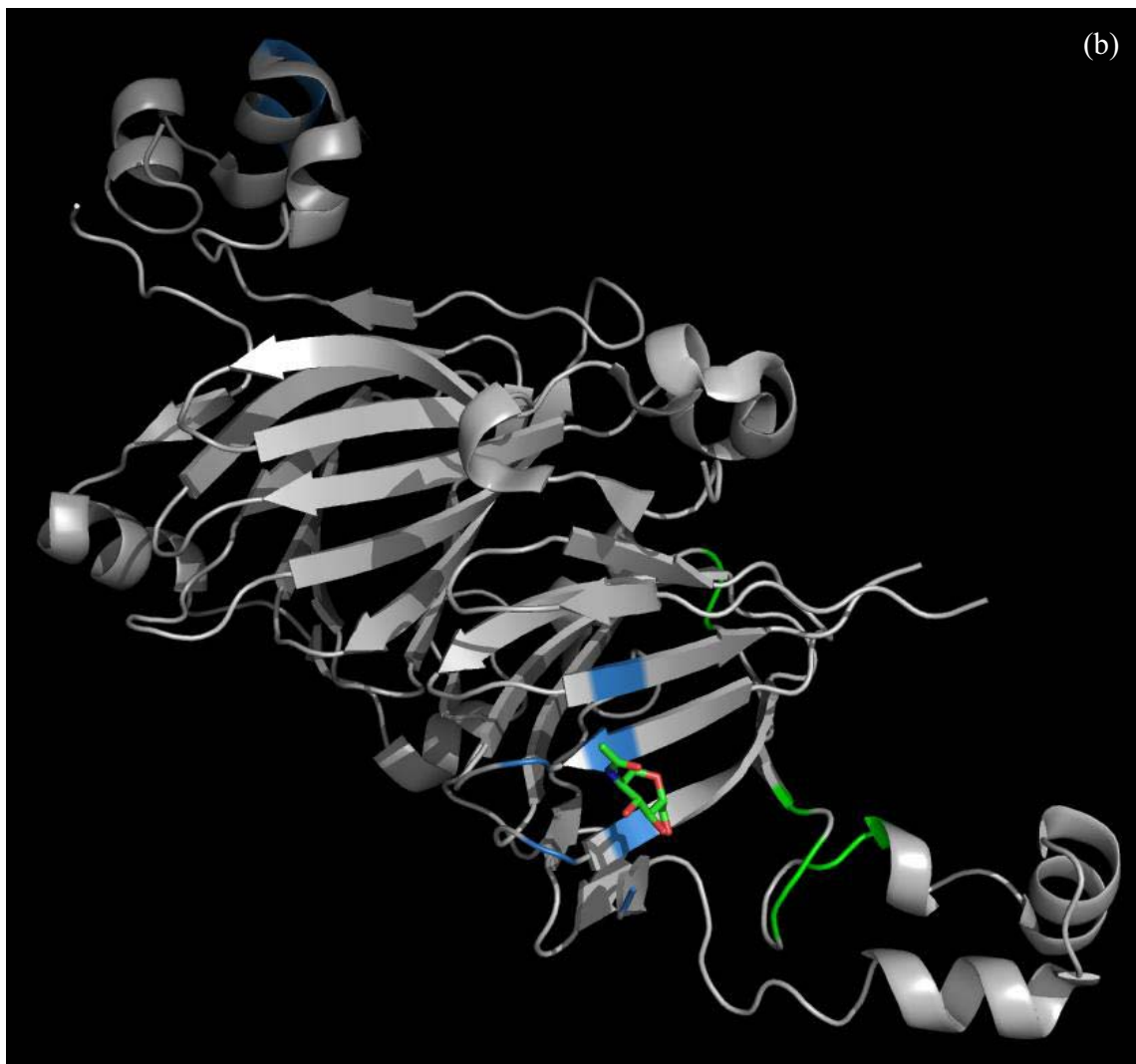


**Fig. 19** – Modelo estrutural do monômero de VuV. Os resíduos em azul que correspondem à Asn186, Ile187, Ala190, Gly194, Leu196, Asn317, Thr361 e Thr363 em VuV estão em posições conservadas com os resíduos Asn157, Ile158, Thr161, Gly260, Leu262, Asn283, Asn329 e Thr331 em CD e estão localizados em regiões de estruturas bastante semelhantes.

#### 4.12. Modelo de interação entre o monômero de CeV e GlcNac

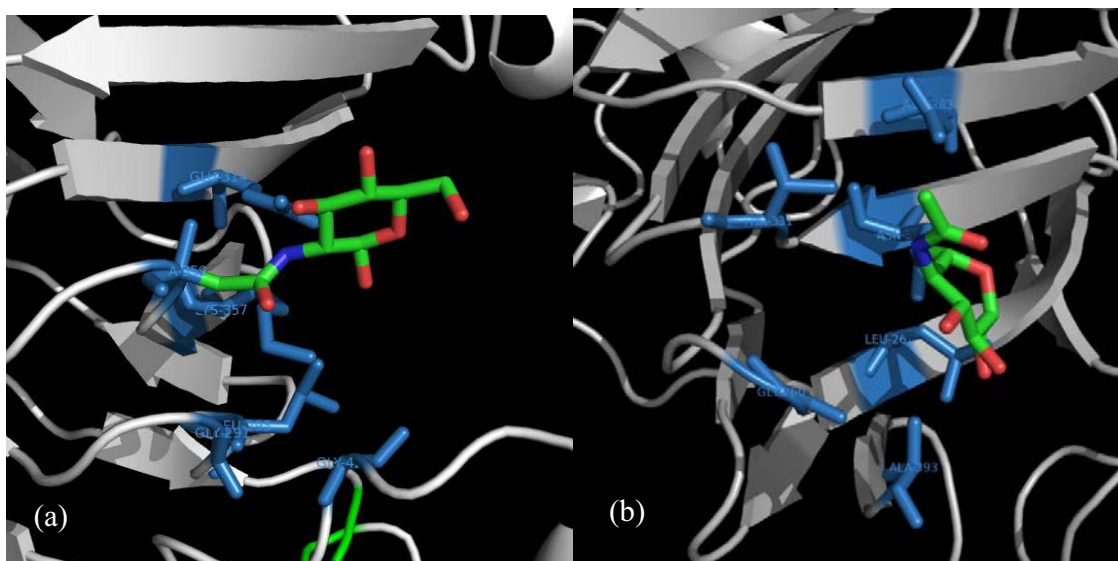
Através do GRAMM (Global Range Molecular Matching) versão 1.03 (Vakser & Afalo, 1994; Vakser, 1995, 1996, 1997; Vakser *et al.*, 1999), foi selecionado o modelo de interação de CeV com o carboidrato GlcNac que apresentava uma quantidade maior de características válidas em comum com o modelo de GmV. As figs. 20(a), 20(b), 21(a) e 21(b) mostram que o domínio CD participa diretamente da interação da vicilina com o carboidrato, e que o domínio R&R pode ter participação em tal interação.





