

MARIANA BARROS DE CERQUEIRA E SILVA

**Avaliação da capacidade de peptídeos oriundos da hidrólise da proteína
 β -vignina na modulação do metabolismo lipídico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Orientador

Prof. Dr. Ederlan de Souza Ferreira

Coorientador

Araraquara

2022

S586a	Silva, Mariana Barros de Cerqueira e Avaliação da capacidade de peptídeos oriundos da hidrólise da proteína beta-vignina na modulação do metabolismo lipídico / Mariana Barros de Cerqueira e Silva. -- Araraquara, 2022 125 f. : il. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara Orientador: Eduardo Maffud Cilli Coorientador: Ederlan de Souza Ferreira 1. Hipercolesterolemia. 2. Leguminosa. 3. Globulinas. 4. Peptídeos. 5. Inibidores enzimáticos. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

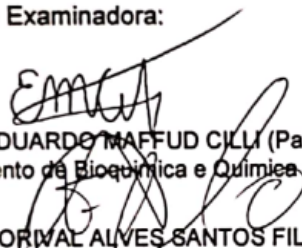
TÍTULO DA TESE: "Avaliação da capacidade de peptídeos oriundos da hidrólise da proteína -vignina na modulação do metabolismo lipídico."

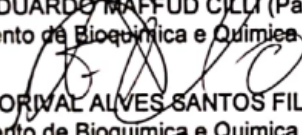
AUTORA: MARIANA BARROS DE CERQUEIRA E SILVA

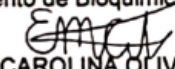
ORIENTADOR: EDUARDO MAFFUD CILLI

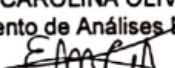
COORIENTADOR: EDERLAN DE SOUZA FERREIRA

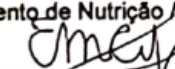
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. NORIVAL ALVES SANTOS FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. CAROLINA OLIVEIRA DE SOUZA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Bromatológicas / Universidade Federal da Bahia - UFBA - Salvador


Prof. Dr. THAÍS SOUZA PASSOS (Participação Virtual)
Departamento de Nutrição / Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN - Natal


Dra. THAMIRES QUADROS FRÓES (Participação Virtual)
Universidade de São Paulo - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 06 de junho de 2022

DADOS CURRICULARES

Nome

Mariana Barros de Cerqueira e Silva

Nome em citações bibliográficas

SILVA, M. B. C; SILVA, MARIANA BARROS DE CERQUEIRA E; CERQUEIRA E SILVA, MARIANA BARROS DE; SILVA, Mariana Barros de Cerqueira; SILVA, MARIANA; DE CERQUEIRA E SILVA, MARIANA BARROS

Endereço profissional

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Química,
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica
Rua Professor Francisco Degni, 55
Jardim Quitandinha, Araraquara, São Paulo

Endereço eletrônico

marianabarros.cs@gmail.com

mariana.barros@unesp.br

Formação acadêmica/titulação

2018

Doutorado em Biotecnologia

Instituto de Química/UNESP – Araraquara, São Paulo, Brasil

Título: Avaliação da capacidade de peptídeos oriundos da hidrólise da proteína β -vignina na modulação do metabolismo lipídico.

Orientador: Eduardo Maffud Cilli

Coorientador: Ederlan de Souza Ferreira

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2015 – 2017

Mestrado em Ciência de Alimentos

Faculdade de Farmácia/UFBA – Salvador, Bahia, Brasil

Título: Avaliação de hidrolisados proteicos e peptídeos derivados da β -vignina do feijão-caupí, sobre a atividade da HMG-CoA redutase *in silico* e *in vitro*. Ano de obtenção: 2017.

Orientador: Ederlan de Souza Ferreira

Bolsista: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

2010 – 2015

Graduação em Farmácia

Universidade Federal da Bahia/UFBA – Salvador, Bahia, Brasil

Título: Pesquisa de Aflatoxinas em amostras de puba regionais

Orientadora: Maria da P. Spínola Miranda

Formação Complementar

2021 - 2021

Curso de curta duração em Introdução aos métodos de QSAR no planejamento de fármacos (Carga horária: 6 horas).

Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil.

2020 – 2020

Curso de curta duração em Urgências e emergências cardiovasculares na atenção básica (Carga horária: 30 horas).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil.

2020 – 2020

Curso de curta duração em Vírus respiratórios emergentes, incluindo o COVID19 (Carga horária: 4 horas).

Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde, OPAS/OMS, Brasil.

2020 – 2020

Curso de curta duração em Reconhecendo sobrepeso e obesidade no contexto da atenção primária à saúde (Carga horária: 30 horas).

Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brasil.

2019 – 2019

Curso de curta duração em Capacitação no uso e manejo de animais de laboratório (Carga horária: 60 horas).

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.

2019 – 2019

Curso de curta duração em Vacinação contra febre amarela (Carga horária: 2 horas).

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil.

2019 – 2019

Curso de curta duração em Cuidado à pessoa com multimorbidade e polimedicamentos (Carga horária: 45 horas).

Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil.

2018 – 2018

Curso de curta duração em Ciência de animais de laboratório (Carga horária: 8 horas).

Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, Brasil.

2015 – 2015

Extensão universitária em Monitoria da disciplina de métodos físicos de análises (Carga horária: 68 horas).

Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil.

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

2015 – 2015

Curso de curta duração em Boas práticas em serviços de alimentação (Carga horária: 12 horas).

Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, Brasil

2014 – 2014

Extensão universitária em Monitoria da disciplina de bioquímica de alimentos (Carga horária: 34 horas).

Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil.

2014 – 2014

Curso de curta duração em Nanotecnologia (Carga horária: 8 horas).

Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil.

2014 – 2014

Extensão universitária em Monitoria da ACCS: Melhoria da qualidade de alimentos (Carga horária: 68 horas).

Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil.

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

2013 – 2013

Extensão universitária em ACC: Melhoria da qualidade de alimentos (Carga horária: 68 horas).

Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil.

2013 – 2013

Curso de Inglês (Carga horária: 680 horas).

Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil.

2012 – 2012

Curso de curta duração em Cosméticos capilares: Do produto ao negócio (Carga horária: 8 horas).

Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil.

Atuação profissional

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

2018 – Atual

Vínculo: Aluna, bolsista. Enquadramento funcional: Doutoranda

Especificação: Bolsa CAPES

Sociedade de Educação e Promoção Social Imaculada Conceição – Externato Santa Teresinha – SEPSIC-EST

2020 – 2020

Vínculo: Profissional autônomo. Enquadramento funcional: Professora substituta de química

Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial – SENAC

2019 – 2019

Vínculo: Professor – Prestador de Serviço

Outras informações: Curso Profissionalizante de Balconista de Farmácia: Módulo de cálculos farmacêuticos

2017 – 2017

Vínculo: Professor – Prestador de Serviço

Outras informações: Curso Profissionalizante de Balconista de Farmácia: Práticas de atendente de farmácia

Universidade Federal da Bahia - UFBA**2015 – 2017**

Vínculo: Aluna bolsista. Enquadramento funcional: Mestranda

Especificação: Bolsa FAPESB

2013 – 2014

Vínculo: Aluna bolsista. Enquadramento funcional: Bolsista PIBIC/UFBA

2012 – 2013

Vínculo: Aluna bolsista. Enquadramento funcional: Bolsista PIBIC/CNPq

2011 - 2012

Vínculo: Aluna bolsista. Enquadramento funcional: Bolsista PIBIC/CNPq

Martins Brasil Indústria de Cosméticos LTDA – MB**2015 – 2015**

Vínculo: Estágio

Projetos de Pesquisa**2018 – Atual**

Propriedades físico-químicas e nutricionais do fruto de piaçava produzido no baixo sul baiano, a fim de viabilizar a produção de novos produtos para fins alimentares.

2017 – 2021

Prospecção de peptídeos bioativos oriundos da proteína beta-vignina dos feijões caupí (*Vigna unguiculata* L.) e adzuki (*Vigna angularis* Willd.).

2016 – Atual

Propriedade antitumoral de hidrolisados proteicos oriundos da glicinina (11S) e beta-conglicinina (7S), sobre diferentes linhagens, in vitro.

2016 – Atual

Avaliação da incorporação de isolados proteicos e nanocargas de amido no desenvolvimento de filmes bionanocompósitos destinados ao setor de embalagens.

2013 – 2014

Avaliação de bioativos em alimentos regionais

2011 – 2013

Isolamento de leveduras da região do vale do São Francisco:
Estudo da fermentação em mosto de uva

Prêmios e títulos

2021

Menção honrosa ao trabalho “Effects of the cowpea Gln-Asp-Phe peptide daily administration in rats fed a saturated high-fat diet”, First Canadian Peptide and Protein Community Virtual Symposium.

2019

Menção honrosa ao trabalho “Soybean beta-conglycinin peptide exerts 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl Coenzyme A reductase inhibitory activity”, 1st CIAPep – Ibero-American Congress on Bioactive Peptides

2015

Menção honrosa ao trabalho “Peptides derived from the soybean conglycinin exert hypocholesterolemic activity by inhibiting the HMG-CoA reductase”, 11º SLACA – Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos.

Produção Bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

- DA SILVA, JAFF RIBEIRO; DE CERQUEIRA E SILVA, MARIANA BARROS; PHILADELPHO, BIANE OLIVEIRA; DE SOUZA, VICTÓRIA CRUZ; DOS SANTOS, JOHNNIE ELTON MACHADO; CASTILHO, MARCELO SANTOS; DE SOUZA FERREIRA, EDERLAN; CILLI, EDUARDO MAFFUD. PyrGF and GSTLN peptides enhance pravastatin's inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme. **Food Bioscience**. v. 44. p. 101451, 2021.

- SILVA, MARIANA; PHILADELPHO, BIANE; SANTOS, JOHNNIE; SOUZA, CAIO; SANTIAGO, VICTÓRIA; SILVA, JAFF; SOUZA, CAROLINA; AZEREDO, FRANCINE; CASTILHO, MARCELO; CILLI, EDUARDO; FERREIRA, EDERLAN. IAF, QGF and QDF peptides exhibit cholesterol-lowering activity through a statin-like HMG-CoA reductase regulation mechanism: *In silico* and *in vitro* approach. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, p. 11067, 2021.
- PHILADELPHO, BIANE; SOUZA, VICTÓRIA; SOUZA, FABIANI; SANTOS, JOHNNIE; BATISTA, FABIANA; SILVA, MARIANA; CAPRARO, JESSICA; DE BENEDETTI, STEFANO; HEINZL, GIUDITTA C.; CILLI, EDUARDO; SCARAFONI, ALESSIO; MAGNI, CHIARA; FERREIRA, EDERLAN. Chromatography-independent fractionation and newly identified molecular features of the adzuki bean (*Vigna angularis* Willd.) β -vignin protein. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, p. 3018, 2021.
- SILVA, A. B. C.; SILVA, M. B. C.; SILVEIRA, P. T. S.; MARQUES, E. L. S.; SOARES, S. E. Extraction and determination of invertase and polyphenol oxidase activities during cocoa fermentation. **Brazilian Journal of Development**. v. 7, p. 80316 – 80330, 2021.
- AMORIM, FREDERICO LOPES; SILVA, MARIANA BARROS DE CERQUEIRA; CIRQUEIRA, MARINA GONÇALVES; OLIVEIRA, ROSEANE SANTOS; MACHADO, BRUNA APARECIDA SOUZA; GOMES, RAQUEL GUTIERRES; DE SOUZA, CAROLINA OLIVEIRA; DRUZIAN, JANICE IZABEL; FERREIRA, EDERLAN DE SOUZA; UMSZA'GUEZ, MARCELO ANDRÉS. Grape peel (*Syrah* var.) jam as a polyphenol-enriched functional food ingredient. **Food Science & Nutrition**. p. 1 – 11, 2019.
- DEUS, VALTERNEY LIMA; CERQUEIRA E SILVA, MARIANA BARROS DE; MACIEL, LEONARDO FONSECA; MIRANDA, LUCAS CALDEIRÃO RODRIGUES; HIROOKA, ELISA YOKO; SOARES, SÉRGIO EDUARDO; FERREIRA, EDERLAN DE SOUZA; BISPO, ELIETE DA SILVA. Influence of drying methods on cocoa (*Theobroma cacao* L.): Antioxidant activity and presence of ochratoxin A. **Ciência e Tecnologia de Alimentos (Online)**. p. 1 – 8, 2018.
- 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-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitory activity of the cowpea Gln-Asp-Phe peptide. **Food Chemistry**. v.259, p.270 - 277, 2018.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

- CUNHA, M. M. N.; SILVA, M. B. C.; BATISTA, F. P. R.; CRUZ, N. P.; SOUZA, C. A. C.; FERREIRA, E. S. Avaliação experimental de hidrolisados proteicos da glicinina da soja sobre a atividade da HMG-CoA redutase. In: **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, X CIGR, VI International Technical Symposium**, Gramado, 2016.
- SILVA, M. B. C.; MIRANDA, M. P. S. Pesquisa de aflatoxinas em amostras de puba da mesoregião metropolitana de Salvador – Bahia. In: **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, X CIGR, VI International Technical Symposium**, Gramado, 2016.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

- SILVA, M. B. C.; SILVA, J. R.; BRASIL, M. C. O. A.; PHILADELPHO, B. O.; SOUZA, V. C.; SANTOS, J. E. M.; LEÃO, R. M.; COUTO, R. D.; AZEREDO, F. J.; CASTILHO, M. S.; FERREIRA, E. S.; CILLI, E. M. Effects Of The Cowpea Gln-Asp-Phe Peptide Daily Administration in Rats Fed A Saturated High-Fat Diet. In: **First Canadian Peptide and Protein Community Virtual Symposium**, 2021.
- PHILADELPHO, B. O.; SILVA, M. B. C.; SANTIAGO, V. G.; ALMEIDA, L. M.; REIS, V. L. S.; SANTOS, J. E. M.; FONTES, D. L.; De GRANDIS, R. A.; PAVAN, F. R.; FERREIRA, E. S. Inhibition of breast, liver and prostate cancer cell proliferation by cowpea derived peptide fractions: An in vitro investigation. In: **First Canadian Peptide and Protein Community Virtual Symposium**, 2021.
- CUNHA, M. M. N.; PHILADELPHO, B. O.; SOUZA, V. C.; SANTOS, J. E. M.; SILVA, J. R.; DRUZIAN, J. I.; CASTILHO, M. S.; CILLI, E. M.; SILVA, M. B. C.; FERREIRA, E. S. Soybean β -conglycinin peptide exerts 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl Coenzyme A reductase inhibitory activity. In: **1st CIAPep – Ibero-American Congress on Bioactive Peptides**, Campinas, 2019.

- PHILADELPHO, B. O.; SANTOS, J. E. M.; SOUZA, V. C.; De GRANDIS, R. A.; SILVA, C. F. G.; ALMEIDA, L. B.; DRUZIAN, J. I.; CASTILHO, M. S.; CILLI, E. M.; PAVAN, F. R.; SILVA, M. B. C.; FERREIRA, E. S. Cowpea β -vignin peptide fractions inhibit human breast cancer cell proliferation. In: **1st CIA Pep – Ibero-American Congress on Bioactive Peptides**, Campinas, 2019.
- SATILIO, D. F.; PHILADELPHO, B. O.; CUNHA, M. M. N.; SOUZA, V. C.; SOUZA, C. A. C.; SILVA, M. B. C.; SANTOS, J. E. M.; CILLI, E. M.; FERREIRA, E. S.; PAVAN, F. R. Selective cytotoxicity of β -conglycinin and glycinin hydrolysates from soybean against liver, prostate and breast cancer cell lines. In: **1st CIA Pep - Ibero-American Congress on Bioactive Peptides**, Campinas, 2019.
- SOUZA, V. C.; PHILADELPHO, B. O.; SANTOS, J. E. M.; SANTOS, T. L.; OLIVEIRA, E. M. M.; SILVA, J. R.; DRUZIAN, J. I.; CILLI, E. M.; SILVA, M. B. C.; CASTILHO, M. S.; FERREIRA, E. S. In silico study of adzuki PRO-GLN-LEU peptide inhibitory activity over the 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl Coenzyme A reductase. In: **1st CIA Pep - Ibero-American Congress on Bioactive Peptides**, Campinas, 2019.
- SOUZA, V. C.; PHILADELPHO, B. O.; SANTOS, J. E. M.; SILVA, M. B. C.; CILLI, E. M.; CASTILHO, M. S.; FERREIRA, E. S. Análise do acoplamento de peptídeos oriundos da proteína β -vignina do feijão adzuki, com o sítio ativo da HMG-CoA, in silico. In: **Congresso de Pesquisa e Extensão da UFBA**, Salvador, 2019.
- STARTERI, M. C.; PHILADELPHO, B. O.; SILVA, C. F. G.; SILVA, M. B. C.; FERREIRA, E. F. Desenvolvimento e caracterização de um produto tipo “hambúrguer” à base de soja. In: **Congresso de Pesquisa e Extensão da UFBA**, Salvador, 2019.
- SILVA, D. M. S.; SANTOS, J. E. M.; SOUZA, V. C.; BATISTA, F. P. R.; SOUZA, C. O.; SILVA, M. B. C.; PHILADELPHO, B. O.; FERREIRA, E. S. Extração, fracionamento e caracterização de proteínas da amêndoa do coco de piaçava *Attalea funifera* Mart. In: **Congresso de Pesquisa e Extensão da UFBA**, Salvador, 2019.
- SANTOS, J. E. M.; SOUZA, V. C.; PHILADELPHO, B. O.; SILVA, M. B. C.; FERREIRA, E. S. Caracterização de hidrolisados proteicos oriundos da proteína β -vignina do feijão-adzuki (*Vigna angularis* Will). In: **Congresso de Pesquisa e Extensão da UFBA**, Salvador, 2019.

- SOUZA, V. C.; PHILADELPHO, B. O.; SILVA, M. B. C.; SILVA, J. R.; CILLI, E. M.; DRUZIAN, J. I.; CASTILHO, M. S.; 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 UFBA**, Salvador, 2018.
- SOUZA, C. A. C.; SILVA, M. B. C.; PHILADELPHO, B. O.; CUNHA, M. M. N.; BATISTA, F. P. R.; SILVA, J. R.; DRUZIAN, J. I.; CILLI, E. M.; CASTILHO, M. S.; FERREIRA, E. S. Análise do acoplamento de peptídeos oriundos da proteína beta-vignina do feijão caupí, com sítio ativo da HMG-CoA in silico. In: **Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFBA**, Salvador, 2018.
- SILVA, M. B. C.; PHILADELPHO, B. O.; SOUZA, V. C.; BATISTA, F. P. R.; PAVAN, F. R.; CILLI, E. M.; DRUZIAN, J. I.; CASTILHO, M. S.; FERREIRA, E. S. Proteína beta-vignina do feijão caupí (*Vigna unguiculata*) hidrolisada por diferentes sistemas enzimáticos gera hidrolisados com atividade citotóxica sobre linhagens tumorais in vitro. In: **Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFBA**, Salvador, 2018.
- SILVA, J. R.; SILVA, M. B. C.; CASTILHO, M. S.; 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**, Joinville, 2018.
- SOUZA, V. C.; SILVA, M. B. C.; BATISTA, F. P. R.; SOUZA, C. A. C.; DRUZIAN, J. I.; FERREIRA, E. S. Extração, isolamento e caracterização por SDS-PAGE da proteína 7S (vicilina) do feijão adzuki (*Vigna angularis* Willd.). In: **Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFBA**, Salvador, 2017.
- CRUZ, N. P.; BATISTA, F. P. R.; SILVA, M. B. C.; DRUZIAN, J. I.; FERREIRA, E. S. Extração, fracionamento e caracterização da fração proteica oriunda da amêndoa do coco piaçava (*Attalea funifera* Mart). In: **Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFBA**, Salvador, 2017.
- SOUZA, C. A. C.; SILVA, M. B. C.; DRUZIAN, J. I.; FERREIRA, E. S. Inibição da enzima HMG-CoA redutase por diferentes frações peptídicas oriundas da proteína β -vignina do feijão-caupí. In: **Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFBA**, Salvador, 2017.
- CUNHA, M. M. N.; PHILADELPHO, B. O.; SOUZA, C. A. C.; SILVA, M. B. C.; DRUZIAN, J. I.; CASTILHO, M. S.; FERREIRA, E. S. Triagem *in silico* de peptídeos

derivados da β -conglucininina com predição de interação/encaixe no sítio da HMG-CoA redutase. In: **Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFBA**, Salvador, 2017.

- BATISTA, F. P. R.; SILVA, M. B. C.; FERREIRA, E. S.; DRUZIAN, J. I. Compostos voláteis de fibras de maçã-de-elefante (*Dillenia indica*). In: **V Simpósio de Inovação na Indústria de Alimentos e I Simpósio de Biotecnologia Industrial**, Salvador, 2017.
- SILVA, M. B. C.; SOUZA, C. A. C.; CUNHA, M. M. N.; PHILADELPHO, B. O.; SILVA, J. R.; DRUZIAN, J. I.; CASTILHO, M. S.; 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**, Campinas, 2017.
- SILVA, M. B. C.; SOUZA, C. A. C.; CUNHA, M. M. N.; DRUZIAN, J. I.; CASTILHO, M. S.; FERREIRA, E. S. Peptides derived from the cowpea beta-vignin exert hypocholesterolemic activity by inhibiting the HMG-CoA reductase. In: **12º SLACA – Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 2017.
- CRUZ, N. P.; MIRANDA, P. A.; BATISTA, F. P. R.; SILVA, M. B. C.; FERREIRA, E. S. Caracterização físico-química e composição dos minerais majoritários presentes na água obtida do coco verde e polpa do fruto seco de piaçava (*Attalea funifera* Mart.) do baixo sul baiano. In: **XXXV Semana de Farmácia da UFBA**, Salvador, 2016.
- SILVA, M. B. C.; ASSIS, D. J.; DEMONTE, A.; DRUZIAN, J. I.; FERREIRA, E. S. Peptide fractions from glycinin hydrolyzed by pepsin/pancreatin inhibit the HMG-CoA reductase activity *in vitro*. In: **2º Simpósio Nacional Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura – Qualidade Nutricional e Processamento Alimentar**, Lisboa, 2015.
- CUNHA, M. M. N.; SILVA, M. B. C.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A.; CILLI, E. M.; FERREIRA, E. S. Peptides derived from the soybean conglycinin exert hypocholesterolemic activity by inhibiting the HMG-CoA reductase. In: **11º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 2015.
- PINHEIRO, C. G.; SILVA, M. B. C.; MIRANDA, M. P. S. Antioxidant activity and phenolic content of red and white grapes skins (*Vitis vinifera* L.) extracts, from

grapes of São Francisco Valley. In: **X Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**, Aracaju, 2014.

- SILVA, M. B. C.; PINHEIRO, C. G.; MIRANDA, M. P. S. Determinação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de *Genipa americana* L. In: **X Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**, Aracaju, 2014.
- SILVA, M. B. C.; MIRANDA, M. P. S. Determinação da atividade antioxidante e ácidos fenólicos de *Genipa americana* L. por CLAE. In: **Semana de Arte, Cultura, Ciência e Tecnologia da UFBA, XXXIII Seminário Estudantil de Pesquisa e XV Seminário de Pesquisa e Pós-graduação**, Salvador, 2014
- SILVA, M. B. C.; MAMEDE, M. E. O. Avaliação da composição química de mosto de uva antes e após o processo fermentativo. In: **Semana de Arte, Cultura, Ciência e Tecnologia da UFBA**, Salvador, 2013.
- MAMEDE, M. E. O.; SILVA, M. B. C. Discriminação de vinhos produzidos por dois tipos de fermentação. In: **III Simpósio Internacional de Plantas Medicinais e Nutracêuticos**, Aracaju, 2012.
- SILVA, M. B. C.; MAMEDE, M. E. O. Avaliação da composição química de mosto de uva antes e após o processo fermentativo. In: **Semana de Arte, Cultura, Ciência e Tecnologia da UFBA**, Salvador, 2012.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

- SANTOS, J. E. M.; ALMEIDA, L. B.; PHILADELPHO, B. O.; SILVA, M. B. C.; SANTIAGO, V. G.; FERREIRA, E. S. Screening de peptídeos com afinidade para o domínio BH3 da proteína antiapoptótica BCL2. In: **II Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia – Desafios para a Ciência e Tecnologia no Mundo Contemporâneo**, 2021.
- PHILADELPHO, B. O.; SANTIAGO, V. G.; SILVA, M. B. C.; De GRANDIS, R. A.; PAVAN, F. R.; FERREIRA, E. S. Hidrolisados derivados de proteínas da soja causam citotoxicidade em células de carcinoma de próstata, in vitro. In: **I Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia – Um Mundo em Constante Transformação**, 2020.
- SANTOS, J. E. M.; SANTIAGO, V. G.; PHILADELPHO, B. O.; SILVA, M. B. C.; CILLI, E. M.; FERREIRA, E. S. Peptídeos derivados da beta-vignina do feijão-adzuki apresentam afinidade de ligação ao receptor de colesterol NIEMANN-PICK C1

LIKE-1, *in silico*. In: **I Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia – Um Mundo em Constante Transformação**, 2020.

- CUNHA, M. M. N.; SILVA, M. B. C.; FERREIRA, E. S. Hidrolisados proteicos oriundos da proteína β -conglucina exercem atividade hipocolesterolêmica, através da inibição da HMG-CoA redutase, *in vitro*. In: **XXXIV Semana de Farmácia da UFBA**, Salvador, 2015.
- SILVA, M. B. C.; MIRANDA, M. P. S.; MAMEDE, M. E. O. Avaliação Sensorial e físico-química de vinhos produzidos por períodos diferentes de fermentação. In: **IV Congresso Latino Americano de Analistas de Alimento**, São Paulo, 2013.

Depósito de Patentes

- SEVERINO, P.; SANTOS, A. L. S.; ITRI, R.; BIANCONI, M. L.; BARBOSA, L. R. S.; CRUZ, M. S. P.; FERREIRA, E. S.; SILVA, M. B. C.; SOUTO, E. M. B.; BATISTA, F. P. R.; SOUZA, C. A. C.; ALMEIDA, T. S.; SOARES, C. M. F.; SILVA, L. N.; PEREIRA, M. M. **Processo de Obtenção de Hidrolisados Proteicos Oriundos do Feijão Caupí e seu uso como Antimicrobiano**. Depositantes: Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes e Universidade do Rio de Janeiro. BR 10 2020 026873 2. Depósito: 29 de dezembro de 2020.
- SILVA, J. R.; CILLI, E. M.; SILVA, M. B. C.; PHILADELPHO, B. O.; FERREIRA, E. S.; CASTILHO, M. S.; SOUZA, V. C. **Peptídeos Sintéticos, Análogos aos do Feijão Caupí, com a Atividade de Inibição da Enzima HMG-CoA Redutase**. Depositantes: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho e Universidade Federal da Bahia. BR 10 2020 020310 0. Depósito: 02 de outubro de 2020.

Orientações concluídas e em andamento

Dissertação de mestrado concluída: Coorientação

- Biane Oliveira Philadelpho. **Atividade antiproliferativa de hidrolisados proteicos e frações peptídicas derivadas da proteína da soja e do feijão-caupí, sobre linhagens tumorais, *in vitro***. 2021. Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos – Universidade Federal da Bahia.
Instituição Financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia

Dissertação de mestrado em andamento: Coorientação

- Tamires Lopes dos Santos. **Estudo *in silico* e *in vitro* da capacidade antioxidante de peptídeos derivados da proteína beta-vignina do feijão adzuki (*Vigna angularis* Willd.).** Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos – Universidade Federal da Bahia.
Instituição Financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia

Trabalhos de Conclusão de Curso Graduação: Coorientação

- Caio Alexandre da Cruz Souza. **Efeito inibitório de peptídeos derivados da proteína β -vignina sobre a atividade da HMG-CoA redutase, *in silico* e *in vitro*.** 2020. Farmácia – Universidade Federal da Bahia.
- Marianne Callado Starteri Sampaio. **Desenvolvimento e caracterização de um produto tipo “hambúrguer” à base de soja.** 2019. Farmácia – Universidade Federal da Bahia.
- Biane Oliveira Philadelpho. **Hidrolisados derivados da beta-vignina (*Vigna unguiculata*) exercem citotoxicidade sobre linhagens tumorais *in vitro*.** 2018. Farmácia – Universidade Federal da Bahia.
- Mariana Mota Novais da Cunha. **Ação inibitória de hidrolisados da proteína β -conglícinina sobre a atividade enzimática da HMG-CoA *in vitro*.** 2016. Farmácia – Universidade Federal da Bahia.
- Fabiani Pazelli de Moura Souza. **Caracterização eletroforética da fração proteica de feijões do gênero *Vigna* cultivado na região Nordeste.** 2016. Farmácia – Universidade Federal da Bahia.

Organização de eventos

- XXXV Semana de Farmácia da UFBA e Simpósio de Ciência dos Alimentos, 2016.
- VI Simpósio de Ciências Farmacêuticas da UFBA, 2015.

Participação em bancas

Bancas de Conclusão de curso: Graduação

- BASSAN, J. C.; SILVA, M. B.C.; REMONATTO, D.

Participação em banca de Lívia Rangel Tsujimoto. **Hidrólise parcial da caseína e ovoalbumina utilizando a protease vegetal ficina: Determinação de atividade antioxidante e quelante de ferro**, 2022. Farmácia, Universidade estadual Paulista (UNESP).

- RAMBO, R. B. S.; SILVA, M. B. C.

Participação em banca de Márvia Cleyse Cunha Correia. **Avaliação de compostos bioativos e atividade antioxidante de condimentos e chás amplamente consumidos em Salvador-Ba**, 2019. Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

- SANTOS JUNIOR, B. N.; COSTA, F. B. C.; SILVA, M. B. C.

Participação em banca de Ninive de Aquino L. Andrade. **Análise do tempo de termoxidação do azeite de dendê por RMN e quimiometria**, 2018. Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

- FERREIRA, E. S.; SILVA, M. B. C.; CERQUEIRA, A. O.

Participação em banca de Victor Guimarães R. Veloso. **Peptídeos opióides derivados de alimentos**, 2018. Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

- MIRANDA, M. P. S.; SILVA, M. B. C.

Participação em banca de Mariana Scavello Andrade. **Pesquisa de aflatoxinas e nitratos em amostras de erva-cidreira, hortelã e canela adquiridas em feiras de Salvador**, 2017. Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Bancas de exame de qualificação de mestrado

- FERREIRA, E. S.; GUEZ, M. A. U.; SILVA, M. B. C.

Participação em banca de Jéssica Santiago Falcão. **Umbu (*Spondias tuberosa* Arr Cam) jelly added of Spirulina LEB-18 as a protein-enriched functional food**, 2019. Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos – Universidade Federal da Bahia (UFBA).

- FERREIRA, E. S.; SOARES, S. E.; SILVA, M. B. C.

Participação em banca de Ludmila Suzarte Marques dos Santos. **Propriedades químicas e atividade antioxidante do resíduo do processamento da amêndoa de cacau (*Theobroma cacao* L.)**, 2018. Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos – Universidade Federal da Bahia (UFBA).

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Ao meu orientador, professor Eduardo Maffud Cilli, e ao meu coorientador Ederlan de Souza Ferreira, pela orientação, incentivo, confiança, apoio, amizade e ensinamentos durante toda a trajetória;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Aos colegas e egressos do LASEBio (UNESP): Jaff, Maria Carolina Brasil, Sarah Brandão, Júlia, Paulo, Letícia, Natália, Alisson, Thainá e Norival, pela colaboração, acolhimento, convívio diário, amizade e por tornar meus dias mais alegres;

Aos colegas do LAPAAC (UFBA): Biane, Fabiana, Johnnie, Camila, Tamires, Jéssica, Gabrielle, Victória por todo apoio, companherismo e por serem parte essencial do trabalho e da vida;

Aos colegas e professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UNESP pelo convívio ao longo desses 4 anos;

Aos amigos de todos os momentos: Lene Nascimento, Caio Alexandre, Ene Vieira, Camila Pinheiro, Paula Maiana, Juliana Bassan, Daniela Remonato, pelo carinho incondicional;

A todos os funcionários do Instituto de Química da UNESP Araraquara;

A todos que contribuíram para que esse momento se concretizasse,

Muito obrigada.

“O amor me explicou tudo”

(São João Paulo II)

RESUMO

As doenças cardiovasculares (DCV) são a maior causa de mortalidade no mundo. Entre os processos dislipidêmicos, a hipercolesterolemia é o principal fator de risco para o desenvolvimento dessas doenças. As estatinas são o tratamento de primeira escolha, e embora sejam bem toleradas, apresentam diversos efeitos adversos. Por outro lado, peptídeos derivados de algumas proteínas, especialmente àquelas encontradas nos grãos de leguminosas têm mostrado exercer efeito redutor da concentração de colesterol plasmático. Em estudos anteriores, peptídeos derivados da proteína β -vignina do feijão-caupí diminuíram a atividade da enzima HMG-CoA redutase, *in vitro*. Nesse trabalho avaliamos a capacidade dos peptídeos MPNY, QDF e GSTLN e seus análogos e conjugados em regular o metabolismo lipídico *in silico* e *in vitro*. Os peptídeos MPNY e QDF também foram avaliados em ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Os peptídeos foram sintetizados, utilizando o método de síntese em fase sólida e purificados por FR-CLAE. A atividade de inibição enzimática foi avaliada em ensaios *in vitro*, utilizando kit HMG-CoA reductase assay. No estudo *in vivo*, os peptídeos e a sinvastatina foram administrados por via oral (10 mg/kg de peso) em ratos e os efeitos foram avaliados após 14 dias. A ingestão alimentar foi semelhante entre todos os grupos, com exceção ao grupo tratado com sinvastatina, que apresentou menor consumo e ganho de peso (16%). Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao HDL-C, contudo o grupo tratado com QDF apresentou menor concentração de triglicérides (-23%) comparado com o grupo controle sem tratamento, não havendo diferença na concentração de colesterol total. O grupo tratado com sinvastatina, comparado ao grupo controle, mostrou redução das concentrações de colesterol total (-21%) e triglicérides (-23%), mas apresentou aumento significativo (+27%) da concentração de glicose. Os dados ainda mostraram uma maior toxicidade da sinvastatina em relação aos dois peptídeos em linhagens tumorais HepG2 (hepatocarcinoma humano), Caco2 (carcinoma de cólon) e A204 (rabdomyossarcoma). Adicionalmente, análogos do QDF desenhados durante o projeto sozinhos e ligados covalentemente ao GSTLN demonstraram capacidade em inibir a HMG-CoA redutase *in silico* e *in vitro*. Os peptídeos NDY, pGluDF e pGluDF-espaçador1-GSTLN apresentaram IC₅₀ de 112,4, 95,50 e 54,96 μ M respectivamente. O pGluDF-espaçador1-GSTLN, que mostrou maior potência, sendo aparentemente capaz de inibir a enzima nos sítios catalíticos de ligação do substrato e no de ligação do NADPH. Os resultados demonstraram que peptídeos oriundos de leguminosas apresentam potencial hipocolesterolêmico e podem ser considerados novos compostos no desenvolvimento de moléculas com atividade hipocolesterolêmica e utilizado no tratamento das doenças cardiovasculares.

Palavras-chaves: hipercolesterolemia, leguminosa, globulinas, peptídeos, inibidores enzimáticos.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of mortality in the world. Among dyslipemic processes, hypercholesterolemia is the main risk factor for the development of these diseases. Statins are the treatment of choice, and although they are well tolerated, they have several adverse effects. On the other hand, peptides derived from some proteins, especially those found in legume grains, have been shown to exert a lowering effect on plasma cholesterol concentration. In previous studies, peptides derived from cowpea protein β -vignin decreased the activity of the enzyme HMG-CoA reductase, *in vitro*. In this work, we evaluated the ability of MPNY, QDF, GSTLN peptides, their analogues and conjugates to regulate lipid metabolism *in silico* and *in vitro*. MPNY and QDF peptides were also evaluated in rats fed a high-fat diet. The peptides were synthesized using the solid phase synthesis method and purified by FR-HPLC. The enzyme inhibition activity was evaluated in *in vitro* assays, using the HMG-CoA reductase assay kit. In the *in vivo* study, the peptides and simvastatin were administered orally (10 mg/kg body weight) to rats and the effects were evaluated after 14 days. Food intake was similar among all groups, with the exception of the group treated with simvastatin, which had lower consumption and weight gain (16%). There was no significant difference between the groups in relation to HDL-C, however the group treated with QDF had a lower concentration of triglycerides (-23%) compared to control group without treatment, with no difference in total cholesterol concentration. The simvastatin-treated group, compared to the control group, showed reduced concentrations of total cholesterol (-21%) and triglycerides (-23%), but showed a significant increase (+27%) in glucose concentration. The data also showed greater toxicity of simvastatin in relation to the two peptides in tumor cell lines HepG2 (human hepatocarcinoma), Caco2 (colon carcinoma) and A204 (rhabdomyosarcoma). Additionally, QDF analogues designed during the project alone and covalently linked to the GSTLN demonstrated the ability to inhibit HMG-CoA reductase *in silico* and *in vitro*. The peptides NDY, pGluDF and pGluDF-spacer1-GSTLN showed IC₅₀'s of 112.4, 95.50 and 54.96 μ M respectively. The pGluDF-spacer1-GSTLN, which showed greater potency, was apparently capable of inhibiting the enzyme in the catalytic sites of substrate binding and NADPH binding. The results showed that peptides from legumes have hypocholesterolemic potential and can be considered new compounds in the development of molecules with hypocholesterolemic activity and used in the treatment of cardiovascular diseases.

