

JAFF RIBEIRO DA SILVA

**Avaliação da ação de peptídeos oriundos da hidrólise da proteína do
feijão-caupí sobre a atividade da enzima HMG-CoA redutase**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Co-orientador: Prof. Dr. Ederlan de Souza Ferreira

Araraquara

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

S586a Silva, Jaff Ribeiro da
Avaliação da ação de peptídeos oriundos da hidrólise da proteína do feijão-caupí sobre a atividade da enzima HMG-CoA redutase / Jaff Ribeiro da Silva. –
Araraquara : [s.n.], 2020
115 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Eduardo Maffud Cilli
Coorientador: Ederlan de Souza Ferreira

1. Feijão-de-corda. 2. Dislipidemias. 3. Aterosclerose.
4. Hipercolesterolemia. 5. Peptídeos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

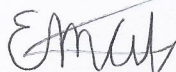
TÍTULO DA TESE: "Avaliação da ação de peptídeos oriundos da hidrólise da proteína do feijão-caupí sobre a atividade da enzima HMG-CoA redutase"

AUTOR: JAFF RIBEIRO DA SILVA

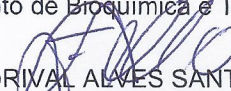
ORIENTADOR: EDUARDO MAFFUD CILLI

COORIENTADOR: EDERLAN DE SOUZA FERREIRA

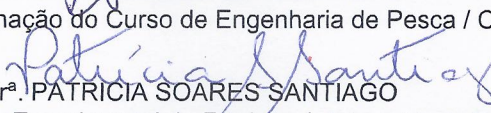
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



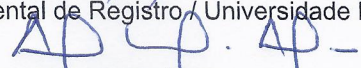
Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



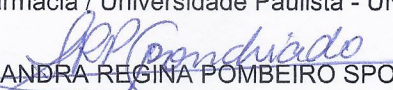
Prof. Dr. NORIVAL ALVES SANTOS FILHO
Coordenação do Curso de Engenharia de Pesca / Campus Experimental de Registro - UNESP - Registro



Prof.^a Dr.^a PATRICIA SOARES SANTIAGO
Campus Experimental de Registro / Universidade Estadual Paulista - UNESP - Registro



Prof. Dr. ALBERTO CAMILO ALÉCIO
Curso de Farmácia / Universidade Paulista - UNIP - Araraquara



Prof.^a Dr.^a SANDRA REGINA POMBEIRO SPONCHIADO
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 14 de fevereiro de 2020

DADOS CURRICULARES

Nome

Jaff Ribeiro da Silva

Nome em citações bibliográficas

SILVA, J. R.; Silva, Jaff R. da; Silva, Jaff R.; Silva, Jaff Ribeiro da; DA SILVA, JAFF RIBEIRO; DA SILVA, JAFF R.

Endereço profissional

Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas
Avenida Barão de Geremoabo s/n

Ondina - Salvador
40170290, BA - Brasil

Endereço eletrônico

jaff_ribeiro@yahoo.com.br
jrdsilva@ufba.br

Formação acadêmica/titulação

2016

Doutorado em Biotecnologia
Instituto de Química/UNESP - Araraquara, São Paulo, Brasil
Título: Avaliação da ação de hidrolisados proteicos e peptídeos obtidos do feijão-caupí sobre a atividade da HMG-CoA redutase
Orientador: Eduardo Maffud Cilli
Co-orientador: Ederlan de Sousa Ferreira

2006 - 2008

Mestrado em Ciência de Alimentos
Faculdade de Farmácia/UFBA - Salvador, Bahia, Brasil
Título: Desenvolvimento e validação de metodologia para a determinação de resíduos do antibiótico cloranfenicol em diferentes matrizes alimentícias, Ano de obtenção: 2009
Orientador: Janice Izabel Druzian
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia

2001 - 2005

Graduação em Farmácia.
Universidade Federal da Bahia/UFBA, Salvador, Bahia, Brasil

Formação complementar

2017 - 2017

Curso de curta duração em Como estruturar, submeter e revisar o seu artigo original de pesquisa. (Carga horária: 4h).

Editage, Brasil

2013 - 2014
Espanhol. (Carga horária: 680h).
Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil

2014 - 2014
Curso de curta duração em Moodle para professores: a educação online na UFBA. (Carga horária: 60h).
Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil

2013 - 2013
Espanhol. (Carga horária: 90h).
Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil

2012 - 2012
Curso de curta duração em Treinamento Técnico Perkin Elmer. (Carga horária: 3h).
Perkin Elmer, Brasil

2011 - 2011
Inglês Instrumental. (Carga horária: 150h).
Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil

2010 - 2010
Curso de curta duração em Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. (Carga horária: 32h).
PROTIMIZA, Brasil

2007 - 2009
Inglês. (Carga horária: 408h).
Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil

2008 - 2008
Curso de curta duração em Cromatografia Gasosa. (Carga horária: 16h).
Perkin Elmer, Brasil

2008 - 2008
Curso de curta duração em TotalChrom de Cromatografia Gasosa. (Carga horária: 8h).
Perkin Elmer, Brasil

2008 - 2008
Curso de curta duração em CLAE e Cromatografia Iônica. (Carga horária: 16h).
Dionex, Brasil

2007 - 2007
Curso de curta duração em Eletrônica Básica. (Carga horária: 60h).
SENAI, Salvador, Brasil

2007 - 2007
Curso de curta duração em Treinamento Operacional no Software Turbomass CGMS. (Carga horária: 24h).
Perkin Elmer, Brasil

2006 - 2006
Curso de curta duração em Espectrometria de Massa Acoplada a LC e GC. (Carga horária: 24h).
SENAI, Salvador, Brasil

2006 - 2006

Curso de curta duração em Traing Course in Clarus 600 and Clarus 600MS. (Carga horária: 32h).
Perkin Elmer, Brasil

2006 - 2006

Curso de curta duração em Programa de treinamento do portal de periódicos. (Carga horária: 12h).
CAPES, Brasília, Brasil

2004 - 2004

Curso de curta duração em Treinamento Operacional em HPLC. (Carga horária: 16h).
Perkin Elmer, Brasil

2004 - 2004

Curso de curta duração em Treinamento Operacional CP3800 e Workstation 6.2. (Carga horária: 8h).
Varian, Brasil

2004 - 2004

Curso de curta duração em Treinamento Operacional em GC - MS. (Carga horária: 24h).
Perkin Elmer, Brasil

2004 - 2004

Curso de curta duração em Curso Empreendedor Nota 10. (Carga horária: 60h).
FAPESB, Salvador, Brasil

2003 - 2003

Curso de curta duração em Os Mais Recentes Avanços na Cromatografia Líquida. (Carga horária: 4h).
Faculdade de Farmácia/UFBA, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

2016 - Atual

Vínculo: Aluno, Enquadramento funcional: Doutorando, Regime: Dedicção exclusiva

Atividades

02/2016 - Atual

Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Química de Araraquara
Linhas de pesquisa: Biotecnologia

2. Universidade Federal da Bahia - UFBA

2011 - Atual

Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Farmacêutico

2010 - 2010

Vínculo: Bolsista DTI 2 CNPq, Enquadramento funcional: Bolsista Pesquisador

2008 - 2009

Vínculo: Trabalho Temporário, Enquadramento funcional: Professor Substituto.

Outras informações: Professor substituto com foco nas áreas de Cromatografia Instrumental e Ciência de Alimentos. Com carga de 8 horas/aula semanais.

2006 - 2008

Vínculo: Estudante, Enquadramento funcional: Mestrando

2002 - 2006

Vínculo: Estudante, Enquadramento funcional: Iniciação Científica

Atividades**10/2016 - Atual**

Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Farmácia
Linhas de pesquisa: Bioquímica dos Alimentos

01/2010 - Atual

Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Farmácia, Laboratório de Pescados e Cromatografia Aplicada/Lapesca
Linhas de pesquisa: Análises cromatográficas

03/2008 - 12/2009

Aperfeiçoamento
Disciplinas ministradas: Métodos Físicos de Análises Aplicadas

03/2008 - 12/2009

Aperfeiçoamento
Disciplinas ministradas: Bioquímica e Análise de Alimentos, Métodos Físicos de Análises Aplicadas

03/2008 - 12/2009

Graduação, Farmácia
Disciplinas ministradas: Bromatologia Geral, Métodos Físicos de Análises Aplicadas

08/2007 - 01/2009

Outra atividade técnico-científica, Faculdade de Farmácia, Mestrado em Ciência de Alimentos
Especificação: Bolsa FAPESB - Mestrado

09/2006 - 09/2008

Conselhos, Comissões e Consultoria, Faculdade de Farmácia, Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos
Especificação: Representante Estudantil do Mestrado em Ciências de Alimentos - UFBA

09/2006 - 09/2008

Conselhos, Comissões e Consultoria, Faculdade de Farmácia, Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos
Especificação: Membro da Comissão de Bolsas do Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos - UFBA

08/2006 - 06/2007

Outra atividade técnico-científica, Faculdade de Farmácia,
Mestrado em Ciência de Alimentos

Especificação: Bolsa CAPES Quota Pró-Reitoria - Mestrado

08/2005 - 07/2006

Outra atividade técnico-científica, Faculdade de Farmácia,
Laboratório de Pescados e Cromatografia Aplicada/Lapesca

Especificação: Bolsa Iniciação Científica PIBIC/CNPq

08/2004 - 07/2005

Outra atividade técnico-científica, Faculdade de Farmácia,
Laboratório de Pescados e Cromatografia Aplicada/Lapesca

Especificação: Bolsa Iniciação Científica PIBIC/CNPq

11/2002 - Atual

Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Farmácia, Laboratório
de Pescados e Cromatografia Aplicada/Lapesca

Linhas de pesquisa: Ciência de Alimentos

Projetos de pesquisa

2016 - Atual

Avaliação da ação de hidrolisados proteicos e peptídeos obtidos do
feijão-caupí sobre a atividade da HMG-CoA redutase

2013 - 2015

Avaliação de bioativos e contaminantes em cascas de uvas
procedentes do Vale são Francisco-Ba

2013 - 2013

Análises de Micotoxinas em Matrizes alimentícias para Humanos e
Animais

2004 - 2006

Avaliação de Resíduos do Antibiótico Cloranfenicol em Camarão -
Convênio Geden nº 447 Banco do Nordeste do Brasil / UFBA /
Empresa Bahia Pesca / FAPEX

2002 - 2006

Implantação de um Laboratório Referência no Estado para
Qualificação de Pescados. Convênio FAPESB/UFBA/FAPEX
222/2002. DOU 14 nov. 2002, no 18.125.

Projetos de desenvolvimento tecnológico

2013 - Atual

Desenvolvimento de filmes flexíveis biodegradáveis para
embalagem primária de matrizes zeolíticas contendo rincoroforol

2009 - Atual

Desenvolvimento de embalagens antioxidantes e antimicrobianas
para aumentar vida de prateleira de produtos lácteos: estudo de
transposição de escala

2009 - 2011

Transformação da glicerina do biodiesel em biopolímero e
biofilmes: otimização dos processos e aplicação dos bioprodutos

Prêmios e títulos

2011

Diploma de Honra ao Mérito, Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. DE JESUS ASSIS, DENILSON; SANTOS, JOANA; DE JESUS, CRISTIANE SANTOS; DE SOUZA, CAROLINA OLIVEIRA; COSTA, SAMANTHA SERRA; MIRANDA, ANDRÉA LOBO; DA SILVA, **JAFF RIBEIRO**; OLIVEIRA, MARIA BEATRIZ PRIOR PINTO; DRUZIAN, JANICE IZABEL. Valorization of crude glycerol based on biological processes for accumulation of lipophilic compounds. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES. v.129, p.728 - 736, 2019.
2. VEIGA-SANTOS, PRICILA; SILVA, LUCIANA T.; DE SOUZA, CAROLINA O.; **DA SILVA, JAFF R.**; ALBUQUERQUE, ELAINE C. C.; DRUZIAN, JANICE I. Coffee-cocoa additives for bio-based antioxidant packaging. FOOD PACKAGING AND SHELF LIFE. v.18, p.37 - 41, 2018.
3. SILVA, MARIANA BARROS DE CERQUEIRA E; SOUZA, CAIO ALEXANDRE DA CRUZ; PHILADELPHO, BIANE OLIVEIRA; CUNHA, MARIANA MOTA NOVAIS DA; BATISTA, FABIANA PACHECO REIS; **SILVA, JAFF RIBEIRO DA**; DRUZIAN, JANICE IZABEL; CASTILHO, MARCELO SANTOS; CILLI, EDUARDO MAFFUD; FERREIRA, EDERLAN S. *In vitro* and *in silico* studies of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitory activity of the cowpea Gln-Asp-Phe peptide. FOOD CHEMISTRY. v.259, p.270 - 277, 2018.
4. FIGUEIREDO, TAMIRIS V. B.; CAMPOS, MÁRCIO I.; SOUSA, LUCIANE S.; **SILVA, JAFF R. DA**; DRUZIAN, JANICE I. Production and characterization of polyhydroxyalkanoates obtained by fermentation of crude glycerin from biodiesel. QUIMICA NOVA. v.37, p.1111 - 1117, 2014.
5. MELO, F. V. S. T.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; COSTA, C. N.; ABREU, R. D. Composição centesimal e perfil de ácidos graxos em Bijupirás (*Rachycentron canadum*) juvenis selvagens e cultivados. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA. v.8, p.458 - 465, 2012.
6. COSTA, CAROLINA NUNES; **SILVA, JAFF RIBEIRO DA**; MELO, FULVIO VIEGAS TEIXEIRA DE; HISANO, HAMILTON; DRUZIAN, JANICE IZABEL; PORTZ, LEANDRO. Incorporação de ômega-3 no tecido muscular da tilápia do Nilo alimentada com dietas contendo

silagem de cabeça de camarão. CIENCIA RURAL. v.42, p.172 - 177, 2012.

7. SOUZA, CAROLINA O.; SILVA, LUCIANA T.; **SILVA, JAFF R.**; LOPEZ, JORGE A.; VEIGA-SANTOS, PRICILA; DRUZIAN, JANICE I. Mango and Acerola Pulps as Antioxidant Additives in Cassava Starch Bio-based Film. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. v.59, p.2248 - 2254, 2011.
8. **SILVA, J. R.**; SILVA, LUCIANA T.; DRUZIAN, JANICE I. Otimização e validação intralaboratorial de método para análise de resíduos de cloranfenicol em leite caprino por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (CG/DCE). QUIMICA NOVA. v.33, p.90 - 96, 2010.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SOUZA, C. A. C.; SILVA, M. B. C. E.; PHILADELPHO, B. O.; CUNHA, M. M. N.; BATISTA, F. P. R.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; CILLI, E. M.; CASTILHO, M.; FERREIRA, E. S. Análise do acoplamento de peptídeos oriundos da proteína beta-vignina do feijão-caupí, com o sítio ativo da HMG-CoA, *in silico*. In: Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da Universidade Federal da Bahia, 2018, Salvador.
2. SOUZA, V.; PHILADELPHO, B. O.; SILVA, M. B. C. E.; **SILVA, J. R.**; CILLI, E. M.; DRUZIAN, J. I.; CASTILHO, M.; FERREIRA, E. S. Estudo de peptídeos derivados da beta-vignina do feijão adzuki sobre a atividade da HMG-CoA redutase *in silico*. In: Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da Universidade Federal da Bahia, 2018, Salvador.
3. **SILVA, J. R.**; SILVA, M. B. C. E.; CASTILHO, MARCELO SANTOS; FERREIRA, E. S.; CILLI, E. M. Peptide derived from the cowpea β -vignin with HMG-CoA reductase inhibitory activity. In: 47th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2018, Joinville.
4. SILVA, M. B. C. E.; SOUZA, C. A. C.; CUNHA, M.; PHILADELPHO, B.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; CASTILHO, M.; CILLI, E. M.; FERREIRA, E. S. *In silico* peptides screening derived of the beta vignin from cowpea with inhibitory capacity over the HMG-CoA reductase. In: 12 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2017, Campinas.
5. MELO, F. V. S. T.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; COSTA, C. N.; PORTZ, L. Proximate composition in cobia (*Rachycentron canadum*) juveniles and adults of wild. In: World Aquaculture, 2011, Natal.
6. ASSIS, D. J.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; CONCEICAO, E. K.; GOMES PACHECO, G. V. Comparativo da produção e caracterização reológica de goma xantana obtida com diferentes linhagens e fontes

de carbono. In: XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010, Salvador.

7. DRUZIAN, J. I.; **SILVA, J. R.**; INOMATA, M.; COSTA, L. A. S. Determinação do peso molecular de goma xantana obtida a partir do resíduo de sisal. In: XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010, Salvador.
8. DRUZIAN, J. I.; **SILVA, J. R.**; INOMATA, M.; COSTA, L. A. S. Obtenção de xantana a partir do extrato aquoso de casca de camarão pela *Xanthomonas campestris* cepa 254: Produção e caracterização do biopolímero. In: XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010, Salvador.
9. MELO, F. V. S. T.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; TAVARES, A. C.; CONCEICAO, E. K.; PORTZ, L. Perfil de ácidos graxos em ossos da cabeça de beijupirás (*Rachycentron canadum*) adultos criados em cativeiro. In: 47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2010, Salvador.
10. MELO, F. V. S. T.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; CONCEICAO, E. K.; TAVARES, A. C. Perfil de ácidos graxos em ossos da cabeça de beijupirás (*Rachycentron canadum*) juvenis selvagens. In: 47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2010, Salvador.
11. COSTA, L. A. S.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; INOMATA, M. Produção e caracterização de goma xantana a partir de extrato aquoso de casca de camarão. In: XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010, Salvador.
12. GALDINO, F. S. S.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; MIRANDA, M. S.; MACIEL, L. F. Determinação de metanol em cachaças produzidas na Bahia por CG-DIC. In: 12º Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas - XII COLACRO, 2008, Florianópolis.
13. MELO, F. V. S. T.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, JANICE I.; PORTZ, L.; COSTA, C. N. Teor de lípidios totais, EPA e DHA do *Rachycentron canadum* cultivado com ração comercial. In: Aquaciencia, 2008, Maringá.
14. **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; GALDINO, F. S. S.; ROSÁRIO, A. S. Validação de método para análise de 5-hidrometilfurfural e furfural em cachaças produzidas na Bahia por CLAE. In: 12º Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas – XII COLACRO, 2008, Florianópolis.
15. **SILVA, J. R.**; SILVA, L. T.; BISPO, E. S.; CARVALHO FILHO, C. D.; SANTOS, P. Q.; ALVAREZ, R. C.; MENEZES, J. D. de S.; CONCEIÇÃO, M. F. Aproveitamento industrial da casca de cacau

(*Theobroma cacao* L.) como fonte de fibra alimentar na produção de biscoito tipo cookie. In: 7º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2007, Campinas.

16. DRUZIAN, J. I.; **SILVA, J. R.**; SILVA, L. T.; SOUZA, C. O.; GALDINO, F. S. S. Ácidos graxos trans de alimentos consumidos em Salvador-BA. In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006, Curitiba.
17. **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I. Determinação de resíduos de antibióticos em camarão cultivado. In: XXV Seminário Estudantil de Pesquisa - UFBA, 2006, Salvador.
18. DRUZIAN, J. I.; **SILVA, J. R.**; SILVA, L. T.; SOUZA, C. O.; GALDINO, F. S. S. Teor de ácido fólico em farinhas de milho enriquecidas e comercializadas em Salvador-BA. In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006, Curitiba.
19. **SILVA, J. R.**; SILVA, L. T.; DRUZIAN, J. I. Avaliação de resíduos do antibiótico cloranfenicol em camarão. In: VI Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2005, Campinas.
20. **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I. Avaliação de resíduos do antibiótico cloranfenicol em camarão cultivado. In: XXIV Seminário Estudantil de Pesquisa (XXIV SEMEP), 2005, Salvador.
21. **SILVA, J. R.**; SILVA, L. T.; DRUZIAN, J. I.; SOUZA, C. O.; HORA, L. Composição físico-química e de ácidos graxos de cabeça de tilápia (*Oreochromis niloticus*). In: XIV Encontro Nacional de Analistas de Alimentos - XIV ENAAL, 2005, Goiânia.
22. SILVA, L. T.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; ANDRADE, G. Q. Teores de colesterol nos peixes mais consumidos na Bahia. In: XXIV Seminário Estudantil de Pesquisa (XXIV SEMEP), 2005, Salvador.
23. SILVA, L. T.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; ANDRADE, G. Q. Teores de colesterol nos peixes mais consumidos na Bahia. In: VI Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2005, Campinas.
24. **SILVA, J. R.**; SILVA, L. T.; DRUZIAN, J. I.; SIEDEL, JOSEFINA F. F. Avaliação do teor de EPA e DHA de cápsulas de óleo de peixe comerciais. In: XXIII Seminário Estudantil de Pesquisa (XXIII SEMEP), 2004, Salvador.
25. **SILVA, J. R.**; SILVA, L. T.; DRUZIAN, J. I.; SIEDEL, JOSEFINA F. F. Avaliação do teor de EPA e DHA em cápsulas de óleo de peixe comerciais. In: IV Seminário Interno de Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFBA, 2004, Salvador.

26. SILVA, L. T.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I. Composição centesimal e teor de cafeína de obi (*Cola acuminata*). In: I Fórum e Salão do Alimento Inteligente, 2004, São Paulo.
27. **SILVA, J. R.**; SILVA, L. T.; DRUZIAN, J. I.; HORA, L. Composição físico-química e de ácidos graxos de cabeças de tilápias (*Oreochromis Niloticus*). In: XXIII Seminário Estudantil de Pesquisa (XXIII SEMEP), 2004, Salvador.
28. SILVA, L. T.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I. Composição centesimal e teor de cafeína de obi (*Cola acuminata*). In: XXII Seminário Estudantil de Pesquisa (XXII SEMEP), 2003, Salvador.
29. SILVA, L. T.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I. Composição centesimal e teor de cafeína de obi (*Cola acuminata*). In: V Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos-V SLACA, 2003, Campinas.
30. **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; VELOSO, E. S. Influência do método de extração na determinação de cafeína de obi (*Cola acuminata*) por HPLC-UV. In: V Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos-V SLACA, 2003, Campinas.
31. **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; VELOSO, E. S. Influência do método de extração na determinação de cafeína de obi (*Cola acuminata*) por HPLC-UV. In: XXII Seminário Estudantil de Pesquisa (XXII SEMEP), 2003, Salvador.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. PASCOAL, D. R. C.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; ASSIS, D. J.; PINHO, L. S.; MOURA, L. E. Study fingerprint the cassava flour produced in the Copioba Valley. In: XIX Encontro Nacional e V Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2015, Natal.
2. RIBEIRO, M. S.; **SILVA, J. R.**; MACIEL, L. F.; MACHADO FILHO, G. C.; SOARES, S. E.; BISPO, E. S. Avaliação da composição centesimal e atividade de água durante o processo de torração de amêndoas de cacau *Theobroma cacao* L. In: XVIII Encontro Nacional e IV Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2013, São Paulo.
3. RIBEIRO, M. S.; **SILVA, J. R.**; CARVALHO, R. D. S.; MACIEL, L. F.; BISPO, E. S. Avaliação dos aspectos físicos-químicos de vinhos tintos procedentes da agricultura convencional e orgânica comercializados na cidade de Salvador-BA. In: XVIII Encontro Nacional e IV Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2013, São Paulo.
4. MACIEL, L. F.; **SILVA, J. R.**; RIBEIRO, M. S. Avaliação dos compostos bioativos de vinhos tintos procedentes da agricultura convencional e orgânica comercializados na cidade de Salvador-BA. In: XVIII

Encontro Nacional e IV Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2013, São Paulo.

5. RIBEIRO, M. S.; **SILVA, J. R.**; MACIEL, L. F.; CARVALHO, R. D. S. Cafeína em bebidas energéticas: Determinação e avaliação de risco. In: XVIII Encontro Nacional e IV Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2013, São Paulo.
6. DRUZIAN, J. I.; **SILVA, J. R.**; INOMATA, M.; COSTA, L. A. S.; ASSIS, D. J. Caracterização das gomas xantana obtidas a partir de resíduos agroindustriais. In: XVII Encontro Nacional e III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2011, Cuiabá.
7. SILVA, L. T.; SOUZA, C. O.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I. Eficácia antioxidante e caracterização de filmes ativos formulados com fécula de mandioca, cacau e café. In: XVII ENAAL e III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2011, Cuiabá.
8. MIRA, I.; **SILVA, J. R.**; MACIEL, L. F.; MIRANDA, M. S.; BISPO, E. S. Estudo comparativo entre propriedades de textura de amostras de pão de forma tradicional comercializadas no município de Salvador - BA. In: XVII Encontro Nacional e III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2011, Cuiabá.
9. MIRA, I.; **SILVA, J. R.**; MACIEL, L. F.; MIRANDA, M. S.; BISPO, E. S. Propriedades de textura de amostras de pão de forma comercializadas no município de Salvador - BA. In: XVII Encontro Nacional e III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2011, Cuiabá.
10. MIRA, I.; **SILVA, J. R.**; MACIEL, L. F.; MIRANDA, M. S. Influência de diferentes sistemas de cultivo no teor de compostos fenólicos totais e flavonóides em salsa (*Petroselinum crispum*). In: XVI Encontro Nacional e II Congresso latino-americano de analistas de alimentos, 2009, Belo Horizonte.
11. **SILVA, J. R.**; SILVA, L. T.; DRUZIAN, J. I.; JESUS, L. B.; TAVARES, A. C.; CONCEICAO, E. K. Influência do estágio de maturação na composição centesimal e teor de compostos fenólicos do jamelão (*Syzygium cumini*). In: XVI Encontro nacional e II Congresso latino-americano de analistas de alimentos, 2009, Belo Horizonte.
12. MELO, F. V. S. T.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; SANTOS, L. G.; CARVALHO, Z. S.; SANTOS, A. R. Influência do fósforo e boro no rendimento de óleo e proteína em sementes de girassol. In: XVI Encontro nacional e II Congresso latino-americano de analistas de alimentos, 2009, Belo Horizonte.
13. **SILVA, J. R.**; MELO, F. V. S. T.; DRUZIAN, J. I.; COSTA, C. N.; PORTZ, L. Perfil de ácidos graxos dos bijupirás juvenis (*Rachyncentron canadum*) selvagens. In: XXI Congresso Brasileiro de

Ciência e Tecnologia de Alimentos e XV Seminário Latino-Americano e do Caribe de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2008, Belo Horizonte.

14. GOMES, I. S.; **SILVA, J. R.**; SILVA, L. T.; DRUZIAN, J. I.; SIEDEL, J. F. F. Ácidos graxos trans em cápsulas de óleo de peixe marinho. In: XII Congresso Latino-americano de Óleos e Gorduras, 2007, Florianópolis.
15. **SILVA, J. R.**; COSTA, C. N.; MELO, F. V. S. T.; DRUZIAN, J. I.; PORTZ, L. EPA e DHA de tilápias nilóticas alimentadas com silagem do resíduo do camarão. In: XV ENAAL e Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2007, Fortaleza.
16. SILVA, L. T.; **SILVA, J. R.**; DRUZIAN, J. I.; SOUZA, C. O.; GALDINO, F. S. S.; CARVALHO, R. D. S.; RIBEIRO, M. S. Teores de ácido fólico e ferro em flocos de milho enriquecidos comercializados em Salvador/BA. In: XLVI Congresso Brasileiro de Química CBQ, 2006, Salvador.
17. **SILVA, J. R.**; SILVA, L. T.; DRUZIAN, J. I.; SIEDEL, JOSEFINA F. F. Avaliação do teor de EPA e DHA de cápsulas de óleo de peixe comerciais. In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004, Recife.

Assessoria e consultoria

12/2006 - 12/2010

Consultoria e assistência técnica em sistemas de cromatografia instrumental da Perkin Elmer do Brasil Ltda.

Consultoria no desenvolvimento e implantação de metodologias com técnicas de cromatografias instrumentais.

Desenvolvimento de treinamentos operacionais e soluções para rotina em softwares cromatográficos para geração, controle e gerenciamento de dados analíticos.

Assistências técnicas preventivas e corretivas em cromatógrafos.

Organização de evento

1. I Workshop de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo: Aplicações das Ferramentas da Propriedade Industrial na Biotecnologia, 2012.
2. XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010.

*Dedico e agradeço aos meus pais, Maria e Juarez,
aos meus irmãos, James (in memoriam) e Jussara,
e a minha amada esposa Bruna,
por todo exemplo, apoio e confiança
que sempre recebi de todos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo alento e força recebidos nos momentos de dificuldades.

Aos meus pais e meus irmãos que sempre me incentivaram e apoiaram para que eu alcançasse meus objetivos.

À minha esposa que sempre foi a melhor companheira e me passou muita força, equilíbrio e serenidade para que eu pudesse transpassar pelos obstáculos que surgiram.

Ao meu orientador, Eduardo Maffud Cilli (o “chefe”), e ao meu coorientador, Ederlan de Souza Ferreira (Alvim), que me abriram as portas da área de peptídeos, mostrando-me a magnitude desta e fazendo com que o meu caminho profissional tomasse um novo rumo pelo qual, hoje, sou fascinado.

A toda equipe do LASEBio: Júlia (Jujuba), Norival (Nonô), Paulo (Lolô), Carolina (Monstro), Mariana (Dobby), Mateus (Teteu), Natália (Gary), Teresa (Tekka), João (Jão Canário) e as novatas (Marina, Natália, Sarah e Letícia); por toda colaboração e por manter um ambiente tão agradável para o trabalho.

A todos os funcionários do Instituto de Química, por serem tão solícitos e gentis em todos os momentos em que necessitei de vossas colaborações.

Aos muitos amigos que Araraquara me deu, pelos momentos de descontração e apoio quando a sobrecarga exigia um descanso.

Aos amigos soteropolitanos que, mesmo com a distância, continuaram presentes e atuantes em minha vida.

A todos aqueles que de algum modo colaboraram para a realização deste trabalho, mesmo sendo com um simples “Olá...” ou um belo sorriso, que forneciam mais força para prosseguir.

Muito Obrigado!

Jaff Ribeiro da Silva

"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito.
Não somos o que deveríamos ser,
não somos o que iremos ser mas,
graças a Deus,
não somos o que éramos".

Martin Luther King

RESUMO

Estudos recentes demonstram que a proteína do feijão-caupí (*Vigna unguiculata*) exerce efeitos benéficos sobre o metabolismo lipídico, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Embora o mecanismo de ação dessas proteínas ainda permaneça pouco esclarecido, a hipótese defendida é que os peptídeos derivados da digestão gastrointestinal destas proteínas poderiam modular o metabolismo lipídico. Neste trabalho, foram identificados peptídeos naturais, a partir da hidrólise enzimática da proteína do feijão-caupí, e desenhados análogos que possuem atividade de inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGR) responsável pela biossíntese do colesterol. Inicialmente, foram realizadas triagens *in silico*, selecionando os peptídeos com melhor potencial para a inibição. Por meio das técnicas de síntese de peptídeo em fase sólida, cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas, foi possível obter os peptídeos com rendimentos em torno de 70% e purezas acima de 95%. Foram identificados os peptídeos naturais, QGF (100 μ M) e GCTLN (100 μ M), com capacidade de inibir a atividade da HMGR em, aproximadamente, 38% e 18%, respectivamente. Seguidamente, foram desenhados e obtidos dois novos peptídeos, o pGlu-GF (100 μ M) e GSTLN (100 μ M), com capacidade de inibir a enzima em, respectivamente, 54% e 27%. Os peptídeos desenhados também foram avaliados de modo combinado entre si e com o fármaco pravastatina. Os resultados dos ensaios de inibição combinados foram: pGlu-GF (50 μ M) + GSTLN (50 μ M) = 55%; pGlu-GF (100 μ M) + pravastatina (16,7 η M) = 54% e; GSTLN (100 μ M) + pravastatina (16,7 η M) = 65%. Esses valores foram maiores do que o obtido para a pravastatina (16,7 η M) que foi de aproximadamente 46%. A capacidade de ação dos peptídeos de modo combinado, pode vir a contribuir com soluções para problemas relacionados aos efeitos adversos das estatinas. Este estudo mostrou que os peptídeos originados da hidrólise enzimática da proteína do feijão-caupí possuem atividade inibitória da enzima HMGR. Os peptídeos desenhados, pGlu-GF e GSTLN, são moléculas promissoras para desenvolvimento de novos fármacos e terapias combinadas para o tratamento de dislipidemias.