**Fig. 20** – (a) Modelo de interação do monômero de GmV com GlcNac descrito por Muryama e col. (2001). (b) Modelo de interação do monômero de CeV com GlcNac. Observam-se em azul os resíduos que fazem parte do domínio CD e próximo a eles em bastões verdes está o carboidrato GlcNac . Em verde os resíduos que fazem parte do domínio R&R.

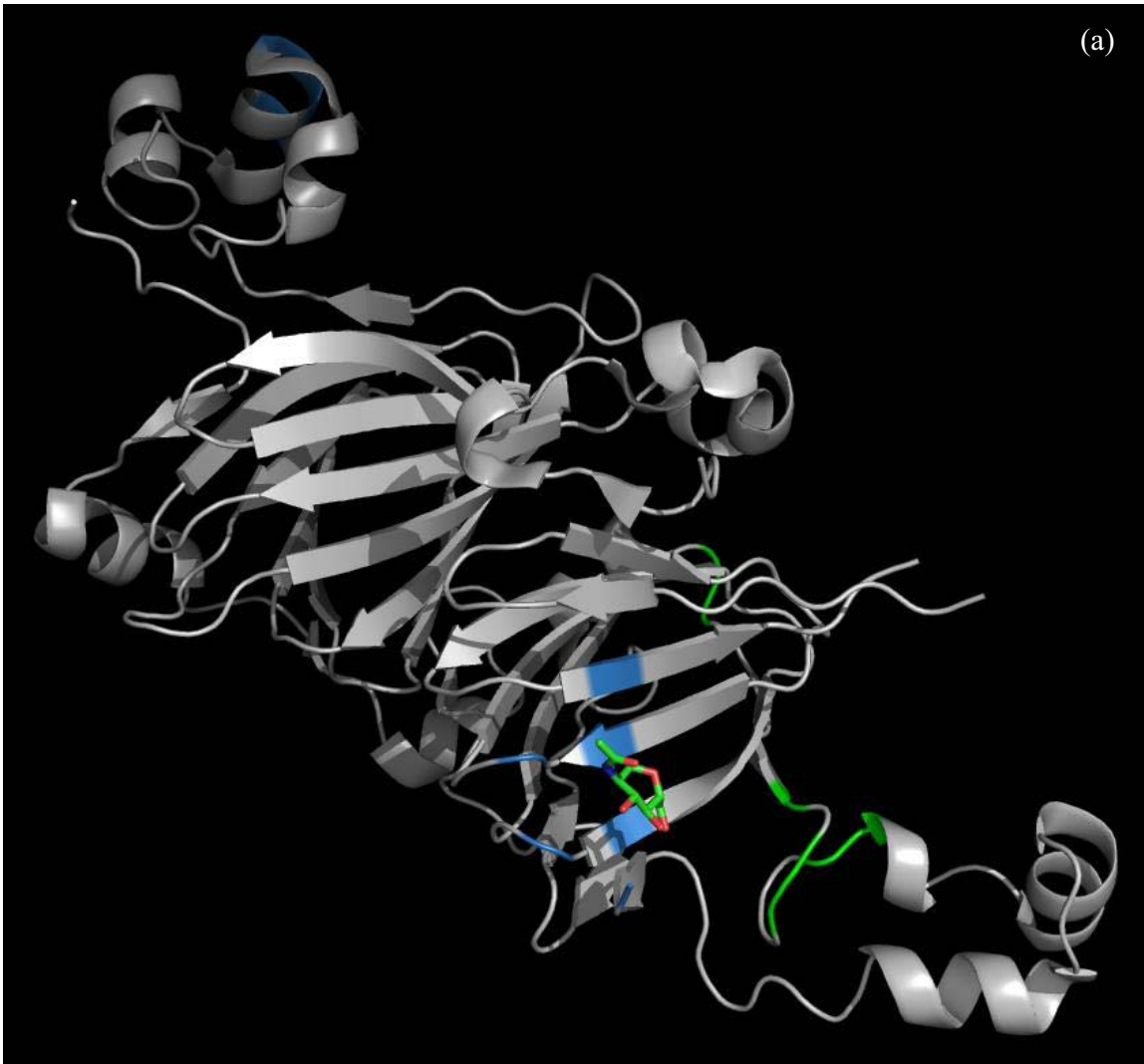


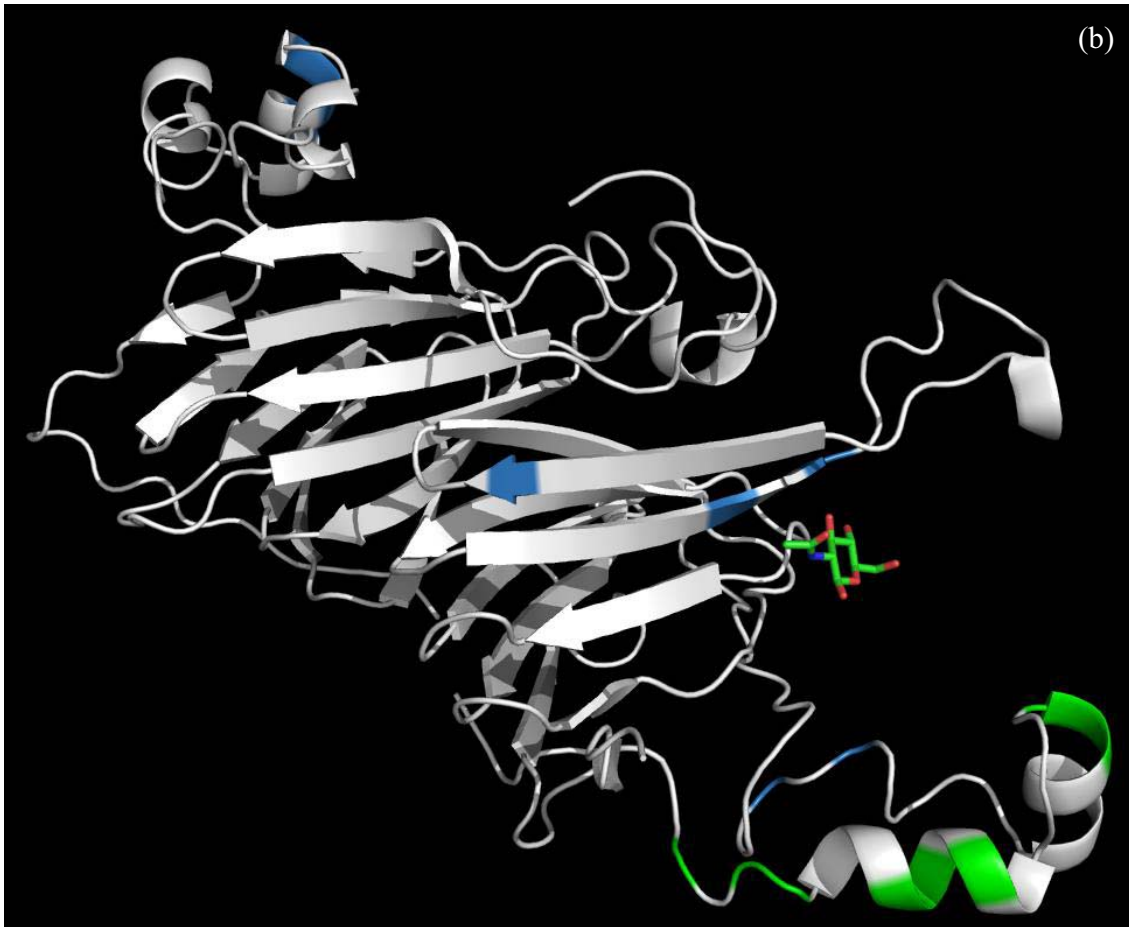


**Fig. 21** – (a) Modelo de interação do monômero de CeV com o carboidrato GlcNac (verde) mostrada mais detalhadamente. (b) Observa-se uma grande semelhança com o modelo de interação feito através de cristalografia de GmV com o mesmo carboidrato. Os resíduos em azul (destacados em forma de bastões) fazem parte do domínio CD.

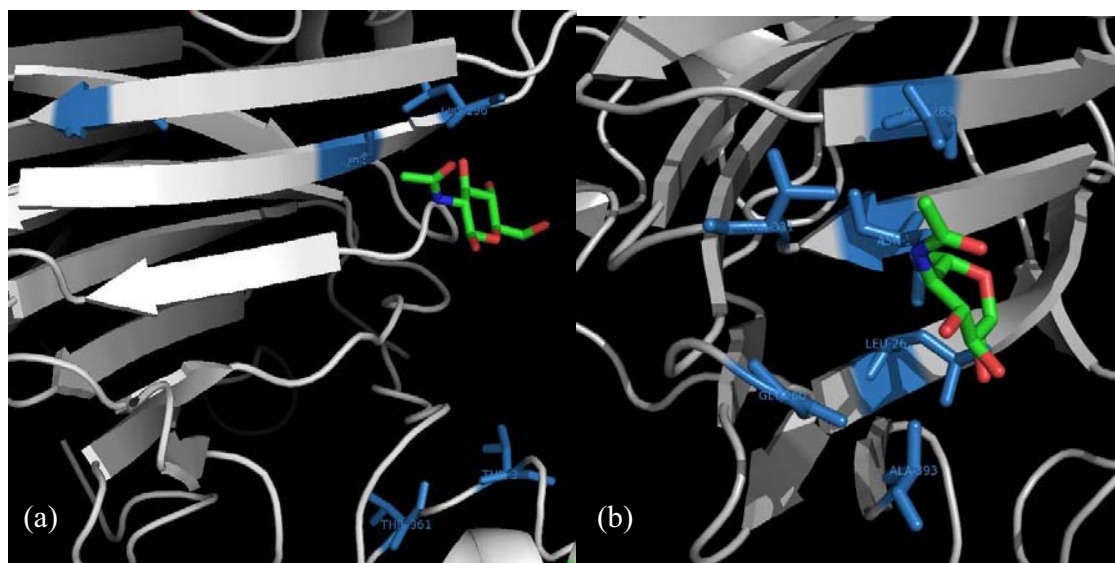
#### 4.13. Modelo de interação entre monômero de VuV e GlcNac

Através do GRAMM (Global Range Molecular Matching) versão 1.03 (Vakser & Aflalo, 1994; Vakser, 1995, 1996, 1997; Vakser *et al.*, 1999), foi selecionado o modelo de interação de VuV com o carboidrato GlcNac que apresentava uma quantidade maior de características válidas em comum com o modelo de GmV. As figs. 22(a), 22(b), 23(a) e 23(b) mostram que o domínio CD participa diretamente da interação da vicilina com o carboidrato, e que o domínio R&R pode ter participação em tal interação.