Keywords: hypercholesterolemia, legume, globulins, peptides, enzyme inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química do colesterol. Anéis derivados do núcleo de esteroides rotulados de A a D. O grupo hidroxila C3 corresponde à cabeça polar da estrutura.....	40
Figura 2 –	Etapas envolvidas na biossíntese do colesterol.....	41
Figura 3 –	Resumo da biossíntese do colesterol a partir de acetil-CoA.....	43
Figura 4 –	Estrutura cristalográfica da HMG-CoA redutase de classe I (PDB: 1QW9) (A) e classe II (PDB: 1T02) (B).....	44
Figura 5 –	Alinhamento das sequências da HMG-CoA redutase de <i>Homo sapiens</i> (NP_000850.1) e de <i>P. mevalonii</i> (1RRI-B), usando Clustal W 1.83. Sinal positivo (+): substituição conservada; Sinal negativo (-): substituição semi-conservada.....	45
Figura 6 –	Estrutura em fitas da HMG-CoA redutase humana. Vista frontal (A) e vista lateral (B) do tetrâmero HMG-CoA redutase humana.....	46
Figura 7 –	Estrutura em fitas do monômero da HMG-CoA redutase humana.....	47
Figura 8 –	Regulação da síntese de colesterol por SREBP.....	48
Figura 9 –	Estruturas químicas da HMG-CoA e da mevastatina.....	49
Figura 10 –	Estruturas químicas das estatinas inibidoras da HMG-CoA redutase.....	51
Figura 11 –	Perfis cromatográficos do peptídeo QDF (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido.....	69
Figura 12 –	Perfis cromatográficos do peptídeo MPNY (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido.....	70
Figura 13 –	Viabilidade de células da linhagem HepG2 frente à sinvastatina e aos peptídeos QDF e MPNY.....	72
Figura 14 –	Viabilidade de células da linhagem Caco2 frente à sinvastatina e aos peptídeos QDF e MPNY.....	72
Figura 15 –	Viabilidade de células da linhagem A204 frente à sinvastatina e aos peptídeos QDF e MPNY.....	73
Figura 16 –	Ganho de massa dos animais (<i>Rattus norvegicus</i>) em função do tempo de estudo.....	75

Figura 17 –	Ingestão de ração em grama por animal (<i>Rattus norvegicus</i>) em função do tempo de estudo.....	77
Figura 18 –	Colesterol total dos grupos dos animais (<i>Rattus norvegicus</i>) em 0, 7, 14 e 21 dias.....	78
Figura 19 –	HDL-colesterol dos grupos dos animais (<i>Rattus norvegicus</i>) em 0, 7, 14 e 21 dias.....	80
Figura 20 –	Triglicérides dos grupos dos animais (<i>Rattus norvegicus</i>) em 0, 7, 14 e 21 dias.....	81
Figura 21 –	Glicose total dos grupos dos animais (<i>Rattus norvegicus</i>) em 0, 7, 14 e 21 dias.....	82
Figura 22 –	Análise de docking da sinvastatina com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9). Posição (redocking) da sinvastatina obtida pela modelagem molecular (cinza) e existente na estrutura cristalográfica (amarela) (A) e das interação da sinvastatina no sítio ativo (B).....	84
Figura 23 –	Análise de docking do peptídeo QDF com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9). Sobreposição da estrutura da sinvastatina (cinza) e do peptídeo QDF (amarelo) obtidos por modelagem molecular (A) e de interação do peptídeo QDF no sítio ativo (B).....	85
Figura 24 –	Análise de docking do peptídeo QDY com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.....	86
Figura 25 –	Análise de docking do peptídeo NDF com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.....	88
Figura 26 –	Análise de docking do peptídeo NDY com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.....	89
Figura 27 –	Análise de docking do peptídeo pGluDF com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.....	91

Figura 28 –	Estruturas químicas dos peptídeos (β -Gln)DF (A), Q(Me-Asp)F (B), Q(β -Asp)F (C) e QD(Me-Phe).....	92
Figura 29 –	Análise de docking do peptídeo (β -Gln)DF com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.....	93
Figura 30 –	Análise de docking do peptídeo Q(Me-Asp)F com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.....	95
Figura 31 –	Análise de docking do peptídeo Q(β -Asp)F com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.....	96
Figura 32 –	Análise de docking do peptídeo QD(Me-Phe) com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.....	97
Figura 33 –	Análise de docking do peptídeo GSTLN com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.....	98
Figura 34 –	Estrutura química dos espaçadores ácido 2-[2-(amino)etoxi] etoxi-ácético (A) e 8-(amino)-ácido caprílico (B).....	99
Figura 35 –	Perfis cromatográficos do peptídeo QDY (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido.....	100
Figura 36 –	Perfis cromatográficos do peptídeo NDF (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido.....	101
Figura 37 –	Perfis cromatográficos do peptídeo NDY (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido.....	102
Figura 38 –	Perfis cromatográficos do peptídeo pGluDF (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido.....	103
Figura 39 –	Perfis cromatográficos do peptídeo QDFGSTLN (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido.....	104

Figura 40 –	Perfis cromatográficos do peptídeo pGluDFGSTLN (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido.....	105
Figura 41 –	Perfis cromatográficos do peptídeo QDF-Espaçador1-GSTLN (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido.....	106
Figura 42 –	Perfis cromatográficos do peptídeo pGluDF-Espaçador1-GSTLN (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido.....	107
Figura 43 –	Perfis cromatográficos do peptídeo QDF-Espaçador2-GSTLN (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido.....	108
Figura 44 –	Perfis cromatográficos do peptídeo pGluDF-Espaçador2-GSTLN (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido.....	109
Figura 45 –	Efeito dose/resposta dos peptídeos pGluDF, pGluDF-espaçador1-GSTLN e NDY sobre a atividade da enzima HMG-CoA redutase.0....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Gradiente de purificação dos peptídeos.....	61
Tabela 2 –	Composição da dieta experimental ofertada durante 21 dias.....	64
Tabela 3 –	Inibição da atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase.....	67
Tabela 4 –	Dados de purificação e caracterização dos peptídeos QDF e MPNY.....	68
Tabela 5 –	Inibição da atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase pelos peptídeos QDF e MPNY.....	71
Tabela 6 –	Energia de ligação dos peptídeos com o sítio catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9)	87
Tabela 7 –	Dados de purificação e caracterização dos análogos peptídicos do QDF e acoplados à sequência GSTLN.....	110
Tabela 8 –	Inibição da atividade da HMG-CoA redutase pelos análogos peptídicos do QDF e acoplados à sequência GSTLN.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA1 –	ATP binding cassette transporter A1 (Transportador de cassetes de ligação ao ATP A1)
ABCG8 –	ATP-binding cassette transporter G8 (Transportador de cassetes de ligação ao ATP G8)
ACAT –	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (Acetil-CoA acetiltransferase)
apoB –	Apolipoproteína B
ACC –	acetil-CoA carboxilase
ATP –	Adenosine triphosphate (adenosina trifosfato)
AVC –	Acidente vascular cerebral
C/EBP –	CCAAT/enhancer binding protein (proteínas de ligação ao intensificador de CCAAT)
CEUA –	Comissão de ética no uso de animais
CLAE –	Cromatografia líquida de alta eficiência
CYP7A1 –	Cholesterol 7 alpha-hydroxylase ou cytochrome P450 7A1 (colesterol 7 alfa-hidroxilase)
DCV –	Doenças cardiovasculares
DIC –	N,N-diisopropilcarbodiimida
DMEM –	Dulbecco modification of Minimum Essential Media
DMF –	N,N-dimetilformamida
EDT –	1,2-etanoditiol
EDTA –	ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
FDA –	Food and Drug Administration
Fmoc –	9-fluorenilmetiloxycarbonil
HDL-c –	High-density lipoprotein (Lipoproteína de alta densidade)
HMG-CoA –	β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA
HMG-CoAR –	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase
HOBt –	1-Hidroxibenzotriazol
IC ₅₀ –	Half maximal inhibitory concentration (Concentração inibitória média)
Insig –	Insulin-induced gene protein
FAS –	Fatty acid synthase (ácido graxo sintase)
LDL-c –	Low-density lipoprotein (Lipoproteína de baixa densidade)

LDLR –	Receptor de LDL
MMS –	Metilmetanosulfonato
mRNA –	Ribonucleic acid messenger (RNA mensageiro)
NADH –	Nicotinamide adenine dinucleotide (Dinucleótido de nicotinamida e adenina)
NADPH –	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina)
NCEP –	National Cholesterol Education Program
NPC1-L1 –	Niemann-Pick C1-Like 1 (Niemann-Pick C1 tipo 1)
PCSK9 –	Pró-proteína convertase subtilisina quexina tipo 9
PPAR –	Peroxisome proliferator-activated receptor (Receptor ativado por proliferador de peroxissoma)
SCAP –	SREBP cleavage-activating protein (Proteína ativadora da clivagem da SREBP)
SPFS –	Síntese de peptídeos em fase sólida
SREBP –	Sterol regulatory-element binding proteins (Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol)
t-Bu –	t-butil
TFA –	Ácido trifluoracético
TIS –	Triisopropilsilano
VLDL –	Very low-density lipoprotein (Lipoproteínas de densidade muito baixa)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	37
3.1 Doenças cardiovasculares	37
3.2 Hipercolesterolemia	38
3.3 Biossíntese do colesterol	40
3.4 HMG-CoA redutase	43
3.5 Tratamento farmacológico da hipercolesterolemia	48
3.6 Peptídeos hipocolesterolemiantes	52
4 MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1 Material botânico	59
4.2 Simulação da digestão gastrointestinal e fracionamento	59
4.3 Acoplamento molecular de peptídeos no sítio catalítico da HMG-CoA redutase	59
4.4 Síntese de peptídeos	59
4.5 Reação de clivagem	60
4.6 Purificação e caracterização dos peptídeos	61
4.7 Ensaio de inibição da enzima HMG-CoA redutase <i>in vitro</i>	61
4.8 Ensaios de viabilidade celular	62
4.9 Análise <i>in vivo</i>	63
4.10 Análise estatística	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1 Ensaio <i>in vitro</i> da inibição da HMG-CoA redutase por frações peptídicas	66
5.2 Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos	67
5.3 Ensaio <i>in vitro</i> da inibição da HMG-CoA redutase pelos peptídeos QDF e MPNY	71
5.4 Ensaios de viabilidade celular	71
5.5 Análise <i>in vivo</i>	73
5.6 Acoplamento molecular de peptídeos no sítio catalítico da HMG-CoA redutase	83
5.7 Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos análogos ao QDF	99
5.8 Ensaio <i>in vitro</i> da inibição da HMG-CoA redutase pelos peptídeos análogos	110
5.9 Determinação do IC ₅₀ dos peptídeos	112
6 CONCLUSÕES	114
REFERÊNCIAS	115
ANEXO	125

1 INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis que compreendem o câncer, diabetes, doenças pulmonares e cardiovasculares, são um dos principais desafios em saúde do século XXI, e coletivamente, representam a principal causa de morte em países desenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2018). Dentre essas patologias crônicas não transmissíveis, as doenças cardiovasculares (DCV) apresentaram a maior taxa de mortalidade nas últimas duas décadas e são consideradas um problema de saúde pública devido a eventos não fatais e danos patológicos associados (NAGAOKA, 2019; WHO, 2018). Além disso, isquemia, aterosclerose e infarto do miocárdio aumentam significativamente o número de mortes devido às doenças cardiovasculares, que poderá acometer 25 milhões de pessoas até 2030 (17 milhões em 2008). Previsões da “American Heart Association” indicam que até 2035, 45% da população terá alguma doença cardiovascular (AHA, 2019).

As dislipidemias são caracterizadas por elevados níveis plasmáticos de colesterol total e da LDL-c (Lipoproteína de baixa densidade), acompanhando ou não da diminuição da HDL-c (Lipoproteína de alta densidade). Esse desequilíbrio da homeostase do metabolismo do colesterol, representa o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, especialmente pelo aparecimento da aterosclerose (AHA, 2019). A existência de uma relação entre o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e a elevada concentração de colesterol no sangue é conhecida, sendo que a redução dos níveis plasmáticos de colesterol total e LDL-c são eficazes no controle do risco do desenvolvimento da enfermidade (SUN *et al.*, 2021; WIGGINS *et al.*, 2020).

Dessa forma, é necessário encontrar métodos eficazes para prevenção ou controle das dislipidemias, a fim de reduzir o risco de desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Embora o colesterol possa ser obtido a partir da dieta, a maior parte do colesterol no organismo, cerca de 70%, é sintetizada endogenamente, sendo que diversos fármacos com atividade hipocolesterolêmica têm como alvo principal a inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase). Essa proteína atua convertendo a HMG-CoA ao mevalonato, uma reação de oxidorredução envolvendo quatro elétrons e que é o passo limitante na síntese de colesterol e outros isoprenóides (KUMAR *et al.*, 2019; LAMMI *et al.*, 2019).

A HMG-CoA redutase está situada na membrana do retículo endoplasmático liso, é composta por 888 aminoácidos e dividida em três domínios principais. O

domínio âncora (aminoácidos 1-339) compreende a interação da enzima à membrana do retículo endoplasmático. O segundo domínio, o ligante (aminoácidos 339-459), une a região ligada a membrana ao terceiro domínio que contém a atividade catalítica (aminoácidos 459-888). Esse último domínio é subdividido em três subdomínios, o N (resíduos 460-527), que conecta a porção catalítica ao domínio ligante, o L (resíduos 682-888) corresponde a região de ligação ao substrato HMG-CoA e o S (resíduos 527-590), região de interação com o cofator NADPH (ISTVAN E DEISENHOFER, 2000; KUMAR *et al.*, 2019). Moléculas que se ligam aos domínios L ou S, ou a ambos, são consideradas inibidoras da atividade da enzima HMG-CoA redutase e hipocolesterolemiantes.

As estatinas, classe de fármacos inibidores competitivos da HMG-CoA redutase, são consideradas a primeira linha de compostos para o tratamento da hipercolesterolemia, com recomendação de terapia única ou combinada com outros fármacos que alterem o metabolismo de lipídeos, a depender do fator de risco apresentado pelo paciente (ALENGHAT; DAVIS 2019; BAYS, 2016). Embora as estatinas sejam medicamentos bem tolerados, o seu uso está associado a alguns efeitos adversos que incluem lesões da musculatura esquelética, diabetes mellitus, déficits cognitivos, dentre outros (DENG *et al.*, 2018). No entanto, a relação dos sintomas com o consumo das estatinas não é clara, estudos com pacientes em tratamento com estatinas demonstrou que 62% deles relataram interromper o tratamento devido a efeitos adversos (COHEN *et al.*, 2012).

Pesquisas atuais sugerem dietas a base de hortaliças, cereais integrais e leguminosas como fator de prevenção de diversas doenças crônicas degenerativas, em especial as doenças cardiovasculares (BOACHIE; YAO; UDENIGWE, 2018; FERREIRA *et al.*, 2015). Dentre os alimentos de origem vegetal, as leguminosas se destacam como fontes de proteínas que têm papel reconhecido na melhoria da saúde humana, estendendo sua importância além do valor nutricional e do fornecimento de aminoácidos (SHI *et al.*, 2019). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado os efeitos benéficos relacionados ao controle dos processos de hipercolesterolemia a partir da ingestão de proteínas de leguminosas (LAMMI; ARNOLDI; AIELLO, 2019; SHI *et al.*, 2019). Desde 1999, o FDA passou a recomendar a ingestão de 25 g/dia de proteína isolada de soja visando à redução do risco de DCV (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1999).

Dentre as leguminosas que se destacam como fontes proteicas, o feijão-caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) apresenta entre 18-30% de proteínas na sua constituição química. A fração proteica dessa semente é constituída por duas classes principais, as globulinas (70-85%) e albuminas (5-10%) que constituem praticamente 90% do conteúdo proteico total. As globulinas são as proteínas majoritárias nessa espécie, sendo a proteína do tipo vicilina ou 7S a principal em termos quantitativos. Essa proteína também denominada de β -vignina, constitui-se de um heterotrímero formado por duas subunidades polipeptídicas principais de 60 e 55 kDa glicosiladas, e outras menores não glicosiladas, e apresenta similaridade estrutural (sequência primária) com outras vicilinas, especialmente a subunidade α' da β -conglícinina da soja (*Glycine max*) (ALUKO *et al.*, 1997).

Um estudo randomizado com indivíduos hipercolesterolêmicos, mostrou que o consumo de 25 g/dia de isolado proteico total de feijão-caupí, foi capaz de promover, após 6 semanas, redução de 12% do colesterol total, 19% do LDL-c e o aumento de 2,7% de HDL-C, demonstrando o efeito benéfico do consumo dessa proteína (FROTA *et al.*, 2015). Em outro trabalho, o hidrolisado proteico da proteína β -vignina do feijão-caupí promoveu a redução significativa da concentração plasmática de colesterol total e LDL-c, e concentração hepática de triglicérides e colesterol, além de aumentar os níveis de HDL colesterol e excreção fecal de triglicérides em ratos alimentados com uma dieta enriquecida com colesterol e gordura saturada, comparado ao grupo controle (FERREIRA *et al.*, 2015). Evidências atribuem esses efeitos biológicos aos peptídeos gerados a partir da hidrólise proteica.

Somado a isso, nas últimas décadas diversos estudos comprovaram a bioatividade de peptídeos de origem natural, tais como, anti-inflamatória (NOH *et al.*, 2015; MORONTA *et al.*, 2016), anticancerígena (SANCHES *et al.*, 2015; VÁSQUEZ-VILLANUEVA *et al.*, 2018), antimicrobiana (UL AIN; SAFDAR; YASMIN, 2017; RAMADA *et al.*, 2017; SANTOS-FILHO *et al.*, 2015), anti-hipertensiva (LIU *et al.*, 2018; VÁSQUEZ-VILLANUEVA *et al.*, 2018), hipocolesterolemizante (PAK *et al.*, 2021; MARQUES *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018), entre outras. Desta forma, os peptídeos representam uma importante classe de medicamentos, uma vez que o emprego destes na terapêutica podem oferecer vantagens como maior potência, especificidade e afinidade de interação com receptores, além de melhores perfis de segurança e toxicidade quando comparados a outras moléculas (ZHOU *et al.*, 2020).

Embora demonstrados os efeitos hipocolesterolêmicos dos peptídeos, o mecanismo de ação ainda não está completamente esclarecido. Autores sugerem que peptídeos bioativos exercem a sua atividade por meio da inibição da absorção intestinal e aumento da excreção de esteróis (LAPPHANICHAYAKOOL *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2015a), ou ainda por meio da regulação do metabolismo de lipídeos por meio da inibição ou modulação de genes ou enzimas envolvidos na síntese de colesterol endógeno (BOACHIE; YAO; UDENIGWE, 2018). Alguns dos mecanismos propostos para a regulação do metabolismo de lipídeos são a inibição da HMG-CoA redutase (LAMMI *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018), o aumento da expressão dos receptores de LDL (SUN *et al.*, 2021) e a modulação da atividade ou expressão de enzimas lipogênicas e genes hepáticos relacionados à biossíntese de lipídeos (SANTILLO *et al.*, 2019; ZANONI *et al.*, 2017).

Estudos *in silico* e *in vivo* mostraram que tripeptídeos são possivelmente mais estáveis e biodisponíveis, além de potentes inibidores da HMG-CoA redutase. Soares *et al.* (2015) verificaram que os peptídeos GGV e IVG, oriundos da hidrólise sequencial pepsina/pancreatina, da proteína do amaranto (*Amaranthus cruentus*), na concentração de 0,02 g/L foram capazes de inibir, *in vitro*, cerca de 40% da atividade da HMG-CoA redutase. O tripeptídeo YIE, obtido por metodologias *in silico* a partir do peptídeo YVAE, análogo aos peptídeos obtidos da glicinina da soja, apresentou IC₅₀ de 0,7 µM, cerca de 60 vezes menor do que o peptídeo YVAE, indicando que peptídeos menores tem maior probabilidade de inibir a HMG-CoA redutase (PAK *et al.*, 2021).

Em trabalho anterior de nosso grupo, foi identificado a partir da hidrólise enzimática *in silico* da proteína β-vignina do feijão-caupí, o tripeptídeo QDF que apresentou capacidade de inibitória da HMG-CoA redutase *in vitro* (IC₅₀ = 12,8 µM) com efeito dose-resposta e o peptídeo MPNY, com capacidade de interagir com o sítio catalítico da enzima. A análise de interação molecular *in silico* sugere que ambos os peptídeos agem inibindo a enzima competitivamente, ligando-se ao sítio catalítico do substrato de forma semelhante às estatinas. Os peptídeos são provavelmente alguns dos responsáveis pela atividade hipocolesterolêmica da fração do hidrolisado da β-vignina formada por peptídeos menores que 3 kDa, que inibiu cerca de 95% da atividade da enzima *in vitro* (SILVA *et al.*, 2018).

Em outro trabalho realizado pelo nosso grupo, Silva *et al.* (2021a) avaliaram a atividade dos peptídeos pGluGF e GSTLN, análogos a peptídeos oriundos das

proteínas do feijão-caupí, em inibir atividade da enzima. Os autores verificaram por modelagem molecular que os peptídeos interagem em diferentes sítios catalíticos da HMG-CoA redutase e, quando misturados, mostraram um incremento na atividade inibitória individual destes peptídeos.

Assim, este trabalho teve como proposta contribuir com os achados da literatura, avaliando a atividade de peptídeos oriundos da hidrólise *in sílico* da β -vignina, e de seus análogos sozinhos e conjugados com o GSTLN na capacidade de inibir a HMG-CoA redutase *in vitro* e modular o metabolismo lipídico de ratos (*Rattus norvegicus*) alimentados com dieta hiperlipídica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a ação dos peptídeos QDF, MPNY, oriundos da hidrólise *in silico* da β -vignina do feijão-caupí (*Vigna unguiculata* L.), de seus análogos e do peptídeo GSTLN, oriundo das proteínas totais do feijão-caupí, sobre a regulação do metabolismo lipídico.

2.2 Objetivos específicos

- Obter hidrolisados a partir da proteína purificada previamente, por meio da ação enzimática sequencial – pepsina/pancreatina (mimetização da digestão gastrointestinal *in vitro*);
- Avaliar, *in silico*, os peptídeos QDF e MPNY, quanto ao potencial em inibir a enzima HMG-CoA redutase;
- Sintetizar, purificar e caracterizar os peptídeos QDF e MPNY;
- Investigar a capacidade dos fracionados proteicos oriundos da β -vignina e dos peptídeos QDF e MPNY em inibir a enzima HMG-CoA redutase, *in vitro*;
- Avaliar a viabilidade das células HepG2, Caco2 e A204, frente aos peptídeos QDF, MPNY e à sinvastatina;
- Analisar o potencial dos peptídeos QDF e MPNY em modificar parâmetros bioquímicos em ratos alimentados com dieta hiperlipídica;
- Verificar a probabilidade de interação de peptídeos análogos ao QDF e ao GSTLN com o sítio catalítico da enzima HMG-CoA redutase *in silico*;
- Sintetizar, purificar e caracterizar os peptídeos análogos ao QDF e conjugados ao GSTLN, com e sem espaçador;
- Investigar a capacidade inibitória dos peptídeos análogos sobre a atividade da enzima HMG-CoA redutase, *in vitro*;
- Determinar a concentração de peptídeo capaz de inibir 50% da atividade da HMG-CoA redutase.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Doenças cardiovasculares

No último século houve uma transição epidemiológica e as doenças infectocontagiosas deram lugar ao câncer, diabetes, doenças pulmonares e cardiovasculares que, juntas, foram as maiores responsáveis pela mortalidade mundial. Dentre essas doenças crônicas não transmissíveis, as doenças cardiovasculares (DCV) representam a principal causa de mortalidade, sendo consideradas problemas de saúde pública, tanto pelo alto índice de mortes, quanto pelos danos patológicos associados a elas com gasto estimado em cerca de 15% do total dos custos com a saúde (NAGAOKA, 2019; WHO, 2018).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, de todas as mortes no mundo, cerca de 42% ocorreram por infarto e 38% por acidente vascular cerebral (WHO, 2018). Além disso, estima-se que as doenças cardiovasculares sejam responsáveis por 37% das mortes prematuras ocasionadas por doenças crônicas não transmissíveis (AHA, 2019).

São classificadas como doenças cardiovasculares o infarto, acidente vascular encefálico, arritmias cardíacas e as doenças que têm como característica a aterosclerose (AHA, 2019). Além dos fatores de risco como sexo, hereditariedade, etnia e idade, fatores do estilo de vida modificáveis como dieta, sedentarismo e consumo de tabaco são os principais aspectos relacionados ao aparecimento e a desenvolvimento das doenças cardiovasculares (FALUDI *et al.*, 2017).

A aterosclerose é responsável por cerca de 80% dos episódios das enfermidades cardiovasculares e cerebrovasculares (BARBARESCO; RIENKS, NOTHLINGS, 2018). A aterosclerose não se resume ao acúmulo de lipídeos nas artérias, ela é caracterizada por um processo de inflamação crônica do endotélio iniciada por desordens lipídicas, entretanto também está relacionada à fatores genéticos, imunológicos, endócrinos e circulatórios, bem como é influenciada pela idade e estilo de vida (FALUDI *et al.*, 2017; NAHRENDORF; SWIRSKI, 2013). A aterosclerose é inequivocadamente o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e as dislipidemia estão diretamente relacionadas a esta condição (NCEP, 2011; SANDESARA *et al.*, 2019).

As dislipidemias são classificadas pela Sociedade Brasileira de Cardiologia em quatro tipos principais, [1] hipercolesterolemia isolada, caracterizada pelo aumento

nos níveis de LDL-c (≥ 160 mg/dL); [2] hipertrigliceridemia isolada, que ocorre quando há um aumento dos níveis de triglicerídeos (≥ 150 mg/dL) e das lipoproteínas ricas desse lipídeo; [3] hiperlipidemia mista, quando existe um aumento dos níveis séricos de triglicerídeos e LDL-c e; [4] redução de HDL-c, que envolve baixo nível plasmático de HDL-c (homens < 40 mg/dL e mulheres < 50 mg/dL) associado ou não a um aumento dos níveis de LDL-c (PRÉCOMA *et al.*, 2019).

Desde 2011, em seu relatório o National Cholesterol Education Program (NCEP) reconheceu que a hipercolesterolemia é fator de risco e pré-requisito para desenvolvimento de aterosclerose (NCEP, 2011). As recomendações das agências mundiais de saúde envolvem o tratamento das dislipidemias, objetivando a redução dos altos níveis de colesterol sérico com o objetivo de reduzir o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (AHA, 2019; IAS, 2013).

3.2 Hipercolesterolemia

A hipercolesterolemia é um fator de risco relevante para o desenvolvimento de aterosclerose e é caracterizada pelo aumento dos níveis de colesterol total, principalmente o contido na lipoproteína LDL-c (BRASIL, 2020). Apesar do colesterol ser um lipídeo biologicamente importante, atuando como precursor de hormônios esteroidais, ácidos biliares e da vitamina D e ser constituinte das membranas celulares, influenciando na fluidez e ativação de determinadas enzimas, seus níveis plasmáticos devem ser monitorados, a fim de reduzir o risco e desenvolvimento de doenças cardiovasculares (FALUDI *et al.*, 2017).

Por serem estruturas hidrofóbicas, para serem solubilizados e transportados na corrente sanguínea, o colesterol e outros lipídeos precisam estar contidos em estruturas conhecidas como lipoproteínas. Diversas lipoproteínas foram identificadas no plasma e classificadas de acordo com a sua densidade em: lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de densidade intermediária, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e quilomícrons, ricos em triglicerídeos (NELSON; COX, 2014). Dentre essas lipoproteínas, a de baixa densidade (LDL-c) é considerada o mais importante fator de risco modificável para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Evidências clínicas evidenciam que baixos níveis séricos de LDL-c estão associados à redução de infarto do miocárdio, AVC e morte por doenças cardiovasculares (FERENCE *et al.*, 2017; NAVARESE *et*

al., 2018). Por outro lado, foi verificado que elevados níveis plasmáticos de HDL, estão relacionados a um decréscimo desse risco (BRASIL, 2020).

Com relação sua etiologia, as dislipidemias podem ser classificadas em primária, quando é causada por um distúrbio genético, ou secundária, quando ocorrem em decorrência do estilo de vida inadequado, da ocorrência de certas comorbidades, ou ainda devido ao uso de medicamentos (FALUDI *et al.*, 2017).

A dislipidemia originada por componente genético é menos comum que a secundária, entretanto, está associada a um alto risco de desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares, pois estão relacionadas a alterações presentes desde o nascimento. Foram descritas mais de 20 síndromes genéticas monogênicas que possuem como principais características alterações no perfil lipídico e histórico familiar de hipercolesterolemia precoce, podendo apresentar padrão de transmissão dominante ou recessivo. As síndromes poligênicas são menos raras e não possuem padrão definido de herdabilidade (CREIDER; HEGELE, 2015; FALUDI *et al.*, 2017).

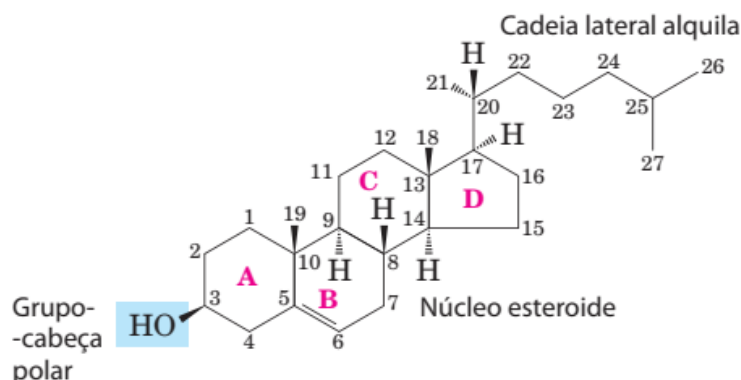
A hipercolesterolemia secundária ocorre mais frequentemente que as primárias. Fatores com dieta, sedentarismo, uso de tabaco e consumo de álcool foram descritos como os principais fatores modificáveis relacionados à ocorrência de dislipidemia (BARBARESKO; RIENKS; NOTHLINGS, 2018), ademais, o envelhecimento e a menopausa também estão associados ao aumento dos níveis de colesterol na corrente sanguínea. As enfermidades mais associadas à hipercolesterolemia são a obesidade, diabetes mellitus tipo 2, hipotireoidismo, insuficiência renal e síndrome nefrótica, além disso, hepatopatias, implicam em modificações nas concentrações plasmáticas, pois o fígado é principal órgão de formação e limpeza das lipoproteínas (BRASIL, 2020; PRÉCOMA *et al.*, 2019). Determinadas drogas também podem produzir alterações do perfil lipídico, tais como, os anticoncepcionais, corticosteroides, esteroides anabolizantes, diuréticos, antipsicóticos atípicos e antirretrovirais (FALUDI *et al.*, 2017; TIWARE; KHOKHAR, 2014).

Por ser um importante fator de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares e apresentar elevada frequência na população geral, o diagnóstico e tratamento adequado da hipercolesterolemia é essencial para um melhor resultado terapêutico e prognóstico (BRASIL, 2020).

3.3 Biossíntese do colesterol

O colesterol é uma molécula hidrofóbica indispensável à vida, presente em todas as células e tecidos dos animais vertebrados, se localiza predominantemente nas membranas celulares onde interage com outros lipídeos para regular sua rigidez, fluidez e permeabilidade. Este lipídeo é precursor de hormônio esteroides e dos ácidos biliares (LUO; YANG; SONG, 2020) e é constituído de 27 átomos de carbono, possui uma estrutura anfipática, sendo a região polar definida por uma hidroxila no carbono 3 e a estrutura apolar representada por quatro anéis do núcleo de esteroide e cadeia alifática lateral ligada no carbono 17 (Figura 1). No organismo é encontrado na sua forma livre ou como ésteres de colesterol (CAMPBELL; FARRELL, 2015; NELSON; COX, 2014).

Figura 1 – Estrutura química do colesterol. Anéis derivados do núcleo de esteroides rotulados de A a D. O grupo hidroxila C3 corresponde à cabeça polar da estrutura.

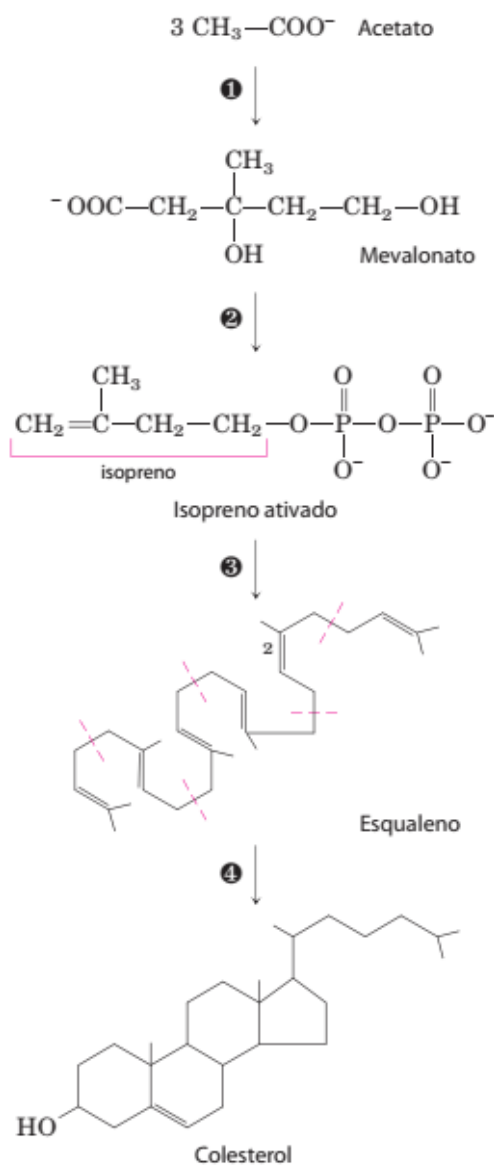


Fonte: Nelson e Cox (2014).

As células obtêm o colesterol que necessitam por meio de duas diferentes vias, a endocitose de lipoproteínas ricas em colesterol esterificado (LDL-c), mediada por receptor, ou via síntese endógena (CARDOSO; ALVES; BOURBON, 2018). Quase todas as células podem sintetizar colesterol e cerca de 50% da síntese em humanos ocorre no fígado, onde uma fração do colesterol sintetizado é incorporado nas membranas dos hepatócitos e outra fração é exportada como ácido biliar, colesterol biliar ou éster de colesterol incorporado em lipoproteínas (LUO; YANG; SONG, 2020; XU *et al.*, 2005).

A síntese endógena do colesterol ocorre a partir da molécula de acetil-CoA e é dividida em quatro etapas que estão resumidas na Figura 2. A biossíntese do colesterol se inicia com a condensação de três moléculas de acetil-CoA em mevalonato, que em seguida é descarboxilado, produzindo unidades isoprenóides ativadas, que posteriormente são condensadas para formação do esqualeno, que é ciclizado originando os anéis do núcleo esteroide, que por fim darão origem ao colesterol (NELSON; COX, 2014).

Figura 2 – Etapas envolvidas na biossíntese do colesterol.



Fonte: Nelson e Cox (2014).

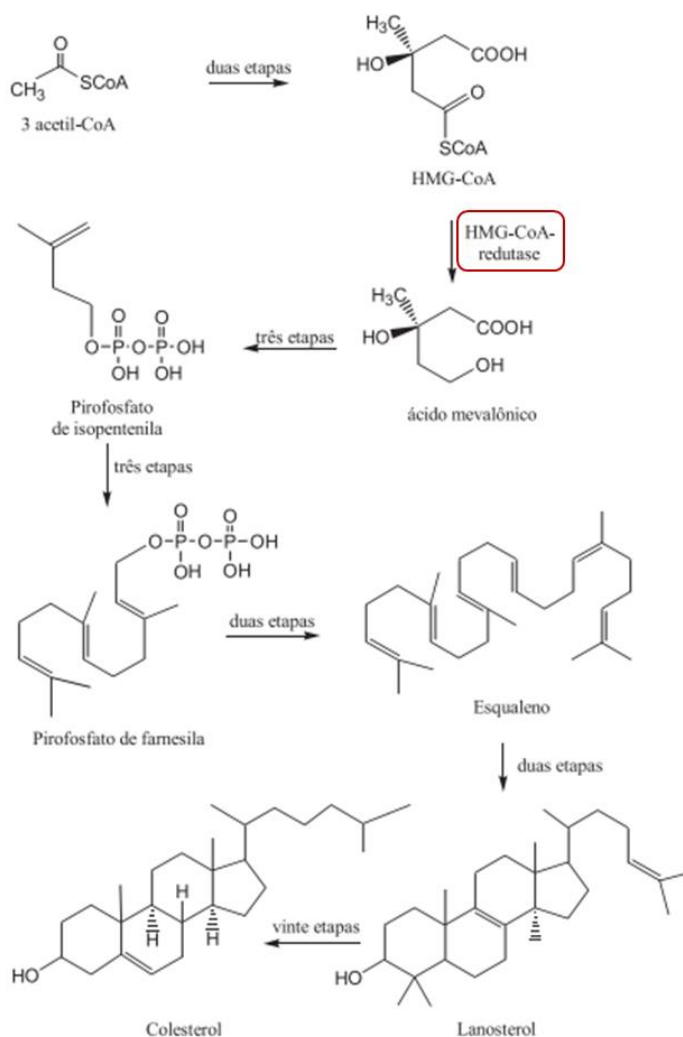
A tiolase é a enzima responsável pela condensação de duas moléculas de acetil-coenzima A, formando o acetoacetil-CoA. Em seguida, com o auxílio da enzima HMG-CoA sintetase, uma terceira molécula de acetil-CoA condensa-se com a acetoacetil-CoA produzindo o composto β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que é reduzido a mevalonato após duas moléculas de NADPH doarem elétrons para a reação catalisada pela HMG-CoA-redutase, considerada a enzima chave para regulação da biossíntese do colesterol (CAMPO; CARVALHO, 2007; NELSON; COX, 2014). Essa etapa é inibida por altos níveis de colesterol e constitui o principal ponto de controle da síntese.

Na segunda etapa o mevalonato será convertido em uma unidade isoprenóide por uma combinação de reações de fosforilação, descarboxilação e desfosforilação. A enzima mevalonato-5-fosfotransferase irá transformar o mevalonato em 5-fosfomevalonato. Essa molécula, será convertida a 5-pirofosfomevalonato e depois a 3-fosfo-5-fosfomevalonato pelas enzimas fosfomevalonato-cinase e pirofosfomevalonato-decarboxilase, respectivamente. Reações que requerem ATP e originarão o isopentenil-pirofosfato e dimetilalil-pirofosfato, que podem ser interconvertidos por reação catalisada pela isopentenil pirofosfato isomerase (DO *et al.*, 2009).

Na etapa seguinte da síntese de colesterol, os metabólitos isopentenil-pirofosfato e dimetilalil-pirofosfato são condensados ao geranyl-pirofosfato, que é condensado a outra molécula de isopentenil-pirofosfato, pela ação da enzima fenil-transferase, dando origem ao farnesil-pirofosfato, um composto de 15 carbonos. Duas moléculas de farnesil-pirofosfato condensam-se originando o esqualeno, reação catalisada pela esqualeno sintase (CAMPBELL; FARRELL, 2015). As reações que ocorrem desde a molécula de mevalonato até a formação do farnesil-pirofosfato ocorrem predominantemente nos peroxissomos celulares (OLIVIER *et al.*, 2000).

Finalmente, o esqualeno é convertido em epóxido de esqualeno em uma reação que requer NADPH e O₂ pela atividade da enzima denominada esqualeno-monooxigenase. Essa molécula sofre uma ciclização para formar o lanosterol, reação catalisada pela epóxido-esqualeno-ciclase, que após cerca de 20 etapas transforma-se na molécula de colesterol (NELSON; COX, 2014). As reações de biossíntese do colesterol estão resumidas na Figura 3.

Figura 3 – Resumo da biossíntese do colesterol a partir de acetil-CoA.



Fonte: Campo e Carvalho (2007).