ABSTRACT

Recent studies show that cowpea bean proteins (*Vigna unguiculata*) possess beneficial effects in the lipid metabolism, *in vitro* and *in vivo*. Although the mechanism of action is still unclear, the hypothesis that is affirmed is that the derived peptides during the gastrointestinal digestion can modulate the lipid metabolism. In this work, natural peptides obtained from enzymatic hydrolysis of the protein from cowpea bean were identified and analogous peptides were drawn, which had inhibition activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR), responsible for endogenous cholesterol synthesis. Firstly, *in silico* screening was performed, selecting the peptides with the best potential for inhibition. It was possible to obtain the peptides with yields around 70 % and purities above 95 %, using techniques of solid phase peptide synthesis (SPPS), high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS). Were identified the natural peptides, QGF (100 μ M) and GCTLN (100 μ M), with capacity of *in vitro* inhibiting the action of HMGR in, approximately, 38 % and 18 %, respectively. Then, two new analogous peptides, pGlu-GF (100 μ M) and GSTLN (100 μ M), were drawn and identified with capacity of HMGR's inhibiting in 54 and 27 %, respectively. The drawn peptides also were evaluated in combination with each other and with the commercial drug pravastatin. The results of the combined inhibition tests were pGlu-GF (50 μ M) + GSTLN (50 μ M) = 55 %; pGlu-GF (100 μ M) + pravastatin (16.7 η M) = 54 % and; GSTLN (100 μ M) + pravastatin (16.7 η M) = 65 %. These values were higher than those obtained for pravastatin (16.7 η M), which was approximately 46 %. The ability of peptides to act in combination may contribute to solutions of therapeutic problems related to the adverse effects of statins's use. This study showed that peptides obtained from enzymatic hydrolysis of cowpea bean protein have a good inhibitory activity of the HMGR enzyme. The drawn peptides, pGlu-GF and GSTLN, are promising molecules for development of new drugs and combined therapies for the treatment of dyslipidemias.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Percentual de mortes por doenças crônicas não-transmissíveis no mundo e no Brasil. Dados brutos extraídos de WHO, 2018 e SBC, 2019.....	34
Figura 2. Processo de formação da placa aterosclerótica.	35
Figura 3. Rota biossintética do colesterol a partir do acetil-CoA.....	38
Figura 4. Esquema de transporte de lipídios pelo organismo mediado pelas lipoproteínas plasmáticas.....	41
Figura 5. Comparação entre as estruturas de 4 estatinas e o HMG-CoA.	45
Figura 6. Produção mundial média de feijão-caupí no período de 1994 a 2017.....	51
Figura 7. Esquema simplificado da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS).	56
Figura 8. Sequência primária de aminoácidos da subunidade-1 da β -vignina (7S) (NCBI/GenBank Blast: AM905848; UniProtKB: A8YQH5_VIGUN).....	59
Figura 9. Alinhamento da sequência primária da subunidade-1 da β -vignina do feijão-caupí (ID: A8YQH5_VIGUN) com a subunidade 7S da globulina do feijão-azuki (ID: A4PI98_PHAAN) e a subunidade α da β -conglucina da soja (ID: GLCAP_SOYBN).	60
Figura 10. Superposição do volume ocupado dos peptídeos triados (estrutura primária) com o espaço ativo de sinvastatina (PDB 1HW9) na HMGR. (A) QGF com sinvastatina; (B) MPNY com sinvastatina.	64
Figura 11. Acoplamento entre o sítio ativo da HMGR (PDB ID: 1HW9) com os peptídeos: (A) QGF e (B) MPNY.	65
Figura 12. Acoplamento do peptídeo MPNY com o sítio ativo (PDB 1HW9) da HMGR usando o software AutoDock-VINA®. (A) Melhor pose selecionada para a sinvastatina (amarelo) sobreposta a melhor posição do peptídeo MPNY (cinza); (B) Previsão do perfil de ligação do MPNY no sítio ativo.....	66
Figura 13. Acoplamento do peptídeo QGF com o sítio ativo (PDB 1HW9) da HMGR usando o software AutoDock-VINA®. (A) Melhor pose selecionada para a sinvastatina (amarelo)	

sobreposta a melhor posição do peptídeo QGF (cinza); (B) Previsão do perfil de ligação do QGF no sítio ativo..... 68

Figura 14. Peptídeo MPNY: (A) Cromatograma do peptídeo bruto sintetizado; (B) Cromatograma do peptídeo purificado; (C) Espectro de massas do peptídeo purificado. 70

Figura 15. Peptídeo QGF: (A) Cromatograma do peptídeo bruto sintetizado; (B) Cromatograma do peptídeo purificado; (C) Espectro de massas do peptídeo purificado..... 71

Figura 16. Reação de formação do ácido piroglutâmico (pGlu) a partir de uma glutamina (Q) e de um ácido glutâmico (E)..... 73

Figura 17. Acoplamento do peptídeo pGlu-GF com o sítio ativo da HMGR (PDB 1HW9) usando o software AutoDock-VINA®. (A) Melhor posição selecionada para a simvastatina (amarelo) sobreposta a melhor posição do peptídeo pGlu-GF (cinza); (B) Previsão do perfil de ligação do pGlu-GF no sítio ativo..... 77

Figura 18. Cromatogramas dos novos peptídeos puros, originados de modificações do MPNY. (A) Δ M-PNY; (B) PNY; (C) SPNY e (D) SPQY. Em detalhe destacam-se as respectivas razões m / z. 78

Figura 19. Cromatogramas dos peptídeos: (A) Peptídeo QGF evidenciando o segundo pico correspondente ao produto de degradação (pGlu-GF); (B) Peptídeo pGlu-GF purificado a partir do QGF e (C) Peptídeo pGlu-GF sintetizado e purificado. Em detalhe destacam-se as respectivas razões m / z. 80

Figura 20. Interação proposta do peptídeo GCTLN por MARQUES e colaboradores (2015b). (A) Tetrâmero da HMGR e o sítio de interação previsto para o peptídeo GCTLN. (B) Interação do GCTLN com o domínio-S próximo ao sítio ativo..... 84

Figura 21. Diagrama em fitas do tetrâmero da HMGR humana. (A) Vista frontal. (B) Vista lateral. 84

Figura 22. Diagrama em fitas da estrutura terciária do monômero da HMGR humana. 85

Figura 23. Cromatogramas do peptídeo puro GCTLN e de seus derivados: (A) GCTLN; (B) GSTLN; (C) GCTLN-NH₂ e; (D) GSTLN-NH₂. Em detalhe destacam-se as respectivas razões m / z. 86

Figura 24. Cromatograma do extrato proteico do feijão-caupí obtido por GPC Sepharose CL-6B (100 x 1,0 cm), eluição isocrática com tampão fosfato de potássio (10 mmol/L) contendo NaCl (0,5 mol/L) e azida sódica (0,01 %) sob um fluxo de 0,45 mL/min. Detecção UV a 280 nm..... 111

Figura 25. Perfis SDS-PAGE do feijão-caupí. (a) Resultados obtidos neste estudo. (b) Figura extraída de Ferreira (2013). 111

Figura 26. Cromatogramas dos peptídeos obtidos da hidrólise da proteína 7S do feijão-caupí obtido por CLAE Analítico C18 (15 x 0,46 cm), detecção UV a 220 nm. (a) Perfil bruto dos peptídeos menores de 3 kDa. (b) Perfil isolado correspondente ao pico de 3,2 min. (c) Perfil isolado correspondente ao pico de 5,4 min. (d) Perfil isolado correspondente ao pico de 7,3 min. 113

Figura 27. Espectro de massas deconvoluído do peptídeo purificado obtido da análise por CL/EM do extrato purificado do peptídeo de 7,3 min obtido pela hidrólise da proteína 7S do feijão-caupí..... 114

Figura 28. Espectro de fragmentação (MS/MS) do peptídeo purificado com massa molar de 386 Da. 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peptídeos obtidos da hidrólise <i>in silico</i> da subunidade-1 da proteína β -vignina do feijão-caupí e dados iniciais da interação com a HMGR.	63
Tabela 2. Principais interações no sítio ativo da HMGR com o substrato HMG-CoA e o inibidor comercial sinvastatina.....	66
Tabela 3. Dados da síntese dos peptídeos originados após a triagem <i>in silico</i> da β -vignina.....	72
Tabela 4. Atividade de inibição da HMGR <i>in vitro</i> pelos peptídeos MPNY e QGF.	74
Tabela 5. Dados da síntese dos peptídeos modificados obtidos a partir do MPNY.	79
Tabela 6. Atividade de inibição da HMGR <i>in vitro</i> pelos novos peptídeos sintetizados.....	81
Tabela 7. Dados da síntese peptídeo GCTLN e seus derivados.	87
Tabela 8. Atividade de inibição da HMGR <i>in vitro</i> pelo peptídeo GCTLN e seus derivados.	87
Tabela 9. Determinação do IC ₅₀ dos peptídeos com maior atividade inibitória sobre a HMGR.	89
Tabela 10. Estudo dos efeitos combinados entre os peptídeos pGlu-GF, GSTLN e o fármaco pravastatina, obtidos por ensaios de inibição <i>in vitro</i> da enzima HMGR.	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11S - Leguminas

7S - Vicilinas

ACC - *American College of Cardiology*

Acetil-CoA - Acetil-coenzima A

ACN - Acetonitrila

C - Colesterol

CE - Ésteres de colesterila

CL/EM - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

C-terminal - Extremidade carboxi-terminal da cadeia polipeptídica

DAC - Doenças arteriais coronarianas

DCM - Diclorometano

DCV - Doenças cardiovasculares

DIC - N,N'-Diisopropilcarbodiimida

DMF - N,N-Dimetilformamida

EDT - 1,2-etanoditol

FDA - *United States Food and Drug Administration*

FFA - *Free Fatty Acids* - Ácidos graxos livres

Fmoc - 9-fluorenilmetiloxycarbonil, grupo protetor α -amino

GPC - *Gel Permeation Chromatography* - Cromatografia de permeação em gel

HDL - *High Density Lipoprotein* - Lipoproteínas de alta densidade pobre em colesterol

HepG2 - Linhagem celular de câncer de fígado humano

HF - Hipercolesterolemia familiar

HMG-CoA - β -hidroxi- β -metilglutaril-coenzima-A

HMGR – Enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase

HOBt – 1-Hidroxibenzotriazol

IC₅₀ – Concentração necessária para inibição de 50 % da atividade

IDL - *Intermediary Density Lipoprotein* - Lipoproteínas de densidade intermediária

LDL - *Low Density Lipoprotein* - Lipoproteínas de baixa densidade rica em colesterol

mRNA – RNA mensageiro

MS/MS - *Tandem Mass Spectrometry* - Espectrometria de massa em tandem

NADP - Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato

NADPH - Forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato

NCDs - *Noncommunicable Diseases* - Doenças crônicas não transmissíveis

NCEP - *National Cholesterol Education Program*

NPC1-L1 - Proteína Niemann-Pick C1-like 1

N-terminal - Extremidade amino-terminal da cadeia polipeptídica

OMS - Organização Mundial da Saúde

PRScore - *Peptide Ranker Score*

R² - Coeficiente de determinação

RMSD - *Root Mean Square Deviation* - Desvio médio dos átomos de uma estrutura X, relativamente a uma segunda estrutura Y

S - Coeficiente de sedimentação

SPFS - Síntese de peptídeos em fase sólida

SR-B1 - *Scavenger Receptor class B type 1* - Receptor sequestrador de classe B tipo 1

SREBP2 - *Sterol regulatory element-binding proteins* - Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 2

TAG - Triacilglicerídeos ou triglicérides

tBu - t-butil, grupo protetor das cadeias laterais

TFA - Ácido trifluoracético

TG - Triacilglicerídeos ou triglicérides

TIS - Triisopropilsilano

t_R - Tempo de retenção

VLDL - *Very Low Density Lipoprotein* - Lipoproteínas de muito baixa densidade

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Ala (A) - Alanina

Arg (R) - Arginina

Asn (N) - Asparagina

Asp (D) - Ácido aspártico

Cys (C) - Cisteína

^DMet (^DM) - Metionina na configuração D

Gln (Q) - Glutamina

Glu (E) - Ácido Glutâmico

Gly (G) - Glicina

His (H) - Histidina

Ile (I) - Isoleucina

Leu (L) - Leucina

Lys (K) - Lisina

Met (M) - Metionina

pGlu - Ácido piroglutâmico

Phe (F) - Fenilalanina

Pro (P) - Prolina

Ser (S) - Serina

Thr (T) - Treonina

Trp (W) - Triptofano

Tyr (Y) - Tirosina

Val (V) - Valina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	31
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivos Específicos	33
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
3.1. Doenças Cardiovasculares.....	34
3.2. Colesterol	36
3.3. Dislipidemias	42
3.3.1. Tratamentos farmacológicos	43
3.3.2. Tratamentos não farmacológicos	46
3.4. Proteínas vegetais	47
3.5. Feijão-caupí.....	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.1. Triagem <i>in silico</i>	52
4.2. Ensaios de acoplamento molecular.....	53
4.3. Síntese dos peptídeos	54
4.4. Reação de clivagem	55
4.5. Purificação e caracterização dos peptídeos	57
4.6. Ensaio de inibição da HMGR <i>in vitro</i>	57
4.7. Análise estatística	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58

5.1. Peptídeos originados da β-vignina (7S)	58
5.1.1. Ensaio <i>in silico</i>	59
5.1.2. Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos triados	69
5.1.3. Ensaio <i>in vitro</i> de inibição da HMGR.....	73
5.1.4. Modificações estruturais dos peptídeos ativos da β -vignina	75
5.1.5. Simulações <i>in silico</i> dos peptídeos modificados.....	76
5.1.6. Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos modificados	78
5.1.7. Ensaio <i>in vitro</i> com os novos peptídeos originados da β -vignina	81
5.2. Peptídeo GCTLN do feijão-caupí.....	83
5.2.1. Modificações estruturais do peptídeo GCTLN.....	83
5.2.2. Síntese, purificação e caracterização do peptídeo GCTLN e seus derivados	86
5.2.3. Ensaio <i>in vitro</i> de inibição da HMGR pelo peptídeo GCTLN e seus derivados	87
5.3. Determinação da concentração dos peptídeos para 50 % de inibição da HMGR (IC₅₀).....	89
5.4. Avaliação do efeito combinado entre os novos peptídeos desenhados e o fármaco pravastatina	90
6. CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS.....	95
APÊNDICES	110

**APÊNDICE A – Estudos preliminares para obtenção de peptídeos da 7S
do feijão-caupí, posteriormente substituídos pelas simulações *in silico*.**

..... 110

1. INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não-transmissíveis (NCDs – *Noncommunicable Diseases*) têm representado a principal causa de morte nas últimas duas décadas no mundo. O aumento na prevalência das NCDs tem sido considerado o resultado da convergência entre saúde, crescimento econômico e desenvolvimento, estando fortemente atrelado às tendências universais como o envelhecimento populacional, avanço da urbanização e um estilo de vida menos saudável, todos como revérbero da globalização (WHO, 2011). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as NCDs foram responsáveis por 41 das 57 milhões de mortes no mundo em 2016 (WHO, 2018). No Brasil, estimasse que em 2016 houveram quase 350 mil mortes decorrentes de doenças cardiovasculares (DCV) (SBC, 2019).

Estudos apontam que a dieta, o sedentarismo e o uso do tabaco, juntos, são responsáveis por 80 % dos episódios coronarianos e cerebrovasculares decorrente da aterosclerose (WHO, 2011, 2018). O *National Cholesterol Education Program* (NCEP), desde 2002, reconhece a hipercolesterolemia como o pré-requisito para a aterosclerose, sendo que a redução da lipoproteína de baixa densidade (LDL) é fundamental para a diminuição do risco de eventos cardiovasculares (NCEP, 2002). A *American College of Cardiology* (ACC) corrobora que mudanças no estilo de vida e na dieta devem ser associadas às terapias medicamentosas para o melhor controle das dislipidemias (STONE et al., 2014).

Uma relação direta entre o consumo de proteínas de origem animal e o desenvolvimento de DCV tem sido descrita na literatura. Isso se deve, principalmente, a dois fatores: primeiro, proteínas de origem animal carregam junto a si ácidos graxos saturados e colesterol, o que não acontece no consumo de proteínas vegetais; em segundo, para as proteínas de origem vegetal tem sido atribuído efeitos benéficos por ação farmacológica dos peptídeos originados da digestão destas (SCARAFONI et al., 2007; CONSONNI et al., 2011; TACO, 2011; FERREIRA et al., 2015; FROTA et al., 2008; SILVA et al., 2018; MARQUES et al., 2018). Estes dados indicam a vantagem da substituição da fonte proteica de origem animal pela fonte vegetal, a fim de promover diversos

benefícios à saúde, principalmente aqueles envolvidos no desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Nesse cenário, estudos tem destacado o papel das leguminosas no metabolismo e na prevenção da hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiperglicemia. Estudos em animais (PAK et al., 2006; PAK et al., 2012; FERREIRA et al., 2015) e em humanos (SIRTORI et al., 2009) têm sugerido que a proteína de soja apresenta uma capacidade de reduzir os níveis séricos de colesterol total e de LDL. Assim como a proteína da soja, outras espécies de leguminosas, tais como feijões, ervilhas e tremoço também têm mostrado capacidade de alterar o metabolismo do colesterol, porém, estas têm recebido menor atenção (SCARAFONI et al., 2007). A literatura aponta um efeito hipocolesterolemizante em animais (FROTA et al., 2008; FERREIRA et al., 2015; KAPRAVELOU et al., 2015; LIYANAGE et al., 2018) e humanos (FROTA et al., 2015) quando alimentados com uma dieta tendo como fonte de proteína o isolado proteico do feijão-caupí.

Apesar do mecanismo de ação dessas proteínas ainda não esteja totalmente esclarecido, indícios apontam que os peptídeos derivados da digestão gastrointestinal destas proteínas poderiam atuar modulando o metabolismo lipídico. Essa ação poderia ser por diversos meios, tais como: alterações na absorção, síntese, excreção, indução e/ou supressão de transcrição de receptores e inibição de enzimas da via biossintética do colesterol (FERREIRA, 2013).

Assim, estudar a hipótese na qual a proteína do feijão-caupí possa originar peptídeos, seja a partir da hidrólise enzimática *in vitro* ou ainda por métodos *in silico*, e que estes venham a apresentar capacidade de agir no metabolismo do colesterol, representa o desafio de avançar no sentido de esclarecer quais os possíveis mecanismos de ação envolvidos. Além disto, possibilita a criação de pressupostos para o desenvolvimento futuro de novos fármacos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a ação de peptídeos obtidos da hidrólise enzimática da proteína do feijão-caupí sobre atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGR).

2.2. Objetivos Específicos

- Triar peptídeos por dois caminhos: (1) a partir da hidrólise *in silico* da subunidade-1 da fração proteica 7S, que já está sequenciada e descrita na literatura; (2) produzir derivados do peptídeo GCTLN do feijão-caupí, já triado e descrito na literatura.
- Avaliar, por ensaios *in silico*, os peptídeos obtidos acima em relação à possível atividade inibitória da HMGR;
- Produzir derivados sintéticos dos peptídeos ativos caracterizados nos ensaios *in silico*;
- Avaliar *in vitro* a capacidade de inibição da HMGR pelos peptídeos sintetizados;
- Desenhar e sintetizar novos derivados dos peptídeos com atividade comprovada, a fim de incrementar sua atividade;
- Avaliar *in vitro* a capacidade de inibição da HMGR dos novos peptídeos sintetizados;
- Determinar a IC₅₀ dos peptídeos que possuam maior capacidade de inibição da HMGR.

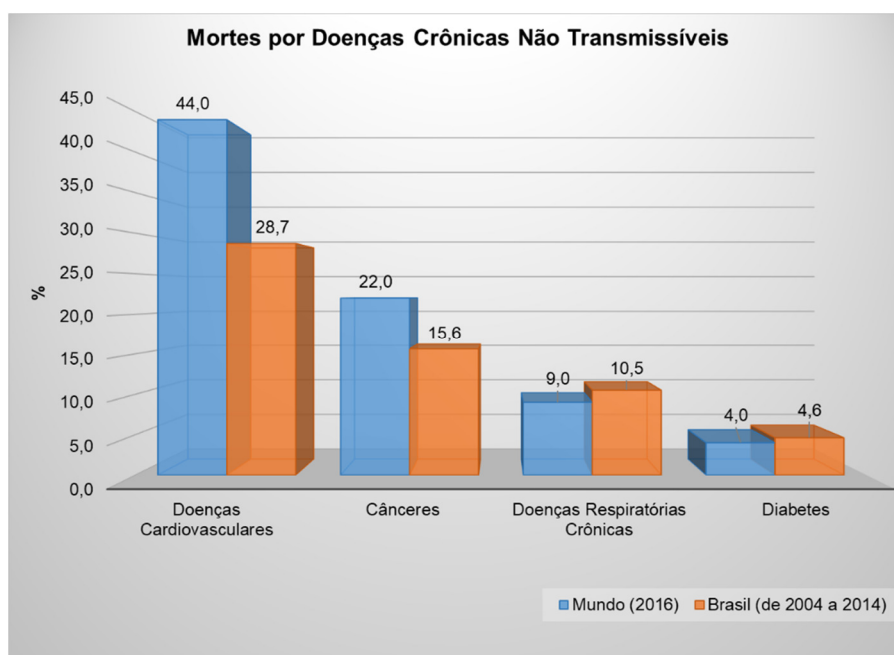
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Doenças Cardiovasculares

No último século, houve uma transição epidemiológica com relação às causas de mortes no mundo, sendo que, na atualidade, as doenças crônico-degenerativas tomaram o lugar das infectocontagiosas. Estudos epidemiológicos estabelecem as NCDs como um notório desafio neste século não apenas para as questões de saúde pública, mas também ao crescimento econômico global. O aumento na prevalência das NCDs está intimamente ligado ao desenvolvimento socioeconômico do mundo globalizado, sendo hoje a principal causa de morte da sociedade moderna (WHO, 2011; PRÉCOMA et al., 2019).

A maioria destas mortes foram causadas por quatro NCDs, sendo a principal delas as doenças cardiovasculares (DCV) (44 %), seguido dos casos de cânceres (22 %), doenças respiratórias crônicas (9 %) e diabetes (4 %) (Figura 1) (WHO, 2018). No Brasil, este cenário não é diferente, entre 2004 e 2014, o percentual de mortes relacionadas às DCVs foi de 28,73 %, neoplasias 15,62%, doenças respiratórias 10,5% e diabetes 4,61% (Figura 1) (SBC, 2019).

Figura 1. Percentual de mortes por doenças crônicas não-transmissíveis no mundo e no Brasil. Dados brutos extraídos de WHO, 2018 e SBC, 2019.



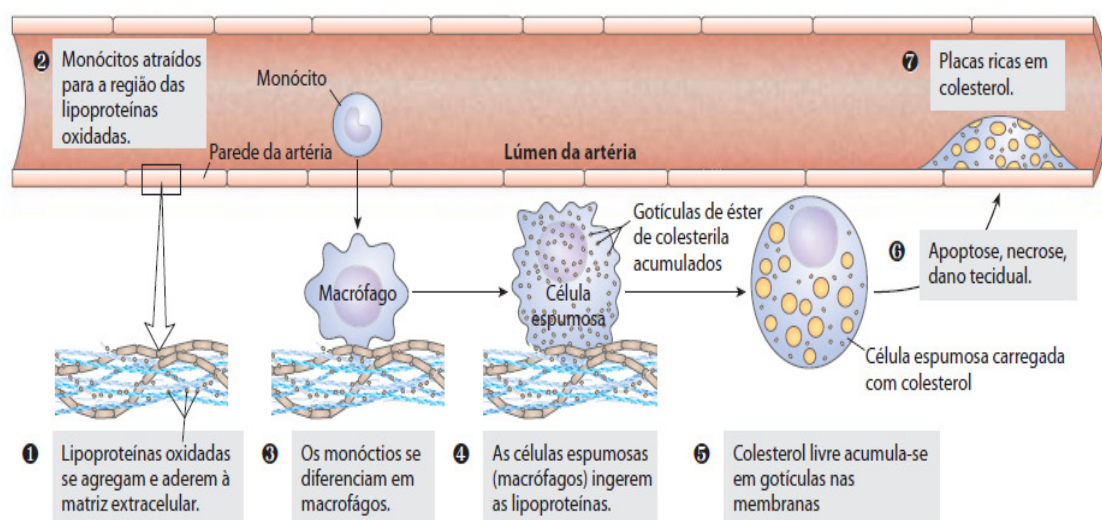
Fonte: Próprio autor.

A incidência das DCVs está intimamente ligada a aterogênese. A ideia de que a aterosclerose seja simplesmente um lento e passivo processo de deposição de gordura na parede dos vasos sanguíneos está ultrapassada. Atualmente, a doença é vista como uma inflamação crônica de origem multifatorial, devido uma resposta do organismo a uma agressão ao endotélio (SWIRSKI e NAHRENDORF, 2013; FALUDI et al., 2017).

A placa aterosclerótica origina-se por uma lesão no endotélio vascular que, por sua vez, pode ser causada diversos fatores, dentre esses as dislipidemias e a hipertensão arterial. Essa agressão ao endotélio culmina em um aumento da permeabilidade às lipoproteínas de baixa densidade ligadas ao colesterol (LDL) que ficam retidas no espaço subendotelial. As partículas de LDL retidas sofrem oxidação gerando epítomos e desse modo tornam-se imunogênicas. A cascata de eventos imunológicos culmina na migração de monócitos para o subendotélio que, uma vez depositados nos vasos, diferenciam-se em macrófagos e passam a captar moléculas de LDL oxidadas (Figura 2) (NELSON e COX, 2014; FALUDI et al., 2017).

Esse evento mostra que a aterogênese está diretamente relacionada com os índices plasmáticos de LDL. Os macrófagos não podem limitar a captação de esteróis, e com este acúmulo passam a ser chamados de células espumosas. Com isso, o acúmulo de colesterol nas células espumosas induz a apoptose e o extravasamento de fluídos potencializa a resposta inflamatória (Figura 2) (NELSON e COX, 2014; FALUDI et al., 2017).

Figura 2. Processo de formação da placa aterosclerótica.



Fonte: Figura extraída de NELSON e COX, 2014.

Hoje sabe-se que a aterosclerose possui uma fisiopatologia complexa e dependente de múltiplos fatores sejam estes adquiridos ou congênitos, que interagem com o meio ao qual esse indivíduo está exposto. Dentre esses fatores, as dislipidemias constituem um grande fator de risco de DCVs, sendo a hipercolesterolemia a mais relevante. A hipertensão arterial, o diabetes e a síndrome metabólica também ganham destaque no aumento significativo da incidência das doenças arteriais coronarianas (DAC). O diabetes pode elevar em até quatro vezes a probabilidade da manifestação de DAC. No caso da hipertensão arterial, o risco é potencializado por se tratar de uma doença assintomática, o que dificulta o diagnóstico e o seu tratamento. Soma-se a isso, as mudanças nos padrões nutricionais e de atividades físicas da sociedade moderna, intimamente relacionadas com as transições econômicas, sociais e demográficas, que tornaram o ambiente propício para o desenvolvimento do sobrepeso e da obesidade (BAIK et al., 2013; FALUDI et al., 2017; PRÉCOMA et al., 2019).

Em 2019, a Diretriz Brasileira de Prevenção da Sociedade Brasileira de Cardiologia, atualizou os fatores de risco tradicionais indicando a agregação de novos fatores que envolvem questões socioeconômicas, ambientais e até mesmo de espiritualidade. A diretriz aponta que fatores psicossociais, tais como o estresse, depressão e ansiedade, bem como questões econômicas e culturais, aumentam o risco para hipertensão arterial e, por consequência, das DCVs. Ao que tange à espiritualidade, esta é considerada um recurso valioso devido ao impacto no paciente para o enfrentamento de doenças e do sofrimento. A diretriz indica que ao dar relevância e prover um suporte espiritual adequado, tanto o paciente quanto a equipe de tratamento são beneficiados (PRÉCOMA et al., 2019).

3.2. Colesterol

De um modo geral os lipídios possuem uma constituição química bem diversificada, sendo definidos pela sua característica universal de insolubilidade em água. Sob a ótica fisiológica, quatro classes de lipídios são os mais importantes: os fosfolipídios, os ácidos graxos, os triglicérides (TG) e o colesterol. Os fosfolipídios são moléculas anfipáticas e essenciais para formar a estrutura básica das membranas celulares. Os ácidos graxos junto com os TGs,

constituem a mais importante forma de armazenamento de energia no organismo, estando estes depositados nos tecidos adiposos e musculares. No caso do colesterol, este também é um constituinte das membranas celulares dando a elas fluidez, além de ser precursor dos ácidos biliares, da vitamina D e dos hormônios esteroides (FALUDI et al., 2017).

O colesterol é essencial para vida dos seres humanos, entretanto não é necessário seu consumo na dieta, pois o organismo é plenamente capaz de sintetizá-lo em quantidades adequadas. Sua biossíntese tem início a partir da condensação de três moléculas de acetil-Coenzima A (acetil-CoA), gerando o composto β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Seguidamente, é formado o ácido mevalônico pela ação da enzima HMG-CoA redutase (HMGR) (Figura 3). Este é um ponto crucial para regulação da biossíntese do colesterol, tanto a curto prazo pela ação de hormônios ou medicamentos, estimulando ou inibindo a atividade da HMGR; quanto a longo prazo, em resposta as concentrações celulares de colesterol, mediadas pela regulação da transcrição do gene da HMGR (WIERZBICKI, 2004; CAMPO e CARVALHO, 2007).

A condensação de três moléculas do composto intermediário pirofosfato de isopentenila, gerado a partir do ácido mevalônico, forma o pirofosfato de farnesila com 15 átomos de carbono. Seguidamente, duas moléculas do pirofosfato de farnesila ligam-se cabeça com cabeça, com a eliminação de ambos os grupos pirofosfato, formando o esqualeno com 30 átomos de carbono. Então, uma reação de epoxidação, catalisada pela esqualeno-monoxigenase, converte o esqualeno em lanosterol. Por fim, em uma sequência de aproximadamente 20 etapas, o lanosterol é convertido em colesterol (Figura 3) (WIERZBICKI, 2004; CAMPO e CARVALHO, 2007).