**Fig. 22** – (a) Modelo de interação do monômero de GmV com GlcNac descrito por Muryama e col. (2001). (b) Modelo de interação do monômero de VuV com GlcNac. Observam-se em azul os resíduos que fazem parte do domínio CD e próximo a eles em bastões verdes está o carboidrato GlcNac . Em verde os resíduos que fazem parte do domínio R&R.



**Fig. 23** – (a) Modelo de interação do monômero de VuV com o carboidrato GlcNac (verde) mostrada mais detalhadamente. (b) Observa-se uma grande semelhança com o modelo de interação feito através de cristalografia de GmV com o mesmo carboidrato. Os resíduos em azul (destacados em forma de bastões) fazem parte do domínio CD

#### 4.14. Determinação da interface de interação entre GlcNac e os motivos de ligação à quitina em relação ao WD<sub>50</sub> de GmV, CeV e VuV

A tabela 1 mostra os aminoácidos envolvidos na interação de GmV, CeV e VuV com o carboidrato GlcNac e sua relação com o WD<sub>50</sub> destas vicilinas para *C. maculatus*. Os resultados mostram que existe uma relação entre a quantidade de aminoácidos, número e tipos de ligações que estes podem exercer com o poder deletério destas vicilinas para larvas de *C. maculatus*.

**Tabela 1** - Relação do  $WD_{50}$  de GmV, CeV e VuV com os tipos de ligação e tipos de aminoácidos que compõem o motivo CD de ligação à quitina.

