



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

MARIANA BARROS DE CERQUEIRA E SILVA

**Avaliação de hidrolisados proteicos e peptídeos isolados da
 β -vignina do feijão-caupí (*Vigna unguiculata* L.) sobre atividade da HMG-
CoA redutase *in silico* e *in vitro***

SALVADOR
2017

MARIANA BARROS DE CERQUEIRA E SILVA

Avaliação de hidrolisados proteicos e peptídeos isolados da β -vignina do feijão-caupí (*Vigna unguiculata* L.) sobre atividade da HMG-CoA redutase *in silico* e *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito do para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Prof. Dr. Ederlan de Souza Ferreira
Orientador

SALVADOR
2017

Silva, Mariana Barros de Cerqueira
Avaliação de hidrolisados proteicos e peptídeos isolados da β -
vignina do feijão-caupí (*Vigna unguiculata* L.) sobre atividade
da HMG-CoA redutase in silico e in vitro / Mariana Barros de
Cerqueira Silva. -- Salvador, 2017.
85 f. : il

Orientador: Ederlan de Souza Ferreira.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em Ciência
de Alimentos) -- Universidade Federal da Bahia, Faculdade de
Farmácia, 2017.

1. Proteínas. 2. Peptídeos. 3. Hipercolesterolemia. 4. HMG-
CoA redutase. 5. in silico. I. Ferreira, Ederlan de Souza. II.
Título.

**“Avaliação de hidrolisados proteicos e peptídeos isolados da
β-vignina do feijão-caupí (*Vigna unguiculata* L.) sobre atividade da HMG-CoA
redutase *in silico* e *in vitro*”**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa de Dissertação de Mestrado da candidata **Mariana Barros de Cerqueira e Silva**, em sessão pública realizada em 05/08/2017.

Prof. Dr. Ederlan de Souza Ferreira (Orientador)

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli (Membro titular)

Prof. Dr. Humberto de Fonseca Freitas (Membro titular)

Profa. Dra. Maria P. Spinola Miranda (Membro suplente)

Prof. Dr. Marcelo Santos Castilho (Membro suplente)

*Aos meus pais, irmãos e amigos, pelo apoio,
amor e por fazer esta vida valer cada vez
mais a pena.*

*“No amor e na fé encontraremos as forças
necessárias para nossa missão”*

(Beata Dulce)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças para superar as dificuldades;

Aos meus pais por acreditarem em mim, me incentivarem e apoiarem incondicionalmente;

Aos meus irmãos e madrastra pelo incentivo e por trazer leveza aos meus dias, à minha irmã Adriana por viver a faculdade diariamente comigo, acreditar em mim e ser minha eterna parceira de laboratório;

Ao professor Ederlan de Souza Ferreira pela orientação, incentivo, confiança e pela oportunidade de aprender a cada dia algo novo;

Às professoras Mara Spínola e Francine Johansson pelo apoio e amizade durante toda a trajetória;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Brasil (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) por financiarem o presente estudo;

Ao LAPAAC, por fornecer subsídios para a execução do projeto;

Ao LAPESCA, LACRIMA, LABBIM, LASEBIO e seus colaboradores, pelo auxílio nas análises;

Aos professores Janice Druzian, Marcelo Castilho, Eduardo Maffud e demais docentes do PGAlí, pelo apoio acadêmico;

À família que o LAPAAC me proporcionou, por estarem comigo todos os dias, me ajudando, incentivando, tornando meus dias mais alegres e sendo parte essencial do trabalho e da vida, Biane Philadelpho, Caio Alexandre, Fabiana Pacheco, Fabiane Almeida, Mariana Novais, Natã Cruz e Priscila Anjos;

Aos amigos de todos os momentos pelo carinho incondicional, Paula Maiana, Lene Nascimento, Gabriela Ribeiro e Cíntia Matos;

Aos amigos do mestrado;

A todos que de alguma maneira contribuíram com este trabalho;

Muito obrigada.

RESUMO

Estudos recentes têm sugerido um efeito redutor do colesterol total, devido a ingestão da proteína de feijão-caupí. Peptídeos derivados da proteína do feijão parecem modular a atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGR). Assim, este estudo avaliou a ação de hidrolisados proteicos e de peptídeos derivados da proteína β -vignina isolada do feijão-caupí, sobre a atividade da HMG-CoA redutase, *in silico* e *in vitro*. Inicialmente, a β -vignina foi isolada, e posteriormente obtida através de processo cromatográfico. A proteína foi hidrolisada pela ação da pepsina e pancreatina. O hidrolisado total foi fracionado em peptídeos maiores do que 30 kDa, 30 a 10 kDa, 10 a 3 kDa e peptídeos menores do que 3 kDa. As análises *in silico* foram realizadas a partir da sequência primária da β -vignina (A8YQH5_VIGUN). Foram gerados 83 peptídeos pela ação das enzimas pepsina, tripsina e quimotripsina, sendo que 11 sequências apresentaram probabilidade (PRScore > 0,5) de exercer alguma atividade biológica. A análise de predição mostrou que 4 peptídeos apresentaram elevada probabilidade de interação (p-value < 0,100) com a região ativa da HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9). Posteriormente, a forma de interação da sequência QDF com a HMG-CoA foi determinada, utilizando o software AutoDock[®]. O peptídeo QDF foi sintetizado, e as diferentes frações foram avaliados quanto a capacidade inibitória sobre a HMG-CoA redutase *in vitro*. Os resultados demonstraram que as etapas de isolamento e de cromatografia foram eficazes para a obtenção da proteína com grau de pureza superior a 95%. A partir do screening *in silico* foi possível estabelecer que as sequências QGF, IAF, QDF e MPNY, apresentaram capacidade de interação com a região ativa da HMG-CoA redutase. A atividade da HMG-CoA redutase teve um decréscimo de 95%, na presença do extrato hidrolisado total e da fração constituída por peptídeos < 3 kDa (concentrações 500 μ g/proteína), *in vitro*. Além disso, o peptídeo QDF mostrou atuar como um potente inibidor da HMG-CoA redutase, com valor de IC₅₀ de 12,84 μ M, sendo dependente do efeito dose-resposta. Portanto, os resultados apresentados neste estudo, sugerem que efeito hipocolesterolêmico do feijão-caupí está relacionada à peptídeos derivados da proteína β -vignina que exercem uma ação inibitória sobre a HMG-CoA redutase, demonstrado a partir de evidências *in silico* e *in vitro*.

Palavras-chave: hipercolesterolemia, *Vigna unguiculata*, β -vignina, peptídeos, inibidor da HMGR.

ABSTRACT

Recent studies have suggested a cholesterol-lowering effect due to ingestion of cowpea protein. Peptide-derived protein peptides appear to modulate the activity of the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR). Protein derived peptides from bean appear to modulate the activity of the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR). Thus, this study assess the action of protein hydrolysates and peptides derived from β -vignin protein isolated from cowpea on the activity of HMG-CoA reductase, *in silico* and *in vitro*. Initially, the β -vignin was isolated, and later obtained through a chromatographic process. The protein was hydrolyzed by the action of pepsin and pancreatin. The total hydrolyzate was fractionated in peptides greater than 30 kDa, 30 to 10 kDa, 10 to 3 kDa and peptides smaller than 3 kDa. The *in silico* analyzes were performed from the β -vignin primary sequence (A8YQH5_VIGUN). Were generated 83 peptides by the action of the pepsin, trypsin and chymotrypsin enzymes, being that 11 sequences were likely to exert some biological activity (PRScore > 0.5). The prediction analysis showed that 4 peptides showed a high probability of interaction (p-value < 0.100) with the active region of HMG-CoA reductase (PDB ID: 1HW9). Subsequently, the interaction form of the QDF sequence with HMG-CoA was determined using AutoDock[®] software. The QDF peptide was synthesized, and the different peptides fractions were evaluated for inhibitory capacity over HMG-CoA reductase *in vitro*. The results demonstrated that the isolation and chromatography steps were effective to obtain the protein with a purity of more than 95%. From the screening *in silico*, it was possible to establish that the QGF, IAF, QDF and MPNY sequences, showed ability to interact with the active region of HMG-CoA reductase. The activity of HMG-CoA reductase decreased by 95%, in the presence of the total hydrolyzed extract and the fraction of peptides < 3 kDa (concentrations 500 μ g/protein) *in vitro*. In addition, the QDF peptide showed to act as a potent inhibitor of HMG-CoA reductase, with an IC₅₀ value of 12.84 μ M, being dose-response dependent. Therefore, the results presented in this study suggest that hypocholesterolemic effect of cowpea is related to peptides derived from the β -vignin protein that exert an inhibitory action on HMG-CoA reductase, demonstrated from *in silico* and *in vitro* evidence.

Keywords: hypercholesterolemia, *Vigna unguiculata*, β -vignin, peptides, HMGR inhibitor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I	– Avaliação de hidrolisados proteicos e/ou peptídeos isolados da β -vignina do feijão-caupí (<i>Vigna unguiculata</i> L.) sobre atividade da HMG-CoA redutase <i>in vitro</i>	17
Figura 1.1	– Estrutura química do colesterol.....	23
Figura 1.2	– Etapas da biossíntese do colesterol.....	25
Figura 1.3	– Estrutura em fitas da HMGR humana.....	28
Figura 1.4	– Estrutura da HMG-CoA e da forma ácida da mevastatina.....	29
Figura 1.5	– Fórmulas estruturais das estatinas e do substrato HMG-CoA.	30
Capítulo II	– Manuscrito: Peptídeo (QDF) derivado da β -vignina do feijão-caupí modula a síntese do colesterol através da inibição da HMG-CoA redutase.....	48
Figura 2.1	– Cromatografia de filtração em gel de β -vignina (A) e perfis de pico re-cromatografados (B).....	74
Figura 2.2	– Perfil SDS-PAGE sob condições redutoras de β -vignina (A) de caupi e análise densitométrica (B).....	75
Figura 2.3	– Cromatografia FR-CLAE da fração peptídica menor do que 3 kDa (A) e extrato hidrolisado total (B).....	76
Figura 2.4	– Alinhamento das sequências de β -vignina do feijão-caupí.....	77
Figura 2.5	– Faixa de massa molecular/número absoluto de peptídeos derivados de proteína β -vignina de feijão de caupí, hidrolisado <i>in vitro</i>	81
Figura 2.6	– Análise de docking da sinvastatina e do peptídeo QDF com o complexo catalítico de HMG-CoA redutase.....	83
Figura 2.7	– O cromatograma FR-CLAE do peptídeo QDF sintetizado. Perfil cromatográfico antes do passo de purificação (A), após o passo de purificação (B) e espectro de massa do peptídeo..	84
Figura 2.8	– Curva de dose-resposta do efeito inibitório do peptídeo QDF oriundo da β -vignina do feijão caupí sob a HMGR.....	86

LISTA DE TABELAS

Capítulo II	– Manuscrito: Peptídeo (QDF) derivado da β -vignina do feijão-caupí modula a síntese do colesterol através da inibição da HMG-CoA redutase.....	48
Tabela 2.1	– Triagem <i>in silico</i> de peptídeos derivados de beta-vignina de caupí hidrolisado com pepsina, tripsina e quimotripsina.....	78
Tabela 2.2	– Peptídeos selecionados para prever a probabilidade de interação com o complexo catalítico de HMG-CoA redutase das estatinas.....	82
Tabela 3.3	– Inibição da atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGCoAR).....	85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS E/OU PEPTÍDEOS ISOLADOS DA VIGNINA DO FEIJÃO-CAUPÍ SOBRE ATIVIDADE DA HMG-CoA REDUTASE.....	
3 FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA	18
3.1 Doenças cardiovasculares	18
3.2 Hipercolesterolemia	20
3.3 Síntese do Colesterol.....	22
3.4 HMG-CoA redutase e o Tratamento Farmacológico.....	26
3.5 Sementes de Leguminosas	31
3.6 Feijão-caupí (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp).....	33
3.7 Proteínas das leguminosas X Dislipidemia.....	36
4 BIBLIOGRAFIA CITADA	40
CAPÍTULO II - <i>MANUSCRITO</i> : PEPTÍDEO (QDF) DERIVADO DA B-VIGNINA DO FEIJÃO-CAUPÍ MODULA A SÍNTESE DO COLESTEROL ATRAVÉS DA INIBIÇÃO DA HMG-CoA REDUTASE	
1 INTRODUÇÃO	51
2 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 MATERIAL BOTÂNICO E REAGENTES QUÍMICOS	55
2.2 ISOLAMENTO E CROMATOGRAFIA POR GEL FILTRAÇÃO DA B-VIGNINA	55
2.3 ELETROFORESE POR SDS-PAGE DA B-VIGNINA.....	55
2.4 SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO GASTROINTESTINAL E FRACIONAMENTO	56
2.5 PERFIL PEPTÍDICO POR RP-CLAE	56
2.6 SCREENING DE PEPTÍDEOS INIBIDORES DA HMG-CoA REDUTASE IN SILICO.....	57
2.7 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO QDF	58
2.8 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA HMG-CoA REDUTASE IN VITRO	59
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4 CONCLUSÃO	69
REFERENCES.....	70

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são consideradas problema de saúde pública devido à alta taxa de mortalidade e danos patológicos associados às mesmas (MARQUES et al., 2015). Estudos evidenciam a existência de uma relação entre o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e a elevada concentração de colesterol no sangue e sugerem a redução dos níveis plasmáticos de colesterol total e LDL-C para controle do risco do desenvolvimento da enfermidade (CTT, 2010; IAS, 2013). A enzima 3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) é a principal reguladora da biossíntese do colesterol endógeno (PAK et al., 2012) sendo portanto, alvo de vários fármacos inibidores com objetivo hipocolesterolêmico.

A alimentação é um dos principais fatores determinantes da saúde humana. Sempre existiu, dentro da sociedade, a preocupação em prevenir e/ou retardar o aparecimento de doenças a partir da dieta. Os alimentos de origem vegetal, tais como frutos e vegetais, têm importante contribuição na nutrição humana como fonte de nutrientes e de componentes biologicamente ativos que apresentam efeitos benéficos à saúde (OMS, 2003). Dietas à base de vegetais e grãos, como fator de prevenção de diversas doenças crônico-degenerativas, especialmente as doenças cardiovasculares, foram sugeridas por estudos epidemiológicos (BOUCHENAK e LAMRI-SENHADJI, 2013). Dentre os alimentos de origem vegetal, as leguminosas se destacam como fontes de proteínas, carboidratos, fibras, minerais e vitaminas. Os grãos de leguminosas são amplamente reconhecidos como importantes fontes de proteína da alimentação humana. Isto ocorre devido à elevada quantidade encontrada no cotilédone, em parte, por apresentarem característica de acumularem proteína durante o seu desenvolvimento, como resultado da necessidade de realização de suas funções catalíticas, estruturais e reserva (CARBONARO, 2000).

Muitos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos a partir da ingestão dos grãos de leguminosas, especialmente relacionados ao controle dos processos de hipercolesterolemia, exercido pela soja (FERREIRA et al., 2010; SINGH et al., 2014), amaranto (MENDONÇA et al., 2009), tremoço-azul (PAROLINI et al., 2012; FONTANARI et al., 2012) e feijão-fava (MACARULLA et al., 2001). Estudos em humanos e em animais reportaram que a ingestão da proteína de soja reduz a concentração sérica do colesterol total e do triacilglicerídeo (WILSON et al., 2007). Desde 1999, o FDA passou a recomendar a ingestão de 25 g/dia de proteína isolada de soja visando à redução do risco de DCV (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1999).

O feijão-caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) apresenta quantidade de proteína que variam entre 18-30% da sua constituição química. A fração proteica dessa semente é constituída por duas classes principais, as globulinas (70-85%) e albuminas (5-10%), quando somadas constituem praticamente 90% de todo conteúdo proteico. As globulinas, fração proteica solúvel em soluções salinas, são consideradas as proteínas majoritárias nessa espécie, sendo a proteína do tipo vicilina ou 7S a principal, em termos quantitativos. Esta proteína denominada de β -vignina, constitui-se de um heterotrímero formado por duas subunidades polipeptídica principais de 60 e 55 kDa glicosiladas, e outras menores não glicosiladas, e apresenta similaridade estrutural (sequência primária) com outras vicilinas, especialmente a subunidade α ' da β -conglícinina da soja (ALUKO et al. 2008).

Recentemente, alguns estudos demonstraram que a proteína do caupí foi capaz de promover a redução significativa da concentração de colesterol total sérico em ratos alimentados com uma dieta enriquecida com colesterol e gordura saturada, comparado ao grupo controle (FERREIRA et al., 2015). Diversos peptídeos derivados

de alimentos tem sido considerado biologicamente ativos, podendo exercer além de funções nutricionais, atividade fisiológica. Dentre as diversas propriedades biológicas observadas, peptídeos bioativos podem apresentar ação hipocolesterolêmica, de ligação mineral, imunomoduladores, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombóticos e anti-hipertensivos (ERDMANN et al., 2008).

Vários estudos têm demonstrado o efeito hipocolesterolêmico exercida pela fração proteica de leguminosas, sobretudo relacionada às proteínas da soja (LIU et al. 2017; TACHIBANA et al. 2014), no entanto, os determinantes e os mecanismos pelos quais essas proteínas exercem estes efeitos ainda não são completamente elucidados. Alguns autores têm atribuído esta ação aos peptídeos, derivados da proteína de leguminosas (PAK et al. 2012; MARTINEZ-VILLALUENGA et al. 2010). Marques e colaboradores (2015) demonstraram que peptídeos gerados da hidrólise enzimática do isolado proteico do feijão-caupí foram capazes de inibir a atividade da HMG-CoA redutase, enzima chave da síntese de colesterol. Além disso, estudos anteriores, realizados com a glicinina (11S) da soja, já atribuíam a peptídeos gerados da proteína, a capacidade de inibição da HMG-CoA redutase (PAK et al. 2005, 2004).

Portanto, a presente pesquisa avaliou a capacidade inibitória de diferentes frações peptídicas *in vitro* e analisou a predição de interação dos peptídeos derivados da estrutura primária da β -vignina, à HMG-CoA redutase, *in silico* e, posteriormente, verificou a capacidade inibitória de peptídeos oriundos da proteína β -vignina, sobre a atividade da enzima, *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação de frações de hidrolisados proteicos e peptídeos oriundos da β -vignina do feijão-caupí (*Vigna unguiculata* L, Walp.) sob a atividade da HMG-CoA redutase *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair, isolar, purificar e caracterizar a proteína β -vignina (7S) a partir do feijão-caupí;
- Hidrolisar a β -vignina a partir da ação sequencial das enzimas pepsina-pancreatina (simulação gastrointestinal) *in vitro*;
- Fracionar o hidrolisado em frações de diferentes massas moleculares;
- Caracterizar o hidrolisado total e frações, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Realizar análise *in silico* da sequência primária da globulina β -vignina (7S) do feijão-caupí;
- Efetuar acoplamento dos peptídeos promissores no sítio ativo da enzima HMG-CoA redutase *in silico*;
- Sintetizar o peptídeo oriundo da β -vignina do feijão-caupí com probabilidade, verificada através da triagem *in silico*, de exercer inibição da HMG-CoA redutase;
- Verificar ação dos hidrolisados fracionados e do peptídeo sobre a atividade da enzima HMG-CoA redutase *in vitro*.

Capítulo I

*Avaliação de hidrolisados proteicos e/ou peptídeos isolados da β -vignina do feijão-caupí (*Vigna unguiculata* L.) sobre atividade da HMG-CoA redutase in silico e in vitro*

3 FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

3.1 Doenças cardiovasculares

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que nos países desenvolvidos e alguns em desenvolvimento, as doenças crônicas não-transmissíveis representam a principal causa de morte. Países como Alemanha, Croácia, Finlândia e República Checa têm apresentado índices de prevalência entre 40-50%. Em 2008, foram registrados mais de 36 milhões de mortes em decorrência das doenças crônicas não-transmissíveis no mundo. Deste número, entre os principais agravos relacionados a essas enfermidades, encontram-se as doenças cardiovasculares (48%), cânceres (21%), doenças respiratórias crônicas (12%) e diabetes (3%). As doenças cardiovasculares têm representado a principal causa de morte no mundo há pelo menos duas décadas (OMS, 2011). Levantamentos mais recentes têm indicado um decréscimo insipiente do número de mortes em decorrência das doenças cardiovasculares em termos mundiais, nos últimos anos. Além disso, as projeções indicam que o número de mortes devido as doenças cardiovasculares passará de 17 milhões (2008) para 25 milhões até 2030 (AHA, 2013).

As estatísticas brasileiras, para as mortes provocadas pelas doenças cardiovasculares têm acompanhado a tendência mundial. Nos últimos anos, as DCV foram responsáveis por aproximadamente 30% de todas as mortes registradas no País. Isto significa que em torno de 310 mil pessoas morreram em virtude da doença. Recentemente, um estudo epidemiológico com base na análise de dados brasileiros (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE) demonstrou que no Brasil, as doenças cardiovasculares ainda são consideradas a primeira causa de mortalidade da população, sendo responsável por mais de 20% dos óbitos na população com mais de 30 anos de idade (MANSUR et. al. 2016).

A Organização Mundial da Saúde tem alertado sobre os principais aspectos relacionados ao aparecimento e a progressão acelerada das doenças cardiovasculares. Os fatores relacionados à dieta, sedentarismo e uso de tabaco, juntos são responsáveis por cerca de 80% dos episódios das doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, especialmente por conta da aterosclerose (OMS, 2011). A etiologia da aterosclerose tem sido descrita como um processo lento e passivo de deposição de gordura na parede dos vasos sanguíneos, com início desde a infância. Evidentemente, que o processo não se resume ao acúmulo de lipídeos nas artérias (NAHRENDORF e SWIRSKI, 2013).

A aterosclerose é caracterizada por lesões de placas de ateroma, decorrentes principalmente do acúmulo de colesterol nas paredes dos vasos sanguíneos (SILVA, 2012). Na verdade, acredita-se que o seu estabelecimento está relacionado à consequência de um processo de inflamação crônica complexa, que se inicia de uma desordem do metabolismo lipídico, especificamente da lipoproteína de baixa densidade (LDL). No entanto, também envolve fatores como idade, estilo de vida, genético, imunológico, endócrino, circulatório e do sistema nervoso (NAHRENDORF e SWIRSKI, 2013).

