

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Biodisponibilidade de peptídeos do feijão caupi
(*Vigna unguiculata* L. Walp) e o metabolismo do
colesterol**

Bianka Caliman Salvador

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Nutrição em Saúde Pública para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Prof. Tit. José Alfredo Gomes Arêas

São Paulo

2017

**Biodisponibilidade de peptídeos do feijão caupi
(*Vigna unguiculata* L. Walp) e o metabolismo do
colesterol**

Bianka Caliman Salvador

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Nutrição em Saúde Pública para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Prof. Tit. José Alfredo Gomes Arêas

Versão Corrigida

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela capacidade de aprender e de buscar ser melhor a cada dia.

A toda a minha família, pelo amor, incentivo e apoio, cada um a seu modo. Em especial a minha mãe Carman, pelo exemplo de garra e força de vontade e ao meu irmão Adriano, pelo exemplo de determinação e superação.

Ao Professor José Alfredo, pela oportunidade e por todos os ensinamentos ao longo desses anos.

Aos membros da banca examinadora: Daniel Carvalho Pimenta, Elizabeth Torres, Marília Cerqueira Leite Seelaender e Valéria Sutti Nunes pelas valiosas contribuições. Ainda à Professora Elizabeth pela disponibilidade do Laboratório de Bromatologia e aos pesquisadores Daniel e Valéria, pela parceria com análises e auxílio ao longo do trabalho.

As Doutoradas Geni e Liania, pelo suporte técnico nos laboratórios, pelo carinho e auxílio em todos os campos da vida.

À companheira de análises Rosana, pela amizade, apoio técnico e orientação ao longo de toda esta etapa.

Aos colegas e amigos da FSP e de Sampa: Augusto Carioca, Áurea Bombo, Cláudia Tramontt, Érica Oki, Érica Siguemoto, Flávia de Conti, Glória Guizellini, Jéssica Aragão, Kamila Gabe, Iara, Joice Castro, Lucile Matsumoto, Manuela Lopes, Maria Carolina Von Atzingen, Mariana Séfora, Marina Norde, Sebastião Bastos, Simone Silva, Társis Maia e Thaíse Mendes, pelos bons momentos e por proporcionarem tornar essa etapa ainda mais enriquecedora e feliz.

Aos amigos e colegas de laboratório: Amanda Carlos, Camila Olivieri, Cintia Silva, Gustavo Fontanari, Marcelo Marques, Nara Letícia Zandonadi e Rosana Soares, por todo o carinho, colaboração e aprendizado compartilhado.

Aos amigos: Eliana Tosi, Elysângela, Cocovik, Fernanda Oliveira, Gardênia Campos, Guilherme Salvador, José Jorge Zardo Júnior, Letícia Oliveira, Ludimila Tureta, Marcey Marinho, Maria Aparecida da Silva, Maria da Graça Fernandes, Marina Fonseca, Monise Abranches, Raquel Bassani, Rita Santana e Roberto Santolim, por mesmo de longe sempre se fazerem presentes.

A todos os funcionários dos Biotérios e Departamentos da Faculdade de Saúde Pública, em especial: Alessandra, Cíntia, Eduardo, José Bezerra, Roseli e Vânia, pelo auxílio sempre que necessário.

A CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

“É necessário aprender a ser grande, mas antes deverá medir-se a própria pequenez, pois esta seria uma forma de ver a si mesmo sobre a palma da mão e ver, também, de que modo esse pequeno ser pode ir crescendo, até assumir a estatura do gigante a que cada um aspira.”