Nos humanos a síntese do colesterol ocorre principalmente no fígado. A maior parte do colesterol produzido nos hepatócitos é distribuída de três formas: o colesterol, os ácidos biliares e os ésteres de colesterila. Quando já distribuído nos tecidos, o colesterol pode ser convertido nos hormônios esteroides e em vitamina D. Os ácidos biliares e seus sais são derivados considerados hidrofílicos, também produzidos no fígado, que juntos compõe a bile que é um importante adjuvante para a digestão de gorduras no intestino. Já os ésteres de colesterila são formas mais hidrofóbicas do colesterol, formados pela junção enzimática de um ácido graxo ao grupo hidroxil do colesterol. Esta forma mais

Devido a hidrofobicidade, o transporte dos lipídios dos tecidos de origem para os tecidos onde serão consumidos ou armazenados, é feito pelas lipoproteínas plasmáticas. Essas são complexos esféricos de macromoléculas constituídos por proteínas transportadoras específicas, denominadas apolipoproteínas, e combinações distintas dos lipídios. Essas distintas combinações produzem partículas com diferentes densidades, sendo quatro os principais tipos:

1. Quilomícrons que tem origem intestinal, maiores, menos densos e ricos em TG;
2. VLDL (do inglês, *Very Low Density Lipoprotein*) que são lipoproteínas de densidade muito baixa, também ricas em triglicérides, mas de origem hepática;
3. LDL (do inglês, *Low Density Lipoprotein*), as lipoproteínas de baixa densidade que são ricas em colesterol e ésteres de colesterol;
4. HDL (do inglês, *High Density Lipoprotein*) que correspondem as lipoproteínas de alta densidade que são ricas em apolipoproteínas.

Ainda existe uma classe de lipoproteínas intermediárias, são as chamadas IDL (do inglês, *Intermediary Density Lipoprotein*) que se formam nos capilares na transição da VLDL para LDL. Os diferentes tipos de lipoproteínas exercem papéis específicos no organismo, sendo que estes variam em função do local de origem, da composição lipídica e dos tipos de apolipoproteínas que as constituem. As apolipoproteínas garantem a especificidade das lipoproteínas para determinados tecidos, bem como ativam enzimas que atuam sob as mesmas (NELSON e COX, 2014; FALUDI et al., 2017).

Os quilomícrons tem origem nos retículos endoplasmáticos dos enterócitos, sendo absorvidos pelo sistema linfático e são responsáveis pela chamada via de absorção exógena do colesterol. Cabe a eles transportar os ácidos graxos obtidos na dieta para os locais onde esses serão consumidos ou armazenados, tais como tecidos musculares, adiposos e glândulas mamárias. O conteúdo remanescente (TG e colesterol) é captado pelo fígado por endocitose e os quilomícrons são degradados nos lisossomos dos hepatócitos (NELSON e COX, 2014).

O excedente de lipídios obtidos pela dieta que chega ao fígado é então convertido em triacilgliceróis e ésteres de colesterol, sendo esses empacotados

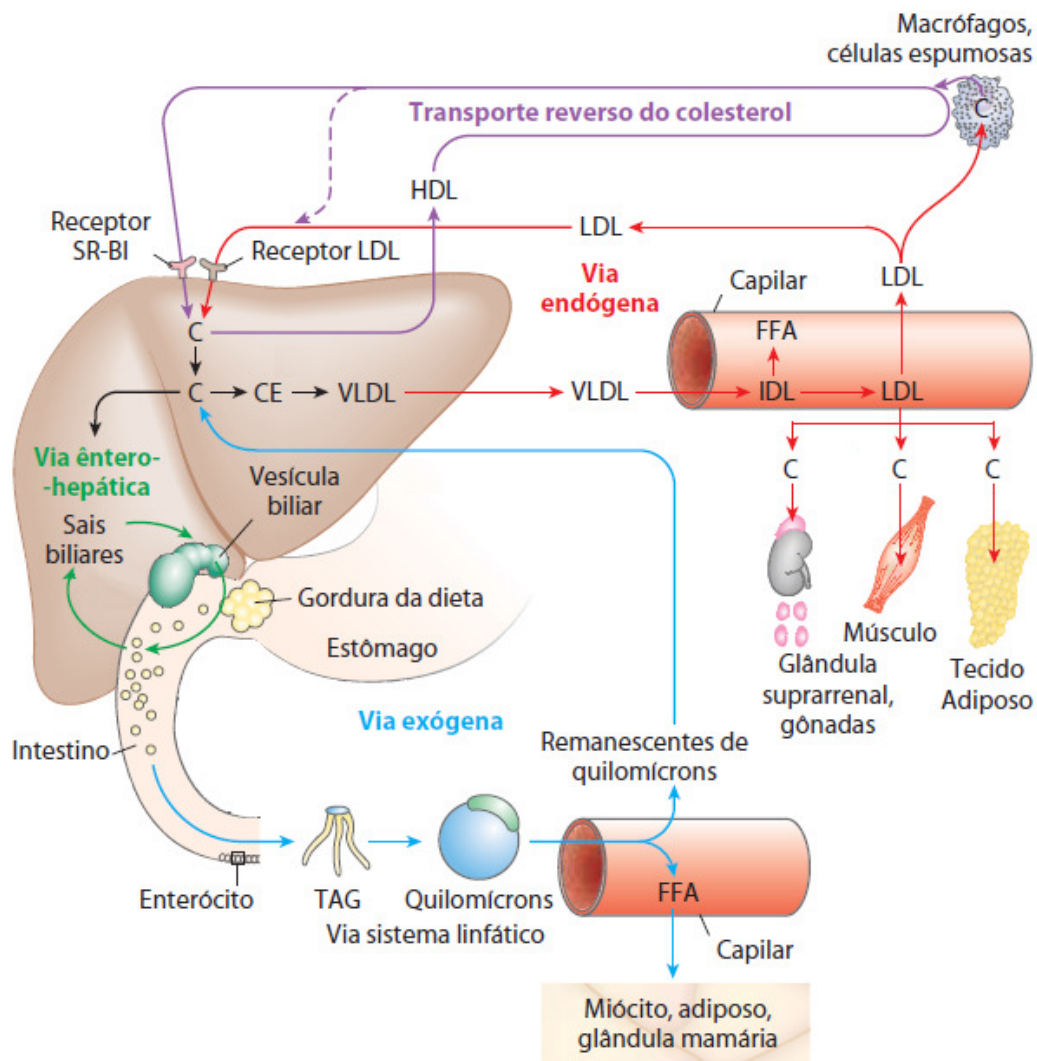
com apolipoproteínas, gerando assim as partículas de VLDL. Estas novas lipoproteínas emergem do fígado liberando ácido graxos livres (FFA, do inglês, *Free Fatty Acids*) nos tecidos musculares e adiposos. Após essa liberação a partícula de VLDL é convertida em IDL que continua distribuindo FFAs no organismo até sua transformação na partícula de LDL, agora rica em colesterol e ésteres de colesterol. Por sua vez, a LDL distribui o colesterol para as glândulas suprarrenais, gônadas, músculos e adipócitos. Além disso, nesse trajeto as partículas de LDL podem ser captadas por macrófagos em formações ateroscleróticas gerando células espumosas (NELSON e COX, 2014).

A LDL remanescente na circulação sanguínea é captada na membrana plasmática dos hepatócitos via receptores de LDL por endocitose. Desse modo, a partícula é destruída e o colesterol liberado pode ser incorporado nas membranas, convertido em ácidos biliares ou reesterificados para armazenamento na forma de gotículas lipídicas citosólicas. À essa via metabólica do colesterol, envolvendo a exportação da VLDL e a captação da LDL, dá-se o nome de via endógena do colesterol (FALUDI et al., 2017).

Um outro caminho do colesterol no organismo é o chamado transporte reverso pela HDL. As HDLs têm origem hepática e no intestino delgado e são ricas em proteínas. Elas são responsáveis por captar o colesterol remanescente dos quilomícrons, das VLDLs, dos macrófagos e das células espumosas, e assim contribuem para a proteção do leito vascular contra a aterogênese. Após a captação, a HDL retorna ao fígado, sendo que o colesterol é liberado da lipoproteína para os hepatócitos pela ação do receptor SR-B1 (do inglês, *Scavenger Receptor class B type 1*). Seguidamente, a HDL se dissocia do receptor e reinicia seu ciclo voltando a circular na corrente sanguínea (FALUDI et al., 2017).

Os sais biliares também fazem um ciclo de reabsorção hepática e nova liberação pela vesícula biliar, sendo este denominado de circulação êntero-hepática. Todas as quatro vias que envolvem a distribuição do colesterol e seus derivados pelas lipoproteínas plasmáticas, podem ser observadas na figura 4 (NELSON e COX, 2014).

Figura 4. Esquema de transporte de lipídios pelo organismo mediado pelas lipoproteínas plasmáticas.



Onde se vê:

C: Colesterol; CE: Ésteres de colesterol; SR-B1: Receptor sequestrador classe B tipo 1; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; IDL: Lipoproteína de densidade intermediária; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa; FFA: Ácidos graxos livres; TAG: Triacilglicerídeos ou triglicérides.

Fonte: Figura extraída e adaptada de NELSON e COX, 2014.

3.3. Dislipidemias

As dislipidemias são doenças metabólicas diretamente relacionadas com os índices das lipoproteínas plasmáticas, e representam um importante fator de risco de DCVs. Segundo a Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (FALUDI et al., 2017), as dislipidemias podem ser classificadas de acordo com sua etiologia e pela fração lipídica alterada. Quando são categorizadas etiológicamente, podem ser:

- **Primárias:** quando o distúrbio lipídico é de origem genética;
- **Secundárias:** quanto os distúrbios originam-se decorrentes do estilo de vida inadequado, de condições de morbidade ou pelo uso de medicamentos.

A segunda classificação refere-se à fração lipídica que está alterada, sendo estas:

- **Hipercolesterolemias:** quando apenas o LDL está elevado ($\text{LDL} \geq 160 \text{ mg/dL}$);
- **Hipertrigliceridemias:** onde somente os TGs estão aumentados ($\text{TG} \geq 150 \text{ mg/dL}$ ou $\geq 175 \text{ mg/dL}$, se a amostra for obtida sem jejum);
- **Hiperlipidemias mistas:** neste caso, tanto o LDL quanto os TGs estão acima dos índices considerados normais;
- **HDL baixo:** onde os índices de HDL estão abaixo da normalidade (homens $< 40 \text{ mg/dL}$ e mulheres $< 50 \text{ mg/dL}$), de um modo isolado ou ainda associado a valores de LDL ou dos TGs elevados.

Independentemente de sua origem primária ou secundária, as dislipidemias relacionadas aos níveis elevados de LDL são as mais importantes, isso devido ao aumento significativo do risco de DCVs.

A hipercolesterolemia secundária está diretamente relacionada a fatores como a dieta, o sedentarismo e o uso do tabaco. Instituições como a Organização Mundial da Saúde e a *American College of Cardiology* atestam que juntos esses fatores são os principais causadores de problemas cardiovasculares (STONE et al., 2014; WHO, 2018).

As dislipidemias primárias são mais raras. Entretanto, a hipercolesterolemia familiar (HF) aumenta o risco para uma doença

aterosclerótica prematura. Isto ocorre, pois, a HF é uma condição genética onde os níveis de LDL podem estar extremamente elevados, independentemente de fatores externos, podendo se manifestar até mesmo na infância (PRÉCOMA et al., 2019).

3.3.1. Tratamentos farmacológicos

O tratamento de dislipidemias deve ser iniciado por mudanças no estilo de vida com a adoção de hábitos mais saudáveis, todavia, devido ao risco cardiovascular, a terapia medicamentosa também deve ser adotada. A farmacoterapia consiste no uso regular de drogas hipolipemiantes, tais como: fibratos, niacina, resinas captadoras de ácidos biliares e inibidores de absorção ou da síntese endógena do colesterol (STONE et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017).

Os fibratos e a niacina são direcionados, principalmente, ao tratamento das hipertrigliceridemias. Os fibratos agem estimulando a lipólise dos TGs nas VLDLs e nos quilomícrons, além de reduzir a síntese das VLDLs. Desse modo, além de reduzir os níveis de triglicérides, também pode reduzir os níveis de LDL, sendo assim adjuvantes nos tratamentos de hipercolesterolemias (XAVIER, 2005; FERREIRA, 2008). A niacina, também conhecida como ácido nicotínico e vitamina B3, atua reduzindo a ação da lipase tecidual nos adipócitos, dessa maneira leva a uma menor liberação de ácidos graxos livres para a corrente sanguínea, culminando numa redução da síntese de triglicérides pelos hepatócitos (WIERZBICKI, 2004; FALUDI et al., 2017).

Para o tratamento das hipercolesterolemias tem-se, principalmente, três modos de ação: os sequestradores de ácidos biliares; os inibidores de absorção intestinal; e os inibidores da síntese endógena.

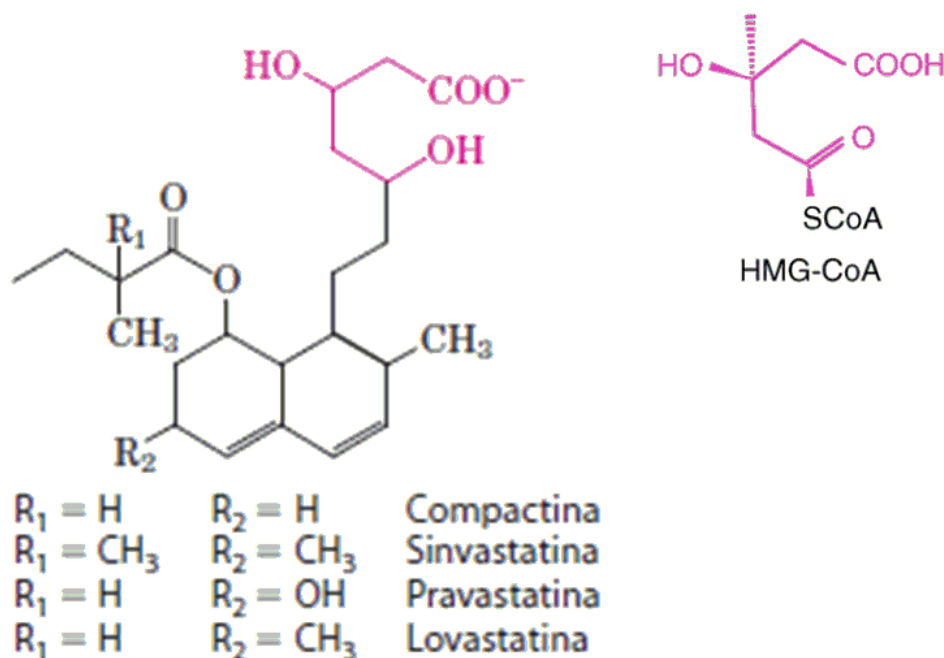
Os sequestradores de ácidos biliares são resinas que atuam fixando-os na luz intestinal. Desse modo, impedem a reabsorção dos sais biliares pela via êntero-hepática, culminando num aumento compensatório na síntese hepática dos mesmos. Para tanto, o fígado aumenta a expressão de receptores de LDL e consequentemente a captação da LDL para assim obter mais moléculas de colesterol e produzir novos sais biliares. Desta forma, obtém-se uma redução de 10 a 15 % da LDL plasmática. Uma reação adversa das resinas é o estímulo da produção endógena de partículas de VLDL e colesterol, consequentemente,

eleva os níveis de triglicérides. Em vista disso, as resinas sequestrantes de sais biliares não são indicadas no tratamento de hiperlipidemias mistas. Alguns efeitos colaterais são observados no aparelho digestivo por interferirem na motilidade intestinal. Além disso, as resinas diminuem a absorção intestinal de vitaminas lipossolúveis e do ácido fólico (WIERZBICKI, 2004; FALUDI et al., 2017).

A ezetimiba é o atual fármaco que age inibindo a absorção intestinal de colesterol. Seu mecanismo de ação é sobre a proteína transportadora NPC1-L1, que está presente na borda em escova dos enterócitos, e é responsável pela absorção do colesterol obtido pela dieta. Assim, os níveis de colesterol hepáticos são reduzidos e ocorre um estímulo à síntese de receptores de LDL. Como consequência, há uma maior captação da LDL, reduzindo seus níveis plasmáticos de 10 a 25 %. Este fármaco é uma opção terapêutica para pacientes com intolerância às estatinas ou ainda pode ser utilizado em associação com elas, a fim de reduzir as doses e alcançar níveis que diminuam os efeitos adversos nos pacientes (WIERZBICKI, 2004; FLORENTIN et al., 2008).

Por sua vez, as estatinas atuam como inibidores da síntese endógena do colesterol, sendo os medicamentos de primeira escolha para o tratamento de hipercolesterolemias, isso devido as evidências relacionadas ao seu uso e a redução da mortalidade associadas a DCVs. As estatinas são fármacos com estrutura similar ao precursor do colesterol, o HMG-CoA (Figura 5), e agem inibindo a ação da enzima HMGR, limitando a síntese de colesterol nos hepatócitos. Com isso, há uma depleção intracelular dos níveis de colesterol, seguida de um estímulo da expressão dos receptores de LDL e, como consequência, há um aumento da captação da LDL pelo fígado. Em virtude disso, os fármacos inibidores da HMGR possuem grande eficácia para a redução dos índices de LDL plasmático, pois apresentam uma dupla ação, reduzindo a síntese endógena de colesterol e aumentando a captação da LDL circundante (MCKENNEY, 2003; PRÉCOMA et al., 2019).

Figura 5. Comparação entre as estruturas de 4 estatinas e o HMG-CoA.



Fonte: Figura extraída e adaptada de NELSON e COX, 2014.

Contudo, muitos efeitos adversos têm sido relacionados ao uso das estatinas, tais como: dor abdominal, diarreia, cefaleia, náuseas, dispepsia, mialgia, fadiga, hepatotoxicidade, rabdomiólise, dentre outros. Os mais graves são a hepatotoxicidade e a rabdomiólise. Considerando que os locais de ação das estatinas são os hepatócitos, a toxicidade hepática deve ser considerada e bem avaliada em pacientes tratados com estes fármacos. Assim, deve-se ter maior atenção em pacientes com histórico de doenças hepáticas ou que fazem uso concomitante de outras substâncias tóxicas ao fígado. Outro fator importante é que as estatinas são catabolizadas pelo sistema do citocromo P450, também localizado no fígado, o que ressalta a necessidade de atenção aos possíveis efeitos hepatotóxicos (MANCINI et al., 2016; THOMPSON et al., 2016; FALUDI et al., 2017).

As miopatias induzidas pelo uso de estatinas, são as responsáveis por reduzir significativamente a aderência dos pacientes ao tratamento. Segundo Faludi e colaboradores (2017), as queixas musculoesqueléticas respondem por cerca de 65 % dos casos de perda de adesão ao tratamento.

Além disso, as miopatias podem evoluir para um quadro de rabdomiólise que é caracterizado por uma necrose muscular que, por sua vez, libera para

circulação sanguínea a mioglobina presente em células musculares. Dentre os sintomas da rabdomiólise apresentam-se mialgia, fraqueza muscular e urina escura. Soma-se a isso, o fato de que a mioglobina presente no sangue passa a lesar os rins, podendo culminar num quadro mais grave de insuficiência renal aguda. Ressalta-se que o uso concomitante de estatinas com fibratos, ciclosporinas, antibióticos macrolídeos e antifúngicos azólicos aumentam o risco de desenvolvimento de miopatias mais graves, tais como a rabdomiólise. Isto limita seu uso, por exemplo, em casos de hiperlipidemias mistas, onde se faz necessário o uso concomitante dos fibratos. Em casos de portadores da hipercolesterolemia familiar, o tratamento é sintomático e contínuo, sendo assim o risco de miopatias pode ser potencializado (GULUM e HUME, 2015; MANCINI et al., 2016; MONIZ et al., 2017).

3.3.2. Tratamentos não farmacológicos

Em associação com as terapias medicamentosas, o tratamento das dislipidemias deve vir acompanhado por mudanças no estilo de vida. Uma terapia nutricional adequada, acompanhada com a prática de exercícios físicos e da perda de peso devem ser incentivadas aos pacientes. O abandono do sedentarismo com a prática regular de atividades aeróbicas, está associado a redução da morbidade e mortalidade cardiovascular. Além disso, sabe-se que o tabagismo interfere na vasodilatação do endotélio em artérias coronárias e nos leitos microvasculares, aumentando o risco de lesões e do desenvolvimento da doença aterosclerótica (FALUDI et al., 2017; PRÉCOMA et al., 2019).

As mudanças nos padrões nutricionais vieram como uma consequência da evolução social. As referências alimentares devem ser resgatadas para uma alimentação saudável destacando-se a seleção dos alimentos, o modo de preparo, a quantidade consumida e as possíveis substituições alimentares.

Um bom exemplo é a substituição do consumo excedente de carboidratos, gorduras saturadas e ácidos graxos *trans* por ácidos graxos poli-insaturados, reduzindo assim o risco cardiovascular. O elevado consumo de carboidratos eleva a glicemia, estimulando a liberação de insulina que, por sua vez, ativa a síntese de ácidos graxos e TG, elevando os níveis séricos destes. Os ácidos graxos *trans* induzem lesão de endotélio e aumentam as concentrações de LDL. Uma alternativa são os suplementos de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3,

que podem reduzir a concentração plasmática dos TGs em até 30 % (FALUDI et al., 2017).

O consumo de óleos vegetais, cereais, grãos e demais vegetais são fontes de fitosteróis, que possuem uma estrutura parecida à do colesterol. Devido a isso, o consumo destes reduz a absorção intestinal do colesterol, reduzindo os níveis plasmáticos de LDL (CABRAL e KLEIN, 2017).

As fibras solúveis sequestram os ácidos biliares no lúmen intestinal, interferindo no ciclo êntero-hepático, e assim estimulam a produção dos mesmos no fígado, reduzindo os níveis de colesterol. Alguns exemplos incluem a aveia, o *psyllium*, a pectina e a goma-guar, todos esses podem auxiliar na redução dos níveis séricos de LDL (BERNAUD e RODRIGUES 2013; FALUDI et al., 2017).

Desde a década de 40, estudos apontam que o consumo elevado de proteínas de origem animal aumenta o risco de DCVs, pois estas trazem junto a si gorduras saturadas e colesterol. Além disso, para as proteínas de origem vegetal tem sido atribuído efeitos benéficos por uma ação farmacológica dos peptídeos originados após sua digestão (SCARAFONI et al. 2007; FERREIRA, 2008; TACO, 2011; PADHI e RAMDATH, 2017). A literatura indica, por exemplo, que o consumo diário de 15 a 30 g de proteína de soja está associado à uma redução ao redor de 5 % de LDL, um aumento em torno de 3 % de HDL e uma redução de até 11 % dos TGs (ANDERSON e BUSH, 2011).

Em suma, as indicações são para um consumo moderado de gorduras, eliminando os ácidos graxos *trans* e controlando o consumo de saturados, sendo priorizada a ingestão de mono e poli-insaturados; a redução do consumo de carboidratos; e a inclusão de carnes magras, leguminosas, frutas e hortaliças na dieta.

3.4. Proteínas vegetais

Tradicionalmente, é atribuído ao reino vegetal alegações de saúde, sendo estas relacionadas a diferentes componentes alimentares, tais como: vitaminas, minerais, flavonoides, carotenoides, fibras, lipídios e, em menor proporção, às proteínas e peptídeos. Em sua maioria as propriedades terapêuticas têm sido atribuídas a atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. Entretanto, em meio este contexto, as proteínas vegetais, bem como os peptídeos originados da hidrólise destas, tem ganhado destaque por suas propriedades farmacológicas

mais complexas, atuando por diversos mecanismos (SCARAFONI et al., 2007; CONSONNI et al., 2011; FERREIRA et al., 2015; PADHI e RAMDATH, 2017; SILVA et al., 2018; MARQUES et al., 2018; AMENGUAL, 2019).

Em se tratando do metabolismo lipídico, as proteínas das leguminosas ganham destaque pelo potencial farmacológico diante das dislipidemias. A proteína de soja, por exemplo, foi a mais amplamente estudada, tanto em ensaios em animais (PAK et al., 2006; FASSINI et al 2012; PAK et al., 2012; FERREIRA et al., 2015) quanto em humanos (SIRTORI et al., 2009), sendo comprovado sua capacidade de auxílio no tratamento de hipercolesterolêmias. Devido a isto, o FDA (1999) passou a recomendar a ingestão diária de 25 g de proteína de soja, a fim de reduzir os riscos de DCVs.

A fração proteica das leguminosas são constituídas por duas classes principais: as albuminas e as globulinas. Juntas, estas duas classes podem representar até 80 % do total de proteínas, sendo de 8 a 20 % albuminas e de 40 a 60 % globulinas. As globulinas, por sua vez, são subdivididas em duas principais frações: as leguminas e as vicilinas. Essas também são classificadas de acordo com seu coeficiente de sedimentação (S), sendo as leguminas denominadas como 11S e as vicilinas como 7S. As vicilinas constituem-se de oligômeros heterogêneos com uma massa molar compreendida entre 140 e 200 kDa. De modo geral, as 7S possuem de três a quatro subunidades com massa molar entre 40 e 60 kDa cada uma. Dados da literatura apontam que diferentes espécies de leguminosas têm demonstrado frações 7S com características físicas e químicas análogas, tais como: sequência de aminoácidos, digestibilidade, reconhecimento imunológico e atividade biológica (LOURENÇO, 2000; SCARAFONI et al., 2007; FERREIRA, 2013).

Estudos apontam que a fração proteica responsável pela atividade hipocolesterolêmica da soja é a 7S, também chamada de β -conglícinina. Dados genéticos postulam que as 7S de diferentes espécies apresentam genes ancestrais comuns. As evidências mostram que algumas 7S possuem grande semelhança na composição e sequência de aminoácidos, sugerindo que suas similaridades decorrem de uma evolução convergente. Isso é demonstrado na forte homologia entre as estruturas primárias da faseolina, vicilina e β -conglícinina, sendo estas, respectivamente, globulinas 7S das espécies

Phaseolus vulgaris, *Pisum sativum* e *Glycine max* (DOYLE e LUCKOW 2003; SCARAFONI et al., 2007; FERREIRA, 2013).

Embora o efeito hipocolesterolêmico tenha sido inicialmente proposto a partir das proteínas de soja, especialmente a vicilina (7S), é possível que esta fração proteica também presente em outras espécies de leguminosas possa desempenhar uma ação semelhante. Outras espécies de leguminosas, tais como: feijões, ervilha, tremoço e grão-de-bico também têm mostrado a capacidade de alterar o metabolismo do colesterol, porém, estas têm recebido menor atenção embora possam exercer efeito semelhante na prevenção das desordens lipídicas (FROTA et al., 2008; RIGAMONTI et al, 2010; FONTANARI et al, 2012; AMARAL et al., 2014; AMARAL et al., 2017).

Quando se tratam das 7S dos feijões caupí e azuqui, as mesmas são denominadas de β -vignina (JAYATHILAKE et al. 2018). Ferreira e colaboradores (2015) avaliaram os efeitos das vicilinas isoladas da soja e dos feijões caupí e azuqui, os autores constataram uma importante atividade hipocolesterolêmica, frente ao metabolismo lipídico de ratos dislipidêmicos, quando comparada à droga comercial sinvastatina.

A despeito de que o mecanismo de ação dessas proteínas ainda não esteja totalmente elucidado, existem evidências de que os peptídeos originados da digestão gastrointestinal dessas proteínas seriam os responsáveis por suas propriedades biológicas (FERREIRA et al. 2015; SILVA et al. 2018). A literatura sugere que os efeitos terapêuticos estão ligados a peptídeos pequenos, com 3 a 20 resíduos de aminoácidos, gerados após a digestão. Estes peptídeos podem modular o metabolismo lipídico de diferentes modos, tais como: alterações nos mecanismos de absorção e excreção; controle da síntese endógena; alterar a expressão de receptores e; agir sobre enzimas enredadas com o metabolismo lipídico. Contudo, sua atividade está intrinsecamente ligada com a composição e sequência dos aminoácidos presentes nesses peptídeos (AMARAL et al., 2014; MARQUES et al. 2015a; FERREIRA et al. 2015; MARQUES et al. 2015b; AWIKA e DUODU, 2017; HERNANDEZ e MEJIA 2017; SILVA et al. 2018).

À vista disso, várias patentes têm sido depositadas com indicações de novas moléculas peptídicas para controlar hipercolesterolemias por diversos mecanismos de ação, tais como:

- Inibição da atividade da HMGC_oA redutase (CN103739665-A; CN103739666-A) (YANG et al., 2013a; YANG et al., 2013b);
- Redução da expressão da HMGC_oA redutase (WO2008034117-A2) (GALVEZ, 2006);
- Modulação via sistema imunológico (WO2019033040-A1; WO2019136307-A1) (CHEN e CHEN, 2017; WAGNER et al., 2017);
- Vacinas (EP3409770-A2; WO2015128287-A1; WO2018189705-A1) (BRUNNER et al., 2012; GALABOVA et al., 2014; JAIN et al., 2017);
- Modulação via sistema endócrino (WO2011048614-A2; WO2017210100-A1) (BAHEKAR et al., 2009; DIMARCHI et al., 2016);
- Estimulação do efluxo do colesterol (WO2006049597-A1; WO2008156873-A2; WO2009129263-A1; WO2011139819-A2; WO2014144708-A1; WO2016044177-A1; WO2016019333-A1) (SIRCAR et al., 2004; BIANCHI et al., 2007; AMAR e REMALEY, 2008; BIELICKI e JOHANSSON, 2010; BIELICKI et al., 2013; BIELICKI e JOHANSSON, 2014; REMALEY et al., 2014);
- Inibição da absorção do colesterol (JP2003238590-A) (NAGAOKA e KANAMARU, 1999).

