

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 29/09/2018.

# **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

## **Isolamento da Vicilina do Feijão Mungo Verde (*Vigna radiata L.*) e Estudo de Suas Atividades Hipocolesterolêmica e Antimicrobiana**

**Ana Lúcia da Silva Amaral**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciências  
Nutricionais

Orientadora: Profa. Dra. Aureluce  
Demonte

**Araraquara  
2016**

# **Isolamento da Vicilina do Feijão Mungo Verde (*Vigna radiata* L.) e Estudo de Suas Atividades Hipocolesterolêmica e Antimicrobiana**

**Ana Lúcia da Silva Amaral**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciências  
Nutricionais

Orientadora: Profa. Dra. Aureluce  
Demonte

**Araraquara  
2016**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

A485i Amaral, Ana Lucia da Silva  
Isolamento da Vicilina do Feijão Mungo Verde (*Vigna radiata L.*) e Estudo de Suas Atividades Hipocolesterolêmica e Antimicrobiana / Ana Lucia da Silva Amaral. – Araraquara, 2016.  
86 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, área de concentração: Ciências Nutricionais.

Orientadora: Aureluce Demonte.

1. Vicilina – Feijão Mungo verde (composto funcional). 2. Controle de qualidade. 3. Vicilina – Estudo *In vitro*. 4. *Helicobacter pylori*. 5. HMG CoAr. 6. Mungo verde I. Demonte, Aureluce, orient. II. Título.

**CAPES: 40500005**

ANA LÚCIA DA SILVA AMARAL

Isolamento da Vicilina do Feijão Mungo Verde ( Vigna Radiata) e Estudo de suas Atividades  
Hipocolesterolêmica e Antimicrobiana

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual  
Paulista - UNESP, Campus de Araraquara como  
requisito para a obtenção do título de Doutora em  
Alimentos e Nutrição.

Araraquara, 29 de setembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

  
AURELUCE DEMONTE

  
ROSIANE GOMES SILVA OLIVEIRA

  
THAIS MILENA DE SOUZA BEZERRA

  
TAIS MARIA BAUAB

  
JULIANA CRISTINA BASSAN

## **Agradecimentos**

*À Deus... pelo dom da vida e pelo amparo de todos os dias...*

*À minha mãe, ao César e todos os meus familiares pelo incentivo e compreensão pela ausência em tantos momentos que poderíamos estar reunidos...*

*À professora Aureluce Demonte pelo acolhimento, orientação e inúmeros ensinamentos...*

*Aos professores Valdir Augusto Neves, Iguatemy Lourenço Brunetti, Rubens Monti, Taís Maria Bauab e aos amigos Juliana Cristina Bassan, Maraiza Aparecida da Silva, Matheus Ramos e Thaís Milena Bezerra pela cooperação na realização dos experimentos.*

*À banca de examinação pela contribuição de ideias, pelas experiências e conhecimentos transmitidos...*

*Aos funcionários da sessão de pós graduação e biblioteca que sempre se mostraram solícitos quando necessário...*

*À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa e cooperar para meu amadurecimento científico...*

*A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização de todas as etapas deste trabalho.*

***“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”***

***Albert Einstein***

## Resumo

A homologia entre as características estruturais, sequenciais e funcionais da  $\beta$ -conglucina da soja em relação a outras vicilinas de leguminosas e a ação de seus peptídeos bioativos nos estimulou a investigar a atividade da globulina vicilina (8S) do feijão mungo verde como composto funcional. **Objetivo:** isolar e caracterizar a globulina 8S do feijão mungo verde e verificar a ação hipocolesterolêmica e antimicrobiana de seus hidrolisados em testes *in vitro*. **Método:** a proteína majoritária 8S do feijão mungo verde foi extraída a partir do método de isolamento, em seguida foi parcialmente purificada por cromatografia de permeação molecular, determinada sua massa molecular a partir da eluição em Coluna Sephadex G-200 e suas subunidades foram caracterizadas por SDS Page. A proteína purificada foi submetida à hidrólise enzimática sequencial com pepsina-pancreatina e o hidrolisado obtido caracterizado por permeação molecular e SDS Tricina. Diferentes frações provenientes da eluição do hidrolisado em Sephadex G-25 foram testadas quanto à inibição da HMG CoAr (3 - Hidróxi - 3 - metilglutaril - CoA redutase) e de microrganismos (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Helicobacter pylori* ATCC 43504). **Resultados:** A 8S do feijão mungo verde é composta por polipeptídeos de 26, 29, 48 e 61 kDa e sua massa molecular é de  $158,23 \pm 10$  kDa, características condizentes com as vicilinas de outras leguminosas. As frações obtidas da eluição do hidrolisado em Sephadex G-25 (10, 12, 14, 22 e 32) mostraram significativa inibição *in vitro* da atividade da enzima HMG-CoAr comparativamente a drogas de reconhecida ação hipocolesterolêmica (pravastatina), sugerindo participação dessas frações peptídicas na inibição de uma importante etapa da síntese do colesterol. O hidrolisado obtido a partir da hidrólise sequencial com pepsina-pancreatina apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados, principalmente contra a *H. pylori*, sendo um promissor avanço na terapia antibacteriana. Ao contrário do ocorrido com o hidrolisado, as frações peptídicas da 8S não apresentaram ação antimicrobiana, o que sugere que este efeito esteja relacionado ao sinergismo decorrente da presença de peptídeos com diferentes massas e características estruturais. **Conclusão:** Os resultados mostram a eficácia nos métodos de isolamento e caracterização da fração proteica, além do efeito hipocolesterolêmico e antimicrobiano do hidrolisado da 8S do feijão mungo verde, sugerindo a utilização desta proteína como composto funcional. **Palavras-chave:** composto funcional; *Helicobacter pylori*; HMG CoAr; mungo verde; vicilina.



## Abstract

The homology between the structural and functional characteristics of sequential  $\beta$ - conglycinin soy compared to other legume vicilin and the action of their bioactive peptides stimulated us to investigate the activity of globulin vicilin (8S) mung beans as functional compound. **Objective:** isolate and characterize the 8S globulin mung beans and check the hypocholesterolemic and antimicrobial activities their hydrolysates in *in vitro* tests. **Method:** The major protein 8S mung bean is extracted from the isolation method, then was partially purified by molecular permeation chromatography, its molecular weight determined from the elution Sephadex G- 200 and its subunits were characterized by SDS-PAGE. The purified protein was subjected to sequential enzymatic hydrolysis with pepsin-pancreatin and the hydrolyzate characterized by molecular permeation and Tricine SDS. Different fractions from the hydrolyzate eluted on Sephadex G-25 were tested for inhibition of HMG CoAr (3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - CoA reductase) and microorganisms (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and *Helicobacter pylori* ATCC 43504). **Results:** 8S mung bean is comprised of polypeptides of 26, 29, 48 and 61 kDa and its molecular weight is  $158.23 \pm 10$  kDa, consistent with the characteristics vicilins from other legumes. The fractions obtained from the elution hydrolyzate in Sephadex G-25 (10, 12, 14, 22 and 32) demonstrated significant *in vitro* inhibition of HMG-CoAr enzyme activity compared with the recognized hypocholesterolemic action drug (pravastatin), suggesting involvement of these peptide fractions in inhibiting an important step in cholesterol synthesis. The hydrolyzate obtained from sequential hydrolysis with pepsin-pancreatin presented antimicrobial activity against the tested microorganisms, particularly against *H. pylori*, is a promising advance in antibacterial therapy. Contrary to what occurred with the hydrolyzate peptide fractions of the 8S showed no antimicrobial activity, suggesting that this effect is related to the synergism due to the presence of peptides with different masses and structural characteristics. **Conclusion:** The results show the effectiveness of the methods of isolation and characterization of the protein fraction, beyond the hypocholesterolemic and antimicrobial effect of the hydrolyzate 8S mung bean, suggesting the use of this protein as a functional compound. **Keywords:** functional compound; *Helicobacter pylori*; HMG CoAr; mung bean; vicilin.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