O aumento dos níveis plasmáticos de colesterol total e da LDL (Lipoproteína de baixa densidade), acompanhando ou não da diminuição da HDL (Lipoproteína de alta densidade) caracterizam o processo de dislipidemias que constituem os principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, especialmente pelo aparecimento da aterosclerose (DURO et al., 2008). Estudos realizados nas últimas décadas têm atribuído aos eventos dislipidêmicos, como principal característica para aparecimento e desenvolvimento da aterosclerose, e conseqüentemente das doenças cardiovasculares, tais como infarto do miocárdio,

acidente vascular cerebral, arritmias cardíacas, isquêmicas ou anginas (OHSAWA e TANNO, 2013; BLOOM et al., 2011; TAVRIDOU e MANOLOPOULOS, 2008).

A Sociedade Brasileira de Cardiologia, em suas diretrizes classifica as dislipidemias em quatro tipos básicos, a hipercolesterolemia isolada, quando existe um aumento nos níveis de LDL (≥ 160 mg/dl); a hipertrigliceridemia isolada, onde existe aumento dos níveis de triglicérides (≥ 150 mg/dl) e das partículas ricas deste lipídeo como o VLDL; IDL e quilomícrons, hiperlipidemia mista com altas taxas de triglicérides e LDL (aumento do LDL, ≥ 160 mg/dl e dos TG, ≥ 150 mg/dl); e a diminuição do HDL, caracterizada por um baixo teor de HDL (homens < 40 mg/dl e mulheres < 50 mg/dl) que pode estar associado ou não a um aumento dos níveis plasmáticos de LDL (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013).

O *National Cholesterol Education Program* (NCEP) reconheceu em seu relatório a hipercolesterolemia como pré-requisito para a aterosclerose, tendo como objetivo a redução da LDL para a diminuição dos riscos de eventos cardiovasculares (NCEP, 2011). Assim como a *International Atherosclerosis Society* (IAS) recomenda o tratamento de altos níveis de colesterol plasmático para a redução dos riscos de doenças cardiovasculares ateroscleróticas (IAS, 2013).

3.2 Hipercolesterolemia

A hipercolesterolemia é caracterizada pelo aumento dos níveis séricos de colesterol total e de LDL. Embora o colesterol seja um lipídeo biologicamente importante para o organismo, precursor de hormônios esteroidais, ácidos biliares e da vitamina D, além de constituinte das membranas celulares atuando na fluidez e ativação de determinadas enzimas, quando em altos níveis torna-se fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares (COLEMAN e BELL,

1976). As lipoproteínas são estruturas que permitem que os lipídeos sejam solubilizados e transportados através da corrente sanguínea. Diversas lipoproteínas foram identificadas no plasma e classificadas de acordo com a sua densidade em lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de densidade intermediária, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e quilomícrons, que são ricas em triglicerídeos (OLOFSON, WIKLUND e BÓREN, 2007). O desenvolvimento da aterosclerose está relacionado principalmente a concentração da LDL, do que com a concentração de colesterol total. Por outro lado, têm sido evidente que quanto mais elevado os níveis séricos de HDL, há um decréscimo desse risco.

Estudos demonstraram que existe alta prevalência de hipercolesterolemia em pacientes com doenças cardiovasculares, em torno de 80 a 88%, quando comparado ao grupo controle (40-48%), sem doenças cardiovasculares (GENEST, et. al., 1992). Resultados de ensaios clínicos sugerem que o decréscimo de 1 mmol/L (38,61 mg/dl) na concentração do nível de LDL, pode significar uma redução de aproximadamente 20% da mortalidade por eventos cardiovasculares (CTT, 2012). Etiologicamente, a hipercolesterolemia pode ser classificada como primária, ocasionada por fatores genéticos, ou secundária, decorrente de doenças ou medicamentos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

A principal causa dessa dislipidemia são as múltiplas variações genéticas relacionada com o aumento de lipoproteínas específicas no plasma sanguíneo (TIWARI e KHOKHAR, 2014). Fatores como envelhecimento e menopausa também são associados ao aumento dos níveis de colesterol na corrente sanguínea. Além disso, enfermidades no fígado, principal órgão de formação e eliminação das lipoproteínas, implicam em modificações nas concentrações plasmáticas dessas

partículas (EATON, 2005). As doenças mais associadas à hipercolesterolemia são a obesidade, diabetes mellitus tipo 2, hipotireoidismo, insuficiência renal, síndrome nefrótica e Aids (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007). Determinados medicamentos também podem produzir alterações do perfil lipídico, dentre os quais, diuréticos tiazídicos, estrogênios orais, glicocorticóides, esteróides anabolizantes, antipsicóticos atípicos e antiretrovirais são alguns exemplos (TIWARE e KHOKHAR, 2014).

3.3 Síntese do Colesterol

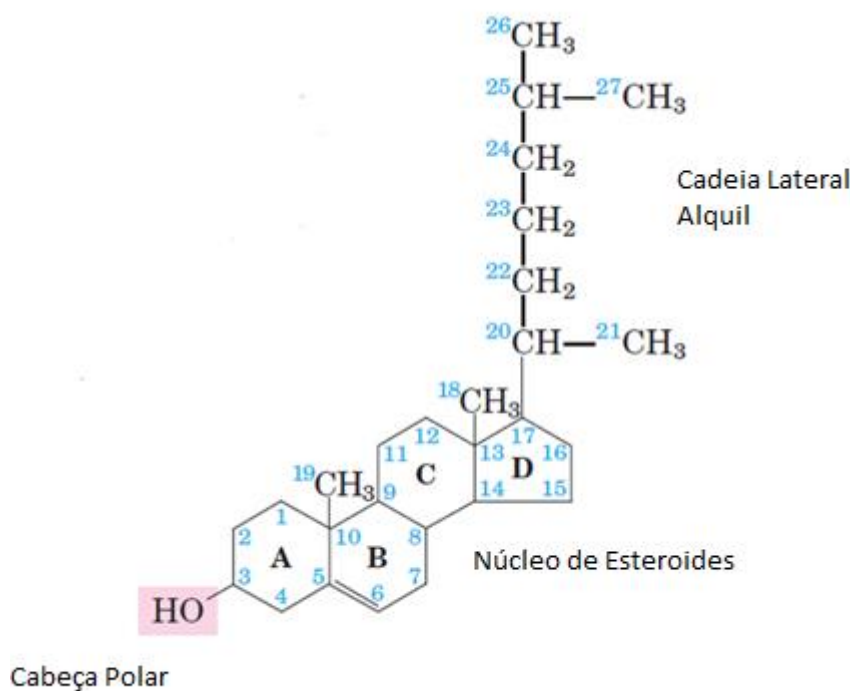
O colesterol é uma molécula hidrofóbica, constituída de 27 carbonos provenientes de uma molécula de acetil-CoA e apresenta em sua estrutura um grupo hidroxila em C3 polar, e quatro anéis do núcleo de esteroides e cadeia alifática lateral ligada em C-17 apolar, caracterizando uma estrutura anfipática (Figura 1.1). É encontrado no organismo sob a forma livre ou ligados a ácidos graxos como ésteres de colesterol (NELSON e COX, 2004).

As moléculas de colesterol são importantes constituintes das células animais, portanto a sua síntese é essencial para a vida. Entretanto, como demonstrado em diversos estudos, a produção em excesso pode acarretar em riscos de diversas enfermidades, fato que torna necessário um mecanismo de regulação da síntese do lipídeo. As vias endógenas, de produção e exógenas, de obtenção dos lipídeos são bem descritas na literatura (YE e DEBOSE-BOYD, 2011).

Os lipídeos, assim como outros nutrientes essenciais, são obtidos através da dieta. O processo de digestão tem início com a emulsificação da gordura, a partir dos sais biliares no intestino delgado. O processo digestivo, denominado lipólise é efetuado por enzimas, a lipase pancreática, responsável pela hidrólise dos

triacilgliceróis e as fosfolipases A₂ que catalisam a hidrólise dos fosfolipídios. Os produtos originados dessas quebras são absorvidos no lúmen intestinal (GREEVENBROEK e VAN, 1998), com o auxílio da proteína NPC1-L1 (Niemann-Pick C1-like 1) transportadora de colesterol, que está situada na membrana das células intestinais. Após a absorção pelos enterócitos, os ácidos graxos livres e os monoacilgliceróis, ainda no interior das células, são esterificados em triacilgliceróis. As moléculas de colesterol, os triacilgliceróis e a apolipoproteína (apo) B-48, por serem hidrofóbicos, necessitam de um complexo com moléculas anfipáticas, os quilomícrons, com o objetivo de transportar as partículas para diferentes tecidos do organismo (SANT'ANA, 2004).

Figura 1.1 – Estrutura química do colesterol. Anéis derivados do núcleo de esteroides rotulados de A a D e átomos de carbono numerados em azul. O grupo hidroxila C-3 (rosa) corresponde à cabeça polar da estrutura.



Fonte: Nelson e Cox, 2004.

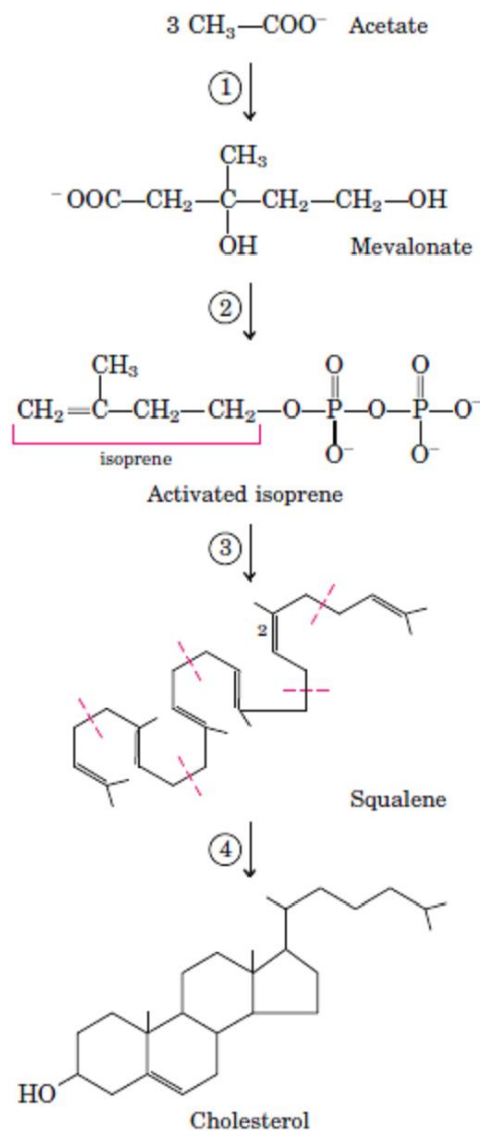
Os quilomícrons apresentam em sua superfície as apolipoproteínas A-I, A-II e A-IV que funcionam como receptores de membrana. Essas partículas são secretadas no sistema linfático e alcançam a circulação sanguínea, onde recebem a partir da HDL as apolipoproteínas C-II e E que lhes confere a capacidade de ativar a lipoproteína lipase com função de quebrar as moléculas de triacilgliceróis aderidos na superfície do endotélio e tecido adiposo. As partículas de quilomícron são reduzidas pela HDL, que recebe parte dos fosfolípidios superficiais, colesterol livre e apo-C, até o estado de quilomícron remanescente, ricos em colesterol, que são captados pelas células hepáticas e hidrolisados nos lisossomos, liberando colesterol, glicerol e ácidos graxos que serão utilizados para produção de energia ou armazenados no organismo. Remanescentes de quilomícrons e ácidos graxos, são utilizados na formação de VLDL (DEBOSE-BOYD, 2008).

A via biossintética endógena de produção do colesterol se inicia a partir da acetil-coenzima A no interior de células nucleadas, especialmente em células hepáticas e intestinais, em quatro grandes etapas representadas na Figura 1.2. O início da síntese se dá pela condensação de três moléculas acetil-CoA em mevalonato, que é convertido a unidades isoprenóides ativadas, em seguida 5 moléculas isoprenóides ativadas são condensadas para formação do esqualeno, que na última etapa sofre ciclização dando origem aos anéis do núcleo esteroidal, que após uma série de reações dará origem ao colesterol (NELSON e COX, 2004).

Na primeira etapa da síntese do colesterol, duas moléculas de acetil-coenzima A são condensadas, com auxílio da enzima tiolase, para formação do acetoacetil-CoA que após condensar com a terceira molécula da acetil-CoA da origem ao composto β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA), pela ação da enzima HMG-CoA sintetase. Em seguida duas moléculas de NADPH doam dois elétrons para a reação onde a HMG-

CoA é reduzida a mevalonato, reação catalisada pela HMG-CoA-redutase, considerada a enzima chave para regulação da biossíntese do colesterol (NELSON e COX, 2004). Na etapa posterior, o mevalonato irá se transformar no 5-fosfomevalonato, pela enzima mevalonato-5-fosfotransferase, a molécula será convertida a 5-pirofosfomevalonato e depois a 3-fosfo-5-fosfomevalonato pelas enzimas fosfomevalonato-cinase e pirofosfo-mevalonato-decarboxilase, respectivamente, e então a isopentenil-pirofosfato e dimetilalil-pirofosfato, os isoprenóides (DO, KISS, GAUDET e ENGERT, 2009).

Figura 1.2 – Etapas da biossíntese do colesterol.



Fonte: Nelson e Cox, 2004.

Na terceira fase da síntese os metabólitos isopentenil-pirofosfato e dimetilalil-pirofosfato são condensados a geranyl-pirofosfato, que é condensado com outra molécula de isopentenil-pirofosfato, ambas as reações catalisadas pela fenil-transferase, dando origem ao farnesil-pirofosfato, que por fim ocorre a ligação entre duas dessas estruturas, dando origem ao esqualeno (NELSON e COX, 2004).

Olivier et al. (2000) demonstraram que todas as reações entre o mevalonato até farnesil-pirofosfato ocorrem predominantemente nos peroxissomos celulares. Finalmente na última fase pela atividade da enzima denominada esqualeno-monooxigenase, o esqualeno é convertido a 2,3-epoxi esqualeno, que sofre ciclização, resultando no lanesterol, que após cerca de 20 reações transforma-se no colesterol.

3.4 HMG-CoA redutase e o Tratamento Farmacológico

A enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (EC 1.1.1.34), participa da via endógena da síntese do colesterol, convertendo HMG-CoA em mevalonato, sendo considerada uma enzima fundamental da biossíntese. Uma proteína integral de membrana do retículo endoplasmático liso, apresenta-se na forma de um tetrâmero, onde seus monômeros se organizam em dois dímeros. Cada dímero possui dois sítios ativos (ISTVAN et. al., 2000). O grupo hidroximetilglutarílico (HMG) do substrato HMG-CoA posiciona-se na interface destes monômeros, onde ocorrem as reações de redução.

Istvan e Deisenhofer (2000) afirmam que a cadeia polipeptídica é formada por 888 resíduos de aminoácidos, sendo que os resíduos aminoterminais dos aminoácidos 1-339 são ligados à membrana do retículo endoplasmático livre. Existe uma região de ligação, dos resíduos dos aminoácidos 340-459 que une a porção

ligada a membrana à região C-terminal citoplasmática, os resíduos de aminoácidos 460-888, que possui atividade catalítica. Na figura 1.3, está representada a estrutura cristalográfica da enzima HMG-CoA redutase.

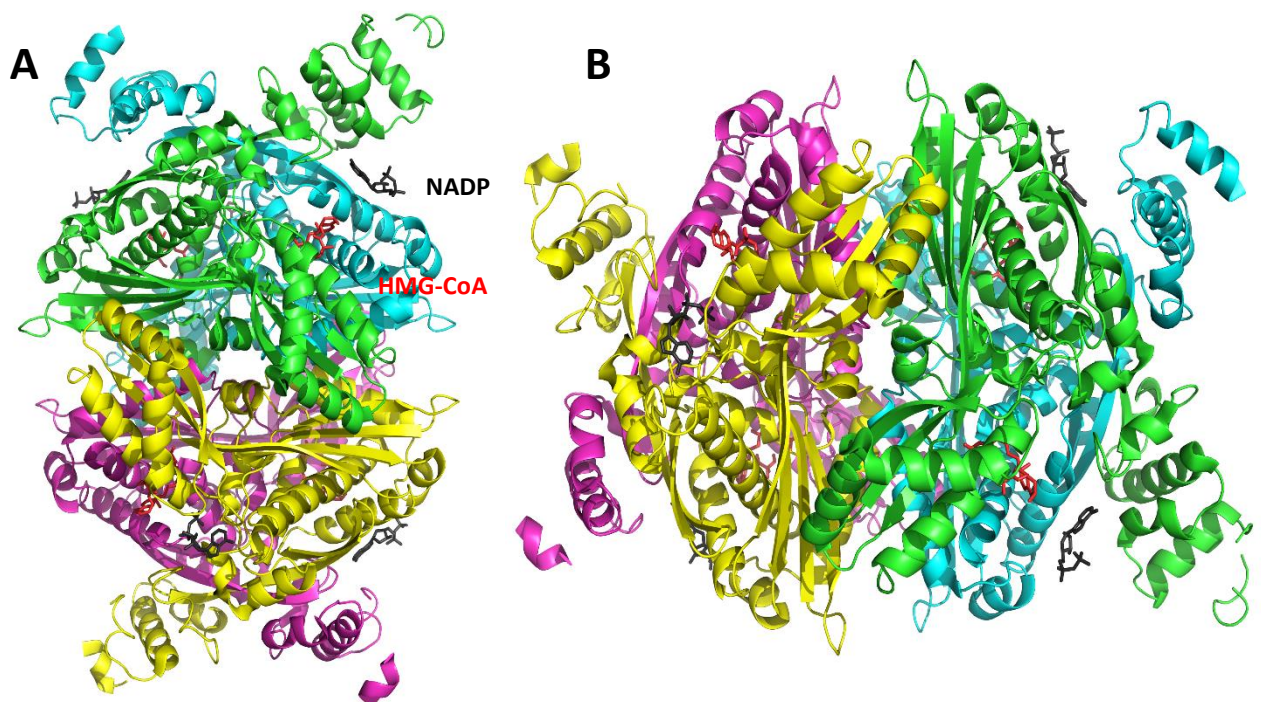
As dislipidemias são consideradas fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose e conseqüentemente doenças cardiovasculares. Diversas associações sugerem o tratamento das desordens lipídicas como primordial para redução do risco de eventos cardiovasculares (NCEP, 2011; IAS, 2013; CCS, 2013). As recomendações envolvem mudanças no estilo de vida e nos hábitos alimentares, podendo estar associadas ou não ao uso de fármacos.

No fim da década de 80, em seu primeiro painel o *National Cholesterol Education Program* recomendou para o tratamento farmacológico da hipercolesterolemia o uso de ácido nicotínico e dos sequestradores de ácidos biliares. A eficácia das estatinas ainda não tinha sido suficientemente determinada, sendo recomendada portanto, como terceira opção (NCEP, 1988). As estatinas foram consideradas primeira opção de escolha a partir da década de 90 permanecendo assim até os dias atuais, com recomendação de terapia única ou combinada com outros fármacos que alterem o metabolismo de lipídeos, a depender do fator de risco apresentado pelo paciente (NCEP, 2011; BAYS et. al., 2016).

Muitos fármacos são utilizadas para o tratamento da hipercolesterolemia como as resinas (sequestradores de ácidos biliares), que atuam reduzindo a absorção do colesterol pelas células intestinais e a ezetimiba, que inibe a proteína NPC1-L1 (Niemann-Pick C1-like 1), desta forma impedindo a absorção e transporte do colesterol. Além de fármacos que reduzem a concentração plasmática de triglicérides como os fibratos que ligam-se a receptores que ativam genes relacionados com a hidrólise dos TGs, degradação de ácidos graxos e síntese de HDL

(SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013). Entretanto, as estatinas são as mais utilizadas e que possuem a eficácia mais comprovada por resultados de estudos clínicos.

Figura 1.3 – Estrutura em fitas da HMGR humana. Os quatro monômeros estão coloridos em verde, azul, amarelo e rosa. O dímero 1 é formado pelos monômeros verde e azul e o dímero dois pelos amarelo e rosa. Cada um dos monômeros está ligado a uma molécula de HMG-CoA (estrutura em bastão vermelho) e a uma de NADP (estrutura em bastão preto). (A) Vista frontal e vertical do tetrâmero HMGR humano (B) e vista frontal e horizontal do tetrâmero HMGR humano.

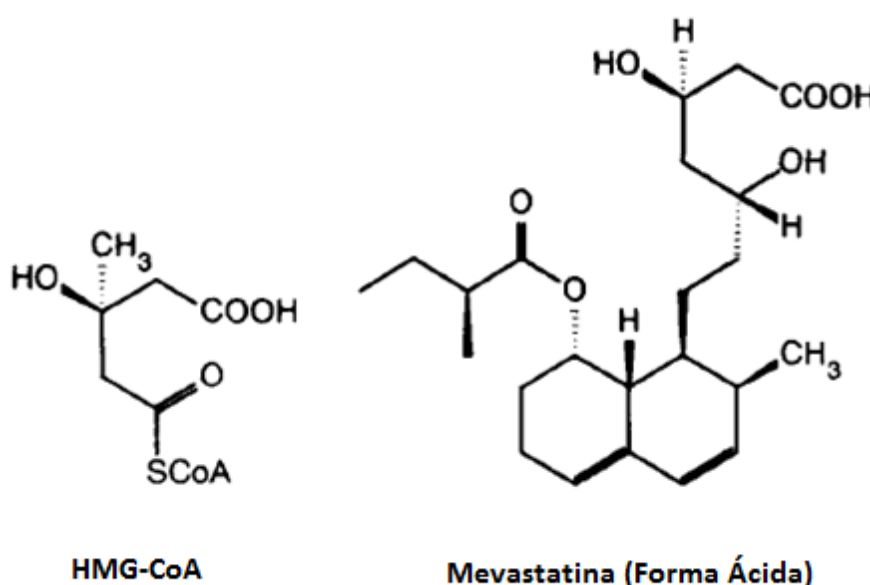


Fonte: Elaborada pela Autora.