Carlos Bernardo González Pecotche

RESUMO

SALVADOR, Bianka Caliman. **Biodisponibilidade de peptídeos do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) e o metabolismo do colesterol.** 2017. 81 f. Tese (Doutorado em Nutrição em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Introdução: Doenças cardiovasculares constituem importante causa de morte em todo mundo e a hipercolesterolemia está diretamente relacionada a elas. A dieta desempenha papel importante neste processo e alguns alimentos como o feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), especialmente sua proteína, tem sido apontado com potencial capacidade de redução do colesterol plasmático. Os efeitos hipocolesterolêmicos já observados indicaram o uso da proteína do feijão caupi, ou dos seus peptídeos, como ingrediente funcional de alimentos para a promoção da saúde e a redução do risco de doenças. Entretanto, as consequências da digestão gastrointestinal na absorção destes peptídeos são claramente complexas tornando essenciais estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliar a sua bioacessibilidade e sua resistência à degradação gastrointestinal, além da disponibilidade e real eficácia destes peptídeos. **Objetivo:** Analisar a biodisponibilidade de peptídeos e avaliar parâmetros ligados ao metabolismo do colesterol em modelos animais após ingestão de isolado proteico de feijão caupi. **Métodos:** A farinha de feijão caupi foi desengordurada e sua proteína isolada. O isolado proteico foi submetido a métodos de hidrólise *in vitro*, para verificação das frações peptídicas formadas e inferência sobre a capacidade de ligação à albumina. Dois experimentos *in vivo* foram conduzidos. No primeiro, o isolado proteico do feijão caupi foi administrado a ratos e a concentração dos peptídeos monitorada no sangue, por 2 horas. O experimento *in vivo* 2 consistiu na alimentação de hamsters com dietas normo (N) e hipercolesterolêmicas por 21 dias, contendo a proteína do feijão caupi como única proteína da ração (I), comparada ao controle de caseína (H). Neste experimento foram analisados no plasma: colesterol total (CT) e frações (LDL-c, VLDL-c e HDL-c), triglicerídeos (TG) e peptídeos; nas fezes: colesterol total (CF) e ácidos biliares (AB); no fígado: colesterol (CH) e lipídeos totais (LH), HMGCR (atividade enzimática e expressão) e expressão de SREBP2, LDLR, ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8, LXR α e AMPK. **Resultados:** Os peptídeos identificados a partir da hidrólise proteica do feijão caupi, ou a partir do plasma dos animais estudados não evidenciaram

similaridades entre os experimentos ou corresponderam a sequências previamente identificadas para o feijão caupi a partir de banco de dados. CT, VLDL-c, HDL-c, TG, CH dos hamsters foram maiores nos grupos H e I quando comparado ao N; LDL-c foi maior para I comparado aos demais; LH foi maior em H comparado a N, sendo que I não diferiu dos demais; CF foi maior para I comparado a N, sendo que H não diferiu dos demais. A expressão de ABCA1 foi maior para I em relação aos demais; LXR α foi maior para I em relação a H, mas N não diferiu dos demais; SREBP2 foi menor em H em comparação aos demais; HMGCR foi mais expressa em N em comparação aos demais, ao passo que a atividade desta enzima foi maior em I quando comparado a N, sendo que H não diferiu dos demais. Não houve diferença entre os grupos quanto a AB ou expressão de ABCG8 ou AMPK. Não foram obtidos resultados de expressão para LDLR, ABCG1 e ABCG5. **Conclusão:** Apesar de pesquisas anteriores a este trabalho terem evidenciado a capacidade do isolado proteico do feijão caupi em inibir a atividade da HMGCR, inibir a solubilização micelar ou melhorar o perfil de lipídeos plasmáticos, no trabalho atual esta matéria prima não mostrou atuação positiva quanto ao metabolismo do colesterol de hamsters nas condições experimentais utilizadas. Os fragmentos indicados como peptídeos obtidos a partir da hidrólise proteica do feijão caupi, ou do plasma dos animais estudados não corresponderam a peptídeos com comprovada, ou até mesmo, com indicação de bioatividade.

Descritores: feijão caupi, peptídeos bioativos, hipercolesterolemia, isolado proteico.

ABSTRACT

SALVADOR, Bianka Caliman. **Bioavailability of cowpea peptides (*Vigna unguiculata* L. Walp) and the cholesterol metabolism.** 2017. 81 f. Thesis (Doctorate in Nutrition in Public Health) – School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, 2017. Portuguese.