<b>Tipos de ligações</b>	<b>GmV (1,80±0,20%)*</b>	<b>CeV (2,40±0,05%)*</b>	<b>VuV (6,30±0,75%)*</b>
<b>Hidrofílica</b>	ASN157	ASN150	ASN186
	ASN283	ALA154	ALA190
	ASN329	ALA300	
	ALA399	LYS298	
<b>Ponte-de-hidrogênio</b>	ASN157	ASN150	ASN186
	THR161		
	ASN329		
<b>Hidrofóbica C-C</b>	ASN157	ASN150	ASN186
	ILE158	PHE151	ILE187
	GLY260	ALA154	ALA190
	LEU262	GLY232	GLY194
	ASN329	LEU234	LEU196
	THR331	ALA300	
	ALA399	GLY362	
<b>Hidrofóbica polar</b>	ASN157	ASN150	ILE187
	ILE158	PHE151	ASN186
	THR161	ALA154	ALA190
	LEU262	GLY232	GLY194
	ASN283	LEU234	LEU196
	ASN329	ALA300	
	THR331	GLY362	
	ALA399		

\* - Dose percentual de vicilina que, quando adicionada à dieta, reduz a massa das larvas em 50%.

## 5. DISCUSSÃO

Quitina é um importante componente estrutural da parede celular de fungos e exoesqueletos de muitos invertebrados, tais como insetos e nematóides. A família de proteínas que se ligam à quitina é composta por um grande número de moléculas com atividades e origens diversas. Dentre as proteínas relacionadas à defesa e com afinidade a quitina encontram-se as lectinas GlcNac-específicas (WGA (aglutinina de gérmen de trigo), lectinas de urtiga e lectinas de solanáceas), peptídeos antimicrobiais de amaranto (Ac-AMP1 e Ac-AMP2); proteínas induzidas por injúrias e quitinases (Raikhel *et al.*, 1993). Todas estas proteínas possuem efeito antinutricional e tóxico para insetos, pois quando incorporadas em dietas artificiais inibiram o crescimento larval e a determinadas doses foram letais para os insetos. Uma das mais testadas destas proteínas foi a WGA que, adicionada a dieta na quantidade de 10 mg por grama, foi detrimental às larvas de *C. maculatus* (Czapla & Lang, 1991; Murdock *et al.*, 1990), além de produzir 50% de mortalidade em pragas do milho, *Ostrinia nubilalis* e *Diabrotica undecimpunctata* (Czapla & Lang, 1991). Até pouco tempo atrás, o modo de ação destas proteínas não era bem esclarecido, especulava-se que o efeito deletério ocorria pela interação destas proteínas com a quitina presente nas membranas peritróficas do intestino médio das larvas. Esta membrana que é composta por quitina e proteínas (Terra *et al.*, 1990), é uma barreira contra choques e abrasões de partículas de alimentos. A ligação das proteínas a estes componentes poderia alterar as propriedades físicas ou prevenir a formação da membrana (Raikhel *et al.*, 1993). As proteínas pertencentes a família de proteínas ligantes à quitina até então estudadas apresentam, estruturalmente, um domínio de 30-43 aminoácidos com várias cisteínas e glicinas em posições conservadas, denominado de motivo heveína. Este motivo, presente na proteína de látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*), a heveína, foi apresentado como o responsável pela especificidade da ligação à matriz de quitina e a vários glicoconjugados contendo GlcNac ou ácido *N*-acetil-*D*-neuramínico (NeuNac) na estrutura (Raikhel *et al.*, 1993).

Recentemente, uma outra classe de proteínas ligantes a quitina foi purificada de sementes de leguminosas. As proteínas de reserva do tipo vicilina de feijão de corda (*V. unguiculata*) apresentaram a propriedade de ligação a matriz de quitina e por ensaios *in vivo* foram deletérias para as larvas de *C. maculatus* (Macedo *et al.*, 1993; Sales *et al.*, 1996). Em seguida foi proposto que o efeito deletério da proteína foi devido à interação com a quitina presente em intestinos médios de larvas de *C. maculatus* (Sales *et al.*, 2001). Depois foi demonstrado por Mota *et al.*, em 2003, que as vicilinas de feijão de corda também foram deletérias para larvas de *Diatraea saccharalis*, uma praga da cana de açúcar. A propriedade de se ligar à quitina parece ser uma propriedade geral das vicilinas, pois Yunes e col. (1998), Moura e col. (2007, 2008) e Amorim e col. (2008), mostraram que vicilinas de sementes de leguminosas selvagens e cultivadas, tais como *G. max*, *C. ensiformis*, *Vigna angularis*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Erythrina velutina* foram detrimenais para larvas de *C. maculatus*, *Zabrotes subfasciatus* e *Plodia interpunctella*, importantes pragas de grãos armazenados.

As proteínas que se ligam à quitina até agora estudadas apresentam, estruturalmente, um domínio de 30-43 aminoácidos (HD) com várias cisteínas e glicinas em posições conservadas que não são encontradas nas vicilinas, as quais são pobres em cisteínas (Shutov *et al.*, 1995). Resultados deste trabalho mostraram que vicilinas ligantes à quitina analisadas aqui não possuem o domínio HD em suas seqüências aminoacídicas. Este fato descartou a possibilidade deste domínio ser o responsável pela ligação à quitina, indicando que outro domínio de ligação à quitina estaria envolvido na interação.

Um outro motivo de ligação à quitina foi analisado, este motivo denominado de R&R consenso (R&R) é encontrado em proteínas cuticulares de insetos (Rebers & Riddiford, 1988), as quais são responsáveis pela manutenção tanto de cutículas rígidas como de cutículas flexíveis em alguns insetos (Andersen *et al.*, 1995). O motivo R&R é composto pela seqüência aminoacídica: G-x(8)-G-x(6)-Y-x-A-x-E-x-G-Y-x(7)-P-x(2)-P ou a modificação G-x(7)-[DEN]-G-x(6)-[FY]-x-A-[DGN]-x(2,3)-G-[FY]-x-[AP]-x(6) (Willis, 1999) conferindo à estas proteínas a capacidade de ligação à matriz quitinosa. O domínio R&R, por possuir uma