As estatinas agem inibindo a enzima HMG-CoA redutase na via da síntese do colesterol impedindo a conversão da HMG-CoA em mevalonato. Essa inibição resulta em menor colesterol intra-hepático e uma elevação da expressão dos receptores LDL da superfície das células hepáticas, ocasionando aumento da absorção de colesterol mediada pelos receptores de LDL e outras lipoproteínas contendo apoB da circulação (WADHERA et. al., 2016). A estrutura química das estatinas possui uma região

análoga à estrutura do substrato HMG-CoA, todos os fármacos dessa classe inibem a enzima de forma competitiva com relação ao sítio de ligação do substrato, mas não com relação com a ligação com o NADPH (GRUNDY, 1988). Os diversos inibidores da 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase apresentam em sua estrutura um grupo funcional semelhante à HMG-CoA (Figura 1.4).

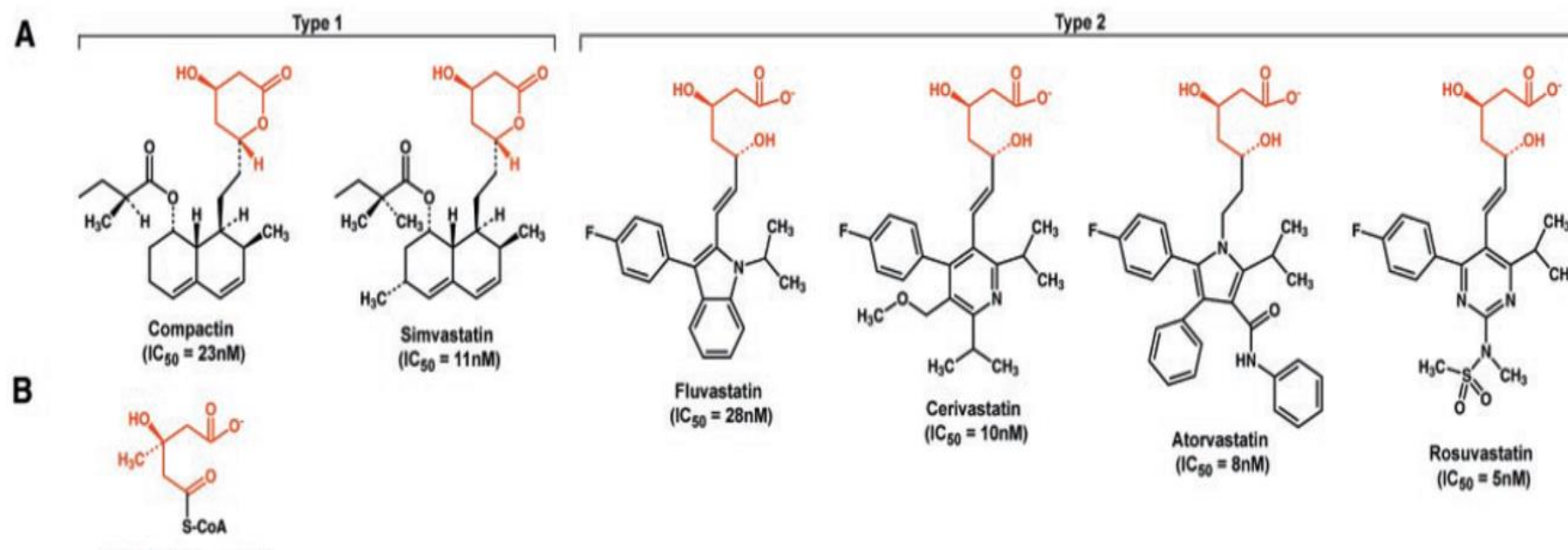
Figura 1.4 – Estrutura da HMG-CoA e da forma ácida da mevastatina.



Fonte: Endo, 1992

As estatinas são classificadas em dois grupos, aquelas que possuem em sua estrutura um grupo rígido e hidrofóbico, o anel decalina, ligado covalentemente à HMG-CoA redutase, o grupo 1, constituído dos fármacos mevastatina, sinvastatina, lovastatina e pravastatina, e o grupo 2 das estatinas de origem sintética com grupos hidrofóbicos maiores ligados à porção tipo HMG, são elas fluvastatina, cerivastatina, atorvastatina e rosuvastatina (ISTVAN E DEISENHOFER, 2001). As estruturas das estatinas estão representadas na figura 1.5.

Figura 1.5 – Fórmulas estruturais das estatinas e do substrato HMG-CoA. (A) Estruturas de alguns inibidores da HMGR tipos 1 e 2. A porção análoga à HMG está representada em vermelho, os valores de IC_{50} estão representados na figura. (B) Estrutura da HMG-CoA, a região de interação está colorida em vermelho.



Fonte: ISTVAN E DEISENHOFER, 2001

3.5 Sementes de Leguminosas

Uma das maiores famílias do filo das angiospermas é a Fabaceae (Leguminosae), esta família é reconhecida geralmente pelos frutos do tipo legume, compreende aproximadamente 730 gêneros e 19000 espécies (SOUZA e LORENZI, 2005). As leguminosas são consideradas a base da alimentação humana, pois foram os primeiros vegetais domesticados no início da agricultura (KOBLOITZ, 2011). A família Leguminosae possui distribuição global e no Brasil são descritas cerca de 1500 espécies de 200 diferentes gêneros (SILVA, 2012).

A origem do termo leguminosa foi atribuída como derivado da palavra latina “*legumen*” que significa “sementes colhidas em vagens”. Os grãos de leguminosas são considerados um importante componente da dieta há milênios, sendo nos dias atuais consumidos em todo o mundo e representam ainda a principal fonte de proteína da alimentação em muitos países. O elevado conteúdo proteico tem sido sem dúvida, o principal aspecto de interesse econômico e nutricional relacionado às sementes de leguminosas.

Koblitz (2011), afirma que são domesticadas mais de 60 espécies da família e dessas, cerca de 20 são utilizadas na alimentação humana. A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), em 2014, afirmou que a produção global de grão de leguminosas foi de 77 milhões de toneladas e dados divulgados pelo IBGE (2017) informam que a safra de leguminosas no Brasil representou, em 2016, 184 milhões de toneladas e estima-se um crescimento de cerca de 20% para o ano de 2017.

As sementes da leguminosas são divididas em tegumento, que representa 3% da massa da semente e tem a função de proteger o embrião de agentes externos, e embrião que corresponde 97% do peso total da semente. O embrião é dividido em

duas partes, cotilédone, que acumula substâncias de reserva (amido proteínas e lipídeos) e eixo embrionário. A maior parte da composição do grão corresponde aos cotilédones, deste, cerca de 40% representa proteínas e de acordo com a espécie pode existir maior teor de lipídeos ou amido. As sementes que armazenam amido possuem concentração de 65% do carboidrato e 2% de lipídeos, enquanto para as sementes que armazenam lipídeos o teor de carboidratos está entre 30-40%. A importância nutricional de espécies como feijões, lentilhas, ervilhas, soja, tremoço, grão-de-bico e outros têm sido reconhecida devido ao seu elevado conteúdo proteico (180 a 350 g/Kg⁻¹), por conta da característica de grãos de leguminosas de armazenarem proteínas em seu cotilédone durante o desenvolvimento da planta. As proteínas são acumuladas nos grãos de leguminosas ao longo do seu desenvolvimento, sendo armazenadas em organelas, das células dos cotilédones, denominadas corpúsculos de proteínas (CARBONARO, GRANT, CAPPELONI, 2000).

O conteúdo proteico total das sementes de leguminosas é constituído por cerca de 90% de proteínas de armazenamento (reserva), com o propósito de fornecerem nitrogênio e enxofre durante o desenvolvimento da planta. As proteínas de reserva foram empiricamente classificadas por Osborne (1924), de acordo com as suas características de solubilidade em albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas), prolaminas (solúveis em soluções hidroalcoólicas) e glutelinas (solúveis em soluções ácidas, alcalinas ou na presença de SDS). O fato é que as albuminas e globulinas são descritas como proteínas de armazenamento das dicotiledôneas, enquanto que as prolaminas e glutelinas são majoritárias nas monocotiledôneas. Desta maneira, as proteínas das dicotiledôneas são constituídas por essas duas classes principais, as albuminas e globulinas que compreendem proteínas com coeficiente de sedimentação entre 1,6S-2S e 7-13S (S, Svedberg), e

que compõem aproximadamente entre 8-20% e 40-70%, respectivamente, da proteína total das sementes de leguminosas (DURANTI e GIUS, 1997).

A fração majoritária das proteínas de leguminosas foram classificadas em dois tipos de acordo com as características de sedimentação, sendo as leguminas (11S), que são hexâmeros e as vicilinas (7S), que se caracterizam por serem em geral trímeros (GIBBS et. al., 1989). São geralmente pobres em aminoácidos sulfurados e em triptofanos, porém apresentam grandes quantidades de lisina. A biodisponibilidade é limitada devido a sua estrutura compacta globular que apresenta hidrólise limitada e a presença de fatores antinutricionais como fitatos e alcaloides (CARBONARO, GRANT, CAPPELONI, 2000).

3.6 Feijão-caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp)

Rubatzky e Yamaguchi (1997) reportaram as 20 principais espécies de leguminosas em termo de importância socioeconômica no mundo. Entre essas, encontraram-se cinco espécies do gênero *Vigna*. No Brasil, a principal representante do gênero *Vigna* é a espécie *V. unguiculata* conhecida popularmente por feijão-caupí, mas também chamado de feijão-de-corda e feijão-macassa na região Nordeste, feijão-de-praia, feijão-da-colônia e feijão-de-estrada no Norte e denominado de feijão-miúdo no Sul do País (FILHO et al., 2011).

Cientificamente, o feijão-caupí é uma planta dicotiledonea, da família *Fabaceae*, tribo *Phaseoleae*, gênero *Vigna*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (PADULOSI e NG, 1997). Evidências têm sugerido que a origem da espécie *unguiculata* tenha ocorrido inicialmente no continente Africano, e mais tarde se dispersou para outros locais. Essa espécie tem assumido uma importante posição na

produção de grãos no Brasil, Índia, Estados Unidos e Sudeste Asiático (ODEIGAH e OSANYINPEJU, 1996).

Segundo MAPA (2008), somente a produção das espécies *Vigna unguiculata* (L.) e *Phaseolus vulgaris* (L.) são consideradas importantes social e economicamente para o país. No Brasil, o feijão-caupí é cultivado predominantemente no sertão semiárido da região Nordeste e em pequenas áreas na Amazônia. Os Estados do Amazonas, Maranhão, Ceará, Bahia, Piauí e Rio Grande do Norte, juntos detêm quase 95% do total das áreas plantadas com feijão-caupí no País. Na região Nordeste, a produção tradicionalmente concentra-se nas áreas semiáridas. A importância da cultura para a região pode ser observada de fato pela sua representatividade na região. Entre o período de 2005 a 2009, a área cultivada e produção média do feijão-caupí no Nordeste representaram aproximadamente 60,8 e 45,7%, enquanto que no Norte foram de 33 e 38% e Centro-Oeste 18 e 9%, respectivamente. Além disso, o feijão-caupí tem uma grande importância tanto como alimento, quanto como gerador de emprego e renda. Particularmente no Nordeste constitui um componente alimentar básico das populações rurais e urbanas (FILHO et al., 2011). Além disso, o feijão-caupí representa uma excelente fonte proteica, em média é constituído de 21-25% de proteína, carboidrato (62%, em média), vitaminas e minerais, além de possuir grande quantidade de fibras dietéticas e baixa quantidade de lipídeos (em média 2%). Pelo seu valor nutritivo, o feijão-caupí é cultivado principalmente para a produção de grãos, secos ou verdes, para o consumo humano, *in natura*, na forma de conserva ou desidratado.

A semente das espécies do gênero *Vigna* apresentam quantidades de proteínas que variam entre 18-30% da constituição química. A rigor, como características dos grãos de leguminosas, a fração proteica do feijão-caupí é

constituída por duas classes principais, as globulinas (70-85%) e albuminas (5-10%), quando somadas constituem praticamente 90% de todo conteúdo proteico da semente. Obviamente, as globulinas representam as proteínas majoritárias, portanto as características dessas proteínas refletem as características químicas da fração proteica do feijão-caupí. Por outro lado, ao contrário de outras sementes de leguminosas, a exemplo da soja, lentilha e tremoço, onde a globulina do tipo 11S (legumina) é considerada a proteína majoritária, no feijão-caupí a globulina do tipo 7S (vicilina) constitui a proteína principal.

Estudos anteriores de caracterização das proteínas de sementes de caupí têm designado uma nomenclatura específica a 7S das *Vignas*, sendo denominadas de proteína β -vignina (ALUKO et al. 2008; MENG et al. 2001). Murray et. al. (1983) demonstraram que β -vignina (7S) do caupí é constituída por duas cadeias polipeptídicas majoritárias de 60 e 55 kDa. Já a globulina 11S era representada por duas estruturas de 80 e 43 kDa, que em condições redutoras, na presença do β -mercaptoetanol, originaram cadeias de 61, 26 e 19 kDa, enquanto que a fração albumina, nas mesmas condições anteriores apresentou cadeias de 100, 70, 43, 35, 32 e 25 kDa. Freitas e colaboradores (2004), isolaram e caracterizaram três globulinas da espécie *V. unguiculata*, e sugeriram a seguinte denominação para essas frações: γ (gama), β (beta) e α (alfa), respectivamente. A fração α apresentou uma cadeia majoritária de 80 kDa, e duas frações menores de 58 e 44 kDa. Na presença do agente redutor, a fração principal originava duas cadeias de 60 e 20 kDa, sendo que esta proteína não apresentava sítios de N-glicosilação, caracterizando-se essencialmente como uma proteína do tipo 11S. A fração γ , minoritária, apresentou uma única cadeia de 22 kDa, e devido ao baixo peso molecular foi caracterizada como uma proteína 2S. A fração majoritária β , apresentava duas frações polipeptídica principais de 60 e 55

kDa glicosiladas, e frações menores não glicosiladas. O resultado deste e outros estudos (ALUKO et al., 1997) sugeriam que a fração β , no feijão-caupí representava a proteína 7S.

3.7 Proteínas das leguminosas X Dislipidemia

Proteínas de leguminosas, especialmente da soja, tem sido relacionada ao metabolismo lipídico, comparada com as proteínas de origem animal desde 1940, porém, não havia evidências suficientes a respeito dos efeitos, bem como dos componentes que poderiam estar associados (ANTHONY et al. 1996). Posteriormente, outros estudos epidemiológicos observaram a redução da incidência de doenças cardiovasculares no Japão e em outros países asiáticos, onde a ingestão de soja e produtos à base da proteína era representativa e maior. Nestas regiões, as concentrações séricas de colesterol e incidência de doenças cardiovasculares eram significativamente menores (SACKS et al., 2006). Dentre os compostos químicos associados à proteína de soja que têm sido reportados na alteração do metabolismo do colesterol, encontram-se os inibidores de tripsina, fibras, saponinas, ácido fítico, isoflavonas, aminoácidos e peptídeos (CARROL et al., 1999). Estudos a partir dos anos de 1970 demonstraram, pela substituição da proteína animal pela vegetal, principalmente de soja, uma associação aos efeitos hipocolesterolêmicos. Durante a década de 70 a 80, os estudos de composição de aminoácidos foram intensificados na tentativa de explicar o efeito nos lípides séricos e redução dos riscos da aterosclerose. Em geral, não foi encontrada relação entre aminoácidos e os efeitos observados. Ainda nessa década, Sirtori et al. (1979) e Descovich et al. (1980) postularam que a proteína de soja era capaz de reduzir o LDL-C de 20 a 30% nos casos de hipercolesterolemia severa em humanos.

A partir dos anos 90, alguns estudos associavam estes efeitos aos compostos de isoflavona presente na soja (ANTHONY et al. 1996). Estes componentes químicos apresentavam efeitos hipocolesterolêmicos quando associado à proteína da soja (DOUGLAS et al., 2006; ANTHONY et al., 1996). Entretanto, diferentes estudos com suplementação da isoflavona em humanos e em animais (GREAVES, 2000; GREAVES et al., 1999; ADAMS et al., 1997), não demonstraram redução significativa da concentração sérica do colesterol total ou LDL-C. Por outro lado, a remoção destes compostos do isolado proteico da soja não alterou os resultados observados pelo efeito de ingestão nos níveis de colesterol total e triacilglicerídeo (FERREIRA et al., 2012, 2011, 2010; DURANTI et al., 2004).

O número de estudos intensificou-se nos últimos 10 anos, que resultou em evidências sobre o consumo da proteína de soja em vários aspectos ligados ao metabolismo lipídico. Os efeitos observados inicialmente em animais hipocolesterolêmicos foram confirmados em diversos estudos conduzidos em humanos (REYNOLDS et al., 2006). Embora os resultados reportem redução significativa, as diminuições mostram-se entre 6-12% do colesterol total (FRIEDMAN e BRANDON, 2001), além da redução da LDL-C, triacilglicerídeo e aumento da lipoproteína HDL-C (SIRTORI et al., 2009; REYNOLDS et al., 2006).

Na década de 90, Lovati e seus colaboradores (1987) mostraram o efeito do isolado proteico de soja comparada ao animal, sobre a atividade dos receptores de LDL de indivíduos entre 26-64 anos e que apresentavam hiperlipoproteínemia. Dois grupos independentes receberam uma dieta com baixo teor lipídico (26%) e com diferentes fontes de proteína (20% da caloria total diária). Após o período de quatro semanas foi observado uma redução 16% na concentração de colesterol total e da fração LDL dos indivíduos alimentados com o isolado proteico de soja. Este efeito foi

acompanhado do aumento da captação da LDL pelas células mononucleares hepáticas em 8 e 16 vezes, respectivamente, comparado aos indivíduos alimentados com proteína de origem animal (baixo lipídio), e no grupo controle. Embora a relação entre a redução do colesterol total e LDL-c, com o aumento da captação e degradação da LDL ainda não estivesse clara, esses resultados confirmavam alguns achados anteriores em animais, e sugeriam a hipótese de que a proteína e/ou peptídeos poderiam ser os responsáveis diretos pelos efeitos observados.

Consonni et al. (2011) apresentaram um polipeptídeo recombinante clonado e expresso em *Pichia pastoris*, com 216 resíduos de aminoácidos, encontrado naturalmente na sequência da subunidade α' da β -conglucina da soja (7S), que apresenta a capacidade de modular o metabolismo do colesterol e dos triacilglicerídeos, reportado em experimentos *in vitro* e *in vivo*. O polipeptídeo na concentração de 8 $\mu\text{mol/L}$ mostrou ser um potente modulador da atividade de receptores de LDL em células hepáticas humanas. A captação e degradação da LDL-c foram aumentadas, respectivamente, em 192 e 143%, semelhante ao observado nas células tratadas com 1 $\mu\text{mol/L}$ de sinvastatina. Estes resultados sustentam os achados anteriores, tornando evidente a ação de peptídeos originados da proteína 7S de soja sob a hipercolesterolemia e, sobretudo, abrem novas perspectivas para estudos que visam identificar *novos* peptídeos e seus mecanismos envolvidos na resposta biológica tanto nessa proteína quanto nas de outras espécies.

Parece evidente que o elemento responsável pela propriedade hipocolesterolêmica exercida por essas proteínas, na verdade, é consequência da ação de peptídeos originados da hidrólise proteica, porém, os mecanismos de ação ainda são pouco claros. Postula-se, que estes efeitos sejam consequência da atividade exercida por peptídeos de 3 a 20 resíduos de aminoácidos gerados da

digestão gastrointestinal. Estes poderiam modular o metabolismo do colesterol e triacilglicerídeos, através de alterações na síntese do colesterol endógeno ou na absorção, síntese, excreção, indução e/ou supressão do mRNAs de receptores e enzimas envolvidas no metabolismo lipídico (LAMMI et al., 2015; SINGH et al., 2014; SHAHIDI e ZHONG, 2008).

Peptídeos isolados da proteína de soja têm apresentado efeitos sobre o metabolismo lipídico, através de inibição da síntese do colesterol pela regulação da atividade da HMG-CoA redutase (PAK et al., 2012, 2005). Este mecanismo tem sido proposto como alvo para nova alternativa no controle da hipercolesterolemia. Pak et al. (2005), isolaram e identificaram peptídeos da glicinina de soja que apresentavam a habilidade de inibir a enzima HMG-CoA redutase. O peptídeo (IAVPGEVA) com 754.9 daltons mostrou exercer atividade inibitória. Posteriormente, os autores (PAK et al., 2005b) sintetizaram o peptídeo IAVP o qual mostrou ser um potente inibidor da HMG-CoA redutase, com efeito semelhante ao observado com a droga lovastatina.

Neste contexto, estudo realizado com β -vignina isolada do feijão-caupí, mostrou que ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica (20%) e hipercolesterolêmica (1% de colesterol) por 28 dias, e que receberam por gavagem doses diárias de 300 mg/kg da proteína isolada apresentaram menores concentrações séricas de colesterol total e da fração não-HDL-c, comparado ao grupo não tratado. O efeito foi superior ao observado no grupo de animais tratado com 50 mg/kg/dia com sinvastatina comercial (FERREIRA et al., 2015).

4 BIBLIOGRAFIA CITADA

ADAMS, M. R.; REGISTER, T. C.; GOLDEN, D. L.; WAGNER, J. D.; WILLIAMS, J. K. Medroxyprogesterone acetate antagonizes inhibitory effects of conjugated equine estrogens on coronary artery atherosclerosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 17, p. 217-221, 1997.

ALUKO, R. E. Methods for the determination of nutritional and bioactive properties of peptides present in enzymatic pea, chickpea, and mung bean protein hydrolysates. **Journal of AOAC International**. v. 9, p. 947-956, 2008.

ALUKO, R. E.; YADA, R. Y.; LENCKI, R. W.; MARANGONI, A. G. Structural and functional properties of a partially purified cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin modified with protein kinase and glycopeptidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 45, p. 2907-2913, 1997.

AMERICAN HEART ASSOCIATION (AHA). Heart diseases and stroke statistics – 2013 update. **Circulation Journal**. v. 127, p. 6-245, 2013.

ANTHONY, M. S.; CLARKSON, T. B.; HUGHES, C. L.; MORGAN, T. M.; BURKE, G. L. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. **Journal of Nutrition**. v. 126(1), p. 43-50, 1996.