Introduction: Cardiovascular diseases are important cause of death worldwide and hypercholesterolemia is directly related to them. Diet plays an important role in this process and some foods such as cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), especially its protein, have been shown to have a potential for reducing plasma cholesterol. The hypocholesterolemic effects already observed indicated the use of cowpea protein, or its peptides, as a functional food ingredient for health promotion and reduction of disease risk. However, the consequences of gastrointestinal digestion on the absorption of these peptides are clearly complex, making *in vitro* and *in vivo* studies essential to assess their bioaccessibility and resistance to gastrointestinal degradation, as well as the availability and actual efficacy of these peptides. **Objectives:** To analyze the bioavailability of peptides and evaluate parameters related to cholesterol metabolism in animal models after ingestion of protein isolate of cowpea. **Methods:** Cowpea flour was defatted and its protein isolated. The protein isolate was subjected to *in vitro* hydrolysis methods to verify the formed peptide fractions and inference about albumin binding ability. Two *in vivo* experiments were conducted. In the first, the cowpea protein isolate was administered to rats and the concentration of the peptides monitored in the blood for 2 hours. The *in vivo* experiment 2 consisted of feeding hamsters with normal (N) and hypercholesterolemic diets for 21 days, containing the cowpea protein as the sole dietary protein (I), compared to casein control (H). In this experiment were analyzed in the plasma: total cholesterol (TC) and fractions (LDL-c, VLDL-c and HDL-c), triglycerides (TG) and peptides; In feces: total cholesterol (CF) and bile acids (AB); In the liver: cholesterol (CH) and total lipids (LH), HMGCR (enzymatic activity and expression) and expression of SREBP2, LDLR, ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8, LXR α and AMPK. **Results:** The peptides identified from the protein hydrolysis of cowpea or from the plasma of the animals studied did not show similarities among the experiments or correspond to sequences previously identified for the cowpea from the database. CT, VLDL-c, HDL-c, TG, CH of hamsters were higher in groups H and I when compared to N; LDL-c was higher for I compared to the others; LH was

higher in H compared to N, and I did not differ from the others; CF was higher for I compared to N, and H did not differ from the others. The expression of ABCA1 was higher for I than the others; LXR α was higher for I than H, but N did not differ from the others; SREBP2 was lower in H compared to the others; HMGCR was more expressed in N compared to the others, whereas the activity of this enzyme was higher in I when compared to N, and H did not differ from the others. There was no difference between groups regarding AB or expression of ABCG8 or AMPK. No expression results were obtained for LDLR, ABCG1 and ABCG5. **Conclusion:** Although previous research to this work evidenced the ability of the cowpea protein isolate to inhibit HMGCR activity, inhibit micellar solubilization or improve the plasma lipid profile, in the current work this raw material did not show a positive cholesterol metabolism of hamsters under the experimental conditions used. The fragments indicated as peptides obtained from the protein hydrolysis of cowpea beans, or from the plasma of the animals studied did not correspond to peptides with proven, or even, with indication of bioactivity.

Descriptors: cowpea beans, bioactive peptides, hypercholesterolemia, protein isolate.