3.5. Feijão-caupí

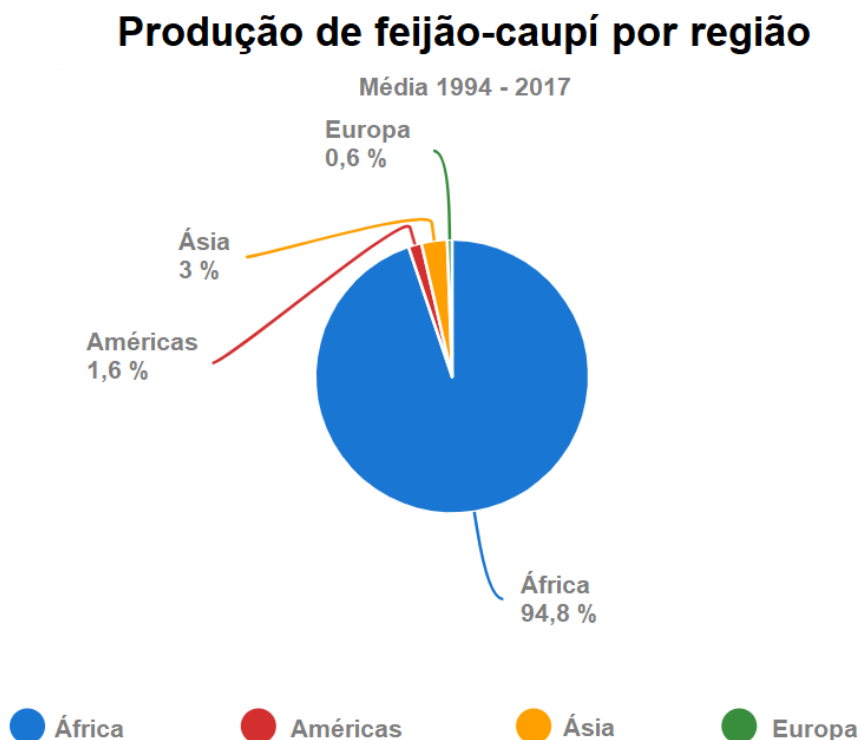
O feijão-caupí tem origem africana e foi introduzido no Brasil pela colonização portuguesa na Bahia (FREIRE FILHO et al., 2011). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento considera feijão apenas os grãos provenientes das espécies *Phaseolus vulgaris* (L.) e *Vigna unguiculata* (L.), denominadas de feijão-comum e feijão-caupí, respectivamente (BRASIL, 2008). Contudo, existem várias variedades de feijão-caupí, sendo encontrados grãos com diferentes cores, tamanhos e formatos. Devido a isto, popularmente ele é conhecido por diversos nomes, tais como: feijão-macassa, feijão-de-corda, feijão-de-praia, feijão-da-colônia, feijão-miúdo, feijão-manteiguinha, feijão-fradinho, dentre outros nomes. A variedade feijão-fradinho é a utilizada para o

preparo do acarajé, do abará e do feijão-tropeiro, todos pratos típicos da culinária baiana (BRITO et al., 2008; FREIRE FILHO et al., 2011; BASTOS et al., 2016).

O caupí possui um teor proteico médio de 25% com um perfil de aminoácidos típico das leguminosas, ricos em lisina e com baixas concentrações de aminoácidos sulfurados. Também é rico em minerais e fibras, sendo um importante componente nutricional das populações rurais e urbanas das regiões Norte e Nordeste do Brasil (IQBAL et al., 2006; BRITO et al., 2008; BASTOS et al., 2016).

No Brasil inexistem informações oficiais sobre a produção de feijão-caupí, devido aos órgãos de pesquisas estatísticas publicarem os dados das duas espécies, *Phaseolus vulgaris* (L.) e *Vigna unguiculata* (L.), de forma conjunta. Isto impede o conhecimento de forma direta sobre qual a participação de cada espécie na produção total de feijão do país (BASTOS et al., 2016). O continente africano produz por cerca de 95 % da produção mundial de feijão-caupí (Figura 6), sendo os três maiores produtores a Nigéria, o Níger e o Burkina Faso (FAO, 2019).

Figura 6. Produção mundial média de feijão-caupí no período de 1994 a 2017.



Fonte: Figura extraída e adaptada de FAO, 2019.

Além da sua importância nutricional e socioeconômica, o caupí tem ganhado destaque devido os efeitos protetores contra DCVs, vindos de suas proteínas e seus respectivos peptídeos. Ferreira e colaboradores (2015) avaliaram ratos com uma dieta hipercolesterolêmica e tratados, via oral, com a 7S do feijão-caupí e com sinvastatina. Quando avaliados os níveis de colesterol total, VLDL e LDL foi constatado que os animais que receberam a 7S obtiveram uma maior redução dos valores séricos, quando comparados com os animais tratados com a sinvastatina. Além disso, àqueles tratados com a fração proteica do caupí obtiveram um aumento significativo do HDL, o que não ocorreu com os animais tratados com a sinvastatina.

Recentemente, Marques e colaboradores (2018) constataram que a fração < 3 kDa originada da hidrólise de proteínas totais do feijão-caupí interfere na absorção intestinal do colesterol. Sua ação foi comprovada pela inibição em células Caco-2 da expressão do mRNA da NPC1-L1, uma das proteínas responsáveis pela absorção intestinal do colesterol. Neste mesmo estudo, foi constatado que o peptídeo de sequência MELNAVSVVHS do feijão-caupí atuou em células HepG2 reduzindo a expressão do mRNA do fator SREBP2. O SREBP2 é uma família de proteínas de ligação aos elementos reguladores de esterol (SREBP, de *sterol regulatory element-binding proteins*) que modulam a expressão da HMGR e dos receptores de LDL (NELSON e COX 2014).

Em suma, os estudos apontam que os peptídeos originados da digestão gastrointestinal da proteína do feijão-caupí são permeáveis ao intestino e podem atuar por diferentes vias para modular o metabolismo do colesterol. Contudo, é necessário identificar quais são esses peptídeos bioativos e seus modos de ação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Triagem *in silico*

Os ensaios efetuados para a triagem *in silico* foram adaptados e realizados a partir do protocolo descrito por Siow e colaboradores (2017).

Inicialmente, foram obtidas nos bancos de dados NCBI (CLARK et al., 2016) e UniProt (UniProt, 2017) as sequências primárias da:

- Subunidade-1 da 7S do feijão-caupí (NCBI/GenBank Blast: AM905848; UniProtKB: A8YQH5_VIGUN);
- Subunidade-1 7S do feijão-azuki (NCBI/GenBank Blast: AB292246.1; UniProtKB: A4PI98_PHAAN);
- Subunidade α' da β -conglitinina da soja (NCBI/GenBank Blast: AY221105.1; UniProtKB: GLCAP_SOYBN).

Seguidamente, as sequências foram alinhadas e comparadas com auxílio da ferramenta ClustalW (LARKIN et al., 2007), a fim de avaliar a homologia sequencial.

Após a avaliação da homologia, a subunidade-1 da β -vignina do caupí foi submetida a um processo de hidrólise virtual por ação sequencial das enzimas pepsina (EC 3.4.23.1), tripsina (EC 3.4.21.4) e quimiotripsina (EC 3.4.21.1), com o auxílio do programa BIOPEP (MINKIEWICZ et al. 2008).

Os peptídeos gerados pela hidrólise *in silico* foram então avaliados quanto a probabilidade de apresentarem alguma bioatividade, para tanto foi utilizado o programa PEPTIDE RANKER (MOONEY et al. 2012). Assim, foi obtido o *PRScore*, variando de 0,000 a 1,000, sendo que foi tomado como ponto de corte dos peptídeos com potencial bioativo, aqueles que obtiveram um *score* $\geq 0,500$.

Posteriormente, os peptídeos que apresentaram *score* (*PRScore*) igual ou superior a 0,500 foram avaliados quanto a possibilidade de ligação na HMGR, para tanto foi utilizado o programa PEPSITE2 (TRABUCO et al. 2012). Foram utilizadas as estruturas cristalográficas da HMGR com os inibidores comerciais no sítio ativo, sendo estes: 1HW9 (Sinvastatina); 1HW8 (Mevastatina); 1HWL (Rosuvastatina); 1HWK (Atorvastatina); 1HWI = (Fluvastatina); 1HWJ = (Cerivastatina); 1T02 (Estatinas De Classe II). A previsão de ligação do peptídeo foi determinada pelo *p-value*, considerando que valores compreendidos entre 0,00 a 0,25 prevê a ligação do peptídeo avaliado sobre a estrutura da enzima HMGR.

4.2. Ensaios de acoplamento molecular

As estruturas dos peptídeos triados e do fármaco sinvastatina foram desenhadas no software MarvinSketch (MARVIN, 2019). Sequencialmente, os volumes das moléculas dos peptídeos foram comparados com a molécula da

sinvastatina utilizando o programa PyMOL (PyMOL, 2019), a fim de avaliar as dimensões da caixa de busca para viabilizar o estudo de acoplamento molecular.

Os cálculos de acoplamento molecular foram realizados no programa AutoDock-VINA (TROTT e OLSON, 2010), utilizando o protocolo de encaixe por ajuste induzido. A região de interação foi definida nas coordenadas cristalográficas ($X = 3,93$; $Y = -9,20$; $Z = -11,33$) correspondentes ao sítio ativo da estrutura do cristal da HMGR com a sinvastatina (PDB ID: 1HW9). As dimensões da caixa de busca foram definidas entre 10 e 14 Å, utilizando como critério de escolha das posições mais próximas daquela observada da sinvastatina no cristal, um valor de $\text{RMSD} \leq 2,0$ Å. Por fim, as 4 melhores posições foram selecionadas na etapa de análise visual.

4.3. Síntese dos peptídeos

Os peptídeos triados pelos ensaios *in silico* e os novos derivados desenhados foram sintetizados manualmente utilizando a metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), com o protocolo Fmoc/tBu (Fmoc: 9-fluorenilmetiloxycarbonil, grupo protetor α -amino; tBu: t-butil, grupo protetor das cadeias laterais). Esse método fundamenta-se na adição de resíduo por resíduo para o crescimento da cadeia peptídica que, por sua vez, está presa covalentemente pelo seu aminoácido C-terminal aos sítios reativos existentes em um suporte sólido (resina), por meio de seu grupo carboxila (MERRIFIELD, 1963; PICCOLI, 2019).

Dois tipos de resinas foram empregadas com o intuito de obter peptídeos com diferentes características na sua porção C-terminal. O primeiro tipo empregado foi a resina Wang para obtenção de peptídeos com a carboxila C-terminal livre e; o segundo tipo foi a resina Rink Amida, a fim de obter peptídeos com uma carboxamida na extremidade C-terminal.

Para os acoplamentos foram utilizados Fmoc-aminoácidos e, como reagentes de ativação dos grupos carboxilas, foram utilizados N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt). Todos os Fmoc-aminoácidos e reagentes foram utilizados com 2 vezes de excesso em relação à quantidade de grupos reativos na resina inicial.

Os grupos protetores Fmoc são base-lábeis, assim sendo foram removidos pela lavagem com 20% 4-metil-piperidina/DMF durante 1 e 20 min.

Após cada etapa de acoplamento e desproteção foram efetuadas lavagens intercaladas com N,N-dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM), para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos.

Para atestar que o acoplamento e a desproteção foram eficientes, foi realizado o teste de ninidrina após cada etapa. Este reagente, a altas temperaturas, reage com grupos amino livres, produzindo um composto de cor azulada (KAISER et al., 1970).

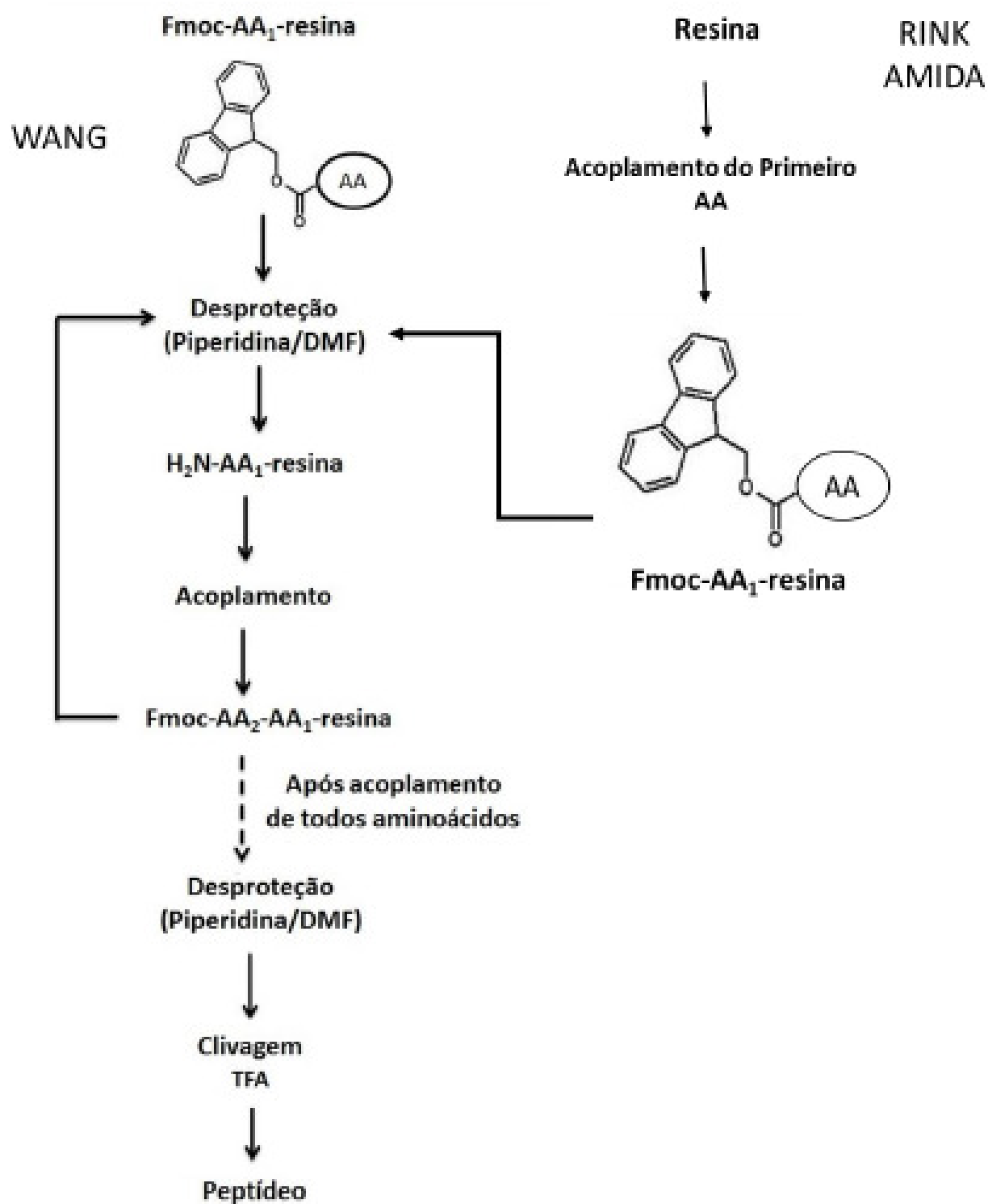
4.4. Reação de clivagem

Após a síntese, os peptídeos foram retirados do suporte sólido por uma reação de clivagem. Foram utilizadas diferentes soluções as quais continham: o ácido trifluoracético (TFA), responsável pela clivagem e; o triisopropilsilano (TIS), o 1,2-etanoditiol (EDT) e a água ultrapura, como supressores de reações colaterais. Para os peptídeos que continham resíduos de Cys ou Met foi utilizada uma mistura na proporção de 94 % TFA : 2,5 % Água : 2,5 % EDT : 1 % TIS. Os outros peptídeos foram clivados com a seguinte proporção 95 % TFA : 2,5 % Água : 2,5 % TIS. As misturas foram submetidas a agitação branda por 2 h em temperatura ambiente.

Após 2 h, uma solução contendo água ultrapura e acetonitrila (ACN) (50:50, v/v) foi adicionada, seguida de centrifugação para separar a resina do peptídeo. Por fim, o sobrenadante contendo o peptídeo bruto foi liofilizado.

Todo o procedimento de síntese dos peptídeos em fase sólida e clivagem pode ser observado resumidamente na figura 7.

Figura 7. Esquema simplificado da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS).



Fonte: Esquema extraído de PICCOLI, 2019.

4.5. Purificação e caracterização dos peptídeos

Os peptídeos sintetizados foram purificados e caracterizados utilizando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massas. A purificação do peptídeo bruto foi realizada em CLAE em modo semipreparativo utilizando coluna de fase reversa C12 Jupiter Proteo Phenomenex® (25 cm x 10 mm; partícula de 10 µm), com solução A (água contendo 0,045% TFA) e solução B (acetonitrila contendo 0,036% TFA), com um fluxo de 5 mL/min; e detecção UV em 220 nm. A pureza foi determinada em CLAE no modo analítico com coluna de fase reversa C18 (15 cm x 4,6 mm; partícula de 5 µm); o gradiente utilizado foi de 5 a 95% de solução B em 30 min com um fluxo de 1 mL/min; a detecção foi obtida com UV em 220 nm.

A determinação da massa molar foi obtida utilizando um espectrômetro de massas com ionização electrospray, atuando no modo de ionização positiva e analisador de massas do tipo *Ion Trap*.

4.6. Ensaio de inibição da HMGR *in vitro*

Por meio de ensaios *in vitro*, os peptídeos sintetizados foram avaliados, em triplicata, quanto à capacidade de inibição da HMGR, de acordo com metodologia proposta por Hulcher e Oleson (1973), utilizando *kit HMG-CoA reductase assay* (Sigma-Aldrich®). O princípio do ensaio está na medição espectrofotométrica da redução da absorbância em 340 nm. Este decréscimo representa a oxidação do NADPH pela ação da subunidade catalítica da HMGR na presença do substrato HMG-CoA. A leitura da absorbância (340 nm) foi realizada utilizando um espectrofotômetro UV/Vis, marca Perkin Elmer, modelo Lambda 1050 com duplo feixe. Os ensaios foram realizados no modo de leitura cinética, medindo a absorbância a cada 5 segundos durante 5 minutos. A pravastatina foi utilizada como controle positivo de inibição. Os resultados foram calculados pela atividade específica em µmol/mim/mg-proteína (U/mgP) e expressos em percentuais de inibição. A reação da HMGR segue o seguinte esquema:



Após determinar quais os peptídeos com maiores atividades inibitórias, foram obtidas curvas analíticas com diferentes concentrações de cada peptídeo, relacionando o logaritmo da concentração pelo percentual de inibição. Seguidamente, foram avaliados os coeficientes de determinação (R^2), e por fim obtidas as respectivas equações das retas para cálculo da concentração para 50 % da inibição (IC_{50}).

4.7. Análise estatística

Todos os resultados foram obtidos em duplicata de ensaios, sendo que de cada replicata foram obtidos 3 percentuais de inibição, calculados em faixas de tempo distintas. Ao total 6 percentuais de inibição (3 de cada replicata) foram utilizados para os cálculos estatísticos. Os dados foram tratados no software Statistica 7.1. A avaliação da normalidade da distribuição foi realizada pelo *Shapiro-Wilk W test*, seguidamente, foi aplicado o *Tukey HSD Test* para avaliar as diferenças estatísticas entre as médias. O intervalo de confiança definido foi de 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente a estratégia adotada para obtenção dos peptídeos do feijão-caupí seguia técnicas clássicas de isolamento, hidrólise, fracionamento e sequenciamento dos peptídeos a partir das sementes do feijão. Contudo, este método demonstrou-se pouco eficiente, devido questões de baixo rendimento em massa para realizar análises posteriores. Com isso, foi adotada a nova estratégia para a obtenção dos peptídeos por meio de ensaios *in silico*. Os dados preliminares obtidos pela via clássica estão apresentados no apêndice A.

5.1. Peptídeos originados da β -vignina (7S)

As vias clássicas para descoberta de novos peptídeos envolvem extensas etapas de extração proteica, hidrólises, fracionamento, purificação e caracterização. Isto demanda um longo tempo e elevados custos com baixas probabilidades de identificação de peptídeos bioativos (SLOW et al., 2017). Os avanços das técnicas computacionais habilitaram a possibilidade das simulações *in silico*, as quais podem direcionar as pesquisas reduzindo o número

de experimentos em laboratório aumentando assim a eficiência do trabalho (MOONEY et al., 2012; TRABUCO et al., 2012).

Desta forma, foram utilizadas ferramentas computacionais para a procura e análise inicial de novos peptídeos ativos.

A literatura já descreveu o sequenciamento completo de uma das subunidades da proteína 7S do caupí (figura 8) (NCBI, 2016). Considerando o fato de que em leguminosas há uma grande homologia na composição de suas proteínas, pode-se inferir que existe uma grande similaridade entre as mesmas (LOURENÇO, 2000; DOYLE e LUCKOW, 2003; FERREIRA et al., 2015).

Figura 8. Sequência primária de aminoácidos da subunidade-1 da β -vignina (7S) (NCBI/GenBank Blast: AM905848; UniProtKB: A8YQH5_VIGUN).

```
VPLLLLGVFLASLSVSFGIVHRGHQESQEESEPRGQNNPFYFDSDRWFHT
LFRNQYGHRLRVLQRFDQRSKQIQNLENYRVVEFQSKPNTLLPHHADADFL
LVVLNGRAILTLVNPDGRDSYILEQGHQAQKTPAGTTFFLVNHDDNENLRIVK
LAVPVNNPHRFQDFFLSSTEAQQSYLQGFSGKNILEASFDSDFKINRVLFGE
EEQKQQDEESQQEGVIVQLKREQUIRELMKHAKSTSKKSLSTQNEPFLRS
QKPIYSNKFGRLHEITPEKNPQLRDLVDVLTSDIKEGGLLMPNYNSKAIVIL
VVNKGEANIELVGQREQQQQQQEESEWEVQRYRAEVSDDDVFVIPASYPV
```

Fonte: NCBI Vicilin protein, partial [*Vigna unguiculata*] GenBank: CAP19902.1

Sendo assim, a partir da subunidade-1 sequenciada da β -vignina (figura 8), foram utilizados como métodos alternativos ensaios *in silico* para a identificação e triagem de peptídeos com possível atividade na HMG-CoA redutase, funcionando como um *screening* inicial para posteriores testes *in vitro*. Todos os ensaios *in silico* foram realizados de acordo com estudo publicado por Siow e colaboradores (2017).

5.1.1. Ensaios *in silico*

As sequências primárias da subunidade-1 da β -vignina do feijão-caupí (NCBI/GenBank Blast: AM905848; UniProtKB: A8YQH5_VIGUN), da subunidade 7S da globulina do feijão-azuki (NCBI/GenBank Blast: AB292246.1; UniProtKB: A4PI98_PHAAN) e da subunidade α da β -conglícinina da soja (NCBI/GenBank Blast: AY221105.1; UniProtKB: GLCAP_SOYBN) foram alinhadas e comparadas com auxílio da ferramenta ClustalW (LARKIN et al., 2007), a fim de avaliar a homologia entre as sequências primárias (figura 9).

O alinhamento das sequências da figura 9 mostrou que a β -vignina teve 47,2% e 74,2% resíduos idênticos e 16,1% e 11,5% de resíduos semiconservados, respectivamente, às subunidades α da β -conglícinina da soja e 7S da globulina do feijão-azuki. Este resultado sugere que a proteína β -vignina de feijão-caupí pode ter um nível de atividade semelhante ao da β -conglícinina da soja e que provavelmente compartilha seu papel biológico. Esta hipótese torna-se importante já que o efeito redutor do colesterol da β -conglícinina é bem estabelecido (CONSONNI et al., 2011; FERREIRA et al., 2013; LAMMI et al., 2015; LIU et al., 2017).

Com isso, a subunidade-1 da β -vignina foi submetida a um processo de hidrólise virtual por ação sequencial das enzimas da pepsina (EC 3.4.23.1), tripsina (EC 3.4.21.4) e quimiotripsina (EC 3.4.21.1), através do programa BIOPEP (MINKIEWICZ et al., 2008).

Os peptídeos gerados pela hidrólise *in silico* foram inicialmente avaliados quanto suas probabilidades de apresentarem alguma bioatividade, através do programa PEPTIDE RANKER, sendo que quanto mais próximo de 1 for o valor do *PRScore* (0,000 a 1,000) maior será a probabilidade do respectivo peptídeo possuir alguma atividade biológica. O PEPTIDE RANKER prevê a probabilidade de um determinado peptídeo ser bioativo ou não, contudo é importante observar que o servidor prevê somente a probabilidade de o peptídeo ser bioativo, e não infere qual será a bioatividade deste peptídeo. Esse servidor é útil como ferramenta de triagem para identificar, entre um conjunto de peptídeos, quais os que possuem uma maior probabilidade de serem bioativos (MOONEY et al., 2012). Neste estudo, um *PRScore* $\geq 0,50$ foi adotado como valor de corte, e assim foram selecionados os peptídeos que possuíam indicativo de atividade biológica (tabela 1).

Os peptídeos selecionados com o indicativo de alguma atividade biológica (tabela 1) apresentaram no máximo 8 resíduos e massas molares inferiores a 1 kDa. Estes dados estão de acordo com descrito pela literatura, onde é indicado que peptídeos com capacidade de inibir a enzima HMGR possuem massas molares inferiores a 3 kDa (PAK et al., 2012; LAMMI et al., 2015; FERREIRA et al., 2015). Um outro dado observado é que, em sua maioria, a porção C-terminal dos peptídeos apresentou um resíduo aromático apolar (F) ou polar não carregado (Y). Isto é uma característica importante, pois a atividade dos

inibidores comerciais da HMGR tem sido relacionada com a apolaridade da molécula (ISTVAN e DEISENHOFER, 2001; CAMPO e CARVALHO, 2007).

Em seguida, os peptídeos triados pelo *PRScore* (tabela 1) foram avaliados quanto à previsão de ligação no sítio ativo da HMGR, através do programa PEPSITE2. Nesta avaliação foram utilizadas as estruturas cristalográficas da HMGR ligadas aos inibidores comerciais, sendo estes: 1HW9 (Sinvastatina); 1HW8 (Mevastatina); 1HWL (Rosuvastatina); 1HWK (Atorvastatina); 1HWI (Fluvastatina); 1HWJ (Cerivastatina); 1T02 (Estatinas de Classe II). O PEPSITE2 varre a superfície da proteína e gera locais candidatos para a ligação dos peptídeos. Seguidamente, a sequência peptídica de interesse é comparada com os locais de ligação candidatos considerando a distância. Por fim, o software calcula o *p-value* relacionando os locais de ligação e o peptídeo, em conformidade com as restrições de distância. O *p-value* entre 0 a 0,25 prevê a ligação de um determinado peptídeo sobre a estrutura da enzima HMGR, sendo que quanto menor esse valor, maior será a significância estatística da previsão (TRABUCO et al., 2012; SLOW et al., 2017). Avaliando-se os dados obtidos (tabela 1) foram selecionados 2 peptídeos, QGF e MPNY, para dar prosseguimento com os estudos para desenvolvimento de análogos e acoplamento molecular.

Tabela 1. Peptídeos obtidos da hidrólise *in silico* da subunidade-1 da proteína β -vignina do feijão-caupí e dados iniciais da interação com a HMGR.

Peptídeo	PRScore ^a	p-value ^b						
		1HW9	1HW8	1HWL	1HWK	1HWI	1HWJ	1T02
QGF	0,94	0,0690	0,0529	0,0529	0,0048	0,0475	0,1071	0,0116
NF	0,94	0,1541	0,1567	0,1681	0,0234	0,1070	0,1333	0,0350
IAF	0,82	0,5598	0,1816	0,2843	0,0915	0,1840	0,0683	0,0554
GQNNPF	0,80	0,4906	0,3900	0,1748	0,1462	0,2059	0,2313	0,0214
GR	0,77	0,2114	0,1674	0,2195	0,1586	0,2781	0,2760	0,0072
QDF	0,74	0,0808	0,1005	0,0915	0,0177	0,0471	0,1183	0,0542
MPNY	0,74	0,2655	0,0738	0,0494	0,0518	0,0765	0,3171	0,0121
PIY	0,60	0,2373	0,0808	0,1502	0,1589	0,1658	0,2226	0,0440
DSDF	0,60	0,4897	0,4531	0,5041	0,5256	0,6500	0,5618	0,1165
GHL	0,59	0,2756	0,5444	0,6322	0,2395	0,2863	0,3147	0,1619
DVF	0,55	0,6206	0,3152	0,7025	0,5478	0,2534	0,2522	0,2522
QSDSHF	0,52	0,7624	0,5400	0,7313	0,2644	0,6798	0,7051	0,5280
PHHADADF	0,51	0,7829	0,6969	0,5645	0,8212	0,8291	0,8336	0,2986

^a Peptide Ranker Score (PRScore) refere-se à probabilidade de o peptídeo apresentar alguma bioatividade.

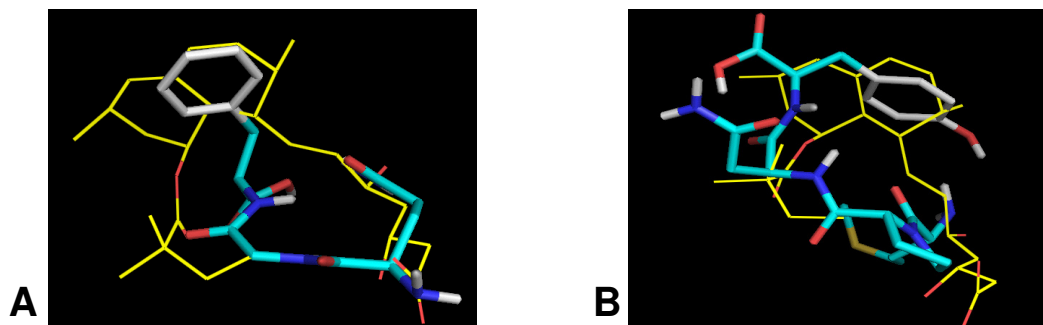
^b p-value refere-se a previsão de sítios de ligação entre o peptídeo analisado e a estrutura de uma proteína específica.

1HW9: Estrutura cristalográfica da HMGR com Sinvastatina; **1HW8:** Estrutura cristalográfica da HMGR com Mevastatina; **1HWL:** Estrutura cristalográfica da HMGR com Rosuvastatina; **1HWK:** Estrutura cristalográfica da HMGR com Atorvastatina; **1HWI:** Estrutura cristalográfica da HMGR com Fluvastatina; **1HWJ:** Estrutura cristalográfica da HMGR com Cerivastatina; **1T02:** Estrutura cristalográfica da HMGR com as estatinas de Classe II.

Fonte: Próprio autor.

Sequencialmente, foi comparado se os volumes das moléculas dos peptídeos triados seriam compatíveis com a molécula da sinvastatina (figura 10), a fim de avaliar a viabilidade do acoplamento (*docking*) dos peptídeos no sítio de ligação da sinvastatina à HMGR.

Figura 10. Superposição do volume ocupado dos peptídeos triados (estrutura primária) com o espaço ativo de sinvastatina (PDB 1HW9) na HMGR. (A) QGF com sinvastatina; (B) MPNY com sinvastatina.

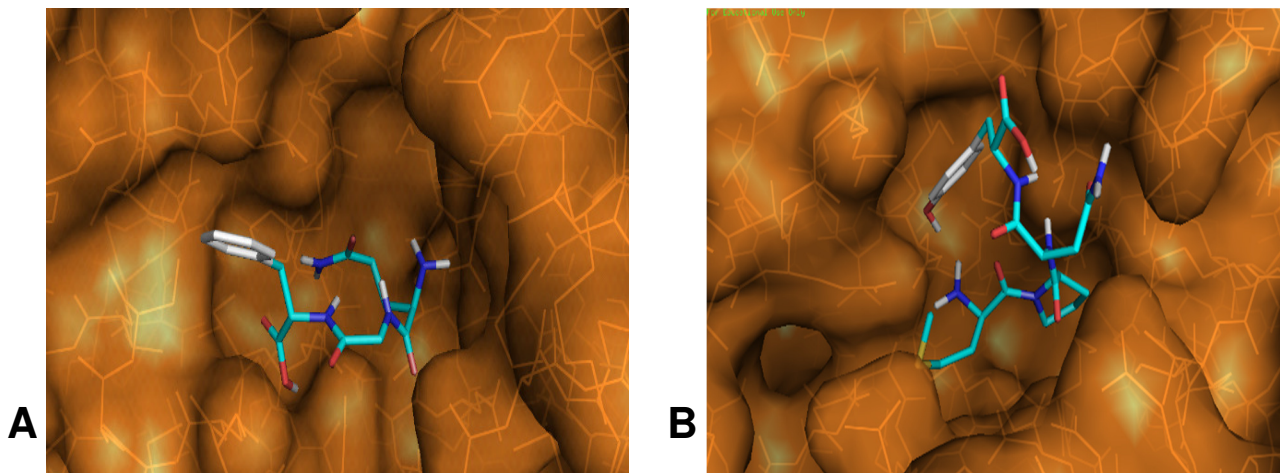


A estrutura de linha amarela refere-se a sinvastatina. As estruturas dos peptídeos são mostradas em ciano, com átomos de oxigênio, nitrogênio, carbono e enxofre em vermelho, azul, cinza e amarelo, respectivamente. Todas as imagens foram geradas usando o software PyMOL 1.6.