possibilidade de modificações em sua sequência aminoacídica, poderia ser um bom candidato a esclarecer como vicilinas ligantes à quitina poderiam interagir com a matriz quitinosa (Rebers & Riddiford, 1988; Willis, 1999). Resultados obtidos neste trabalho mostraram que, através de alinhamentos feitos com as seqüências primárias das vicilinas de *C. ensiformis* e *V. unguiculata*, o motivo R&R pode ser localizado nas proteínas. Porém, quando foram construídos os modelos estruturais das vicilinas, pode-se observar que a estrutura secundária do motivo, em forma de meio-barril  $\beta$  a qual seria a região mais apropriada para o tipo de interação proteína-sacarídeo em proteínas cuticulares de insetos (Hamodrakas *et al.*, 2002), não se assemelhava às estruturas secundárias encontradas nas vicilinas, onde o motivo R&R ficou localizado em estruturas secundárias em forma de  $\alpha$ -hélice e alças. Também foi observado que as vicilinas mostraram um comportamento de ligação ao GlcNac onde principalmente resíduos polares neutros e apolares fizeram parte do domínio proposto no modelos de interação gerados por “docking”. Diferente do analisado por Vyas (1991), Hamodrakas e col. (1997), e Tews e col. (1997) onde resíduos de aminoácidos aromáticos foram essenciais em uma interação hidrofóbica proteína-sacarídeo e os anéis aromáticos destes resíduos se posicionaram contra a face dos anéis sacarídicos da quitina.

Maruyama e col. (2001) cocristalizaram a vicilina de soja denominada de conglícinina com GlcNac. Os resultados mostraram um motivo de ligação ao monossacarídeo que foi composto pelos seguintes aminoácidos: Asn157, Ile158, Thr161, Gly260, Leu262, Asn283, Asn329, Thr331 e Ala393. O domínio CD, encontrado na estrutura cristalográfica obtida por Muryama e col. (2001) e proposto neste trabalho, foi encontrado com um alto grau de conservação nas seqüências primárias das vicilinas de *C. ensiformis* e *V. unguiculata*, além disso, quando localizado nos modelos estruturais, este motivo teve sua localização bem semelhante ao encontrado no modelo estrutural da vicilina de *G. max*. Isso pode indicar que estas vicilinas, por possuírem um grau de conservação em suas estruturas (Argos *et al.*, 1985; Wright *et al.*, 1987, 1988; Gibbs *et al.*, 1989), possuem um domínio comum de ligação à matriz quitinosa. Esse domínio é um



forte candidato no esclarecimento de como estas proteínas interagem com a matriz quitinosa.

Por fim, quando foi analisado a possível relação entre o poder deletério das vicilinas expressadas pelos seus  $WD_{50}$  (Yunes *et al.*, 1998), quantidade de aminoácidos presentes e os tipos de ligações que eles podem exercer na interação do domínio CD e GlcNac nas vicilinas de *G. max*, *C. ensiformis* e *V. unguiculata* foi observado que eles estão diretamente associados ao poder deletério que estas possuem sobre larvas de *C. maculatus*. Isso pode indicar como estas proteínas interagem com a matriz quitinosa de insetos que possuem importância econômica e auxiliar no estudo do melhoramento de defesas de plantas.

Através dos métodos *in silico* utilizados neste estudo, foi possível dar o passo inicial na descoberta de como proteínas de reserva exercem um papel de defesa em sementes, e como este processo pode ocorrer *in vivo*.

## 6. CONCLUSÕES

O modelo estrutural da vicilina da semente de *V. unguiculata*, apresentou sua estrutura tridimensional confiável, após as validações.

Os alinhamentos mostram que o domínio heveína (HD) não está presente na seqüência primária de GmV, CeV e VuV; e que os domínios R&R consenso (R&R) e conglicinina (CD) estão presentes nas seqüências primárias de CeV e VuV com algumas alterações em suas seqüências aminoacídicas.

Com base nos modelos de interação feitos com as vicilinas de *C. ensiformis* e *V. unguiculata*, o domínio R&R, apesar de não ter semelhança em nível estrutural, pode ter uma participação indireta na atividade de ligação das proteínas à quitina, alterando a qualidade da ligação destas.

Os modelos de interação entre as vicilinas de *C. ensiformis* e *V. unguiculata* com GlcNac apresentaram o mesmo perfil de ligação presente no modelo estrutural da vicilina de *G. max*, indicando que esse domínio participa diretamente na interação destas com o carboidrato GlcNac.

A participação do domínio de ligação à quitina CD nas vicilinas de *C. ensiformis* e *V. unguiculata*, indica a presença de um padrão na ligação destas com quitina, o que pode ser um achado de como estas interagem na membrana peritrófica de alguns insetos de importância econômica.

No domínio CD presente em GmV, CeV e VuV, a quantidade de aminoácidos, números e tipos de ligação que estes podem exercer com GlcNac estão relacionados com o poder deletério ( $WD_{50}$ ) que estas vicilinas possuem para larvas de *C. maculatus*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, S. GROMIHA, M. M. & SARAI, A. – Analysis and Prediction of DNA-binding Proteins and their Binding Residues Based on Composition, Sequence and Structural Information. *Bioinformatics*, **20**: 477-486, 2004.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MEYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. - Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*. **215**: 403-410, 1990.
- AMORIM, T. M.; MACEDO, L. L.; UCHOA, A. F.; OLIVEIRA, A. S.; MACEDO, F. P.; SANTOS, E. A. & SALES, M. P. - Proteolytic Digestive Enzymes and Peritrophic Membranes During the Development of *Plodia interpunctella* (*Lepidoptera:Piralidae*): Targets for the Action of Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) and Chitin-binding Vicilin (EvV). *J. Agric. Food Chem.*, **56(17)**: 7738-7745, 2008.
- ARGOS, P.; NARAYANA, S. V. L. & NIELSEN, N. C. – Structural Similarity Between Legumin and Vicilin Storage Proteins from Legumes. *EMBO J.*, **4**: 1111-1117, 1985.
- ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; & SCHWEDE, T. - The SWISS-MODEL Workspace: A Web-based Environment for Protein Structure Homology Modelling. *Bioinformatics*. **22**: 195-201, 2006.
- BARBEHENN, R. V. & STANNARD, J. – Antioxidant Defense of the Midgut Epithelium by the Peritrophic Envelope in Caterpillars. *J. Insect Physiol.*, **50**: 783-790, 2004.