BAYS, H. E. A lipidologist perspective of global lipid guidelines and recommendations, part 1: Lipid treatment targets and risk assessment. **Journal of Clinical Lipidology**. v. 10, p. 228-239, 2016.

BLOOM, D. E.; CAFIERO, E. T.; JANÉ-LLOPIS, E.; ABRAHAMS-GESSEL, S.; BLOOM, L. R. **The global economic burden of noncommunicable diseases**. Geneva: World Economic Forum. 2011.

BOUCHENAK, M.; LAMRI-SENHADJI, M. Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: a review. **Journal of Medicinal Food**. 16 (3), p. 185-98, 2013.

CANADIAN CARDIOVASCULAR SOCIETY (CCS). 2012 Update of the Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Dyslipidemia for the Prevention of Cardiovascular Disease in the Adult. **Canadian Journal of Cardiology**. v. 29, p. 151-167, 2013.

CARBONARO, M.; GRANT, G.; CAPPELLONI, M. Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: antinutritional compounds or storage proteins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 48, p. 742-749, 2000.

CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS' (CTT) Collaborators. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. **Lancet**. v. 380 p. 581–590, 2012.

CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS' (CTT) Collaboration. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a metaanalysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. **Lancet**. v. 376, p. 1670–1681, 2010.

COLEMAN, R. A.; BELL, R. M. Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells: Studies on the microsomal diacylglycerol acyltransferase activity using ethanol-dispersed diacylglycerol. **Journal Biological Chemistry**. v. 251, p. 4537-4543, 1976.

CONSONNI, A.; LOVATI, M. R.; PAROLARI, A.; MANZONI, C.; MORAZZONI, P.; DURANTI, M. Heterologous expression and purification of the soybean 7S globulin subunit extension region: In vitro evidence of its involvement in cell cholesterol homeostasis. **Protein Expression Purification**. v. 80, p. 125-129, 2011.

DEBOSE-BOYD, R. A. Feedback regulation of cholesterol synthesis: Sterol-accelerate ubiquitination and degradation of HMG-CoA reductase. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. v.18, p. 609-621, 2008.

DESCOVICH, G. C.; GADDI, A.; MANNINO, G.; CATTIN, L.; SENIN, U.; CARUZZO, C.; FRAGIACOMO, C.; SIRTORI, M.; CEREDI, C.; BENASSI, M. S.; COLOMBO, L.; FONTANA, G.; MANNARINO, E.; BERTELLI, E.; NOSEDA, G.; SIRTORI, C.R. Multicentre study of soybean protein diet for outpatient hypercholesterolaemic patients. **The Lancet**, v. 316, p. 709-712, 1980.

DO, R.; KIS, R. S.; GAUDET, D.; ENGERT, J. C. Squalene synthase: a critical enzyme in the cholesterol biosynthesis pathway. **Clinical Genetics**. v. 75, p. 19-29, 2009.

DURANTI, M.; LOVATI, M. R.; DANI, V. The subunit from soybean 7S globulin lowers plasma lipids and upregulates liver VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet. **Journal of Nutrition**. v. 134, p. 1334-1339, 2004.

DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Cr Res**. v. 53, p. 31-45, 1997.

DURO, L. N.; ASSUNÇÃO, M. C. COSTA, J. S. D.; SANTOS, I. S. Desempenho da solicitação do perfil lipídico entre os setores público e privado. **Revista de Saúde pública**. v. 42, p. 82-88, 2008.

EATON, C. B. Hyperlipidemia. **Primary Care: Clinics Office Practice**. v. 32, p. 1027-1055, 2005.

ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **Journal of Lipid Research**. v. 33, p. 1569-1582, 1992.

ERDMANN, K.; CHENG, B. W. Y.; SCHRODER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 19, p. 643-654, 2008.

FERREIRA, E. S.; AMARAL, A. L. S.; CAPRARO, J.; DEMONTE, A.; ZANELLI, C. F.; DURANTI, M.; NEVES, V. A. Hypocholesterolemic effect of rat-administered oral

doses of the isolated 7S globulins from cowpeas and adzuki beans. **Journal of Nutritional Science**. v. 4, 2015.

FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. Conglycinin combined with fenofibrate or rosuvastatin have exerted distinct hypocholesterolemic effects in rats. **Lipids in Health and Disease**. v. 11, p. 11, 2012.

FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. Conglycinin (7S) and glycinin (11S) exert a hypocholesterolemic effect comparable to that of fenofibrate in rats fed a high-cholesterol diet. **Journal of Functional Foods**. v. 2, p. 275-283, 2011.

FERREIRA, E.; SILVA, M. A.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. Soy conglycinin (7S globulin) reduces plasma and liver cholesterol in rats fed hypercholesterolemic diet. **Journal of Medicinal Food**. v. 14, p. 94-100, 2010.

FILHO, F. R. F. **Feijão-caupí no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011.

FONTANARI, G. G.; BATISTUTI, J. P.; CRUZ, R. J.; SALDIVA, P. H. N.; ARÊAS, J. A. G. Cholesterol-lowering effect of whole lupin (*Lupinus albus*) seed and its protein isolate. **Food Chemistry**. v. 132, p. 1521-1526, 2012.

Food and Drug Administration (FDA). Food labeling: Health claims; soybean protein and coronary heart disease. **Federal Register, Rules and Regulations**, 64, 57700-57733, 1999.

FREITAS, R. L.; TEIXEIRA, A. R.; FERREIRA, R. B. Characterization of the Proteins from *Vigna unguiculata* Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 1682-1687, 2004.

FRIEDMAN, M.; BRANDON, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1069-1086, 2001.

GENEST JR, J. J.; MARTIN-MUNLEY, S. S.; MCNAMARA, J. R.; ORDOVAS, J. M.; JENNER, J.; MYERS, R. H.; SILBERMAN, S. R.; WILSON, P. W.; SALEM, D. N.; SCHAEFER, E. J. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. **Circulation**. v. 85, p. 2025–2033, 1992.

GIBBS, P. E. M.; STRONGIN, K. B.; MCPHERSON, A. Evolution of Legume seed storage proteins – a domain common to legumins and vicilins is duplicated in vicilins. **Molecular Biology and Evolution**. v. 6, p. 614-623, 1989.

GREAVES, K. A.; WILSON, M. D.; RUDEL, L. L.; WILLIAMS, J. K.; WAGNER, J. D. Consumption of soy protein reduces cholesterol absorption compared to casein protein alone or supplemented with an isoflavone extract or conjugated equine estrogen in ovariectomized cynomolgus monkeys. **The Journal of nutrition**, v. 130, p. 820-826, 2000.

GREAVES, K. A.; PARKS, J. S.; WILLIAMS, J. K.; WAGNER, J. D. Intact dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein, improves plasma lipids

in ovariectomized cynomolgus monkeys. **The Journal of nutrition**, v. 129, p. 1585-1592, 1999.

GREEVENBROEK, M. M. J.; VAN, B. T. Chylomicron synthesis by intestinal cells in vitro and in vivo. **Atherosclerosis**. v. 141, p. 9-16, 1998.

GRUNDY, S. M. HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. **New England Journal of Medicine**. v. 319, p. 24-33, 1988.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro: IBGE, 2017.

INTERNACIONAL ATHEROSCLEROSIS SOCIETY (IAS). An International Atherosclerosis Society Position Paper: Global recommendations for the management of dyslipidemia Expert Dyslipidemia Panel. **Journal of Clinical Lipidology**. v. 7, 2013.

ISTVAN, E. S.; DEISENHOFER, J. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. **Science**. v. 292, p. 1160-1164, 2001.

ISTVAN, E. S.; DEISENHOFER, J. The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1529, p. 9-18, 2000.

ISTVAN, E. S.; PALNITKAR, M.; BUCHANAN, S. K.; DEISENHOFER, J. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. **European Molecular Biology Organization Journal**. v. 19, p. 819-830, 2000.

KOBLITZ, M. G. B. **Matérias-primas alimentícias: composição e controle de qualidade**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

LAMMI, C.; ZANONI, C.; ARNOLDI, A. IAVPGEVA, IAVPTGVA, and LPYP, three peptides from soy glycinin, modulate cholesterol metabolism in HepG2 cells through the activation of the LDLR-SREBP2 pathway. **Journal of functional foods**. v. 14, p. 469-478, 2015.

LIU, Y.; YANG, J.; LEI, L.; WANG, L.; WANG, X.; MA, K. Y. YANG, X.; CHEN, Z-Y. 7S protein is more effective than total soybean protein isolate in reducing plasma cholesterol. **Journal of Functional Foods**. v. 36, p. 18-26, 2017.

LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; CANADESI, A.; VACCARINO, V.; MARCHI, M. Soybean protein diet Increases low-density lipoprotein receptor activity in mononuclear cells from hypercholesterolemic patients. **Journal Clinical Investigation**. v. 80, p. 1498-1502, 1987.

MACARULLA, M. T; MEDINA, C.; DE DIEGO, M. A.; CHAVARRI, M.; ZULET, M. A.; MARTINEZ, J. A.; NOEL-SUBERVILLE, C.; HIGUERET, P.; PORTILLO, M. P. Effects of the whole seed and a protein isolate of faba bean (*Vicia faba*) on the cholesterol metabolism of hypercholesterolaemic rats. **British Journal of Nutrition**. v. 85, p. 607-614, 2001.

MANSUR, A. P.; FAVARATO, D. Trends in Mortality Rate from Cardiovascular Disease in Brazil, 1980-2012. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v. 107, p. 20-25, 2016.

MARQUES, M. R.; FREITAS, R. A. M. S.; CARLOS, C. C.; SIGUEMOTO, E. S.; FONTANARI, G. G.; ARÊAS, J. A. G. Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilisation in to micelles. **Food Chemistry**. v. 168, p. 288-293, 2015.

MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; RUPASINGHE, S. G.; SCHULER, A. M.; MEJIA, E. G. Peptides from purified soybean β -conglycinin inhibit fatty acid synthase by interaction with the thioesterase catalytic domain. **FEBS Journal**. v. 277, p. 1481-1493, 2010.

MENDONÇA, S.; SALDIVA, P. H.; CRUZ, R. J.; ARÊAS, J. A. G. Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. **Food Chemistry**. v. 116, p. 738-742, 2009.

MENG, G-T.; MA, C-Y. Thermal properties of Phaseolus angularis (red bean) globulin. **Food Chemistry**. v. 73, p. 453-460, 2001.

MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). 2008.

MURRAY, D. R.; MACKENZIE, K. F.; VAIRNHOS, F.; PEOPLES, M. B.; ATKINS, C. A.; PATE, J. S. Electrophoretic studies of the seed proteins of cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**. v. 109, p. 363-370, 1983.

NAHRENDORF, M.; SWIRSKI, F. K. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. **Nacional Institutes of Health**. v. 112, p. 1624-1633, 2013.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. Third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). **NIH Pub**. Bethesda, MD: National Heart, Lung, and Blood Institute. 2011. 284p.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. High Blood Cholesterol in Adults: Report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment. **NIH Pub**. No. 88-2925. Bethesda, MD: National Heart, Lung, and Blood Institute. 1988. 87p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. Nova York: Worth Publishers Freeman and Company, 2004.

ODEIGAH, P. G. C.; OSANYINPEJU, A. O. Seed protein electrophoretic characterization of cowpea (*Vigna unguiculata*) germplasm from IITA gene bank. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 43, p. 485-491, 1996.

OHSAWA, M.; TANNO, K. Conflicting effect of alcohol on cardiovascular risk: a clue to understand the different etiologies of coronary artery disease, stroke and peripheral artery disease. **Hypertension Research**. v. 36, p. 16-18, 2013.

OLIVIER, L. M.; KOVACS, W.; MASUDA, K.; KELLER, G. A.; KRISANS, S. K. Identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes: AA-CoA thiolase, HMG-CoA synthase, MPPD, and FPP synthase. **Journal Lipid Research**. v. 41, p. 1921-1935, 2000.

OLOFSSON, S. O.; WIKLUND, O.; BORÉN, J. Apolipoproteins A-I and B: biosynthesis, role in the development of atherosclerosis and targets for intervention against cardiovascular disease. **Vascular Health and Risk Management**. v. 3, p. 491- 502, 2007.

OSBORNE, T. B. **The vegetable proteins**. Longmans Green, London, 1924.

PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin, taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Advances in cowpea research**, p. 1-12, 1997.

PAK, V. V.; KOO, M.; YUN, L.; KWON, D. Y. Design of a highly potent inhibitory peptide acting as a competitive inhibitor of HMG-CoA reductase. **Amino Acids**. v. 43, p. 2015-2025, 2012.

PAK, V. V.; KOO, M.; LEE, N. Isolation and identification of peptides from soy 11S-globulin with hypocholesterolemic activity. **Chemistry Natural Compounds**. v. 41(6), p. 710-714, 2005.

PAK, V. V.; KOO, M.; LEE, N.; OH, S. K.; KIM, M. S.; LEE, J.; KWON, D. Y. Hypocholesterolemic soybean peptide (IAVP) inhibits HMG-CoA reductase in a competitive manner. **Food Science and Biotechnology**, v. 14, p. 727, 2005b.

PAK, V. V.; KOO, M. S.; KWON, D. Y.; KASIMOVA, T. D. Conformation analysis of ILE-ALA-VAL-PRO peptide and its derivatives by circular dichroism. **Chemistry Natural Compounds**. v. 40, p. 398-404, 2004.

PAROLINI, C.; RIGAMONTI, E.; MARCHESI, M.; BUSNELLI, M.; CINQUANTA, P.; MANZINI, S.; SIRTORI, C. R.; CHIESA, G. Cholesterol-lowering effect of dietary. *Lupinus angustifolius* proteins in adult rats through regulation of genes involved in cholesterol homeostasis. **Food Chemistry**. v. 132, p. 1475-1479, 2012.

REYNOLDS, K.; CHIN, A.; LEES, K. A Meta-Analysis of the Effect of Soy Protein Supplementation on Serum Lipids. **American Journal of Cardiology**. v. 98, p. 633-640, 2006.

RUBATZKY, V. E.; YAMAGUCHI M. **World vegetables: principles, production, and nutritive values**. Edition 2. New York: Chapman & Hall. 1997.

SACKS, F.M.; LICHTENSTEIN, A.; VAN HORN, L. Soy Protein, Isoflavones, and Cardiovascular Health an American Heart Association Science Advisory for Professionals from the Nutrition Committee. **Circulation**. v. 113, p. 1034-1044, 2006.

SANT'ANA, L. S. Biochemical mechanisms involved in the Omega fatty acids digestion, absorption and metabolism. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**. v. 17, p. 211-216, 2004.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Bioactive peptides. **Journal AOAC International**. v. 91, p. 914-931, 2008.

SILVA, M. S.; REIS, C.; PONTES-PIRES, A. F. P. Anatomical Characteristics of Leaf of Five Species of Family Fabaceae Found in Sinop, MT. **Scientific Electronic Archives**. v. 1, p. 16-19, 2012.

SILVA, L. R.; STEFANELLO, J. M. F.; PIZZI, J.; TIMOSSI, L. S.; LEITE, N. Atherosclerosis subclinical and inflammatory markers in obese and nonobese Children and adolescents. **Revista brasileira de epidemiologia**. v. 15, n.4, 2012.

SINGH, B. P.; VIJ, S.; HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptide**. v. 54, p. 171-179, 2014.

SIRTORI, C. R.; GALLI, G.; ANDERSON, J. W.; ARNOLDI, A. Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins. **Atherosclerosis**. v. 203, p. 8-17, 2009.

SIRTORI, C. R.; GATTI, E.; MANTERO, O.; CONTI, F.; AGRADI, E.; TREMOLI, E.; SIRTORI, M.; FRATERRIGO, L.; TAVAZZI, L.; KRITCHEYSKY, D. Clinical experience with the soybean protein diet in the treatment of hypercholesterolemia. **The American journal of clinical nutrition**, v. 32, p. 1645-1658, 1979.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivo brasileiro de Cardiologia**. v. 101, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivo brasileiro de Cardiologia**. v. 88, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Instituto Plantarum, 2005.

TACHIBANA, N.; YAMASHITA, Y.; NAGATA, M.; WANEZAKI, S.; ASHIDA, H.; HORIO, F.; KOHNO, M. Soy β -conglycinin improves glucose uptake in skeletal muscle and ameliorates hepatic insulin resistance in Goto-Kakizaki rats. **Nutrition Research**. v. 34, p. 160-167, 2014

TAVRIDOU, A.; MANOLOPOULOS, V. G. Novel molecules targeting dyslipidemia and atherosclerosis. **Current Medicinal Chemistry**. v. 15, p. 792-802, 2008.

TIWARI, V.; KHOKHAR, M. Mechanism of action of anti-hypercholesterolemia drugs and their resistance. **European Journal of Pharmacology**. v. 741, p. 156-170, 2014.

WADHERA, R. K.; STEEN, D. L.; KHSN, I.; GIUGLIANO, R. P.; FOODY, J. M. A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on

cardiovascular disease morbidity and mortality. **Journal of Clinical Lipidology**. v. 10, p. 472-489, 2016.

WHO/FAO. **State of the world's forests**. Food and Agriculture Organization of the United States, 2014.

WHO/FAO. **Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases**. Geneva, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO global report: Noncommunicable diseases country profiles. Ed. **World Health Organization**, 2011, 209p.

YE, J.; DEBOSE-BOYD, R. A. Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. v.3, p. 1-13, 2011.

Capítulo II

Manuscrito: Peptídeo (QDF) derivado da β -vignina do feijão-caupí modula a síntese do colesterol através da inibição da HMG-CoA redutase

PEPTÍDEO (QDF) DERIVADO DA β -VIGNINA DO FEIJÃO-CAUPÍ MODULA A SÍNTESE DO COLESTEROL ATRAVÉS DA INIBIÇÃO DA HMG-COA REDUTASE

Peptide (QDF) derived of the cowpea β -vignin modulate cholesterol synthesis through the inhibition of the HMG-CoA reductase

Mariana Barros de Cerqueira e Silva^a, Caio Alexandre da Cruz Souza^a, Mariana Mota Novais da Cunha^a, Jaff Ribeiro da Silva^b, Janice Izabel Druzian^a, Marcelo dos Santos Castilho^a, Ederlan S. Ferreira^{a,*}

^aDepartment of Bromatological Analysis, School of Pharmacy, Federal University of Bahia, Barão de Jeremoabo street, 40170-115, Salvador, BA, Brazil.

^b São Paulo State University (Unesp), Institute of Chemistry, 14800-060, Rua Prof. Francisco Degni, 55, Araraquara, SP, Brazil.

Running title: Peptide QDF exerts a hypocholesterolemic activity

***CORRESPONDING AUTHOR:**

Prof. Ederlan de Souza Ferreira

Department of Bromatological Analysis

Federal University of Bahia

Barão de Jeremoabo street, 147

40.170-115, Salvador, Brazil

Email address: ederlan.ferreira@ufba.br

Phone: ++55 71 3283-6932

RESUMO

Estudos anteriores têm demonstrado que a proteína do feijão-caupí interfere de forma positiva no metabolismo do colesterol. Neste estudo, nós avaliamos a capacidade de inibição da fração de peptídeos menores do que 3 kDa e do peptídeo Glu-Asp-Phe (QDF), derivados da proteína β -vignina do caupí, sobre a atividade da HMG-CoA redutase. As contribuições científicas mais relevantes demonstradas foram: *i.* validação do protocolo de isolamento da proteína β -vignina para a obtenção com grau de pureza superior a 95%; *ii.* Uso do screening *In Silico* para identificar sequências primárias com capacidade de interação com a região ativa da HMG-CoA redutase; *iii.* Realização de experimentos *in vitro* para comprovar a atividade da fração constituída por peptídeos < 3 kDa frente à HMG-CoA redutase; *iv.* Desenho e síntese do tripeptídeo QDF que age como um potente inibidor (IC 50% = 12.84 μ M) da HMG-CoA redutase, sendo dependente do efeito dose-resposta. Finalmente, este estudo apresenta pela primeira vez, um peptídeo derivado da proteína β -vignina do feijão caupí, com elevado potencial de inibição da HMG-CoA redutase, comprovado a partir de evidências *in silico* e *in vitro*.

Palavras-chave: *Vigna* ssp.; Peptide hydrolysates; HMG-CoA reductase inhibitor; Concentration-response effect.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, muitos estudos têm sugerido a regulação do metabolismo humano através da fração proteica de alimentos, especialmente àqueles de origem vegetal. Proteínas e peptídeos de diferentes tamanhos e propriedades físico-químicas, derivados a partir da proteína de sementes das leguminosas têm demonstrado diversas atividades fisiológicas em estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos (AWIKA e DUODU, 2016; MAESTRI, MARTA, e NELSONY, 2016; RIZZELLO, et al. 2016). Particularmente, estes efeitos têm sido bem estabelecidos em relação ao controle da saciedade (MARTINEZ-VILLALUENGA et al. 2010), sistema cardiovascular (MARQUES et al. 2015; PAK et al. 2012; CONSONNI et al. 2011; CHO et al. 2008), processo inflamatório (FROTA et al. 2015; YOSHIKAWA, 2015) e câncer (LUNA-VITAL et al. 2015; MONTALES et al. 2015; PADONA et al. 2013).

O feijão-caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) é um planta *Dicotyledonea*, da família *Fabaceae*, tribo *Phaseoleae*, gênero *Vigna*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Esta espécie de origem Africana tem seu cultivo favorecido em clima tropical e subtropical, e tem assumido uma importante posição na produção de grãos em países como Brasil, Índia, Estados Unidos, etc (FILHO et al., 2011). Inicialmente, a importância nutricional desse feijão foi reconhecida devido ao seu elevado conteúdo proteico (180 a 250 g/Kg⁻¹). A rigor, como na maioria das sementes de leguminosas, a classe das globulinas constitui entre 70-80% da fração proteica total do caupí, sendo que a proteína do tipo-vicilina ou 7S (*Svedberb*) é considerada majoritária. A fração 7S tem sido denominada mais especificamente de proteína β -vignina entre as espécies do gênero *Vigna* (GUPTA et al. 2010). Estudos anteriores têm definido algumas características estruturais da β -vignina do feijão-caupí (ALUKO et al. 1997). Tem sido demonstrado que a β -vignina é constituída por duas cadeias polipeptídicas

glicosiladas principais de 60 e 55 kDa e uma minoritária de 35 kDa (FREITAS et al. 2004).