Fonte: Próprio autor.

As análises de superposição mostraram que as estruturas modeladas desses peptídeos apresentaram um encaixe adequado ao espaço ocupado pela molécula da sinvastatina. Com isso, os peptídeos tiveram seu modo de interação previsto utilizando-se a análise de acoplamento molecular com o protocolo de encaixe com ajuste induzido. Foi definida a região de interação a partir das coordenadas cristalográficas ($X = 3,93$; $Y = -9,20$; $Z = -11,33$) do sítio ativo da estrutura do cristal da HMGR com a sinvastatina (PDB 1HW9) (figura 11). As dimensões da caixa de busca (10-14 Å) foram otimizadas no programa AutoDock-VINA® (versão 4.2.6), sendo selecionadas as posições mais próximas ($\text{RMSD} \leq 2,0$ Å) daquela observada com a sinvastatina para a etapa seguinte (TROTT e OLSON, 2010).

Figura 11. Acoplamento entre o sítio ativo da HMGR (PDB ID: 1HW9) com os peptídeos: (A) QGF e (B) MPNY.



O sítio de ligação está representado em laranja. Os átomos de oxigênio, nitrogênio, carbono e enxofre estão representados em vermelho, azul, cinza/ciano e amarelo, respectivamente. Todas as imagens foram geradas usando o software PyMOL 1.6 e o ensaio de acoplamento realizado no software VINA-Docking®.

Fonte: Próprio autor.

A atividade no sítio ativo da HMGR é caracterizada por interações com alguns resíduos específicos. A tabela 2 resume os resíduos encontrados no sítio ativo da HMGR que possuem interações com o substrato natural (HMG-CoA) e com o inibidor comercial sinvastatina.

Considerando as melhores posições após os acoplamentos, foram avaliadas as interações dos peptídeos MPNY e QGF no sítio ativo da HMGR (figuras 12 e 13).

Tabela 2. Principais interações no sítio ativo da HMGR com o substrato HMG-CoA e o inibidor comercial sinvastatina.

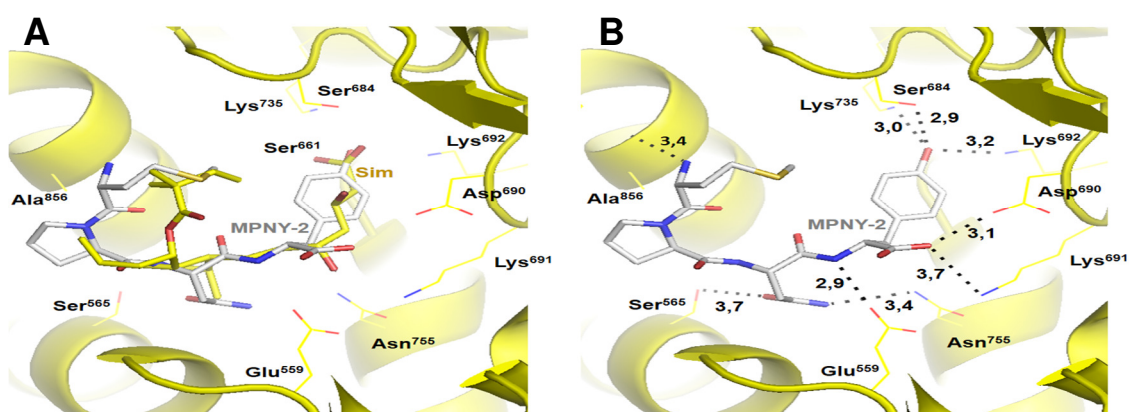
Resíduo do sítio ativo	Ligantes (Grupo funcional)		Tipo de interação
	HMG-CoA ^a	Sinvastatina ^b	
Arg590	3-C-OH	3-C-OH	Ligação de H
		1-C=O	
Asn755		5-C-OH	Ligação de H
Asp690	3-C-OH	3-C-OH	Ligação de H
Glu559	1-C=O	5-C-OH	Ligação de H
His866	-SH (CoA)		Ligação de H
Leu562		9-C-CH ₃	Interação hidrofóbica
Leu853	3-C-CH ₃		van der Waals
		10-CH	Interação hidrofóbica
Lys691	1-C=O	5-C-OH	Ligação de H
Lys735	5-C-OH		Ponte salina
		1-C=O	Ligação de H
Ser684	5-C=O	1-C=O	Ligação de H
Val683		20-CH ₂	Interação hidrofóbica

^a Dados retirados de CAMPO e CARVALHO, 2007.

^b Dados retirados de 1HW9 PDB, 2018.

Fonte: Próprio autor.

Figura 12. Acoplamento do peptídeo MPNY com o sítio ativo (PDB 1HW9) da HMGR usando o software AutoDock-VINA®. (A) Melhor pose selecionada para a sinvastatina (amarelo) sobreposta a melhor posição do peptídeo MPNY (cinza); (B) Previsão do perfil de ligação do MPNY no sítio ativo.

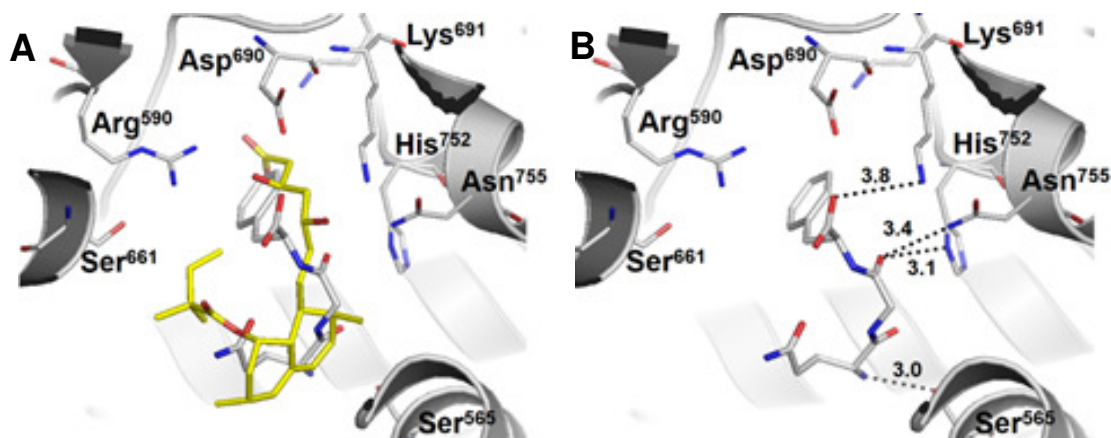


O sítio de ligação da HMGR está representado em amarelo. Oxigênio = vermelho; nitrogênio = azul; enxofre = amarelo; e carbono = amarelo ou cinza. As distâncias estão medidas em angstrom (Å).

Fonte: Próprio autor.

Na previsão do encaixe do peptídeo MPNY (figura 12) à mesma região que a sinvastatina, observa-se que o anel imino do resíduo de prolina (P) proporciona uma torção na molécula propiciando um melhor acoplamento na região do sítio ativo. Isto ocorre porque as ligações peptídicas envolvendo o nitrogênio imino da prolina podem assumir a configuração *cis* propiciando facilmente uma dobra na molécula (NELSON e COX, 2014). O resíduo de tirosina (Y) realiza interações polares semelhantes ao substrato HMG-CoA e a sinvastatina com os resíduos de Ser684 e Lys735 (tabela 2). A carboxila terminal também realiza interações polares semelhantes ao HMG-CoA e a sinvastatina com os resíduos Asp690 e Lys691 (tabela 2). A cadeia lateral amida da asparagina (N) confere a possibilidade de ligações de hidrogênio adicionais com os resíduos de Ser565 e Asn755, sendo que a interação com o resíduo Asn755 também ocorre com a sinvastatina (tabela 2). Outra semelhança é a interação polar com o resíduo Glu559, que pode ser conferida pelo grupo amino da ligação peptídica entre a asparagina (N) e a tirosina (Y) do peptídeo. Além disso, o peptídeo MPNY apresenta a possibilidade de três interações polares adicionais com os resíduos de Lys692, Ser565 e Ala856. Contudo, não houve interações com os resíduos Leu562, Leu853 e Val683. Estes resíduos interagem por meio de interações hidrofóbicas com os grupos apolares das estatinas. No caso da sinvastatina, este grupo hidrofóbico é a decalina, um hidrocarboneto bi-cíclico não aromático (CAMPO e CARVALHO, 2007).

Figura 13. Acoplamento do peptídeo QGF com o sítio ativo (PDB 1HW9) da HMGR usando o software AutoDock-VINA®. (A) Melhor pose selecionada para a sinvastatina (amarelo) sobreposta a melhor posição do peptídeo QGF (cinza); (B) Previsão do perfil de ligação do QGF no sítio ativo.



O sítio de ligação da HMGR está representado em cinza. Oxigênio = vermelho; nitrogênio = azul; e carbono = amarelo ou cinza. As distâncias estão medidas em angstrom (Å).

Fonte: Próprio autor.

Na previsão do encaixe do peptídeo QGF demonstrada na figura 13, é evidenciado que o mesmo também pode realizar interações no sítio ativo da HMGR. A porção C-terminal do peptídeo realiza interações polares com o grupo amino do resíduo de Lys691, semelhantes àquelas observadas com o HMG-CoA e a sinvastatina (tabela 2). O oxigênio carbonílico da glicina pode realizar interações polares com o resíduo de Asn755, bem como ligações de hidrogênio com a cadeia lateral da His752. Ressalta-se que o inibidor sinvastatina realiza uma ligação de hidrogênio com o resíduo Asn755 (tabela 2). A extremidade N-terminal do peptídeo no resíduo da glutamina conferiu uma interação polar adicional com a Ser565.

Os estudos acima descritos mostram uma grande possibilidade da interação entre os peptídeos e a HMGR. Contudo, após uma triagem inicial, torna-se imprescindível a validação destes resultados com os ensaios laboratoriais.

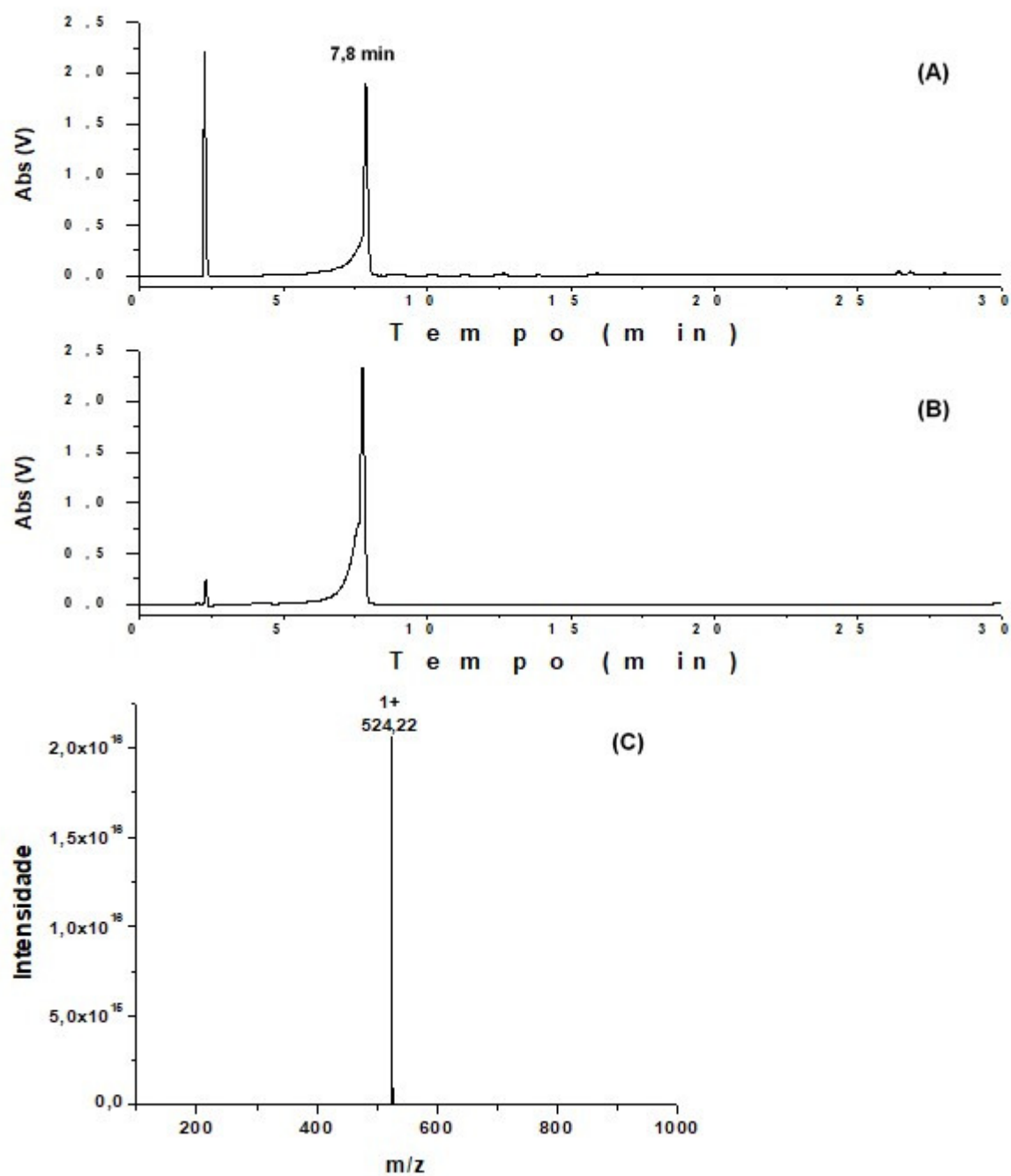
5.1.2. Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos triados

O uso dos ensaios *in silico* possibilitaram a triagem de vários peptídeos, sendo que dois deles (MPNY e QGF), derivados da β -vignina, serão avaliados em relação a atividade inibitória da HMGR. Com isso, os peptídeos triados foram sintetizados manualmente através do protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida pelo método Fmoc/tBu (MERRIFIELD, 1963; PICCOLI, 2019).

Os peptídeos sintetizados foram purificados e caracterizados utilizando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massas. A cromatografia é uma poderosa técnica de separação baseada em diferentes interações dos componentes de uma amostra entre duas fases, uma fixa e outra móvel. As técnicas cromatográficas possuem alta sensibilidade, versatilidade, rapidez, sendo ainda exatas e precisas. A cromatografia é essencialmente uma técnica de separação, porém quando associada a outras técnicas, tais como as espectrofotométricas, torna-se uma grande ferramenta analítica para identificação e quantificação de analitos em misturas complexas (SILVA, 2009).

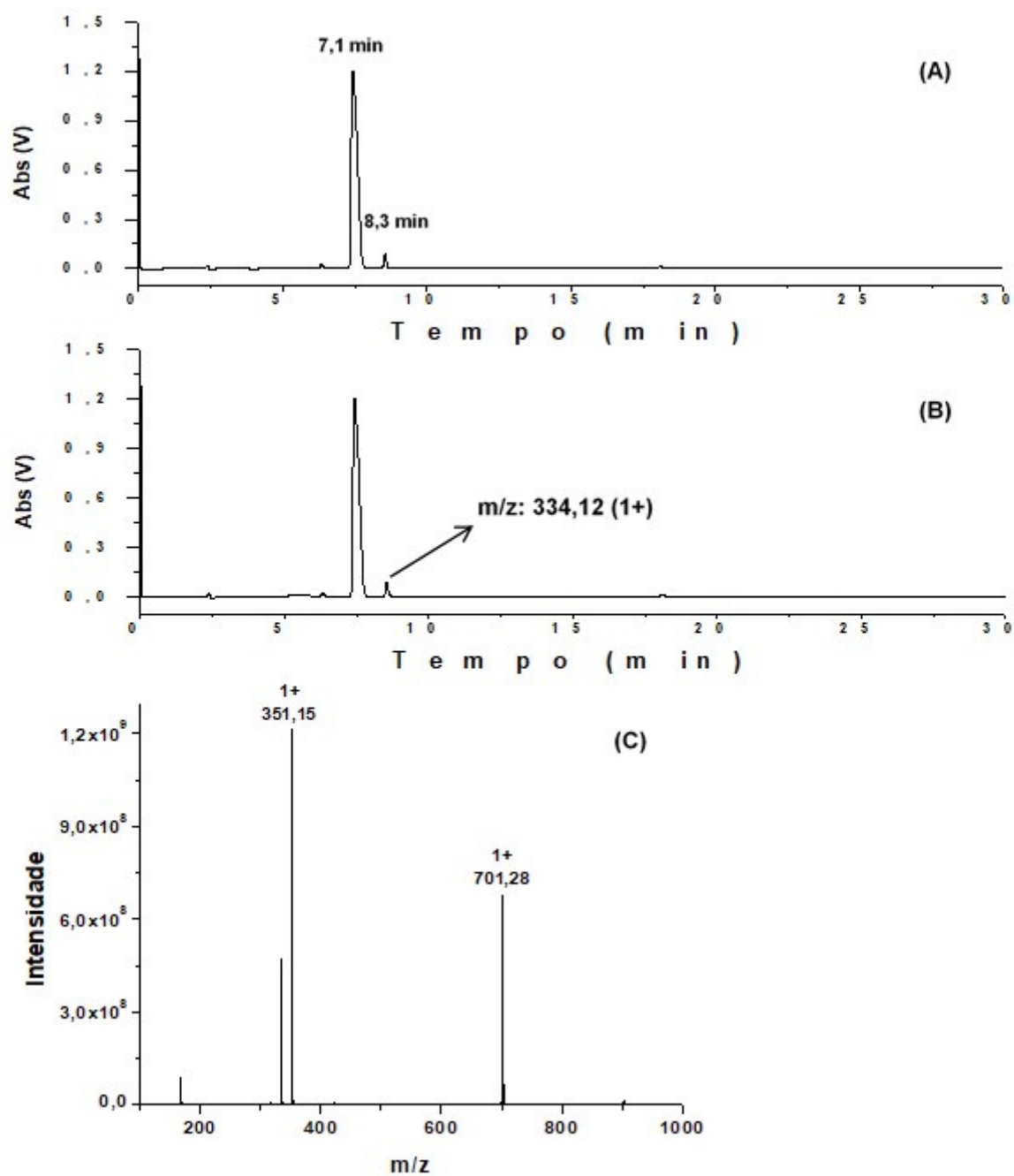
As figuras 13 e 14 mostram os perfis brutos, purificados e os espectros de massas obtidos, respectivamente, dos peptídeos MPNY e QGF.

Figura 14. Peptídeo MPNY: (A) Cromatograma do peptídeo bruto sintetizado; (B) Cromatograma do peptídeo purificado; (C) Espectro de massas do peptídeo purificado.



Fonte: Próprio autor.

Figura 15. Peptídeo QGF: (A) Cromatograma do peptídeo bruto sintetizado; (B) Cromatograma do peptídeo purificado; (C) Espectro de massas do peptídeo purificado.



Fonte: Próprio autor.

A tabela 3 resume os dados de síntese, purificação e caracterização dos dois peptídeos obtidos pela triagem *in silico*.

Tabela 3. Dados da síntese dos peptídeos originados após a triagem *in silico* da β -vignina.

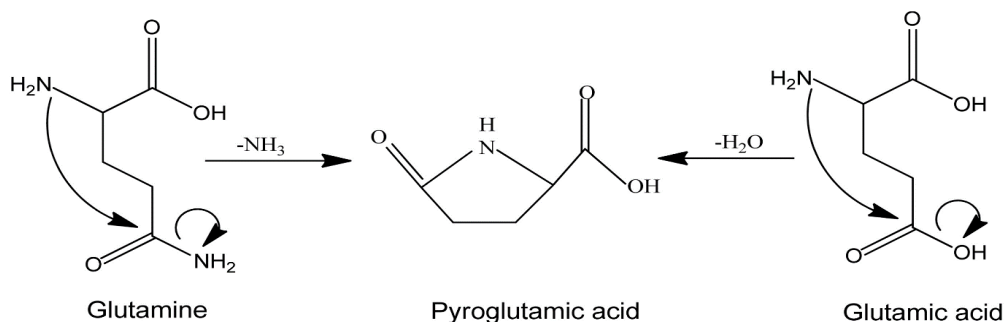
Peptídeo	Rendimento de síntese (%)	Pureza (%)	MM _{Teórica} (g/mol)	MM _{Obtida} (g/mol)
MPNY	72,7	99,9	523,6	523,2
QGF	78,9	96,7	350,4	350,2

*MM = Massa Molar

Fonte: Próprio autor.

A síntese manual dos peptídeos triados obteve um rendimento satisfatório variando de 72,7 a 78,9 % e as massas molares teóricas foram devidamente confirmadas pela espectrometria de massas (tabela 3), evidenciando que o processo foi eficiente. As purezas dos peptídeos após a purificação foram de 96,7 e 99,9 %, neste caso foi observado que o peptídeo QGF, que possui uma glutamina (Q) N-terminal, foi o que obteve menor pureza (96,7 %) (tabela 3). Avaliando-se o perfil cromatográfico do peptídeo QGF (figura 15) nota-se a presença de um pico contaminante em 8,3 min. Este pico aparece até mesmo no cromatograma deste peptídeo já purificado. Avaliando-se a razão massa / carga (m/z) deste pico (figura 15), foi constatado que a massa molar desse corresponde a uma diferença de exatos 17,03 g/mol em comparação com a massa molar do peptídeo. A literatura descreve que peptídeos que contenham glutamina e/ou ácido glutâmico na posição N-terminal podem formar ácido piroglutâmico (pGlu) por um processo de ciclização com a cadeia lateral do resíduo (PURWAHA et al., 2014). Este processo envolve a perda de uma molécula de amônia quando se tem uma glutamina N-terminal ou de uma molécula de água, no caso de ácido glutâmico N-terminal (figura 16). É descrito que condições ácidas, alcalinas ou aquecimento podem favorecer o processo de ciclização (PURWAHA et al., 2014).

Figura 16. Reação de formação do ácido piroglutâmico (pGlu) a partir de uma glutamina (Q) e de um ácido glutâmico (E).



Fonte: PURWAHA et al., 2014.

Considerando que as etapas de síntese, clivagens e purificação envolvem o uso de meios alcalinos e ácidos; e que a diferença de massa molar constatada foi exatamente correspondente a massa molar de uma molécula de amônia (17,03 g/mol), inferiu-se que a menor pureza obtida no peptídeo QGF foi devido a formação do pGlu na glutamina N-terminal.

A assimetria frontal encontrada no pico do MPNY (figura 14) foi atribuída à propriedade do peptídeo e não devido a presença de impurezas, visto que a massa molar desta região, avaliada ponto-a-ponto por LC/MS (cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas), foi a mesma do peptídeo. Moléculas passíveis de isomeria geométrica (*cis-trans*), como é caso de peptídeos contendo resíduos de prolina (P), podem gerar rotâmeros de interconversão lenta culminando em deformações no pico cromatográfico (TRABELSI et al., 2000; SANTOS NETO, 2010).

5.1.3. Ensaios *in vitro* de inibição da HMGR

Após a obtenção dos peptídeos sintéticos puros foi possível a realização dos ensaios *in vitro*. Inicialmente, foram realizados ensaios em concentrações decrescentes e, assim foi definida a concentração de 100 μM para avaliar a atividade inibitória dos peptídeos sintetizados (tabela 4). Os ensaios foram realizados utilizando o *kit HMG-CoA reductase assay* (Sigma Aldrich®), de acordo com a metodologia proposta por HULCHER e OLESON (1973).

Tabela 4. Atividade de inibição da HMGR *in vitro* pelos peptídeos MPNY e QGF.

Amostra	[] do inibidor (μM)	Inibição (%)
Pravastatina	0,5	94,52 ^a $\pm$ 2,00
MPNY	100	38,07 ^b $\pm$ 3,15
QGF	100	38,50 ^b $\pm$ 3,01

Médias seguidas por letras distintas apresentam diferenças significativas, ao nível de confiança de 95%, pelo teste de Tukey.

Fonte: Próprio autor.

Os resultados de inibição da HMGR para os peptídeos MPNY e QGF mostraram percentuais de inibição de aproximadamente 38 % para ambos os peptídeos (tabela 4). Os resultados de inibição dos peptídeos testados nesse trabalho foram melhores do que alguns já avaliados na literatura. Lammi e colaboradores (2015) obtiveram inibições da HMGR *in vitro* variando de 15 a 20 % com os peptídeos YVVNPDNDEN (100 μ M) e YVVNPDNNEN (150 μ M) originados da proteína β -conglícinina da soja.

Os resultados obtidos estão de acordo com os estudos preliminares feitos *in vivo* com dietas compostas com farinhas (LIYANAGE et al. 2018), isolados proteicos totais (FROTA et al., 2008; KAPRAVELOU et al., 2015) e fração 7S (FERREIRA et al., 2015) do feijão-caupí. Em todos estes trabalhos foi obtido a redução nos índices de colesterol total e LDL.

Em outro estudo, Frota e colaboradores (2015) avaliaram 38 pacientes hipercolesterolêmicos que consumiram 25 mg/dia de um isolado proteico do feijão-caupí e caseína (grupo controle) por 6 semanas. Os autores constataram que o consumo do isolado proteico do feijão-caupí reduziu, significativamente, o colesterol total (12 %), o LDL (18,9 %) e o não-HDL (16 %); além de um aumento nos índices do HDL (2,7 %). Isto sugere que os peptídeos originados da digestão da proteína do caupí podem estar modulando o metabolismo do colesterol. Considerando que uma mistura de peptídeos originados na digestão pode ter tal ação, é plausível cogitar que peptídeos puros com respostas de inibição da HMGR *in vitro* de 38 % (tabela 4), podem ser bons pontos de partida para o desenvolvimento de novas moléculas.

Independente da diferença apresentada entre os percentuais de inibição dos peptídeos e da pravastatina, os resultados iniciais apontam o potencial dos peptídeos em inibir a HMGR, além de serem bons alvos para modificações estruturais, a fim de incrementar a atividade dos mesmos. Pak e colaboradores (2012) selecionaram 3 peptídeos inicialmente isolados da proteína da soja, e por meio de alterações nas estruturas dos mesmos, obtiveram um incremento acima de 99 % na atividade inibitória.

5.1.4. Modificações estruturais dos peptídeos ativos da β -vignina

Com a comprovação da atividade dos peptídeos *in vitro*, modificações estruturais foram propostas, a fim de incrementar a atividade inibitória. Para o peptídeo MPNY foram avaliadas as seguintes alterações:

- **DM-PNY** – avaliação da influência do arranjo espacial do resíduo situado na extremidade N-terminal.
- **PNY** – como a metionina apresentou apenas 1 interação (N-terminal), esse resíduo foi retirado na tentativa aumentar o encaixe da molécula no sítio ativo, por conta da redução do volume molecular.
- **SPNY** – adição de uma hidroxila em busca de mais interações polares na porção N-terminal.
- **SPQY** – além da oferta de uma hidroxila na porção N-terminal; tentativa de aproximar a cadeia lateral amida do tetrapeptídeo aos resíduos polares da proteína, aumentando as interações polares, por meio da substituição da Asn por Gln.

Quanto ao peptídeo QGF, o produto de degradação formado sugere a formação de pGlu na porção N-terminal. Durante os procedimentos de síntese, clivagem e purificação quanto maior o tempo de exposição do peptídeo QGF as soluções ácidas, maior era formação do pGlu-GF. Contudo, a literatura sugere que a formação de pGlu na porção N-terminal fornece uma resistência a degradação por aminopeptidases. Muitas proteínas e peptídeos bioativos possuem pGlu na porção N-terminal, tendo a sua atividade relacionada a presença desse resíduo, incluindo anticorpos, fibrinogênio, colágeno,

neuropeptídeos e hormônios (AWADE et al., 1994; CHELIUS et al., 2006; PURWAHA et al., 2014).

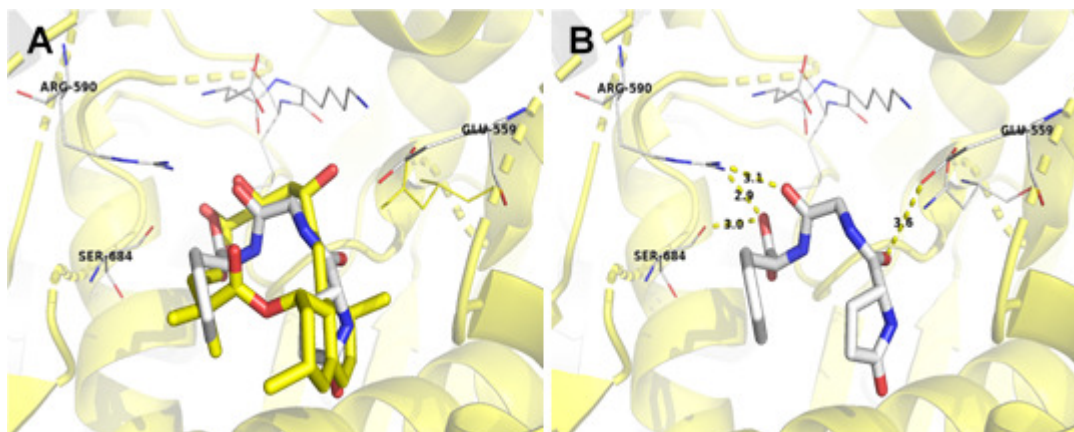
À vista disso, os seguintes fatores foram considerados: 1) o peptídeo QGF seria originado na hidrólise gastrointestinal da β -vignina; 2) no trato gastrointestinal o pH do meio pode variar de 2,0 a 8,0 a depender da região; 3) a formação do pGlu é catalisada por meios ácidos ou alcalinos; e 4) a presença de pGlu na porção N-terminal, adiciona maior estabilidade ao peptídeo. Diante deste contexto, o peptídeo pGlu-GF foi proposto como um novo derivado do peptídeo QGF para os ensaios *in vitro*.

5.1.5. Simulações *in silico* dos peptídeos modificados

Os análogos do peptídeo MPNY, nas condições de acoplamento molecular estudadas, não demonstraram interações significativas no sítio ativo da HMGR utilizando a estrutura cristalográfica da HMGR contendo o inibidor comercial sinvastatina (1HW9). Contudo, a literatura indica a existência de mais um domínio catalítico na HMGR, bem como a possibilidade de peptídeos interagirem em diferentes domínios (CAMPO e CARVALHO, 2007; MARQUES et al. 2015b). Assim, as modificações do peptídeo MPNY, mesmo sem apresentar interações significativas no ensaio com a estrutura 1HW9, foram sintetizadas a fim de avaliar a possibilidade de interação em outros sítios.

Por outro lado, no ensaio de acoplamento molecular no sítio ativo da estrutura cristalográfica 1HW9 com o peptídeo pGlu-GF houve a presença de interações com o sítio ativo da HMGR (figura 17).