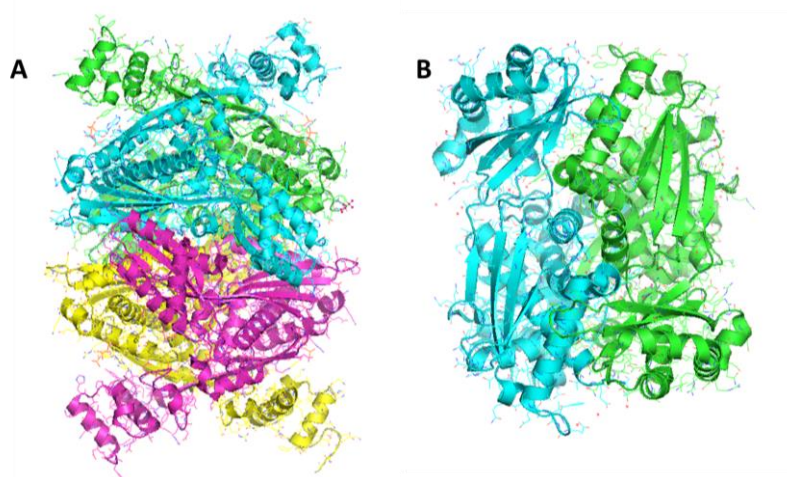
3.4 HMG-CoA redutase

A enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) é uma glicoproteína integral de membrana do retículo endoplasmático liso que, participa da síntese endógena do colesterol, sendo considerada uma enzima fundamental da biossíntese. A enzima atua convertendo a HMG-CoA a mevalonato, uma reação de oxidorredução de quatro elétrons que é a etapa limitante na síntese de colesterol e outros isoprenóides (LUO; YANG; SONG, 2020; NELSON; COX, 2014).

Encontrada em todos os domínios da vida, foram identificadas, por meio de análise filogenética, duas classes dessa enzima. A HMG-CoA redutase de classe I é encontrada em eucariontes e algumas archaeas, enquanto as enzimas de classe II foram identificadas em eubactérias e outras archaea. Na Figura 4 estão representadas

as estruturas cristalográficas da HMG-CoA redutase de ambas as classes (BURG; ESPENSHADE, 2011).

Figura 4 – Estrutura cristalográfica da HMG-CoA redutase de classe I (PDB: 1DQA) (A) e classe II (PDB: 1T02) (B).



Fonte: Próprio autor.

A HMG-CoA redutase humana pertence à classe I e utiliza como doador de elétrons o NADPH, já as enzimas de classe II são encontradas principalmente em eubactérias e utilizam o NADH como cofator. Nas arqueobactérias as enzimas variam amplamente em sequência e em classe. As formas eucarióticas da enzima são ancoradas no retículo endoplasmático, enquanto as enzimas procarióticas são solúveis, o principal elemento que distingue as duas classes da enzima é a estrutura do “*cis-loop*”, característica estritamente conservada nas enzimas de classe I, correspondendo aos aminoácidos 682-694 da HMG-CoA redutase humana (BURG; ESPENSHADE, 2011).

As enzimas de ambas as classes são multímeros de um número específico de monômeros idênticos e as comparações estruturais revelam semelhanças e diferenças significativas entre elas. A HMG-CoA redutase de classe I possui três domínios principais (catalítico, ligante e âncora), já as enzimas de classe II possuem apenas o domínio catalítico. O sítio catalítico é formado com a contribuição de resíduos de ambos monômeros (FRIESEN; RODWELL, 2004). O alinhamento das sequências primárias das enzimas de diferentes classes revela a existência de uma semelhança de cerca de 88% entre os aminoácidos formadores dos sítios de ligação da enzima com o substrato (Figura 5).

Figura 5 – Alinhamento das sequências da HMG-CoA redutase de *Homo sapiens* (NP_000850.1) e de *P. mevalonii* (1RRI-B), usando Clustal W 1.83. Sinal positivo (+): substituição conservada; Sinal negativo (-): substituição semi-conservada.

```
[HMGR-Homo sapiens] MLSRLFRMHG LFVASHPWEV IVGTVTLTIC MMSNMFTGN NKICGWNyec PKFEEDVLSS DIIILTITRC IAILYIFYQF QNLRQLGSKY ILGIAGLFTI
[HMGR-P. mevalonii] -----

[HMGR-Homo sapiens] FSSFVFSTVV IHFLDKELTG LNEALPFFLL LIDLSRASTL AKFALSSNSQ DEVRENIARG MAILGPTFTL DALVECLVIG VGTMSGVRQL EIMCCFGCMS
[HMGR-P. mevalonii] -----

[HMGR-Homo sapiens] VLANYFVFMT FFPACVSLVL ELSRESREGR PIWQLSHFAR VLEEEENKPN PVTQRVKMIM SLGLVLVHAH SRWIADPSPQ NSTADTSKVS LGLDENVSKR
[HMGR-P. mevalonii] -----
                        H+--- +---E+--- -+---+M-M -+GLV
                        ----- LTTWEKDNG HLVGTLLEMPM PVGLV-----

[HMGR-Homo sapiens] IEPSVSLWQF YLSKMISMDI EQVITLSLAL LLAVKYIFFE QTETESTLSL KNPITSPVVT QKKVPDNCCR REPMLVRNNO KCDSVEEETG INRERKVEVI
[HMGR-P. mevalonii] -----

[HMGR-Homo sapiens] KPLVAETDTP NRATFVVGNS SLLDTSSVLV TOEPEIELPR EPRPNEECLQ ILGNAEKGAK FLSDAEIIQL VNAKHIPAYK LETLMETHER GVSIRRQLLS
[HMGR-P. mevalonii] -----

[HMGR-Homo sapiens] KKLSEPSSLQ YLPYRDYNYS LVMGACCENV IGYMPIPVGV AGPLCLDEKE FOVPMATTEG CLVASTNRCG RAIGLGGAS SRVLADGMTR GPVVRLPRAC
[HMGR-P. mevalonii] -----
                        --MP+PVG+ -G-----
                        --MPMPVGL VG-----
                        --ENV IG---+P---V A---+---+--- --VP+---E-
                        --ENV IGTFELPYAV ASNFQINGRD VLVPLVVEEP -----

[HMGR-Homo sapiens] DSAEVKAWLE TSEGFAVIKE AFDSTSRFAR LQKLHTSIAG RNLYIRFQSR SGDAMGMNMI SKGTEKALSK LHEYFPEMQI LAVSGNYCTD KKPAAINWIE
[HMGR-P. mevalonii] -----
                        ADTPRGPM LV AHLIVDVRDA MGANTVNTMA EAVAPIMEAI TGGQVRLRIL SNLADLRLAR

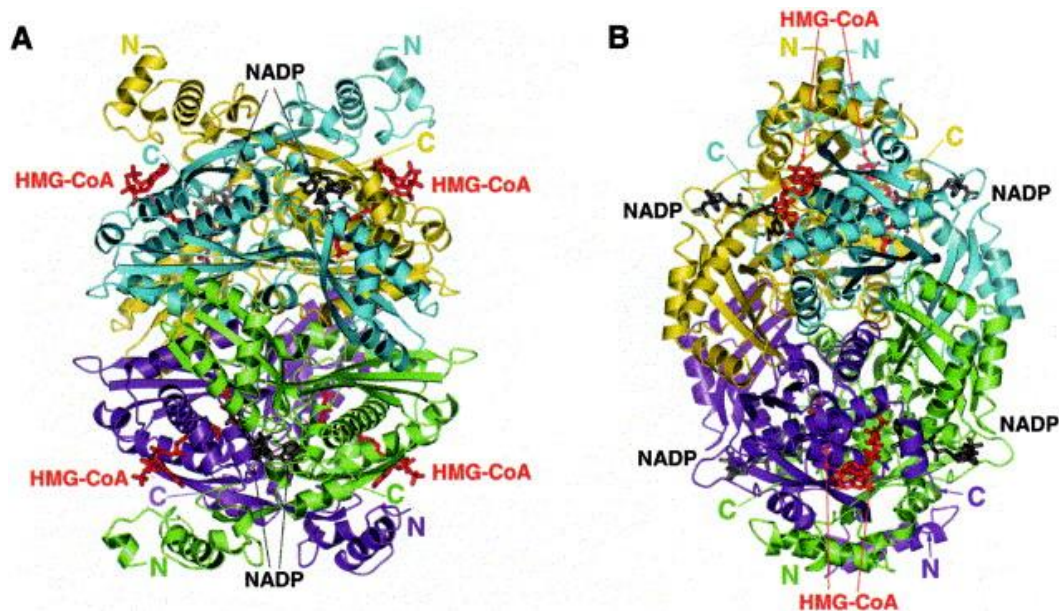
[HMGR-Homo sapiens] GRGKSVVCEA VIPAKVVREV LKTTTEAMIE VNINKNLVGS AMAGSIGGYN AHAANIVTAI YIACGQDAAQ NVGSSNCITL MEASGPTNED LYISCTMPST
[HMGR-P. mevalonii] AQVRITPQQL ETAEFSGEAV -----
                        ----- NNGH LVGTLEMP-M

[HMGR-Homo sapiens] EIGTVGGGTN LLPQOACLQM LGVQGACKDN PGENARQLAR IVCCTVMAGE LSLMAALAAG HLKSHMIHN RSKINLQDLQ GACTKKTA
[HMGR-P. mevalonii] PVGLVGGATK THPLAQLSLR ILGVK-----
                        -+G-VGG-T- --P--Q--L+ +LGV+-----
                        -----A+--LA -I-----+A- -L--M-ALA- --+---+---HM-+ H-R+-----
                        -----TAQALA EIAVAVGLAQ NLGAMRALAT EGIQRGHMAL HARN-----
```

Fonte: Próprio autor.

A enzima HMG-CoA redutase humana, apresenta-se na forma de um tetrâmero onde os monômeros se organizam em dois dímeros, cada um possuindo dois sítios ativos (ISTVAN *et al.*, 2000). O grupo hidroximetilglutarílico (HMG) do substrato HMG-CoA posiciona-se na interface destes monômeros, onde ocorrem as reações de redução. Essa enzima está localizada na membrana do retículo endoplasmático liso e compreende um domínio hidrofóbico N-terminal que atravessa a membrana oito vezes, e um grande domínio C-terminal solúvel que se projeta no citosol (LUO; YANG; SONG, 2020). Na Figura 6 está representada a estrutura cristalográfica da enzima com a indicação dos seus quatro sítios catalíticos.

Figura 6 – Estrutura em fitas da HMG-CoA redutase humana. Vista frontal (A) e vista lateral (B) do tetrâmero HMG-CoA redutase humana.

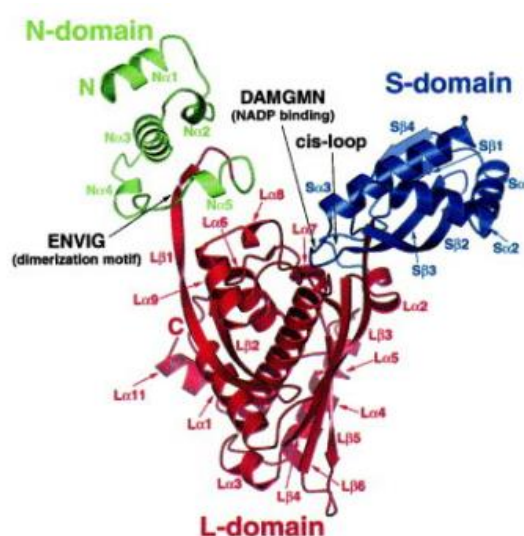


Os quatro monômeros estão coloridos em amarelo, verde, azul e roxo. O dímero 1 é formado pelos monômeros amarelo e azul e o dímero 2 pelos monômeros verde e roxo. As extremidades N- e C-terminal do monômero estão indicadas. Cada um dos monômeros está ligado a uma molécula de HMG-CoA (estrutura em bastão vermelho) e a uma de NADP (estrutura em bastão preto). **Fonte:** Istvan e Deisenhofer (2000).

Cada monômero é formado por 888 resíduos de aminoácidos e é dividido em três domínios principais. Os resíduos amino-terminais (1-339) são ligados à membrana do retículo endoplasmático liso e essa região é denominada de domínio âncora. O domínio ligante, resíduos 340-459, é responsável por unir a porção ligada à membrana à região C-terminal citoplasmática, correspondente aos resíduos 460-

888, que possui atividade catalítica (ISTVAN; DEISENHOFER, 2000). O terceiro domínio é dividido em três regiões, a região N (resíduos 460-527), que se conecta ao domínio ligante, o L (resíduos 682-888) que é a região de ligação ao substrato HMG-CoA e o S (resíduos 527-590), região de interação com o cofator NADPH (Figura 7). Os domínios L e S são unidos por um “cis-loop”, que corresponde aos aminoácidos 682-694, e é essencial para a formação do sítio ativo (ISTVAN; DEISENHOFER, 2000; KUMAR *et al.*, 2019).

Figura 7 – Estrutura em fitas do monômero da HMG-CoA redutase humana.



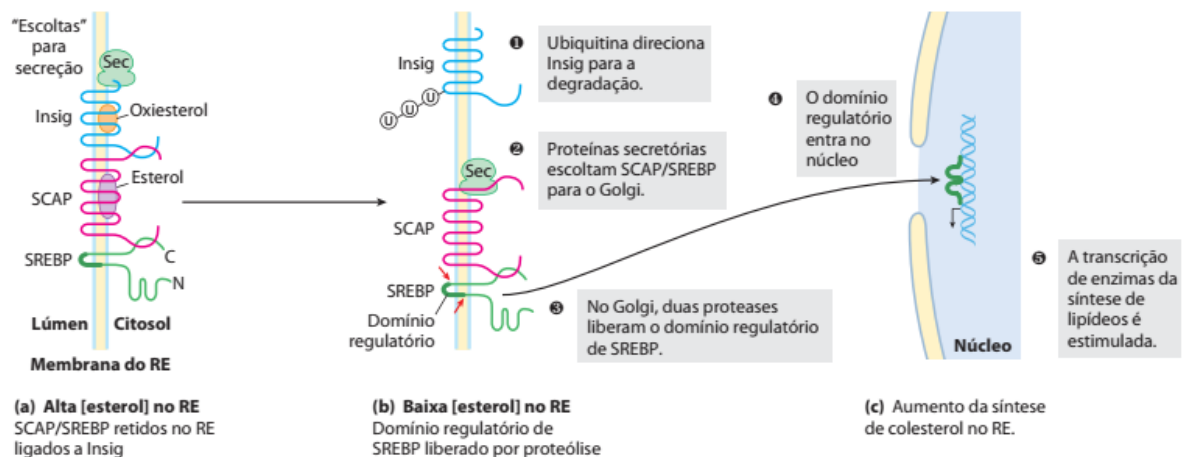
As regiões estão representadas por diferentes cores: Região N colorida em verde, região L em vermelho e região S em azul. As extremidades N- e C-terminal do monômero estão indicadas. **Fonte:** Istvan e Deisenhofer (2000).

Devido ao seu papel crítico na homeostase celular do colesterol, a síntese de colesterol é regulada nos níveis transcricional, traducional e pós-traducional, em resposta às concentrações celulares de colesterol. Em baixas concentrações de colesterol o gene da HMG-CoA redutase é ativado pelo SREBP 2 (proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol) (Figura 8), já a tradução do mRNA da HMG-CoA redutase pode ser inibida por isoprenóides não esterol (NELSON; COX, 2014).

A regulação da atividade enzimática da HMG-CoA redutase por meio de modificações pós-traducionais se dá por meio de degradação proteolítica da enzima. Altos níveis de colesterol celular são detectados pela proteína Insig, que atua como um sensor de esterol, que dispara o acoplamento de moléculas de ubiquitina à HMG-CoA redutase, levando à sua degradação. Além disso, a enzima pode ser

interconvertida nas suas formas fosforiladas e não fosforiladas. A fosforilação inibe a atividade da enzima sem afetar a degradação induzida por esteróis (LUO; YANG; SONG, 2020).

Figura 8 – Regulação da síntese de colesterol por SREBP.



Fonte: Nelson e Cox (2014).

A desregulação do metabolismo de colesterol pode levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Por ser a enzima chave da biossíntese do colesterol, a HMG-CoA redutase é o principal alvo dos tratamentos farmacológicos. Moléculas que interajam com o sítio catalítico do substrato ou com sítio do cofator podem atuar como inibidores enzimáticos e apresentarem atividade hipocolesterolêmica (ALENGHAT; DAVIS 2019).

3.5 Tratamento farmacológico da hipercolesterolemia

Devido ao indiscutível papel da hipercolesterolemia como fator de risco no desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares, o tratamento das desordens lipídicas, em especial a redução dos níveis de colesterol plasmático total e LDL-c, é recomendado a fim de reduzir esse risco. As recomendações para o tratamento envolvem mudanças no estilo de vida e nos hábitos alimentares, podendo ser associado ou não ao uso de fármacos (BRASIL, 2020; PRÉCOMA *et al.*, 2019).

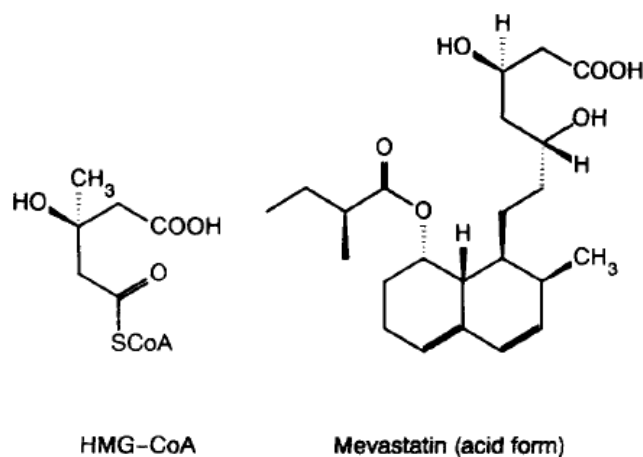
O tratamento clínico para a hipercolesterolemia objetivava reduzir o LDL-c para níveis abaixo de 100 mg/dL, entretanto as novas diretrizes priorizam a redução do risco cardiovascular do paciente, avaliando diversos critérios e não apenas o nível de LDL-c isoladamente (BRASIL, 2020). Os medicamentos recomendados para o

tratamento da hipercolesterolemia são as estatinas, em terapia única ou associadas à ezetimiba, à colestiramina (sequestrador de ácidos biliares) ou a fármacos que atuam predominantemente na redução dos triglicérides, como os fibratos ou ácido nicotínico (FALUDI *et al.*, 2017).

Atualmente, as estatinas são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento da hipercolesterolemia. Elas atuam na primeira etapa da biossíntese de colesterol inibindo de forma competitiva e reversível a HMG-CoA redutase, impedindo a formação do mevalonato, o que resulta em menor colesterol intra-hepático e uma elevação da regulação dos receptores LDL da superfície das células hepáticas, ocasionando aumento da absorção mediada pelos receptores de LDL e outras lipoproteínas contendo apoB da circulação (WADHERA *et al.*, 2016).

A estrutura química das estatinas possui uma região análoga à estrutura do substrato HMG-CoA, todos os fármacos dessa classe inibem a enzima de forma competitiva com relação à ligação com o substrato, mas não com relação com a ligação com o NADPH. A inibição da HMG-CoA redutase pelo fármaco ocorre devido a lactona presente na estatina, que pode estar na sua forma ativa ou inativa, estrutura semelhante à HMG (Figura 9), e às suas cadeias laterais que interagem com o sítio catalítico da enzima (SIRTORI, 2014).

Figura 9 – Estruturas químicas da HMG-CoA e da mevastatina.



Fonte: Endo, 1992

Várias estatinas estão disponíveis e são classificados em estatinas de primeira geração ou naturais. A estrutura dessas moléculas possui um grupo rígido e hidrofóbico, o anel decalina. As estatinas de segunda geração são inibidores

totalmente sintéticos, com grupos maiores ligados à lactona. As estatinas de segunda geração possuem anéis abertos com estrutura análoga à HMG-CoA. As mudanças moleculares vão de uma simples adição de um único átomo a aberturas de anel mais complexas, para as estatinas mais recentes. Além disso, a estrutura análoga ao substrato natural mostra alterações moleculares adicionais, que vão de hidroxilas ou grupo metilas adicionais em padrões estereoquímicos complexos (ISTVAN; DEISENHOFER, 2001; SIRTORI, 2014). Na Figura 10 estão representadas as estruturas químicas das estatinas de primeira e segunda geração.

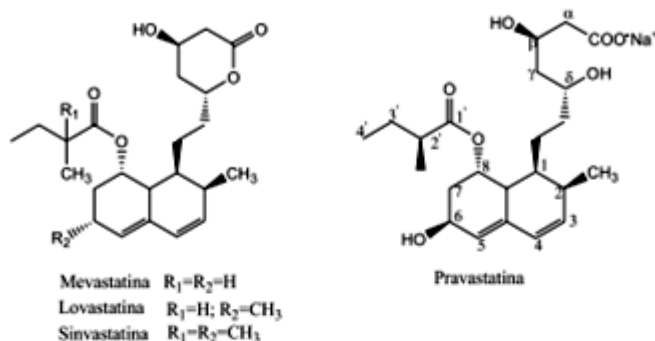
Quando as estatinas interagem com o sítio catalítico da enzima, os resíduos são desordenados, revelando um sulco hidrofóbico raso que acomoda as porções hidrofóbicas das estatinas. O grande número de ligações de hidrogênio e pares de íons resulta em complementaridade de carga e forma entre a proteína e as estatinas por meio de interações similares as observadas entre a enzima e o seu substrato. Os compostos volumosos e hidrofóbicos das estatinas ocupam a bolsa de ligação do HMG e parte da superfície de ligação do CoA. Assim, o acesso do substrato HMG-CoA ao sítio catalítico da enzima é bloqueado quando as estatinas são ligadas. Os grupos hidrofóbicos dos inibidores são responsáveis pela maior afinidade da enzima com os inibidores quando comparado ao substrato (ISTVAN; DEISENHOFER, 2001).

Além de diminuir o colesterol, as estatinas parecem ter vários efeitos adicionais pleiotrópicos, como o crescimento de novos vasos sanguíneos, estimulação da formação óssea, proteção contra a modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade, além de efeitos anti-inflamatórios e redução dos níveis de proteína C-reativa (OESTERLE; LAUFS; LIAO, 2017).

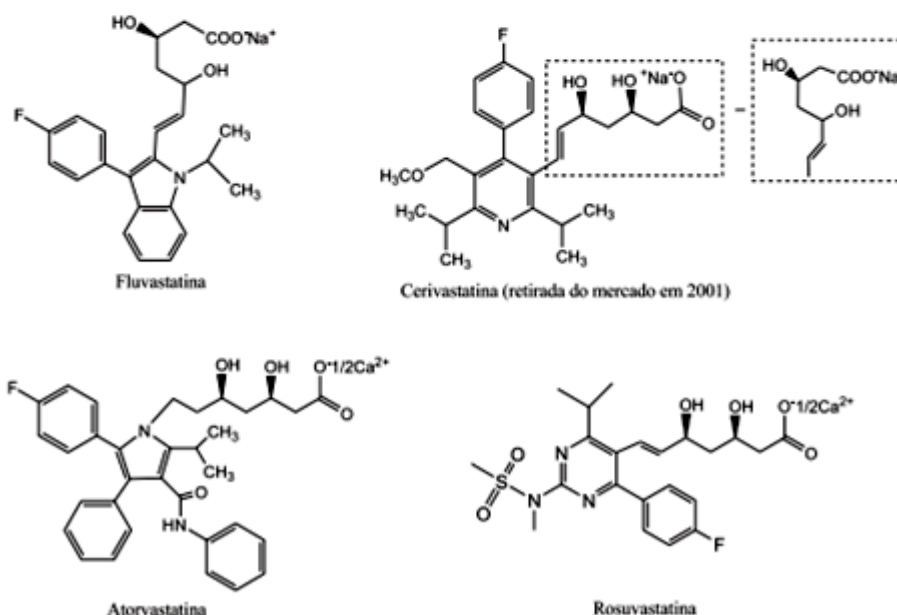
Embora as estatinas sejam medicamentos bem tolerados, o seu uso está associado a alguns efeitos adversos que incluem lesões da musculatura esquelética, diabetes mellitus, déficits cognitivos, dentre outros (THOMPSON *et al.*, 2016). Os efeitos adversos mais graves estão relacionados a hepatotoxicidade e danos musculares, que variam da mialgia com ou sem alteração da creatinoquinase até a rabdomiólise, esses efeitos podem surgir em semanas ou anos a partir do início do tratamento (PRÉCOMA *et al.*, 2019).

Figura 10 – Estruturas químicas das estatinas inibidoras da HMG-CoA redutase.

Naturais



Sintéticos



Fonte: Campo e Carvalho (2007).

Para pacientes que apresentam intolerância às estatinas, o fármaco prescrito é a ezetimiba, que inibe os receptores NPC1-L1 impedindo a absorção intestinal e transporte do colesterol e consequentemente redução do colesterol hepático e estímulo da síntese de receptores de LDL. Outra alternativa são os sequestradores dos ácidos biliares que atuam reduzindo a absorção intestinal, que por não serem absorvidas na circulação sistêmica, são prescritos para crianças e mulheres grávidas ou em período de amamentação (BRASIL, 2020; FALUDI *et al.*, 2017).

A diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose também recomenda para paciente com alto risco cardiovascular, em que o tratamento com a

maior dose tolerada de estatina não tenha alcançado os níveis recomendados de LDL-c, o uso de inibidores da PCSK9 (evolocumabe e alirocumabe). Essa enzima liga-se aos receptores de LDL favorecendo a sua degradação (FALUDI *et al.*, 2017).

3.6 Peptídeos hipocolesterolemiantes

Proteínas de leguminosas apresentam capacidade de modular o metabolismo lipídico, como demonstrado em estudos em animais e humanos (FERREIRA *et al.*, 2015; SIRTORI *et al.*, 2009). Alguns estudos apontam que esse efeito está diretamente relacionado aos peptídeos originados a partir da digestão gastrointestinal dessas proteínas (MARQUES *et al.*, 2015a; SILVA *et al.*, 2018). Esses peptídeos podem exercer a sua atividade hipocolesterolêmica por meio da inibição da absorção intestinal e aumento da excreção de esteróis (LAPPHANICHAYAKOOL *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2015) e/ou da regulação do metabolismo de lipídeos, com a inibição ou modulação de genes ou enzimas envolvidos na síntese de colesterol endógeno (MARQUES *et al.*, 2015b; ZANONI *et al.*, 2017).

O mecanismo de ação dos peptídeos que atuam sobre o colesterol exógeno envolve impedir a absorção do colesterol oriundo da dieta por meio da interação hidrofóbica entre os resíduos de aminoácidos dos peptídeos hipocolesterolêmicos com os ácidos biliares. Esses peptídeos competem com o colesterol, reorganizando-se radialmente nas micelas, com seu espaço entre as partes hidrofóbicas preenchidas e separadas por sais biliares o que desestabiliza essas estruturas e impede a emulsificação do colesterol e consequentemente sua absorção. Além disso, o complexo sequestrante-ácido biliar não é reabsorvido no intestino e é eliminado junto com as fezes (BOACHIE; YAO; UDENIGWE, 2018; HOWARD; UDENIGWE, 2013).

Em estudo *in vitro*, a fração peptídica menor que 3 kDa oriunda da hidrólise do isolado proteico do feijão caupí cozido foi capaz de interagir com ácidos biliares e fosfatidilcolina num sistema modelo de bile humana e inibir 39,8% da solubilização micelar do colesterol (MARQUES *et al.*, 2015a). Nagaoka *et al.* (2010) avaliaram a capacidade do hidrolisado trípico de caseína (HTC), do hidrolisado peptídico da proteína de soja (HPS) e do peptídeo VAWWMY solubilizarem micelas e interagirem com ácidos biliares *in vitro*, além de absorver o colesterol em ratos tratados. Os dados obtidos mostraram que a solubilidade micelar foi significativamente diminuída e a capacidade de ligação aos sais biliares foi maior para os tratamentos com HPS e com o peptídeo quando comparado com o HTC, sem diferença estatística entre VAWWMY

e o fármaco colestiramina. Somado a isto, eles foram capazes de inibir a absorção intestinal de colesterol *in vivo*. O mesmo mecanismo também foi descrito para proteínas do farelo de arroz e hidrolisados da sericina da seda. Ratos hipercolesterolêmicos tratados com essas proteínas apresentaram redução do colesterol total e LDL, além de aumentarem a excreção fecal de colesterol (LAPPHANICHAYAKOOL *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2015). Essa atividade hipocolesterolêmica pode explicada pela presença de peptídeos ricos em aminoácidos hidrofóbicos, a presença de núcleos hidrofóbicos nos peptídeos é importante para a ligação do colesterol e do ácido biliar. A anfipaticidade dos peptídeos também aumenta sua capacidade de interagir com os ácidos biliares livres e micelares (BOACHIE; YAO; UDENIGWE, 2018; HOWARD; UDENIGWE, 2013).

A redução da absorção do colesterol também pode ocorrer via inibição intestinal de Niemann-Pick C1 tipo 1 (NPC1L1), que está localizada nos enterócitos e transporta o colesterol do lúmen intestinal para os enterócitos (HERNANDEZ; DE MEJIA, 2017; JIANG *et al.*, 2020). Um estudo *in silico* identificou 14 peptídeos de leguminosas oriundos da digestão sequencial pepsina/pancreatina com potencial para inibir a NPC1L1 por meio da capacidade de interagir com o domínio N-terminal. Três peptídeos de feijão preto (YAAAT, ERAF e FATGT) e um peptídeo do feijão caupí (KD) também tiveram maior afinidade de ligação com a proteína que o fármaco ezetimiba, e possivelmente são capazes de reduzir a absorção do colesterol (HERNANDEZ; DE MEJIA, 2017).

Os peptídeos LQPE, VLPVPQ e VAPFPE originados da hidrólise da caseína do leite demonstraram capacidade hipocolesterolemiante *in vitro* por meio da redução da solubilidade das micelas de colesterol e decréscimo dos níveis de proteína (NPC1L1) em células Caco-2 tratadas com os peptídeos. As reduções foram de 19, 52 e 23%, respectivamente para os três peptídeos, em comparação ao grupo controle sem tratamento, além de regulação positiva da expressão de mRNA de ABCA1 e ABCG8, envolvidos no transporte de colesterol e redução da expressão da ACAT 2 (JIANG *et al.*, 2020).

Além da NPC1L1, a enzima ACAT também desempenha um importante papel na absorção de colesterol, ela é predominante no intestino delgado e fígado, onde esterifica a molécula de colesterol para ser transportado pelas lipoproteínas. Foi demonstrado que ratos alimentados com dieta rica em frutose tiveram um aumento dos níveis de triglicérides, colesterol total, VLDL e LDL plasmático e triglicérides e

colesterol total hepático induzido pelo aumento da expressão de ACAT 2 (ICHIGO *et al.*, 2019); desta forma, inibidores dessa enzima são eficazes na prevenção da hipercolesterolemia.

A principal via pela qual o colesterol excessivo é metabolizado é pela sua conversão a ácidos biliares, a enzima responsável por controlar a síntese de ácidos biliares no fígado é a colesterol 7 alfa-hidroxilase (CYP7A1). A sua regulação positiva é uma importante estratégia para tratamento da hipercolesterolemia, pois diminui o colesterol hepático, gerando influxo de colesterol no fígado e consequentemente redução do nível de colesterol plasmático (NAGAOKA, 2019). O peptídeo originado da proteína do leite IIAEK e seus derivados AEK e EK aumentaram a expressão da CYP7A1 em células HepG-2 (MORIKAWA *et al.*, 2007a). Os autores verificaram que a lisina C-terminal é um importante fator para a absorção desses peptídeos pelos hepatócitos e após uma triagem identificaram que os dipeptídeos DK, EK e WK podem aumentar significativamente o nível de mRNA de CYP7A1 em células HepG2 (MORIKAWA *et al.*, 2007b).

Uma enzima que desempenha um importante papel na biossíntese de ácidos graxos é a acetil-CoA carboxilase (ACC), que catalisa a carboxilação de acetil-CoA em malonil-CoA, atua na oxidação de ácidos graxos e regula o sistema de transporte mitocondrial. Em animais existem duas isoformas, a ACC1 e a ACC2, codificadas por diferentes genes e com diferentes distribuições nos tecidos. As isoformas da enzima ACC são reguladas por dieta, hormônios e outros fatores fisiológicos, e a malonil-CoA é o principal sinal metabólico para o controle da oxidação e síntese de ácidos graxos em resposta às mudanças dietéticas (ABU-ELHEIGA *et al.*, 1995; ABU-ELHEIGA *et al.*, 2001). Foi demonstrado que camundongos com mutação no gene que expressa a ACC2 têm taxa de oxidação de ácidos graxos mais alta e menores quantidades de gordura, enquanto os camundongos deficientes em ACC2 acumularam 50% menos de gordura que os camundongos selvagens (ABU-ELHEIGA *et al.*, 2001). Além disso, a exclusão de ACC2 foi capaz de proteger os camundongos de esteatose mesmo com o aumento da lipogênese e de dieta rica em lipídeos. Em relação a animais em condições normais de dietas as demais alterações metabólicas foram mínimas e não houve diferença fisiológica significativa nos fígados de camundongos mutantes e comparação com os selvagens (ABU-ELHEIGA *et al.*, 2012). Estes achados sugerem que a isoforma 2 da enzima pode ser alvo útil para síndromes metabólicas. Em outro estudo, camundongos com obesidade induzida pela dieta foram tratados com

peptídeos oriundos da soja e demonstraram menor ganho de peso corporal que animais não tratados, além de apresentarem menor ingestão e redução de triglicérides plasmático; sendo a fosforilação da ACC uma das vias moduladas por esses peptídeos (JANG *et al.*, 2008).

A enzima ácido graxo sintase (FAS) que catalisa a síntese de ácidos graxos de cadeia longa tendo como substrato o malonil-CoA, produto da ACC, também é uma importante enzima envolvida no metabolismo lipídico. Além de impedir a síntese de ácidos graxos, a inibição de FAS reduz gotículas de lipídeos de adipócitos e de mRNA da proteína de ligação CCAAT/Enhancer (C/EBP) e de receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ (PPAR γ), o que indica que o FAS desempenha papel importante no desenvolvimento dos adipócitos. A enzima também é hiperexpressa em células cancerígenas e sua inibição leva a morte celular (NAGAOKA, 2019; TIAN *et al.*, 2011). Os peptídeos KNPQLR, EITPEKNPQLR e RKQEEDEDEEQQRE foram identificados na fração β -conglícinina da soja e apresentaram capacidade de inibir a atividade da FAS *in vitro* com IC₅₀ de 79, 27 e 16 μ M, respectivamente. A análise de acoplamento molecular mostrou que, os peptídeos da soja se ligam ao domínio de tioesterase da ácido graxo sintase humana bloqueando o seu sítio catalítico, os autores verificaram também que a massa molar, ponto isoelétrico e números de resíduos carregados negativamente e hidrofílicos influenciam diretamente a potência inibitória dos peptídeos (MARTINEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2010).

A redução dos parâmetros lipídios plasmáticos e hepáticos foi observada em camundongos alimentados com dieta hiperlipidêmica e hipercolesterolêmica e tratados com proteínas hidrolisadas do leite de soja e de leite de soja integral, a redução foi associada com a inibição da ácido graxo sintase nos hepatócitos dos animais, entretanto além da inibição da FAS também houve redução significativa da enzima málica, o que pode ter potencializado a ação hipolipidêmica (CHOI *et al.*, 2011). A enzima málica é uma proteína tetramérica que catalisam uma descarboxilação oxidativa reversível de L-malato, produzindo piruvato e gás carbônico, com redução de NADP⁺ a NADPH. Em mamíferos, essas enzimas foram divididas em três isoformas, sendo que duas delas desempenham um importante papel na lipogênese, fornecendo NADPH para a biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa e esteroides (HSIEH; CHEN; HUNG, 2009; UDENIGWE; ROUVINEN-WATT, 2015).

Outra via capaz de modular o metabolismo lipídico é pela ativação dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPAR), que são uma família de fatores de transcrição dependentes de ligantes que regulam a expressão do gene alvo pela ligação à elementos específicos de resposta do proliferador de peroxissomas (PPARs) em locais estimuladores de genes regulados. Há três isoformas desta enzima, PPAR γ , PPAR α e PPAR δ que regulam uma série de genes relacionados ao metabolismo lipídico. Diversos ácidos graxos foram identificados como ligantes naturais para os PPARs, atuando como sensores lipídicos e reguladores do metabolismo lipídico (LI *et al.*, 2018). O peptídeo hidrofóbico YPFVV, oriundo da β -conglícinina da soja, diminuiu os níveis plasmáticos e hepáticos de triglicerídeos em camundongos. Essa redução ocorreu devido à capacidade do peptídeo em aumentar a expressão de PPAR α por meio da elevação da expressão do gene do receptor de adiponectina (AdipoR2). A maior expressão do mRNA do PPAR α e de seus genes alvo, acil-CoA oxidase, carnitina, palmitoiltransferase 1A e proteína desacopladora mitocondrial-2 no fígado, aumentou a oxidação de ácidos graxos, o gasto de energia e melhorou o perfil lipídico endógeno de camundongos diabéticos obesos (YAMADA *et al.*, 2012).

As proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP) desempenham um papel crucial na regulação de genes que codificam enzimas que atuam na captação e síntese de ácidos graxos e colesterol. Essas proteínas são ancoradas à membrana do retículo endoplasmático e apenas a porção ativa N-terminal entra no núcleo após a clivagem proteolítica, que depende da proteína ativadora da clivagem de colesterol (SCAP), molécula que atua como sensor de esterol, e então ativa seus genes alvo. As três diferentes isoformas, SREBP-1a, SREBP-1c e SREBP-2 têm diferentes papéis na síntese de lipídeos. Alguns estudos sugerem que a SREBP-1 está envolvida no metabolismo de ácidos graxos e glicose, enquanto a SREBP 2 é específica para síntese de colesterol (BOACHIE; YAO; UDENIGWE, 2018; LAMMI *et al.*, 2019; SANTILLO *et al.*, 2019). Adipócitos maduros 3T3-L1 tratados com hidrolisados de leite foram avaliados quanto à viabilidade celular, apoptose e níveis de expressão gênica de SREBP-1c e FAS. A viabilidade celular foi reduzida significativamente e a expressão dos genes também sofreu alteração significativa em relação ao grupo controle, indicando que esses hidrolisados são capazes de atuar no metabolismo de ácidos graxos (SANTILLO *et al.*, 2019).

Por outro lado, SREBP-2 é um fator de transcrição chave no metabolismo do colesterol e controla a expressão de genes envolvidos no seu metabolismo, incluindo receptor de LDL, PCSK9 e HMG-CoA redutase. Células HepG2 tratadas com o peptídeo GQEQSHQDEGVIVR oriundo da proteína do tremoço apresentaram aumento da expressão da proteína SREBP-2 e consequentemente um aumento da expressão de receptores de LDL-c (LDLR) em 43%, tendo possível ação hipocolesterolêmica (LAMMI *et al.*, 2019). A regulação positiva da expressão dos receptores de LDL é um dos mecanismos associados à redução do colesterol, pois a remoção do LDL do plasma, um processo dependente de receptor é essencial para manutenção da homeostase do colesterol (BOACHIE; YAO; UDENIGWE, 2018; LAMMI *et al.*, 2019).