LISTAS DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1 – Esquema simplificado da rota de biossíntese do colesterol.	18
Figura 2 – Estrutura fisiológica da bioatividade de peptídeos.	22
Figura 3 – Esquema geral do trabalho.	28
Figura 4 – Fluxograma do isolamento proteico da farinha de feijão caupi.	30
Figura 5 – Esquema geral do Experimento <i>in vitro</i>	31
Figura 6 – Esquema geral do Experimento <i>in vivo</i> 1.	33
Figura 7 – Esquema geral do Experimento <i>in vivo</i> 2.	36
Figura 8 – Concentrações séricas de CT, VLDL-c, LDL-c e HDL-c dos hamsters. Experimento <i>in vivo</i> 2.	51
Figura 9 – Distribuição do colesterol total sérico dos hamsters. Experimento <i>in vivo</i> 2.	52
Figura 10 – Concentração de triglicerídeos séricos dos hamsters. Experimento <i>in vivo</i> 2.	53
Figura 11 – Composição do triglicerídeo sérico dos hamsters. Experimento <i>in vivo</i> 2. ...	53
Figura 12 – Atividade hepática da HMGCR em hamsters. Experimento <i>in vivo</i> 2.	58
Figura 13 – Expressão de genes relacionados com lipídeos no fígado de hamsters. Experimento <i>in vivo</i> 2.	60
Figura 14 – Fluorescência de BSA excitado a 280 e 293 nm na presença do hidrolisado proteico do feijão caupi. Experimento <i>in vitro</i>	64
Figura 15 – Fluorescência de BSA excitado a 280 e 293 nm, a 25 e 35 C°, na presença do hidrolisado. Experimento <i>in vitro</i>	66
Quadro 1 – Distribuição dos animais, segundo grupos. Experimento <i>in vivo</i> 1.	34
Quadro 2 – Discriminação dos grupos de animais, segundo tipo de dieta administrada. Experimento <i>in vivo</i> 2.	37
Quadro 3 – Formulação planejada das dietas administradas, segundo grupo de animais. Experimento <i>in vivo</i> 2.	39
Quadro 4 – Tipo de análises realizadas, segundo material biológico. Experimento <i>in vivo</i> 2.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Necessidades nutricionais de hamsters em fase de crescimento (animal com 35 a 130 g).....	38
Tabela 2 – Perfil de aminoácidos do isolado proteico do feijão caupi.	40
Tabela 3 – Composição centesimal (g.100 g ⁻¹) das farinhas de feijão caupi: integral, desengordurado e isolado proteico, em base seca.	48
Tabela 4 – Composição centesimal (g.100 g ⁻¹) das dietas em base seca. Experimento <i>in vivo</i> 2.	49
Tabela 5 – Perfil de ácidos graxos (g.100 g ⁻¹) das dietas. Experimento <i>in vivo</i> 2.....	50
Tabela 6 – Peso inicial e final, ingestão diária média e total de dieta, ganho de peso e CEA (coeficiente de eficiência alimentar) dos hamsters. Experimento <i>in vivo</i> 2.	51
Tabela 7 – Peso do fígado, ALT (alanina aminotransferase), lipídeos totais e colesterol hepático dos hamsters. Experimento <i>in vivo</i> 2.	55
Tabela 8 – Colesterol e ácidos biliares excretados nas fezes dos hamsters. Experimento <i>in vivo</i> 2.	57
Tabela 9 – Fragmentos identificados como possíveis peptídeos, a partir da hidrólise do isolado proteico do feijão caupi. Experimento <i>in vitro</i>	67
Tabela 10 – Fragmentos identificados como possíveis peptídeos, a partir do soro de animais após gavagem com isolado proteico do feijão caupi. Experimento <i>in vivo</i> 1.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAT2	Acil-CoA: colesterol aciltransferase
ALT	Alanina amino transferase
AST	Aspartato amino transferase
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
Apo	Apolipoproteína
BSA	Albumina do soro bovina
BSH	Albumina do soro humano
CT	Colesterol total
FAS	Ácido graxo sintase
GGT	γ -glutamilttransferase
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade
HMGCR	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
LDLR	Receptor LDL
LPL	Lipase lipoproteica
LXR α	α receptor X do fígado
NAFLD	Doença gordurosa hepática não-alcoólica
NPC1L1	Proteína Niemann-Pick C1-like 1
MUFA	Ácido graxo monoinsaturado
PEPT1	Transportador de peptídeos próton-dependente 1
POT	Transportador de oligopeptídeos próton-dependente
PUFA	Ácido graxo poliinsaturado
SCAP's	Proteína ativadora de clivagem do SREBP
SREBPE2	Proteína de ligação do elemento regulador do esterol 2
TG	Triglicerídeos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. <i>METABOLISMO DO COLESTEROL.....</i>	<i>16</i>
2.2. <i>DIGESTÃO PROTEICA E PEPTÍDEOS BIOATIVOS.....</i>	<i>20</i>
2.3. <i>FEIJÃO CAUPI E PEPTÍDEOS HIPOCOLESTEROLÊMICOS</i>	<i>25</i>
3. OBJETIVOS	27
3.1. <i>OBJETIVO GERAL.....</i>	<i>27</i>
3.2. <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	<i>27</i>
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. <i>MATÉRIA PRIMA.....</i>	<i>29</i>
4.2. <i>EXPERIMENTO IN VITRO</i>	<i>31</i>
4.2.1. <i>Hidrólise.....</i>	<i>31</i>
4.2.2. <i>Capacidade de Ligação à Albumina.....</i>	<i>32</i>
4.2.3. <i>Peptídeos</i>	<i>32</i>
4.3. <i>EXPERIMENTO IN VIVO 1</i>	<i>33</i>
4.3.1. <i>Animais</i>	<i>33</i>
4.3.2. <i>Dieta</i>	<i>34</i>
4.3.3. <i>Coleta e Análise de Material Biológico</i>	<i>34</i>
4.4. <i>EXPERIMENTO IN VIVO 2</i>	<i>35</i>
4.4.1. <i>Animais</i>	<i>36</i>
4.4.2. <i>Dieta</i>	<i>37</i>
4.4.3. <i>Ganho de Peso e Consumo Alimentar</i>	<i>41</i>
4.4.4. <i>Coleta e Análise de Material Biológico</i>	<i>41</i>
4.5. <i>ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....</i>	<i>47</i>
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. <i>CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA.....</i>	<i>48</i>
5.2. <i>METABOLISMO DO COLESTEROL (EXPERIMENTO IN VIVO 2).....</i>	<i>49</i>
5.2.1. <i>Caracterização das dietas, consumo e ganho de peso dos animais</i>	<i>49</i>
5.2.2. <i>Perfil de Lipídeos Séricos</i>	<i>51</i>