CaCo - 2	Células de carcinoma de cólon humano
CYP7A1	Colesterol 7- $\alpha$ hidroxilase
HDL - C	Lipoproteína de alta densidade – colesterol
Hep G2	Células hepáticas humanas
HIV - 1	Vírus da imunodeficiência humana – 1
HMG CoAr	3 – hidroxí – 3 – metilglutaril – CoA redutase
LDL - C	Lipoproteína de baixa densidade – colesterol
SREPB - 2	Proteína ligante do elemento regulatório de esterol – 2
VLDL - C	Lipoproteína de muita baixa densidade – colesterol

## Lista de Tabelas

### Capítulo 2

Tabela 1. Ação antimicrobiana da 8S do feijão mungo verde frente a diferentes microrganismos. 71

Tabela 2. Ação antimicrobiana das frações peptídicas do hidrolisado da vicilina do feijão mungo verde eluídas em Coluna Sephadex G-25 frente à *H.pylori*. 74

# Lista de Figuras

## Introdução

Figura 1. Modelos de formação de poros decorrentes da interação eletrostática dos peptídeos antimicrobianos e a bicamada lipídica de microrganismos. 21

Figura 2. Planta, vagens e sementes do feijão mungo verde. 24

## Capítulo 1

Figura 1. Perfil cromatográfico da globulina 8S do feijão mungo verde em coluna Sephadex G-25. 50

Figura 2. Perfil cromatográfico da globulina 8S do feijão mungo verde em coluna Sepharose CL 6B. 50

Figura 3. SDS Page da globulina total, globulina 8S isolada e picos cromatográficos das colunas Sepharose CL 6B e Sephadex G 200. 51

Figura 4. Grau de hidrólise da globulina 8S do feijão mungo verde decorrente da digestão sequencial com as enzimas pepsina e pancreatina. 52

Figura 5. SDS Tricina da 8S do feijão mungo verde após hidrólise com pepsina e pancreatina. 53

Figura 6. Perfil de inibição da HMG CoAr ocasionado pela presença das frações peptídicas da 8S do feijão mungo verde obtidas da eluição em Sephadex G-25. 54

Figura 7. Perfil cromatográfico em CLAE das frações peptídicas com atividade hipocolesterolêmica. 56

## Capítulo 2

Figura 1. (a) Perfil cromatográfico da globulina 8S do feijão mungo verde em coluna Sepharose CL 6B. (b) SDS Page da globulina total, globulina 8S isolada e picos cromatográficos das colunas Sepharose CL 6B e Sephadex G 200. 69

Figura 2. (a) Grau de hidrólise da globulina 8S do feijão mungo verde decorrente da digestão sequencial com as enzimas pepsina e pancreatina. (b) SDS Tricina da 8S do feijão mungo verde após hidrólise com pepsina e pancreatina.

## Sumário

Resumo	IV
Abstract	V
Lista de Abreviaturas e Siglas	VI
Lista de Tabelas	VII
Lista de Figuras	VIII
Introdução	11
Capítulos	42
Capítulo 1: A proteína vicilina ( <i>Vigna radiata L.</i> ) do feijão mungo verde como composto funcional: evidências “ <i>in vitro</i> ” da atividade hipocolesterolêmica	43
Resumo	44
Introdução	44
Material e métodos	46
Resultados e discussão	49
Conclusão	57
Referências	57
Capítulo 2: Atividade antimicrobiana do hidrolisado da vicilina do feijão mungo verde: estudo <i>in vitro</i>	61
Resumo	62
Introdução	62
Material e métodos	64
Resultados e discussão	69
Conclusão	75
Referências	75
Considerações finais	80
Referências	83

## **Introdução**

### **1 *Proteínas de leguminosas***

Leguminosas produtoras de grãos crescem de forma abrangente em regiões temperadas e tropicais e compõem a terceira maior família das angiospermas, com cerca de 650 gêneros e 18000 espécies (1,2). Além de serem usadas na alimentação, sua composição de nutrientes permite que estas atuem como ingredientes na indústria alimentícia, por suas propriedades funcionais, e na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, dislipidemia, dentre outras devido à presença de compostos bioativos em sua estrutura (2-4). Seus efeitos fisiológicos dependem do tipo de leguminosa, do componente do grão envolvido na ação (proteínas, polissacarídeos, fibras ou fitoquímicos), da interação sinérgica ou antagonista com outros componentes do grão e da maneira como age no organismo (4-6).

As proteínas de leguminosas representam de 20 a 40% do peso do grão e são classificadas quanto à sua solubilidade em globulinas, albuminas, glutelinas e prolaminas, sendo as globulinas e as albuminas suas frações principais (7,8). As globulinas são as proteínas majoritárias destes grãos e representam aproximadamente 35 a 70% das proteínas totais, sendo classificadas como 7S ou vicilinas e 11S ou leguminas dependendo do seu coeficiente de sedimentação (S – Svedberg) (8-10). Dependendo da espécie,

este coeficiente pode variar de 7,1S a 8,75S para as vicilinas e de 10,1S a 14S para as leguminas, todavia esta classificação é mantida já que mesmo apresentando coeficientes de sedimentação diferentes estas proteínas possuem características comuns entre si (10,11).

## **2 Vicilinas e homologia proteica**

As vicilinas são proteínas oligoméricas, geralmente glicosiladas, com massas moleculares variando entre 140 a 200 kDa e constituídas por 3 subunidades:  $\alpha$ ,  $\alpha'$  e  $\beta$  que possuem sequências de resíduos de aminoácidos idênticas em seu interior (9, 12, 13).

A homologia entre as vicilinas de leguminosas tem sido demonstrada através da semelhança entre suas composições de aminoácidos, propriedades imunológicas e estruturais sugerindo que estas globulinas possuem genes ancestrais comuns e que suas similaridades são decorrentes de uma evolução convergente (11,14-16). A existência da homologia entre vicilinas de leguminosas foi constatada por Doyle et al. (17) a partir da observação de uma sequência idêntica de aminoácidos da parte terminal das vicilinas dos gêneros *Phaseolus* e *Vigna* com a da  $\beta$ -conglucina (7S) da soja, confirmando os dados de Lackey (18) que observou uma semelhança na atividade imunológica das subespécies *Phaseolinae* do gênero *Vigna* e *Glicininae* do gênero *Glycine*.

Doyle e colaboradores (19) identificaram semelhanças de 85 a 95% entre as subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  da  $\beta$ -conglucina em relação às vicilinas da



ervilha e do feijão (*Phaseolus vulgaris*) ao passo que Maruyama et al. (20) observaram que essa homologia também poderia ocorrer entre as próprias subunidades de uma mesma espécie. Dessa maneira, a homologia entre as subunidades  $\alpha$ ,  $\alpha'$  e  $\beta$  da  $\beta$ -conglucina foi identificada pela presença de sequências idênticas de aminoácidos no núcleo da proteína, representando uma similaridade de 90,4% entre as subunidades  $\alpha$  e  $\alpha'$ , 76,2% entre  $\alpha$  e  $\beta$  e de 75,5% entre  $\alpha'$  e  $\beta$  (20).