Figura 17. Acoplamento do peptídeo pGlu-GF com o sítio ativo da HMGR (PDB 1HW9) usando o software AutoDock-VINA®. (A) Melhor posição selecionada para a sinvastatina (amarelo) sobreposta a melhor posição do peptídeo pGlu-GF (cinza); (B) Previsão do perfil de ligação do pGlu-GF no sítio ativo.



O sítio de ligação da HMGR está representado em amarelo. Oxigênio = vermelho; nitrogênio = azul; enxofre = amarelo; e carbono = amarelo ou cinza. As distâncias estão medidas em angstrom (Å).

Fonte: Próprio autor.

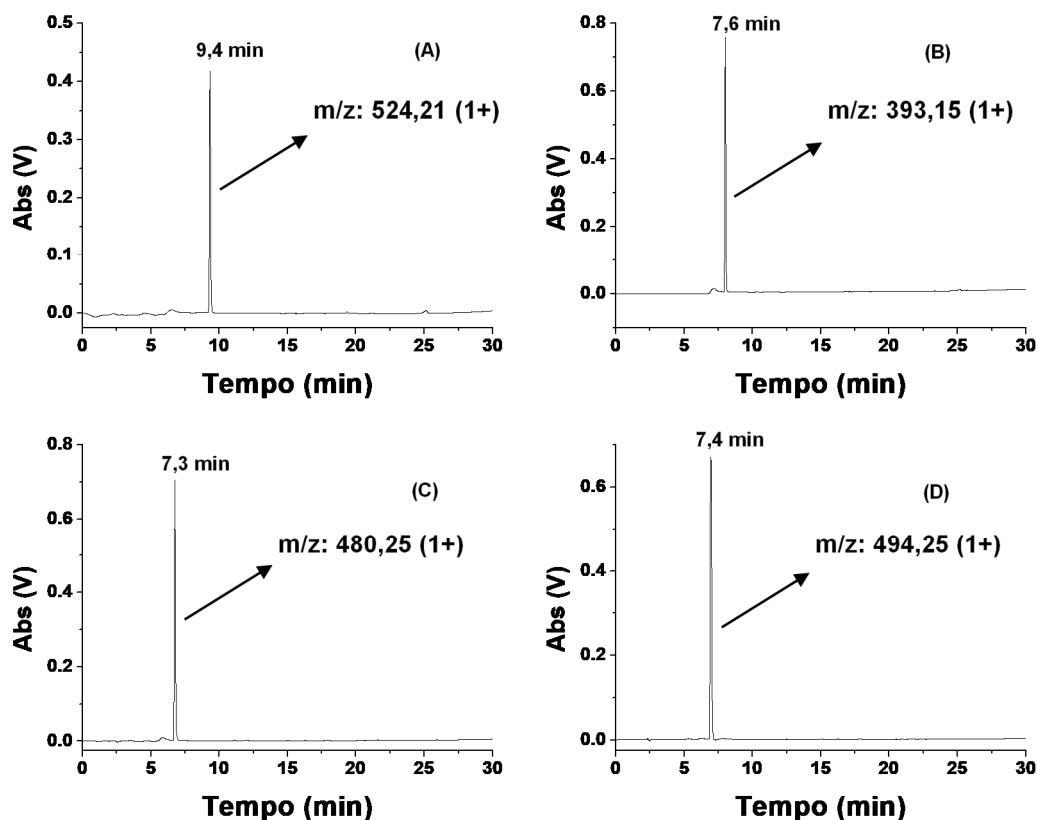
Analisando a figura 17, nota-se que porção C-terminal do peptídeo realiza as mesmas interações polares que o substrato HMG-CoA e o inibidor sinvastatina (tabela 2), com os resíduos Arg590 e Ser684. Além disso, a carbonila da glicina confere uma possibilidade adicional de interação com a Arg590, fato que também ocorre com a molécula da sinvastatina (tabela 2). Por fim, a carbonila da ligação peptídica entre o pGlu e a glicina também permite uma interação polar com a Glu559, sendo que a mesma interação também ocorre com o HMG-CoA e com a sinvastatina. Ressalta-se que nesse ensaio de acoplamento molecular a lactama do peptídeo pGlu-GF ocupa a mesma região da decalina da sinvastatina.

Um outro ponto relevante é que o peptídeo pGlu-GF (figura 17) apresentou um perfil de interações totalmente diferente do seu precursor, o peptídeo QGF (figura 13). O QGF interagiu com quatro resíduos: Ser565, Lys691, Asn755 e His752; ao passo que o pGlu-GF interagiu com três resíduos diferentes: Glu559, Arg590 e Ser684. Contudo todos os três resíduos de interação do pGlu-GF também interagem com o HMG-CoA e com a sinvastatina (tabela 2), o que não ocorreu na interação do QGF.

5.1.6. Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos modificados

Os novos peptídeos modificados foram sintetizados manualmente através do protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida Fmoc/tBu, purificados e caracterizados (MERRIFIELD, 1963; PICCOLI, 2019). Os perfis cromatográficos dos análogos puros modificados de alterações na estrutura do MPNY são demonstrados nas figuras 18; e a tabela 5 resume os dados de síntese, purificação e caracterização dos peptídeos.

Figura 18. Cromatogramas dos novos peptídeos puros, originados de modificações do MPNY. (A) Δ M-PNY; (B) PNY; (C) SPNY e (D) SPQY. Em detalhe destacam-se as respectivas razões m/z .



Fonte: Próprio autor.

Tabela 5. Dados da síntese dos peptídeos modificados obtidos a partir do MPNY.

Peptídeo	Rendimento de síntese (%)	Pureza (%)	MM _{Teórica} (g/mol)	MM _{Obtida} (g/mol)
_D M-PNY	87,0	99,9	523,6	523,2
PNY	84,4	99,9	392,4	392,2
SPNY	88,2	99,9	479,5	479,3
SPQY	89,0	99,9	493,5	493,3

*MM = Massa Molar

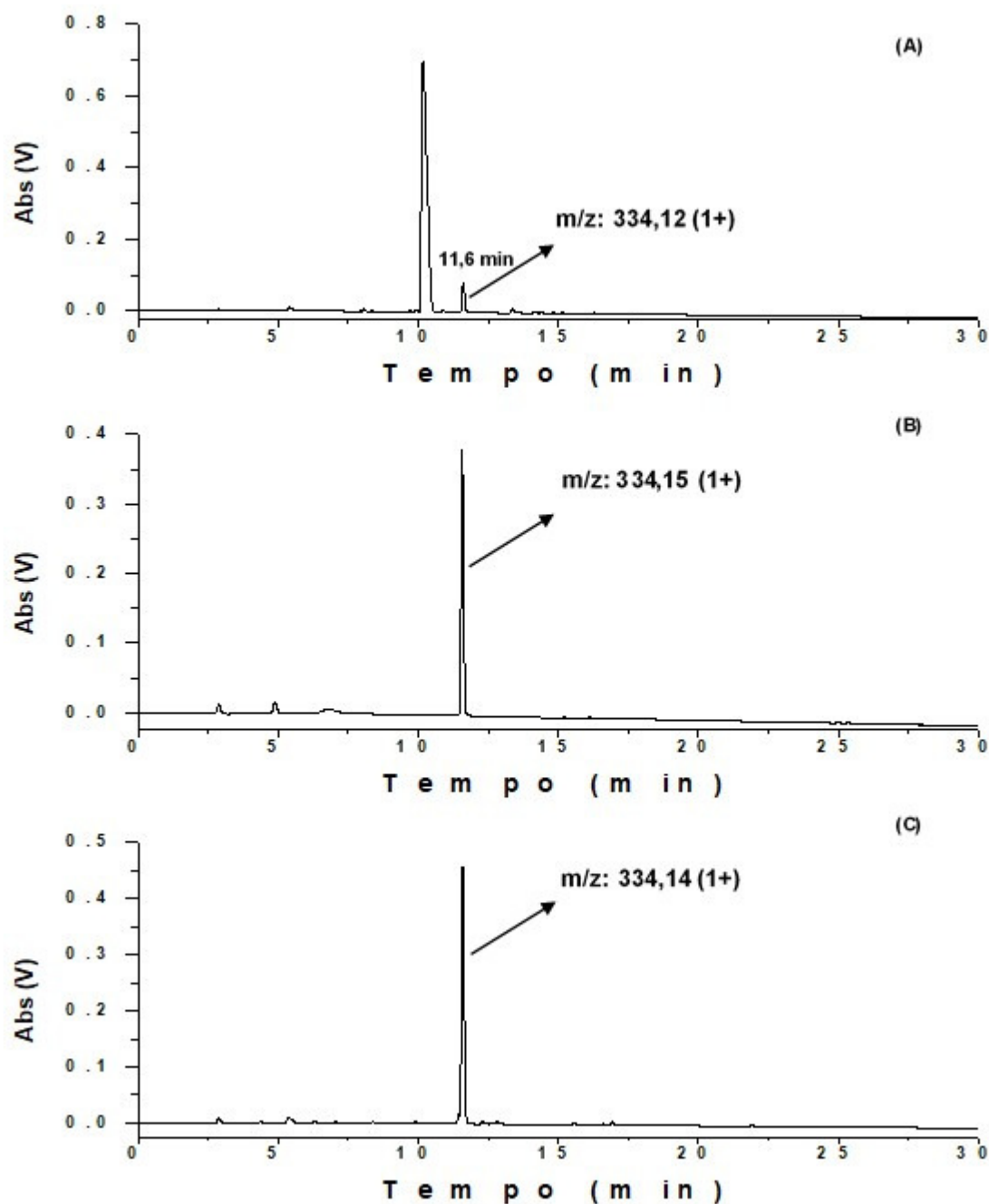
Fonte: Próprio autor.

A síntese manual dos peptídeos modificados obteve ótimos rendimentos, todos acima de 80 %; as purezas obtidas foram todas acima de 99 %; e as massas molares obtidas comprovaram a obtenção dos materiais desejados (tabela 5; figura 18), evidenciando que o processo de síntese foi eficiente.

No caso do peptídeo pGlu-GF, considerando a presença do mesmo em todas sínteses do QGF, foi realizada a purificação do mesmo ao invés de uma nova síntese. Entretanto, a fim de confirmar a identidade do peptídeo pGlu-GF purificado, uma síntese em menor escala foi realizada utilizando diretamente o ácido piroglutâmico (pGlu) para ser acoplado ao dipeptídeo GF.

Nos cromatogramas da figura 19 é possível observar a presença do peptídeo pGlu-GF como um produto de degradação do QGF (figura 19A) com um tempo de retenção (t_R) de 11,6 min. Ao avaliar os cromatogramas do peptídeo pGlu-GF purificado (figura 19B) e do sintetizado (figura 19C), nota-se que o t_R é coincidente. Além disso, em todos os três cromatogramas a razão massa/carga (m/z) foi obtida com o mesmo valor em torno de 334 g / mol (+1). Com isso, foi confirmada a hipótese levantada da degradação da glutamina N-terminal do peptídeo QGF, e assim foi obtido o peptídeo pGlu-GF para os novos ensaios *in vitro*.

Figura 19. Cromatogramas dos peptídeos: (A) Peptídeo QGF evidenciando o segundo pico correspondente ao produto de degradação (pGlu-GF); (B) Peptídeo pGlu-GF purificado a partir do QGF e (C) Peptídeo pGlu-GF sintetizado e purificado. Em detalhe destacam-se as respectivas razões m/z .



Fonte: Próprio autor.

5.1.7. Ensaios *in vitro* com os novos peptídeos originados da β -vignina

Os novos peptídeos obtidos foram avaliados quanto a capacidade de inibir a enzima HMGR (tabela 6) da mesma forma como descrito anteriormente. Os resultados foram comparados com os obtidos com os peptídeos MPNY e QGF.

Tabela 6. Atividade de inibição da HMGR *in vitro* pelos novos peptídeos sintetizados.

Amostra	[] do inibidor (μ M)	Inibição (%)
Pravastatina	0,5	94,52 ^a $\pm$ 2,00
MPNY	100	38,07 ^c $\pm$ 3,15
QGF	100	38,50 ^c $\pm$ 3,01
_D M-PNY	100	n/a
PNY	100	n/a
SPNY	100	n/a
SPQY	100	n/a
pGlu-GF	100	54,28 ^b $\pm$ 3,22

Médias seguidas por letras distintas apresentam diferenças significativas, ao nível de confiança de 95%, pelo teste de Tukey.

Fonte: Próprio autor.

De acordo com dados obtidos pelo ensaio *in vitro*, nenhuma das modificações propostas para o peptídeo MPNY apresentou atividade. Estes dados, corroboram com os resultados obtidos pelos ensaios *in silico*, que indicaram que os análogos obtidos das modificações do MPNY não apresentaram interações significativas no sítio ativo da HMGR. A alteração do resíduo de metionina (M) para a configuração D (_DM), a substituição por serina (S) ou a remoção do mesmo, promoveram a perda total da atividade inibitória. Isto sugere que o resíduo de metionina é fundamental para a atividade do peptídeo MPNY, e que a interação N-terminal com o resíduo Ala856 (figura 12), apesar de não estar presente com o inibidor sinvastatina (tabela 2), também é importante para a atividade do peptídeo.

No que concerne ao peptídeo pGlu-GF, este apresentou o maior percentual de inibição (54,28 %) com diferença significativa quando comparado aos outros peptídeos avaliados (tabela 6). Em relação ao seu peptídeo de origem

(QGF), a atividade inibitória do pGlu-GF foi cerca de 1,4 vezes maior, ou seja, ocorreu um incremento de 41 %. Correlacionando esse resultado com os dados do ensaio *in silico* (figuras 13 e 17), nota-se que mesmo não interagindo com os mesmos resíduos que o QGF, a atividade do pGlu-GF foi consideravelmente maior. Se comparado com o acoplamento do peptídeo MPNY (figura 12), ambos interagem com os resíduos Glu559 e Ser684, que também está presente nas interações do substrato HMG-CoA e do inibidor sinvastatina (tabela 2), o que pode justificar sua atividade. Contudo, dentre os peptídeos avaliados o pGlu-GF foi o único que interagiu com o resíduo Arg590 (figura 17) que, por sua vez também realiza interações com o substrato e o inibidor comercial (tabela 2). A literatura indica que a interação com o resíduo Arg590 acarreta num incremento da atividade inibitória, assim como foi observado com o pGlu-GF (ISTVAN e DEISENHOFER, 2001; CAMPO e CARVALHO, 2007).

Outro ponto perceptível, é que o número de possíveis interações realizadas pelo MPNY (9 interações) (figura 12) é bem maior que àquelas indicadas para o pGlu-GF (4 interações) (figura 17). Entretanto, isso não se relacionou com uma maior atividade. Possivelmente, os resíduos com os quais o pGlu-GF interage são mais importantes e as interações mais fortes, do que as realizadas pelo MPNY.

Além disto, o ensaio de acoplamento do pGlu-GF mostrou que a lactama do peptídeo ocupou a mesma posição da decalina da sinvastatina (figura 17). Esta posição é importante devido a literatura indicar que o grupo volumoso apolar das estatinas (a decalina, no caso da sinvastatina) é importante para atividade inibitória, pois proporciona interações hidrofóbicas com os resíduos Leu562, Leu853 e Val683. Os estudos com a HMGR sugerem que existe uma diferença fundamental entre as interações do substrato (HMG-CoA) e as estatinas. No complexo da HMGR com as estatinas ocorre uma mudança conformacional na região flexível C-terminal, e assim acomoda os grupos rígidos e apolares dos inibidores, desse modo aumenta as interações hidrofóbicas culminando num aumento da potência inibitória. Apesar destas interações não estarem evidenciadas nas condições de acoplamento adotadas para o pGlu-GF, o posicionamento da lactama no mesmo bolsão apolar das estatinas pode ofertar grupos CH e CH₂ para interações hidrofóbicas (ISTVAN e DEISENHOFER, 2001; CAMPO e CARVALHO, 2007).

5.2. Peptídeo GCTLN do feijão-caupí

Marques e colaboradores (2015b) também trabalharam com peptídeos do feijão-caupí. Os autores isolaram e sequenciaram *de novo* o peptídeo GCTLN, que em estudos *in silico* mostrou a capacidade de interagir significativamente nas proximidades do sítio ativo da HMGR. Contudo os autores não avaliaram *in vitro* a ação inibitória do peptídeo GCTLN sob a HMGR.

5.2.1. Modificações estruturais do peptídeo GCTLN

Neste trabalho, foi estudada a atividade do peptídeo GCTLN, por meio da sua síntese química e avaliação biológica. Além disso, foram propostas as seguintes modificações estruturais:

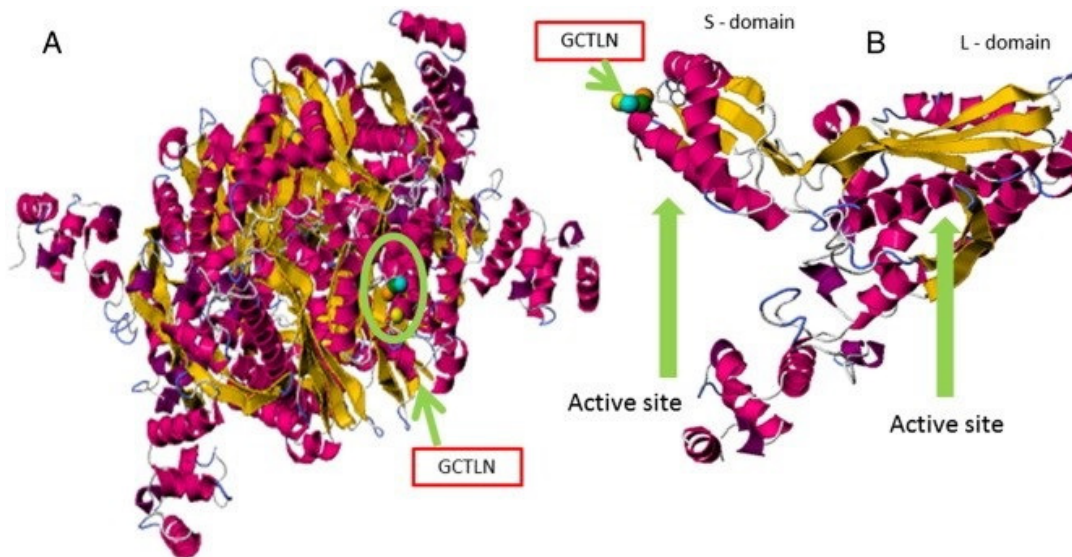
- GSTLN – substituição do resíduo de cisteína para evitar dimerização por ligação dissulfeto, mantendo uma hidroxila para formar interações polares.
- GCTLN-NH₂ – a fim de avaliar a influência da extremidade C-terminal.
- GSTLN-NH₂ – em busca de avaliar as modificações conjuntas descritas no primeiro e segundo peptídeo.

Tanto para o peptídeo GCTLN, quanto para os seus derivados foram simulados ensaios de acoplamento molecular com o sítio ativo da estrutura cristalográfica da HMGR com a sinvastatina (1HW9). Contudo nenhum destes peptídeos demonstraram probabilidades de interações nas condições avaliadas. Este resultado já era esperado, tendo em vista que o estudo publicado por Marques e colaboradores (2015b) indicou a possibilidade do peptídeo GCTLN interagir em outra região da enzima. Segundo os autores, o peptídeo GCTLN liga-se no domínio-S do monômero da HMGR próximo ao sítio ativo (figura 20).

A estrutura da HMGR humana foi descrita por Istvan e Deisenhofer (2000) e está demonstrada nas figuras 21 e 22. A enzima é composta pela união de 4 monômeros que se arranjam em dímeros e por fim se unem formando um tetrâmero. Os resíduos de ambos os monômeros dos dímeros formam dois sítios ativos para o substrato HMG-CoA, totalizando 4 sítios na enzima (figura 21). Cada monômero contém uma única estrutura com três domínios: um domínio N-terminal (*N-domain*); um domínio central, maior e que contém a porção C-

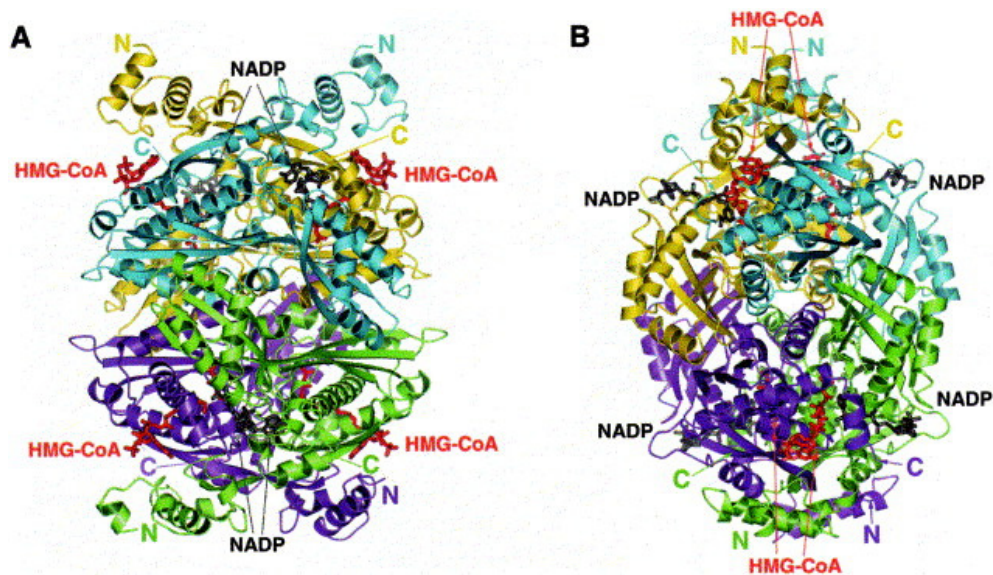
terminal (*L-domain*) e; um domínio menor (*S-domain*) inserido no *L-domain* (figura 22) (ISTVAN e DEISENHOFER, 2000).

Figura 20. Interação proposta do peptídeo GCTLN por MARQUES e colaboradores (2015b). (A) Tetrâmero da HMGR e o sítio de interação previsto para o peptídeo GCTLN. (B) Interação do GCTLN com o domínio-S próximo ao sítio ativo.



Fonte: MARQUES et al., 2015b.

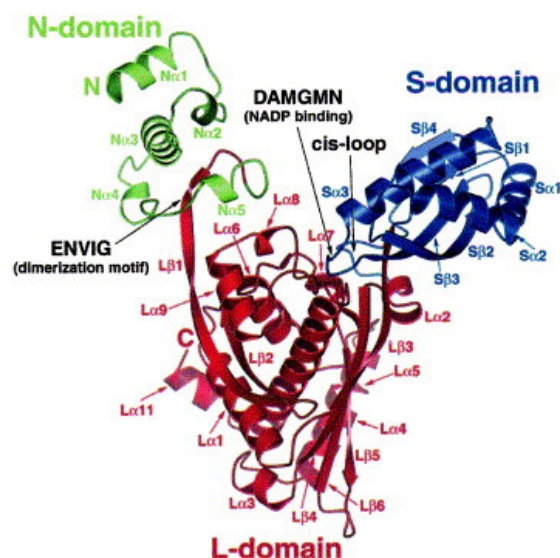
Figura 21. Diagrama em fitas do tetrâmero da HMGR humana. (A) Vista frontal. (B) Vista lateral.



Os quatro monômeros estão coloridos em amarelo, verde, azul e roxo. O dímero 1 é formado pelos monômeros amarelo e azul e o dímero 2 pelo verde e o roxo. A porção N- e C- terminal de cada monômero está indicada. 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).

Fonte: ISTVAN e DEISENHOFER, 2000.

Figura 22. Diagrama em fitas da estrutura terciária do monômero da HMGR humana.



Os três domínios estão em cores distintas: N-domain de verde; L-domain de vermelho e; S-domain de azul. A porção N- e C- terminal do monômero está indicada.

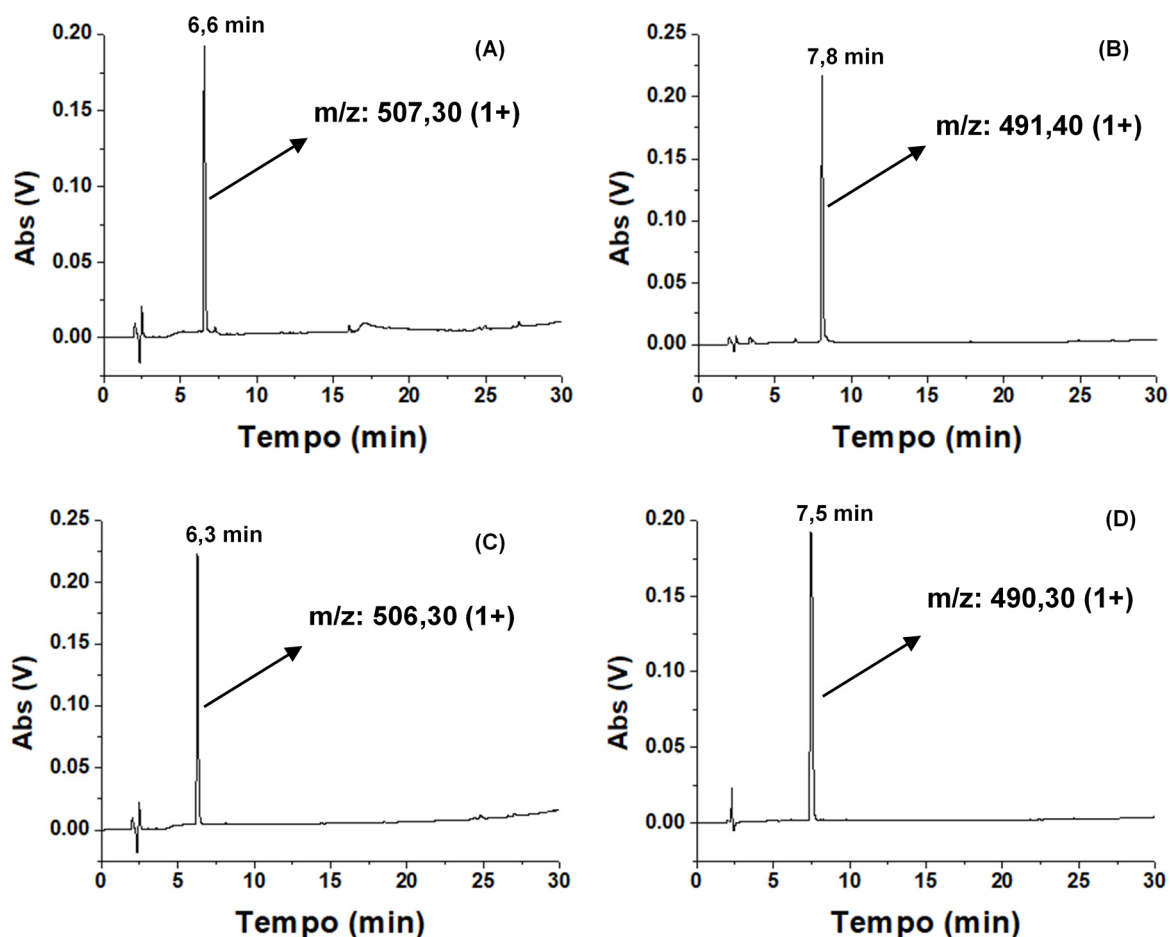
Fonte: ISTVAN e DEISENHOFER, 2000.

O sítio ativo do substrato HMG-CoA está localizado no *L-domain*, enquanto que o local de ligação do NADPH é, predominantemente, no *S-domain*. Os domínios *L* e *S* são unidos por um *loop*, denominado de “*cis-loop*” que, por sua vez, é essencial para a formação do sítio ativo. O “*cis-loop*” envolve os resíduos localizados entre 682-694, sendo que a região dos aminoácidos Cys688 a Thr689 orienta os resíduos Ser684, Asp690, Lys691 e Lys692, que são fundamentais para a atividade da HMGR (ISTVAN e DEISENHOFER, 2000; CAMPO e CARVALHO, 2007). Assim torna-se admissível a hipótese de que o peptídeo GCTLN interagindo no *S-domain* próximo ao sítio ativo, possa induzir mudanças conformacionais na estrutura de modo a inibir atividade da HMGR. Este seria um mecanismo distinto das estatinas, que agem por uma competição direta com o substrato pelo sítio ativo. Isto justifica o fato de que nos ensaios de acoplamento molecular realizados com o sítio ativo da estrutura cristalográfica 1HW9 e o peptídeo GCTLN e seus derivados, não foram observadas interações.

5.2.2. Síntese, purificação e caracterização do peptídeo GCTLN e seus derivados

O peptídeo GCTLN e seus derivados (GSTLN; GCTLN-NH₂ e GSTLN-NH₂) foram sintetizados manualmente através do protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida, purificados e caracterizados (MERRIFIELD, 1963; PICCOLI, 2019). Os perfis cromatográficos dos novos peptídeos puros são demonstrados na figura 23 e a tabela 7 resume os dados obtidos da síntese dos mesmos.

Figura 23. Cromatogramas do peptídeo puro GCTLN e de seus derivados: (A) GCTLN; (B) GSTLN; (C) GCTLN-NH₂ e; (D) GSTLN-NH₂. Em detalhe destacam-se as respectivas razões m/z .



Fonte: Próprio autor.

Tabela 7. Dados da síntese peptídeo GCTLN e seus derivados.

Peptídeo	Rendimento de síntese (%)	Pureza (%)	MM _{Teórica} (g/mol)	MM _{Obtida} (g/mol)
GCTLN	73,8	99,9	506,6	506,3
GSTLN	62,8	99,9	490,5	490,4
GCTLN-NH ₂	67,5	99,9	505,6	505,3
GSTLN-NH ₂	70,0	99,9	489,5	489,3

*MM = Massa Molar

Fonte: Próprio autor.

A síntese manual do peptídeo GCTLN e seus derivados apresentou rendimentos satisfatórios variando de 62,8 a 73,8 %, sendo que todos mostraram após a purificação, valores de purezas maiores que 99 % (tabela 7). As massas molares teóricas foram devidamente confirmadas pela espectrometria de massas (tabela 7; figura 23), evidenciando a obtenção dos materiais desejados.

5.2.3. Ensaios *in vitro* de inibição da HMGR pelo peptídeo GCTLN e seus derivados

O peptídeo GCTLN e seus derivados foram avaliados quanto a capacidade de inibir a enzima HMGR (tabela 8) utilizando o *kit HMG-CoA reductase assay* (Sigma Aldrich®) (HULCHER e OLESON, 1973).

Tabela 8. Atividade de inibição da HMGR *in vitro* pelo peptídeo GCTLN e seus derivados.

Amostra	[] do inibidor (μM)	Inibição (%)
Pravastatina	0,5	94,52 ^a ± 2,00
GCTLN	100	17,93 ^c ± 1,41
GSTLN	100	27,14 ^b ± 3,39
GCTLN-NH ₂	100	n/a
GSTLN-NH ₂	100	n/a

Médias seguidas por letras distintas apresentam diferenças significativas, ao nível de confiança de 95%, pelo teste de Tukey.

Fonte: Próprio autor.