Resultados publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram uma redução significativa na concentração plasmática de colesterol total e triacilglicerídeos de ratos alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica (composta de 20% de gordura saturada, 1% de colesterol e 0,5% de ácido fólico) e tratados com uma dose administrada oralmente da β -vignina de feijão-caupí por 28 dias (FERREIRA, et al. 2015). Outros autores, também têm reportado o efeito hipocolesterolemico exercido pelo feijão-caupí. Weththasinghe et al. (2014) demonstraram ação hipocolesterolêmica e hipoglicêmica em um estudo realizado com a farinha de cinco variedades de caupí, que foram incorporadas à ração como fonte proteica (20%) em substituição a caseína (controle), em ratos tratados com uma dieta hipercolesterolêmica por 6 semanas. No estudo foi observado um decréscimo significativo entre 19-44%, 54-78% e 31-75%, da concentração sérica de colesterol total, LDL-C e glicose, respectivamente, quando comparados aos animais que receberam a dieta controle. Kanetro (2015) avaliou o efeito redutor do colesterol plasmático em animais, em um estudo realizado com o isolado proteico obtido do feijão caupí. No experimento, ratos Sprague-Dawley normais e diabéticos foram divididos em quatro grupos ($n = 5$). Dois grupos de animais receberam a dieta controle (caseína) e os outros dois a dieta incorporada com o isolado proteico em substituição a caseína, durante 15 dias. Os resultados observados demonstraram que os efeitos foram mais significativos nos animais diabéticos. A concentração sérica de colesterol total e LDL-C, no grupo alimentado com o isolado proteico foi menor significativamente entre 11-47% e 64-80%, respectivamente, comparado aos animais normais e diabéticos alimentados com a dieta controle. Porém, foi verificado uma diminuição

significativa da concentração dos triacilglicerídeos, somente nos animais diabéticos (-42%) que foram alimentados com o isolado proteico. A partir dos resultados observados, os autores atribuíram um potencial hipocolesterolêmico à proteína do feijão caupí. Frota et al. (2015) avaliaram o perfil lipídico, parâmetros de inflamação e disfunção endotelial de indivíduos adultos com hipercolesterolemia moderada que consumiram 25 g de proteína isolada do feijão caupí, durante 4 semanas. Os resultados demonstraram que o grupo de pacientes que receberam a proteína tiveram um decréscimo significativo de 12% do colesterol total, 18,9% da LDL-C, 14% da apoB e um acréscimo de 2,7% da HDL-C, na concentração sérica. Porém, não foram observadas alterações significativas para os parâmetros inflamatórios e de disfunção endotelial. Estudos clínicos também têm evidenciado alterações séricas do perfil lipídico atribuído ao consumo de proteína de outras leguminosas. Neste contexto, a US Food and Drug Administration (FDA, 1999), reconheceu a ação exercida pela proteína de soja, e recomendou que o consumo diário de 25 g de isolado proteico poderia reduzir a concentração plasmática de colesterol total, LDL-C, e conseqüentemente, ocasionar benefícios relacionados aos fatores de risco para doenças cardiovasculares. Apesar de muitos estudos reconhecerem a ação hipocolesterolêmica exercida pela fração proteica de leguminosas, sobretudo relacionada às proteínas da soja (LIU et al. 2017; TACHIBANA et al. 2014; FASSINI et al. 2012; FERREIRA et al. 2012, 2011, 2010; CONSONNI et al. 2011; ZONG et al. 2007; PAK et al. 2005), os determinantes e os mecanismos pelos quais essas proteínas exercem estes efeitos ainda não são completamente elucidados. No entanto, alguns autores têm atribuído estas habilidades reguladoras à ação de peptídeos oriundos da degradação das proteínas das leguminosas. Alguns mecanismos de ação têm sido propostos para o metabolismo do colesterol (PAK et al.

2012; MARTINEZ-VILLALUENGA et al. 2010; CHO, JUILLERAT, LEE, 2008). Notadamente, a inibição da síntese endógena do colesterol tem sido o principal alvo de muitos estudos. Peptídeos constituídos de 3 a 8 resíduos de aminoácidos parecem interagir com região catalítica da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril Coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), provocando alterações conformacionais e causando a perda da atividade (PAK et al. 2008).

Estudo realizado com a fração de peptídeos menores do que 3 kDa, derivada do isolado proteico total de caupí pela ação da pepsina/pancreatina, demonstrou um decréscimo de 89% da atividade da HMG-CoA redutase, *in vitro* (MARQUES et al. 2015). Estudos anteriores, realizados com a glicinina (11S) da soja, também atribuíam a peptídeos gerados da proteína, a capacidade de inibição da HMG-CoA redutase (PAK et al. 2005, 2004).

Neste manuscrito, nós estudamos a ação da fração menor que 3 kDa obtida da hidrólise da proteína β -vignina e apresentamos pela primeira vez um peptídeo com a estrutura primária derivada da proteína β -vignina do feijão-caupí, com propriedade hipocolesterolêmica, capaz de modular a síntese do colesterol através da inibição da HMG-CoA redutase, demonstrado a partir de ensaios *in silico* e *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material botânico e reagentes químicos

As sementes do feijão-caupí (*Vigna unguiculata*, L. Walp) foram cedidas gentilmente pelo Dr. Rogério Faria Vieira do Centro Tecnológico da Zona da Mata da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Viçosa, MG, Brasil). Todos os reagentes utilizados foram obtidos a partir da empresa Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, EUA), quando não houver especificação.

2.2 Isolamento e cromatografia por gel filtração da β -vignina

Inicialmente, as sementes do feijão caupí foram selecionadas, embebidas em água destilada (4° C/12 h), decorticadas manualmente, secas em esfufa com circulação de ar (50 °C/12 horas), pulverizada (60 mesh) e armazenadas a 4 °C. A β -vignina foi isolada de acordo com metodologia proposta por Ferreira et al. (2015). Posteriormente, alíquotas (80 mg/ β -vignina) da proteína isolada foram solubilizadas em tampão fosfato de potássio (0,05 mol/L), com NaCl (0,5 mol/L), azida sódica (0,01%) em pH 7,5, e cromatografada em coluna (1,0 x 100 cm) de gel filtração Sepharose CL-6B. O fluxo utilizado foi de 0,45 mL/min, sendo o volume da fração de 4,5 mL/tubo. A proteína eluída foi monitorada pela medida da absorbância em 280 nm. A fração principal (tubo pico) foi dialisada, precipitada, e posteriormente, liofilizada.

A concentração de proteína foi mensurada pelo método Lowry et al. (1951), durante as etapas de isolamento e do processo cromatográfico.

2.3 Eletroforese por SDS-PAGE da β -vignina

Amostras do isolado proteico total, β -vignina isolada e cromatografada foram analisadas por eletroforese unidimensional (SDS-PAGE), de acordo como descrito por

Lampli (1970), utilizando equipamento Hoefer® MiniVE electrophoresis system (Amersham Biosciences, Hercules, CA, USA). Alíquotas de 10 µg/amostra foram aplicadas no gel. Proteínas com massa molecular entre 97-14,4 kDa foram utilizadas como marcadores moleculares (Low Molecular Weight, GE Healthcare®, Little Chalfont, Reino Unido). As imagens dos géis foram analisadas através do software AlphaEase (Alpha Innotech®, San Leandro, USA).

2.4 Simulação da digestão gastrointestinal e fracionamento

Para mimetização da digestão gastrointestinal *in vitro*, a β-vignina (200 mg) foi hidrolisada sequencialmente pela ação da enzima pepsina (P-7012) e pancreatina (P-7545), de acordo com procedimentos descritos por Akesson e Stahman (1964). O extrato hidrolisado total foi fracionado em peptídeos maiores do que 30 kDa, peptídeos entre 30 e 10 kDa, peptídeo entre 10 e 3 kDa e peptídeos menores do que 3 kDa, utilizando filtros de membranas para ultrafiltração Microcon Centrifugal Filters (Merck Millipore®, Darmstadt, Germany).

2.5 Perfil peptídico por RP-CLAE

O perfil cromatográfico do hidrolisado proteico total, da fração formada por peptídeos menores do que 3 kDa e do peptídeo QDF foi obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando um sistema System PerkinElmer®, com coluna de fase reversa (C18 x 0,45 x 25 cm) e com detector UV/VIS. O sistema de solventes utilizado foi A (0,045% de ácido trifluoroacético em água ultrapura) e B (0,036% de ácido trifluoroacético em acetonitrila), fluxo de 1,0 mL/min, temperatura de 30 °C, registrando-se leitura a 220 nm. O gradiente utilizado foi o seguinte: 10 min

em 95% de A, 50 min para atingir 25% de B, retornando para 95% de A em 2 min e permanecendo na condição inicial por 3 min.

2.6 Screening de peptídeos inibidores da HMG-CoA redutase *In Silico*

A sequência primária da β -vignina (NCBI/GenBank Blast: *AM905848* e UniProtKB: *A8YQH5_VIGUM*), globulina 7S do feijão-adzuki (NCBI/GenBank Blast: *AB292246.1*; UniProtKB: *A4PI98_PHAAN*) e da subunidade α' da β -conglucina da soja (NCBI/GenBank Blast: *AY221105.1*; UniProtKB: *UniProtKB: GLCAP_SOYBN*) foram utilizadas na análise de similaridade sequencial, através do web software ClustalW (versão 1.83, <http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>). A sequência primária da β -vignina foi hidrolisada pela ação sequencial das enzimas pepsina (EC 3.4.23.1), tripsina (EC 3.4.21.4) e quimotripsina (EC 3.4.21.1), através do web software BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>). A hidrofobicidade de cada peptídeo foi calculada, através do software ProPAS[®] (versão 1.1). Posteriormente, os peptídeos derivados da β -vignina foram submetidos à análise para prever a probabilidade de bioatividade, através do web software PeptideRanker Score[®], (http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/Server_pages/peptide_ranker.php). Foram considerados peptídeos com potencial bioativo àqueles que apresentaram score \geq a 0,500 (variabilidade de 0,000 a 1,000). A probabilidade de interação com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase, a partir dos modelos de interação dos inibidores comerciais, sinvastatina (*PDB ID: 1HW9*), mevastatina (*PDB ID: 1HW8*), rosuvastatina (*PDB ID: 1HWL*), atorvastatina (*PDB ID: 1HWK*), fluvastatina (*PDB ID: 1HWI*), cerivastatina (*PDB ID: 1HWJ*) e lovastatina (*PDB ID: 1T02*) foi avaliada através do web software PepSite 2 (<http://pepsite2.russelllab.org>), sendo a significância estatística de $p < 0,2500$, como

previamente validado (TRABUCO et al. 2012). Os peptídeos com elevada predição de interação ($p \leq 0,1000$) tiveram seu modo de interação predito por meio da análise de acoplamento molecular, utilizando o protocolo de encaixe de ajuste induzido. A região de interação foi definida a partir das coordenadas cristalográficas ($X = 3,93$, $Y = -9,20$, $Z = -11,33$) da sinvastatina (*PDB ID: 1HW9*). Em seguida, as dimensões da caixa de busca (10-14 Å) foram otimizadas utilizando o programa AutoDock-VINA® (versão 4.2.6), sendo consideradas as poses mais próxima ($\text{RMSD} \leq 2,0$ Å) daquela observada com a sinvastatina (TROTT e OLSON, 2010). As 4 posições com maiores probabilidades foram consideradas na etapa de análise visual.

2.7 Síntese e caracterização do peptídeo QDF

O peptídeo QDF foi sintetizado empregando o método de síntese em fase sólida (Merrifield 1963), utilizando o grupo protetor Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonila) para a proteção dos grupos α -amino dos aminoácidos. O grupo tritila foi utilizado na proteção da cadeia lateral da Gln e o terc-butila na proteção da cadeia lateral do Asp. O peptídeo bruto foi purificado por CLAE (Shimadzu Prominence®, Kioto, Japão) em sistema semipreparativo utilizando coluna (25 cm x 10 mm e partícula de 10 μm) em fase reversa (Jupiter Proteo Phenomenex®, California, USA), com detector UV/VIS (220 nm). O sistema de solventes utilizado foi A (0,045% de ácido trifluoroacético em água ultrapura) e B (0,036% de ácido trifluoroacético em acetonitrila). O gradiente utilizado foi o seguinte: 15 min em 5% de B, e 90 min para atingir 45% de B, num fluxo de 5 mL/min. A identidade e o grau de pureza foram analisada por CLAE, acoplado ao espectrômetro de massas com eletrospray e ionização positiva (LC/ESI-MS, Bruker® Amazon). O sistema de solvente utilizado foi A (0,1% de fórmico em água ultrapura) e B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila), fluxo de 0,5 mL/min em

temperatura de 30 °C. O gradiente utilizado foi o seguinte: 5 a em 95% de B em 20 min.

2.8 Ensaio de inibição da enzima HMG-CoA redutase *in vitro*

A atividade inibitória da fração constituída por peptídeos menores do que 3 kDa (0,5 mg/proteína/mL) e do peptídeo QDF nas concentrações de 250, 125, 62,5 e 31,25 μ mol foram realizadas em ensaios *in vitro*, utilizando kit HMG-CoA reductase assay (Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), em triplicata, de acordo com metodologia proposta por Hulcher e Oleson (1973). A atividade específica da enzima foi definida como: μ mol de NADPH oxidado/min/mg.proteína.

2.9 Análise estatística

As médias dos resultados foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) unidirecional (one-way) e para a comparação múltipla foi utilizado o teste de Duncan (SigmaStat®, v. 3,5, Systat software, California, USA). O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. Todos os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de pelo menos três análises independentes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos estudos anteriores, realizados com animais tratados com a proteína β -vignina isolada do feijão caupí, demonstraram uma diminuição significativa da concentração plasmática do colesterol total e triacilglicerídeos em ratos tratados com uma dose diária de 300 mg/Kg, durante 28 dias (Ferreira et al. 2015). No presente estudo, as contribuições mais relevantes foram as seguintes: *i.* validação do protocolo de isolamento da proteína β -vignina para a obtenção com grau de pureza superior a 95%; *ii.* Uso do screening *In Silico* para identificar sequências primárias com capacidade de interação com a região ativa da HMG-CoA redutase; *iii.* Realização de experimentos *in vitro* para comprovar que a atividade da fração hidrolisada formada por peptídeos menor que 3 kDa e do tripeptídeo sintético QDF frente à HMG-CoA redutase.

A proteína β -vignina foi isolada a partir da farinha de feijão caupí por cromatografia em gel filtração e posteriormente, analisada por eletroforese em gel de poli-acrilamida. Na Figura 1 são mostrados os perfis cromatográficos da β -vignina isolada (A) e do pico da proteína purificada (B), utilizada nos experimentos subsequentes. O perfil cromatográfico obtido mostrou uma pureza de aproximadamente 95%. A Figura 2 demonstra os resultados da análise de caracterização molecular por SDS-PAGE (A) e a análise densitométrica (B) realizadas com as amostras do extrato proteico inicial e das etapas de isolamento após a desnaturação, onde é observada a presença e o número de cadeias polipeptídicas que constituem cada fração. Tem sido evidente que as globulinas constituem mais de 51% da proteína total presente no feijão caupí. Os estudos demonstram que esta fração proteica é formada por 3 proteínas principais, denominadas de α -, β - e γ -

vignina. Além disso, a β -vignina representa a principal proteína do caupí, sendo constituída por duas cadeias polipeptídicas glicosiladas majoritárias, com massas molares de 60 e 55 kDa, e outras menores (FREITAS et al. 2004). Neste estudo, nós observamos que a fração globulina total foi constituída por 8 cadeias polipeptídicas (Fig. 2, linhas 2). Porém, a proteína β -vignina isolada apresentou 5 cadeias polipeptídicas, semelhante ao observado em outros estudos (ALUKO et al. 1997).

O perfil cromatográfico da purificação apresentou 3 frações principais. A partir da quantificação proteica e da análise densitométrica dos picos foi possível afirmar que o primeiro era relativo a um componente não-proteico de baixa massa molar, o segundo pela globulina α -vignina e o terceiro pela proteína β -vignina (dados não mostrados). A fração correspondente a β -vignina foi obtida através de várias repetições cromatográficas utilizando a proteína isolada (Fig. 2, linhas 3). A partir dos resultados demonstrados (Fig. 1B e Fig. 2, linhas 4) foi possível observar que o processo de isolamento, seguido da etapa cromatográfica foram eficientes para a obtenção da β -vignina com um grau de pureza superior a 95%.

A β -vignina foi hidrolisada pela ação sequencial da pepsina e pancreatina com objetivo de gerar sequências primárias de peptídeos semelhantes ao processo gastrointestinal. Estudos têm demonstrado que os fragmentos peptídicos produzidos a partir da digestão humana são facilmente absorvidos pela mucosa intestinal, principalmente através da proteína transportadora PepT1, sendo assim lançados à circulação sanguínea e podendo alcançar sistemas alvos (NASSL et al. 2011; QANDEEL et al. 2011). O potencial terapêutico de peptídeos bioativos derivados dos alimentos apresentam funcionalidades como antioxidantes, antimicrobianos, antihipercolesterolêmico, antihipertensivo, antitrombótico, opióides e imunomoduladores (GIACOMETTI e TOMLJANOVIC, 2017; AWIKA e DUODU, 2016;

MAESTRI, MARTA, e NELSONY, 2016; YOSHIKAWA, 2015). A partir do extrato hidrolisado total foi obtida a fração constituída por peptídeos menores do que 3 kDa, que mostrou alta capacidade de inibição da HMGCoAR (95% com 500 µg). Acreditamos que estes peptídeos são os responsáveis pelos efeitos observados nos ensaios experimentais em diferentes abordagens (LAMMI, ZANONI, ARNOLDI, 2015; MARQUES et al. 2015; PAK et al. 2012; MARTINEZ-VILLALUENGA et al. 2010; CHO, JUIILLERAT, LEE, 2008; PAK et al. 2005).

A Figura 3 mostra o perfil cromatográfico do hidrolisado proteico total e da fração constituída por peptídeos de tamanhos moleculares menores do que 3 kDa, resultantes da hidrólise da β -vignina, *in vitro*. Um grande número de peptídeos foi derivado da proteína. No entanto, após o fracionamento por membranas de ultrafiltração, o número de picos majoritários diminuiu na fração de peptídeos < 3 kDa. Alguns autores têm apontado a dificuldade de identificação de peptídeos bioativos derivados de proteólises enzimáticas, devido a grande variabilidade de sequências primárias encontradas, especialmente àqueles menores, constituídos de 2 a 6 resíduos de aminoácidos. Zhong et al. (2007) realizaram exaustivos procedimentos com várias etapas cromatográficas (resina de adsorção, gel filtração, RP-HPLC e LC-MS) para a separação e identificação do peptídeo WGAPSL derivado do isolado proteico de soja, que mostrou exercer um efeito na solubilidade micelar do colesterol. No entanto, o hidrolisado foi obtido somente pela ação enzimática da alcalase. Mais recentemente, Lahrichi et al. (2013) sugeriram um método baseado na análise por LC-MS/MS para a identificação em grande escala de peptídeos menores do que 3 kDa, principalmente os di-, tri- e tetrapeptídeos. Segundo os autores, a partir em um experimento de validação foi possível identificar 60 peptídeos, de 117 sequências diferentes de uma amostra, no entanto, eles ressaltaram que outros 57 peptídeos não

eram distinguidos devido à característica isobárica e a co-eluição dos mesmos. Por outro lado, alguns estudos têm recomendado a utilização de experimentos “*in silico*” como uma alternativa mais rápida, viável e promissora para a identificação (screening) de peptídeos bioativos (ABDELHEDI et al. 2018). Assim, neste estudo, nós utilizamos ferramentas *In Silico* para determinar sequências de peptídeos, preditas à interação com a região ativa da HMG-CoA, que exerceriam uma propriedade hipocolesterolêmica, e que mais tarde, foram confirmados através de ensaios de inibição da enzima, *in vitro*.

Na Figura 4 são demonstrados os resultados comparativos do alinhamento das sequências primárias da β -vignina (UniProtKB ID: *A8YQH5_VIGUN*) do caupí, subunidade α' (UniProtKB ID: *GLCAP_SOYBN*) da β -conglucina de soja e subunidade 7S1 (UniProtKB ID: *A4PI98_PHAAN*) da vicilina do feijão adzuki. A estrutura primária da β -vignina mostrou ser idêntica em 47,2 e 74,2%, fortemente similar em 16,1 e 11,5%, e diferente em 31,1 e 11,5%, às subunidades α' e 7S1, respectivamente. Este resultado demonstra que a proteína β -vignina do caupí poderia desempenhar ação semelhante à β -conglucina da soja, que tem seu efeito redutor de colesterol bem estabelecido na literatura (LIU et al. 2017; TACHIBANA et al. 2014; FERREIRA et al. 2012, 2011; CONSONNI et al. 2011; MARTINEZ-VILLALUENGA et al. 2010; CHO, JUILLERAT, LEE, 2008). As sequências peptídicas KNPQLR, EITPEKNPQLR, LLPHH e NPQLR derivadas da β -conglucina são reportadas com propriedades bioativas, sendo que estão presentes também na estrutura primária da β -vignina do feijão caupí. Estudos anteriores têm sugerido que proteínas do tipo-vicilina (7S) das sementes de leguminosas são codificadas por genes ancestrais comuns, apresentando estruturas primárias e funcionalidade biológicas semelhantes decorrentes de uma evolução genética convergente (GEPTS et al. 2005). Muitos

estudos têm reconhecido o efeito redutor de colesterol exercido pela proteína β -conglucina da soja (LIU et al. 2017; FERREIRA et al. 2012, 2011, 2010; CONSONNI et al. 2011; MARTINEZ-VILLALUENGA et al. 2010). Lovati et al. (1992) mostraram em ensaios com células HepG2, que a β -conglucina era capaz de ocasionar “upregulation” para receptores de LDL. Posteriormente, os autores confirmaram os primeiros achados por meio de ensaios realizados com a subunidade α' da β -conglucina, que mostrou aumentar a ativação dos receptores de LDL através da regulação da apolipoproteína B. Quando as células eram expostas a subunidade nativa houve um acréscimo de 35 e 42% na captação e degradação da LDL-C, respectivamente. Porém, quando expostas ao hidrolisado da proteína o efeito observado foi de 104 e 122%, comparado ao controle (LOVATI et al. 2000). Outro estudo demonstrou a capacidade de um polipeptídeo recombinante formado por 216 resíduos de aminoácidos, encontrado naturalmente na sequência primária da subunidade α' da β -conglucina, em modular o metabolismo do colesterol. As células HepG2 quando expostas à concentração de 8 $\mu\text{mol/L}$ do peptídeo e apresentaram um aumento em 192 e 143% na captação e degradação da LDL-C, respectivamente. Resultados próximos foram observados nos ensaios, onde as células foram tratadas com 1 $\mu\text{mol/L}$ de sinvastatina (CONSONNI et al. 2011).