Ao compararem as vicilinas do feijão adzuki (*Phaseolus angularis*) e do feijão mungo verde, Tang e Sun (21) perceberam que a composição de suas estruturas secundárias apresentavam similaridades. Estes dados confirmam os achados de Hirano et al. (22) que descrevem uma similaridade de 80 a 90% das sequências N terminais das vicilinas dos feijões adzuki, caupí e mungo verde quando comparadas com a  $\beta$ -conglucina da soja e de Mendoza et al. (23) que, através de análises imunológicas e das sequências N terminais da vicilina do feijão mungo verde demonstraram uma homologia entre esta proteína, a  $\beta$ -conglucina da soja e os precursores de faseolinas e vicilinas de *Vicia faba* e da ervilha. Deste modo, a existência dessa homologia estrutural entre as proteínas, principalmente entre as vicilinas, justificaria a semelhança das ações fisiológicas desempenhadas por proteínas de leguminosas observadas em diferentes trabalhos (24,25).

### **3 Peptídeos bioativos de leguminosas**

As proteínas são precursoras de peptídeos bioativos. Esses peptídeos estão na sua forma inativa quando situados na estrutura primária da proteína, porém com o rompimento das ligações peptídicas a partir de processos enzimáticos *in vitro* ou durante a digestão gastrointestinal estes são liberados e possuem a capacidade de modular o metabolismo, inibindo ou estimulando processos bioquímicos (26,27). Dentre as atividades fisiológicas desempenhadas por peptídeos derivados de proteínas de leguminosas destacam-se as atividades anti-hipertensiva, antilipidêmica, antioxidante, anticancerígena, imunomodulatória, antimicrobiana e antidiabética (7,27,28).

A bioatividade desses peptídeos pode ser influenciada pela composição de aminoácidos da proteína nativa, pelo método de hidrólise e condições como tempo, temperatura e tipo de enzima(s) envolvida(s) no processo (7,26). O tamanho dos peptídeos formados também é decisivo na sua ação uma vez que influencia a absorção pelos enterócitos e sua consequente disponibilidade para os tecidos alvos (26,29). Para garantir a eficácia da atividade bioativa, os peptídeos devem desempenhar sua ação diretamente no trato gastrointestinal, não sendo necessária a sua absorção, ou serem absorvidos pelos enterócitos sem sofrerem degradação pelas proteases intestinais (7). You et al. (30) propõem que o uso de peptídeos com baixo peso molecular seria uma alternativa para que a absorção ocorra sem que haja a ação das proteases.

Estudos têm verificado que os hidrolisados proteicos apresentam ação mais significativa do que a sua proteína de origem devido à interação direta de seus resíduos de aminoácidos (31). Nagaoka et al. (32) e Sugano et al. (33)

testaram a ação de hidrolisados e isolados proteicos de soja em experimentos *in vivo* e em células Caco-2 e comprovaram que o hidrolisado de soja demonstrou uma maior eficácia frente a redução do colesterol quando comparado a ação exercida pela proteína isolada de soja. Esses autores ainda relatam que os efeitos obtidos são resultantes da maior exposição dos resíduos de aminoácidos após a hidrólise, da relação entre a hidrofobicidade do hidrolisado e a sua capacidade de ligação a ácidos biliares no íleo e inibição da solubilidade micelar do colesterol no jejuno, resultando em uma menor reabsorção dos ácidos biliares e maior excreção de esteróis fecais.

A pesquisa sobre a bioatividade de peptídeos tem ganhado novos rumos e investimentos, principalmente das indústrias farmacêuticas que veem nestes compostos uma grande possibilidade de utilização já que estes peptídeos possuem alta bioatividade e especificidade aos órgãos-alvo, baixa toxicidade e geralmente não se acumulam nos tecidos, parâmetros considerados ótimos do ponto de vista da produção de medicamentos (7). Na indústria alimentícia, o seu uso envolve a manutenção da saúde e a prevenção e/ou intervenção das doenças crônicas (29). Porém, mesmo com o interesse pela utilização de peptídeos bioativos a nível industrial, a maneira como os processos de extração, isolamento, purificação e estabilidade da função bioativa serão desenvolvidos em grande escala, ainda tem sido discutidos (28,34,35).

#### **4 Ação hipolipidêmica das proteínas de leguminosas**

A alteração de lipídeos séricos e hepáticos tem sido considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, especialmente nos países ocidentais (28). Vários estudos *in vitro* (36,37,38,39), experimentos animais (25,40-42) e populacionais (43,44) foram realizados nos últimos anos a fim de se desvendar o(s) composto(s) proteico(s) responsável pela ação hipocolesterolêmica das proteínas das leguminosas. Diante deste quadro, grande parte dos trabalhos foram desenvolvidos com a soja, entretanto o interesse por este efeito benéfico tem despertado a atenção para o estudo de outras leguminosas (45,46).

Chau et al. (47) observaram uma redução acentuada do colesterol total, LDL-C, triacilglicerídeos plasmáticos, lipídeos totais e colesterol hepáticos em hamsters hipercolesterolêmicos que receberam dieta contendo concentrado proteico das espécies *Phaseolus angularis*, *Phaseolus calcaratus* e *Dolichos lablab*, sugerindo que o conteúdo de metionina e as razões metionina/glicina e lisina/arginina dessas proteínas estavam relacionadas com os resultados obtidos. Macarulla et al. (48) mostraram que a redução dos níveis de lipídeos plasmáticos, em especial os de colesterol total e LDL-C é decorrente, pelo menos em parte, da diminuição da atividade da enzima HMG – CoAr no fígado dos animais que ingeriram isolado proteico de *Vicia faba*. E Frota et al. (25) notaram uma redução de 20% e 22%, respectivamente, para colesterol total e fração não-HDL (LDL-C + VLDL-C) além de uma menor deposição de gordura nas células hepáticas de *hamsters* alimentados com o isolado proteico da

espécie de feijão caupí (*V. unguiculata*) e acreditam que os mecanismos responsáveis por estes efeitos sejam os mesmos verificados na soja.

Spielmann et al. (40) verificaram que ratos alimentados com proteína isolada de ervilha apresentaram menor peso do fígado e menor ganho de peso do que o grupo alimentado com caseína. E apesar de não haver diferença nos níveis plasmáticos de colesterol total, LDL-C e HDL-C entre os grupos, houve diminuição nas concentrações de colesterol hepático e no colesterol constituinte da VLDL-C seguida de uma maior excreção de ácidos biliares nas fezes, além de uma maior concentração de SREBP-2, HMG CoAr, receptor de LDL-C e CYP7A1, envolvidos no metabolismo e regulação do colesterol. A ingestão do isolado proteico de tremçoço por hamsters alimentados com dieta hipercolesterolêmica também levou a uma melhora no perfil lipídico com a diminuição de 37% do colesterol plasmático, além de apresentar um efeito hepatoprotetor quanto ao quadro de esteatose apresentado (41).