A degradação dos LDLR ocorre devido à ação da pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), que é regulada por seu prodomínio N-terminal, que quando clivado leva a ativação da proteína. A PCSK9 liga-se ao LDLR resultando na degradação dos LDLR nos endossomos e inibição de sua reciclagem. Peptídeos com semelhança estrutural com o prodomínio ou com o domínio de interação da PCSK9 com a LDLR podem inibir a atividade desta enzima e reduzir os níveis de colesterol plasmático (BOACHIE; YAO; UDENIGWE, 2018). Estudo *in silico* e *in vitro* demonstrou que peptídeos de tremoço (GQEQSHQDEGVIVR e LILPKHSDAD) eram capazes de inibir a interação PCSK9-LDLR. O peptídeo mais ativo LILPKHSDAD aumentou em 66% a capacidade de captação de LDL das células HepG2 em relação ao controle além de reduzir a expressão de PCSK9 em hepatócitos (LAMMI *et al.*, 2016; ZANONI *et al.*, 2017). LILPKHSDAD também diminuiu os níveis do fator nuclear de hepatócitos 1a (HNF1a), que regula a expressão de PCSK9, o que resultou na diminuição do nível da proteína PCSK9 sem afetar diretamente LDLR e HMG-CoA redutase, que são regulados por SREBP2 (ZANONI *et al.*, 2017).

A HMG-CoA redutase, principal enzima da síntese do colesterol e principal alvo dos tratamentos farmacológicos, pode ser inibida de maneira competitiva. Os peptídeos LPYP, LPYPR e SPYPR foram os primeiros peptídeos descritos com essa capacidade. Eles foram isolados e identificados após hidrólise enzimática da glicinina da soja e demonstraram capacidade hipocolesterolêmica (KWON *et al.*, 2002), posteriormente também na glicinina foi identificado o IAVPGEVA com capacidade de inibir a atividade da HMG-CoA redutase em 75% (PAK *et al.*, 2005a). Os autores também verificaram que o fragmento IAVP, apresentou IC₅₀ de 59,3 µM, sendo capaz

de inibir a enzima de forma competitiva em ambos os sítios catalíticos, do substrato HMG-CoA e do cofator NADPH (PAK *et al.*, 2005b).

Marques *et al.* (2015b), verificaram no hidrolisado proteico total do feijão-caupí, a presença do peptídeo GCTLN, capaz de interagir *in silico* com o sítio ativo do cofator da enzima, competindo com o NADPH. Também utilizando ferramentas computacionais, os peptídeos IAF, QGF e QDF foram identificados na globulina 7S do feijão caupí e apresentaram capacidade de interagir com o sítio catalítico do substrato, além disso, *in vitro*, na concentração de 500 μM , eles foram capazes de reduzir em 69, 77 e 78% a atividade da enzima, respectivamente (SILVA *et al.*, 2021b).

A análise do acoplamento molecular das sequencias peptídicas pGluDF e GSTLN, análogas aos peptídeos identificados nas proteínas do feijão-caupí, demonstrou que esses peptídeos eram capazes de interagir com o sítio catalítico do substrato e do cofator respectivamente. Além disso, juntos, ambos na concentração de 50 μM , eles foram capazes de inibir cerca de 55% da atividade enzimática, atividade maior do que a verificada para estes peptídeos isoladamente (SILVA *et al.*, 2021a).

Recentemente, Pak *et al.* (2021) utilizaram abordagens *in silico*, para selecionar tripeptídeos capazes de inibir a atividade da HMG-CoA redutase. Foram propostos cinco tripeptídeos baseados em peptídeos desenhados em estudos anteriores do mesmo grupo, usando o ácido glutâmico (E) na região C-terminal. Todos os peptídeos projetados, YIE, YLE, YVE, YAE e YGE foram capazes de inibir competitivamente a atividade da HMG-CoA redutase *in vitro*, ademais o peptídeo YIE apresentou grande potencial hipocolesterolêmico, com IC_{50} de 0,7 μM .

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Proteína purificada

A proteína β -vignina, obtida a partir de sementes do feijão-caupí (*Vigna unguiculata*, L. Walp), foi previamente purificada por Silva *et al* (2018).

4.2 Simulação da digestão gastrointestinal e fracionamento

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

4.3 Acoplamento molecular de peptídeos no sítio catalítico da HMG-CoA redutase

Os peptídeos com elevada predição de interação ($p \leq 0,1000$) com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase, a partir do modelo de interação do inibidor comercial sinvastatina (*PDB ID: 1HW9*) (SILVA *et al.*, 2018) e seus análogos tiveram seu modo de interação predito por meio da análise de acoplamento molecular, utilizando o protocolo de encaixe de ajuste induzido. A região de interação foi definida a partir das coordenadas cristalográficas ($X = 3,93$, $Y = -9,20$, $Z = -11,33$) da sinvastatina (*PDB ID: 1HW9*). Em seguida, as dimensões da caixa de busca (10-14 Å) foram otimizadas utilizando o programa AutoDock-VINA® (versão 4.2.6), sendo consideradas as poses mais próximas ($\text{RMSD} \leq 2,0$ Å) daquela observada com a sinvastatina (TROTT; OLSON, 2010). As 4 posições com maiores probabilidades foram consideradas na etapa de análise visual.

4.4 Síntese de peptídeos

Os peptídeos foram sintetizados empregando a metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) e utilizando o grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) como grupo protetor do α -amino. Protetores ácido-lábil, geralmente derivados do grupo t-butil (t-Bu), nas cadeias laterais dos aminoácidos também foram empregados. A SPFS fundamenta-se no crescimento da cadeia peptídica, resíduo por

resíduo, ao aminoácido C-terminal ligado covalentemente pelo seu grupamento carboxila aos sítios reativos existentes em um suporte sólido (resina) (MERRIFIELD, 1963).

Para obtenção dos peptídeos com a carboxila C-terminal livre, foi utilizada a resina Wang já ligada ao primeiro Fmoc-aminoácido. Para os acoplamentos foram utilizados Fmoc-aminoácidos e agentes de ativação dos grupos carboxilas (N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt)) com duas vezes de excesso em relação ao teor de grupos ativos livres na resina.

Antes do acoplamento de cada aminoácido, para realizar a desproteção do grupo α -amino do aminoácido anterior, foram realizadas lavagens com 20% 4-metilpiperidina/DMF durante 1 e 20 min. Após cada etapa de acoplamento e desproteção foram efetuadas lavagens com N,N-dimetilformamida (DMF) para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos.

Após cada uma das etapas de acoplamento e desproteção, foi realizado o teste de ninidrina, para verificar a eficiência destas etapas. Este reagente, a altas temperaturas, reage com grupos amino livres, produzindo um composto de cor violeta (KAISER *et al.*, 1970).

4.5 Reação de clivagem

Para separar o peptídeo da resina (suporte sólido), é realizada uma reação de clivagem. A reação aconteceu com o uso de diferentes reagentes, o ácido trifluoracético (TFA), responsável pela clivagem, o triisopropilsilano (TIS), o 1,2-etanoditiol (EDT) e a água ultrapura, que agem 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 por 2 h em temperatura ambiente. Após esse período, água ultrapura e acetonitrila (50:50, v/v) foram adicionadas à solução, seguida de agitação em vórtex e centrifugação para separar a resina do peptídeo. O sobrenadante contendo o peptídeo bruto foi então liofilizado, obtendo-se um composto branco floculoso denominado de bruto.

4.6 Purificação e caracterização dos peptídeos

Após a clivagem, os peptídeos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu Prominence®) em sistema semipreparativo utilizando coluna em fase reversa (Jupiter Proteo Phenomenex®) de tamanho 25 x 1,0 cm, e diâmetro de partícula de 10 µm. A detecção do material eluído foi realizada em 220 nm. O sistema de solventes utilizado foi: A (0,045% de ácido trifluoracético em água ultrapura) e B (0,036% de ácido trifluoracético em acetonitrila), com fluxo de 5 mL/min. O gradiente utilizado variou de peptídeo para peptídeo (Tabela 1). Após a separação e liofilização dos materiais obtidos, a análise de pureza de cada fração foi realizada por CLAE em um aparelho analítico Shimadzu, com coluna 150 x 4,6 mm, de fase reversa C18 Ultrasphere Phenomenex, tamanho da partícula de 5 µm, detecção em 220 nm, utilizando um programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min com fluxo de 1 mL/min.

A identidade do material obtido foi confirmada por meio da obtenção da massa molar do material em um espectrômetro de massas com metodologia “Ion trap” (Thermo LCQ-fleet) com ionização electrospray positiva.

Tabela 1 – Gradiente de purificação dos peptídeos.

Peptídeo	Gradiente (Solvente B)	Tempo de Corrida (min)
QDF	10 a 40 %	150
MPNY	10 a 40 %	90
QDY	5 a 35 %	120
NDF	10 a 40 %	90
NDY	5 a 35 %	90
pGluDF	10 a 40 %	150
GSTLN	2 a 30 %	120
QDFGSTLN	15 a 55 %	90
pGluDFGSTLN	20 a 50 %	90
QDF-espaçador1-GSTLN	15 a 55 %	90
pGluDF-espaçador1-GSTLN	20 a 50 %	90
QDF-espaçador2-GSTLN	20 a 50 %	90
pGluDF-espaçador2-GSTLN	20 a 50 %	90

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

A atividade inibitória dos fracionados proteicos (0,5 mg/proteína/mL) e dos peptídeos foi avaliada em ensaios *in vitro*, utilizando kit *HMG-CoA reductase assay* (Sigma Aldrich®), em triplicata, de acordo com metodologia proposta por Hulcher e

Oleson (1973). A metodologia consiste na medida espectrofotométrica da redução da absorbância em 340 nm. O decréscimo da absorção representa a oxidação do NADPH, de acordo com a seguinte reação:



A leitura da absorbância foi realizada utilizando um espectrofotômetro UV/Vis (PerkinElmer, Lambda 1050). Os ensaios foram realizados no modo de leitura cinética, durante 5 min, com medidas de absorbância a cada 5 s. A pravastatina foi utilizada como controle positivo de inibição.

A atividade específica da enzima foi definida como: μmol de NADPH oxidado/min/mg proteína. Os resultados foram expressos em percentuais de inibição, com base no controle sem inibidor, considerado com 100% de atividade. Para os peptídeos que apresentaram maiores atividades inibitórias (NDY, pGluDF e pGluDF-espaçador1-GSTLN), foram obtidas curvas analíticas com diferentes concentrações de cada peptídeo, relacionando o logaritmo da concentração pelo percentual de inibição. Do gráfico obtido foi calculada a concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática (IC_{50}).

4.8 Ensaios de viabilidade celular

A viabilidade celular das linhagens tumorais HepG2 (hepatocarcinoma humano), Caco2 (carcinoma de cólon) e A204 (rabdmiossarcoma) foi determinada pelo ensaio de óxido-redução da resazurina de acordo com os procedimentos descritos por Pagé, Pagé e Noel (1993) e adaptados por De Grandis *et al.* (2017).

As células foram incubadas sob condições padronizadas de cultivo celular (37 °C, 5% CO_2 , 95% de umidade), em garrafas de cultivo de 75 cm^2 , contendo meio de cultura DMEM (Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®). As células foram recolhidas das garrafas de cultivo utilizando 2 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco®), centrifugadas a 200 x *g* por 5 min e contadas em câmara Neubauer, pelo método de exclusão com solução de azul de Trypan a 0,004% (Sigma Aldrich®), que cora as células inviáveis, em seguida, ajustou-se a concentração para $7,5 \times 10^4$ células/mL. As células foram subcultivadas em microplacas de 96 poços obtendo-se uma concentração celular de $1,5 \times 10^4$ células/poço, e incubadas sob as condições padronizadas de cultivo, durante 24 horas para permitir a aderência celular. Para o

tratamento, as amostras (QDF, MPNY e sinvastatina) foram preparadas de forma que pôde-se realizar seis diluições na microplaca, a fim de se obter concentrações de 2 a 250 μ M. O controle negativo (CN) foi composto por células que receberam apenas meio de cultura e o controle positivo (CP) recebeu o agente citotóxico metilmetanosulfonato (MMS, 300 μ M). As células foram incubadas por 24 h.

Após esse período, o meio de cultura foi removido, e logo em seguida foram adicionados 50 μ L de cloridrato de resazurina 0,01% (Sigma–Aldrich®). As placas foram novamente incubadas por 2 h e, em seguida, procedeu-se a leitura da fluorescência em leitor de microplacas Synergy H1 (BioTek®) em filtros de excitação e de emissão nos comprimentos de onda de 530 e 590 nm, respectivamente. Em células metabolicamente ativas, a resazurina (de coloração azul não fluorescente) é reduzida a um composto fluorescente de coloração rosa, denominado resorufina. Com isso, a intensidade de fluorescência é proporcional ao número de células viáveis. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos pela porcentagem de viabilidade celular calculada com base na fluorescência emitida pelo controle negativo, considerada como 100% de viabilidade.

4.9 Análise *in vivo*

4.9.1 Animais, dietas e protocolo experimental

O efeito da administração por via oral dos peptídeos QDF, MPNY e do fármaco comercial Sinvastatina® foi avaliado em ratos submetidos à dieta hiperlipídica durante 21 dias. Ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *Albinus*), com 40 dias de idade e peso médio de 180 g, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia (UFBA) foram utilizados no experimento.

Antes do início do experimento, os animais permaneceram por uma semana no local do experimento, à temperatura controlada de 22 ± 2 °C, com ciclo de claro-escuro de 12 h, recebendo ração comercial Purina® e água *ad libitum*, para adaptação e aquisição do peso ideal.

Todos os procedimentos realizados com os animais foram executados de acordo com o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1985), após análise e aprovação pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, sob parecer protocolado de número 91/2018 (Anexo A).

Todos os animais foram alimentados, *ad libitum*, por sete dias com ração hiperlipídica, enriquecida com sebo hidrogenado (35 g/100 g) e ácido cólico (0,1 g/100 g) para induzir ao estado de dislipidemia, a dieta foi produzida pela empresa PragSoluções® Ltda, composição descrita na Tabela 2, seguindo metodologia descrita por Ferreira *et al.* (2015) com modificações. Após esse período foram divididos em quatro grupos de $n = 7$, de acordo com o tratamento recebido, [1] hipercolesterolêmico (HC, controle positivo), [2] idem a 1 contendo o peptídeo QDF, [3] idem a 1 contendo o peptídeo MPNY, e [4] idem a 1 contendo a sinvastatina (SV). Todos os animais foram alimentados com a dieta hiperlipídica e recebiam água *ad libitum*. Os peptídeos e o fármaco foram administrados diariamente por técnica de gavagem, na concentração de 10 mg/Kg de peso corpóreo dos animais, durante 14 dias. O grupo controle positivo (HC) recebeu uma solução salina (NaCl 0,2 mol/L), nas mesmas condições.

Tabela 2 – Composição da dieta experimental ofertada durante 21 dias.

Ingredientes	Dieta HC (g/100 g)
Amido de Milho	4,85
Caseína	20,00
Amido Dextrinizado	-
Sacarose	30,00
Óleo de Soja	-
Celulose Microcristalina	5,00
Mix Mineral AIN93 G	3,50
Mix Vitamina AIN93	1,00
L Cistina	0,30
Bitartarato de Colina	0,25
Colesterol	-
Ácido Cólico	0,10
Sebo Hidrogenado	35,00

4.9.2 Parâmetros experimentais e análises bioquímicas séricas

Ao longo dos 21 dias, o ganho de massa corporal e a ingestão foram quantificados diariamente, em balança semi-analítica, respeitando sempre o mesmo horário. A ingestão foi determinada pela diferença entre a ração ofertada no dia anterior e a sobra de ração do dia.

Nos dias 0, 7 e 14, os animais permaneceram 12 h em jejum e posteriormente foi realizada a coleta de sangue pela veia caudal. Ao final do experimento (dia 21), os

animais foram deixados em jejum por 12 h e em seguida foram eutanasiados por decapitação. O sangue obtido foi coletado em tubos contendo gel separador, e em seguida centrifugado (1500 rpm/15 min/4 °C) e o soro foi armazenado a – 70 °C, para análises posteriores.

Os níveis de colesterol total, HDL-c, triglicérides e glicose dos animais foram avaliados por espectrofotometria no equipamento Winer CB 330, por meio de reações colorimétricas e enzimáticas, utilizando kits de reagentes da Wiener lab group® e leitura em 505 nm.

O nível sérico de colesterol total é medido pela intensidade de cor vermelha do composto antipirilquinonimina, formado após reações de hidrólise dos ésteres de colesterol, que libera colesterol livre, que será oxidado a colest-4-emona e peróxido de hidrogênio. Este reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando o composto de coloração vermelha.

Para análise do HDL-c, este é solubilizado com um detergente seletivo, em seguida o colesterol dessas partículas é oxidado pela ação da colesterol oxidase, este irá reagir com 4-aminoantipirina e cromogênio disulfobutilmetatoluidina (DSBmT), gerando um produto colorido.

A reação de quantificação dos triglicérides é realizada com a hidrólise deste, liberando ácido graxo e glicerol, que é convertido em glicerol-3-fosfato. Esse composto é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio, que irá reagir com 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, produzindo quinoneimina, produto de cor vermelha.

A dosagem do nível de glicose plasmática acontece por meio de uma reação de oxidação da glicose, gerando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, que irá reagir com 4-aminoantipirina e fenol, formando antipirilquinonimina.

Todos os produtos coloridos formados após as reações são proporcionais à concentração do analito na amostra.

4.10 Análise estatística

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Proteínas de leguminosas apresentam diversas atividades benéficas à saúde reconhecidas. A ação hipocolesterolêmica do isolado proteico total do feijão-caupí tem sido demonstrada em estudos *in vitro* e *in vivo* (FROTA *et al.*, 2008; FROTA *et al.*, 2015; MARQUES *et al.*, 2015a; MARQUES *et al.*, 2018). Além disso, a proteína β -vignina isolada e hidrolisada também mostrou capacidade de regular o metabolismo lipídico em ratos hipercolesterolêmicos (FERREIRA *et al.*, 2015). Estudos preliminares indicam que esse efeito está diretamente relacionado a peptídeos de tamanho entre 3 a 20 resíduos de aminoácidos originados a partir da hidrólise dessas proteínas (PAK *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2021b). Devido à importância desses resultados, diversos estudos têm investigado a ação dos peptídeos e seus mecanismos de ação.

5.1 Ensaio *in vitro* da inibição da HMG-CoA redutase por frações peptídicas

A fim de investigar o possível mecanismo hipocolesterolêmico da proteína β -vignina, esta foi purificada e caracterizada a partir da farinha obtida pela pulverização do feijão-caupí (SILVA *et al.*, 2018). Posteriormente, a proteína foi hidrolisada, simulando a digestão gástrica, pela ação sequencial das enzimas pepsina/pancreatina e o hidrolisado proteico obtido foi fracionado por ultrafiltração.

As frações proteicas de diferentes massas molares foram avaliadas *in vitro*, utilizando método espectrofotométrico, quanto a sua capacidade de inibir a atividade da enzima HMG-CoA redutase. Os resultados dos ensaios de inibição enzimática são apresentados na Tabela 3.

O hidrolisado total da proteína β -vignina do feijão caupí apresentou capacidade de inibir a enzima HMG-CoA redutase com valor superior a 95%. Além disso, todas as frações foram capazes de reduzir a atividade da enzima, e dentre as frações com diferentes massas molares obtidas, a fração formada por peptídeos menores do que 3 kDa apresentou a maior atividade inibitória (95%). Esse resultado foi semelhante ao reportado por Silva *et al.* (2021b), que utilizou o mesmo mecanismo enzimático e processo de fracionamento para obtenção da fração peptídica menores do que 3 kDa que reduziu 90% da atividade enzimática. Estudo anterior verificou atividade inibitória de 89% para essa fração, porém, os autores utilizaram como material de partida um hidrolisado obtido a partir do isolado proteico total do feijão caupí (MARQUES *et al.*, 2015a). Os resultados mostraram que, essa fração poderia conter as principais sequências responsáveis pela atividade do hidrolisado total.

Tabela 3 – Inibição da atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase.

Amostra	Concentração de inibidor	Inibição (%)
Controle	-	0 ^a
Pravastatina	0,5 µM	97,51 ± 0,0012 ^b
Hidrolisado Total	500 µg/mL	95,29 ± 0,0021 ^{b,f}
Peptídeos > 30 kDa	500 µg/mL	62,81 ± 0,0029 ^c
Peptídeos 30 < 10 kDa	500 µg/mL	12,58 ± 0,0105 ^d
Peptídeos 10 < 3 kDa	500 µg/mL	59,78 ± 0,0159 ^e
Peptídeos < 3 kDa	500 µg/mL	95,02 ± 0,0012 ^f

No entanto, a purificação dos peptídeos da fração contendo peptídeos de massa molar menor que 3 kDa não foi satisfatória, não sendo obtidos materiais puros em quantidade considerável. Desta forma, métodos alternativos foram avaliados para a procura de peptídeos com atividade hipocolesterolêmica.

5.2 Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos

Devido à dificuldade na obtenção de peptídeos do hidrolisado da proteína β-vignina, ferramentas alternativas foram utilizadas. O uso de metodologias *in silico* tem se mostrado eficiente na triagem de peptídeos com atividades biológicas (SILVA *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2021). Utilizando essas ferramentas, Silva *et al.* (2018) e Silva *et al.* (2021a) selecionaram as sequências QDF e MPNY, oriundas da hidrólise *in silico* da β-vignina, que apresentaram alta probabilidade de interagir com o sítio catalítico da enzima, de maneira semelhante às interações realizadas pelo fármaco comercial sinvastatina.

No peptídeo QDF, já estudado anteriormente somente *in silico* e *in vitro*, a fenilalanina (F) ocupa a mesma posição do anel decalina, uma vez que ambos têm características hidrofóbicas e na forma cíclica. A glutamina (Q) realiza interações polares semelhantes às do grupo carboxila da sinvastatina, além disso, realiza uma ligação de H com o resíduo Lys692 da HMG-CoA redutase, ao invés de Arg590. Uma diferença significativa foi observada nas interações que o resíduo aspártico (D) do peptídeo realiza, este demonstrou estar há uma distância mais adequada para realizar ligação de H com o resíduo Ser589 do que a sinvastatina, devido à presença de um grupo apolar na região do sítio ativo.

O peptídeo MPNY, cuja sequência foi citada por Silva *et al.* (2018) e Silva *et al.* (2021a), mas não avaliada *in vivo*, realiza interações menos favoráveis que o QDF,

no entanto, possui interações com o sítio catalítico da enzima, semelhantes às realizadas pela sinvastatina. A tirosina (Y) realiza interações polares com os resíduos Ser684 e Asp690 e a carboxila da asparagina (N) faz uma ligação de H com o Asn765. Além disso, a metionina (M) realiza interações hidrofóbicas com o sítio ativo da HMG-CoA redutase.

As interações favoráveis que esses peptídeos realizam com a enzima HMG-CoA redutase e o fato de que peptídeos curtos serem descritos como promissores candidatos a fármacos, devido à baixa toxicidade e biodisponibilidade oral, nos levaram a estudar (PAK *et al.*, 2021; SOARES *et al.*, 2015) as sequências QDF e MPNY *in vitro*. Neste sentido, estes peptídeos foram sintetizados manualmente pelo método da síntese de peptídeo em fase sólida (MERRIFIELD, 1963) e avaliadas quanto a capacidade de inibir a HMG-CoA redutase *in vitro* e de modular o metabolismo lipídico *in vivo*.

As sínteses das sequências peptídicas QDF e MPNY foram eficientes, pois os peptídeos puros foram obtidos com rendimento acima de 40% e as massas molares teóricas foram confirmadas por meio da espectrometria de massas.

Os materiais brutos obtidos foram purificados e os dados de pureza e as massas molares obtidas estão colocadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Dados de purificação e caracterização dos peptídeos QDF e MPNY.

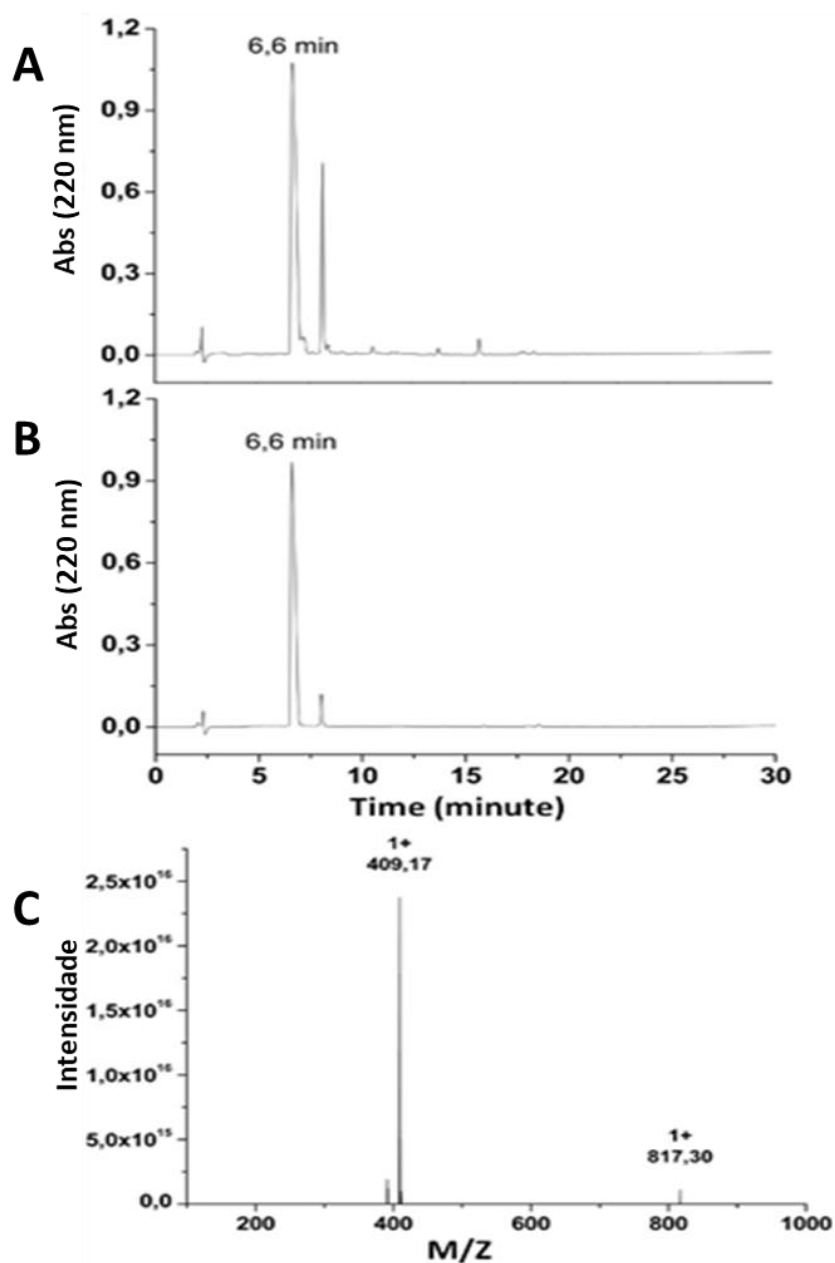
Peptídeo	Pureza (%)	MM teórica (g/mol)	MM obtida (g/mol)
QDF	95,6	408,41	409,17
MPNY	99,9	523,60	524,20

*MM - Massa Molar

O peptídeo QDF apresentou uma pureza menor (95,6%), quando comparado com o peptídeo MPNY, devido a presença de um pico em 7,9 min. A avaliação deste material por espectrometria de massas sugere que, o aminoácido glutamina que se encontra na posição N-terminal sofre ciclização em sua cadeia lateral, formando um ácido piroglutâmico (pGlu). Essa modificação já foi encontrada em outros estudos e é acelerada em meios ácidos, alcalinos ou em altas temperaturas (PURWAHA *et al.*, 2014). O contaminante obtido mostrou massa molar de 391,40 g/mol, idêntica a teórica para o peptídeo pGluDF.

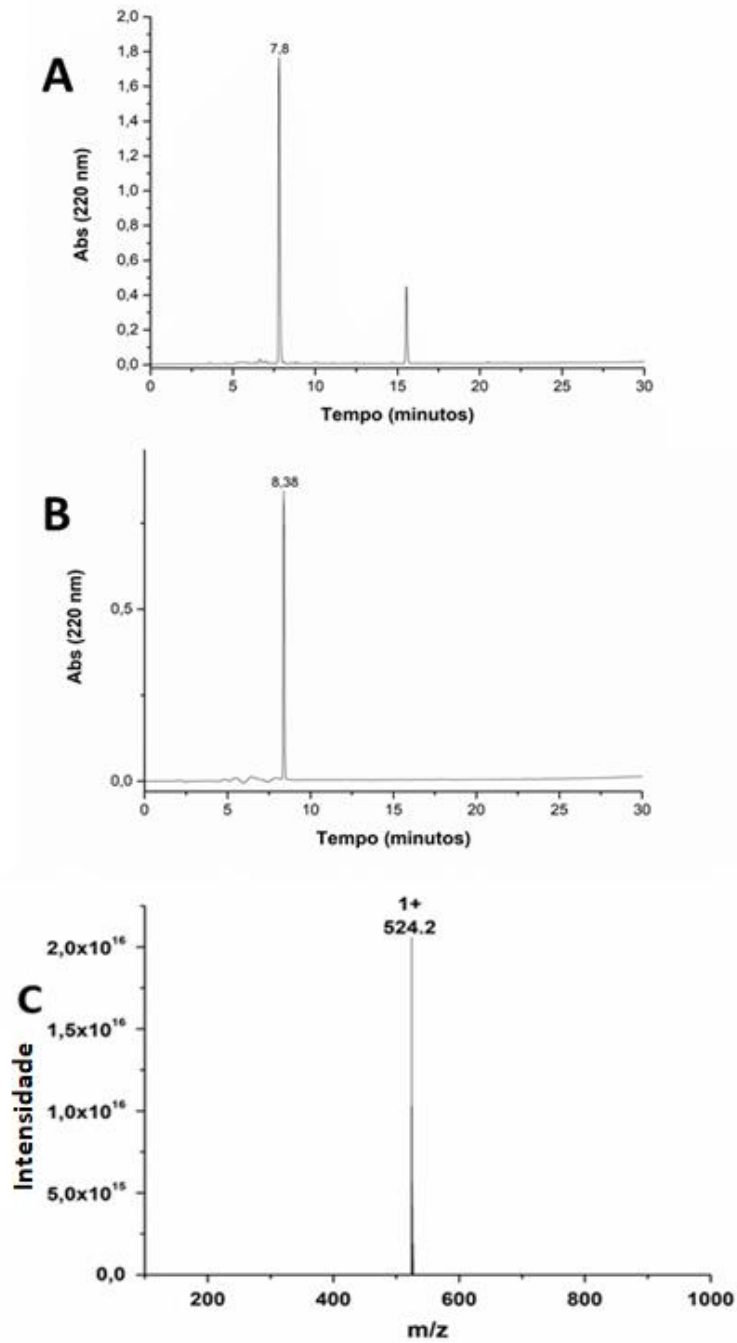
Nas Figuras 11 e 12 estão representados os cromatogramas dos materiais brutos e puros e os espectros de massas obtidos na síntese dos peptídeos QDF e MPNY, respectivamente.

Figura 11 – Perfis cromatográficos do peptídeo QDF (A) bruto e (B) puro e (C) espectro de massas obtido*.



*MW = 409,17 g/mol

Figura 12 – Perfis cromatográficos do peptídeo MPNY (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido*.



*MW = 523,60 g/mol

5.3 Ensaio *in vitro* da inibição da HMG-CoA redutase pelos peptídeos QDF e MPNY

Após a obtenção dos peptídeos puros, foi possível confirmar a capacidade destes em reduzir a atividade da enzima HMG-CoA redutase *in vitro*. Os peptídeos foram testados na concentração de 100 μM e suas atividades hipocolesterolêmicas estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Inibição da atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase pelos peptídeos QDF e MPNY.

Amostra	Concentração de inibidor	Inibição (%)
Controle	-	0 ^a
Pravastatina	0,5 μM	94,7 $\pm$ 0,0221 ^b
QDF	100 μM	45,7 $\pm$ 0,0823 ^c
MPNY	100 μM	22,9 $\pm$ 0,1750 ^d

De forma semelhante às frações proteicas, os peptídeos demonstraram exercer efeito inibitório da atividade enzimática. Na concentração de 100 μM , os peptídeos QDF e MPNY inibiram, respectivamente, 45,7 e 22,9% da atividade da enzima. Entretanto, Silva *et al.* (2018), relataram que o QDF apresentou um IC_{50} de 12,84 μM , atividade superior à encontrada. Em outro trabalho, Silva *et al.* (2021a), verificou que o peptídeo MPNY, na mesma concentração inibiu 38,1% da atividade da HMG-CoA redutase. As diferenças encontradas, apesar de não esperadas, podem ser explicadas devido a diferenças nos kits utilizados para análise e em seu armazenamento.

Sequências peptídicas obtidas da proteína glicinina (11S) da soja, IAVP, IAVPTGVA e IAVPTGEVA, apresentaram um IC_{50} de 59, 93 e 125 μM , respectivamente, frente à capacidade de inibição contra a HMG-CoA redutase (PAK *et al.*, 2005b). Os peptídeos YVNPNDNEN e YVNPNNEN, identificados na β -conglícinina (7S) da soja, exibiram um IC_{50} de 150 e 200 μM respectivamente (LAMMI *et al.*, 2015). Desta forma, os peptídeos acima descritos apresentaram atividade superior aos peptídeos oriundos de leguminosas, encontrados na literatura.

5.4 Ensaios de viabilidade celular

A toxicidade desses dois peptídeos (QDF e MPNY) até o momento não tinham sido avaliadas. Neste sentido, a citotoxicidade destes e da sinvastatina (controle) foram avaliadas por meio da viabilidade celular das linhagens de células de carcinoma

hepatocelular humano (HepG2), carcinoma de cólon (Caco2) e de rabdomiossarcoma (A204). As linhagens foram escolhidas por corresponderem aos tecidos relacionados aos efeitos adversos mais comuns associados ao consumo das estatinas. As concentrações usadas variaram de 2 a 250 μM . O percentual de viabilidade foi quantificado pelo método de resarsurina (PAGE; PAGE; NOEL, 1993). Os resultados dos ensaios de viabilidade celular são apresentados nas figuras 13, 14 e 15.

Figura 13 – Viabilidade de células da linhagem HepG2 frente à sinvastatina e aos peptídeos QDF e MPNY.

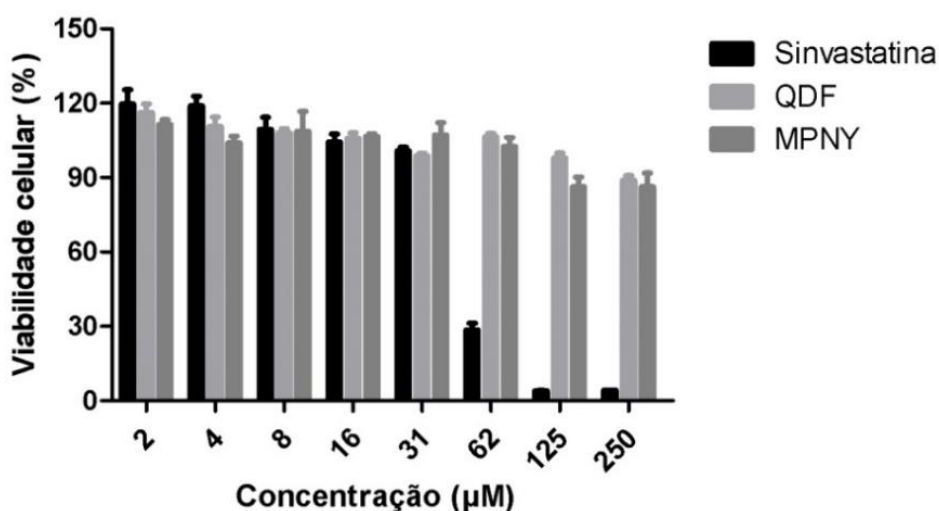


Figura 14 – Viabilidade de células da linhagem Caco2 frente à sinvastatina e aos peptídeos QDF e MPNY.

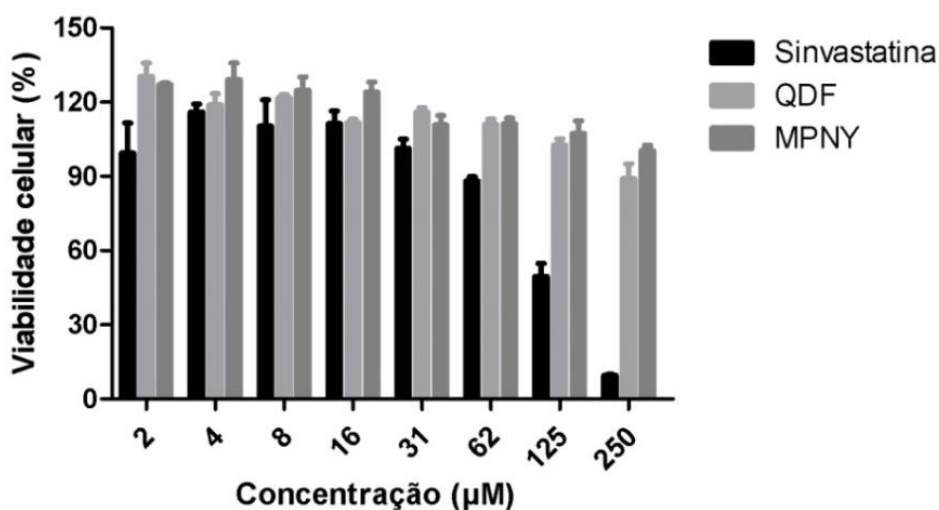
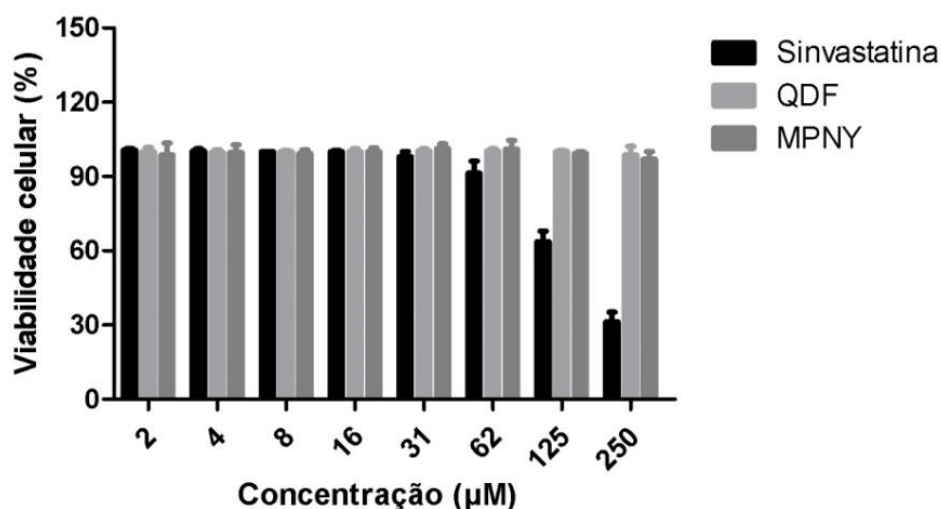


Figura 15 – Viabilidade de células da linhagem A204 frente à sinvastatina e aos peptídeos QDF e MPNY.