- BROEKAERT, W. F.; VAN PARIJS, J.; LEYNS, F.; JOOS, H. & PEUMANS, W. J. - A Chitin-binding Lectin from Stinging Nettle Rhizome with Antifungal Properties. *Science*, **245**: 1100-1102, 1989.
- CHEE, P. P.; JONES, J. M. & SLINGHTOM, J. L. – Expression of a Bean Storage Protein “Phaseoline Minigene” in Foreign Plants Tissues. *Gene*, **41**: 47-57, 1991.
- CZAPLA, T. H. & LANG, B. A. - Effect of Plant Lectins on the Larval Development of European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae) and Southern Corn Rootworm (Coleoptera:Crysomelidae). *J. Econ. Entomol.*, **83**: 2480-2485, 1990.
- DEANE, C. M. & BLUNDELL, T L. – Protein Comparative Modelling and Drug Discovery. In Wermuth, C. G. *The practice of Medicinal Chemistry*, London: Elsevier Academic Press, 2003.
- DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D. J. & BOUTLER, D. – Legumin and Vicilin, Storage Proteins of Legume Seeds. *Phytochemistry*, **15**: 3-24, 1976.
- DESHPANDE, S. S. & DAMODARAN, S. - Denaturation Behavior of Phaseolin in Urea, Guanidine Hydrochloride, and Sodium Dodecyl Sulfate Solutions. *J. Protein Chem.*, **10(1)**: 103-115, 1991.
- FARISELLI, P.; PAZOS, F.; VALENCIA, A. & CASADIO, R. – Prediction of Protein-protein Interaction Sites in Heterocomplexes with Neural Networks. *Eur. J. Biochem.*, **269**: 1356-1361, 2002.

- GIRAUD-GUILLE, M. M. & BOULIGAND Y. – Chitin-protein Molecular Organization in Arthropods. *In: Muzzarelli R., Jeuniaux C., Gooday G. W. (eds) Chitin in Nature and Technology*, New York: Plenum, 1986.
- GOMES, V. M.; MOSQUEDA, M. I.; BLANCO-LABRA, A.; SALES, M. P.; FERNANDES, K. V. S.; CORDEIRO, R. A. & XAVIER-FILHO, J. - Vicilin Storage Proteins from *Vigna unguiculata* (legume) Seeds Inhibit Fungal Growth. *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 4110-4115, 1997.
- GROSDIDIER, S. & FERNÁNDEZ-RECIO, J. – Identifications of Hot-spot Residues in Protein-protein Interactions by Computational Docking. *BMC Bioinformatics*, **9**: 447, 2008.
- GUEX, N. & PEITSCH, M. C. - SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An Environment for Comparative Protein Modelling. *Electrophoresis*. **18**: 2714-2723, 1997.
- GUEX, N.; DIEMAND, A. & PEITSCH, M. C. – Protein Modelling for All. *TiBS*, **24**: 364-367, 1999.
- GIBBS, P. E. M.; STRONGIN, B. B. & McPHERSON, A. – Evolution of Legume Seed Storage Proteins: A Domain Common to Legumins and Vicilins is Duplicated in Vicilins. *Mol. Biol. Evol.*, **6**: 614-623, 1989.
- HAMODRAKAS, S. J.; KANELLOPOULOS, P. N.; PAVLOU, K. & TUCKER, P. A. – The Crystal Structure of the Complex of Concanavalin A with 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside. *J. Struct. Biol.*, **118**: 23-30, 1997.
- HAMODRAKAS, S. J.; WILLIS, J. H. & ICONOMIDOU, V. A. – A Structural Model of the Chitin-binding Domain of Cuticle Proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **32**: 1577-1583, 2002.

- HIGGINS, T. J. V. – Synthesis and Regulation of Major Proteins in Seeds. *Annu. Review of Plant Physiol. And Plant Mol. Biol.*, **35**: 191-221, 1984.
- HILLERTON, J. E. & VINCENT, J. F. V. – Consideration of the Importance of Hydrophobic Interactions in Stabilising Insect Cuticle. *International Journal of Biological Macromolecules*, **5**: 163-166, 1983.
- HILLISCH, A.; PINEDA, L. F. & HILGENFELD, R. – Utility of Homology Models in the Drug Discovery Process. *Drug Discovery Today*, **09**: 659-669, 2004.
- HÖLTJE, H. D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D. & FOLKERS, G. – Introduction to Comparative Protein Modeling. *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*, Weinheim: Wiley-VHC, 2003.
- HOSKINS, J.; LOVELL, S. & BLUNDELL, T. L. – An Algorithm for Predicting Protein-protein Interaction Sites: Abnormally Exposed Amino Acid Residues and Secondary Structure Elements. *Protein Sci.*, **15**: 1017-1029, 2006.
- HUESING, J. E.; MURDOCK, I. L. & SHARE, R. E. - Rice and Stingin Nettle Lectin: Insecticidal Activity Similar to Wheat Germ Agglutinin. *Phytochemistry*, **30**: 3565-3568, 1991.
- IMAI, T.; WATANABE, T.; YUI, T. & SUGIYAMA, J. – The Directionality of Chitin Biosynthesis: a Revisit. *Biochem. J.*, **374**: 755-760, 2003.
- JONES, T. A. & KLEYWEGT, G. J. – CASP3 Comparative Modeling Evaluation. *Proteins*, **Suppl. 3**: 30-46, 1999.
- KARLSSON, K. A. – Meaning and Therapeutic Potential of Microbial Recognition of Host Glycoconjugates. *Mol. Microbiol.*, **29**: 1-11, 1998.

- KHAN, R. I.; GATEHOUSE, J. A. & BOULTER, D. – The Seed Proteins of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *J. Exp. Botany*, **31(125)**: 1599-1611, 1980.
- KOPP, J. & SCHWEDE, T. - The SWISS-MODEL Repository of Annotated Three-dimensional Protein Structure Homology Models. *Nucleic Acids Research*. **32**: 230-234, 2004.
- KRAMER, K. J. & KOGA, D. – Insect Chitin: Physical State, Synthesis, Degradation and Metabolic Regulation. *Insect Biochem.*, **16**: 851-877, 1986.
- LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; THORNTON, J. M. - PROCHECK: A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography*, **26**: 283-291, 1993.
- LEHANE, M. J. – Peritrophic Matrix Structure and Function. *Annu. Rev. Entomol.*, **42**: 525-550, 1997.
- LENGAUER, T. & RAREY, M. – Computational Methods for Biomolecular Docking. *Current Opinion in Structural Biology*, **6(3)**: 402-406, 1996.
- MACEDO, M. L. R.; ANDRADE, L. B. S.; MORAES, R. A. & XAVIER-FILHO, J. - Vicilin Variants and the Resistance of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Seeds to the Cowpea Weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **105C(1)**: 89-94, 1993.
- MACEDO, M. L. R.; FERNANDES, K. V. S.; SALES, M. P. & XAVIER-FILHO, J.- Purification and Properties of Storage Proteins (vicilins) from Cowpea (*Vigna unguiculata*) Seeds which are Susceptible or Resistant to the Vbruchid Beetle *Callosobruchus maculatus*. *Braz. Journal and Biol. Research*, **28**: 183-190, 1995.