De acordo os dados obtidos (tabela 8), os peptídeos GCTLN e GSTLN apresentaram atividades inibitórias da HMGR de, respectivamente, 17,93 e 27,14 %. Estes dados contrapõem-se aos resultados de simulação *in silico* da ligação dos peptídeos ao sítio ativo da HMGR (1HW9), que não mostrou interação alguma. Esses resultados confirmam que a ação desses peptídeos ocorre em outro sítio da enzima HMGR que não o sítio ativo, isto está em consonância ao que foi proposto por Marques e colaboradores (2015b). É provável que os peptídeos GCTLN e GSTLN estejam interagindo próximo a região do sítio ativo, sem competir com o substrato, provocando alguma mudança conformacional que inibe a capacidade da HMGR de converter o HMG-CoA em mevolanato.

Os resultados obtidos do ensaio *in vitro* mostram que a alteração na porção C-terminal (peptídeos GCTLN-NH₂ e GSTLN-NH₂) acarretou na perda total da atividade (tabela 8), isto demonstra a importância do grupo carboxílico C-terminal na interação com a enzima e na sua atividade. A amidação remove a carga negativa da extremidade C-terminal. É provável que interações iônicas formadas nesta região com grupos da enzima sejam cruciais para a sua inibição. Resíduos com cargas positivas, tais como lisina e arginina, podem estar envolvidos nas interações com a porção C-terminal destes peptídeos (ALSINA e ALBERICIO, 2003; NELSON e COX, 2014).

A substituição do segundo resíduo (Cys) também traz informações sobre as possíveis interações envolvidas. A substituição do resíduo de cisteína (C) por uma serina (S), provocou um aumento significativo de 51 % da atividade inibitória (tabela 8). Tanto a cisteína quanto a serina, possuem cadeias laterais polares não carregadas, que por sua vez são passíveis de promover interações polares com a HMGR. Contudo, a maior atividade do peptídeo contendo o resíduo de serina, pode ser justificada pela maior eletronegatividade do átomo de oxigênio (hidroxila da cadeia lateral da serina) comparado ao átomo de enxofre, presente no grupo tiol da cadeia lateral da cisteína. Um maior eletronegatividade promove interações mais fortes, o que pode ser responsável pelo aumento da atividade (PAULING, 1932; ALLRED, 1961; ISTVAN e DEISENHOFER, 2000; CAMPO e CARVALHO, 2007).

Um outro dado importante que deve ser ressaltado, é que o resíduo de cisteína pode ser oxidado e promover dimerização das moléculas por ligações

dissulfeto (LORENZON et al., 2019). Isto retiraria a oferta de um grupo polar nesta posição do peptídeo o que pode provocar a perda da atividade. Além disso, a dimerização aumentaria o tamanho da molécula o que poderia impedir sua ligação à enzima.

Após a síntese do peptídeo GCTLN foi constada a presença do dímero, contudo, o mesmo foi excluído pelo processo de purificação. No entanto, no meio fisiológico ou mesmo nas condições do teste de inibição da HMGR, a formação do dímero pode ocorrer, diminuindo a possibilidade de utilização desta molécula. Neste contexto, o peptídeo GSTLN ganha destaque por apresentar diferença significativa na atividade inibitória em relação ao GCTLN e, por não possuir problemas com a dimerização.

5.3. Determinação da concentração dos peptídeos para 50 % de inibição da HMGR (IC₅₀)

Após a identificação dos peptídeos com maior atividade inibitória sobre a HMGR, foram determinadas as suas concentrações que promovem a metade da inibição (IC₅₀) da HMGR. Para tanto, foram obtidas curvas analíticas com diferentes concentrações de cada peptídeo, relacionando o logaritmo da concentração pelo percentual de inibição, sendo avaliados os coeficientes de determinação (R²), e seguidamente obtidas as respectivas equações das retas para cálculo do IC₅₀. Os resultados obtidos de IC₅₀ estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Determinação do IC₅₀ dos peptídeos com maior atividade inibitória sobre a HMGR.

Peptídeo	Equação da reta (R ²)	IC ₅₀ (μM)
QGF	$y = 37,224 \log(x) - 36,055$ (R ² = 0,9984)	205,0
pGlu-GF	$y = 41,343 \log(x) - 31,929$ (R ² = 0,9430)	95,9
GSTLN	$y = 67,585 \log(x) - 110,93$ (R ² = 0,9840)	240,5

Fonte: Próprio autor.

Os resultados obtidos para a concentração correspondente a metade da inibição máxima (IC_{50}) variaram de 95,9 μ M (pGlu-GF) a 240,5 μ M (GSTLN) (tabela 9). Na literatura são descritos os peptídeos LPYP, IAVPGEVA e IAVPTGVA isolados da proteína de soja, que possuem um IC_{50} sobre a HMGR de 484, 201 e 152 μ M, respectivamente (PAK et al., 2012). Lammi e colaboradores (2015) também determinaram valores de IC_{50} para os peptídeos YVVNPDNDEN e YVVNPDNNEN, originados da proteína β -conglícinina da soja, obtendo valores de, respectivamente, 150 e 200 μ M. Isto demonstra que os peptídeos obtidos nesse estudo possuem uma atividade inibitória da HMGR próxima aos valores de outros peptídeos isolados e já descritos na literatura, no entanto, com menores tamanhos. Outro dado importante é que o peptídeo pGlu-GF apresentou uma diminuição de mais de 100 % do IC_{50} , quando comparado ao seu precursor QGF.

5.4. Avaliação do efeito combinado entre os novos peptídeos desenhados e o fármaco pravastatina

A combinação de diferentes drogas em terapias é amplamente aplicada no tratamento de diversas doenças. Nesta estratégia de tratamento, dois ou mais fármacos são associados a fim de aumentar a eficácia terapêutica, reduzir dosagens individuais e mitigar os efeitos colaterais de cada fármaco. Por exemplo, no tratamento de dislipidemias, são combinados os usos das estatinas com sequestradores de ácidos biliares, os inibidores de absorção intestinal, os fibratos e a niacina (SCHULZ, 2006; FALUDI et al., 2017; BASTING, 2018, PRÉCOMA et al., 2019).

Essas aplicações baseiam-se nos efeitos sinérgicos ou aditivos de cada fármaco, que juntos podem melhorar a eficácia terapêutica. O sinergismo ocorre quando a combinação de dois ou mais fármacos produzem um efeito maior do que aquele esperado para a simples soma dos efeitos individuais de cada componente combinado. Ao passo que, o efeito aditivo ocorre pela simples soma dos efeitos individuais de cada fármaco (ROELL et al., 2017; CHAVARRIA et al., 2019).

Considerando a possibilidade de terapias combinadas e de que, neste estudo, foram obtidos peptídeos com atividades em dois sítios distintos da

HMGR; sendo um destes o local de ação das estatinas; foram realizados ensaios de inibição *in vitro* combinando os peptídeos pGlu-GF, GSTLN e o fármaco pravastatina, conforme apresentados na tabela 10.

Tabela 10. Estudo dos efeitos combinados entre os peptídeos pGlu-GF, GSTLN e o fármaco pravastatina, obtidos por ensaios de inibição *in vitro* da enzima HMGR.

Amostra	[] do inibidor	Inibição (%)
Pravastatina	16,7 η M	46,13 ^c $\pm$ 0,74
pGlu-GF	100 μ M	54,28 ^b $\pm$ 3,22
GSTLN	100 μ M	27,14 ^d $\pm$ 3,39
Pravastatina : pGlu-GF	16,7 η M : 100 μ M	54,40 ^b $\pm$ 7,87
Pravastatina : GSTLN	16,7 η M : 100 μ M	65,24 ^a $\pm$ 4,28
pGlu-GF : GSTLN	50 μ M : 50 μ M	55,42 ^b $\pm$ 3,40

Médias seguidas por letras distintas apresentam diferenças significativas, ao nível de confiança de 95%, pelo teste de Tukey.

Fonte: Próprio autor.

Para ser avaliado o efeito da pravastatina em combinação com os peptídeos, primeiramente foi necessário reduzir seu percentual de inibição. Para tanto, foram realizadas diluições consecutivas da solução estoque da pravastatina e avaliado o efeito inibidor destas diluições. Assim, foi determinado que a concentração de 16,7 η M seria adotada para os ensaios combinados.

Avaliando os dados da tabela 10, percebe-se que o percentual de inibição das combinações pravastatina : pGlu-GF e pGlu-GF : GSTLN não diferem significativamente quando comparados com o efeito do peptídeo pGlu-GF (100 μ M) individualmente. Contudo, tanto o pGlu-GF quanto todas as combinações utilizadas possuem efeito inibidor maior e com diferença significativa do fármaco pravastatina (16,7 η M).

Ao combinar o fármaco pravastatina (16,7 η M) com o peptídeo pGlu-GF (100 μ M), o aumento foi menor que a soma das atividades destes dois compostos que deveria resultar em inibição de aproximadamente 100 %. Os resultados estão de acordo com o fato de que a pravastatina e o peptídeo pGlu-GF agem no mesmo sítio, podendo apresentar uma inibição competitiva. De qualquer forma, os resultados obtidos demonstram que o pGlu-GF pode

funcionar como um adjuvante na ação das estatinas, propiciando a utilização de doses menores destas sem comprometer a atividade inibitória e com menores efeitos adversos.

Quando se avalia o efeito da combinação da pravastatina (16,7 η M) com o GSTLN (100 μ M), o incremento de atividade foi o maior obtido em todos os ensaios (65,24 %) (tabela 10). Ao comparar com as atividades individuais da pravastatina e do GSTLN os aumentos foram de, respectivamente, 19,11 e 38,10 % na inibição. O valor obtido de inibição da mistura é próximo do valor obtido se somarmos as atividades dos dois compostos individualmente (aproximadamente 73 %), indicando novamente que os sítios de ligação destes compostos podem ser diferentes.

Ao avaliar a atividade da combinação dos dois peptídeos, pGlu-GF (50 μ M) e GSTLN (50 μ M), foi obtido um percentual de inibição de 55,4 % (tabela 10), que foi muito próxima do peptídeo pGlu-GF sozinho. Considerando que a concentração utilizada na combinação entre os dois peptídeos foi de 50 μ M de cada um e que o pGlu-GF possui uma alta atividade individual (54,28 %), é possível que em estudos variando as concentrações dos dois peptídeos possam se obter percentuais de inibição ainda maiores. Isto demonstra que a associação do pGlu-GF com o GSTLN possui um bom potencial de inibição.

Esses resultados indicam mais uma vez que os sítios de ligação destes dois peptídeos são diferentes na HMGR. Outra possibilidade é que o peptídeo GSTLN tenha um efeito sinérgico na enzima, facilitando a ligação da pravastatina ou do peptídeo pGlu-GF. Novamente, os dados obtidos neste ensaio mostram que, além do peptídeo pGlu-GF, o GSTLN também pode funcionar como um adjuvante na ação das estatinas.

Com base nesses resultados (tabela 10), é possível observar que há aumentos significativos nas atividades inibitórias quando o fármaco pravastatina e os peptídeos foram utilizados de modo combinado. Contudo, com os experimentos realizados não foi possível determinar se houve um sinergismo ou um efeito aditivo. Para ser determinado com exatidão se houve um efeito sinérgico ou aditivo, seriam necessários estudos farmacodinâmicos mais aprofundados relacionando as doses dos compostos de forma individual e

combinada com a inibição da HMGR (ROELL et al, 2017; BASTING, 2018; CHAVARRIA et al., 2019).

De forma global, os resultados obtidos são muitos semelhantes aos descritos na literatura. Pak e colaboradores (2012) a partir dos peptídeos LPYP, IAVPGEVA e IAVPTGVA isolados da proteína de soja (IC_{50} de 484, 201 e 152 μ M, respectivamente), modelaram alterações gerando os peptídeos IAVE, IVAE, YAVE e YVAE que obtiveram novos IC_{50} de 75, 52, 44 e 41 μ M, respectivamente. Contudo, é importante ressaltar que os peptídeos isolados e modelados descritos na literatura, visam, de modo geral, mimetizar a estrutura das estatinas a fim de obter maiores inibições.

Neste trabalho, o foco não foi isolar nem modelar miméticos das estatinas, e sim moléculas passíveis de atuar no mesmo sítio destas ou ainda em outros sítios da HMGR, sem igualar as características estruturais. Nos peptídeos aqui descritos, foram priorizadas uma busca maior de interações polares com menor ênfase no grupo volumoso apolar das estatinas (figura 5). Apesar do grupo apolar das estatinas estar descrito como um dos responsáveis por sua elevada atividade, o substrato natural da HMGR, o HMG-CoA (figura 5), não possui grupo volumoso hidrofóbico (ISTVAN e DEISENHOFER, 2001; CAMPO e CARVALHO, 2007).

Também deve ser considerado a ocorrência de efeitos adversos das estatinas e a limitação para o uso destas em terapias combinadas. Sendo assim, mimetizar estatinas incorreria em maiores riscos de gerar as mesmas limitações destes fármacos, conflitando com o propósito central deste estudo.

Ainda que a monoterapia possa controlar algumas dislipidemias, a estratégia de terapias combinadas se faz necessária para o tratamento de pacientes de alto risco, portadores de dislipidemias mistas e com síndrome metabólica. No entanto, as prescrições devem ser antevistas de uma análise minuciosa dos riscos e possíveis interações medicamentosas. Isto é necessário devido aos efeitos adversos relacionados a associação das estatinas com outros fármacos para o tratamento de dislipidemias.

Por exemplo, no caso da hiperlipidemia mista familiar o quadro clínico se caracteriza por uma resistência à insulina, níveis baixos de HDL, níveis altos TG e colesterol total, causando um alto risco cardiovascular. Nesses casos, a terapia combinada das estatinas com sequestradores de ácidos biliares ou ezetimiba

pode ser necessária para se alcançar os níveis indicados de LDL. Assim como, os níveis elevados de TG e baixos de HDL também devem ser corrigidos, para tanto é necessária a combinação das estatinas com fibratos. Contudo, o uso concomitante de estatinas com fibratos aumentam o risco de hepatotoxicidade e do desenvolvimento de miopatias mais graves, tais como a rabdomiólise. Assim pacientes com problemas renais ou hepáticos, idosos e aqueles que fazem uso de múltiplos medicamentos, não devem utilizar terapia combinada estatina-fibrato. Além disso, as miopatias induzidas pelo uso das estatinas, são responsáveis por reduzir significativamente a adesão dos pacientes ao tratamento (SCHULZ, 2006; FALUDI et al., 2017; PRÉCOMA et al., 2019).

Assim sendo, estudar moléculas que naturalmente são produzidas durante nossa alimentação e que possam vir a contornar estas limitações são de grande importância no contexto atual. Neste intuito, Ferreira e colaboradores (2012) avaliaram *in vivo* o efeito da terapia combinada entre a proteína β -conglucina da soja, fenofibrato e rosuvastatina em ratos hiperlipidêmicos. A combinação proteína-fenofibrato mostrou diferenças significativas no colesterol sérico total e na HDL, além de uma redução de 20,6 % dos níveis hepáticos de TG. Já a combinação proteína-rosuvastatina, propiciou um aumento de 23 % na HDL. Isto evidencia o efeito positivo e promissor da associação de peptídeos e fármacos para os tratamentos de dislipidemias.

6. CONCLUSÕES

A estratégia de identificar e produzir derivados de peptídeos originados da proteína do feijão-caupí a partir de simulações *in silico* demonstrou-se eficiente. Por meio da triagem *in silico* foi possível identificar os peptídeos naturais QGF e MPNY que possuíam indicativo de atividade inibitória da enzima HMGR. Sequencialmente, foram desenhados novos peptídeos derivados do QGF, MPNY e GCTLN.

A síntese de peptídeos em fase sólida possibilitou a obtenção de todos os peptídeos naturais e seus derivados com ótimos rendimentos. Por meio das técnicas cromatográficas e espectroscópicas foi possível purificar e caracterizar eficientemente todos os peptídeos sintetizados.

Os ensaios *in vitro* mostraram que os novos peptídeos desenhados, pGlu-GF e GSTLN, possuíam maiores percentuais de inibição (54,28 % e 27,14 %, respectivamente). Os ensaios combinados destes, evidenciou o potencial terapêutico dos peptídeos, tanto associados as estatinas quanto combinados entre si. Estes peptídeos podem vir a contribuir com soluções para problemas terapêuticos relacionados aos efeitos adversos e a adesão ao tratamento de dislipidemias.

Diante desse cenário, é possível afirmar que os peptídeos originados da hidrólise enzimática da proteína do feijão-caupí possuem atividade inibitória da enzima HMGR.

Neste trabalho foi mostrado que peptídeos originados da hidrólise de proteínas oriundas de fontes naturais e recorrentes na alimentação humana, podem ser potentes alternativas na obtenção de compostos ativos contra várias doenças humanas, neste caso a hipercolesterolemia. Somado a isso, os peptídeos desenhados neste estudo se apresentam como moléculas promissoras para desenvolvimento novos fármacos e terapias combinadas para o tratamento de dislipidemias.

REFERÊNCIAS

1HW9. PDB. NLG Viewer. ROSE, A. S.; BRADLEY, A. R.; VALASATAVA, Y.; DUARTE, J. M.; PRLIĆ, A.; ROSE, P. W. NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. **Bioinform.** v. 34, n. 21, p. 3755–3758, 2018.

AKESON, W. R.; STAHMANN, M. A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **J Nut.** v. 83, n. 3, p. 257-261, 1964.

ALLRED, A. L. Electronegativity values from thermochemical data. **J Inorg Nucl Chem.** v. 17, p. 215-221, 1961.

ALSINA, J.; ALBERICIO, F. Solid-phase synthesis of C-terminal modified peptides. **Biopol Pep Sci.** v. 71, p. 454–477, 2003.

AMAR, M. J. A.; REMALEY, A. T. **New peptide promoting lipid efflux via ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and activating lipoprotein lipase, useful for treating or inhibiting a dyslipidemic or vascular disorder.**

Depositante: US DEPT HEALTH&HUMAN SERVICES (USSH-C); REMALEY A T (REMA-Individual); AMAR M J A (AMAR-Individual). WO2009129263-A1. 2008.

AMARAL, A. L.; FERREIRA, E. S.; NEVES, V. A.; DEMONTE, A. Legumin from chickpea: hypolipidemic effect in the liver of hypercholesterolemic rats. **Nutr Food Sci.** v. 44, n. 5, p. 378-388, 2014.

AMARAL, A. L.; FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; NEVES, V. A.; DEMONTE, A. The Vicilin protein (*Vigna radiata* L.) of mung bean as a functional food: Evidence of “*in vitro*” hypocholesterolemic activity. **Nutr Food Sci.** v. 47, n. 6, p. 907-916, 2017.

AMENGUAL, J. Bioactive Properties of Carotenoids in Human Health. **Nutr.** v. 11, n. 10, 2019.

ANDERSON, J. W.; BUSH, H. M. Soy protein effects on serum lipoproteins: a quality assessment and meta-analysis of randomized, controlled studies. **J Am Coll Nutr.** v. 30, n. 2, p. 79-91, 2011.

AWADE, A. C.; CLEUZIAT, P.; GONZALES, T.; BAUDOUY, J. R. Pyrrolidone carboxyl peptidase (Pcp): An enzyme that removes pyroglutamic acid (pGlu) from pGlu-peptides and pGlu-proteins. **Prot Struc Func Gen.** v. 20, p. 34-51, 1994.

AWIKA, J. M.; DUODU, K. G. Bioactive polyphenols and peptides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their health promoting properties: A review. **J Funct Foods.** v. 38, p. 686-697, 2017.

BAHEKAR, R.; JAIN, M. R.; PATEL, P. R. **New isolated peptidomimetics are glucagon receptor antagonists, useful for e.g. treating diseases including hyperlipidemia, hypercholesterolemia, hyperglycemia, hyperinsulinemia, impaired glucose tolerance and insulin resistance.** Depositante: CADILA HEALTHCARE LTD (CDLA-C); CADILA HEALTHCARE LTD (CDLA-C); BAHEKAR R (BAHE-Individual); JAIN M R (JAIN-Individual); PATEL P R (PATEIndividual). WO2011048614-A2. 2009.

BAIK, I.; CHO, N. H.; KIM, S. H.; SHIN, C. Dietary information improves cardiovascular disease risk prediction models. **Eur J Clin Nut.** v. 67, p. 25-30, 2013.

BASTING, R. T. Avaliação da associação do extrato bruto diclorometânico de frutos de *Pterodon pubescens Benth.* e do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. **Tese de Doutorado.** Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

BASTOS, E. A.; SILVA, K. J. D.; ROCHA, M. M.; MENEZES-JÚNIOR, J. A. N.; SILVA, P. H. S.; SOBRINHO, C. A.; FONTES, J. R. A. **A cultura do feijão-caupí no Brasil.** Teresina. Embrapa meio-norte. 2016. 71p.

BERNAUD, F. S. R.; RODRIGUES, T. C. Fibra alimentar – Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. **Arq Bras Endocr Metab.** v. 57, n. 6, p. 397-405, 2013.

BIANCHI, E.; PESSI, A.; INGENITO, R.; WANG, J.; CARBALLO-JANE, E.; CHANG, C. H.; CHANG, C. **New apolipoprotein A-I (ApoA-I) peptide mimetic derived from the sequence of the ApoA-1 consensus peptide, useful for increasing reverse cholesterol efflux in a patient, and for treating hypercholesterolemia and cardiovascular disease.** Depositante: MERCK & CO INC (MERI-C); IST RICERCHE BIOL MOLECOLARE ANGELETTI (ISTR-C); MERCK SHARP & DOHME CORP (MERI-C); BIANCHI E (BIAN-Individual); PESSI A (PESS-Individual); INGENITO R (INGE-Individual); WANG J (WANGIndividual); CARBALLO-JANE E (CARB-Individual); CHANG C H (CHAN-Individual). WO2008156873-A2. 2007.

BIELICKI, J. K.; JOHANSSON, J. **New isolated peptide having cholesterol efflux activity, comprising an amino acid sequence that is amphipathic alpha-helix that has a non-polar surface and a polar surface, useful e.g. for treating a symptom of atherosclerosis and diabetes.** Depositante: UNIV CALIFORNIA (REGC-C). WO2016044177-A1. 2014.

BIELICKI, J. K.; JOHANSSON, J. **Synthesizing oxidation-resistant polypeptide having cholesterol efflux activity, by synthesizing peptide containing amphipathic alpha-helix**. Depositante: UNIV CALIFORNIA (REGC-C). WO2011139819-A2. 2010.

BIELICKI, J. K.; JOHANSSON, J.; DANHO, W. **New isolated polypeptide having cholesterol efflux activity, useful in composition for e.g. preventing and/or treating e.g. atherosclerosis, comprises amphipathic alpha-helix having nonpolar surface and polar surfaces**. Depositante: UNIV CALIFORNIA (REGC-C); BIELICKI J K (BIEL-Individual); JOHANSSON J (JOHA-Individual); DANHO W (DANH-Individual). WO2014144708-A1. 2013.

BRITO, E. S. **Feijão-caupí**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2008. 97p.

BRUNNER, S.; GALABOVA, G.; WINSAUER, G.; BILCIKOVA, E.; JUNO, C.; LINZMAYER-HIRT, P.; SCHUH, B.; STAFFLER, G. **Vaccine useful for treating or preventing disorders caused by hyperlipidemia, hypercholesterolemia or atherosclerosis, preferably cardiovascular diseases, stroke or peripheral vascular diseases, comprises peptide**. Depositante: AFFIRIS AG (AFFI-C). EP3409770-A2. 2012.

CABRAL, C. E.; KLEIN, M. R. S. T. Phytosterols in the treatment of hypercholesterolemia and prevention of cardiovascular diseases. **Arq Bras Cardiol**. v. 109, n. 5, p. 475-482, 2017.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Quim Nova**. v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas. **Quim Nova**. v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CHAVARRÍA, D.; ESPARZA, V.; POZOS, A. Pharmacological synergism: A multimodal analgesia approach to treat dental pain. **Int J Dent Sc**. v. 1, n. 21, p. 10-14, 2019.

CHELIUS, D.; JING, K.; LUERAS, A.; REHDER, D. S.; DILLON, T. M.; VIZEL, A.; RAJAN, R. S.; LI, T.; TREUHEIT, M. J.; BONDARENKO, P. V. Formation of pyroglutamic acid from N-Terminal glutamic acid in immunoglobulin gamma antibodies. **Anal Chem.** v. 78, p. 2370-2376, 2006.

CHEN, J.; CHEN, J. W. **Preventing, arresting, reversing or treating atherosclerosis, or preventing or treating inflammatory cardiovascular disease or disorder, by administering macrophage inflammatory protein-1-beta (MIP-1-beta) inhibitor.** Depositante: UNIV NAT YANG MING (UYMN-C); TAIPEI VETERANS GEN HOSPITAL (TAIP-Non-standard); VIVASOLIS BIOTECHNOLOGY CO LTD (VIVA-Non-standard); HUANG C (HUAN-Individual). WO2019033040-A1. 2017.

CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; SAYERS, E. W. GenBank. **Nucl Ac Res.** v. 44, p. D67-D72, 2016.

CONSONNI, A.; LOVATI, M. R.; PAROLARI, A.; MANZONI, C.; MORAZZONI, P. Heterologous expression and purification of the soybean 7S globulin subunit extension region. **Prot Exp Purif.** v. 80, p. 125-129, 2011.

DIMARCHI, R. D.; FINAN, B.; YANG, B.; ZHU, Z. **New conjugate comprising glucagon-like peptide-1 agonist peptide, thyroid receptor ligand and linking group or bond joining peptide and ligand, useful for treating e.g. hyperlipidemia, diabetes, obesity and liver steatosis.** Depositante: UNIV INDIANA RES & TECHNOLOGY CORP (INDV-C). WO2017210100-A1. 2016.

DOYLE, J. J.; LUCKOW, M. S. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiol.** v. 131, p. 900-910, 2003.

FALUDI, A. A.; IZAR, M. C. O.; SARAIVA, J. F. K.; CHACRA, A. P. M.; BIANCO, H. T.; AFIUNE NETO, A.; et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. **Arq Bras Cardiol.** 2017.

FAO (2019). FAOSTAT. **Crops. Cow peas, dry.** Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso em: 23 de outubro de 2019.

FASSINI, P. G.; FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; NEVES, V. A.; DEMONTE, A. Soybean glycinin (11S) increases HDL-cholesterol in hypercholesterolemic rats. **Nut Food Sci.** v. 42, n. 2, p. 102-110, 2012.

FERREIRA, E. S. Efeito da proteína β -conglícinina da soja no metabolismo lipídico de animais submetidos à dieta hipercolesterolêmica. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.

FERREIRA, E. S. Vicilinas de leguminosas e seus efeitos no metabolismo lipídico de ratos dislipidêmicos. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2013.

FERREIRA, E. S.; AMARAL, A. L. S.; 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 Nut Sci.** v. 4, 2015.

FERREIRA, E. S.; CAPRARO, J.; SESSA, F.; MAGNI, C.; DEMONTE, A.; CONSONNI, A.; NEVES, V. A.; CILLI, E. M.; DURANTI, M.; SCARAFONI, A. New molecular features of cowpea bean (*Vigna unguiculata*, L. Walp) β -vignin. **Biosc Biotech Bioch.** v. 82, n. 2, p. 285-291, 2018.

FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. β -conglícinin combined with fenofibrate or rosuvastatin have exerted distinct hypocholesterolemic effects in rats. **Lip Heal Dise.** v. 11, n. 11, 2012.

FLORENTIN, M.; LIBEROPOULOS, E. N.; ELISAF, M. S. Ezetimibe-associated adverse effects: what the clinician needs to know. **Int J Clin Pract.** v. 62, n. 1, p. 88–96, 2008.

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 Chem.** v. 132, p. 1521–1526, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Food labeling: health claims; soybean protein and coronary heart disease.** v. 64, n. 206, p. 57700-57733, 1999.

FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupí no Brasil: Produção, melhoramento genético, avanços e desafios.** Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84p.

FREITAS, R. L.; TEIXEIRA, A. R.; FERREIRA, R. B. Characterization of the proteins from *Vigna unguiculata* seeds. **J Agri 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 Hosp.** v. 31, n. 4, p. 1611-1619, 2015.

FROTA, K.; MENDONÇA, S.; SALDIVA, R.; ARÊAS, J. Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. **J Food Sci.** v. 73, 2008.

GALABOVA, G.; STAFFLER, G.; BRUNNER, S.; WINSAUER, G.; MAIRHOFER, A.; JUNO, C. **Vaccine useful for treating and/or preventing disorders caused by hyperlipidemia, hypercholesterolemia and/or atherosclerosis, and stroke, comprises peptide which is variant of peptide comprising specific amino acid sequence.** Depositante: AFFIRIS AG (AFFI-C); AFFIRIS FORSCHUNGS & ENTWICKLUNGS GMBH (AFFI-Non-standard). WO2015128287-A1. 2014.

GALVEZ, A. F. **Inhibiting H3 acetylation by PCAF in a mammal comprises providing an amount of lunasin peptides to a mammal to inhibit PCAF from acetylating histone H3 in the mammal.** Depositante: GALVEZ A F (GALV-Individual); SOY LABS LLC (SOYS-Non-standard). WO2008034117-A2. 2006.

GULUM, A. H.; HUME, A. L. Statins: An update on clinical issues and selected adverse effects. **J Nurs Pract.** v. 11, n. 3, p.287-294, 2015.

HERNANDEZ, L. M. R.; MEJIA, E. G. Bean peptides have higher in silico binding affinities than ezetimibe for the N-terminal domain of cholesterol receptor Niemann-Pick C1 Like-1. **Peptides**. v. 90, p. 83-89, 2017.

HULCHER, F. H.; OLESON, W. H. Simplified spectrophotometric assay for microsomal HMG-CoA reductase by measurement of CoA. **J Lip Res**. v.14, n. 6, p. 625-631, 1973.

IQBAL, A.; KHALIL, I. A.; ATEEQ, N.; KHAN, M. S. Nutritional quality of important food legumes. **Food Chem**. v. 97, p. 331–335, 2006.

ISTVAN, E. S.; DEISENHOFER, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. **Sci**. v. 292, p. 1160-1164, 2001.

ISTVAN, E. S.; DEISENHOFER, J. The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase. **Bioch Biophys Act**. v. 1529, p. 9-18, 2000.

JAIN, M.; GIRI, S.; BAHEKAR, R.; GUPTA, G.; CHOPADE, R. **New peptide comprising specific amino acid sequence useful for treating health disorders chosen from hyperlipidemia, hypercholesterolemia, and atherosclerosis and other cardiovascular diseases**. Depositante: CADILA HEALTHCARE LTD (CDLA-C). WO2018189705-A1. 2017.

JAYATHILAKE, C.; VISVANATHAN, R.; DEEN, A.; BANGAMUWAGE, R.; JAYAWARDANA, B. C.; NAMMIC, S.; LIYANAGEA, R. Cowpea: an overview on its nutritional facts and health benefits. **J Sci Food Agric**. v. 98, p. 4793-4806, 2018.

KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Anal Bioch**, v. 34, n. 2, p. 595–598, 1970.

KAPRAVELOU, G.; MARTÍNEZ, R.; ANDRADE, A. M.; CHAVES, C. L.; LÓPEZ-JURADO, M.; ARANDA, P.; ARREBOLA, F.; CAÑIZARES, F. J.; GALISTEO, M.; PORRES, J. M. Improvement of the antioxidant and hypolipidaemic effects of cowpea flours (*Vigna unguiculata*) by fermentation: results of *in vitro* and *in vivo* experiments. **J Sci Food Agric**. v. 95, p. 1207–1216, 2015.