Os resultados mostraram que ambos os peptídeos são seguros, mesmo na mais alta concentração testada (250 µM). A viabilidade das linhagens celulares HepG2 manteve-se próxima à 90%, já a Caco2 apresentou viabilidade entre 95 e 100% enquanto a linhagem A204 mostrou aproximadamente 96% de viabilidade. Por outro lado, na mesma concentração de sinvastatina, as viabilidades das linhagens HepG2, Caco2 e A204 foram, respectivamente, de 4, 9 e 31%. Embora sejam o principal tratamento para a hipercolesterolemia, o uso das estatinas está associado à hepatotoxicidade, lesões da musculatura esquelética, entre outros efeitos adversos, cuja relação com o consumo das estatinas não é clara (DENG *et al.*, 2018; THOMPSON *et al.*, 2016).

Os resultados demonstram que embora apresentem IC₅₀ muito superior ao das estatinas, os peptídeos não apresentaram citotoxicidade, mesmo em altas concentrações. Resultado semelhante foi encontrado por Lin *et al.* (2015) que utilizaram a técnica de exibição de fagos para rastrear peptídeos curtos com capacidade de inibir a HMG-CoA redutase. Nesse trabalho os peptídeos TPMASD e PMAS foram capazes de inibir a atividade da enzima, com IC₅₀ de 80 e 68 µM respectivamente, além de não apresentarem citotoxicidade *in vitro* sobre a linhagem celular HepG2.

5.5 Análise *in vivo*

A fim de verificar a atividade desses peptídeos sobre o metabolismo lipídico *in vivo*, as duas sequências foram testadas em ratos. O experimento consistiu na

utilização de 4 grupos de ratos, onde todos foram avaliados no tempo zero e após 7 dias com a dieta hiperlipídica. Após este período eles foram submetidos a diferentes tratamentos:

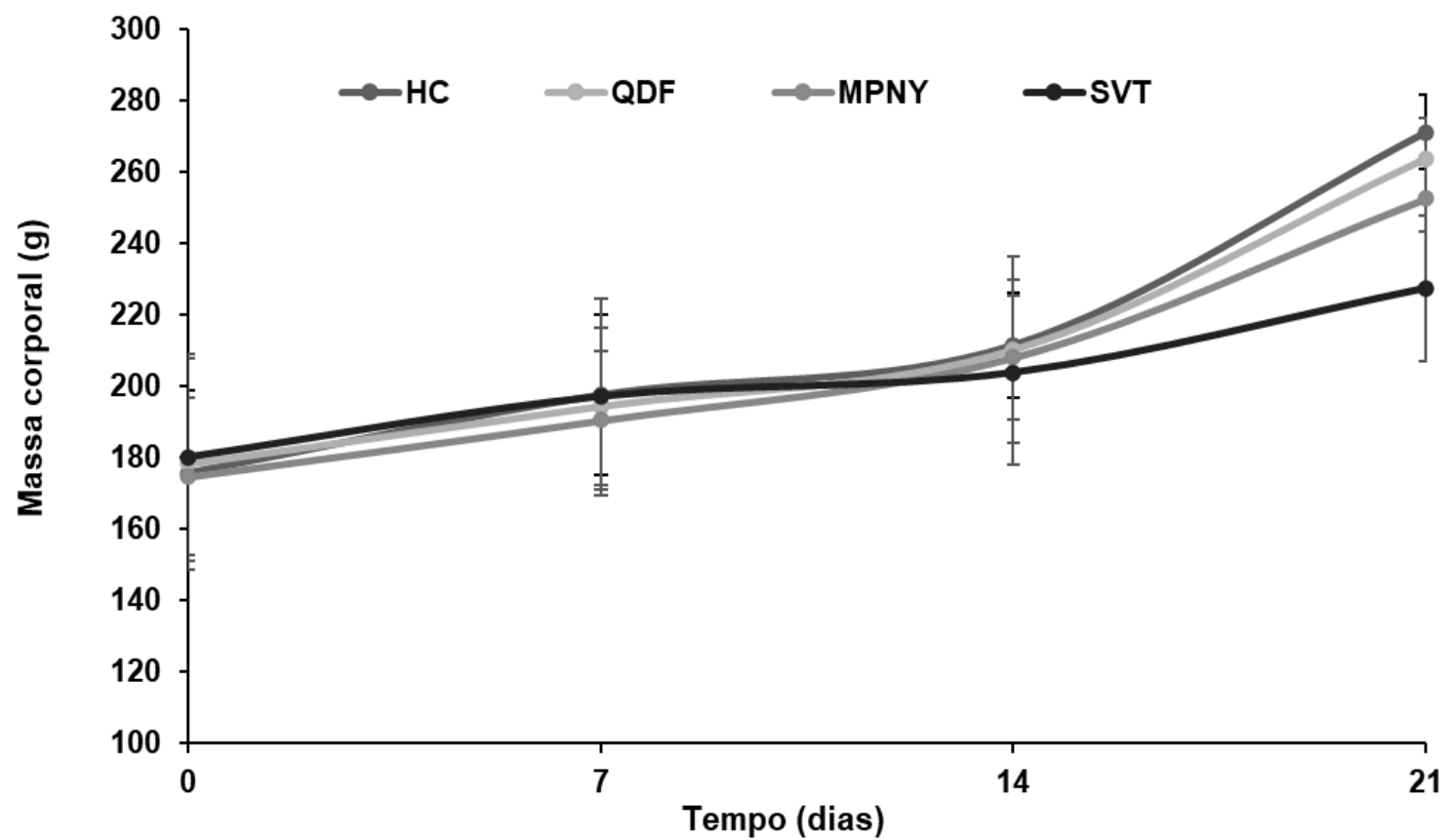
- [1] continuou com a dieta hipercolesterolêmica (HC, controle positivo);
- [2] dieta hipercolesterolêmica + peptídeo QDF;
- [3] dieta hipercolesterolêmica + peptídeo MPNY;
- [4] dieta hipercolesterolêmica + sinvastatina (SV).

Os parâmetros de ganho de peso corporal e consumo alimentar foram avaliados e os resultados apresentados nas Figuras 16 e 17.

Nos sete dias iniciais, onde os animais estavam apenas sendo alimentados com dieta hiperlipídica não houve diferença estatística entre eles com relação ao ganho de peso. Após 14 dias de tratamento, os grupos 1, 2 e 3 tiveram aumentos de 54,3%, 47,9% e 44,5%, respectivamente. Apesar de diferentes esses dados não diferem estatisticamente entre si. Lima *et al.* (2019) também não encontraram diferença estatística de ganho de massa e consumo de ração entre animais tratados com hidrolisados proteicos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e grupo controle HC.

Diferentemente do encontrado para os 3 grupos anteriores, o grupo tratado com o fármaco sinvastatina teve ganho de peso de apenas 26,3%, diferindo dos demais grupos (Figura 16). Ferreira *et al.* (2015) avaliaram o ganho de massa e o consumo de ração de ratos hipercolesterolêmicos, tratados com glubulinas 7S de caupí (7S-C) e adzuki (7S-A) e sinvastatina, e verificou que os grupos tratados com 7S-A e sinvastatina provocaram redução de cerca de 12% do peso corporal dos animais, além da redução da ingestão alimentar, enquanto a 7S-C não apresentou redução. Fassini *et al.* (2011) verificaram que ratos alimentados com dieta hipercolesterolêmica e tratados com glicinina da soja não apresentaram diferença em relação ao ganho de massa, quando comparado com grupo controle sem tratamento, entretanto, mostrou também não haver diferença entre os grupos tratados com glicinina da soja, rosuvastatina e glicinina + rosuvastatina.

Figura 16 – Ganho de massa dos animais (*Rattus norvegicus*) em função do tempo de estudo*



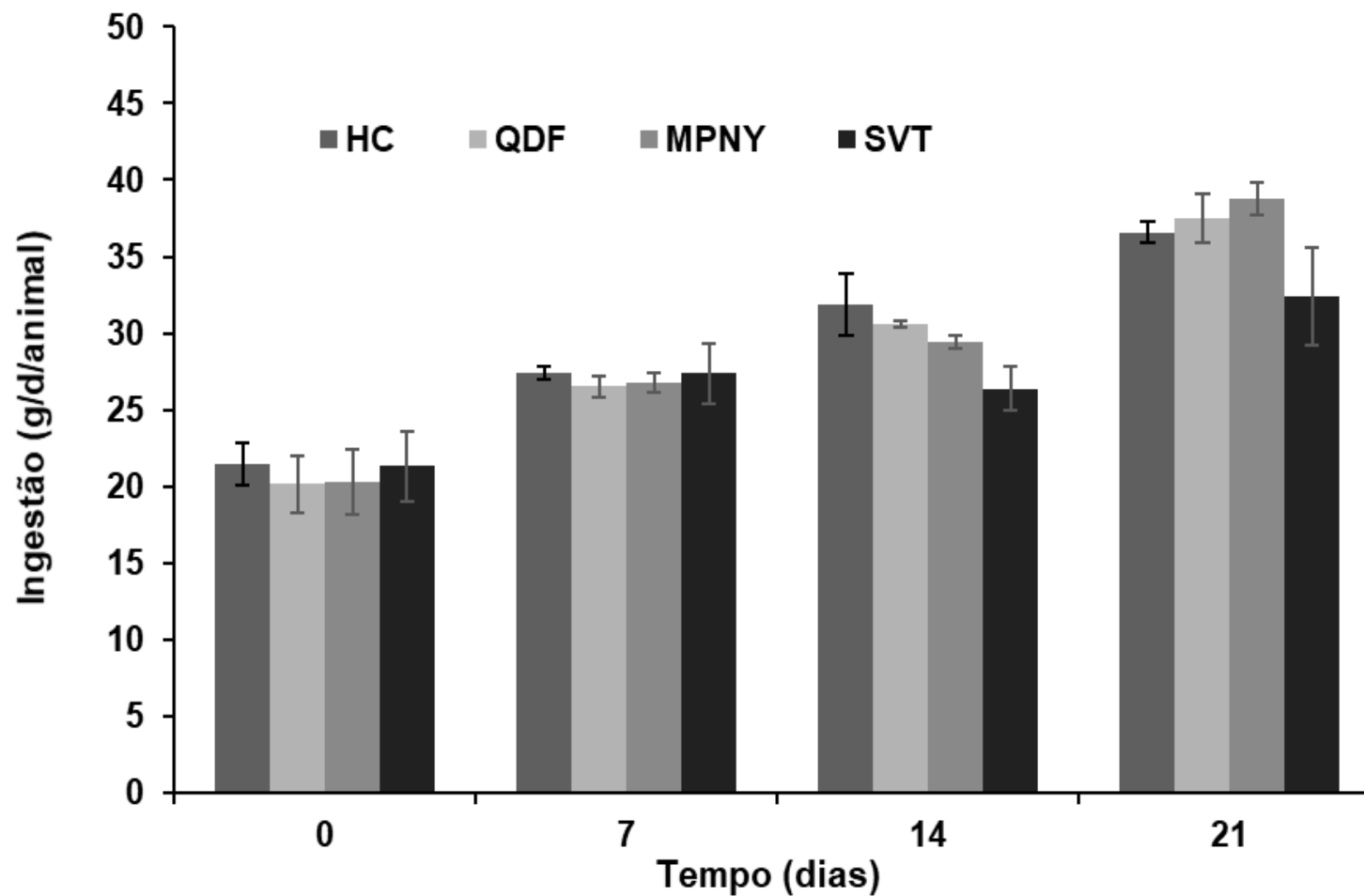
*HC: animais que não receberam tratamento, QDF: animais tratados com o peptídeo QDF, MPNY: animais tratados com o peptídeo MPNY e SVT: animais tratados com o fármaco de referência Sinvastatina.

Com relação ao consumo de ração, a partir do 14º dia, o grupo 4, começou a diferir significativamente dos demais grupos (Figura 17), apresentando ao fim do tratamento um consumo médio de 32,4 g/dia/animal enquanto os ratos dos grupos 1, 2 e 3 consumiram em média 36,6, 37,5 e 38,8 g/dia/animal, respectivamente. O que sugere que o maior ganho de peso observado nestes grupos pode ser consequência do maior consumo de ração.

Os níveis de colesterol total, HDL-c, triglicérides e glicose dos animais foram avaliados por espectrofotometria, por meio de reações colorimétricas e enzimáticas. A Figura 18 apresenta os valores de colesterol total dos quatro grupos de ratos, nos dias 0, 7, 14 e 21 do experimento. É possível verificar ao avaliar o grupo controle, que não houve diferença significativa entre os valores de colesterol total no início (0 dia) e no fim da análise (21 dias), indicando que a dieta hiperlipídica não foi capaz de induzir a hipercolesterolemia nos animais. Além disso, ao fim dos 21 dias os peptídeos QDF e MPNY na dose de 10 mg/kg de peso/dia não foram capazes de reduzir o colesterol total dos animais com relação ao grupo controle, não apresentando diferença estatística entre eles. Apenas o grupo alimentado com a sinvastatina mostrou uma diminuição do colesterol total após 14 e 21 dias. Essa variação pode estar relacionada ao menor IC₅₀ do fármaco e à variação do consumo de ração. Ressaltamos que apesar da atividade dos compostos sobre a HMG-CoA redutase ser diferente, os peptídeos e a sinvastatina foram administrados na mesma concentração de 10 mg/Kg de peso corpóreo dos animais.

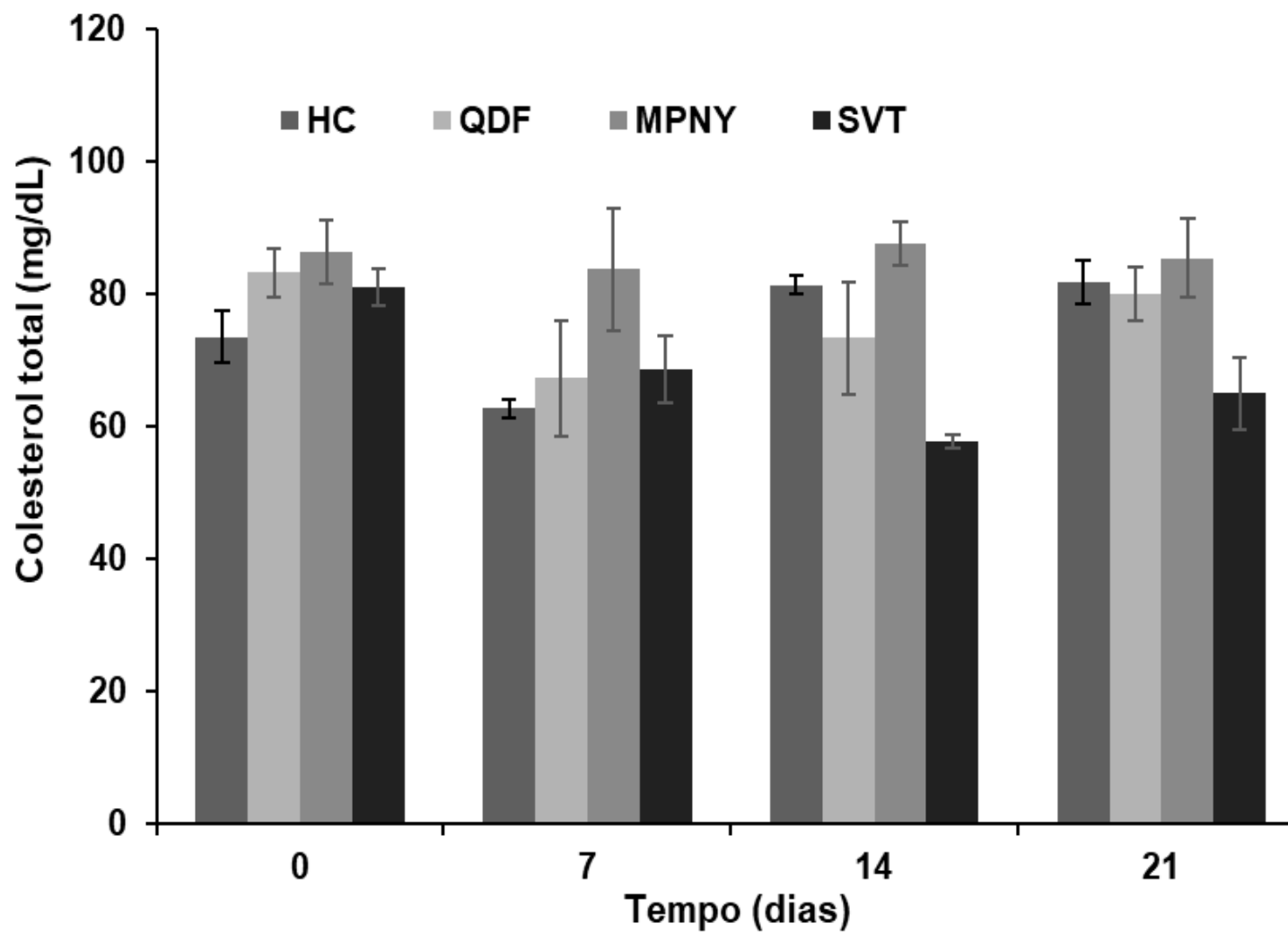
Ferreira *et al.* (2015) verificaram ao fim de 28 dias, que animais alimentados com dieta com adição de 20% óleo de coco, 0,5% ácido cólico e 1% colesterol apresentaram um aumento do colesterol total de cerca de 6 vezes em comparação aos animais que consumiram dieta padrão não hiperlipídica, além disso observou redução de 33% no colesterol total de animais tratados com 200 mg/kg/dia de β -vignina de feijão-caupí, em relação ao grupo controle hipercolesterolêmico. Por outro lado, estudos com camundongos hipercolesterolêmicos, tratados com 700 mg/kg/dia de hidrolisado proteico de feijão comum não mostrou redução dos níveis de LDL-c quando comparado ao grupo controle (GOMES *et al.*, 2020). Desta forma, os estudos realizados por nós foram prejudicados devido ao não aumento de colesterol dos animais no período estudado. Esse fato pode ser atribuído a pouca eficiência da dieta em agir no aumento do colesterol plasmático ou ainda no tempo de estudo.

Figura 17 – Ingestão de ração em grama por animal (*Rattus norvegicus*) em função do tempo de estudo*



*HC: animais que não receberam tratamento, QDF: animais tratados com o peptídeo QDF, MPNY: animais tratados com o peptídeo MPNY e SVT: animais tratados com o fármaco de referência Sinvastatina.

Figura 18 – Colesterol total dos grupos dos animais (*Rattus norvegicus*) em 0, 7, 14 e 21 dias*



*HC: animais que não receberam tratamento, QDF: animais tratados com o peptídeo QDF, MPNY: animais tratados com o peptídeo MPNY e SVT: animais tratados com o fármaco de referência Sinvastatina.

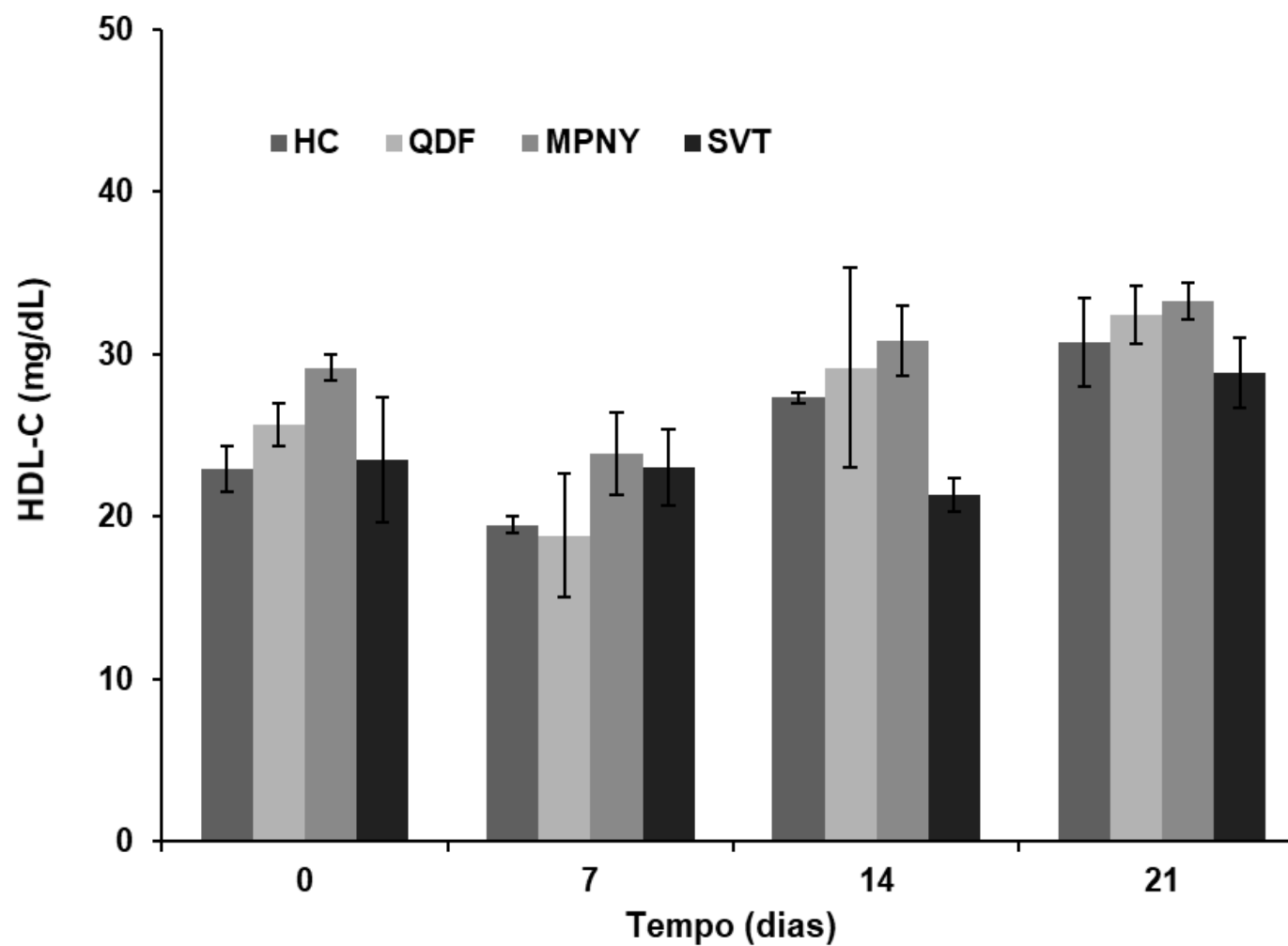
O nível de HDL-colesterol (Figura 19) também não mostrou diferença significativa entre os quatro grupos de animais avaliados.

Com relação aos valores de triglicérides, apresentados na Figura 20, tanto o peptídeo QDF quanto a sinvastatina apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle, reduzindo 30,6% e 31,9% dos triglicérides iniciais, respectivamente. O peptídeo MPNY não diferiu do grupo sem tratamento. A redução encontrada é superior à observado por Fassini *et al.* (2011), que após 28 dias, mostrou diminuição de aproximadamente 23% dos triglicérides em ratos tratados com 300 mg/kg/dia de 11S de soja assim como naqueles tratados com 10 mg/kg/dia de rosuvastatina. Apesar da similaridade de valores, vale lembrar o maior consumo de dieta do grupo tratado com o peptídeo QDF em relação ao tratado com sinvastatina. Estes dados em conjunto podem indicar uma maior atividade do peptídeo em diminuir o triglicéride. No entanto, maiores estudos são necessários para comprovar e esclarecer essa diferença.

A concentração sérica de glicose também foi avaliada e verificou-se que todos os grupos apresentaram aumento no nível de glicose após 21 dias. Foi observado que não houve diferença significativa entre os grupos 1, 2 e 3 do início ao fim do tratamento. Entretanto os animais tratados com sinvastatina apresentaram um aumento de 26,5%, comparado ao grupo controle HC no 21º dia, como pode ser observado na Figura 21. O resultado reforça as evidências de que as estatinas apresentam um pequeno, mas significativo aumento do risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 (RIDKER *et al.*, 2012; SWERDLOW *et al.*, 2015), fato esse possivelmente devido à ligação entre o mecanismo de ação das estatinas e alterações no metabolismo oxidativo do musculo esquelético (MIKUS *et al.*, 2013).

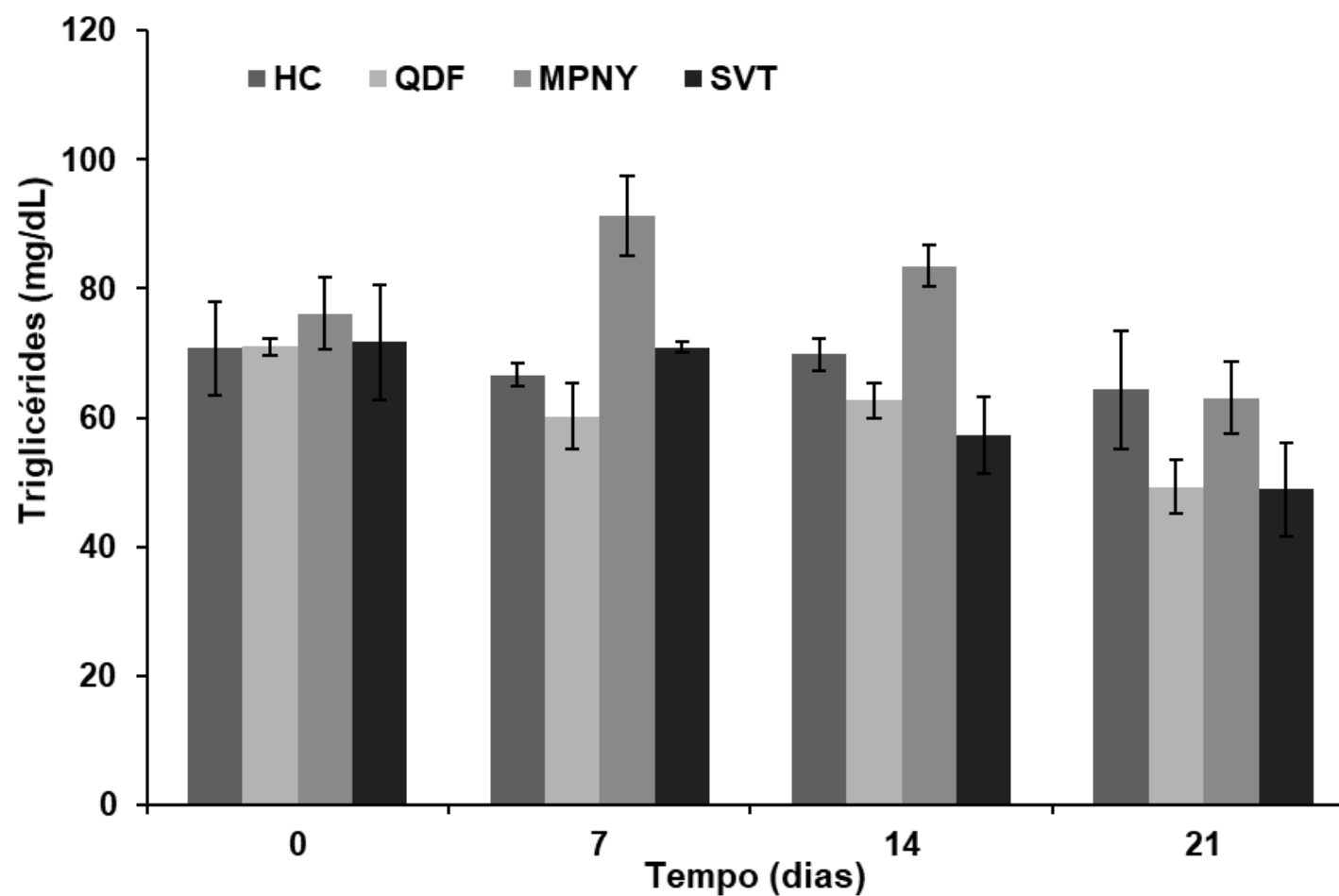
Os dados obtidos *in vivo* não mostraram resultados comprobatórios e diferentes da ação hipercolesterolêmica entre os compostos estudados, provavelmente pelo pouco tempo de exposição aos peptídeos e sinvastatina e pela pouca eficácia da ração hiperlipídica utilizada.

Figura 19 – HDL-colesterol dos grupos dos animais (*Rattus norvegicus*) em 0, 7, 14 e 21 dias*



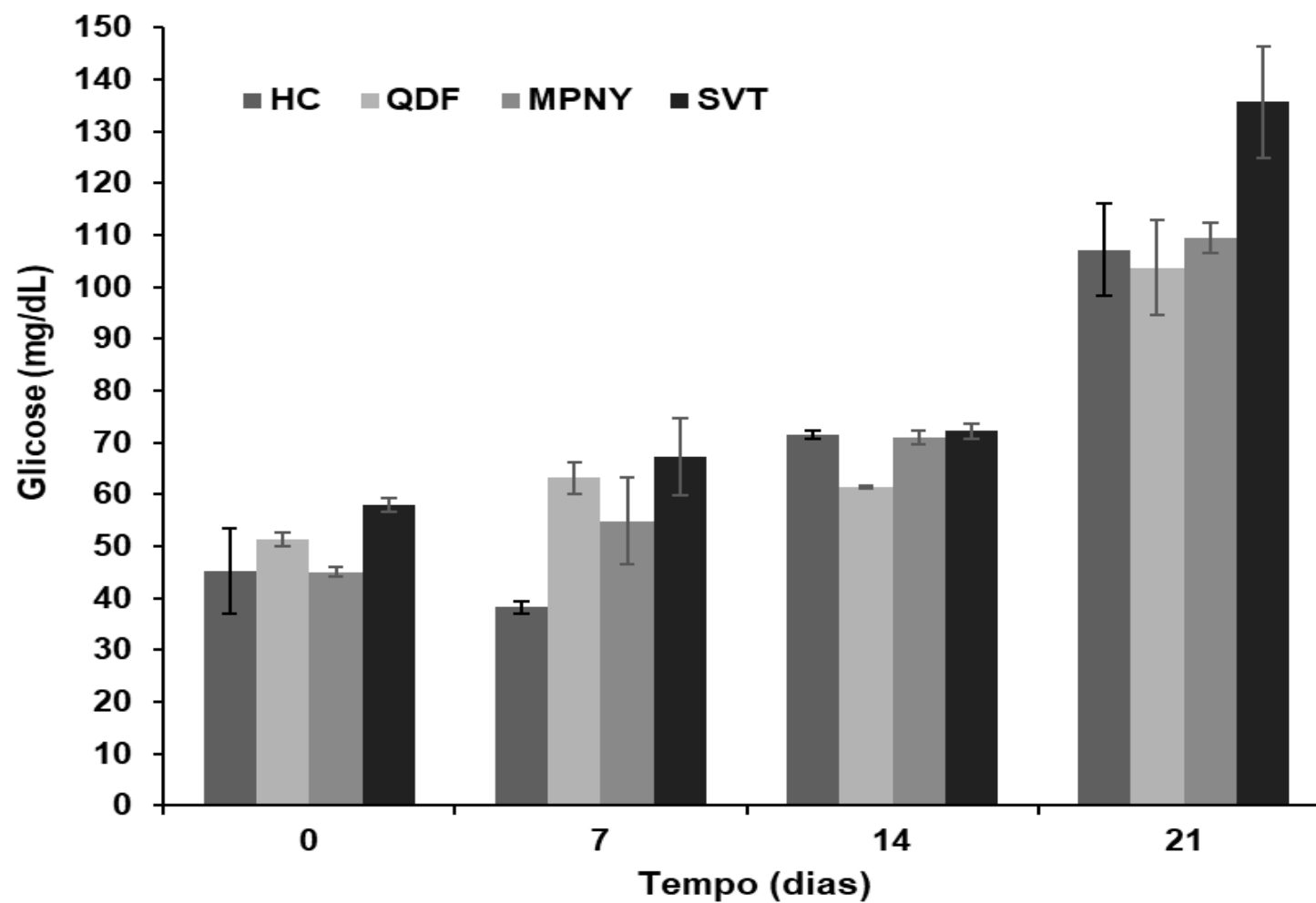
*HC: animais que não receberam tratamento, QDF: animais tratados com o peptídeo QDF, MPNY: animais tratados com o peptídeo MPNY e SVT: animais tratados com o fármaco de referência Sinvastatina.

Figura 20 – Triglicérides dos grupos dos animais (*Rattus norvegicus*) em 0, 7, 14 e 21 dias*



*HC: animais que não receberam tratamento, QDF: animais tratados com o peptídeo QDF, MPNY: animais tratados com o peptídeo MPNY e SVT: animais tratados com o fármaco de referência Sinvastatina.

Figura 21 – Glicose total dos grupos dos animais (*Rattus norvegicus*) em 0, 7, 14 e 21 dias*



*HC: animais que não receberam tratamento, QDF: animais tratados com o peptídeo QDF, MPNY: animais tratados com o peptídeo MPNY e SVT: animais tratados com o fármaco de referência Sinvastatina.

5.6 Acoplamento molecular de peptídeos no sítio catalítico da HMG-CoA redutase

Como o peptídeo QDF apresentou resultados satisfatórios *in silico* e *in vitro*, e positivo sobre a produção de triglicérides *in vivo*, resolvemos desenhar e testar análogos desta molécula a fim de se obter um peptídeo com melhor interação com o sítio catalítico da enzima HMG-CoA redutase e com possível capacidade de modelar o metabolismo lipídico. Inicialmente realizamos modificações pontuais na sequência. Estas modificações foram realizadas por simples substituição de resíduos do peptídeo por outros com as mesmas propriedades físico-químicas e pertencentes ao mesmo grupo ao qual o aminoácido original pertencia. Desta forma, os peptídeos QDY, NDF e NDY foram desenhados. Estes peptídeos possuem a substituição da fenilalanina pela tirosina, o que adiciona ao peptídeo um grupo fenol substituindo o fenil, e/ou uma asparagina substituindo a glutamina. O menor tamanho da Asn poderia facilitar a interação com o sítio catalítico da HMG-CoA redutase. Inicialmente estes peptídeos tiveram sua interação com a HMG-CoA redutase realizada por análise de acoplamento molecular (Figuras 22–26), utilizando o protocolo de encaixe de ajuste induzido (TROTT; OLSON, 2010) no sítio de interação definido a partir das coordenadas cristalográficas da sinvastatina (PDB ID: 1HW9). Para efeito de comparação as análises de docking da sinvastatina e do peptídeo original foram adicionados (Figuras 22 e 23) (SILVA *et al.*, 2018).

A interação do peptídeo QDY com o sítio catalítico é semelhante à realizada pela sinvastatina (Figura 22). A tirosina (Y) mostrou interações polares, da hidroxila do grupo fenol semelhantes ao grupo carboxila do fármaco. A carboxila da glutamina (Q) faz ligação de hidrogênio com o resíduo Asn658. Entretanto, diferente do peptídeo QDF, cuja cadeia lateral da fenilalanina ocupa a mesma região hidrofóbica que o anel de decalina da sinvastatina (Figura 23), o mesmo não ocorre para a tirosina do QDY (Figura 24).

Figura 22 – Análise de docking da sinvastatina com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9). Posição (redocking) da sinvastatina obtida pela modelagem molecular (cinza) e existente na estrutura cristalográfica (amarela) (A) e das interação da sinvastatina no sítio ativo (B).

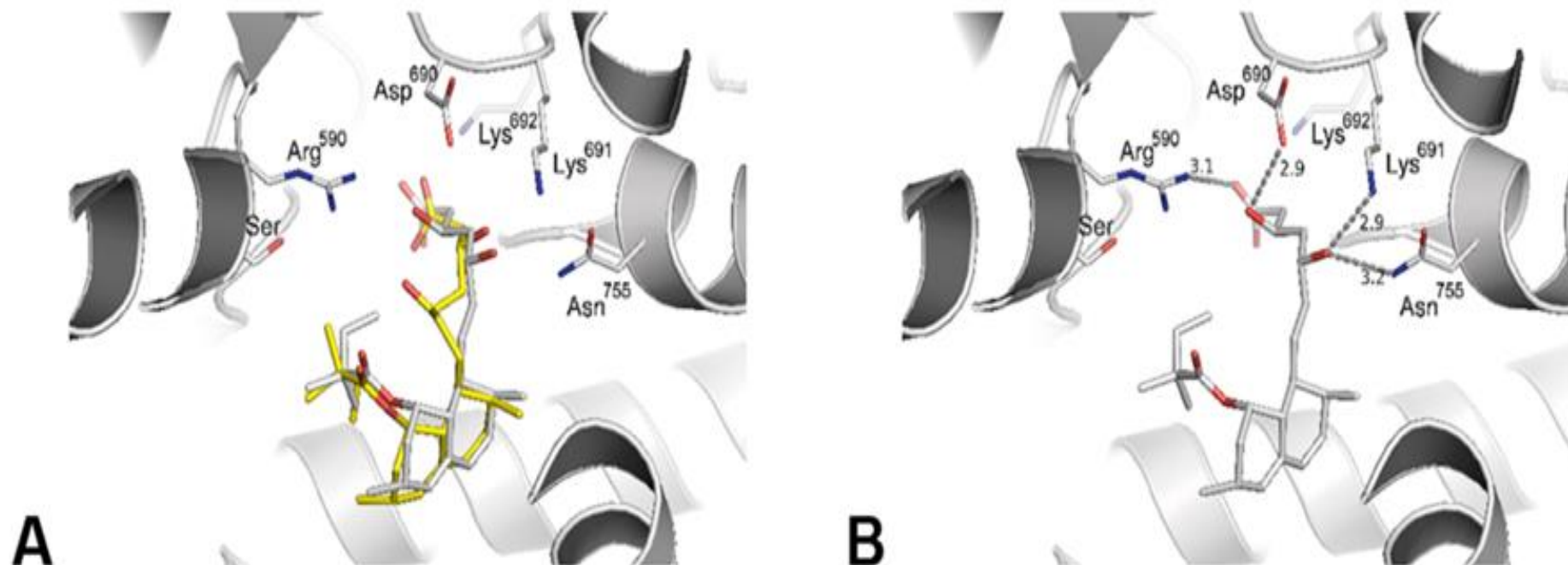


Figura 23 – Análise de docking do peptídeo QDF com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9). Sobreposição da estrutura da sinvastatina (cinza) e do peptídeo QDF (amarelo) obtidos por modelagem molecular (A) e de interação do peptídeo QDF no sítio ativo (B).