- MACEDO, M. L. R.; SÁ, C. M.; FREIRE, M. G. M. & PARRA, J. R. P. - A Kunitz-type Inhibitor from *Adenantha pavonina* Seeds Active Against Coleopteran Pest Proteases and this Effect on the Development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae). *J. Agr. Food Chem.*, **52**: 2533-2540, 2004.
- MACEDO, L. L.; AMORIM, T. M.; UCHOA, A. F.; OLIVEIRA, A. S.; RIBEIRO, J. K.; MACEDO, F. P.; SANTOS, E. A. & SALES, M. P. - Larvicidal Effects of a Chitin-binding Vicilin from *Erythrina velutina* Seeds on the Mediterranean Fruit Fly *Ceratitidis capitata*. *J. Agric. Food Chem.*, **56(3)**: 802-808, 2008.
- MARUYAMA, N.; ADACHI, M.; TAJAHASHI, K.; YAGASAKI, K.; KOHNO, M.; TAKENAKA, Y.; OKUDA, E.; NAKAGAWA, S.; MIKAMI, B. & UTSUMI, S. - Crystal Structures of Recombinant and Native Soybean  $\beta$ -Conglycinin  $\beta$  Homotrimers. *Eur. J. Biochem.*, **268**: 3595-3604, 2001.
- McCAMMON, J. A. – Theory of Biomolecular Recognition. *Current Opinion in Structural Biology*, **8**: 245-249, 1998.
- MERZENDORFER, H. – Insect Chitin Synthases: a Review. *J. Comp. Physiol.*, **176**: 1-15, 2006.
- MICHIRO, M.; HISAYUKI, M. & KAZUAKI, H. – Chemically Prepared Hevein Domains: Effect of C-terminal Truncation and the Mutagenesis of Aromatic Residues on the Affinity for Chitin. *Protein Engineering*, **13(6)**: 385-389, 2000.
- MOTA, A. C.; DAMATTA, R. A.; LIMA, M.; SILVA, C. P. & XAVIER, J. – Cowpea (*Vigna unguiculata*) Vicilins Bind to the Peritrophic Membrane of Larval Sugarcane Stalk Borer (*Diatraea saccharalis*). *J. Insect Physiol.*, **49(9)**: 873-880, 2003.



- MURDOCK, L. L.; HUESING, J. E.; NIELSEN, S. S.; PRATT, R. C. & SHADE, K. E. - Biological Effects of Plant Lectins on the Cowpea Weevil. *Phytochem.*, **29**: 85-89, 1990.
- MURZIN, A. G. – Structure Classification-based Assessment of CAPS3 Predictions for the Fold Recognition Targets. *Proteins*, **Suppl. 3**: 88-103, 1999.
- NAYEEM, A.; SITKOFF, D. & JUNIOR, S. K. – A Comparative Study of Available Software of High Accuracy Homology Modeling: From Sequence Alignments to Structural Models. *Protein Science*, **15**: 808-824, 2006.
- NEUMANN, D.; KOHLBACHER, O.; LENHOF, H. P. & LEHR, C. M. – Lectin-sugar Interaction. Calculated versus Experimental Binding Energies. *Eur. Biochem.*, **269**: 1518-1524, 2002.
- OSBORNE, T.B. & CAMPBELL, G.F. - Legumin and Vicilin Storage Proteins of Legume Seeds. In *Derbyshire, E., Wright, D. J., Bouter, D. Phytochemistry*, 1976.
- PARK, H. & LEE, S. – Homology Modeling, Force Field Design, and Free Energy Simulation Studies to Optimize Activities of Histone Deacetylase Inhibitors. *Journal of Computer-aided Molecular Design*, **18**: 808-824, 2004.
- PETERS, W. – Peritrophic Membranes. In: *Bradshaw S. D., Burgren W., Heller H. C., Ishii S., Langer H., Neuweiler G., Randall D. J. (eds) Zoophysiology*, New York: Springer, 1992.
- PITTERMANN ET AL. – Applications of Chitin and Chitosan. In: *Muzzarelli R. A. A., Peter M. G. (eds) Chitin Handbook*, Italy: Atec Edizioni, 1997.

- RAIKHEL, N. V.; LEE, H. I. & BROEKAERT, W. F. - Structure and Function of Chitin-binding Proteins. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, **44**: 591-615, 1993.
- RAMACHANDRAN, G. N. & SASISEKHARAN, V. - Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. *Adv. Protein Chem.*, **23**: 283-437, 1968.
- REBERS, J. E. & RIDDIFORD, L. M. - Structure and Expression of a *Manduca sexta* Larval Cuticle Gene Homologous to *Drosophila* Cuticle Genes. *J. Mol. Bio.*, **203**: 411-423, 1988.
- RINAUDO, M. – Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Prog. Polym. Sci.*, **31**:603-632, 2006.
- RINI, J. M. – Lectin Structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **24**: 51-77, 1995.
- RUDALL, K. M. & KENCHINGTON, W. – The Chitin System. *Biol. Rev.*, **48**: 597-636, 1973.
- SALES, M. P.; GOMES, V. M.; FERNANDES, K. V. S. & XAVIER-FILHO, J. - Chitin Binding Proteins from Cowpea (*Vigna unguiculata*) Seeds. *Jour. Med. Biol. Res.*, **29**: 319–326, 1996.
- SALES, M. P.; PIMENTA, P. P.; PAES, N. S; GROSSI-DE-SÁ, M. F. & XAVIER-FILHO, J. - Vicilins (7S storage globulins) of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Seeds Bind to Chitinous Structures of the Midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae) Larvae. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **34**: 27-34, 2001.