As atividades hipolipidêmica e hipocolesterolêmica das proteínas de leguminosas têm sido associadas, em grande parte, a ação das globulinas 7S e 11S. Pak et al. (36) e Know et al. (49) isolaram e identificaram peptídeos, *in vitro*, a partir da hidrólise da glicinina (11S) da soja constatando a ação hipocolesterolêmica desta fração proteica através de sua capacidade de ligação com ácidos biliares e inibição da enzima HMG CoAr. Lovati et al. (37-39) observaram, *in vitro*, que a fração 7S da soja produzia uma maior captação e *turnover* de LDL-C devido ao aumento da expressão do RNAm do SREBP-2 e do número de receptores de LDL-C em células Hep-G2.

Estudos recentes com as globulinas 11S e 7S tem confirmado a ação hipolipidêmica de outras leguminosas. Amaral et al (50) observaram que a ingestão da 11S isolada do grão de bico por ratos hipercolesterolêmicos levou a uma redução de 28% nos triglicerídeos séricos, 82,7% e 51,4% nos triglicerídeos e colesterol hepáticos, respectivamente. Ao passo que a ingestão das 7S dos feijões adzuki e caupí promoveu, respectivamente, uma redução de 32, 5% e 33% no colesterol sérico e um aumento significativo nos níveis de HDL. Além disso, a 7S do feijão caupí também contribuiu para a redução de 14% e 17% no colesterol e triglicerídeos hepáticos (42).

Os possíveis processos envolvidos na redução do colesterol, e de uma maneira geral, os efeitos hipocolesterolêmicos das proteínas de leguminosas parecem envolver a regulação do receptor de LDL e da síntese de ácidos graxos, todavia nem todos os mecanismos têm sido esclarecidos (26). Dentre as hipóteses que justificariam a ação hipocolesterolêmica das globulinas 11S e 7S das leguminosas destacam-se a composição de aminoácidos das proteínas da dieta (37,51,52), a presença de peptídeos produzidos a partir da digestão limitada da proteína pelas enzimas gastrointestinais, que após absorção e transporte para o fígado poderiam modular a homeostase do colesterol (39,53), a interação entre os peptídeos formados e o colesterol, ou seus metabólitos, esteróis neutros e sais biliares promovendo sua excreção (54, 55), a inibição da HMG CoA reductase (36,56) e a influência sobre o metabolismo dos SREBP-1, SREBP- 2 e CYP7A1 (37,40).

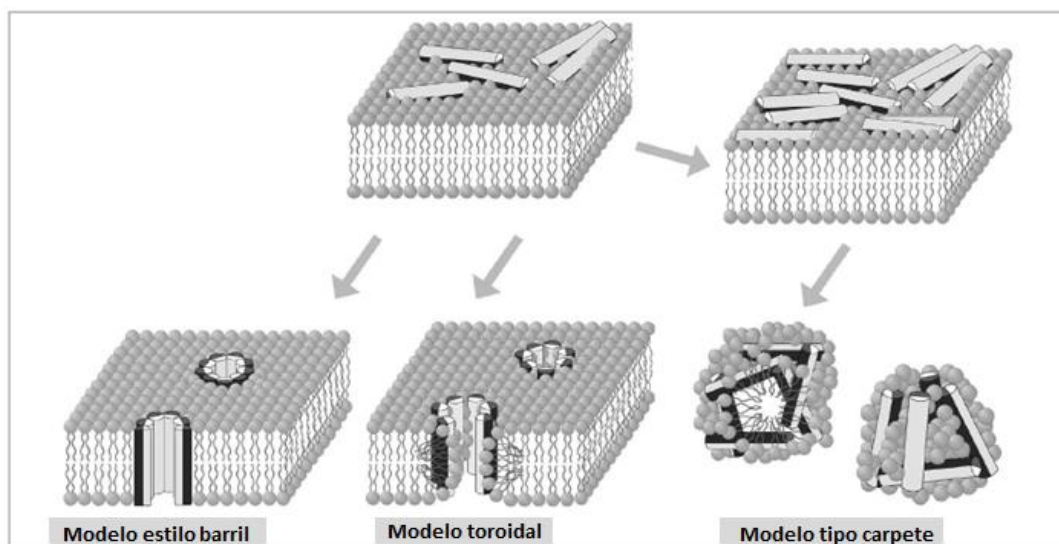
## **5 Ação antimicrobiana dos peptídeos de leguminosas**

Peptídeos antimicrobianos são oligopeptídeos de tamanhos variados, contendo de 5 a 100 aminoácidos, geralmente de caráter anfipático e com predominância de aminoácidos hidrofóbicos e resíduos arginina e lisina em sua estrutura. Eles são produzidos por plantas e animais e desempenham atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral e/ou antiparasitária (57, 58, 59). Tanto nas plantas quanto nos animais, estes peptídeos estão envolvidos com o sistema imune inato, sendo capazes de modular atividades e proteger o organismo contra infecções microbianas (60).

A atividade antimicrobiana de peptídeos se baseia, primordialmente, na interação entre a estrutura do peptídeo e a membrana celular do microrganismo. Por serem catiônicos e anfipáticos, os peptídeos se ligam nas membranas lipídicas devido à atração dos resíduos de arginina e lisina da estrutura peptídica pelos fosfolipídeos presentes na bicamada e pela interação entre os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos do peptídeo e da membrana. O conjunto destas interações permite que os peptídeos atravessem a bicamada lipídica e alcancem o interior da célula, provocando disfunção na membrana pela formação de poros com extravasamento de íons e metabólitos, despolarização, perda da respiração acoplada à membrana e morte celular (57-59, 61, 62).

Apesar dos mecanismos envolvidos na ação antimicrobiana não estarem totalmente esclarecidos, são citados na literatura alguns modelos que

ilustram a formação dos poros a partir da interação dos peptídeos com a membrana celular dos microrganismos (Figura 1). Na formação de poros do tipo barril, os peptídeos se inserem na membrana de forma que a sua região hidrofóbica se alinha com a bicamada lipídica da membrana e a parte hidrofílica forma a região interior do poro, permitindo então a entrada e saída de íons do interior da célula atacada. No modelo toroidal, os peptídeos se fixam perpendicularmente à membrana e entram em contato com os grupos hidrofóbicos permitindo o dobramento da membrana, causando a formação do poro. Já no modelo tipo carpete, os peptídeos são adsorvidos paralelamente a membrana-alvo pela interação eletrostática com os fosfolípídeos presentes na bicamada e produzem um efeito detergente que desintegra a membrana, formando micelas (63,64,65).



**Figura 1.** Modelos de formação de poros decorrentes da interação eletrostática dos peptídeos antimicrobianos e a bicamada lipídica de microrganismos. Fonte: Adaptado de Wiesner e Vilcinskis (64).



As formas de ação intracelular de cada peptídeo podem diferir entre si, alguns inibem a síntese proteica e de DNA, outros inibem proteases, agem sobre estágios específicos de células ou inibem vias intracelulares por penetração direta ou endocitose (57-59,61,62). Andersson et al. (60) sugerem ainda que o mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos podem envolver muitas outras interações específicas do que as que são representadas nos modelos conhecidos, fazendo com que a ação antimicrobiana se torne muito mais complexa.