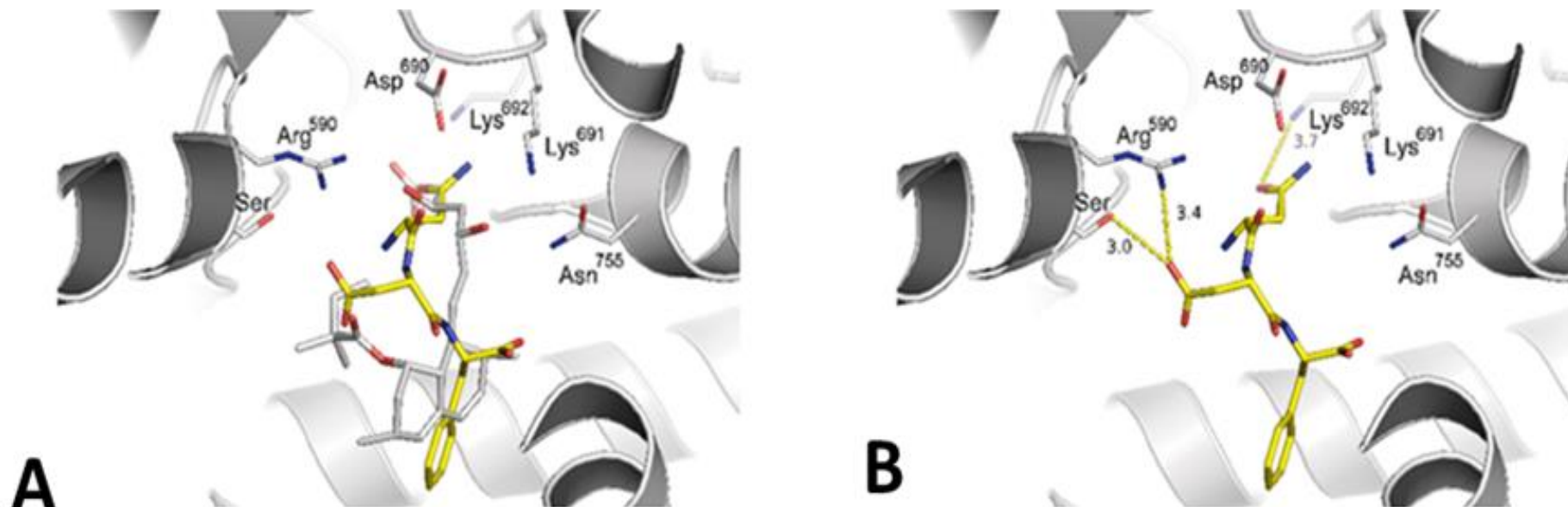
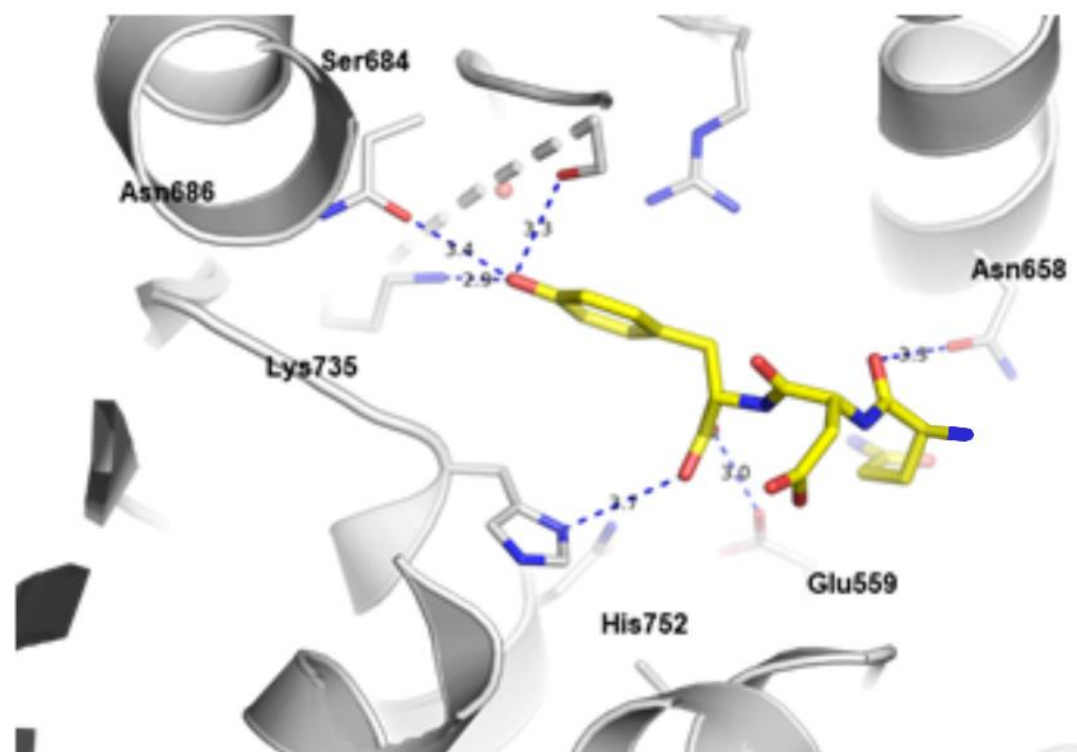


Figura 24 – Análise de docking do peptídeo QDY com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.



O peptídeo NDF obtido da substituição da glutamina pela asparagina, ambos são aminoácidos polares não carregados com a cadeia lateral amida, mostrou interações polares da Asn com o sítio ativo semelhantes às do grupo carboxila da sinvastatina (Figura 25). Além disso, os resultados da simulação demonstraram que ocorre uma ligação de H da cadeia lateral da Asn com o resíduo Lys692, ao invés de Arg590 (Figura 22), assim como ocorreu para o QDF (Figura 23). O resíduo de aspartato (D) pela predição de docking está em uma posição adequada para realizar ligação de H com os resíduos Asn755 e His752, diferente da sinvastatina que, devido à presença de um grupo apolar na região do sítio ativo não é capaz de realizar esse tipo de interação. Porém, a fenilalanina não ocupa o mesmo bolsão hidrofóbico ocupado pelo anel de decalina da sinvastatina.

Quando realizamos substituições tanto no N quanto no C terminal (NDY) (Figura 26), a tirosina (Y) ocupa a mesma configuração do anel de decalina da sinvastatina, pois ambos possuem grupos hidrofóbicos e na forma de anel, já a asparagina (N) mostrou uma ligação de H com o resíduo Lys692 e apresenta interação desfavorável entre o grupo α -amino e o resíduo Arg590 (ambos positivos em pH biológico).

As simulações acima para os peptídeos QDY, NDF e NDY mostraram interações que poderiam aumentar e/ou diminuir a interação com a HMG-CoA redutase. Para se obter uma previsão da soma de todas as interações entre a enzima e os compostos, o cálculo da energia de ligação com o sítio catalítico da HMG-CoA (Tabela 6) foi realizado. Os valores negativos obtidos confirmaram a possibilidade de ligação dos peptídeos com o sítio ativo, sendo que o peptídeo NDY mostrou menor energia de ligação que o peptídeo original QDF.

Tabela 6 – Energia de ligação dos peptídeos com o sítio catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9).

Peptídeo	Energia de Interação
MPNY	- 6,0 kcal/mol
QDF	- 6,5 kcal/mol
QDY	- 6,4 kcal/mol
NDF	- 6,3 kcal/mol
NDY	- 7,2 kcal/mol
PyrGluDF	- 7,0 kcal/mol
(β -Gln)DF	- 6,5 kcal/mol
Q(Me-Asp)F	- 7,0 kcal/mol
Q(β -Asp)F	- 6,7 kcal/mol
QD(MePhe)	- 6,5 kcal/mol

Figura 25 – Análise de docking do peptídeo NDF com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.

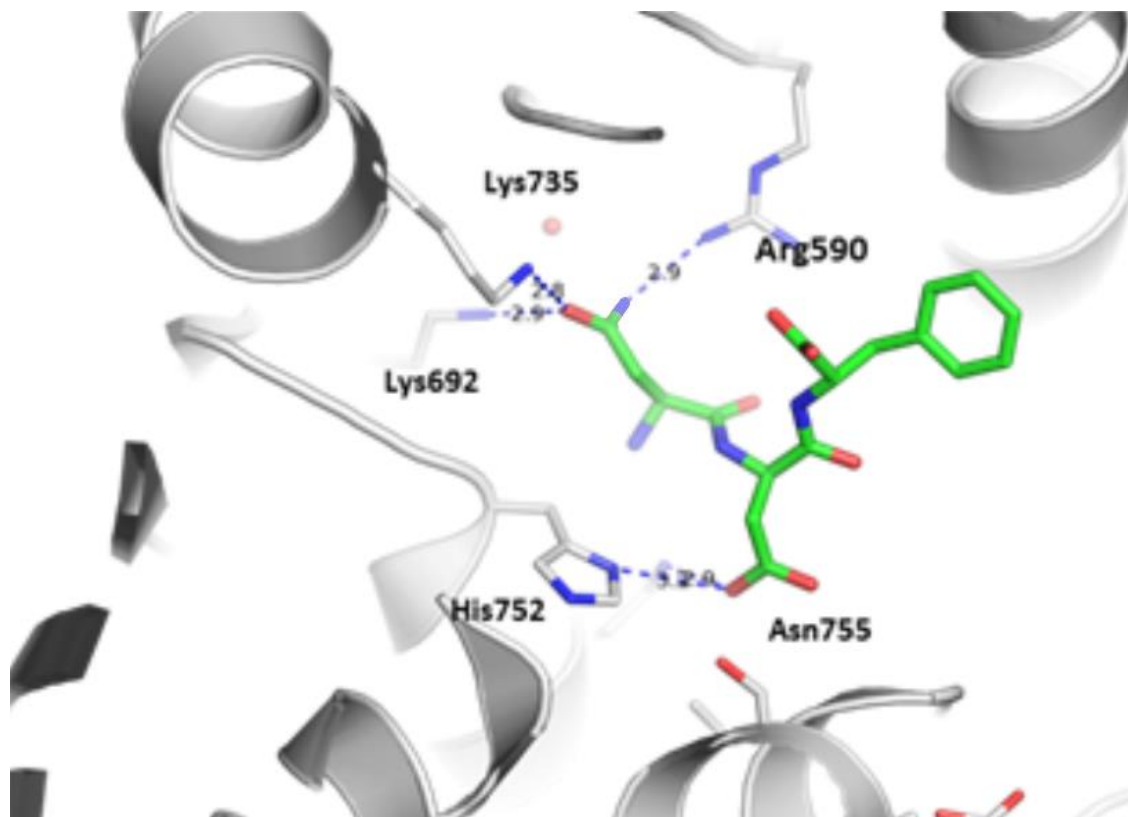
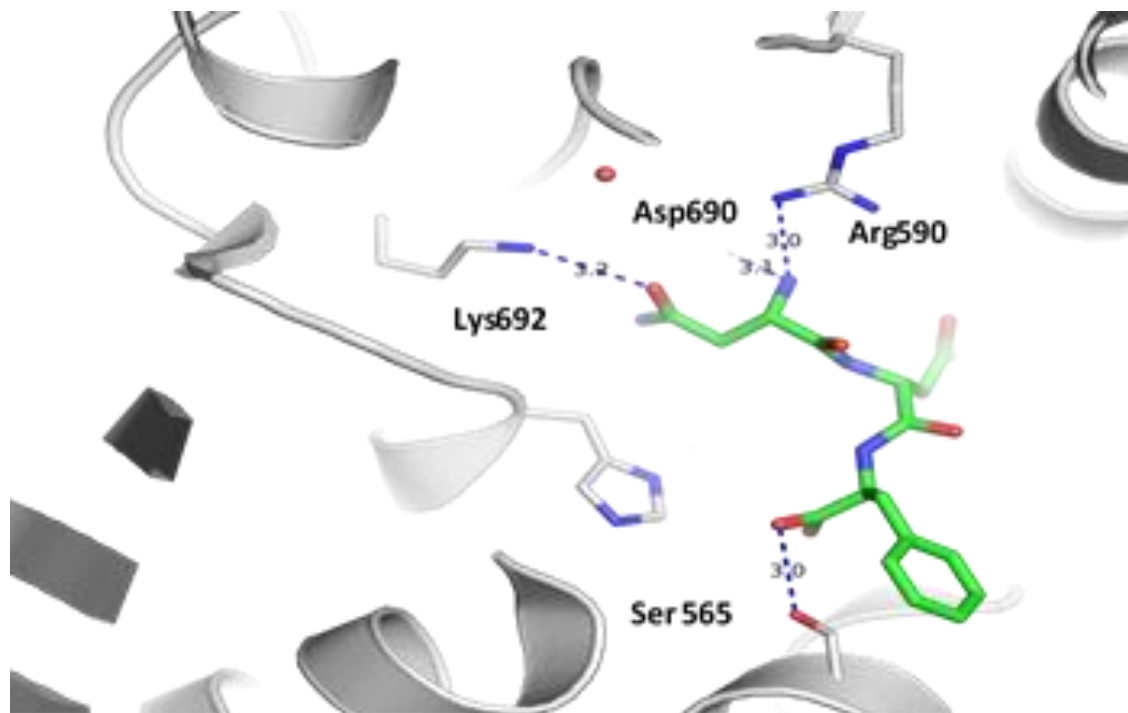


Figura 26 – Análise de docking do peptídeo NDY com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.



Além das substituições de resíduos por outros aminoácidos naturais de característica semelhante, alguns métodos são descritos na literatura como estratégias para melhorar o uso terapêutico dos peptídeos, aumentando sua meia-vida, solubilidade e absorção, e/ou reduzindo sua proteólise. Esses métodos incluem a conjugação de peptídeos, a glicosilação, a ciclização, a proteção da extremidade N-terminal, entre outros (LI; CLARK; TAN, 2018). Nesse contexto, um peptídeo com sua extremidade N-terminal ciclizada - pGluDF - foi desenhado e sintetizado. Destacamos que, esse peptídeo foi encontrado como produto colateral durante a síntese do QDF, sendo possível de que seja formado também durante a digestão gástrica. O acoplamento molecular dessa molécula com o sítio ativo da HMG-CoA redutase está apresentado na Figura 27.

O peptídeo realiza interações semelhantes as realizadas pelo peptídeo QDF (SILVA *et al.*, 2018). A fenilalanina (F) ocupa o bolsão hidrofóbico de forma semelhante ao anel de decalina da sinvastatina, o resíduo de ácido aspártico (D) realiza interações de hidrogênio com os resíduos Ser565 e Leu851, além disso o ácido piroglutâmico (pGlu) parece interagir com as regiões hidrofóbicas da região catalítica. A sequência pGluDF mostrou baixa energia de interação com a enzima (- 7,0 kcal/mol), sendo juntamente com a apresentada pelo NDY (- 7,2 kcal/mol) as menores (Tabela 6). Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que os peptídeos com capacidade de interagir com a enzima HMG-CoA redutase eram anfipáticos, em sua maioria carregados negativamente e com cerca de 30% de aminoácidos hidrofóbicos (LIN *et al.*, 2015).

Além da ciclização do peptídeo, nesse caso parcial, outra estratégia de desenho de novas drogas peptídicas, com melhores propriedades farmacocinéticas e especificidade ao alvo molecular, é a incorporação de aminoácidos não naturais à estrutura (LAU; DUNN, 2018). Os peptídeos (β -Gln)DF, Q(Me-Asp)F, Q(β -Asp) e QD(Me-Phe), cujas estruturas estão representadas na Figura 28, tiveram suas interações com o sítio catalítico da enzima HMG-CoA redutase preditas e representadas nas Figuras 29, 30, 31 e 32. O peptídeo (β -Gln)DF mostrou encaixe favorável na região catalítica da enzima HMG-CoA redutase (Figura 29), a β -Gln realiza interações polares semelhante às do grupo carboxila da sinvastatina; o ácido aspártico (D), interage com o resíduo Ser654; além disso o acoplamento molecular sugere que há uma possibilidade de formação de interações intramoleculares entre a carboxiamida da glutamina com a cadeia principal.

Figura 27 – Análise de docking do peptídeo pGluDF com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.

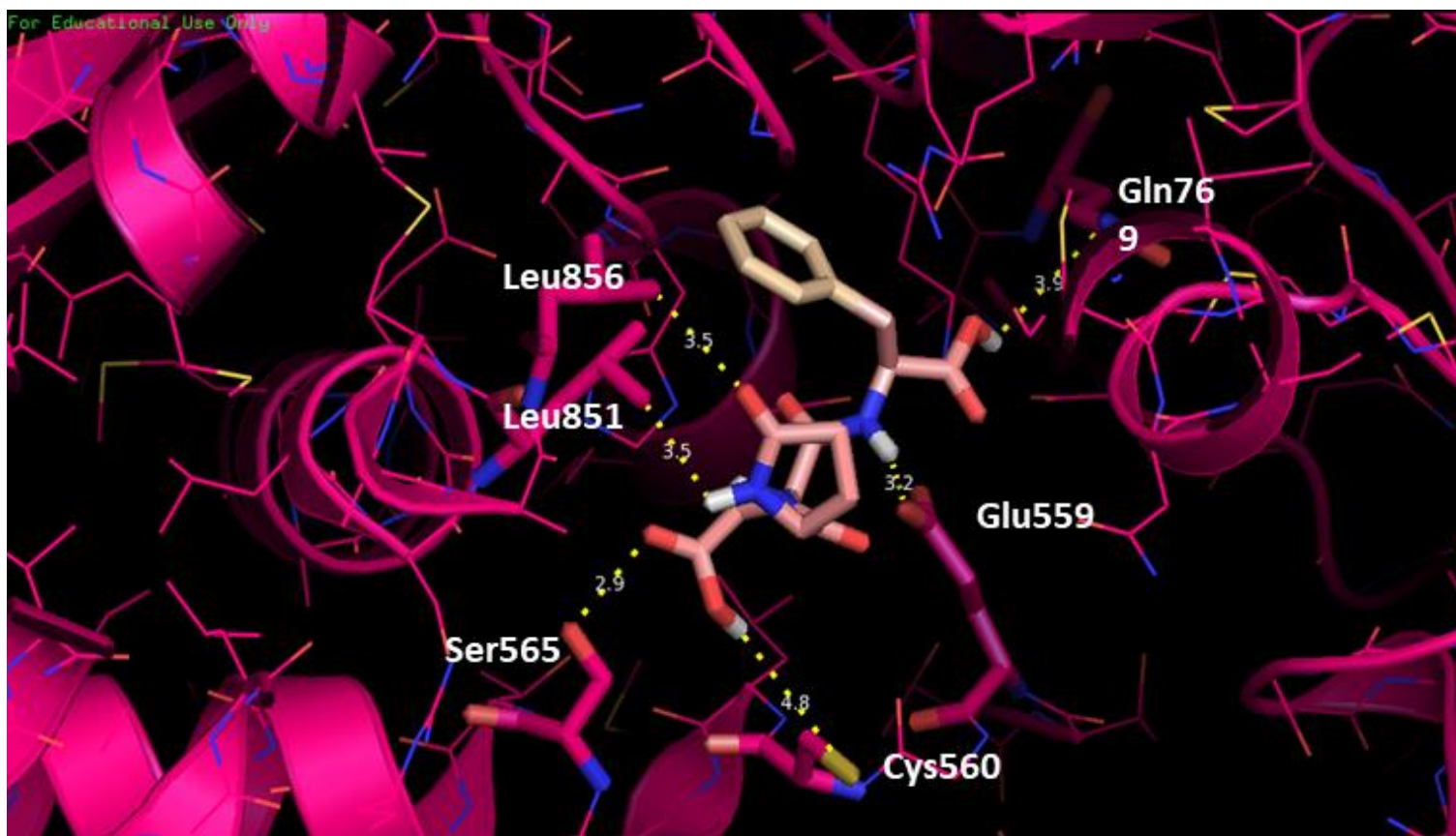


Figura 28 – Estruturas químicas dos peptídeos (β -Gln)DF (A), Q(Me-Asp)F (B), Q(β -Asp)F (C) e QD(Me-Phe).

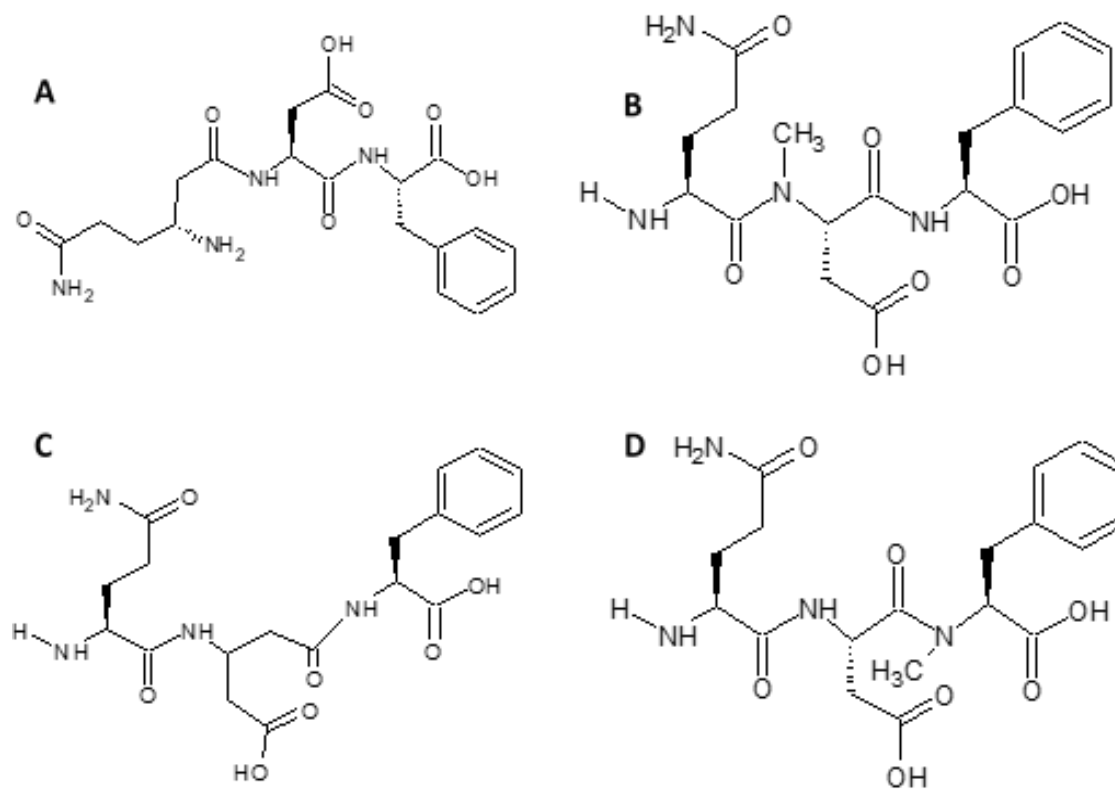
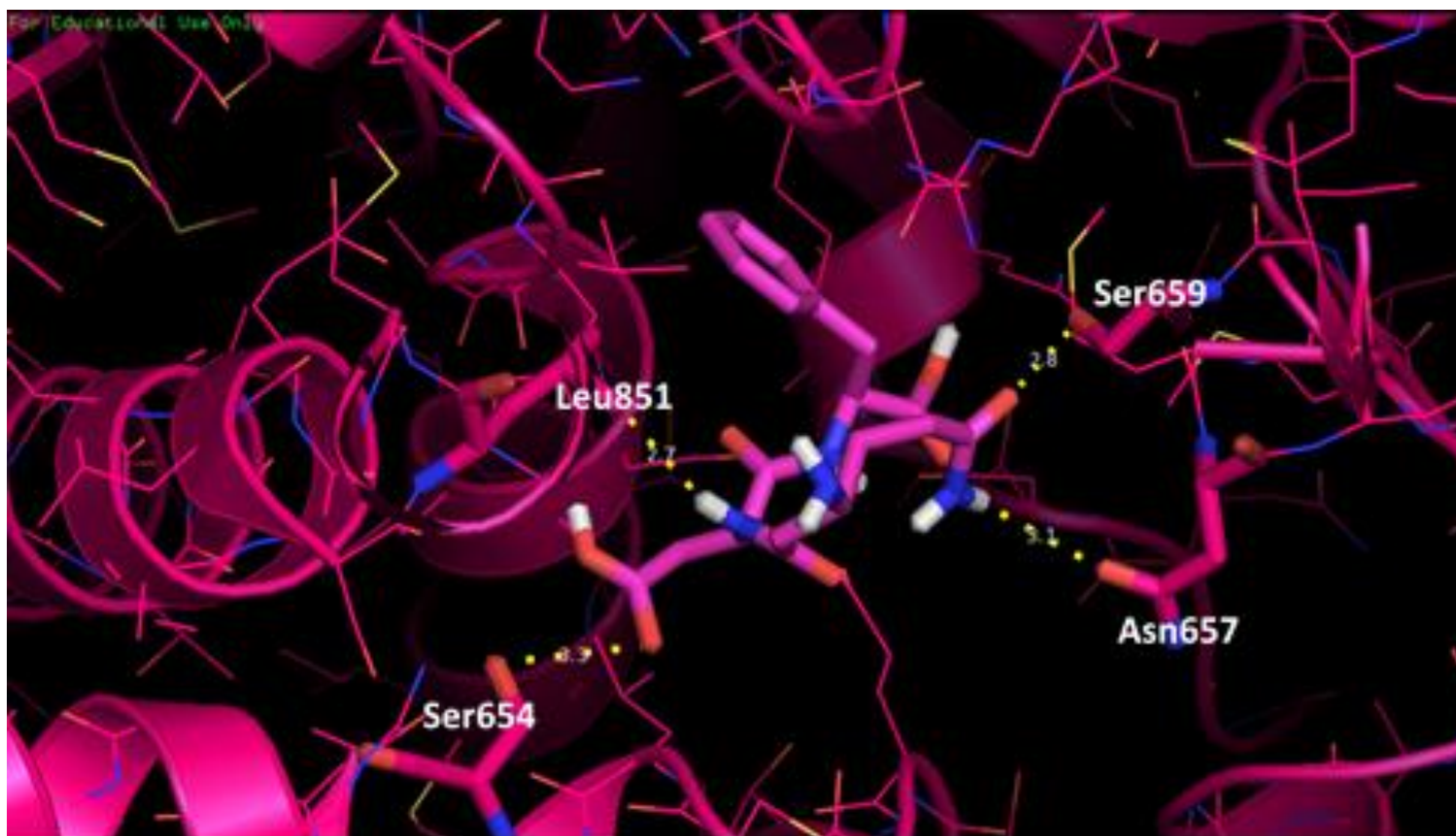


Figura 29 – Análise de docking do peptídeo (β -Gln)DF com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.



O acoplamento molecular do Q(Me-Asp)F apresentou interações satisfatórias e baixa energia de interação, realizando prováveis interações com os grupos Leu856, Lys690 e Glu559, entretanto o grupo metila do Me-Asp não realiza nenhuma ligação significativa com o sítio ativo da enzima (Figura 30).

A sequência Q(β -Asp)F apresentou um bom perfil de interação, pois a cadeia carbônica mais longa do β -aminoácido fornece uma superfície hidrofóbica maior, quando comparado ao α -aminoácido, além de realizar ligações polares semelhantes às realizadas pelas estatinas (Figura 31).

A análise do acoplamento molecular do peptídeo QD(Me-Phe) mostrou que existe uma disposição favorável para os grupamentos hidrofóbicos, mas de forma geral apresentou um perfil de interação desfavorável, não sendo um provável inibidor da HMG-CoA redutase (Figura 32).

Os peptídeos (β -Gln)DF, Q(Me-Asp)F e Q(β -Asp) apresentaram bons perfis de interação com sítio catalítico da HMG-CoA redutase, podendo apresentar atividade hipocolesterolêmica, entretanto nenhum deles mostrou uma diminuição da energia de interação superior em relação ao pGluDF, como mostrado na Tabela 6, desta forma, os estudos envolvendo esses peptídeos não foram continuados.

O peptídeo GSTLN, análogo do peptídeo GCTLN, também foi descrito como inibidor da HMG-CoA redutase Silva *et al.* (2021a), e neste trabalho foi avaliado em relação ao seu acoplamento molecular no sítio ativo da HMG-CoA redutase. A análise obtida não mostrou interação entre este peptídeo e o sítio ativo da enzima com o substrato (Figura 33).

A enzima HMG-CoA redutase, além do sítio catalítico do substrato, também possui um sítio de interação com o cofator NADPH. Marques *et al.* (2015b) mostraram que a sequência GCTLN, diferentemente dos demais peptídeos estudados até o momento, interage com a HMG-CoA redutase por meio da ligação ao domínio de interação do NADPH com a enzima. Desta forma, a falta de interação do peptídeo com o sítio ativo do substrato é esclarecida e esperada. No entanto, Silva *et al.* (2021a), mostrou que um análogo desse peptídeo, o GSTLN na concentração de 100 μ M apresentou capacidade de inibir a enzima, *in vitro*, em 27,1%.

Figura 30 – Análise de docking do peptídeo Q(Me-Asp)F com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.

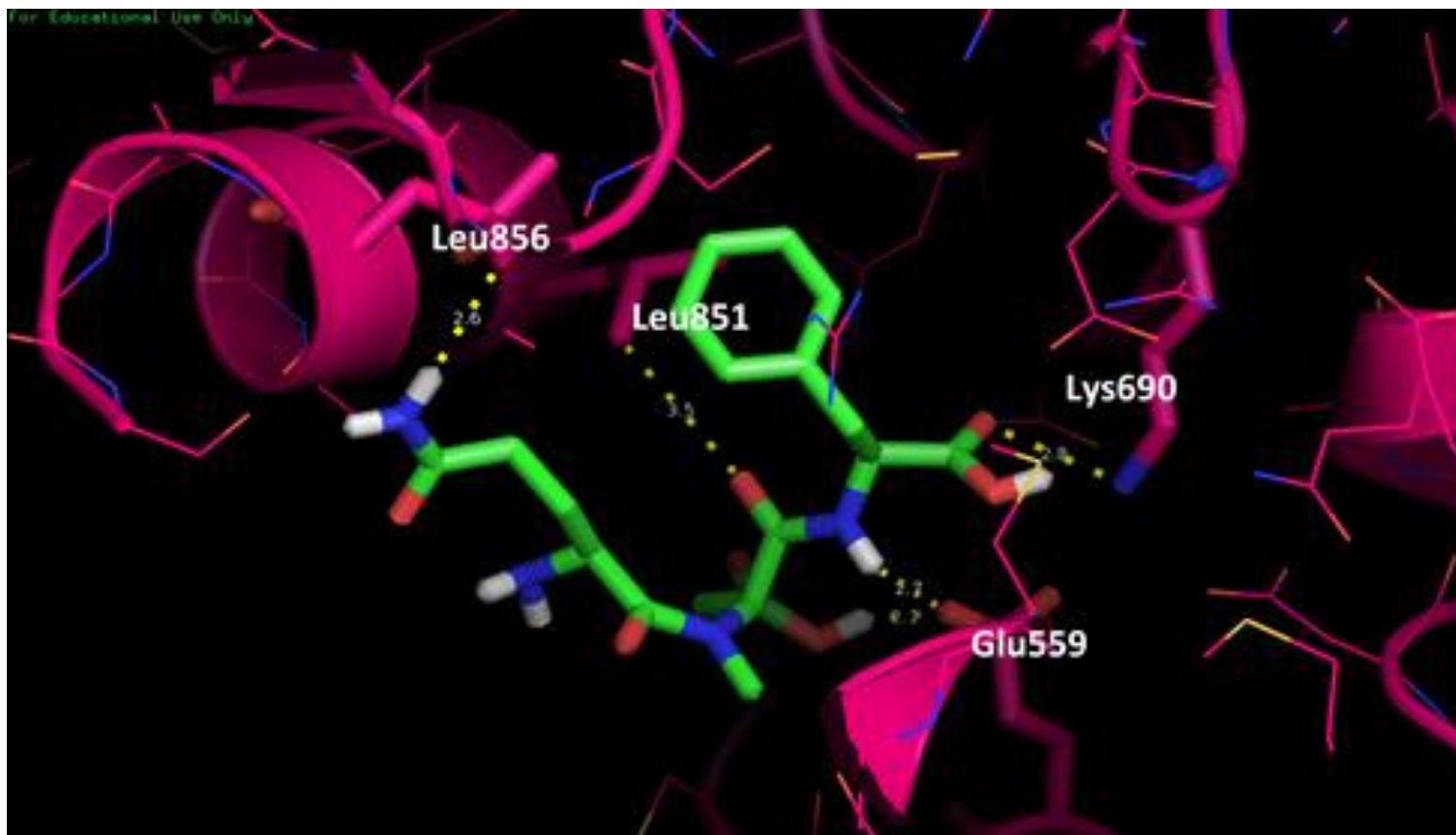


Figura 31 – Análise de docking do peptídeo Q(β -Asp)F com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.

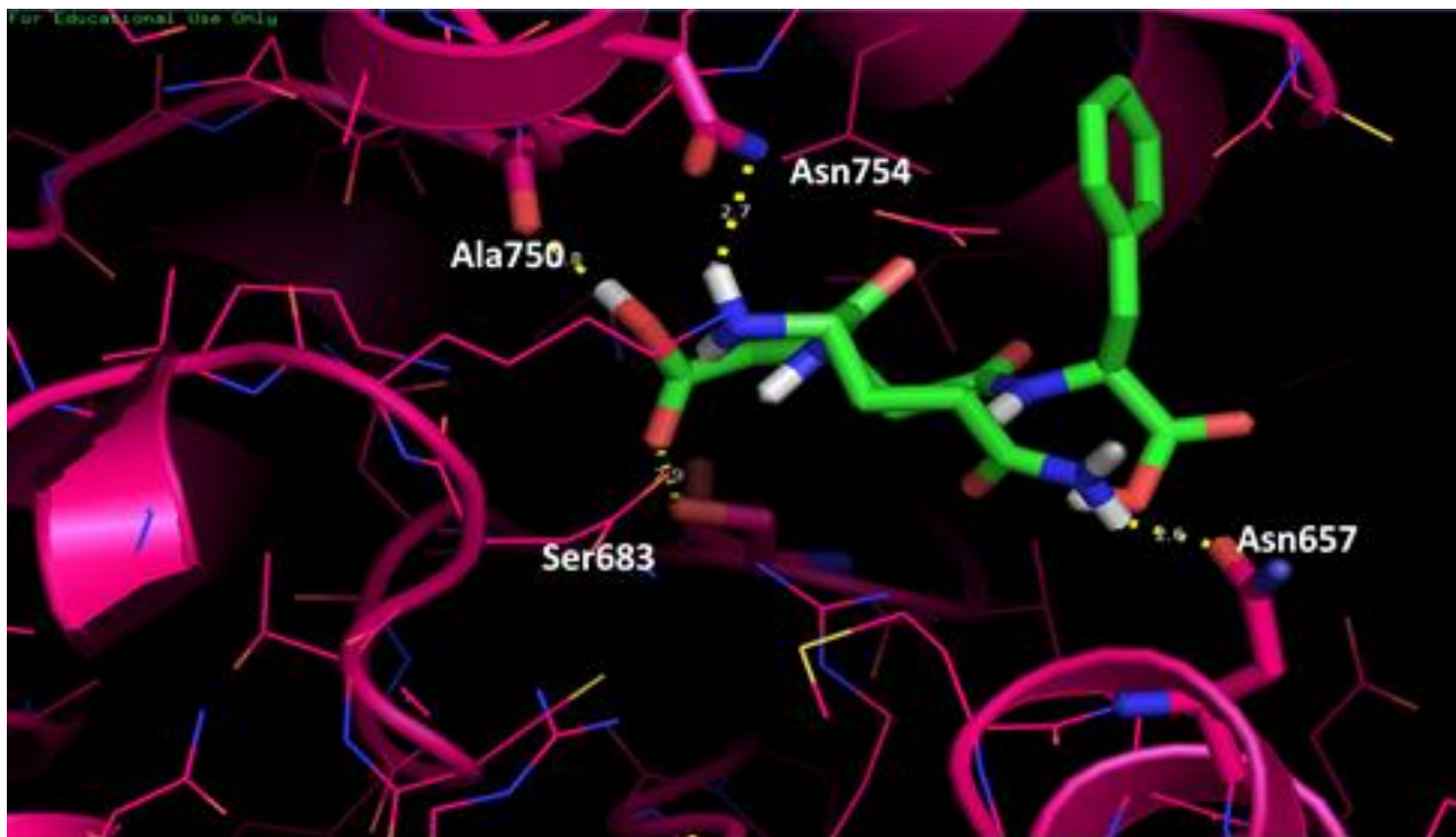
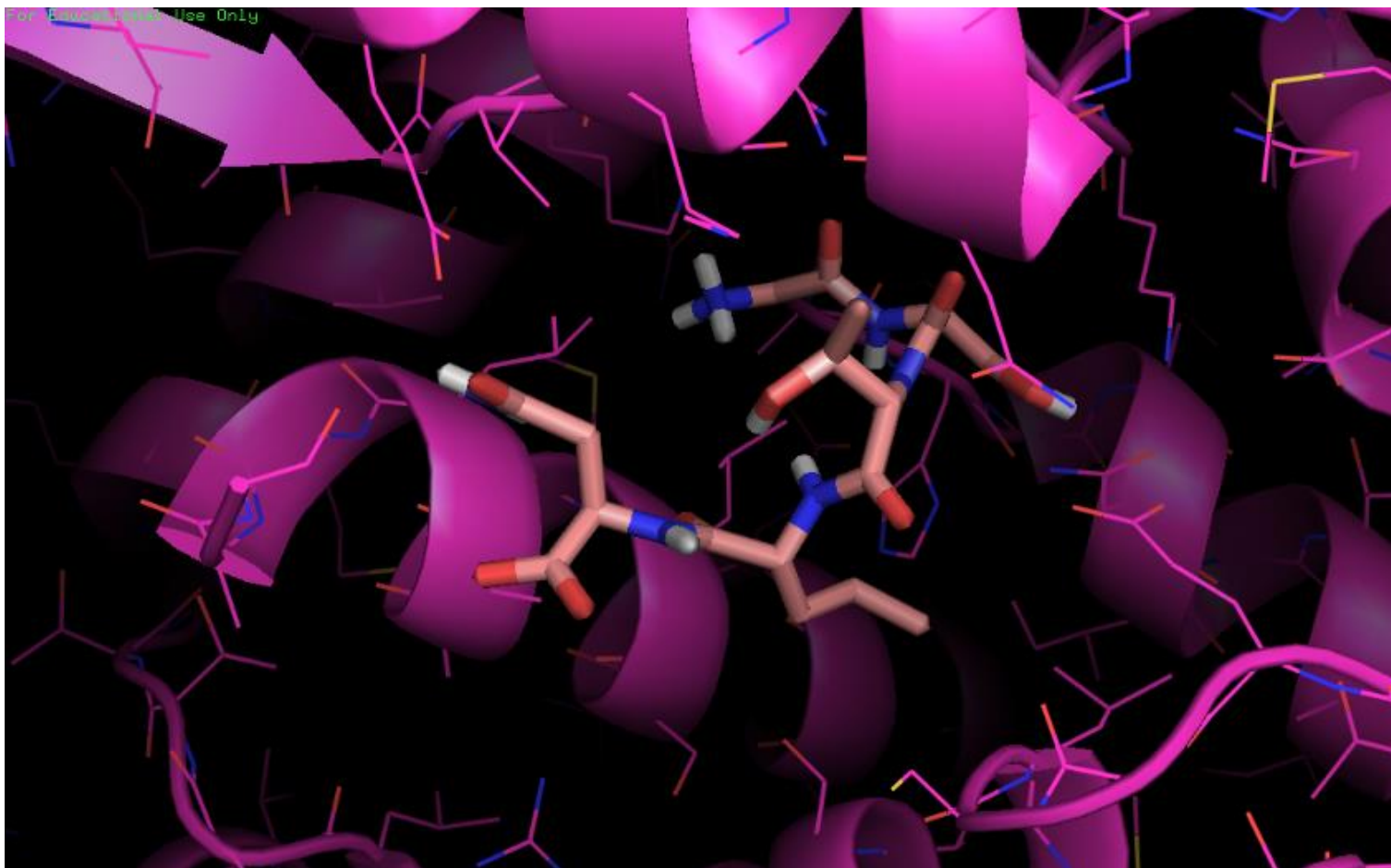


Figura 32 – Análise de docking do peptídeo QD(Me-Phe) com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.