Na Tabela 1 são apresentadas as sequências e algumas características físico-químicas dos peptídeos derivados da estrutura primária da β -vignina (UniProtKB ID: *A8YQH5_VIGUN*), hidrolisada pela ação da pepsina, tripsina e quimotripsina, *in silico*. O número de 82 sequências foi obtido, no entanto, a análise para predição de bioatividade (PeptideRanker Score[®]) demonstrou que somente 13 peptídeos apresentaram algum potencial ativo com o nível de PRS $\geq 0,500$, sendo que a maioria destes apresentaram massa molecular inferior a 500 Da. Na Figura 5 é mostrada a

faixa de distribuição dos peptídeos, de acordo com a massa molecular. Os resultados encontrados demonstram que a maioria dos peptídeos com predição a bioatividade foram constituídos de 3 a 6 resíduos de aminoácidos, com valores de hidrofobicidade entre 3.0333 a -2.4499. Além disso, foi possível constatar o estabelecimento de um padrão característico pela presença de resíduos hidrofóbicos (fenilalanina, tirosina e leucina) na região C-terminal. Alguns estudos têm sugerido determinadas características físico-químicas nas sequências primárias de peptídeos, que favoreceriam a sua interação o sítio ativo da enzima HMG-CoA redutase, tais como a hidrofobicidade, que parece ter uma importância chave no modelo de inibição da HMG-CoA redutase (PAK et al. 2005). Uma nova ferramenta *in silico* tem sido proposta para a identificação de sequências com predição de interação, baseado na correlação de muitos parâmetros físico-químicos. Entre esses, foi demonstrado que o tamanho, ponto isoelétrico e a característica de hidrofobicidade de um peptídeo têm uma correlação significativa para a sua atividade (MARCZAK, OKONIEWSKA e GRABOWKI, 2016). Tem sido consenso entre os estudos já publicados, que o peptídeo com a habilidade inibitória sobre a HMG-CoA redutase deve necessariamente ser constituído de uma estrutura química com massa molar inferior a 1 kDa (MARQUES et al. 2015; MARTINEZ-VILLALUENGA et al. 2010; CHO et al. 2008; PAK et al. 2004). Dessa forma, moléculas com quatro resíduos de aminoácidos apresentariam características ótimas para complementariedade quanto ao volume ocupado na região ativa (PAK et al. 2012), sendo consistentes com estudos baseados na conformação estrutural das estatinas. Esses peptídeos atuam de maneira competitiva na região de ligação da HMG-CoA. Do mesmo modo, peptídeos com predisposição a conformação “ β -turn” tem sido considerado como parâmetro de seleção para adoção de uma conformação bioativa, sendo que a presença do resíduo

prolina poderia imitar a estrutura da nicotinamida da molécula de NADPH. O resíduo de valina tem demonstrado um efeito estérico devido ao volume de sua cadeia lateral alifática (PAK et al. 2006).

Na Tabela 2 são apresentados os resultados do *p*-valor na predição de interação dos peptídeos com as diferentes regiões dos ligantes comerciais (estatinas) à HMG-CoA redutase. Os resultados encontrados demonstraram uma elevada predição (*p*-valor $\leq 0,100$) de interação com a região catalítica da HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) para os peptídeos formados pelas sequências Gln-Gly-Phe (QGF, -0.3666), Ile-Ala-Phe (IAF, 3.0333), Gln-Asp-Phe (QDF, -1.3999) e Met-Pro-Asn-Tyr (MPNY, -1.1249). No entanto, o peptídeo QDF mostrou resultados mais favoráveis e, portanto, as análises de acoplamento molecular foram realizadas num primeiro momento para esse peptídeo.

A fim de garantir que o programa empregado nessa etapa da simulação fosse capaz de prever as interações entre HMG-CoA redutase e seus ligantes, as moléculas de água e ligantes da estrutura 1HW9 foram removidas e o encaixe do ligante (Sinvastatina) foi predito através do software Autodock-Vina[®]. Como pode ser observado na Figura 6A, a ligação predita para o ligante sinvastatina é bastante próxima (RMSD 1,47 Å) daquela encontrada na estrutura cristalográfica. Isto garante que o anel decalina, a carboxila e uma das hidroxilas realizem as interações moleculares esperadas (Figura 6B). Levando em consideração esses resultados, o encaixe do peptídeo QDF foi predito (Figuras 6C e 6D). A fenilalanina (F) ocupa a mesma configuração do anel decalina, uma vez que ambos têm características hidrofóbicas em forma de anel. A asparagina (Q) mostrou interações polares, semelhantes às do grupo carboxila da sinvastatina. Além disso, os resultados da simulação demonstraram que ocorre uma ligação de H com o resíduo Lys692, ao

invés de Arg590 (Fig. 6D). Por outro lado, foi observada uma diferença mais significativa nas interações preditas para a disposição do resíduo aspártico (D) do peptídeo, a qual demonstrou estar há uma distância mais adequada para realizar ligação de H com o resíduo Ser589 do que a sinvastatina, devido à presença de um grupo apolar na região do sítio ativo e, portanto, não é capaz de realizar esse tipo de interação. A partir dos resultados observados nessas simulações computacionais, nós sintetizamos o peptídeo, a fim de realizamos os estudos de inibição da HMG-CoA redutase *in vitro*.

O perfil cromatográfico do peptídeo bruto, após o processo de isolamento e a sua caracterização é demonstrado na Figura 7. A relação massa/carga apresentada na análise de caracterização do QDF sintetizado foi semelhante ao valor teórico mostrado na Tabela 1. A partir da análise cromatográfica (Figura 3A) é possível sugerir a presença do QDF na fração constituída por peptídeos menores do que 3 kDa, através da sobreposição dos cromatogramas. Porém, não foi possível avaliar um possível de co-eluição de outros peptídeos (LAHRICHI et al. 2013; PAK et al. 2005).

O efeito hipocolesterolêmico da fração constituída por peptídeos < 3 kDa e do peptídeo QDF foi testado *in vitro*, através da determinação do percentual de inibição da atividade da HMG-CoA redutase, a qual é reconhecida por ser a enzima chave no processo de biossíntese do colesterol. Na Tabela 3 são apresentados os resultados dos ensaios de inibição da HMG-CoA redutase. A fração formada por um “pool” de peptídeos menores do que 3 kDa, obtido a partir do fracionamento do extrato total hidrolisado, derivada da ação proteolítica das enzimas pepsina/pancreatina sobre a proteína β -vignina do feijão-caupí, mostrou ser constituída por sequências peptídicas capazes de inibir fortemente a atividade enzimática (> 95%). Este resultado foi superior ao reportado em um estudo anterior (> 89%), que utilizou o mesmo

mecanismo enzimático e processo de fracionamento para obtenção da fração peptídica (menores do que 3 kDa), porém, os autores utilizaram um hidrolisado obtido a partir do isolado proteico total do feijão caupí (MARQUES et al. 2015).

De modo semelhante, o peptídeo QDF demonstrou exercer um efeito inibitório potente da HMG-CoA redutase *in vitro*, apresentando uma concentração mínima inibitória (IC 50%) de 12.84 μM (Tabela 3). Além disso, nós observamos que o QDF inibiu a HMG-CoA redutase dependente do efeito dose-resposta (Fig. 8). Estudos anteriores mostraram que as sequências IAVP, IAVPTGVA e IAVPTGEVA apresentaram um IC (50%) de 59, 93 e 125 μM , respectivamente, frente à capacidade de inibição contra a HMG-CoA. Esses peptídeos foram obtidos à partir da estrutura da proteína glicinina (11S) da soja. Outros peptídeos oriundos desta proteína, LIAVPGEVA, LPYPR, LIAVP e LIAVPTGVA na concentração de 200 μM mostraram um percentual de inibição de HMG-CoA redutase de 62, 34, 18 e 12%, respectivamente (PAK et al. 2005a). Entre as estruturas, o IAVP demonstrou maior atividade inibitória, no entanto, cinco vezes maior que o obtido pelo peptídeo QDF. Os resultados de cinética mostraram que o efeito hipocolesterolêmico do peptídeo dá-se pela inibição da HMG-CoA redutase de forma competitiva, tanto com a região do substrato HMG-CoA quanto com a do cofator NADPH. Além disso, análises de superposição espacial na região ativa da enzima têm sugerido que o resíduo Glu poderia mimetizar parte da porção do substrato, enquanto o resíduo Pro cria interações com HMG-CoA redutase semelhantes ao observado pela porção da nicotinamida da molécula da NADPH (PAK et al. 2005b).

4 CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo que apresenta um peptídeo derivado da proteína β -vignina do feijão caupí com propriedade hipocolesterolêmica e com elevado potencial de inibição da HMG-CoA redutase, comprovado a partir de evidências *in silico* e *in vitro*. Os resultados encontrados representam a expectativa de novas investigações, sobretudo para o mecanismo cinético de inibição da enzima HMG-CoA redutase e para o desenho de novas moléculas. Algumas dessas questões estão em andamento em nosso laboratório.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by CNPq (426235/2016-9); M.B.C.S. fellowship was financed by FAPESB (BOL0433/2016). The Authors are indebted with Prof. Valdir Augusto Neves for substantial scientific comments.

STATEMENT OF CONFLICT OF INTEREST

All the authors declare no conflict of interest with regards to the described research, the publication of the result and financial issues.

REFERENCES

- ABDELHEDI, O.; NASRI, R.; MORA, L.; JRIDI, M.; TOLDRÁ, F.; NASRI, M. In silico analysis and molecular docking study of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from smooth-hound viscera protein hydrolysates fractionated by ultrafiltration. **Food Chem.** v. 239, p. 453-463, 2018.
- AKESON, W. R.; STAHMANN, M. A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **J Nutr.** v. 83:3, p. 257-261, 1964.
- ALUKO, R. E.; YADA, R. Y.; LENCKI, R. W.; MARANGONI, A. G. Structural and functional properties of a partially purified cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin modified with protein kinase and glycopeptidase. **J Agric Food Chem.** v. 45, p. 2907-2913, 1997.
- AWIKA, J. M.; DUODU, K. G. Bioactive polyphenols and peptides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their health promoting properties: A review. **J Funct Food.** xxx (2016) xxx-xxx.
- CHO, S. J.; JUILLERAT, M. A.; LEE, C-H. Peptides from soybean hydrolysate in human hepatocytes. **J Agric Food Chem.** v. 56, p. 4372-4376, 2008.
- CONSONNI, A.; LOVATI, M. R.; PAROLARI, A.; MANZONI, C.; MORAZZONI, P.; DURANTI, M. Heterologous expression and purification of the soybean 7S globulin subunit extension region: In vitro evidence of its involvement in cell cholesterol homeostasis. **Protein Express Purif.** v. 80, p. 125-129, 2011.
- FASSINI, P. G.; FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; NEVES, V. A.; DEMONTE, A. Soybean glycinin (11S) increases HDL-cholesterol in hypercholesterolemic rats. **Nutr Food Sci.** v. 42, 102-110, 2012.
- FERREIRA, E. S.; AMARAL, A. L. S.; CAPRARO, J.; DEMONTE, A.; ZANELLI, C. F.; DURANTI, M.; NEVES, V. A. Hypocholesterolaemic effect of rat-administered oral doses of the isolated 7S globulins from cowpeas and adzuki beans. **J Nutr Sci.** v. 4, p. doi:10.1017/jns, 2015.
- FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. Beta-conglycinin combined with fenofibrate or rosuvastatin have exerted distinct hypocholesterolemic effects in rats. **Lip health dis.** v. 11, p. 11, 2012.
- FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. Soy beta-Conglycinin (7S globulin) reduces plasma and liver cholesterol in rats fed hypercholesterolemic diet. **J Med Food.** v. 14, p. 94-100, 2011.
- FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. beta-conglycinin (7S) and glycinin (11S) exert a hypocholesterolemic effect comparable to that of fenofibrate in rats fed a high-cholesterol diet. **J Funct Food.** v. 2, p. 275-283, 2010.

FILHO, F. R. F. et al. **Feijão-caupí no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84 p.

Food and Drug Administration (FDA). Food labeling: Health claims; soybean protein and coronary heart disease. **Federal Register, Rules and Regulations**, 64, 57700-57733, 1999.

FREITAS, R. L.; TEIXEIRA, A. R.; FERREIRA, R. B. Characterization of the Proteins from *Vigna unguiculata* Seeds. **J Agric Food Chem**. v. 52, p. 1682-1687, 2004.

FROTA, K. M. G.; SANTOS, R. D.; RIBEIRO, V. Q.; ARÊAS, J. A. G. Cowpea protein reduces LDL-cholesterol and apolipoprotein B concentrations, but does not improve biomarkers of inflammation or endothelial dysfunction in adults with moderate hypercholesterolemia. **Nutr Hop**. v. 31, p. 1611-1619, 2015.

GIACOMETTI, J.; BURETIC-TOMLJANOVIC, A. Peptidomics as a tool for characterizing bioactive milk peptides. **Food Chem**. v. 230, p. 91-98, 2017.

GUPTA, P.; SINGH, R.; MALHOTRA, S.; BOORA, K. S.; SINGAL, H. R. Characterization of seed storage proteins in high protein genotypes of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Physiol Mol Biol Plants**. v. 16:1, p. 53-58, 2010.

HULCHER, F. H.; OLESON, W. H. Simplified spectrophotometric assay for microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by measurement of coenzyme A. **J Lipid Res**. v. 14, p. 625-631, 1973.

KANETRO, B. Hypocholesterolemic Properties of Protein Isolate from Cowpeas (*Vigna unguiculata*) Sprout in Normal and Diabetic Rats. **Procedia Food Sci**. v. 3, p. 112-118, 2015.

LAEMLLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-684, 1970.

LAHRICHI, S. L.; AFFOLTER, M.; ZOLEZZI, I. S.; PANCHAUD, A. Food Peptidomics: Large scale analysis of small bioactive peptides - A pilot study. **J Proteomic**. v. 88, p. 83-91, 2013.

LAMMI, C.; ZANONI, C.; ARNOLDI, A. IAVPGEVA, IAVPTGVA, and LPYP, three peptides from soy glycinin, modulate cholesterol metabolism in HepG2 cells through the activation of the LDLR-SREBP2 pathway. **J Func food**. v. 14, p. 469-478, 2015.

LIU, Y.; YANG, J.; LEI, L.; WANG, L.; WANG, X.; MA, K. Y. YANG, X.; CHEN, Z-Y. 7S protein is more effective than total soybean protein isolate in reducing plasma cholesterol. **J Func Food**. v. 36, p. 18-26, 2017.

LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; PIZZAGALLI, A. Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. **J Nutr**. v. 130, p. 2543-2549, 2000.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**. v. 193, p. 265-275, 1951.

LUNA-VITAL, D. A.; MEJÍA, E. G.; DIA, V. P.; LOARCA-PIÑA, G. Peptides in common bean fractions inhibit human colorectal cancer cells. **Food Chem.** v. 157, p. 347-355. 2014.

MAESTRI, E.; MARMIROLI, M.; MARMIROLI, N. Bioactive peptides in plant-derived foodstuffs. **J Prot.** v. 16, p. 140-155, 2016.

MARCZAK, M.; OKONIEWSKA, K.; GRABOWSKI, T. Classification model of amino acid sequences prone to aggregation of therapeutic proteins. **In Silico Pharmacol.** v. 4, p. 1-10, 2016.

MARQUES, M. R.; FREITAS, R. A. M. S.; CARLOS, A. C. C.; SIGUEMOTO, E. S.; FONTANARI, G. G.; ARÊAS, J. A. G. Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilisation into micelles. **Food Chem.** v. 168, p. 288-293, 2015.

MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; RUPASINGHE, S. G.; SCHULER, A. M.; MEJIA, E. G. Peptides from purified soybean β -conglycinin inhibit fatty acid synthase by interaction with the thioesterase catalytic domain. **FEBS J.** v. 277, p. 1481-1493, 2010.

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **J Am Chem Soc.** v. 85, p. 2149-2154, 1963.

MONTALES, M. T. E.; SIMMEN, R. C. M.; FERREIRA, E. S.; NEVES, V. A.; SIMMEN, F. A. Metformin and soybean-derived bioactive molecules attenuate the expansion of stem cell-like epithelial subpopulation and confer apoptotic sensitivity in human colon cancer cells. **Genes Nutr.** v. 10, p. 49, 2015.

NASSL, A-M, RUBIO-ALIAGA, I, SAILER, M, DANIEL, H. The Intestinal Peptide Transporter PEPT1 Is Involved in Food Intake Regulation in Mice Fed a High-Protein Diet. **PLoS One.** v. 6, 2011. e26407.

PABONA, J. M. P.; DAVE, B.; SU, Y.; MONTALES, M. T. E.; LUMEN, B. O.; MEJIA, E. G.; RAHAL, O. M.; SIMMEN, R. C. M. The soybean peptide lunasin promotes apoptosis of mammary epithelial cells via induction of tumor suppressor PTEN: similarities and distinct actions from soy isoflavone genistein. **Genes Nutr.** v.8, p. 79-90, 2013.

PAK, V. V.; KOO, M.; YUN, L.; KWON, D. Y. Design of a highly potent inhibitory peptide acting as a competitive inhibitor of HMG-CoA reductase. **Amino Acids.** v. 43, p. 2015-2025, 2012.

PAK, V. V.; KOO, M. S.; KIM, M. J.; YANG, H. J.; YUN, L.; KWON, D. Y.; KASIMOVA, T. D. Modeling an active conformation for linear peptides and design of a competitive inhibitor for HMG-CoA reductase. **J Mol Recognit.** v. 21, p. 224-232, 2008.

PAK, V. V.; KIM, S. H.; KOO, M.; LEE, N.; SHAKHIDOYATOV, K. M.; KWON, D. Y. Inhibitor for HMG-CoA Reductase Based on Statin Structure. **Biopolymers.** v. 84, p. 586-594, 2006.

PAK, V. V.; KOO, M. S.; KASIMOVA, T. D.; KWON, D. Y. Isolation and identification of peptides from soy 11s-globulin with hypocholesterolemic activity. **Chem Nat Comp.** v. 41, p. 710-714, 2005a.

PAK, V. V.; KOO, M. S.; LEE, N.; OH, S. K.; KIM, M. S.; LEE, J-S.; KWON, D. A. Y. Hypocholesterolemic soybean peptide (IAVP) inhibits HMG-CoA reductase in a competitive manner. **Food Sci Biotechn.** v. 14, p. 727-731, 2005b.

PAK, V. V.; KOO, M. S.; KWON, D. Y.; KASIMOVA, T. D. Conformation analysis of ILE-ALA-VAL-PRO peptide and its derivatives by circular dichroism. **Chem Nat Comp.** v. 40, p. 398-404, 2004.

QANDEEL, H. G.; ALONSO, F.; HERNANDEZ, D. J.; MADHAVAN, S.; DUENES, J. A.; ZHENG, Y.; SARR, M. G. Peptide Absorption After Massive Proximal Small Bowel Resection: Mechanisms of Ileal Adaptation. **J Gastrointest Surg.** v. 15, p. 1537-1547, 2011.

RIZZELLO, C. G.; TAGLIAZUCCHI, D.; BABINI, E. RUTELLA, G. S.; SAA, D. L. T.; GIANOTTI, A. Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. **J Funct Food.** v. 27, p. 549-569, 2016.

TACHIBANA, N.; YAMASHITA, Y.; NAGATA, M.; WANEZAKI, S.; ASHIDA, H.; HORIO, F.; KOHNO, M. Soy β -conglycinin improves glucose uptake in skeletal muscle and ameliorates hepatic insulin resistance in Goto-Kakizaki rats. **Nutr Res.** v. 34, p. 160-167, 2014.

TRABUCO, L. G.; LISE, S.; PETSALAKI, E.; RUSSELL, R. B. PepSite: prediction of peptide-binding sites from protein surfaces. **Nucleic Acids Res.** v. 40, p. 423-226, 2012.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **J Comp Chem.** v. 31, p. 455-461, 2010.

WETHTHASINGHE, P.; LIYANAGE, R.; VIDANARACHCHI, J.; PERERA, O.; JAYAWARDAN, B. Hypocholesterolemic and Hypoglycemic Effect of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) Incorporated Experimental Diets in Wistar Rats (*Rattus norvegicus*). **Agric Agric Sci Procedia.** v. 2, p. 401-405, 2014.

YOSHIKAWA, M. Bioactive peptides derived from natural proteins with respect to diversity of their receptors and physiological effects. **Peptides.** v. 72, p. 208-225, 2015.

ZHONG, F.; LIU, J.; MA, J. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. **Food Res Inter.** v. 40, p. 661-667, 2007.