Diferentes peptídeos de leguminosas tem mostrado ação antimicrobiana. Vasconcellos et al. (66) isolaram as globulinas 7S e 11S de soja e obtiveram peptídeos a partir da hidrólise com pepsina. Em seguida, testaram a ação destes peptídeos frente aos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica*, *Klebsiella pneumonie*, *Streptococcus mutans* e *Propionibacterium acnes*, verificando que estes peptídeos foram capazes de inibir o crescimento de todas as cepas citadas anteriormente de maneira dose dependente. Franco et al. (67) isolaram o peptídeo Cp-tionina a partir do feijão caupí (*Vigna unguiculata*) e verificaram sua ação antibacteriana contra bactérias Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) e Gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas syringae*).

Wong e Ng (68) identificaram a ação antimicrobiana de um peptídeo de 7kDa, denominado lunatusina, extraído do feijão lima (*Phaseolus lunatus L.*). Este peptídeo apresentou ação antifúngica frente às cepas de *Fusarium*

*oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola* e *Botrytis cinerea*, ação antibacteriana contra *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* e *Mycobacterium phlei*, além de diminuir a atividade da transcriptase reversa do vírus HIV-1. Estes mesmos autores realizaram testes antimicrobianos com o peptídeo vulgarinina, isolado a partir do feijão branco (*Phaseolus vulgaris*), e verificaram a atividade antifúngica deste peptídeo contra *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Physalospora piricola* e *Botrytis cinérea*, ação antibacteriana contra *Mycobacterium phlei*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* e *Proteus vulgaris* e também a redução da atividade da transcriptase reversa do HIV-1. A semelhança entre as atividades antivirais destes peptídeos pode estar associada à síntese proteica (69) enquanto que as atividades antifúngica e antibacteriana podem ser decorrentes de homologia estrutural e/ou uso de um mesmo mecanismo de ação.

Tem sido notório o maior interesse das indústrias de alimentos, de produtos agrícolas e farmacêutica pela aplicação de métodos e/ou fontes alternativas no combate contra agentes microbianos visando a conservação de alimentos, o controle de pragas e o uso na área da saúde. Deste modo, a utilização de peptídeos antimicrobianos tem se mostrado promissora nestas áreas já que eles são menos susceptíveis à resistência microbiana, parecem ter baixa toxicidade a células de plantas e mamíferos e não interferem na flora bacteriana do indivíduo por terem ação bastante específica (27,70,71).

## **6 Feijão mungo verde: características físicas, econômicas e efeitos benéficos**

Os feijões são base da culinária e da cultura de vários países. Os principais produtores mundiais de feijões são a Índia, Myanmar, Brasil, China, Estados Unidos e México. A produção mundial de feijões nas safras de 2013/2014 foi de 23,1 milhões de toneladas, sendo o Brasil responsável por 3,4 milhões. As principais variedades produzidas no Brasil são o feijão carioca, o feijão preto e o feijão de corda (caupí). Apesar de ter representatividade nos mercados nacionais e internacionais, o comércio regional de feijão tem prevalecido por ser uma cultura de subsistência, fazendo com que a maior parte da sua produção seja destinada ao consumo local (72).

O feijão mungo verde é originário da Índia, sendo que cerca de 90% da sua produção atual acontece no sul, leste e sudeste da Ásia. Sua produção anual representa 5% do total de grãos produzidos mundialmente, com aproximadamente 3 milhões de toneladas de grãos que ocupam 6 milhões de hectares em todo o mundo. A Índia é o principal produtor deste grão, seguida de Myanmar, China e Paquistão (73). No Brasil, sua produção ainda é pequena, porém bastante promissora já que a demanda deste feijão tem aumentado visando à produção de brotos de feijão (74,75). Além disso, este feijão possui um bom potencial de uso agrônomico devido ao seu fácil plantio, ciclo de cultivo curto e a possibilidade de incorporação de nitrogênio ao solo através da utilização de seus resíduos pós colheita (74).

O feijão mungo verde é uma planta anual, de porte ereto ou semiereto, com ramificações e folhas verde claras ou escuras, trifolioladas, com altura variando entre 0,3 e 1,5 metros. Suas vagens se concentram na parte superior da planta, são marrons escuras e medem entre 60 a 90 centímetros de comprimento e 5 a 5,4 milímetros de largura. Possui sementes pequenas que podem variar de cor de acordo com a sua maturidade, podendo ser amarela, amarela esverdeada, verde, marrom, preta ou pintada de preto (mosqueada) (Figura 2). Desenvolve-se bem em temperatura mínima de 15 a 22°C e temperatura ótima de 28 a 30°C, requer solo arenoso e umidade moderada, sendo tolerante ao calor e períodos de estiagem (75-79).



**Figura 2.** Planta, vagens e sementes do feijão mungo verde. Fonte: Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2010 (77).

O florescimento e a maturação das vagens ocorrem de maneira irregular dependendo do tipo de cultivar e das condições climáticas do ambiente. As primeiras vagens podem ser colhidas a partir de 46 dias após o

plântio, sendo necessárias 2 a 4 colheitas com intervalos de 7 a 15 dias para finalizar este processo (75-77). O maior rendimento e desenvolvimento da planta são relacionados com o genótipo da planta e o plantio no tempo adequado (77, 81, 82).

Preparações com o feijão mungo verde são características de cada local. Ele pode ser consumido cozido na forma de grãos ou vagens, como broto de feijão, mingau, pasta ou macarrão. Ainda é possível processá-lo e produzir geleias e bolos, muito comuns na Tailândia ou servir de acompanhamento para o arroz ou o ugali (prato típico do Kênia e Tanzânia a base de farinha de milho) (73). Além disso, talos, folhas e cascas deste feijão são comumente usados como alimento para o gado (73,79).

O feijão mungo verde vem sendo utilizado à séculos devido às suas propriedades medicinais. Alguns exemplos bastante citados na literatura são sua atividade antimicrobiana, anticancerígena, antioxidante, antidiabética, hipolipidêmica, antisséptica, anti-inflamatória, dentre outras. Estes efeitos têm sido associados à presença de compostos fenólicos, flavonoides, ácidos orgânicos, peptídeos entre outros (78,82).

Tanto a situação econômica quanto a alta prevalência de vegetarianos em países subdesenvolvidos (Índia, Paquistão e Bangladesh) fazem com que leguminosas se tornem valiosas quanto ao seu teor proteico, aminoácidos essenciais e aporte de micronutrientes (2,3,73,79). Neste sentido, trabalhos tem verificado a importância nutricional das proteínas do feijão mungo verde. Dzudie e Hardy (83) compararam a composição aminoacídica de 3 espécies de feijão

comum (branco, preto e vermelho) com o feijão mungo verde. Estes feijões tiveram pouca variação quanto ao teor de proteínas totais (21,2 a 24,9%), sendo que os feijões vermelho, branco e preto apresentaram perfis de aminoácidos bastante semelhantes entre si enquanto que o feijão mungo verde teve um maior conteúdo de aminoácidos essenciais e não essenciais em relação aos outros feijões.

Ullah et al (79) analisaram 3 variedades de feijão mungo verde, verificando a presença de 18 aminoácidos nas amostras. Dentre eles, destacam-se os ácidos glutâmico (20, 2 a 22,8%) e aspártico (11,6 a 13%), leucina, arginina, isoleucina, alanina, valina, serina, lisina e fenilalanina que variaram entre 3 a 8% do total de proteínas. Assim como em outras leguminosas, o consumo simultâneo deste feijão com o arroz faz com que estes complementem seus aminoácidos limitantes, metionina e lisina respectivamente, aumentando assim a qualidade destas proteínas (2,3,73,79).