Figura 33 – Análise de docking do peptídeo GSTLN com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase (PDB ID: 1HW9) usando o software AutoDock-VINA® e de interação do peptídeo com o sítio ativo.

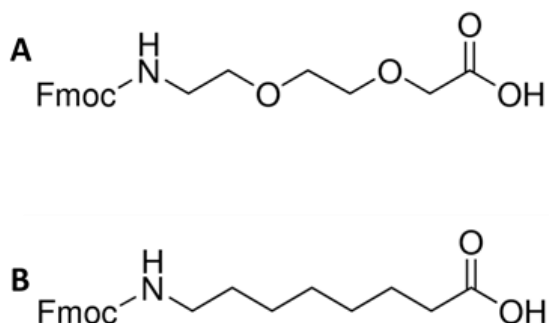


Silva *et al.* (2021a) mostrou ainda que, uma solução contendo uma mistura dos peptídeos pGlu-GF (50 μ M) e GSTLN (50 μ M) apresenta uma capacidade de inibição de 55,4% da atividade da enzima, superior aos peptídeos individualmente. Além disso, ambos os peptídeos foram capazes de incrementar a inibição realizada pela pravastatina. Estes dados demonstraram que a associação do pGluGF com o GSTLN possui um bom potencial de inibição. Neste trabalho, resolvemos avaliar os peptídeos QDF e pGluDF, que interagem com o sítio ativo do substrato, ligados covalentemente ao GSTLN, análogo que se liga ao sítio de ligação do NADPH.

5.7 Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos análogos ao QDF

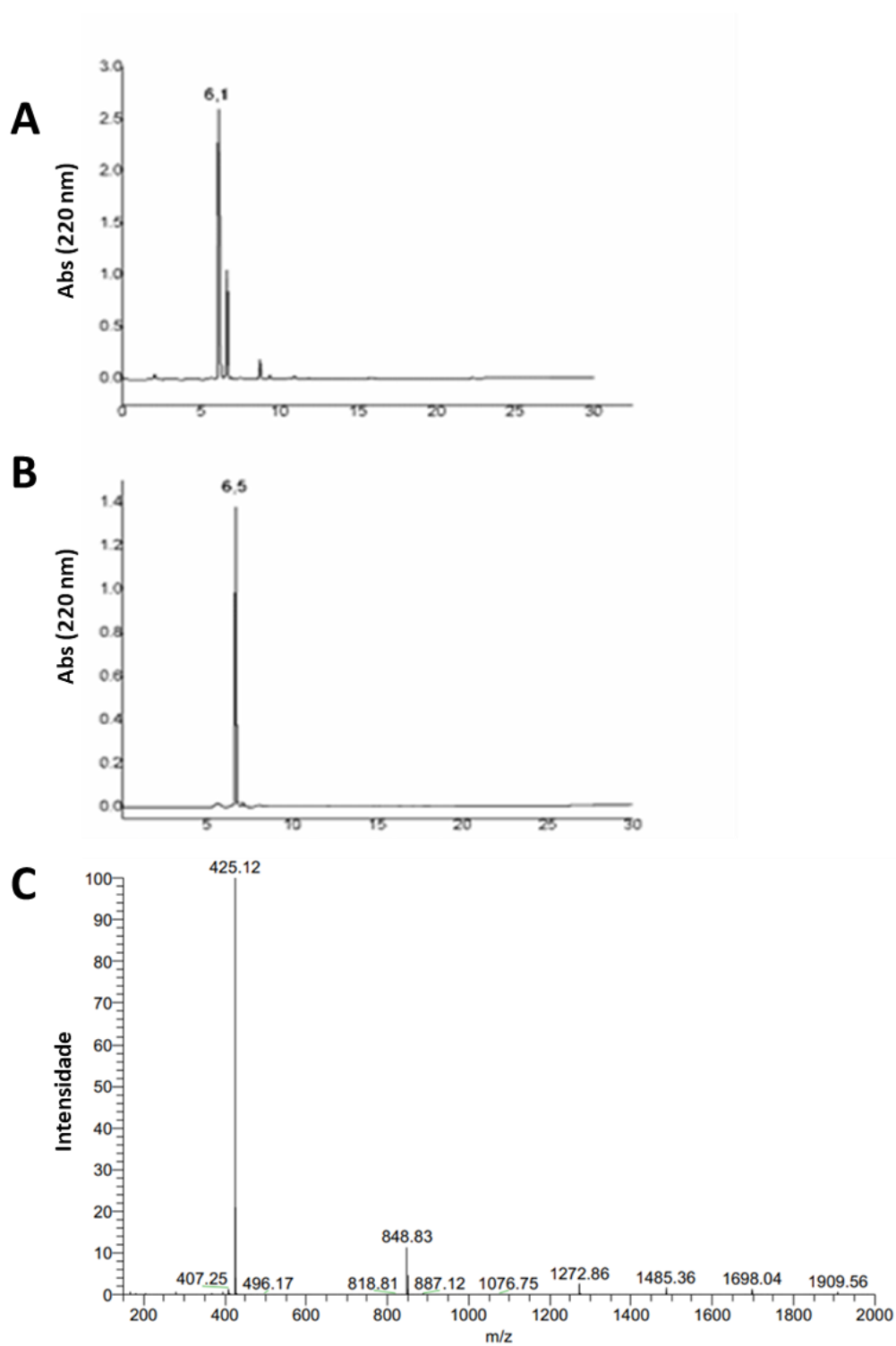
Os análogos peptídicos que apresentaram bons perfis de interação com o sítio catalítico da enzima HMG-CoA redutase foram sintetizados e purificados utilizando o mesmo protocolo de síntese em fase sólida (MERRIFIELD, 1963) utilizado anteriormente. Ademais, a fim de se avaliar o efeito de se acoplar peptídeos com ação no sítio do substrato da HMG-CoA redutase com peptídeos com ação no sítio de ligação do NADPH, o QDF e pGluDF foram conjugados à sequência GSTLN, com e sem espaçador. Os espaçadores, um polar e um apolar, foram utilizados para dar maior mobilidade ao peptídeo e possivelmente permitir o aumento da interação com os sítios da HMG-CoA redutase. As estruturas dos espaçadores utilizados estão colocadas na Figura 34.

Figura 34 – Estrutura química dos espaçadores ácido 2-[2-(amino)etoxi] etoxi-acético (A) e 8-(amino)-ácido caprílico (B).



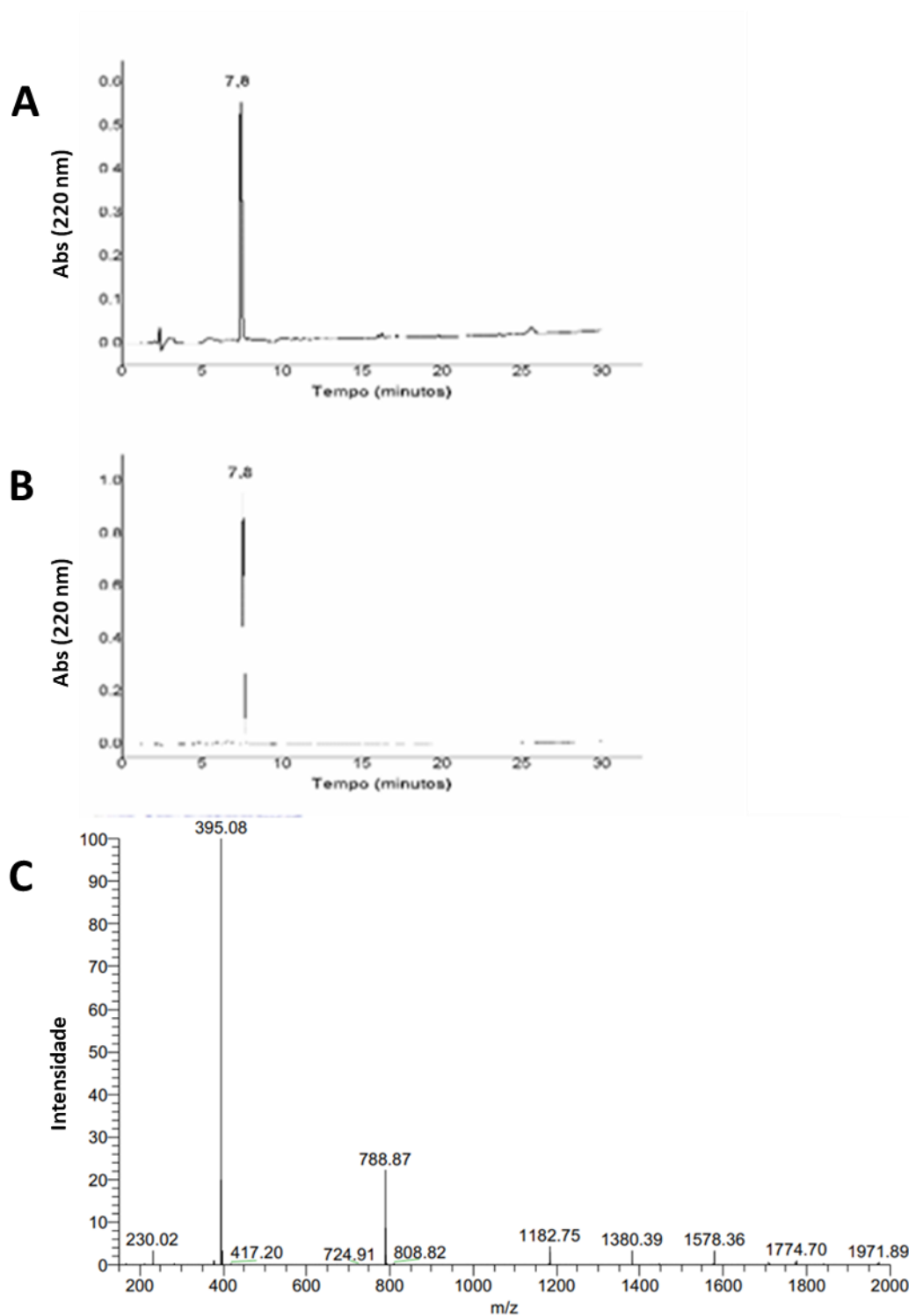
Os perfis cromatográficos dos análogos QDY, NDF, NDY e pGluDF brutos e puros obtidos, e seus respectivos espectros de massas estão apresentados nas Figuras 35, 36, 37 e 38.

Figura 35 – Perfis cromatográficos do peptídeo QDY (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido*.



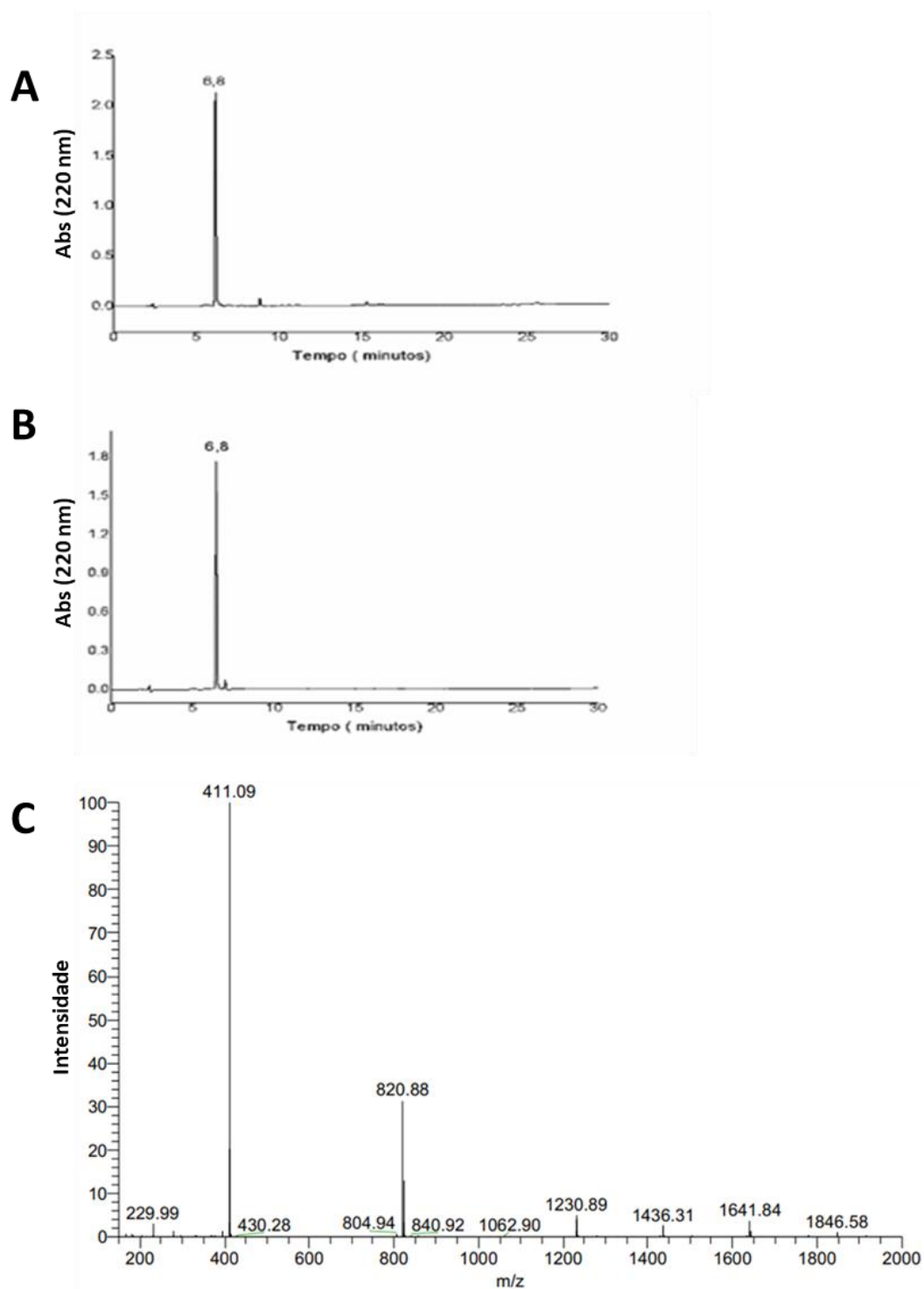
*MW = 425,12 g/mol.

Figura 36 – Perfis cromatográficos do peptídeo NDF (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido*.



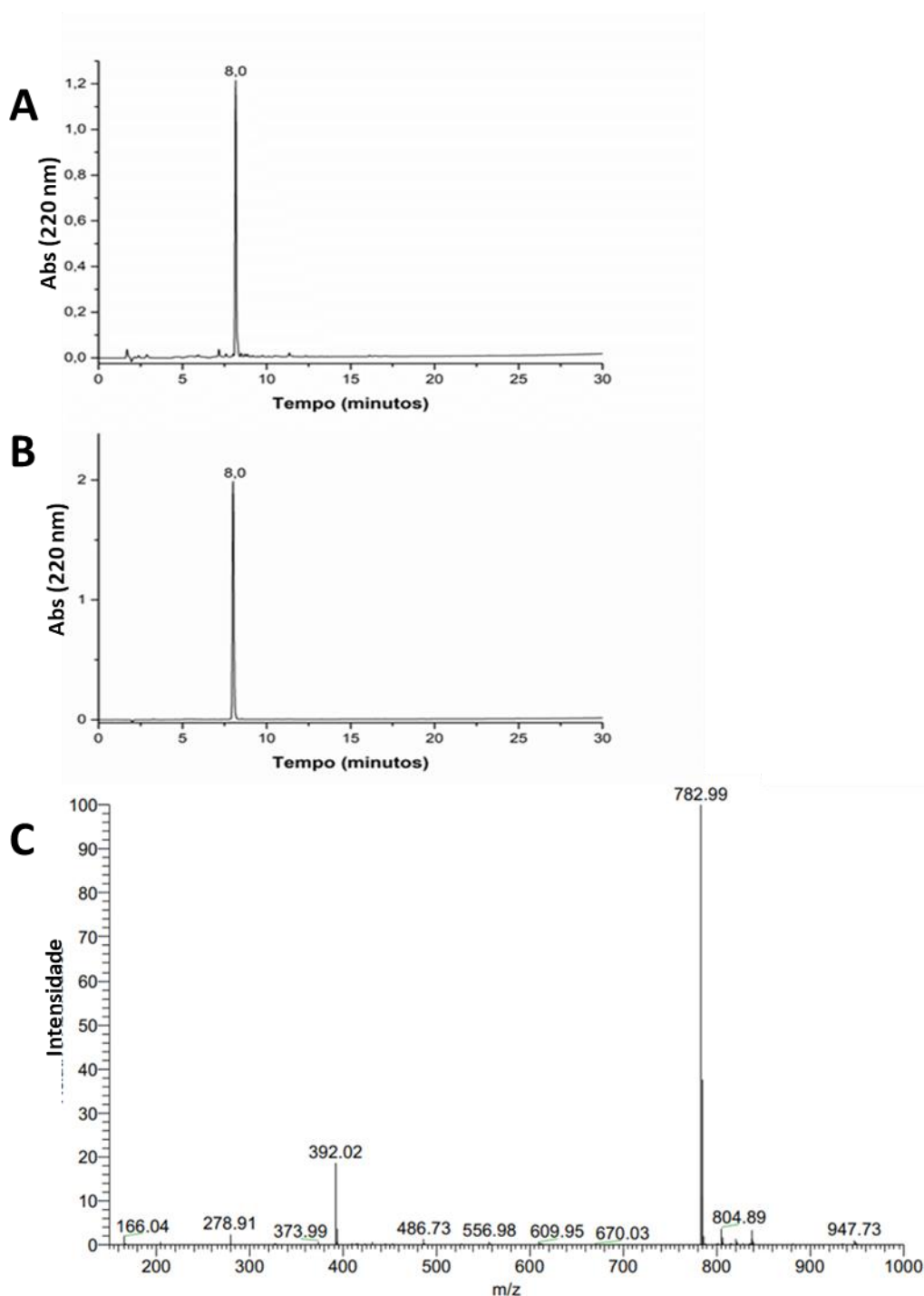
*MW = 395,08 g/mol.

Figura 37 – Perfis cromatográficos do peptídeo NDY (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido*.



*MW = 411,09 g/mol.

Figura 38 – Perfis cromatográficos do peptídeo pGluDF (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido.

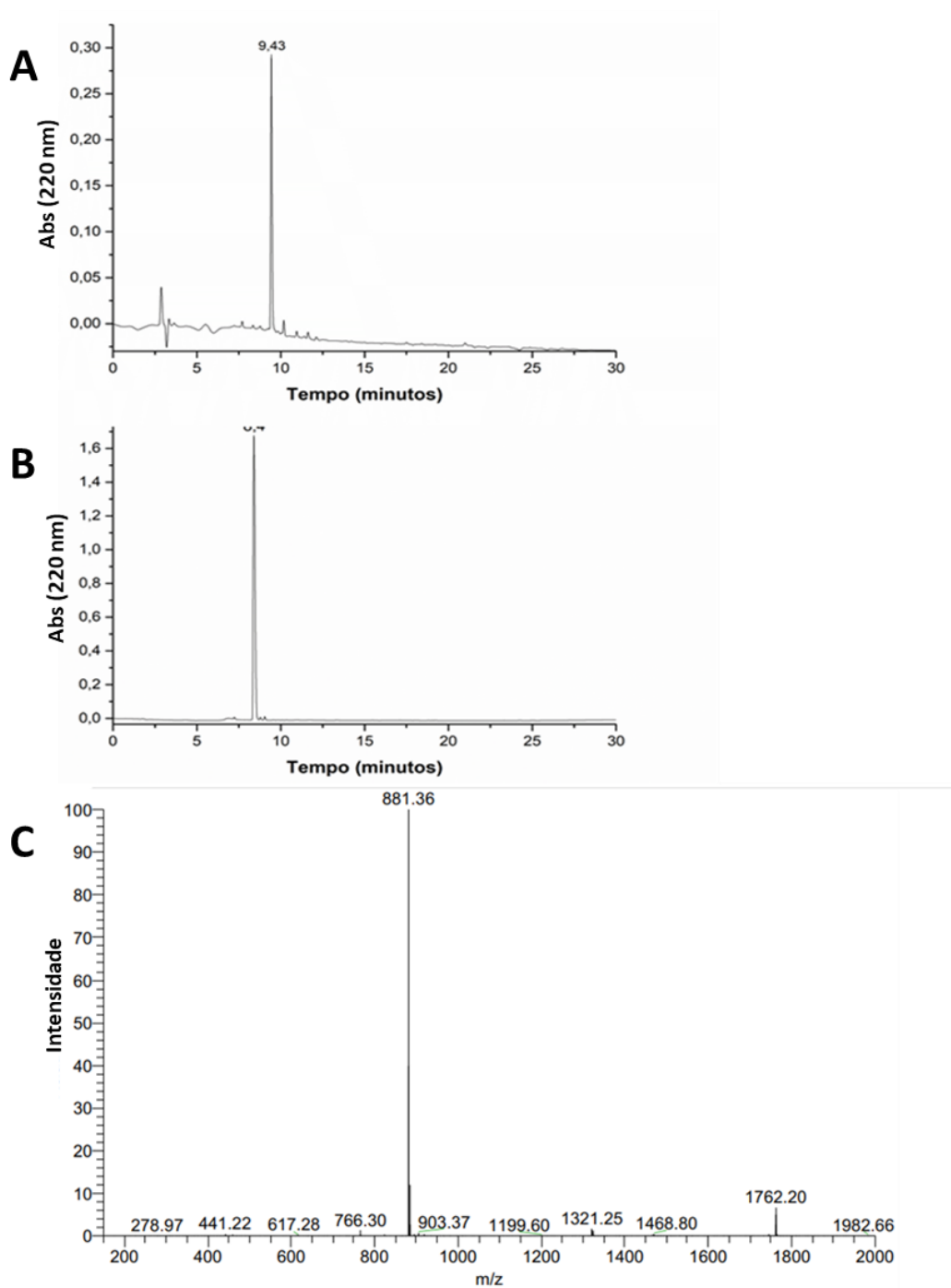


*MW = 392,02 g/mol.

Nas Figuras 39, 40, 41, 42, 43 e 44 são mostrados os cromatogramas dos peptídeos brutos e puros das sequências: QDF-GSTLN, pGluDF-GSTLN, QDF-Espaçador1-GSTLN, pGluDF-Espaçador1-GSTLN, QDF-Espaçador2-GSTLN e

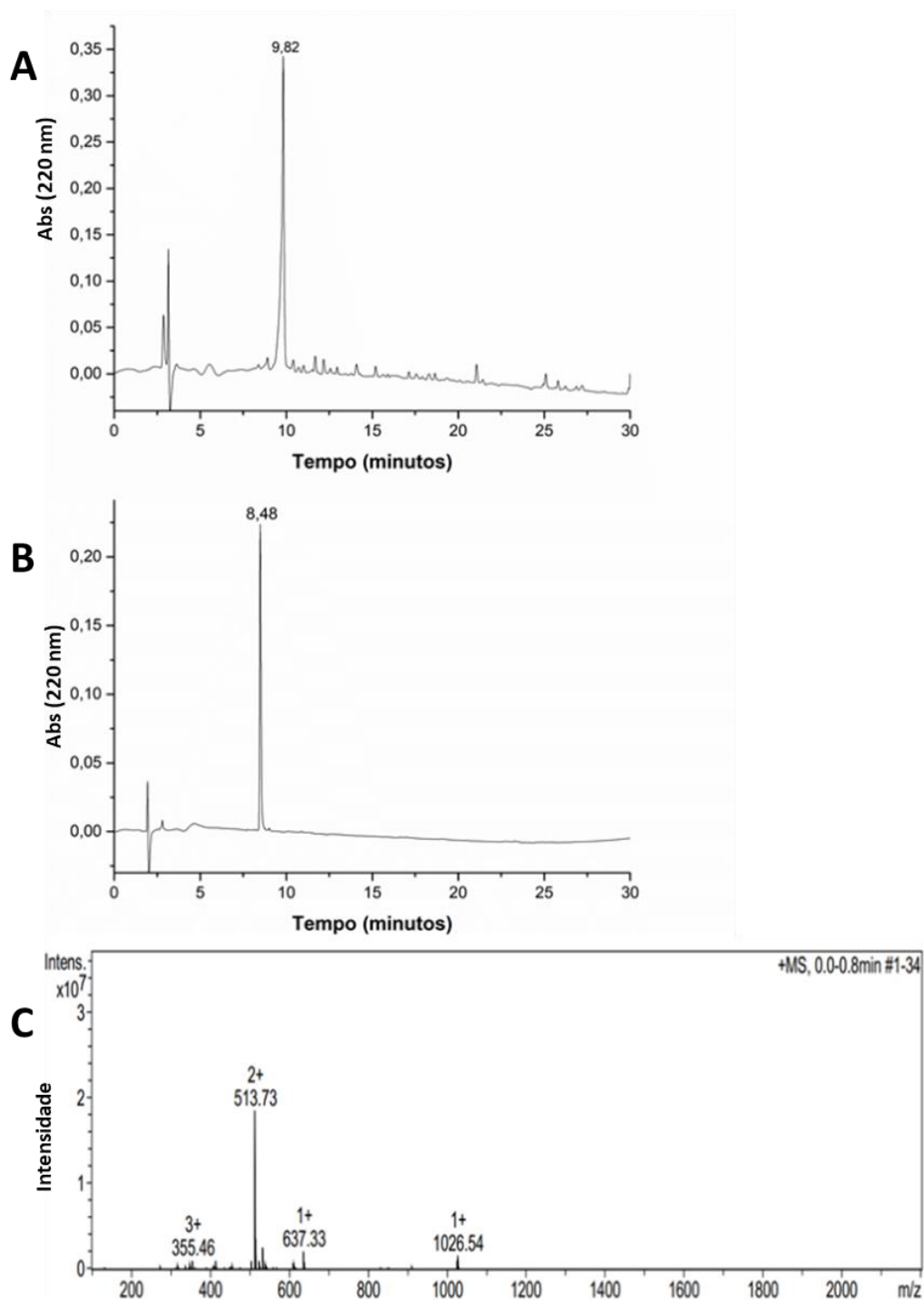
pGluDF-Espaçador2-GSTLN. Os espectros de massas confirmaram a obtenção do material desejado.

Figura 39 – Perfis cromatográficos do peptídeo QDFGSTLN (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido*.



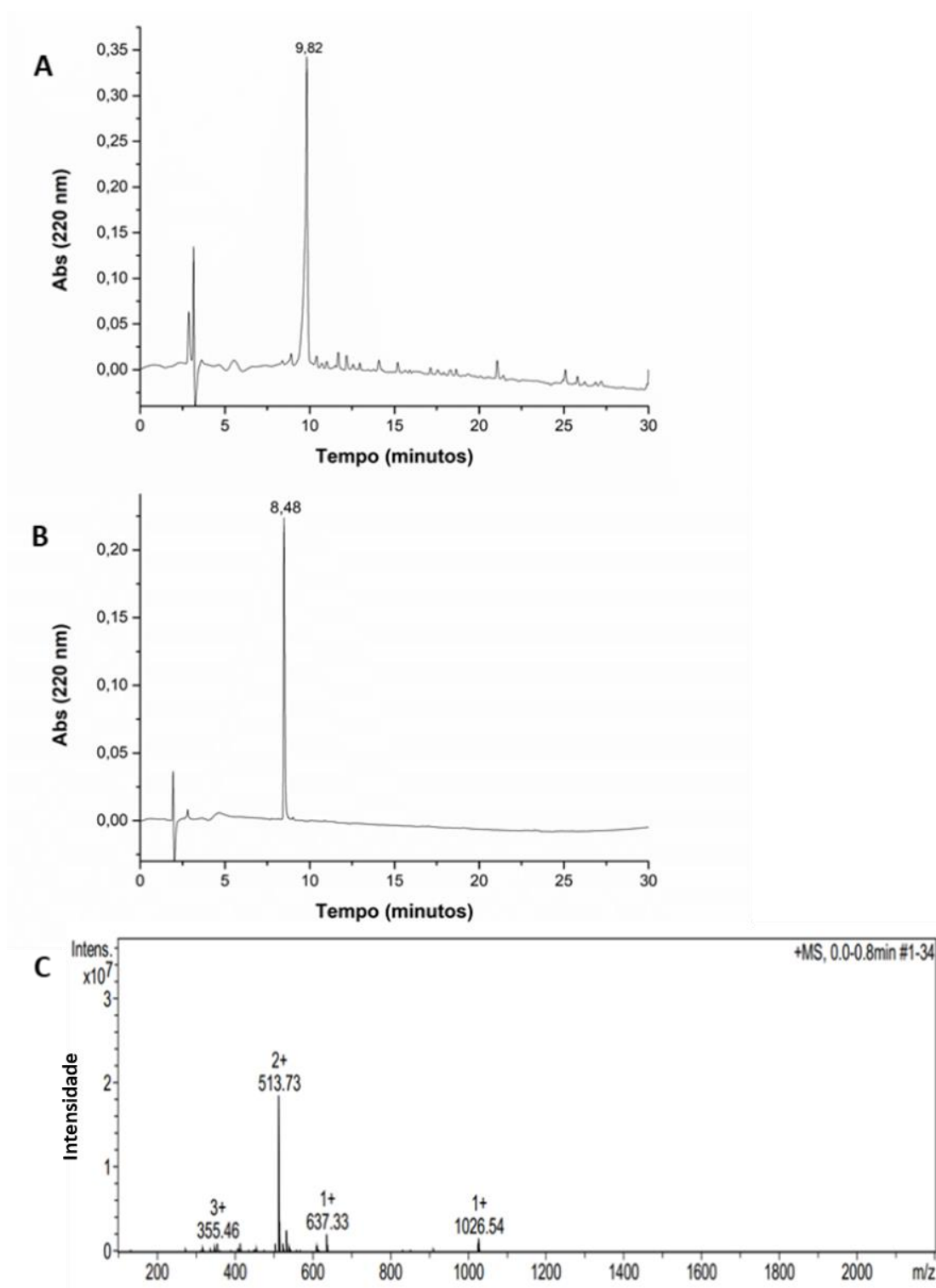
*MW = 881,36 g/mol.

Figura 40 – Perfis cromatográficos do peptídeo pGluDFGSTLN (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido*.



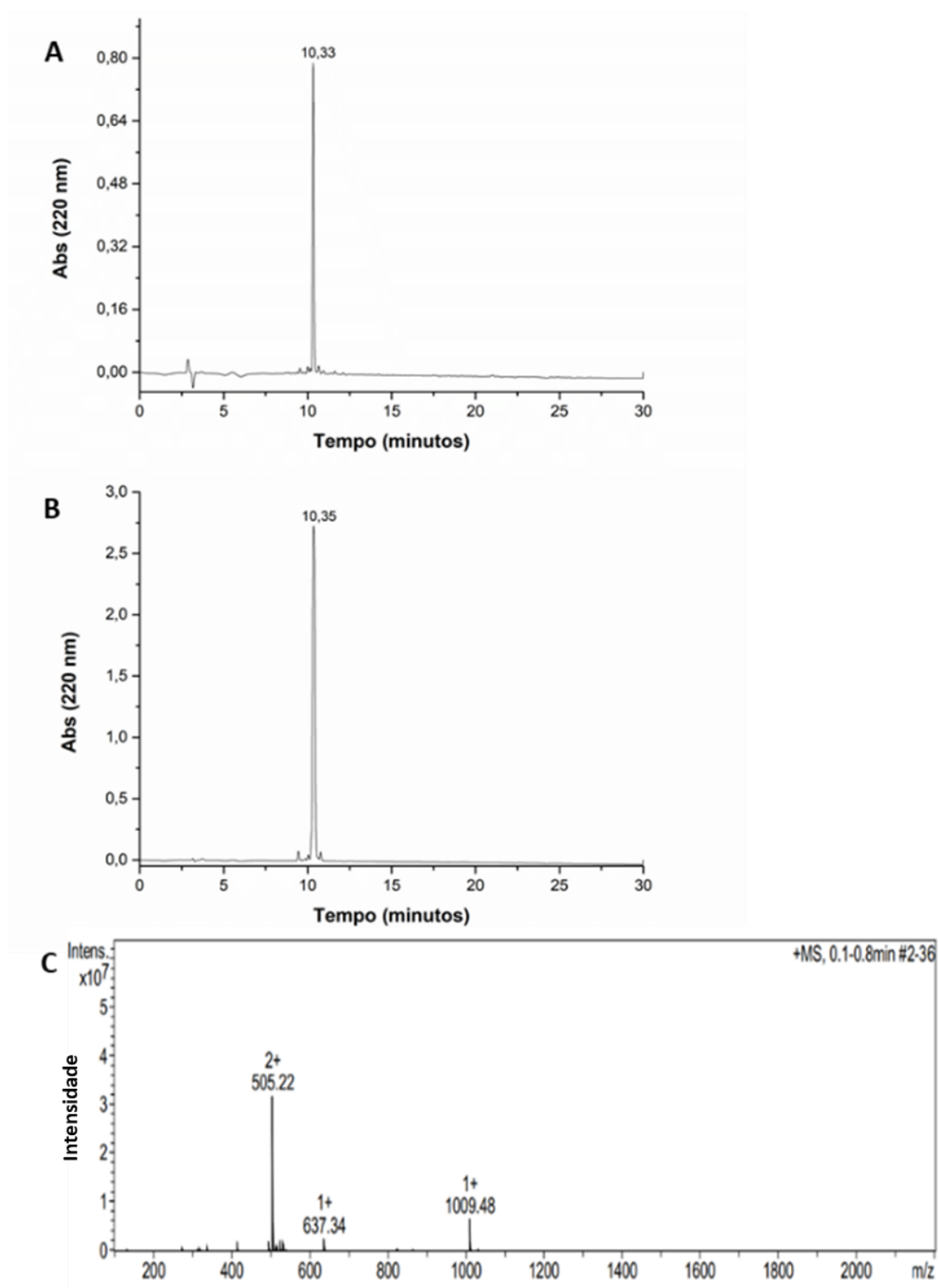
*MW = 864,16 g/mol.

Figura 41 – Perfis cromatográficos do peptídeo QDF-Espaçador1-GSTLN (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido*.



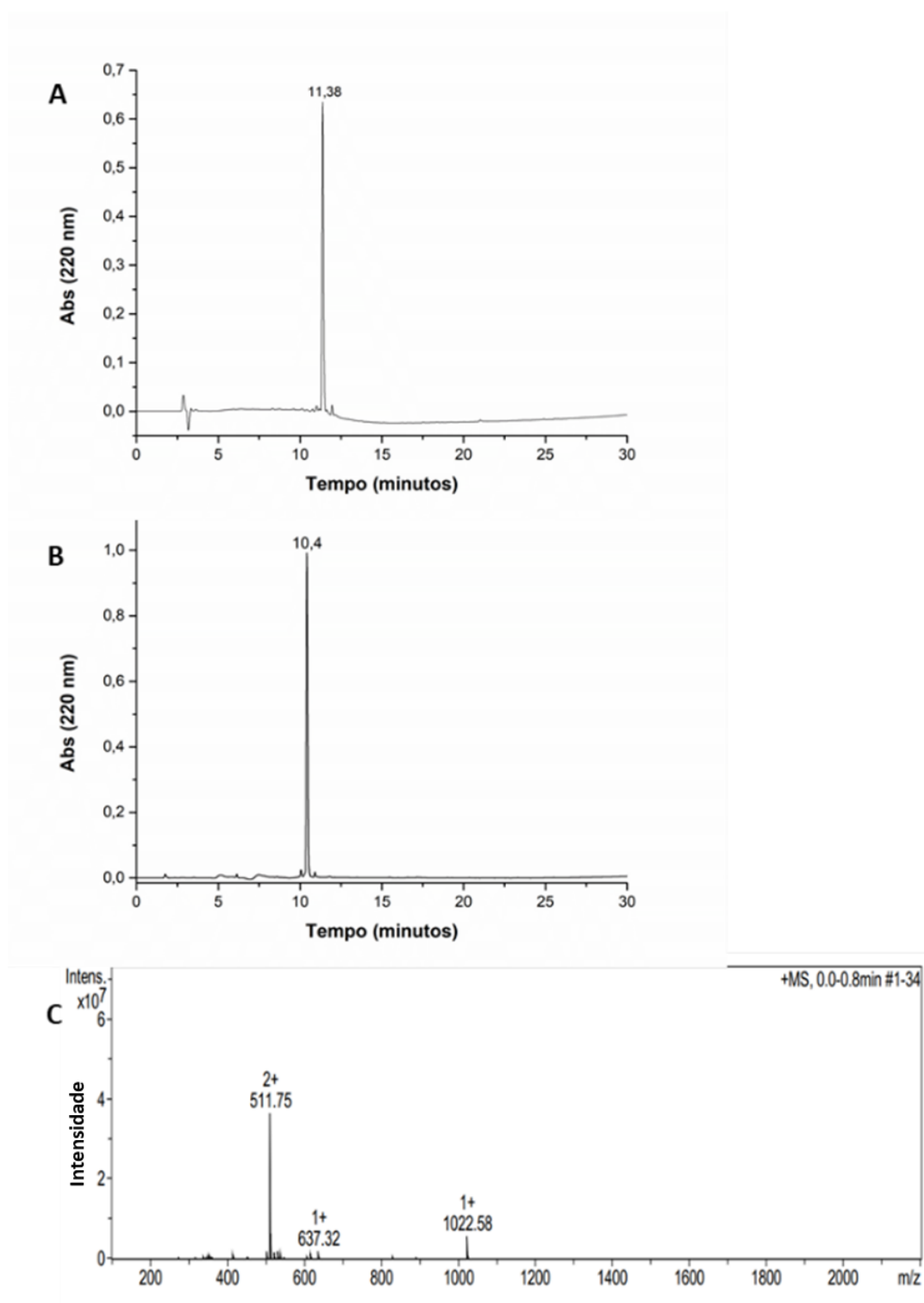
*Espaçador 1: ácido 2-[2-(amino)etoxi]etoxi-acético. MW = 1026,54 g/mol.