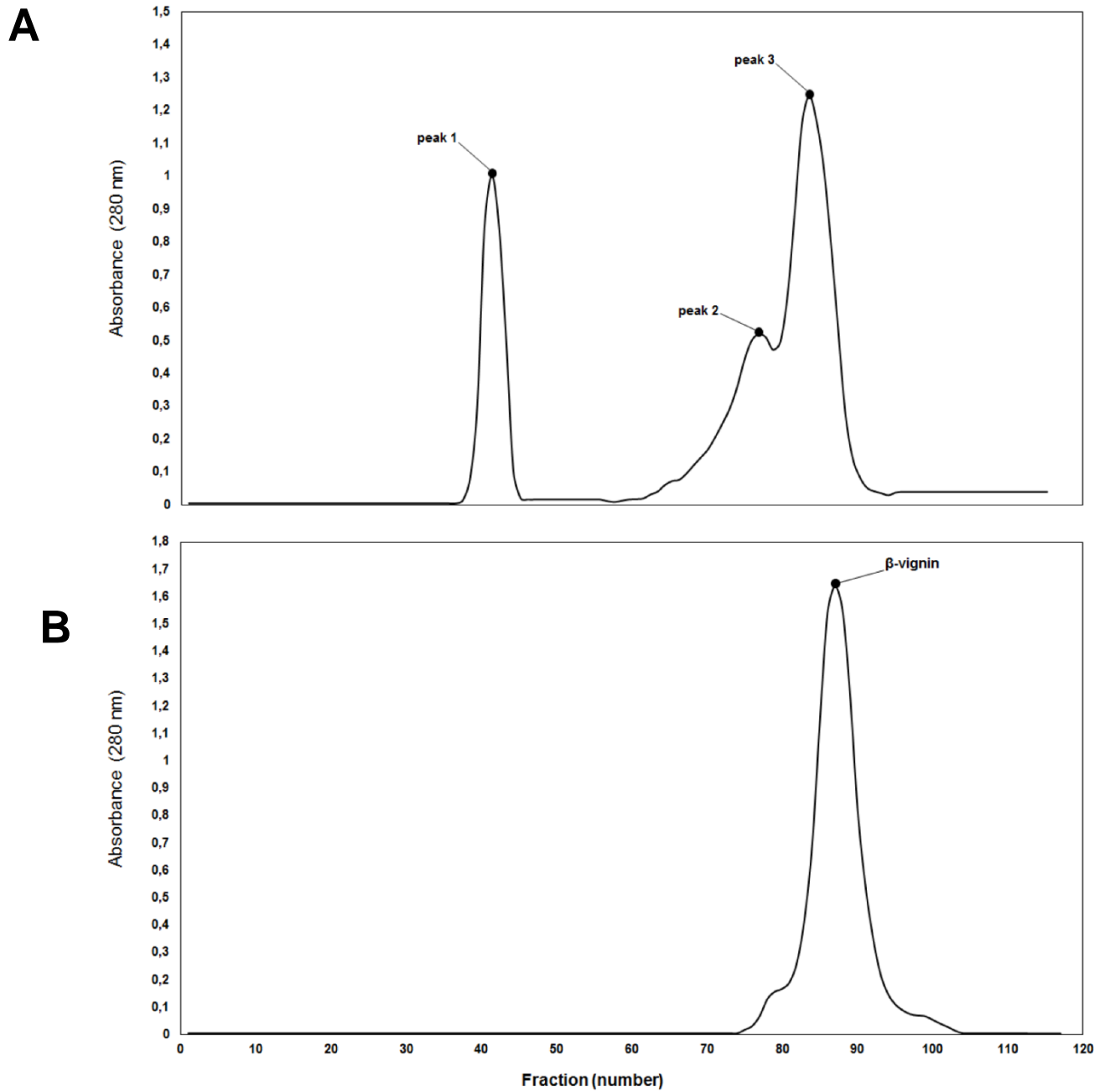


Figura 2.1 – Cromatografia de filtração em gel de β -vignina (A) e perfis de pico re-cromatografados (B), conforme detalhado em material e métodos.

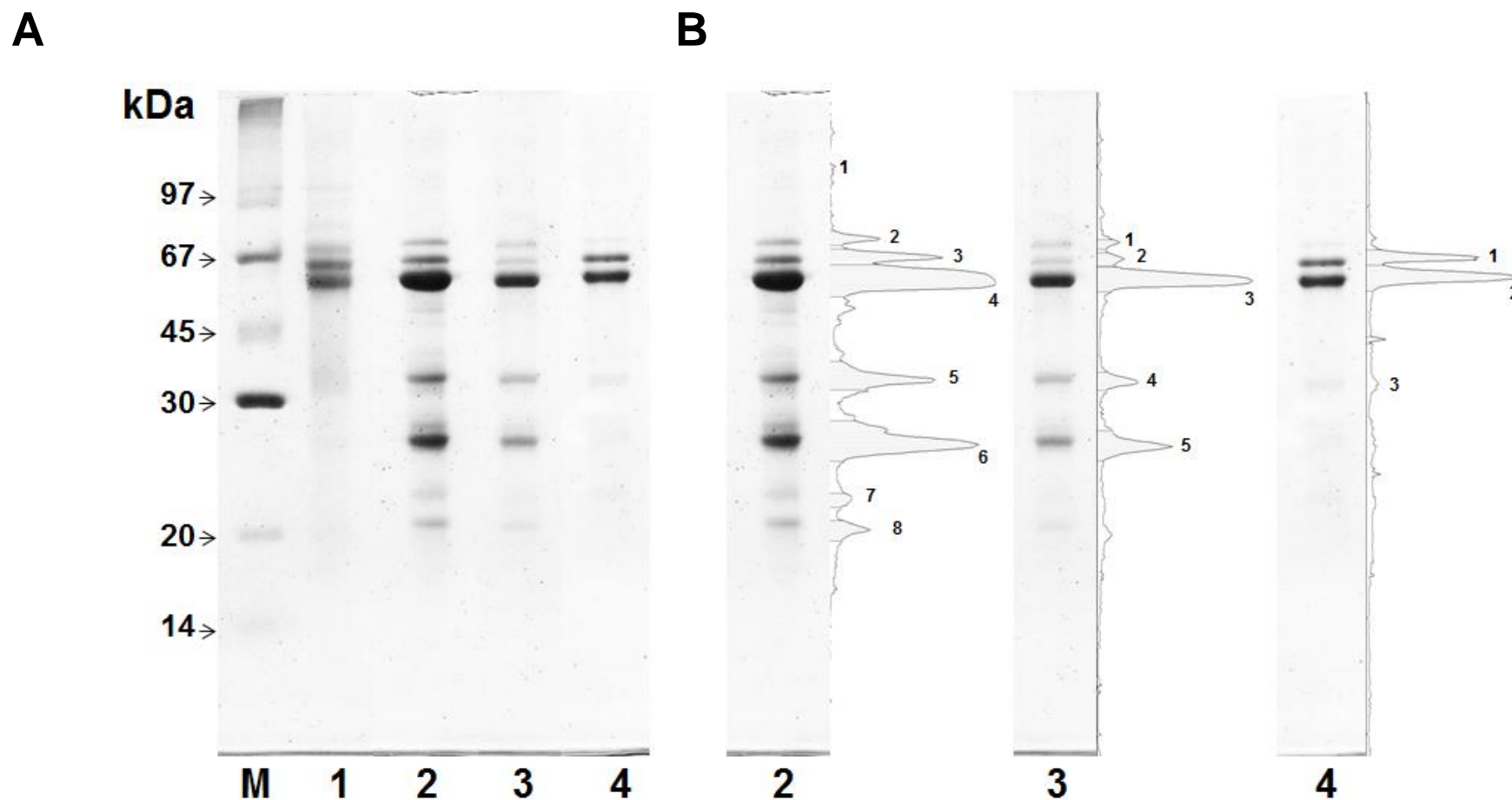


Figura 2.2 – Perfil SDS-PAGE sob condições redutoras de β -vignina (A) de caupi e análise densitométrica (B). A massa molecular dos marcadores de proteínas (M) são expressas como kDa; A coluna 1 representa o extrato total de proteína do caupi; As colunas 2 representam o extrato de globulina; As colunas 3 representam a β -vignina do caupi isolada e as colunas 4 representam a β -vignina do caupi cromatografada. As quantidades de amostras foram de cerca de 10 μ g.

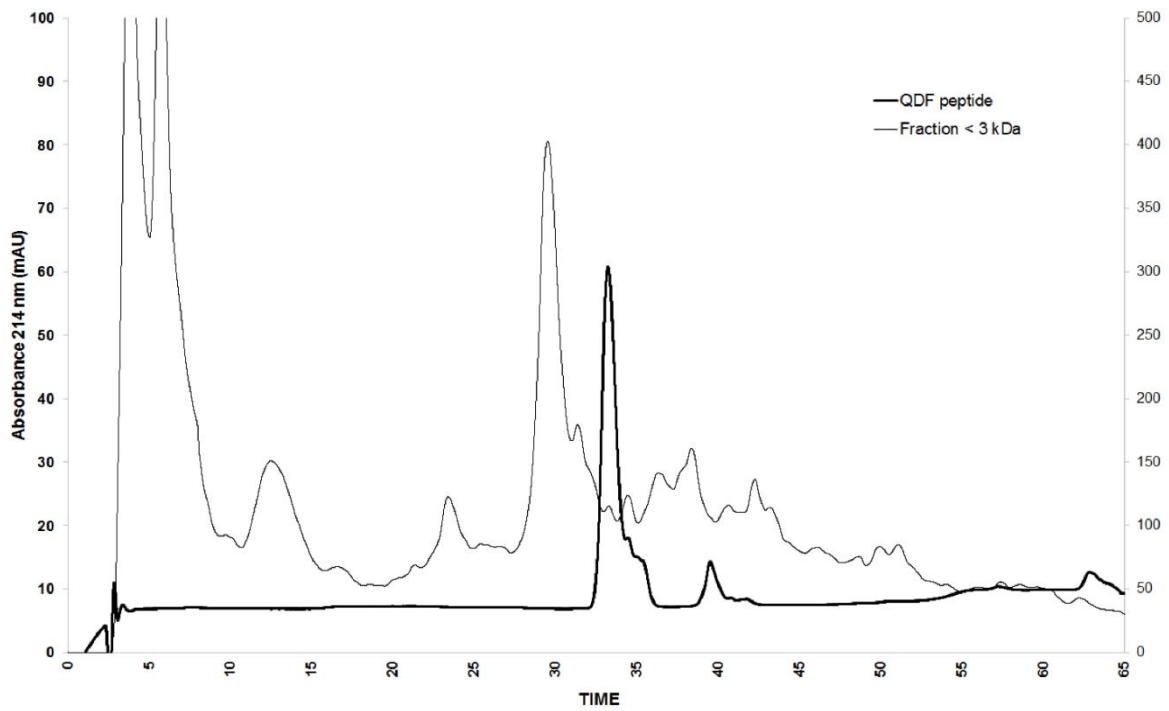
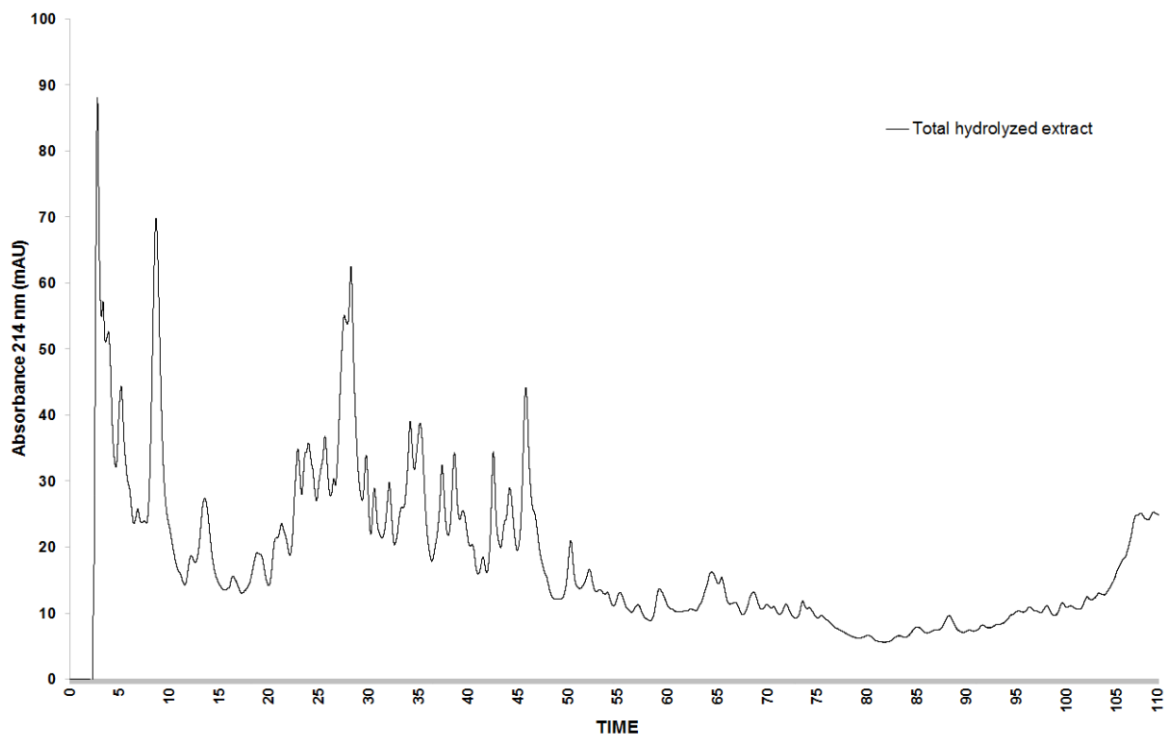
A**B**

Figura 2.3 – Cromatografia FR-CLAE da fração peptídica menor do que 3 kDa (A) e extracto hidrolisado total (B).

```

A8YQH5_VIGUN  ----VPLLLLGLVFLASLSVSVFGIVHRG-----
A4PI98_PHAAN  -----IVHRE-----
GLCAP_SOYBN   MMRARFPLLLLGWVFLASVSVSFGIAYWEKQNP SHNKLRSCNSEKDSYRNQACHARCNLLKVEEEEECEEGQIPRPRQPHERERQQHGEKEEDEGEQP
                *.:

A8YQH5_VIGUN  -----HQESQEE-----
A4PI98_PHAAN  -----HHESREEV-----
GLCAP_SOYBN   RPFPPRPRQPHEEEHEQKEEHEWHRKEEKHGGKGSEEEQDEREHPRHQP HQKEEEKHEWQHKEKHQKQKESEEEEEEDQDEDEEQDKESQESGSESQ
                *:*..*

A8YQH5_VIGUN  --SEPRQNNPFYFSDRWFTLFRNQYGLRVLQRFQDQSKQIQNLENYRVVEFQSKPNTLLLPHHADADFLVWLNGRAILTLVNPDGRDSYILEQGH
A4PI98_PHAAN  --SVSSGKNNPFYFNSDRWFRTLYRNEWGHIRVLQRFQDQSKQMQNLENYRVVEFQSKPNTLLLPHHADADFLVWLNGTAVLTLVNPDSRDSYILEQGH
GLCAP_SOYBN   REPRRHKNKNPFHFNSKR-FQTLFKNQYGHVRVLQRFNKRSQLQNLRDYRILEFNSKPNTLLLPHHADADYLIVILNGTAILTLVNDDRDSYNLQSGD
                . :***:*:* * :***:*:* :***:*****:***:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
                . :***:*:* * :***:*:* * :***:*****:***:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

A8YQH5_VIGUN  AQKTPAGTFFLVNHHDDNE-----NLRIVKLAVPVNPNHRFQDFFLSSTEAAQSYLQGF SKNILEASFDSDFKINRVLFGEEEQK
A4PI98_PHAAN  AQKIPAGTFFLVNPPDDNE-----NLRIKLAIPVNNPHRFQDFFLSSTEAAQSYLRGF SKNILEASFDSDFKINRVLFGEEERQQ
GLCAP_SOYBN   ALRVPAGTTFYVNPNDNENLRMIAGTTFYVNPNDNENLRMITLAIPVKNKPGRFESFFLSSTQAQSYLQGF SKNILEASYDTKFEINKVLFGREEGQ
                * : *****:* * : * :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
                * : *****:* * : * :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

A8YQH5_VIGUN  QQDEESQQEGVIVQLKREQIRELMKHAKSTSKKSLSTQNEPFLNRSQKPIYSNKFGRLEITPEKNPQLRDLDFVLTSSVDIKEGGLLMPNYNSKAIIVLV
A4PI98_PHAAN  QQGEESREEGVIVELKREQIQELMKHAKSSSRKELSSQDEPFLNRSKPIYSNKFGRWYEMTPEKNPQLKDLDFVLISSVDMKEGALLPHYSSKAIIVIMV
GLCAP_SOYBN   QQGEERLQESVIVEISKQIRELSKHAKSSSRKTISSEDKPFLNLSRDPYISNKLGLKFEIT-QRNPQLRDLDFVLSVDMNEGALFLPHFNSKAIIVLV
                **.* * :***:..:***:* *****:* * :***:***** . *****:* . * * :***:*****: * :***:* * :***:*****:
                * :***:***** :***: * : * :*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

A8YQH5_VIGUN  VNKGEANIELVGQREQQQQ--QQEESWEVQRYRAEVSDDDVFVIPASYPVAITATSNLNFIAFGINAENNRNFLAGGEDNVMSEIPTVLDVTFPASGE
A4PI98_PHAAN  INEGEAKIELVGLSDQQQQK-QQEESLEVQRYRAELSEDDVFVIPAAYPVAINATSNLNFIAFGINAENNRNFLAGGKDNVMSEIPTVLEVSFPASGK
GLCAP_SOYBN   INEGEANIELVGIKEQQQRQQQEEQPLEVRKYRAELSEQDIFVIPAGYPMVNATSDLNFFAFGINAENNRNFLAGSKDNVISQIPSQVQELAFPRSAK
                * :***:***** :***: * : * :*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
                * :***:***** :***: * : * :*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

A8YQH5_VIGUN  KVEKLINKQSDSHFTDHSKREERV-----
A4PI98_PHAAN  KVEKLIKQSESHFVDAQPEQQQREEGHKGRKGSLSLILGSLY
GLCAP_SOYBN   DIENLIKQSESYFVDAQP--QQKEEGNKGRKGPLSSILRAFY
                .:***:..**:*:* * .. : :

```

Figura 2.4 – Alinhamento das sequências de β-vignina do feijão-caupí. As sequências de aminoácidos da beta-vignina de caupi (ID: A8YQH5_VIGUN) disponíveis em UniProt / TrEMBL foram alinhadas usando Clustal W 1.83. A subunidade de sequências 7S1 de β-vignina do feijão adzuki (ID: A4PI98_PHAAN) e subunidade alfa 'de β-conglicinina das proteínas homólogas de soja (ID: GLCAP_SOYBN) também são mostradas. Cada linha completa mostra 100 resíduos de aminoácidos. Asteriscos: idêntico; Ponto e vírgula: substituição conservada; Parada completa: substituição semi-conservada.

Tabela 2.1 – Triagem *in silico* de peptídeos derivados de beta-vignina de caupi* hidrolisado com pepsina, tripsina e quimotripsina.

Peptide N°	Sequence ^a	Isoelectric point	MW	N° aa	Localization	Repetition	Hydrophobicity ^c	PRS ^b
1	VPL	5.49	327.42	3	1-3	1	2.1333	0.37
2	GVL	5.52	287.36	3	7-9	1	2.5333	0.31
3	ASL	5.57	289.33	3	12-14	1	1.6000	0.25
4	SVSF	5.24	438.48	4	15-18	1	1.3500	0.41
5	GIVHR	9.75	580.69	5	19-23	1	0.1200	0.20
6	GHQESQEESEPR	4.48	1412.39	12	24-35	1	-2.6916	0.09
7	GQNNPF	5.52	675.70	6	36-41	1	-1.6166	0.80
8	DSDR	4.20	491.46	4	44-47	1	-3.0749	0.20
9	HTL	6.74	369.42	3	50-52	1	-0.0332	0.14
10	NQY	5.52	423.43	3	55-57	1	-2.7666	0.16
11	GHL	6.74	325.37	3	58-60	1	0.0667	0.59
12	VL	5.49	230.31	2	62-63; 202-203	2	4.0000	0.13
13	QR	9.75	302.33	2	64-65	1	-3.9999	0.27
14	DQR	5.83	417.42	3	67-69	1	-3.8332	0.19
15	SK	8.46	233.27	2	70-71; 184-185	2	-2.3499	0.07
16	QIQNL	5.52	614.70	5	72-76	1	-0.4399	0.23
17	ENY	3.99	424.41	3	77-79	1	-2.7666	0.07
18	VVEF	3.99	492.57	4	81-84	1	1.9250	0.13
19	QSK	8.75	361.40	3	85-87	1	-2.7332	0.07
20	PNTL	5.95	443.50	4	88-91	1	-0.4999	0.32
21	PHHADADF	5.05	908.93	8	94-101	1	-1.0749	0.51
22	VVL	5.49	329.44	3	104-106	1	4.0667	0.06
23	NGR	9.75	345.36	3	107-109	1	-2.7999	0.46
24	AIL	5.57	315.41	3	110-112	1	3.3667	0.33
25	TL	5.18	232.28	2	113-114	1	1.5500	0.14
26	VNPDGR	5.80	656.70	6	115-120	1	-1.5499	0.39
27	DSY	3.79	383.36	3	121-123	1	-1.8666	0.18
28	IL	5.52	244.33	2	124-125	1	4.1500	0.39

29	EQGHAQK	6.84	796.84	6	126-132	1	-2.3142	0.08
30	TPAGTTF	5.18	693.75	7	133-139	1	0.0714	0.33
31	VNHDDNENL	4.02	1069.05	9	142-150	1	-1.7999	0.15
32	IVK	8.75	358.48	3	152-154	1	1.6000	0.05
33	AVPVNNPHR	9.80	1003.13	9	156-164	1	-0.8555	0.47
34	QDF	3.79	408.41	3	166-168	1	-1.3999	0.74
35	SSTEAAQSY	3.99	999.99	9	171-179	1	-1.4555	0.08
36	QGF	5.52	350.37	3	181-183	1	-0.3666	0.94
37	NIL	5.52	358.44	3	186-188	1	1.6000	0.26
38	EASF	3.99	452.46	4	189-192	1	0.0750	0.30
39	DSDF	3.56	482.45	4	193-196	1	-1.2499	0.60
40	EINR	6.10	530.58	4	198-201	1	-1.7499	0.08
41	GEEEQK	4.25	718.72	6	205-210	1	-3.0499	0.04
42	QQDEESQQEGVIVQL	3.50	1729.82	12	211-225	1	-1.0666	0.11
43	EQIR	6.10	544.61	4	228-231	1	-1.7499	0.09
44	EL	3.99	260.29	2	232-233	1	0.1500	0.07
45	MK	8.50	277.38	2	234-235	1	-0.9999	0.45
46	HAK	8.75	354.41	3	236-238	1	-1.7666	0.11
47	STSK	8.46	421.45	4	239-242	1	-1.5499	0.06
48	SL	5.24	218.25	2	244-245	1	1.5000	0.33
49	STQNEPF	3.99	821.84	7	246-252	1	-1.5428	0.35
50	NL	5.52	245.28	2	253-254	1	0.1500	0.29
51	SQK	8.46	361.40	3	256-258	1	-2.7332	0.08
52	PIY	5.95	391.47	3	259-261	1	0.5333	0.60
53	SNK	8.46	347.37	3	262-264	1	-2.7332	0.09
54	GR	9.75	231.25	2	266-267	1	-2.4499	0.77
55	HEITPEK	5.39	852.94	7	269-275	1	-1.6999	0.09
56	NPQL	5.52	470.53	4	276-279	1	-1.1999	0.47
57	DL	3.79	246.26	2	281-282	1	0.1500	0.33
58	DVF	3.79	379.41	3	283-285	1	1.1667	0.55
59	TSVDIK	5.49	661.75	6	287-292	1	-0.0332	0.08
60	EGGL	3.99	374.39	4	293-296	1	-0.1249	0.37

61	MPNY	5.27	523.60	4	298-301	1	-1.1249	0.74
62	NSK	8.75	347.37	3	302-304	1	-2.7332	0.07
63	AIVIL	5.57	527.70	5	305-309	1	3.7600	0.24
64	VVNK	8.72	458.56	4	310-313	1	0.2500	0.03
65	GEANIEL	3.79	744.80	7	314-320	1	-0.1142	0.14
66	VGQR	9.72	458.52	4	321-324	1	-1.0499	0.17
67	EQQQQQQEESW	3.67	1447.44	11	325-335	1	-3.0181	0.09
68	EVQR	6.10	530.58	4	336-339	1	-1.8249	0.04
69	AEVSDDDF	3.37	996.00	9	342-350	1	-0.1999	0.19
70	VIPASY	5.49	648.76	6	351-356	1	1.1333	0.17
71	PVAITATSNL	5.95	986.13	10	357-366	1	0.8800	0.14
72	NF	5.52	279.30	2	367-368; 381-382	2	-0.3499	0.94
73	IAF	5.52	349.43	3	369-371	1	3.0333	0.82
74	GINAENNQR	6.00	1015.05	9	372-380	1	-1.7888	0.12
75	AGEEDNVMSEIPTEVL	3.44	1732.88	16	384-399	1	-0.2562	0.16
76	DVTF	3.79	480.52	4	400-403	1	0.7000	0.32
77	PASGEK	6.42	587.63	6	404-409	1	-1.3999	0.17
78	VEK	5.97	374.44	3	410-412	1	-1.0666	0.02
79	INK	8.75	373.45	3	414-416	1	-0.9666	0.10
80	QSDSHF	5.07	719.71	6	417-422	1	-1.4999	0.52
81	TDHSSK	6.40	673.68	6	423-428	1	-2.1499	0.06
82	EER	4.53	432.43	3	430-432	1	-3.8332	0.04

*Para prever a os sítios de clivagem da globulina-7S de feijão-caupí utilizou-se a sequência de aminoácidos disponível no banco de dados UniProt (Identidade: A8YQH5_VIGUN). Como descrito em material e métodos.