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

LAMMI, C.; ZANONI, C.; ARNOLDI, A.; VISTOLI, G. Two peptides from soy β -conglycinin induce a hypocholesterolemic effect in HepG2 cells by a statin-like mechanism: Comparative *in vitro* and *in silico* modeling studies. **J Agri Food Chem**. v. 63, p. 7945–7951, 2015.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinf**. v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 2007.

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 Funct Food**. v. 36, p. 18–26, 2017.

LIYANAGE, R.; PERERA, O.; LAKMINI, G. W. A. S.; WETHTHASINGHE, P.; VISVANATHAN, R.; JAYATHILAKE, C.; JAYAWARDANA, B. C.; VIDANARACHCHI, J.; SIVAKANESAN, R. Boiled, sprouted, and raw cowpea-incorporated diets modulate high-fat diet-induced hypercholesterolemia in rats. **Food Sci Nutr**. v. 6, p. 1762–1769, 2018.

LORENZON, E. N.; PICCOLI, J. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; CILLI, E. M. Dimerization of antimicrobial peptides: A promising strategy to enhance antimicrobial peptide activity. **Prot Pept Lett**. v. 26, n. 2, p. 98-107, 2019.

LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal. 2000. 343p.

MANCINI, G. B. J.; BAKER, S.; BERGERON, J.; FITCHETT, D.; FROHLICH, J.; GENEST, J.; GUPTA, M.; HEGELE, R. A.; NG, D.; PEARSON, G. J.; POPE, J.; TASHAKKOR, A. Y. Diagnosis, prevention, and management of statin adverse effects and intolerance: canadian consensus working group update. **Canadian J Cardi**. v. 32, n. 7, p. S35-S65, 2016.

MARQUES, M. R.; CERDA, A.; FONTANARI, G. G.; PIMENTA, D. C.; SOARES-FREITAS, R. M.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C.; ARÊAS, J. A. G. Transport of cowpea bean derived peptides and their modulator effects on mRNA expression of cholesterol-related genes in Caco-2 and HepG2 cells. **Food Res Int.** v. 107, p. 165-171, 2018.

MARQUES, M. R.; FONTANARI, G. G.; PIMENTA, D. C.; SOARES-FREITAS, R. M.; ARÊAS, J. A. G. Proteolytic hydrolysis of cowpea proteins is able to release peptides with hypocholesterolemic activity. **Food Res Inter.** v. 77, p. 43-48, 2015b.

MARQUES, R. M.; 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, 2015a.

MARVIN (version 19.17.0) **ChemAxon**, (<http://www.chemaxon.com>), 2019.

MCKENNEY, J. M. Pharmacologic characteristics of statins. **Clin Cardiol.** v. 26, p. III32–III38, 2003.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **J Am Chem Soc.** p. 2149-2154, 1963.

MINKIEWICZ, P.; DZIUBA, J.; IWANIAK, A.; DAREWICZ, M. BIOPEP: database for processing bioactive peptide sequences. **J AOAC Int.** v. 91, p. 965-980, 2008.

MONIZ, M. S.; MASCARENHAS, M. I.; ESCOBAR, C.; NUNES, P.; ABADESSO, C.; LOUREIRO, H.; ALMEIDA, H. Rabdomiólise como manifestação de uma doença metabólica: relato de caso. **Rev Bras Ter Intens.** v. 29, n. 1, p. 111-114, 2017.

MOONEY, C.; HASLAM, N. J.; POLLASTRI, G.; SHIELDS, D. C. Towards the improved discovery and design of functional peptides: Common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity. **PLoS ONE.** v. 7, n. 10, 2012.

NAGAOKA, T.; KANAMARU, Y. **Novel cholesterol reducing peptide I useful in reducing blood serum cholesterol level**. Depositante: MEIJI MILK PROD CO LTD (MEIP-C). JP2003238590-A.1999.

NCBI. In: Vicilin protein, partial-GenBank: CAP19902.1. **Nat Center Biotech Inf.** 2016.

NCEP - NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. Third report of NCEP expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. NIH Pub. Bethesda, **MD: National Heart, Lung, and Blood Institute**. 2002. 284p.

NELSON, D. L.; COX, M. **Principios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. São Paulo: Sarvier, 2014. 1328p.

OLIVEIRA, L. B.; CARVALHO, I. B.; ESCÓRCIO-DOURADO, C. S. M.; DOURADO, J. C. L.; NASCIMENTO, M. O. Prevalência de dislipidemias e fatores de risco associados. **J Heal Bio Sci**. v. 5, n. 4, p. 320-325, 2017.

PADHI, E. M. T.; RAMDATH, D. D. A review of the relationship between pulse consumption and reduction of cardiovascular disease risk factors. **J Funct Food**. v. 38, p. 635–643, 2017.

PAK, V. V.; KIM, S. H.; KOO, M.; KWON, D. Y. Peptide design of a competitive inhibitor for HMG-CoA reductase based on statin structure. **Biop**. v. 84, n. 6, p. 586-594, 2006.

PAK, V. V.; KOO, M.; KWON, D. Y; YUN, L. Design of a highly potent inhibitory peptide acting as a competitive inhibitor of HMG-CoA reductase. **Am Ac**. v. 43, n. 5, 2012.

PAULING, L. The nature of the chemical bond. IV. The energy of single bonds and the relative electronegativity. **J Am Chem Soc**. v. 54, n. 9, p. 3570-3582, 1932.

PICCOLI, J. P. Validação de monocamadas peptídicas auto-organizadas com marcador redox no desenvolvimento de imunossensores capacitivos. **Tese de**

Doutorado. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2019.

PRÉCOMA, D. B.; OLIVEIRA, G. M. M.; SIMÃO, A. F.; DUTRA, O. P.; COELHO, O. R.; IZAR, M. C. O; et al. Atualização da Diretriz de Prevenção Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia – 2019. **Arq Bras Cardiol.** 2019.

PURWAHA, P.; SILVA, L. P.; HAWKE, D. H.; WEINSTEIN, J. N.; LORENZI, P. L. An artifact in LC-MS/MS measurement of glutamine and glutamic acid: In-source cyclization to pyroglutamic acid. **Anal Chem.** v. 86, p. 5633-5637, 2014.

PyMOL. **The PyMOL Molecular Graphics System**, Version 2.3.2 Schrödinger, LLC. 2019.

REMALEY, A.; SCHWENDEMAN, A.; TURNER, S. **Pharmaceutical formulation used e.g. for treating hypercholesterolemia, hyperlipidemia, cardiovascular disease e.g. atherosclerosis, and restenosis (e.g. atherosclerotic plaques), comprises apolipoprotein mimetic peptide 5A and phospholipid.** Depositante: KINEMED INC (KINE-Non-standard); REMALEY A (REMA-Individual); SCHWENDEMAN A (SCHW-Individual); TURNER S (TURN-Individual); US DEPT HEALTH & HUMAN SERVICES (USSH-C). WO2016019333-A1. 2014.

RIGAMONTI, E.; PAROLINI, C.; MARCHESI, M.; DIANI, E.; BRAMBILLA, S.; SIRTORI, C. R.; CHIESA, G. Hypolipidemic effect of dietary pea proteins: Impact on genes regulating hepatic lipid metabolism. **Mol Nutr Food Res.** v. 54, p. S24-S30, 2010.

ROELL, K. R.; REIF, D. M.; MOTSINGER-REIF, A. A. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy - Perspectives from across disciplines. **Front Pharmacol.** v. 8, 2017.

SANTOS-NETO, A. J. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida – parte 4. **Sci Chromat.** v. 2, n. 3, p. 61-67, 2010.

SBC - SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **Cardiômetro:** Mortes por doenças cardiovasculares no Brasil. Rio de Janeiro. 2019.

SCARAFONI, A.; MAGNI, C.; DURANTI, M. Molecular nutraceuticals as a mean to investigate the positive effects of legume seed proteins on human health. **Tren Food Sci Techn.** v. 18, p. 454-463, 2007.

SCHULZ, I. Tratamento das dislipidemias – Como e quando indicar a combinação de medicamentos hipolipemiantes. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 50, n. 2, p. 344-359, 2006.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Bioactive peptides. **J AOAC Int.** v. 91, n. 4, p. 914-931, 2008.

SILVA, J. R. Desenvolvimento e validação de metodologia para a determinação de resíduos do antibiótico cloranfenicol em diferentes matrizes alimentícias. **Dissertação de Mestrado.** Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

SILVA, M. B. C.; SOUZA, C. A. C.; PHILADELPHO, B. O.; CUNHA, M. M. N.; BATISTA, F. P. R.; SILVA, J. R.; DRUZIAN, J. I.; CASTILHO, M. S.; CILLI, E. M.; FERREIRA, E. S. *In vitro* and *in silico* studies of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitory activity of the cowpea Gln-Asp-Phe peptide. **Food Chem.** v. 259, p. 270-277, 2018.

SLOW, H. L.; LIM, T. S.; GAN, C. Y. Development of a workflow for screening and identification of α -amylase inhibitory peptides from food source using an integrated bioinformatics-phage display approach. **Food Chem.** v. 214, p. 67-76, 2017.

SIRCAR, J. C.; ALISALA, K.; NIKOULIN, I. **New peptides useful as modulators of reverse cholesterol transport for treatment of e.g. hyperlipidemia, coronary heart disease, atherosclerosis, Alzheimer's disease, diabetes, metabolic syndrome, septic shock, obesity, and stroke.** Depositante: AVANIR PHARM (AVAN-Non-standard). WO2006049597-A1. 2004.

SIRTORI, C. R.; GALLI, G.; ANDERSON, J. W. Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention. **Ath.** v. 203, p. 8-17, 2009.

STONE, N. J.; ROBINSON, J. G.; LICHTENSTEIN, A. H.; BAIREY MERZ, C. N.; BLUM, C. B.; ECKEL, R. H.; GOLDBERG, A. C.; GORDON, D.; LEVY, D.; LLOYD-JONES, D. M.; MCBRIDE, P.; SCHWARTZ, J. S.; SHERO, S. T.; SMITH, S. C. Jr.; WATSON, K.; WILSON, P. W. F. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **Circul.** 2014.

SWIRSKI, F. K.; NAHRENDORF, M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. **Scien.** v. 339, p. 161-166, 2013.

TACO. **Tabela brasileira de composição de alimentos.** Nepa: Núcleo de estudos e pesquisas em alimentação. UNICAMP. Campinas. 2011. 161p.

THOMPSON, P. D.; PANZA, G.; ZALESKI, A.; TAYLOR, B. Statin-associated side effects. **J Am Col Cardiol.** v. 67, n. 20, p. 2395-2410, 2016.

TRABELSI, H.; BOUABDALLAH, S.; SABBAH, S.; RAOUAFI, F.; BOUZOUITA, K. Study of the *cis-trans* isomerization of enalapril by reversed-phase liquid chromatography. **J Chromat A.** v. 871, p. 189–199, 2000.

TRABUCO, L. G.; LISE, S.; PETSALAKI, E.; RUSSELL, R. B. PepSite: prediction of peptide-binding sites from protein surfaces. **Nucl Acids Res.** v. 40, p. 423-426, 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, n. 2, p. 455-461, 2010.

UNIPROT. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucl Ac Res.** v. 45, n. D1, p. D158–D169, 2017.

WAGNER, D. H.; YUSSMAN, M. G.; HENRY, C. W. **Preventing atherosclerosis comprises administering peptide that affects interaction of cluster of differentiation (CD)40 with CD154/CD40-ligand.** Depositante: OP-T LLC (OPTO-Non-standard). WO2019136307-A1. 2017.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Data global status report on non-communicable diseases 2010**: 1.Chronic disease-prevention and control. 2. Epidemiology. 3.Mortality. 4.Cost of illness. 5.Delivery of health care. Geneva. 2011.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals**. Geneva: World Helth Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2018.

WIERZBICKI, A. S. Lipid-lowering therapies in development. **Exp Opin Invest Drugs**. v. 13, n. 11, p. 1405-1418, 2004.

XAVIER, H. T. Farmacologia do fibratos. **Arq Bras Card**. v. 85, p. 15-16, 2005.

YANG, Y.; WANG, N.; ZHANG, Y.; WANG, W. **Hypotensive and hypolipidemic lipid bifunctional dipeptide TE useful for reducing blood pressure and for reducing blood fat**. Depositante: Univ Zhejiang Shuren. CN103739665-A. 2013.

YANG, Y.; WANG, N.; ZHANG, Y.; WANG, W. **New dipeptide QE useful in preparation of angiotensin-converting-enzyme and/or 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase inhibitory peptides for reducing blood pressure and blood fat, comprises specific amino acid sequence**. Depositante: Univ Zhejiang Shuren. CN103739666-A. 2013.

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.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Estudos preliminares para obtenção de peptídeos da 7S do feijão-caupí, posteriormente substituídos pelas simulações *in silico*.

Inicialmente o trabalho tinha como estratégia metodológica para identificar os peptídeos ativos na fração 7S as seguintes etapas:

- Isolar a fração proteica 7S do feijão-caupí;
- Produzir e caracterizar hidrolisados oriundos de simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* a partir da proteína de interesse;
- Fracionar grupos de peptídeos por faixas massa molecular e avaliar a capacidade de inibir a HMGR *in vitro*;
- Isolar peptídeos majoritários oriundos das frações acima que apresentarem atividade comprovada;
- Investigar entre os peptídeos majoritários a capacidade de inibição enzimática da HMGR *in vitro*;
- Sequenciar e caracterizar os peptídeos com inibição atestada;

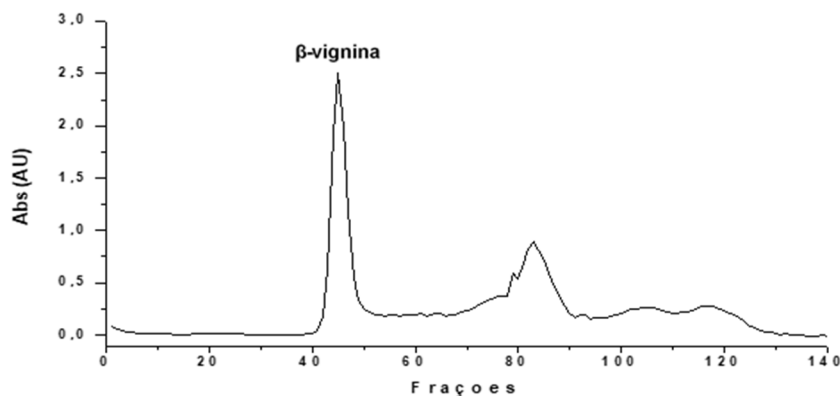
Sendo assim, as sementes do feijão-caupí (*Vigna unguiculata*, L) foram obtidas e os grãos selecionados foram hidratados e, manualmente, separados do epicarpo. Seguidamente as sementes foram desidratadas e pulverizadas para posterior isolamento e purificação da proteína 7S.

A β -vignina (proteína 7S do caupí) foi obtida segundo os procedimentos descritos por Ferreira e colaboradores (2015). Após a extração, a β -vignina foi purificada por cromatografia de permeação em gel (GPC) conforme figura 24.

A purificação da β -vignina foi avaliada por eletroforese SDS-PAGE conforme método descrito por Laemmli (1970). O perfil eletroforético obtido (figura 25a) foi similar ao perfil obtido por Ferreira (2013) (figura 25b), apresentando as mesmas bandas principais. Avaliando os dados obtidos (figura 25a) observa-se que a fração purificada se encontra com dois polipeptídios majoritários entre 45 e 66 kDa e mais quatro frações peptídicas minoritárias, uma próxima a 66 kDa e três entre 30 e 21 kDa. Estes resultados corroboram com os postulados por Freitas e colaboradores (2004) e Ferreira e colaboradores (2018) que

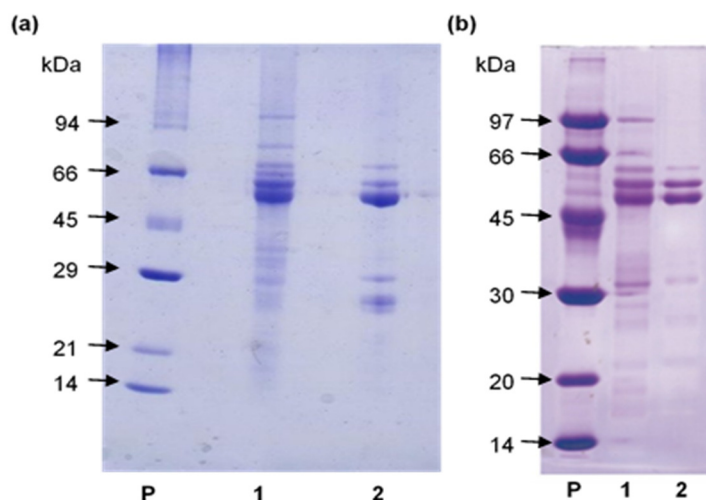
descreveram a β -vignina como sendo constituída de dois principais polipeptídios de 55 e 60 kDa, e outros quatro menores com 66, 30, 24 e 22 kDa.

Figura 24. Cromatograma do extrato proteico do feijão-caupí obtido por GPC Sepharose CL-6B (100 x 1,0 cm), eluição isocrática com tampão fosfato de potássio (10 mmol/L) contendo NaCl (0,5 mol/L) e azida sódica (0,01 %) sob um fluxo de 0,45 mL/min. Detecção UV a 280 nm.



Fonte: Próprio autor.

Figura 25. Perfis SDS-PAGE do feijão-caupí. (a) Resultados obtidos neste estudo. (b) Figura extraída de Ferreira (2013).



P, padrões de diferentes massas moleculares; 1, Isolado proteico total; 2, β -vignina purificada.

Fonte: Próprio autor.

Após o processo de purificação, a proteína 7S do caupí foi hidrolisada de acordo com o procedimento proposto por Akeson e Stahman (1964), onde a proteína 7S foi submetida à ação sequencial das enzimas pepsina e pancreatina simulando, assim, o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*.

Segundo dados da literatura os peptídeos 3 a 20 resíduos de aminoácidos gerados na digestão gastrointestinal podem modular o metabolismo do colesterol

(SHAHIDI e ZHONG, 2008; FERREIRA et al., 2015). Dentre os possíveis mecanismos apontados à ação destes oligopeptídeos, sugere-se a inibição da atividade da HMGR (MARQUES et al., 2015b; SILVA et al., 2018; JAYATHILAKE et al., 2018).

Inicialmente o hidrolisado obtido a partir da β -vignina continha todos os oligo e polipeptídeos oriundos deste processo. A separação dos oligopeptídeos de interesse foi obtida utilizando membranas de ultrafiltração, fracionando os peptídeos em maiores que 30 kDa, entre 30-10 kDa, entre 10-3 kDa e menores do que 3 kDa, de acordo como descrito por Zhong e colaboradores (2007).

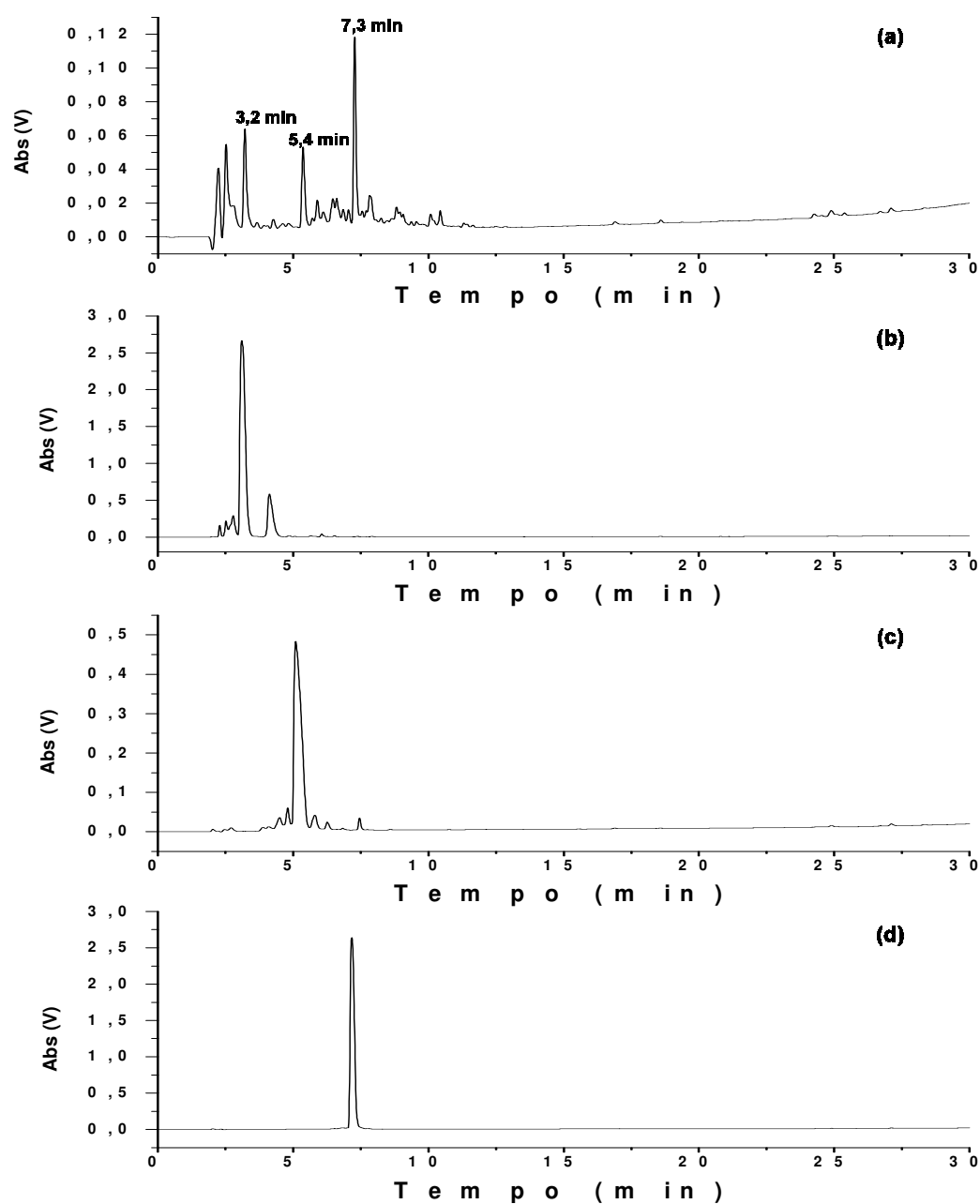
Dentre as frações obtidas, os peptídeos menores que 3 kDa foram destinados para etapas de purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa. A figura 26a demonstra o perfil bruto dos peptídeos menores que 3 kDa oriundos da hidrólise da proteína 7S do feijão-caupí. No cromatograma do perfil bruto (figura 26a), obtido por CLAE em escala analítica, destacam-se três picos majoritários em aproximadamente 3,2; 5,4 e 7,3 min. A partir deste perfil foi realizada a purificação por CLAE em escala semipreparativa em busca de obter esses três picos majoritários purificados. Com isso obteve-se os perfis destacados nas figuras 26b, 26c e 26d que correspondem, respectivamente, aos três picos majoritários vistos no perfil bruto (figura 26a).

Analisando os resultados obtidos na etapa de purificação, nota-se que os extratos isolados dos picos de 3,2 e 5,4 min (figuras 26b e 26c) ainda possuem outros compostos contaminantes, ao contrário do extrato obtido do pico de 7,3 min (figura 26d) que demonstra estar purificado. Apesar de o pico de 7,3 min ser o de maior intensidade no perfil bruto (figura 26a), após a liofilização de seu extrato purificado a massa obtida foi ínfima, estando em um valor menor que 0,1 mg. Considerando os extratos isolados e liofilizados dos picos de 3,2 e 5,4 min constatou-se que estes renderam massas ainda menores que a do pico de 7,3 min, isto inviabilizou a tentativa de um processo de repurificação dos mesmos.

O extrato purificado obtido do pico de 7,3 min (figura 26d) foi submetido à análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL/EM), a fim de avaliar qual era massa molecular do peptídeo purificado (figura 27). Através do espectro de massas obtido (figura 27) foi constatado que o peptídeo purificado possui uma massa molecular de aproximadamente 386 Da (massa do íon molecular = 387,3). Este dado vai ao encontro com o descrito na literatura,

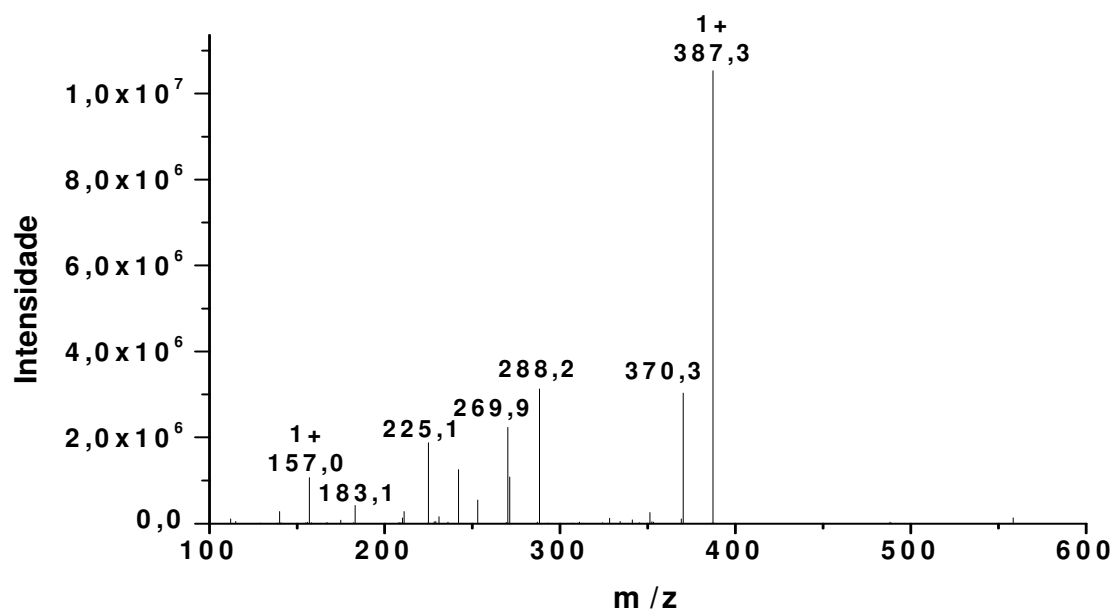
onde peptídeos com atividade de inibição da HMGR possuem massa molecular entre 231 e 1257 Da (PAK et al., 2006; SILVA et al., 2018; MARQUES et al., 2018).

Figura 26. Cromatogramas dos peptídeos obtidos da hidrólise da proteína 7S do feijão-caupí obtido por CLAE Analítico C18 (15 x 0,46 cm), detecção UV a 220 nm. (a) Perfil bruto dos peptídeos menores de 3 kDa. (b) Perfil isolado correspondente ao pico de 3,2 min. (c) Perfil isolado correspondente ao pico de 5,4 min. (d) Perfil isolado correspondente ao pico de 7,3 min.



Fonte: Próprio autor.

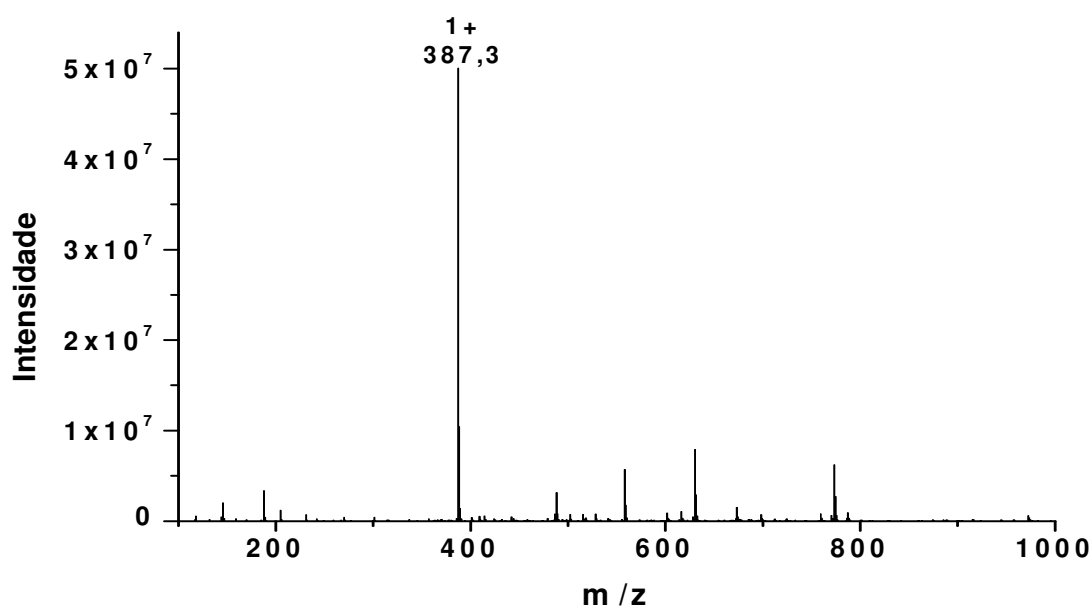
Figura 27. Espectro de massas deconvoluído do peptídeo purificado obtido da análise por CL/EM do extrato purificado do peptídeo de 7,3 min obtido pela hidrólise da proteína 7S do feijão-caupí.



Fonte: Próprio autor.

Em busca de sequenciar o peptídeo purificado foi realizada a injeção direta do mesmo no espectrômetro de massas para obter seu espectro de fragmentação (MS/MS) (figura 28).

Figura 28. Espectro de fragmentação (MS/MS) do peptídeo purificado com massa molar de 386 Da.



Fonte: Próprio autor.

Segundo Cantú e colaboradores (2008), para estudos de sequenciamento de peptídeos por espectrometria de massas, primeiramente é necessário identificar os íons diagnóstico do aminoácido da posição terminal. Para tanto, é necessário o conhecimento prévio do tipo de digestão que originou o peptídeo em estudo para assim conhecer qual o ponto de quebra da enzima envolvida no processo da digestão proteica.

Sendo assim, para estudos de sequenciamento de peptídeos por espectrometria de massas indica-se uma hidrólise proteica com tripsina, pois esta possui como pontos de quebra em resíduos de lisina e/ou arginina no lado carbonílico. Neste estudo, foi realizada uma digestão com as enzimas pepsina e pancreatina. Neste caso, a pepsina teria como pontos de quebra em resíduos de leucina, fenilalanina, triptofano e tirosina localizados no lado amino. Ao passo que para a pancreatina, devido a mesma ser constituída de uma mistura de enzimas (lipases, amilases e proteases) o ponto de quebra é desconhecido (CANTÚ et al., 2008; NELSON e COX, 2014).

Considerando questões como o baixo rendimento em massa dos peptídeos hidrolisados purificados (menor que 0,1 mg) e a dificuldade em obter o sequenciamento dos peptídeos, as alternativas *in silico* foram adotadas em relação ao método inicial de obtenção dos peptídeos hidrolisados da proteína 7S do caupí. A estratégia de triagem por ensaios *in silico* demonstrou ser uma ferramenta eficiente para identificação, caracterização e desenvolvimento de novos peptídeos bioativos. A triagem *in silico* propiciou uma redução de tempo e custos na execução do trabalho, além de garantir um processo mais limpo e com menores impactos ambientais.