O feijão mungo verde (*Vigna radiata L.*) possui 17 a 26% de proteínas (23), sendo que 62% representam a fração globulina, 16,3% as albuminas, 13,3% as glutelinas e 0,9% as prolaminas (84). As vicilinas ou 8S correspondem a 89% das globulinas totais, seguidas por 7,6% de leguminas e 3,4% de 7S básicas e a massa molecular de suas subunidades correspondem a 60, 48, 32 e 26 kDa, não possuindo ligações dissulfeto entre si (23).

O uso das proteínas do feijão mungo verde como possíveis ingredientes de produtos alimentícios tem sido verificado através do estudo de suas propriedades funcionais. Dzudie e Hardy (83), Akaerue e Onwuka (85),

Shaheen et al. (86) e Liu et al. (87) descreveram algumas dessas propriedades, como a capacidade emulsificante, absorção de água e óleo, solubilidade, formação e estabilidade de espuma ao analisarem a farinha, o isolado proteico e a globulina 8S do feijão mungo verde. Tang e Sun (88) também testaram as propriedades funcionais das globulinas 8S e 11S do feijão mungo verde e acreditam que estas propriedades estão diretamente relacionadas com as características físico-químicas das proteínas deste grão.

Os efeitos fisiológicos das proteínas do feijão mungo verde também têm sido alvo de pesquisas. Tachibana et al. (24) e Yao et al.(89) identificaram a ação hipolipidêmica do isolado proteico do feijão mungo verde, sugerindo que a redução dos níveis plasmáticos e hepáticos de colesterol e triglicerídeos se dá por sua composição de aminoácidos, pela maior excreção, menor absorção e síntese de lipídeos. Peptídeos derivados da fração globulínica 8S do feijão mungo verde desempenharam papel anti-hipertensivo ao inibir a atividade da enzima conversora de angiotensina (90) enquanto que o peptídeo VrCRP, isolado a partir do feijão mungo verde pode ser usado no combate de uma espécie de larva, a *Callosobruchus maculatus* (91). Deste modo, as propriedades funcionais e os efeitos fisiológicos desempenhados pelo feijão mungo verde fazem com que este possa ser aplicado nas indústrias de alimentos, farmacêutica, na saúde e na agricultura (82).

Vários estudos têm caracterizado as propriedades estruturais, fisicoquímicas e funcionais das proteínas do feijão mungo verde na sua forma integral (83), como isolado proteico (21,23), e ainda suas frações, 11S, 8S e 7S

básicas (23,88,92-94). Contudo, somente Viernes et al. (90) verificou a atividade biológica de hidrolisados derivados da vicilina do feijão mungo verde através da digestão *in vitro* com as proteases tripsina e quimiotripsina, inibindo a enzima de conversão da angiotensina I em 83,95% e 93,68%, respectivamente. Assim, este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar a vicilina do feijão mungo verde, produzir peptídeos simulando a digestão gastrointestinal e verificar a bioatividade destes hidrolisados a partir de ensaios *in vitro*.

## Referências

1. Lewis G, Schirer B, Mackinder B, Lock M. *Legumes of the World*. Kew: Royal Botanical Gardens; 2005, 592 p.
2. Iqbal A, Khalil IA, Ateeq N, Khan MS. Nutritional quality of important food legumes. *Food Chem*. 2006 Jul; 97(2): 331-35.
3. Duranti M, Gius C. Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crop Res*. 1997 Jul; 53(1-3): 31-45.
4. Bouchenak M, Lamri-Senhadji M. Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: A review. *J Med Food*. 2013 Mar; 16(3):185–198.
5. Venn BJ, Mann JI. Cereal grains, legumes and diabetes. *Eur J Clin Nutr*. 2004 Nov; 58(11):1443-61.



6. Rebello CJ, Greenway, FL, Finley JW. A review of the nutritional value of legumes and their effects on obesity and its related co-morbidities. *Obes Rev.* 2014 May; 15(5):392-407.
7. López-Barrios L, Gutiérrez-Uribe JA, Serna-Saldívar SO. Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients. *J Food Sci.* 2014 Mar; 79(3):R273-83.
8. Duranti M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia.* 2006 Feb; 77(2):67-82.
9. Freitas R, Ferreira R, Teixeira A. Use of a single method in the extraction of the seed storage globulins from several legume species. Application to analyse structural comparisons within the major classes of globulins. *Int J Food Sci Nutr.* 2000 Sep; 51(5):341-52.
10. Chel-Guerrero L, Scilingo AA, Tintoré SG, Dávilla G, Añon M. Physicochemical and structural characterization of Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) globulins. *LWT - Food Sci Technol.* 2007 Nov; 40(9): 1537-44.
11. Argos P, Narayana SV, Nielsen NC. Structural similarity between legumin and vicilin storage proteins from legumes. *Embo J.* 1985 May; 4(5): 1111-17.
12. Kimura A, Fukuda T, Zhang M, Motoyama S, Maruyama N, Utsumi S. Comparison of physicochemical properties of 7S and 11S globulins from pea, fava bean, cowpea and french bean with those of soybeans french bean 7S globulin exhibits excellent properties. *J. Agric. Food Chem.* Nov 12; 56(21):10273-9.

13. Tavano O L, Neves VA. Isolation, solubility and in vitro hidroyisis of chickpea vicilin-like protein. *LWT-Food Sci Techn.* 2008 Sep; 41(7), p. 1244-55.
14. Borroto K, Dure L. The globulin seed storage proteins of flowering plants derived from two ancestral genes. *Plant Mol. Biol.* 1987 Mar; 8(2):113-31.
15. Doyle JJ, Luckow MS. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* 2003 Mar; 131(3): 900–10.
16. Gepts P, Beavis WD, Brummer EC. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed. *Plant Phys.* 2005 Apr; 137(4):1228-35.
17. Doyle JJ, Ladin BF, Beachy RN. Antigenic relationship of legume seed storage proteins to the 7S storage protein of soybean. *Bioc Syst Ecol.* 1985 May; 13(2):123-32.
18. Lackey JA. Phaseoleae DC. (1825). In: Advances in legume systematic. R.M. Polhill & P.H. Raven, eds. Royal Botanic Gardens, Kew; 1981. p.301-27.
19. Doyle JJ, Schuler MA, Godette, WD. The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. Structural homologies of genes and proteins. *J Biol Chem.* 1986 Jul; 261(20):9228-38.
20. Maruyama N, Katsube T, Wada Y, Oh MH, Barba de La Rosa AP, Okuda E, Nakagawa S, Utsumi S. The roles of the N-linked glycans and extension regions of soybean  $\beta$ -conglycinin folding, assembly and structural features. *Eur. J. Biochem.* 1998 Dec; 258(2):854-62.