^aOs dados dos peptídeos, ponto isoelétrico, massa molar (MW), número de aminoácidos e repetição foram acessados pelo BIOPEP, disponível no <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>

^bA pontuação PeptideRanker (PRS) refere-se a probabilidade dos peptídeos serem bioativos, disponível no http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/Server_pages/peptideranker.php

^cO valor de hidrofobicidade para cada peptídeo foi calculado utilizando a seguinte equação: Hidrofobicidade do peptídeo = $\sum [(massa\ molar\ de\ cada\ aminoácido) \times (constante\ do\ substituinte,\ caracterizando\ a\ cadeia\ lateral\ do\ aminoácido)] / \sum (massa\ molar\ de\ cada\ aminoácido)$, através do software ProPAS® versão 1.1, disponível no <http://www.mybiosoftware.com/propas-1-1-protein-property-analysis-software.html>

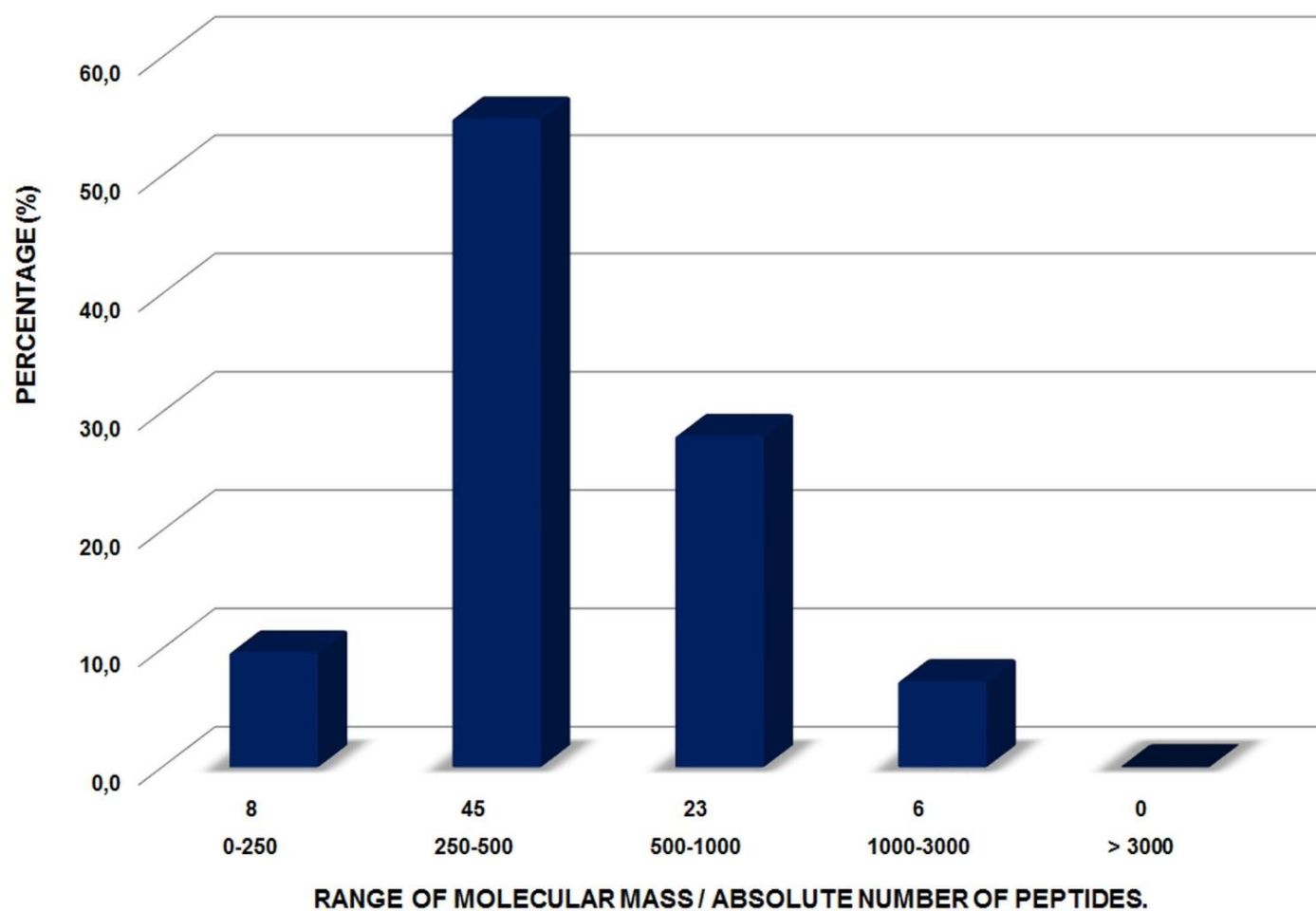


Figura 2.5 – Faixa de massa molar / número absoluto de peptídeos derivados de proteína β -vignina de feijão de caupí, hidrolisado in vitro.

Tabela 2.2 – Peptídeos selecionados para prever a probabilidade de interação com o complexo catalítico de HMG-CoA redutase das estatinas

Peptide N°	Sequence ^a	PeptideRanker Score ^b	p-value ^c						
			1HW9	1HW8	1HWL	1HWK	1HWI	1HWJ	1T02
1	QGF	0.94	0.0690	0.0529	0.0529	0.0048	0.0475	0.1071	0.0116
2	NF	0.94	0.1541	0.1567	0.1681	0.0234	0.1070	0.1333	0.0350
3	IAF	0.82	0.5598	0.1816	0.2843	0.0915	0.1840	0.0683	0.0554
4	GQNNPF	0.80	0.4906	0.3900	0.1748	0.1462	0.2059	0.2313	0.0214
5	GR	0.77	0.2114	0.1674	0.2195	0.1586	0.2781	0.2760	0.0072
6	QDF	0.74	0.0808	0.1005	0.0915	0.0177	0.0471	0.1183	0.0542
7	MPNY	0.74	0.2655	0.0738	0.0494	0.0518	0.0765	0.3171	0.0121
8	PIY	0.60	0.2373	0.0808	0.1502	0.1589	0.1658	0.2226	0.0440
9	DSDF	0.60	0.4897	0.4531	0.5041	0.5256	0.6500	0.5618	0.1165
10	GHL	0.59	0.2756	0.5444	0.6322	0.2395	0.2863	0.3147	0.1619
11	DVF	0.55	0.6206	0.3152	0.7025	0.5478	0.2534	0.2522	0.2522
12	QSDSHF	0.52	0.7624	0.5400	0.7313	0.2644	0.6798	0.7051	0.5280
13	PHHADADF	0.51	0.7829	0.6969	0.5645	0.8212	0.8291	0.8336	0.2986

^aA sequência de peptídeos foi obtida através da análise no BIOPEP, como descrito em material métodos.

^bPontuação PeptideRanker, ver na tabela anterior.

^cp-value refere-se a ao calculo da probabilidade de interação protein-peptídeo, predita pelo PepSite2, disponível no <http://pepsite2.russelllab.org>.

PDB ID: 1HW9, refere-se ao complexo catalítico da HMG-CoA reductase com a Sinvastatina. PDB ID: 1HW8, Mevastatina, como citado anteriormente. PDB ID: 1HWL, Rosuvastatina, como citado anteriormente. PDB ID: 1HWK, Atorvastatina, como citado anteriormente. PDB ID: 1HWI, Fluvastatina, como citado anteriormente. PDB ID: 1HWJ, Cerivastatina, como citado anteriormente. PDB ID: 1T02, Lovastatina, como citado anteriormente.

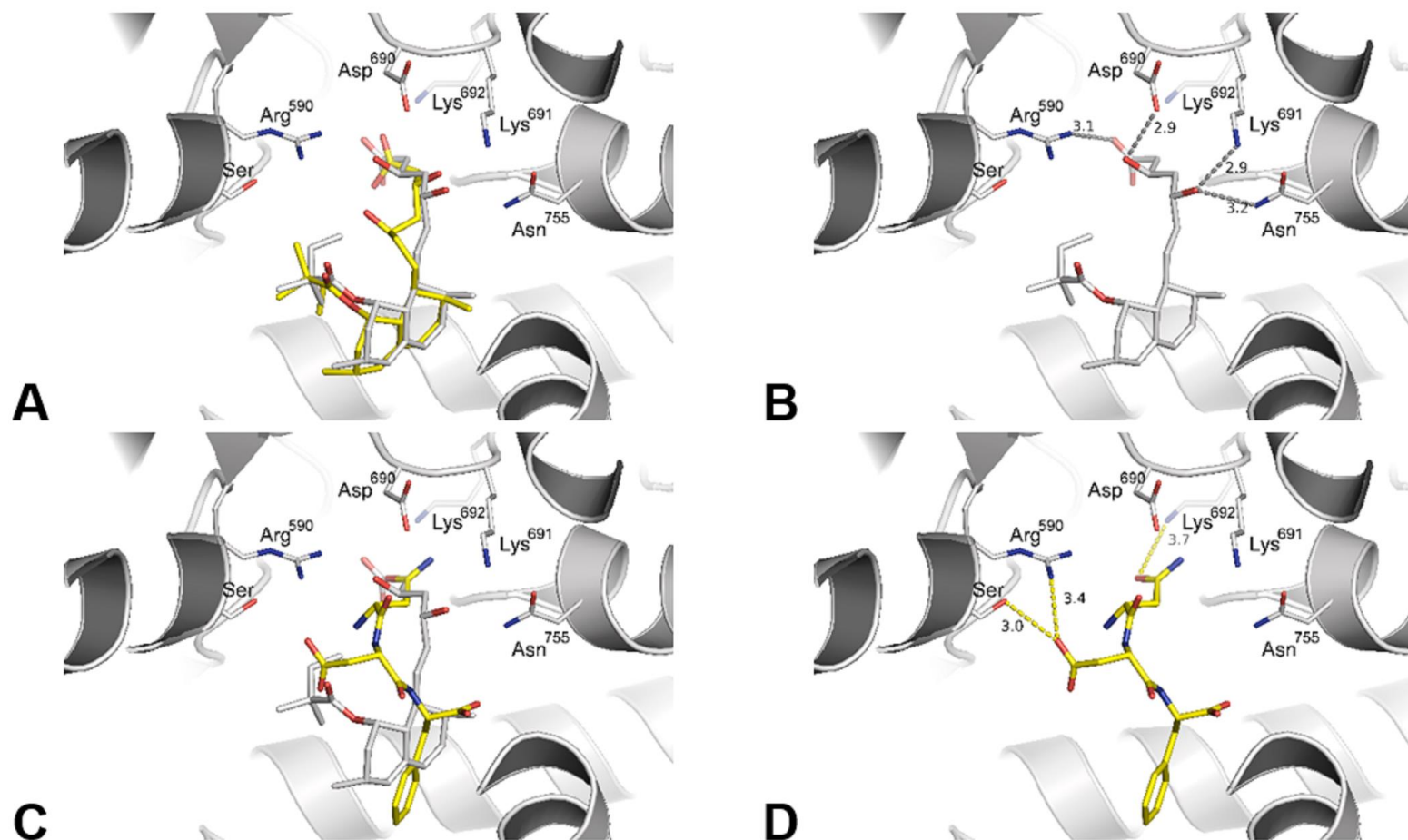


Figura 2.6 – Análise de docking da simvastatina e do peptídeo QDF com o complexo catalítico de HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software VINA-Docking®. Posição (redocking) do projetado (A) e dos sítios de previsão (docking) de interação (B) da simvastatina no sítio ativo; Posição (redocking) da estrutura (C) e dos sítios de previsão (docking) de interação (D) do peptídeo QDF no espaço ativo. Os átomos de oxigênio, nitrogênio, carbono e enxofre são mostrados em vermelho, azul, azul claro e amarelo, respectivamente. Todas as imagens geradas usando o software PyMOL 1.6.

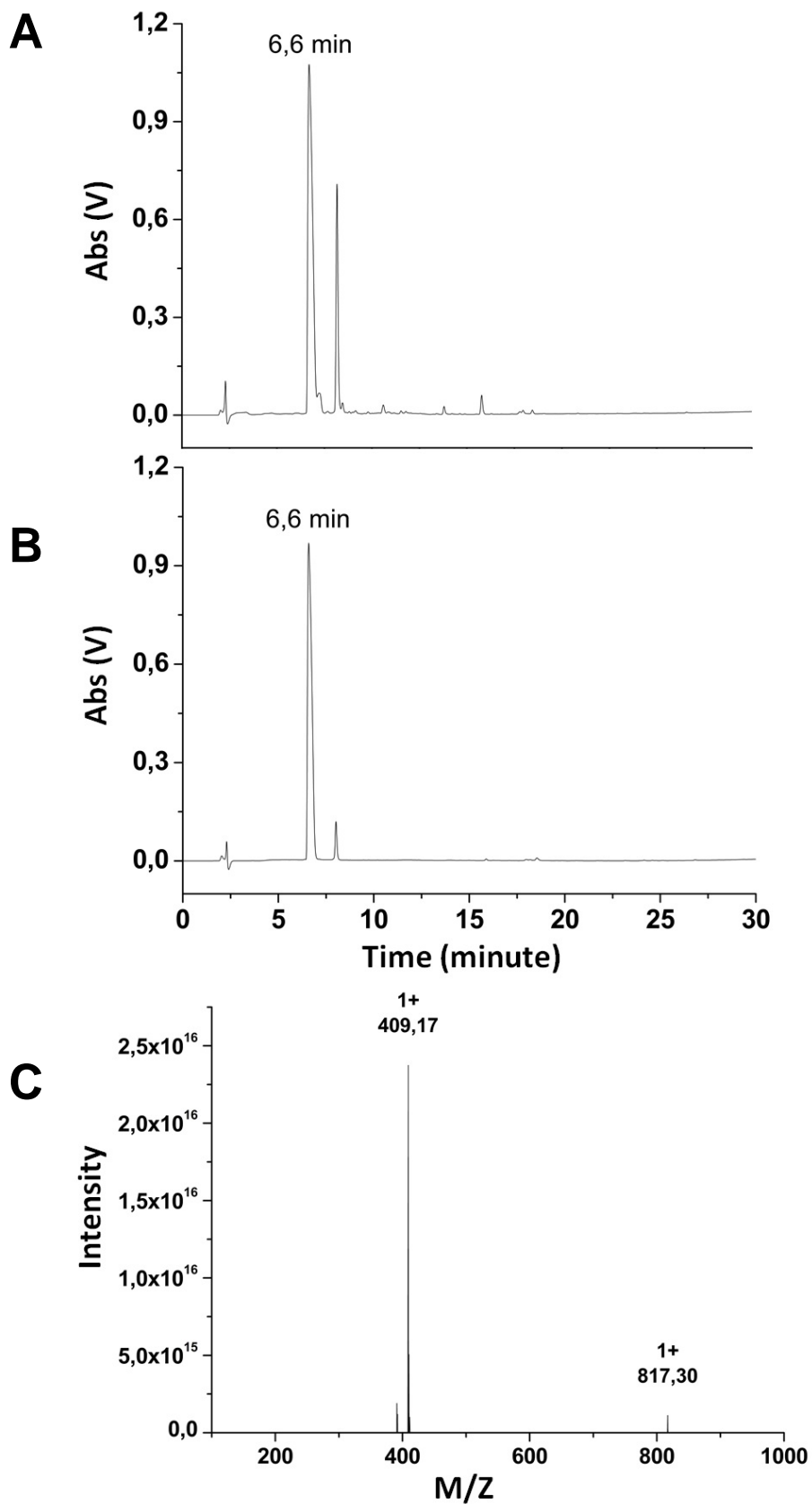


Figura 2.7 – O cromatograma FR-CLAE do peptídeo QDF sintetizado. Perfil cromatográfico antes do passo de purificação (A), após o passo de purificação (B) e espectro de massa do peptídeo (relação massa a carga (m/z) 409,17 Da).

Tabela 2.3 – Inibição da atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase)

Samples	[] of inhibitor	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ peptide	Inhibition (%) [*]	IC ₅₀ (μM)
Control	-	5.04 \pm 0.05	0	-
Pravastatin	2.35 μM	0.42 \pm 0.06	90.68 \pm 1.72 ^b	0.07 [#]
Peptides < 3 kDa	500 μg .protein	0.25 \pm 0.01	95.02 \pm 0.10 ^a	nd
QDF peptide	250 μM	0.73 \pm 0.03	85.78 \pm 0.34 ^c	12.84 \pm 0.17

^{*}Letras sobrescritas diferentes significam diferença estatística para $P < 0.05$ (ANOVA) pelo teste de múltiplas extensões de Duncant.

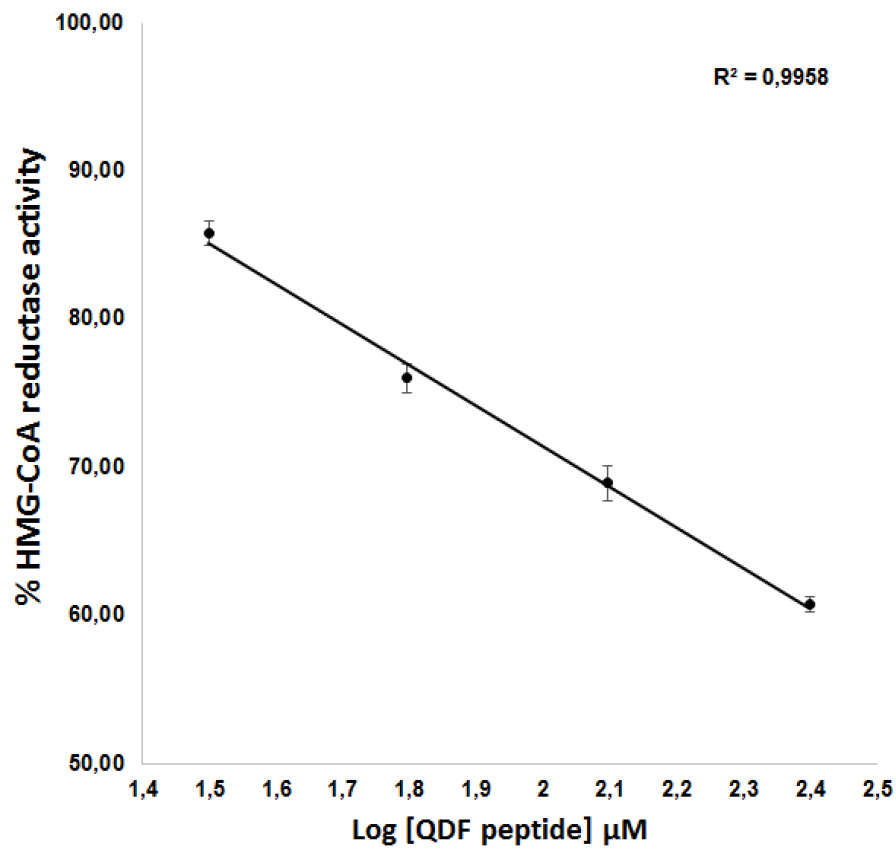


Figura 2.8 – Curva de dose-resposta do efeito inibitório do peptídeo QDF oriundo da β -vignina do feijão caupí sob a HMGR.