- SAN SEGUNDO, B.; CORDERO, M. J. & RAVENTÓS, D. – Expression of a Maize Proteinase Inhibitor Gene is Induced in Response to Wounding and Fungal Infection: Systemic Wound-response of a Monocot Gene. *Plant J.*, **6(2)**: 141-150, 1994.
- SCHLESIER, B. – A Gel Eletrophoretic, Study on the Polypeptide Structure of Vicilins. *Kulturpflanze*, **32**: 223-225, 1984.
- SCHLUMBAUM , A.; MAUCH, F.; VOGELI, U. & BOLLER, T. - Plant Chitinases are Potent Inhibitors of Fungal Growth. *Nature*, **324**: 365-367, 1986.
- SCHWEDE, T.; KOPP, J.; GUEX, N. & PEITSCH, M. C. - SWISS-MODEL: An Automated Protein Homology-modeling Server. *Nucleic Acids Research*. **31**: 3381-3385, 2003.
- SHARON, N. & LIS, H. - Lectins as Cell Recognition Molecules. *Science*, **246**: 227-234, 1989.
- SHIONYU-MITSUYAMA, C.; SHIRAI, T.; ISHIDA, H. & YAMANE, T. – An Empirical Approach for Structure-based Prediction of Carbohydrate Binding Sites on Proteins. *Protein Eng.* **16**: 467-478, 2003.
- SHUTOV, A. D.; KARHOVSKAYA, I. A.; BRAUN, H.; BAÜMLEIN, H. & MÜNTZ, K. – Legumin-like and Vicilin-like Seed Storage Proteins: Evidence for a Common Single-domain Ancestral Gene. *J. Mol. Evol.*, **41**: 1057-1069, 1995.
- SILVA, V. B. & SILVA, C. H. T. P. – Modelagem Molecular de Proteínas-alvo por Homologia Estrutural. *Revista Eletrônica de Farmácia*, **IV(1)**: 15-26, 2007.

- STERNBERG, M. J. E.; GABB, H. A. & JACKSON, R. M. – Predictive Docking of Protein-protein and Protein-DNA Complexes. . *Current Opinion in Structural Biology*, **8**: 250-256, 1998.
- SUMATHI, K.; ANANTHALAKSHMI, P.; ROSHAN, M. N. & SEKAR, K. - 3dSS: 3D Structural Superposition. *Nucleic Acids Res.*, **34**: 128-132, 2006.
- SVENDSEN, I.; JACOBSEN S. & HEJGAARD, J. - Two Antifungal Thaumatin-like Proteins from Barley Grain. *FEBS*. **291**, 1991.
- TARONI, C.; JONES, S. & THORNTON, J. M. – Analysis and Prediction of Carbohydrate Binding Sites. *Protein Eng.*, **13**: 89-98, 2000.
- TERRA, W. R. - Evolution of digestive systems of insects. *Ann. Rev. Entomol.*, **35**: 181-200, 1990.
- TEWS, I.; SCHELTIGA, T.; PERRAKIS, A.; WILSON, K. S. & DIJKSTRA, B. W. – Substrate-assisted Catalysis Unifies 2 Families of Chitinolytic Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**: 7954-7959, 1997.
- THALER, J. S.; FIDANTSEF, A. L.; DUFFEY, S. S. & BOSTOCK, R. M. – Trade-offs in Plant Defense Against Pathogens and Herbivores: A Field Demonstration of Chemical Elicitors of Induced Resistance. *Journal of Chem. Ecology*, **25**: 15970-1609, 1999.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**: 4673-4680, 1994.

- TOVCHIGRECHKO, A. & VAKSER, I. A. – How Common is the Funnel-like Energy Landscape in Protein-protein Interactions? *Protein Science*, **10**: 1572-1583, 2001.
- TOVCHIGRECHKO, A.; WELLS, C. A. & VAKSER, I. A. – Docking of Protein Models. *Protein Science*, **11**: 1888-1896, 2002.
- VAJDA, S.; SIPLL, M. & NOVOTNY, J. – Empirical Potentials and Functions for Protein Folding and Binding. *Current Opinion in Structural Biology*, **7**: 222-228, 1997.
- VAKSER, I. A. & AFLALO, C. - Hydrophobic Docking: A Proposed Enhancement to Molecular Recognition Techniques. *Proteins*, **20**: 320-329, 1994.
- VAKSER, I. A. - Protein Docking for Low-resolution Structures. *Protein Eng.*, **8**: 371-377, 1995.
- VAKSER, I. A. - Low-resolution Docking: Prediction of Complexes for Underdetermined Structures. *Biopolymers*, **39**: 455-464, 1996.
- VAKSER, I. A. - Evaluation of GRAMM Low-resolution Docking Methodology on Hemagglutinin-antibody Complex. *Proteins*, **1**: 226-230, 1997.
- VAKSER, I. A.; MATAR, O. G. & LAM, C. F. - A Systematic Study of Low-resolution Recognition in Protein-protein Complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**: 8477-8482, 1999.
- VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W. F.; GOLDSTEIN, I. J. & PEUMANS, W. J. - Hevein: an Antifungal Protein from Rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) Latex. *Planta*, **183**: 258-64, 1991.

- VERMEULEN, C. A. & WESSELS, J. G. – Chitin Biosynthesis by a Fungal Membrane Preparation. Evidence for a Transient Non-crystalline State of Chitin. *Eur. J. Biochem.*, **158**: 411-415.
- VINCENT, J. F. V. & WEGST, U. G. K. – Design and Mechanical Properties of Insect Cuticle. *Arthropod Structure & Development*, **33**: 187-199, 2004.
- VYAS, N. K. – Atomic Features of Protein-carbohydrate Interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1**: 732-740, 1991.
- WILLIS, J. H. - Cuticular Proteins in Insects and Crustaceans. *Am. Zool.*, **39**: 600-609, 1999.
- WRIGHT, D. J. – The Seed Globulins. *In: Hudson B. J. F. (ed) Development in Food Proteins – 5*, London: Elsevier, 1987.
- WRIGHT, D. J. – The Seed Globulins. *In: Hudson B. J. F. (ed) Development in Food Proteins – 6*, London: Elsevier, 1988.
- XAVIER-FILHO, J. – Sementes e suas Defesas Contra Insetos. *Projeto Multinacional de Biotecnologia de Alimentos*, OEA, 1993.
- YAN, C.; TERRIBILINI, M.; WU, F.; JERNINGAN, R L.; DOBBS, D. & HONAVAR, V. – Predicting DNA-binding Sites of Proteins from Amino Acid Sequence. *BMC Bioinformatics*, **7**: 262, 2006.
- YUNES, A. A.; SALES, M. P.; ANDRADE, M. P.; MORAIS, R. A.; FERNANDES, K. V. S.; GOMES, V. M.; XAVIER-FILHO, J. & ANDRADE, M. T. – Legume Seeds Vicilins (7S Storage Proteins) Interfere with the Development of the Cowpea Weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Journal of Science of Food and Agriculture*. **76(1)**: 111-116, 1998.