21. Tang C, Sun X. A comparative study of physicochemical and conformational properties in three vicilins from *Phaseolus* legumes: implications for the structure – function relationship. *Food Hydrocoll.* 2011 May; 25(3):315-24.
22. Hirano H, Kagawa H, Okubo K. Characterization of proteins released from legume seeds in hot water. *Phytochemistry.* 1992 Mar; 31(3):731-5.
23. Mendonza EMT, Adachi M, Bernardo AEN, Utsumi S. Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] globulins: purification and characterization. *J. Agric. Food Chem.* 2001 Mar; 49(3):1552-8.
24. Tachibana N, Wanezaki S, Nagata M, Motoyama T, Kohno M, Kitagawa S. Intake of mung bean protein isolate reduces plasma triglyceride level in rats. *Funct. Food Health Dis. Sep;* 3(9):365-76.
25. Frota KMG, Mendonça S, Saldiva RJC, Arêas JAG. Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. *J. Food Sci.* 2008 Nov; 73(9):H235-40.
26. Ruiz JCR, Ancona DAB, Campos MRS. Bioactive vegetable proteins and peptides in lipid-lowering; nutraceutical potential. *Nutr Hosp.* 2014 Apr; 29(4):776-84.
27. Shahidi F, Zhong Y. Bioactive peptides. *J AOAC Int.* 2008 Jul-Aug; 91(4):914-31.
28. Singh BP, Vij S, Hati S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides.* 2014 Apr; 54:171-9.

29. Udenigwe CC, Aluko RE. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *J Food Sci.* 2012 Jan; 77(1):R11-24.
30. You L, Zhao M, Regenstein JM, Ren J. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem.* 2010 Jun; 120(3):810-16.
31. Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2008 May; 48(5):430-41.
32. Nagaoka S, Miwa K, Eto M, Kuzuya Y, Hori G, Yamamoto K. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and Caco-2 cells. *J Nutr.* 1999 Sep; 129(9):1725-30.
33. Sugano M, Goto S, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T, Kimoto M. Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats. *J Nutr.* 1990 Sep; 120(9):977-85.
34. Li-Chan ECY. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Curr Opin Food Sci.* 2015 Feb; 1:28-37.
35. Pedroche J, Yust MM, Lqari H, Megias C, Girón-Calle J, Alaiz M, Vioque J, Millán F. Obtaining of *Brassica carinata* protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases. *Food Res Int.* 2007 Aug; 40(7):931-38.

36. Pak VV, Koo NS, Kasymova TD, Kwon DY. Isolation and identification of peptides from soy 11S-globulin with hypocholesterolemic activity. *Chem Nat Comp.* 2005 Nov; 41(6):710-714.
37. Lovati MR, Manzoni C, Pizzagalli A, Castiglioni S, Duranti MM. Polypeptide from 7S soy globulin alpha' subunit up-regulates LDL-receptors in HepG2 cells. *Faseb J.* 2008 Mar; 22(1):303-7.
38. Lovati MR, Manzoni C, Gianazza E, Arnoldi A, Kurowska E, Carroll KK, Sirtori CR. Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. *J Nutr.* 2000 Oct; 130(10):2543-9.
39. Lovati MR, Manzoni C, Corsini A, Granata A, Frattini R, Fumagalli R, Sirtori CR. Low density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture. *J Nutr.* 1992 Oct; 122(10):1971-8.
40. Spielmann J, Stangl GI, Eder K. Dietary pea protein stimulates bile acid excretion and lowers hepatic cholesterol concentration in rats. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2008 Dec; 92(6):683-93.
41. Fontanari GG, Batistuti JP, Cruz RJ, Saldivac PHN, Arêas, JAG. Cholesterol-lowering effect of whole lupin (*Lupinus albus*) seed and its protein isolate. *Food Chem.* 2012 Jun; 132(3):1521-26.
42. Ferreira ES, Amaral ALS, Demonte A, Zanelli CF, Capraro J, Duranti M, Neves VA. Hypocholesterolaemic effect of rat-administered oral doses of the isolated 7S globulins from cowpeas and adzuki beans. *J Nutr Sci.* 2015 Feb; 4(e7):1-9.

43. Reynolds K, Chin A, Lees KA, Nguyen A, Bujnowski D, He J. A meta-analysis of the effect of soy protein supplementation on serum lipids. *Am J Cardiol.* 2006 Sep; 98(5):633-40.
44. Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med.* 1995 Aug; 333(5):276-82.
45. Blachier F1, Lancha AH Jr, Boutry C, Tomé D. Alimentary proteins, amino acids and cholesterolemia. *Amino Acids.* 2010 Jan; 38(1):15-22.
46. Bazzano LA, Thompson AM, Tees MT, Nguyen CH, Winham DM. Non-soy legume consumption lowers cholesterol levels: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011 Feb; 21(2):94-103.
47. Chau C, Cheung PCK, Wong Y. Hypocholesterolemic effects of protein concentrates from three chinese indigenous legume seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 1998 Sep; 46(9):3698–3701.
48. Macarulla MT, Medina C, De Diego MA, Chávarri M, Zulet MA, Martínez JA, Noël-Suberville C, Higuieret P, Portillo MP. Effects of the whole seed and a protein isolate of faba bean (*Vicia faba*) on the cholesterol metabolism of hypercholesterolaemic rats. *Br J Nutr.* 2001 May; 85(5):607-14.
49. Kwon DY, OH SW, LEE JS, YANG, HJ, LEE SH, LEE JH, LEE YB, SOHN HS. Amino acid substitution of hypocholesterolemic peptide originated from glycinin hydrolysate. *Food Sci. Biotechnol.* 2002 Mar; 11(1):55-6.

50. Amaral AL, Ferreira ES, Neves VA, Demonte A. Legumin from chickpea: hypolipidemic effect in the liver of hypercholesterolemic rats", *Nutr Food Sci*, 2014 Nov; 44(5):378-88.
51. Fukui K, Tachibana N, Wanezaki S, Tsuzaki S, Takamatsu K, Yamamoto T, Hashimoto Y, Shimoda T. Isoflavone-free soy protein prepared by column chromatography reduces plasma cholesterol in rats. *J Agric Food Chem*. 2002 Sep; 50(20):5717-21.
52. Moriyama T, Kishimoto K, Nagai K, Urade R, Ogawa T, Utsumi S, Maruyama N, Maebuchi M. Soybean beta-conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004 Feb; 68(2):352-9.
53. Scarafoni A, Magni C, Duranti M. Molecular nutraceuticals as a mean to investigate the positive effects of legume seed proteins on human health. *Trends Food Sci Techn*. 2007 Sep; 18(9):454-63.
54. Kahlon TS, Shao Q. In vitro binding of bile acids by soy bean (*Glycine max*), black eye bean (*Vigna unguiculata*), garbanzo (*Cicer arietinum*) and lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Food Chem*. 2004 Jul; 86(3):435-40.
55. Rho SJ, Park SP, Ahn CW, Shin JK, Lee HG. Dietetic and hypocholesterolaemic action of black soy peptide in dietary obese rats. *J Sci Food Agric*, 2007 Mar; 87:908-13.

56. Lammi C, Zanoni C, Arnoldi A, Vistoli G. Two peptides from soy  $\beta$ -conglycinin induce a hypocholesterolemic effect in HepG2 cells by a statin-like mechanism: comparative in vitro and in silico modeling studies. *J Agric Food Chem*. 2015 Sep; 63(36):7945-51.
57. Pelegrini PB, Sarto RP, Silva ON, Franco OL, Grossi-de-As MF. Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. *Biochem Res Int*. 2011 Jan; 2011:1-9.
58. Silva FP, Machado MC. Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides*. 2012 Aug; 36(2):308-14.
59. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*. 2013 Nov; 6(12): 1543-75.
60. Andersson DI, Hughes D, Kubicek-Sutherland JZ. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist Updat*. 2016 May; 26:43-57.
61. Salas CE, Badillo-Corona JA, Ramírez-Sotelo G, Oliver-Salvador C. Biologically active and antimicrobial peptides from plants. *BioMed Res Int*. 2015 Aug; 2015:1-11.
62. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev*. 2003 Mar; 55(1):27-55.
63. Kang SJ, Kim DH, Mishig-Ochir T, Lee BJ. Antimicrobial peptides: their physicochemical properties and therapeutic application. *Arch Pharm Res*. 2012 Mar; 35(3):409-13.



64. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*. 2010 Sep-Oct; 1(5):440-64.
65. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*. 2005 Mar; 3(3):238-50.
66. Vasconcellos FCS, Woiciechowski AL, Soccol VT, Mantovani D, Soccol CR. Antimicrobial and antioxidant properties of  $\beta$ -conglycinin and glycinin from soy protein isolate. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 2014 Abr; 3(8) 144-157.
67. Franco OL, Murad AM, Leite JR, Mendes PA, Prates MV, Bloch C Jr. Identification of a cowpea gamma-thionin with bactericidal activity. *Febs J*. 2006 Aug; 273(15):3489-97.
68. Wong JH, Ng TB. Lunatusin, a trypsin-stable antimicrobial peptide from lima beans (*Phaseolus lunatus L.*). *Peptides*. 2005 Nov; 26(11):2086-92.
69. Wong JH1, Ng TB. Vulgarinin, a broad-spectrum antifungal peptide from haricot beans (*Phaseolus vulgaris*). *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Aug; 37(8):1626-32.
70. Pitta MGR, Pitta MGR, Galdino SL. Development of novel therapeutic drugs in humans from plant antimicrobial peptides. *Curr Protein Pept Sci*. 2010 May; 11(3):236-47.
71. Upton M, Cotter P, Tagg J. Antimicrobial peptides as therapeutic agents. *Int J Microbiol*. 2012 Abril; 2012: 1-2.
72. CONAB – Superintendência Regional da Paraíba. Conjuntura agropecuária do feijão [internet]. 2015. Disponível a partir de: [http:](http://)

[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_07\\_09\\_16\\_20\\_14\\_conjuntura\\_agropecuaria\\_do\\_feijao\\_-\\_junho\\_2015.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_07_09_16_20_14_conjuntura_agropecuaria_do_feijao_-_junho_2015.pdf).

73. Nair RM, Yang RY, Easdown WJ, Thavarajah D, Thavarajah P, Hughes Jd, Keatinge JD. Biofortification of mungbean (*Vigna radiata*) as a whole food to enhance human health. *J Sci Food Agric*. 2013 Jun; 93(8):1805-13.
74. Lin, SS, Alves AC. Comportamento de linhagens de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) em Santa Catarina. *Cienc. Rural*. 2002 Aug; 32(4):553-58.
75. Vieira RF, Nishihara MK. Comportamento de cultivares de mungo-verde (*Vigna radiata*) em Viçosa, Minas Gerais. *Rev Ceres*. 1992 Mar; 39(221):60-83.
76. Vieira RF, Oliveira VR, Vieira C, Pinto CMF. Ouro Verde MG2: nova cultivar de mungo-verde para Minas Gerais. *Hort.bras*. 2002 Mar; 20(1):119-120.
77. Mung bean. Production guideline. Department of Agriculture, Forestry and Fisheries. [internet] 2010. Disponível a partir de: <http://www.nda.agric.za/docs/Brochures/MbeanpGUDELINS.pdf>
78. Kavya N, Kavya B, Ramarao V, Kumar RK, Venkateshwarlu G. Nutritional and therapeutic uses of mudga [*Vigna radiata*(L.) R. Wilczek]: a potential interventional dietary componente. *Int J Res Ayurveda Pharm*. 2014 Mar-Apr; 5(2):238-41.
79. Ullah R, Ullah Z, Al-Deyab SS, Adnan M, Tariq A. Nutritional assessment and antioxidant activities of different varieties of *Vigna radiata*. *Sci World J*. 2014 Oct; 2014:1-5.

80. Singh AK, Kumar P, Chandra N. Studies on seed production of mungbean (*Vigna radiata*) sown at different dates. *J Environ Biol.* 2013 Nov; 34(6):1007-11.
81. Mondal MMA, Puteh AB, Malek MA, Ismail MR, Rafii MY, Latif MA. Seed yield of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) in relation to growth and developmental aspects. *Sci World J.* 2012 Aug; 2012: 1-7.
82. Tang D, Dong Y, Ren H, Li L, He C. A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common food mung bean and its sprouts (*Vigna radiata*). *Chem Cent J.* 2014 Jan; 8(1):1-9.
83. Dzudie, T, Hardy, J. Physicochemical and functional properties of flours prepared from common beans and green mung beans. *J. Agric. Food Chem.* 1996 Oct; 44(10):3029-32.
84. Tsou, CS, Hsu, MS, Tan ST, Park HG. The protein quality of mungbean and its improvement. In: Proceedings of the Symposium on Quality of Vegetables. Lund, Sweden, p. 279 - 288, 1979.
85. Akaerue BI, Onwuka GI. Evaluation of the yeild, protein content and functional properties of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] protein isolates as affected by processing. *Pak J Nutr.* 2010 Abr; 9 (8): 728-735.
86. Shaheen S, Harun N, Khan F, Hussain RA, Ramzan S, Rani S, Khalid Z, Mushtaq Ahmad M, Zafar M. Comparative nutritional analysis between *Vigna radiate* and *Vigna mungo* of Pakistan. *Afr. J. Biotechnol.* 2012 Mar; 11(25): 6694-6702.

87. Liu H, Liu H, Yan L, Cheng, X, Kang, Y. Functional properties of 8S globulin fractions from 15 mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) cultivars. *Int J Food Sci Tech*. 2015 May; 50(5):1206-14.
88. Tang CH, Sun X. Physicochemical and structural properties of 8S and/or 11S globulins from mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] with various polypeptide constituents. *J Agric Food Chem*. 2010 May 26; 58(10):6395-402
89. Yao Y, Zhu Y, Ren G. Mung bean protein increases plasma cholesterol by up-regulation of hepatic HMG-CoA reductase, and CYP7A1 in mRNA levels. *J Food Nutr Res*. 2014 Oct; 2(11):770-75.
90. Viernes LBG, Garcia RN, Torio MAO, Angelia MRN. Antihypertensive peptides from vicilin, the major storage protein of mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). *J Biolog Sci*. 2012 Dec; 12: 393-399.
91. Chen KC, Lin CY, Kuan CC, Sung HY, Chen CS. A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid. *J Agric Food Chem*. 2002 Dec;50(25):7258-63.
92. Bernardo AE, Garcia RN, Adachi M, Angeles JG, Kaga A, Ishimoto M, Utsumi S, Tecson-Mendoza EM. 8S globulin of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]: cloning and characterization of its cDNA isoforms, expression in *Escherichia coli*, purification, and crystallization of the major recombinant 8S isoform. *J Agric Food Chem*. 2004 May; 52(9):2552-60.

93. Itoh T, Garcia RN, Adachi M, Maruyama Y, Tecson-Mendoza EM, Mikami B, Utsumi S. Structure of 8S alpha globulin, the major seed storage protein of mung bean. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2006 Jul; 62(Pt 7):824-32.
94. Garcia RN, Adachi M, Tecson-Mendoza EM, Bernardo AE, Utsumi S. Physicochemical properties of native and recombinant mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) 8S globulins and the effects of the N-linked glycans. *J Agric Food Chem*. 2006 Aug; 54(16):6005-10.