Figura 42 – Perfis cromatográficos do peptídeo pGluDF-Espaçador1-GSTLN (A) bruto, (B) puro, e (C) espectro de massas obtido*



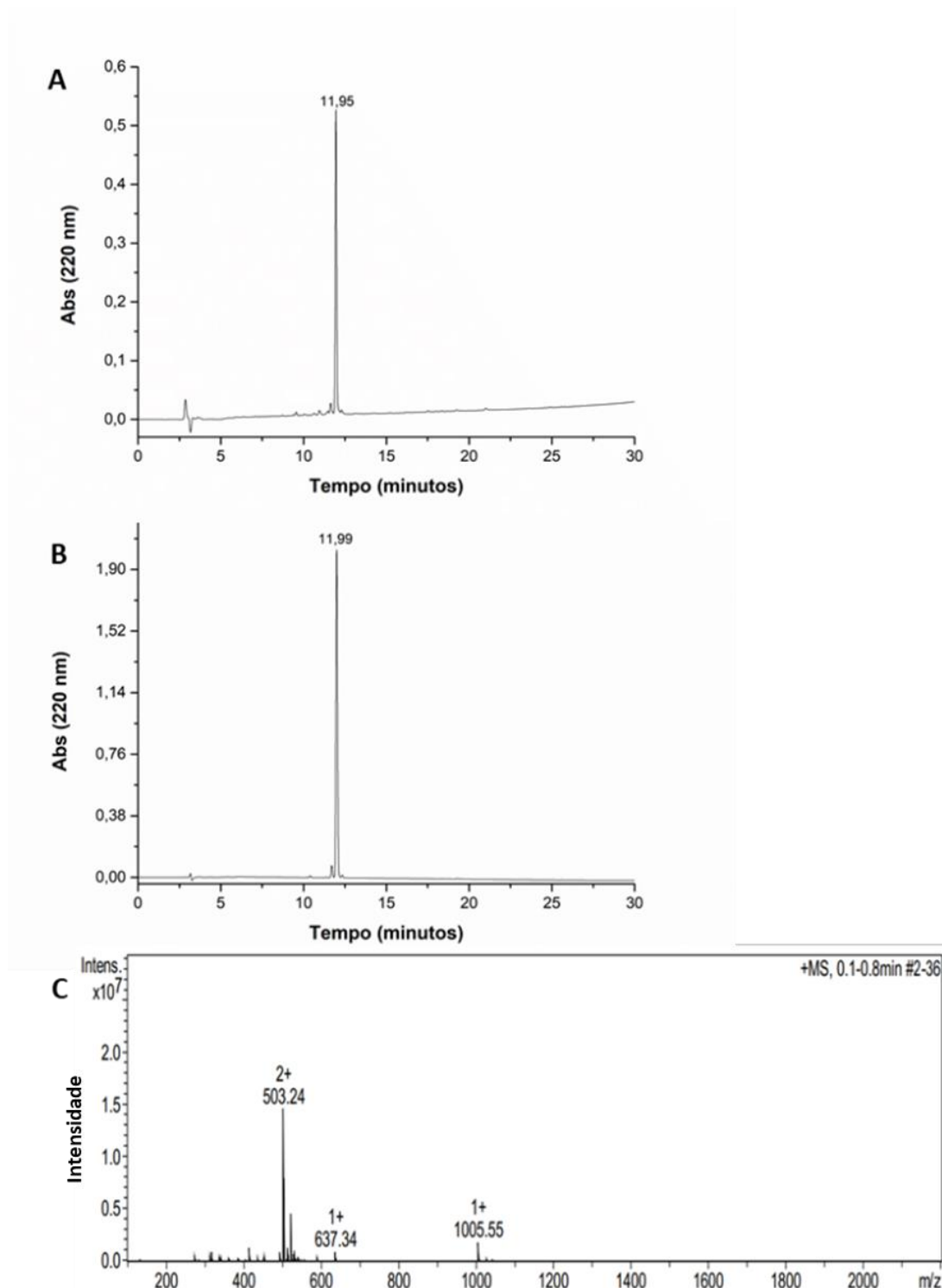
*Espaçador 1: ácido 2-[2-(amino)etoxi]etoxi-acético. MW = 1009,48 g/mol.

Figura 43 – Perfis cromatográficos do peptídeo QDF-Espaçador2-GSTLN (A) bruto, (B) puro e (C) espectro de massas obtido*



*Espaçador 2: 8-(amino)-ácido caprílico. MW = 1022,58 g/mol.

Figura 44 – Perfis cromatográficos do peptídeo pGluDF-Espaçador2-GSTLN (A) bruto e (B) puro, e (C) espectro de massas obtido*



*Espaçador 2: 8-(amino)-ácido caprílico. MW = 1005,55 g/mol.

Na Tabela 7, estão colocadas as purezas obtidas pelos peptídeos após a etapa de purificação e as massas molares teóricas e obtidas.

Tabela 7 – Dados de purificação e caracterização dos análogos peptídicos do QDF e acoplados à sequência GSTLN.

Peptídeo	Pureza (%)	MM teórica (g/mol)	MM obtida (g/mol)
QDY	98,40	424,40	425,12
NDF	99,90	394,38	395,08
NDY	98,70	410,38	411,09
pGluDF	99,90	391,40	392,02
QDFGSTLN	99,50	880,91	881,36
pGluDFGSTLN	99,90	863,89	864,16
QDF-espaçador1-GSTLN	99,90	1024,90	1026,54
pGluDF-espaçador1-GSTLN	99,50	1007,90	1009,48
QDF-espaçador2-GSTLN	99,90	1022,37	1022,58
pGluDF-espaçador2-GSTLN	99,90	1005,35	1005,55

*MM - Massa Molar

Os peptídeos análogos ao QDF e os peptídeos conjugados ao GSTLN foram obtidos com grau de pureza satisfatórios, sendo alguns deles avaliados em relação a capacidade de inibição da HMG-CoA redutase.

5.8 Ensaio *in vitro* da inibição da HMG-CoA redutase pelos peptídeos análogos

As sequências peptídicas análogas aos peptídeos oriundos da proteína do feijão caupí apresentaram interações favoráveis com o sítio catalítico da enzima, podendo apresentar atividade hipocolesterolêmica, portanto, após a síntese e purificação, a atividade dessas moléculas foi verificada *in vitro* utilizando o kit *HMG-CoA reductase assay* (HULCHER; OLESON, 1973).

Os peptídeos análogos ao QDF (pGluDF, QDY, NDF e NDY) e o GSTLN foram avaliados na concentração de 100 μ M (Tabela 8), e verificou-se que todos possuem capacidade de reduzir a atividade enzimática da HMG-CoA redutase. Os peptídeos pGluDF e NDY, que apresentaram menor energia de interação com o sítio catalítico da enzima, foram os que mostraram maior atividade inibitória: 46,20 e 55,60%, respectivamente. Esses peptídeos mostraram maior atividade inibitória que outras sequências peptídicas, oriundas de hidrolisados de leguminosas, descritas na literatura. Os peptídeos GGV, IGV e VGVV identificados na fração menor que 3 kDa

de hidrolisado proteico de amaranço, na concentração de 20 mg/L, apresentaram capacidade de inibir 40% da atividade da enzima (SOARES *et al.*, 2015). Os peptídeos IAF e QGF, oriundos da proteína β -vignina do feijão-caupí, inibiram, na concentração de 500 μ M, 69 e 77% da atividade enzimática, respectivamente (SILVA *et al.*, 2021b).

Tabela 8 – Inibição da atividade da HMG-CoA redutase pelos análogos peptídicos do QDF e acoplados à sequência GSTLN.

Amostra	Concentração de inibidor	Inibição (%)
Controle	-	0 ^a
Pravastatina	0,5 μ M	94,70 $\pm$ 0,0221 ^b
QDF	100 μ M	45,70 $\pm$ 0,0823 ^c
pGluDF	100 μ M	46,20 $\pm$ 0,1550 ^c
QDY	100 μ M	10,70 $\pm$ 0,0807 ^d
NDF	100 μ M	15,74 $\pm$ 0,1030 ^e
NDY	100 μ M	55,60 $\pm$ 0,0746 ^f
GSTLN	100 μ M	28,00 $\pm$ 0,0967 ^g
pGluDFGSTLN	100 μ M	26,90 $\pm$ 0,1974 ^g
pGluDF-espaçador1-GSTLN	100 μ M	65,40 $\pm$ 0,2840 ^h
pGluDF-espaçador1-GSTLN	50 μ M	44,95 $\pm$ 0,1758 ^c
pGluDF + GSTLN	50 μ M + 50 μ M	39,30 $\pm$ 0,1936 ⁱ

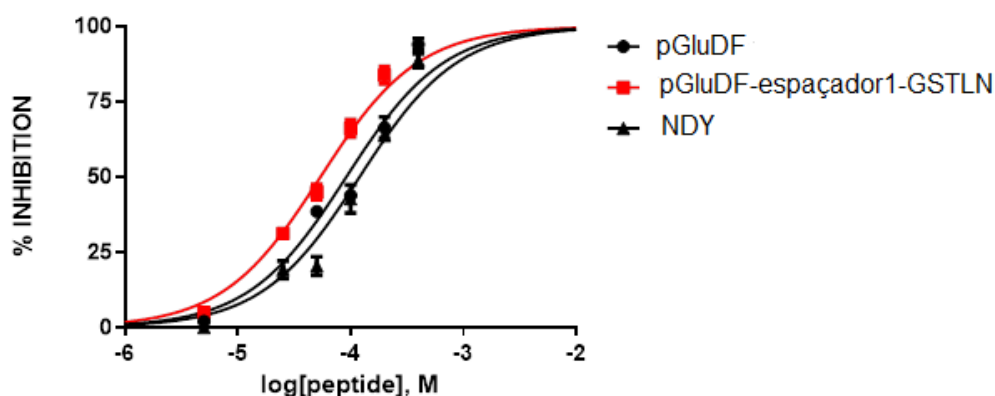
Embora praticamente não haja diferença entre as atividades inibitórias dos peptídeos QDF e pGluDF, a extremidade cíclica confere ao segundo peptídeo melhores propriedades farmacocinéticas e especificidade (LAU; DUNN, 2018). Desta forma, foram testados apenas os peptídeos conjugados com o pGluDF acoplados ao peptídeo GSTLN, sem espaçador e com o espaçador ácido 2-[2-(amino)etoxi]etoxi-acético. O conjugado contendo o espaçador apolar não foi avaliado devido à demora na importação do kit, devendo ser testado posteriormente. Além disso, foram testados os peptídeos pGluDF e o GSTLN juntos em solução, porém não conjugados, mas totalizando na soma 100 μ M, mesma concentração dos peptídeos avaliados individualmente. Na concentração de 100 μ M de inibidor, todos os conjugados mostraram capacidade de inibir a atividade da enzima. A menor atividade foi encontrada para o peptídeo sem espaçador (pGluDF-GSTLN), inclusive menor que as dos peptídeos individualmente, provavelmente devido ao impedimento estérico. A proximidade entre eles pode dificultar a interação com os sítios de ligação e diminuir a atividade.

O peptídeo pGluDF-espaçador1-GSTLN apresentou um aumento significativo da atividade quando comparado aos peptídeos pGluDF e GSTLN e pGluDF-GSTLN, indicando uma ação conjunta nos sítios de ligação do substrato e do NADPH da HMG-CoA redutase. Somado a isto, se pegar os peptídeos livres em solução na concentração de 50 μM em relação ao bioconjugado, o segundo foi mais ativo, mostrando um efeito mais que aditivo na atividade da HMG-CoA redutase. Silva *et al.* (2021a) verificaram em seu trabalho um incremento da atividade inibitória quando os peptídeos pGluGF e GSTLN foram misturados, ambos na concentração de 50 μM . A mistura do peptídeo GSTLN com o fármaco pravastatina também foi positiva, sugerindo uma ação conjunta nos sítios do substrato e do cofator.

5.9 Determinação do IC_{50} dos peptídeos

Para os peptídeos avaliados que apresentaram maior atividade inibitória, foi determinada a concentração capaz de inibir 50% da atividade da HMG-CoA redutase. Os peptídeos foram testados por análise espectrofotométrica (HULCHER; OLESON, 1973), nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 μM . A Figura 45 mostra o percentual de capacidade em reduzir atividade da enzima dos peptídeos pela concentração destes.

Figura 45 – Efeito dose/resposta dos peptídeos pGluDF, pGluDF-espaçador1-GSTLN e NDY sobre a atividade da enzima HMG-CoA redutase.



Foi verificado para os peptídeos pGluDF, pGluDF-espaçador1-GSTLN e NDY IC_{50} de 95,50, 54,96 e 112,4 μM respectivamente. O pGluDF-espaçador1-GSTLN,

apresentou maior potência, devido ao fato de conseguir agir em ambos os sítios catalíticos.

Outros estudos demonstraram que peptídeos com capacidade de inibir os dois sítios da enzima apresentam maior atividade. O fragmento IAVP, derivado do peptídeo IAVPGEVA, oriundo da globulina 11S da soja, apresentou IC₅₀ de 59,3 µM, sendo o mais ativo dos derivados do IAVPGEVA, e capaz de inibir a enzima de forma competitiva em ambos os sítios catalíticos, do substrato HMG-CoA e do cofator NADPH (PAK *et al.*, 2005b).

Os peptídeos análogos aos peptídeos derivados da proteína β-vignina apresentam um bom potencial hipocolesterolêmico, sendo possíveis candidatos a fármacos e/ou adjuvantes no tratamento de dislipidemias.

6 CONCLUSÕES

O estudo atual comprovou que os peptídeos QDF e MPNY oriundos da proteína β -vignina do feijão-caupí foram capazes de inibir competitivamente a enzima HMG-CoA redutase, interagindo no sítio catalítico do substrato, com mecanismo de ação semelhante às estatinas. A partir dos resultados obtidos na análise *in vivo*, foi possível verificar que embora os peptídeos não tenham reduzido os níveis séricos de colesterol e LDL, o peptídeo QDF foi capaz de modular o metabolismo lipídico de ratos alimentados com dieta hiperlipídica, reduzindo os níveis de triglicérides destes animais. Os peptídeos também não mostraram toxicidade nas condições estudadas.

A obtenção de novos análogos a partir das sequências acima foi positiva na obtenção de moléculas mais ativas. A análise de modelagem molecular e os ensaios *in vitro* mostraram que as sequências peptídicas análogas aos peptídeos identificados nas proteínas do feijão caupí foram capazes de interagir com a enzima e reduzir a sua atividade. Além disso, o pGluDF-espaçador1-GSTLN mostrou maior atividade, sendo capaz de inibir a enzima interagindo com os sítios catalíticos do substrato e do cofator.

Nesse contexto, os resultados desse estudo contribuem para os achados da literatura fornecendo evidências da atividade hipocolesterolêmica de peptídeos oriundos de proteínas de leguminosas. Somado a isto, indica que esses peptídeos podem ser utilizados no desenho de novas moléculas mais ativas e menos tóxicas.

REFERÊNCIAS

- ABU-ELHEIGA, L.; JAYAKUMAR, A.; BALDINI, A.; CHIRALA, S. S.; WAKIL, S. J. Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 4011-4015, 1995.
- ABU-ELHEIGA, L.; MATZUK, M. M.; ABO-HASHEMA, K. A.; WAKIL, S. J. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. **Science**, v. 291, p. 2613-2616, 2001.
- ABU-ELHEIGA, L.; WU, H.; GU, Z.; BRESSLER, R.; WAKIL, S. J. Acetyl-CoA carboxylase 2-/- mutant mice are protected against fatty liver under high-fat, high-carbohydrate dietary and de novo lipogenic conditions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 12578-12588, 2012.
- AKESON, W. R.; STAHMANN, M. A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **Journal of Nutrition**, v. 83, p. 257-261, 1964.
- ALENGHAT, F. J.; DAVIS, A. M. Management of blood cholesterol. **Journal of the American Medical Association**, v. 321, p. 800-801, 2019.
- ALUKO, R. E.; YADA, R. Y.; LENCKI, R. W.; MARANGONI, A. G. Structural and functional properties of a partially purified cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin modified with protein kinase and glycopeptidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2907-2913, 1997.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION (AHA). Heart diseases and stroke statistics – 2018 update. **Circulation Journal**, v. 139, p. 56-528, 2019.
- BARBARESCO, J.; RIENKS, J.; NOTHLINGS, U. Lifestyle indices and cardiovascular disease risk: a meta-analysis. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 55, p. 555-564, 2018.
- BAYS, H. E. A lipidologist perspective of global lipid guidelines and recommendations, part 1: Lipid treatment targets and risk assessment. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 10, p. 228-239, 2016.
- BOACHIE, R.; YAO, S.; UDENIGWE, C. C. Molecular mechanisms of cholesterol-lowering peptides derived from food proteins. **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p. 58-63, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Dislipidemia: Prevenção de eventos cardiovasculares e pancreatite**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.
- BURG, J. S.; ESPENSHADE, P. J. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. **Progress in Lipid Research**, v. 50, p. 403-410, 2011.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S.O. **Bioquímica**. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 812 p.

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

CARDOSO, M. L.; ALVES, A. C.; BOURBON, M. Colesterol total, nem oito (enta) nem (duzentos e) oitenta: Parte 1 – Defeitos da biossíntese do colesterol. **Boletim Epidemiológico Observações**, v. 7, p. 12-16, 2018.

CHOI, J. Y.; JEON, J. E.; JANG, S. Y.; JEONG, Y. J.; JEON, S. M.; PARK, H. J.; CHOI, M. S. Differential effects of powdered whole soy milk and its hydrolysate on antiobesity and antihyperlipidemic response to high-fat treatment in C57BL/6N mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2584-2591, 2011.

COHEN, J. D.; BRINTON, E. A.; ITO, M. K.; JACOBSON, T. A. Understanding Statin Use in America and Gaps in Patient Education (USAGE): an internet-based survey of 10,138 current and former statin users. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 6, p. 208-215, 2012.

CREIDER, J. C.; HEGELE, R. A. Clinical Evaluation for Genetic and Secondary Causes of Dyslipidemia. **Clinical Lipidology: A Companion to Braunwald's Heart Disease E-Book**, 2015, 128 p.

DE GRANDIS, R. A.; CAMARGO, M. S.; SILVA, M. M.; LOPES, E. O.; PADILHA, E. C.; RESENDE, F. A.; PECCININI, R. G.; PAVAN, F. R.; DESIDERI, A.; BATISTA, A. A.; VARANDA, E. A. Human topoisomerase inhibition and DNA/BSA binding of Ru (II)–SCAR complexes as potential anticancer candidates for oral application. **BioMetals**, v. 30, p. 321-334, 2017.

DENG, X.; MA, J.; SONG, M.; JIN, Y.; JI, C.; GE, W.; GUO, C. Effects of products designed to modulate the gut microbiota on hyperlipidaemia. **European Journal of Nutrition**, v. 58, p. 2713-2729, 2018.

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

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. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, p. 1-76, 2017.

FASSINI, P. G.; NODA, R. W.; FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; NEVES, V. A.; DEMONTE, A. Soybean glycinin improves HDL-C and suppresses the effects of rosuvastatin on hypercholesterolemic rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 165, 2011.

REFERENCE, B. A.; GINSBERG, H. N.; GRAHAM, I.; RAY, K. K.; PACKARD, C. J.; BRUCKERT, E. *et al.* Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus

statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. **European Heart Journal**, v. 38, p. 2459-2472, 2017.

FERREIRA, E. S.; AMARAL, A. L. S.; CAPRARO, J.; DEMONTE, A.; ZANELLI, C. F.; DURANTI, M.; NEVES, V. A. Hypocholesterolemic effect of rat-administered oral doses of the isolated 7S globulins from cowpeas and adzuki beans. **Journal of Nutritional Science**, v. 4, p. 1-9, 2015.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Food labeling: health claims; soybean protein and coronary heart disease, **Federal register/rules and regulations**. 64(206); 57700-57733, 1999.

FRIESEN, J. A.; RODWELL, V. W. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. **Genome Biology**, v. 5, p. 248, 2004.

FROTA, K. M. G.; MENDONÇA, S.; SALDIVA, P. H. N.; CRUZ, R. J.; ARÊAS, J. A. G. Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. **Journal of Food Science**, v. 73, p. H235-H240, 2008.

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. **Nutrición Hospitalaria**, v. 31, p. 1611-1619, 2015.

GOMES, M. J. C.; LIMA, S. L. S.; ALVES, N. E. G.; ASSIS, A.; MOREIRA, M. E. C.; TOLEDO, R. C. L.; ROSA, C. O. B.; TEIXEIRA, O. R.; BASSINELLO, P. Z.; DE MEJÍA, E. G.; MARTINO, H. S. D. Common bean protein hydrolysate modulates lipid metabolism and prevents endothelial dysfunction in BALB/c mice fed and atherogenic diet. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 30, p. 141-150, 2020.

HERNANDEZ, L. M. R.; DE 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.

HOWARD, A.; UDENIGWE, C. C. Mechanisms and prospects of food protein hydrolysates and peptide-induced hypolipidaemia. **Food & Function**, v. 4, p. 40-51, 2013.

HSIEH, J. Y.; CHEN, S. H.; HUNG, H. C. Functional roles of the tetramer organization of malic enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 18096-18105, 2009.

HULCHER, F. H.; OLESON, W. H. Simplified spectrophotometric assay for microsomal HMG-CoA reductase by measurement of CoA. **Journal of Lipid Research**, v. 14, p. 625-631, 1973.

ICHIGO, Y.; TAKESHITA, A.; HIBINO, M.; NAKAGAWA, T.; HAYAKAWA, T.; PATEL, D.; FIELD, C. J.; SHIMADA, M. High-fructose diet-induced hypertriglyceridemia is associated with enhanced hepatic expression of ACAT2 in rats. **Physiological Research**, v. 68, p. 1021-1026, 2019.

INTERNACIONAL ATHEROSCLEROSIS SOCIETY (IAS). An International Atherosclerosis Society Position Paper: Global recommendations for the management of dyslipidemia Expert Dyslipidemia Panel. **Journal of Clinical Lipidology**. v. 7, p. 561-565, 2013.

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

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

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

JANG, E. H.; MOON, J. S.; KO, J. H.; AHN, C. W.; LEE, H. H.; SHIN, J. K.; PARK, C.S.; KANG, J. H. Novel black soy peptides with antiobesity effects: activation of leptin-like signaling and AMP-activated protein kinase. **International Journal of Obesity**, v. 32, p. 1161-1170, 2008.

JIANG, X.; PAN, D.; ZHANG, T.; LIU, C.; ZHANG, J.; SU, M.; WU, Z.; ZENG, X.; SUN, Y.; GUO, Y. Novel milk casein-derived peptides decrease cholesterol micellar solubility and cholesterol intestinal absorption in Caco-2 cells. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 3924-3936, 2020.

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. **Analytical Biochemistry**, v. 34, p. 595-598, 1970.

KUMAR, V.; SHARMA, P.; BAIRAGYA, H. R.; SHARMA, S.; SINGH, T. P.; TIKU, P. K. Inhibition of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by peptides leading to cholesterol homeostasis through SREBP2 pathway in HepG2 cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1867, p. 604-615, 2019.

KWON, D. Y.; OH, S. W.; LEE, J. S.; YANG, H. J.; LEE, S.; LEE, J. C.; LEE, Y. B.; SOHN, H. S. Amino acid substitution of hypocholesterolemic peptide originated from glycinin hydrolyzate. **Food Science Biotechnology**, v.11, p. 56-61, 2002.

LAMMI, C.; AIELLO, G.; BOSCHIN, G.; ARNOLDI, A. Multifunctional peptides for the prevention of cardiovascular disease: A new concept in the area of bioactive food-derived peptides. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 135-145, 2019.

LAMMI, C.; ARNOLDI, A.; AIELLO, G. Soybean Peptides Exert Multifunctional Bioactivity Modulating 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase and Dipeptidyl Peptidase-IV Targets in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 4824-4830, 2019.

LAMMI, C.; ZANONI, C.; AIELLO, G.; ARNOLDI, A.; GRAZIOSO, G. Lupin peptides modulate the protein-protein interaction of PCSK9 with the low-density lipoprotein receptor in HepG2 cells. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-13, 2016.

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. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, p. 7945-7951, 2015.

LAPPHANICHAYAKOOL, P.; SUTHEERAWATTANANONDA, M.; LIMPEANCHOB, N. Hypocholesterolemic effect of sericin-derived oligopeptides in high-cholesterol fed rats. **Journal of Natural Medicines**, v. 71, p. 208-215, 2017.

LAU, J. L.; DUNN, M. K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 2700-2707, 2018.

LI, Y.; CLARK, K. A.; TAN, Z. Methods for engineering therapeutic peptides. **Chinese Chemical Letters**, v. 29, p. 1074-1078, 2018.

LI, S.; LIU, L.; HE, G.; WU, J. Molecular targets and mechanisms of bioactive peptides against metabolic syndromes. **Food & Function**, v. 9, p. 42-52, 2018.

LIMA, S. L. S.; GOMES, M. J. C.; SILVA, B. P.; ALVES, N. E. G.; TOLEDO, R. C. L.; THEODORO, J. M. V.; MOREIRA, M. E. C.; BENTO, J. A. C.; BASSINELLO, P. Z.; MATTA, S. L. P.; DE MEJÍA, E. G.; MARTINO, H. S. D. Whole flour and protein hydrolysate from common beans reduce the inflammation in BALB/c mice fed with high fat high cholesterol diet. **Food Research International**, v. 122, p. 330-339, 2019.

LIN, S. H.; CHANG, D. K.; CHOU, M. J.; HUANG, K. J.; SHIUAN, D. Peptide inhibitors of human HMG-CoA reductase as potential hypocholesterolemia agents. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 456, p. 104-109, 2015.

LIU, C.; FANG, L.; MIN, W.; LIU, J.; LI, H. Exploration of the molecular interactions between angiotensin-I-converting enzyme (ACE) and the inhibitory peptides derived from hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch.). **Food Chemistry**, v. 245, p. 471-480, 2018.

LUO, J.; YANG, H.; SONG, B. L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, p. 225-245, 2020.

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 Research International**, v. 77, p. 43-48, 2015b.

MARQUES, M. R.; FREITAS, R. A. M. S.; CARLOS, C. C.; SIGUEMOTO, E. S.; FONTANARI, G. G.; ARÊAS, J. A. G. Peptides from cowpea present antioxidant

activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilisation in to micelles. **Food Chemistry**, v. 168, p. 288-293, 2015a.

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 Research International**, v. 107, p. 165-171, 2018.

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

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 2149-2154, 1963.

MIKUS, C. R.; BOYLE, L. J.; BORENGASSER, S. J.; OBERLIN, D. J.; NAPLES, S. P.; FLETCHER, J.; MEERS, G. M.; RUEBEL, M.; LAUGHLIN, M. H.; DELLSPERGER, K. C.; Fadel, P. J.; THYFAULT, J. P. Simvastatin impairs exercise training adaptations. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, p. 709-714, 2013.

MORIKAWA, K. ISHIKAWA, K.; KANAMARU, Y.; HORI, G.; NAGAOKA, S. Effects of dipeptides having a C-terminal lysine on the cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA level in HepG2 cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, p. 821-825, 2007b.

MORIKAWA, K.; KONDO, I.; KANAMARU, Y.; NAGAOKA, S. A novel regulatory pathway for cholesterol degradation via lactostatin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 352, p. 697-702, 2007a.

MORONTA, J.; SMALDINI, P. L.; DOCENA, G. H.; AÑÓN, M. C. Peptides of amaranth were targeted as containing sequences with potential anti-inflammatory properties. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 463-473, 2016.

NAGAOKA, S.; NAKAMURA, A.; SHIBATA, H.; KANAMARU, Y. Soystatin (VAWWMY), a novel bile acid-binding peptide, decreased micellar solubility and inhibited cholesterol absorption in rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 74, p. 1738-1741, 2010.

NAGAOKA, S. Structure-function properties of hypolipidemic peptides. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, p. 1–8, 2019.

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

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. Third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). **NIH Pub.**

Bethesda, MD: National Heart, Lung, and Blood Institute. 2011. 284p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for care and use of laboratory animals**. Washington,DC: National Academy of Sciences, 1985.

NAVARESE, E. P.; ROBINSON, J. G.; KOWALEWSKI, M.; KOŁODZIEJCZAK, M.; ANDREOTTI, F.; BLIDEN, K.; TANTRY, U.; KUBICA, J.; RAGGI, P.; GURBEL, P. A. Association between baseline LDL-C level and total and cardiovascular mortality after LDL-C lowering: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Medical Association**. v. 319, p. 1566-1579, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1220 p.

NOH, H. J.; HWANG, D.; LEE, E. S.; HYUN, J. W.; YI, P. H.; KIM, G. S.; LEE, S. E.; PANG, C.; PARK, Y. J.; CHUNG, K. H.; DO KIM, G.; KIM K. H. Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of *Citrus unshiu*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 163, p. 106-112, 2015.

OESTERLE, A.; LAUFS, U.; LIAO, J. K. Pleiotropic effects of statins on the cardiovascular system. **Circulation Research**, v. 120, p. 229-243, 2017.

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

PAGE, B.; PAGE, M.; NOEL, C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. **International journal of oncology**, v. 3, p. 473-476, 1993.

PAK, V. V.; KOO, M. S.; KASYMOVA, T. D.; KWON, D. Y. Isolation and identification of peptides from soy 11S-globulin with hypocholesterolemic activity. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, p. 710-714, 2005a.

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

PAK, V. V.; KWON, D. Y.; KHOJIMATOV, O. K.; PAK, A. V.; SAGDULLAEV, S. S. Design of Tripeptides as a Competitive Inhibitor for HMG-CoA Reductase. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 27, p. 1-9, 2021.

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. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, p. 787-891, 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: Insource cyclization to pyroglutamic acid. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 5633-5637, 2014.

RAMADA, M. H. S.; BRAND, G. D.; ABRÃO, F. Y.; OLIVEIRA, M.; CARDOZO FILHO, J. L.; GALBIERI, R.; GRAMACHO, K. P.; PRATES, M. V.; BLOCH, C. Encrypted Antimicrobial Peptides from Plant Proteins. **Scientific Reports**, v. 7, p. 13263, 2017.

RIDKER, P. M.; PRADHAN, A.; MacFADYEN, J. G.; LIBBY, P.; GLYNN, R. J. Cardiovascular benefits and diabetes risks of statin therapy in primary prevention: an analysis from the JUPITER trial. **The Lancet**, v. 380, p. 565-571, 2012.

SANCHES, P. R. S.; CARNEIRO, B. M.; BATISTA, M. N.; BRAGA, A. C. S.; LORENZON, E. N.; RAHAL, P.; CILLI, E. M. A conjugate of the lytic peptide Hecate and gallic acid: structure, activity against cervical cancer, and toxicity. **Amino Acids**, v. 47, p. 1433-1443, 2015.

SANDESARA, P. B.; VIRANI, S. S.; FAZIO, S.; SHAPIRO, M. D. The forgotten lipids: triglycerides, remnant cholesterol, and atherosclerotic cardiovascular disease risk. **Endocrine Reviews**, v. 40, p. 537-557, 2019.

SANTILLO, A.; FIGLIOLA, L.; CAROPRESE, M.; MARINO, R.; GIARDINO, I.; ALBENZIO, M. Effect of lipid fraction of digested milk from different sources in mature 3T3-L1 adipocyte. **The Journal of Dairy Research**, v. 86, p. 129-133, 2019.

SANTOS-FILHO, N.; FERNANDES, R.; SGARDIOLI, B.; RAMOS, M.; PICCOLI, J.; CAMARGO, I.; BAUAB, T.; CILLI, E. Antibacterial Activity of the Non-Cytotoxic Peptide (p-BthTX-I)₂ and Its Serum Degradation Product against Multidrug-Resistant Bacteria. **Molecules**, v. 22, p. 1898, 2015.

SHI, W.; HOU, T.; GUO, D.; HE, H. Evaluation of hypolipidemic peptide (Val-Phe-Val-Arg-Asn) virtual screened from chickpea peptides by pharmacophore model in high-fat diet-induced obese rat. **Journal of Functional Foods**, v. 54, p. 136-145, 2019.

SILVA, J. R.; SILVA, M. B. C.; PHILADELPHO, B. O.; SOUZA, V. C.; SANTOS, J. E. M.; CASTILHO, M. S.; FERREIRA, E. S.; CILLI, E. M. PyrGF and GSTLN peptides enhance pravastatin's inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme. **Food Bioscience**, v. 44, p. 101451, 2021a.

SILVA, M. B. C.; PHILADELPHO, B. O.; SANTOS, J.; SOUZA, C. A.; SANTIAGO, V.; SILVA, J.; SOUZA, C.; AZEREDO, F.; CASTILHO, M.; CILLI, E. M.; FERREIRA, E. IAF, QGF and QDF peptides exhibit cholesterol-lowering activity through a statin-like HMG-CoA reductase regulation mechanism: *In silico* and *in vitro* approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 11067, 2021.

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 Chemistry**, v. 259, p. 270-277, 2018.

SIRTORI, C. R. The pharmacology of statins. **Pharmacological Research**, v. 88, p. 3-11, 2014.

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

SOARES, R. A. M.; MENDONÇA, S.; DE CASTRO, L. Í. A.; MENEZES, A. C. C. C.; ARÊAS, J. A. G. Major peptides from amaranth (*Amaranthus cruentus*) protein inhibit HMG-CoA reductase activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 4150-4160, 2015.

SUN, S.; WANG, W.; WANG, N.; ZHANG, Y.; ZHU, Z.; LI, X.; WANG, J.; CHEN, Q.; SADIQ, F. A.; YANG, H.; QI, Q.; ZHANG, G. HPP and SGQR peptides from silkworm pupae protein hydrolysates regulated biosynthesis of cholesterol in HepG2 cell line. **Journal of Functional Foods**, v. 77, p. 104328, 2021.

SWERDLOW, D. I.; PREISS, D.; KUCHENBAECKER, K. B.; HOLMES, M. V.; ENGMANN, J. E. L.; SHAH, T.; LEUSINK, M. et al. HMG-coenzyme A reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: evidence from genetic analysis and randomised trials. **The Lancet**, v. 385, p. 351-361, 2015.

THOMPSON, P. D.; PANZA, G.; ZALESKI, A.; TAYLOR, B. Statin-associated side effects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 67, p. 2395-2410, 2016.

TIAN, W. X.; MA, X. F.; ZHANG, S. Y.; SUN, Y. H.; LI, B. H. Fatty acid synthase inhibitors from plants and their potential application in the prevention of metabolic syndrome. **Clinical Oncology and Cancer Research**, v. 8, p. 1-9, 2011.

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

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

UDENIGWE, C. C.; ROUVINEN-WATT, K. The role of food peptides in lipid metabolism during dyslipidemia and associated health conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 9303-9313, 2015.

UL AIN, N.; SAFDAR, N.; YASMIN, A. Antimicrobial Investigations from Crude and Peptide Extracts of *Glycine max* Linn. Merr Varieties. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 42, p. 105-113, 2017.

VÁSQUEZ-VILLANUEVA, R.; MUÑOZ-MORENO, L.; CARMENA, M. J.; MARINA, M. L.; GARCÍA, M. C. In vitro antitumor and hypotensive activity of peptides from olive seeds. **Journal of Functional Foods**, v. 42, p. 177-184, 2018.

WADHERA, R. K.; STEEN, D. L.; KHSN, I.; GIUGLIANO, R. P.; FOODY, J. M. A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 10, p. 472-489, 2016.

WANG J.; SHIMADA M.; KATO Y.; KUSADA M.; NAGAOKA S. Cholesterol-lowering effect of rice bran protein containing bile acid-binding proteins. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 79, p. 456-461, 2015.

WIGGINS, B. S.; DIXON, D.; BELLONE, J.; GASBARRO, N.; MARRS, J. C.; TRAN, R. Key articles and guidelines in the management of dyslipidemia: 2019 update. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 33, p. 882-894, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Time to deliver: report of the WHO Independent High-Level Commission on Noncommunicable Diseases. Ed. **World Health Organization**, 2018.

XU, F.; RYCHNOVSKY, S. D.; BELANI, J. D.; HOBBS, H. H.; COHEN, J. C.; RAWSON, R. B. Dual roles for cholesterol in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 14551-14556, 2005.

YAMADA, Y.; MURAKI, A.; OIE, M.; KANEGAWA, N.; ODA, A.; SAWASHI, Y.; KANEKO, K.; YOSHIKAWA, M.; GOTO, T.; TAKAHASHI, N.; KAWADA, T.; OHINATA, K. Soymorphin-5, a soy-derived μ -opioid peptide, decreases glucose and triglyceride levels through activating adiponectin and PPAR α systems in diabetic KKAY mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 302, p. E433-E440, 2012.

ZANONI, C.; AIELLO, G.; ARNOLDI, A.; LAMMI, C. Investigations on the hypocholesterolaemic activity of LILPKHSDAD and LTFPGSAED, two peptides from lupin β -conglutin: Focus on LDLR and PCSK9 pathways. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 1-8, 2017.

ZHOU, J.; CHEN, M.; WU, S.; LIAO, X.; WANG, J.; WU, Q.; ZHUANG, M.; DING, Y. A review on mushroom-derived bioactive peptides: Preparation and biological activities. **Food Research International**, v. 134, p. 109230, 2020.

ANEXO



Universidade Federal da Bahia
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comitê de Ética no Uso de Animais

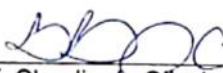
Av. Ademar de Barros, 500 – Ondina-40170-110 Salvador-BA
 Fone: (071) 3283-6704/6708/ - Fax: 3283-6718
 E-mail: escmev@ufba.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da capacidade de peptídeos Oriundos da hidrólise da proteína b-vignina na modulação do metabolismo lipídico**”, registrada com o nº **91/2018**, sob a responsabilidade do **Prof. Ederlan de Souza Ferreira**, e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, **em reunião de 10.12.2018.**

Finalidade	() Ensino () Pesquisa Científica
Vigência da autorização	06.11.2018 à 27.11.2018
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	32
Peso/Idade	150-200g / 40 dias
Sexo	Ambos
Origem	Biotério do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA

Salvador, 10/12/2018.


 p/ Prof. Claudio de Oliveira Romão
 Coordenador CEUA/EMEVZ-UFBA