5.2.3. Lipídeos Totais e Colesterol no Fígado	55
5.2.4. Colesterol e Ácidos Biliares nas Fezes	56
5.2.5. Atividade Hepática da HMGCR	58
5.2.6. Expressão por PCR	59
5.3. ABSORÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS.....	63
5.3.1. Capacidade de ligação da albumina	63
5.3.2. Peptídeos, EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	67
5.3.3. Peptídeos, EXPERIMENTO <i>IN VIVO 1 (RATOS)</i>	68
5.3.4. Peptídeos, EXPERIMENTO <i>IN VIVO 2 (HAMSTERS)</i>	68
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
7. CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
CURRÍCULOS LATTES	80

1. INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares constituem importante causa de morte em todo mundo e refletem grande morbidade e consumo de recursos do setor saúde (ARAÚJO et al., 2005; RIBEIRO et al., 2005; ROSA et al., 2007; HSU et al., 2013). Além de contribuir para a redução na qualidade de vida dos indivíduos e aumentar gastos com tratamentos, podem afetar a economia por acometerem aqueles responsáveis pela força de trabalho e economicamente ativos (ROSA et al., 2007).

A hipercolesterolemia é considerada um fator de risco importante para as doenças cardiovasculares e a dieta desempenha papel importante neste processo (HALLIKAINEN et al., 2013).

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), especialmente sua proteína, tem apontado capacidade de redução do colesterol plasmático (FROTA, 2007; FROTA et al., 2008; FROTA, 2011) e desta forma, contribuição no combate a este fator de risco cardiovascular.

Estudos indicam que este efeito hipocolesterolêmico, de forma semelhante ao que acontece em outros alimentos como o amaranto e o tremoço, está relacionado a peptídeos formados durante a digestão da proteína, capazes de desempenhar papel importante na regulação e modulação do metabolismo lipídico (FROTA et al., 2008; VAZ, 2010; SEGURA-CAMPOS et al., 2011; FONTANARI et al., 2012).

Há indicações de que peptídeos hipocolesterolêmicos podem agir como inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMGCR), enzima chave na síntese do colesterol no fígado, ou na inibição da absorção de colesterol por meio da atuação em transportadores e receptores envolvidos no metabolismo do colesterol, tanto a nível hepático quanto intestinal, ou ainda na excreção fecal (CHO et al., 2008; LIASET et al., 2009; VAZ, 2010; LIU et al., 2012; HOWARD e UDENIGWE, 2013).

Os efeitos hipocolesterolêmicos observados apontam para o uso potencial da proteína do feijão caupi, ou dos seus peptídeos, como ingrediente funcional na produção de alimentos, para a promoção da saúde e redução do risco de doenças. Entretanto, os efeitos da digestão gastrointestinal na absorção destes peptídeos são complexos e requerem estudos *in vitro* e *in vivo*, visando avaliar a sua resistência à degradação gastrointestinal e bioacessibilidade. É também fundamental a avaliação da eficácia de ação e da disponibilidade destes peptídeos no organismo para atuação nos locais alvo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. METABOLISMO DO COLESTEROL

O fígado controla os níveis de colesterol no plasma através de uma rede metabólica complexa de receptores de lipoproteínas, transportadores de esteróis e receptores nucleares que traduzem sinais gerados por alterações na concentração do colesterol, e assim, selecionam o controle transcricional para a expressão gênica. Ao lado do fígado, o intestino é importante na regulação de muitos aspectos do metabolismo do colesterol, pois é o seu principal local de absorção e de excreção (HUI et al., 2008; SINGH et al., 2013; GROEN, et al. 2014).

As principais fontes de colesterol hepático são o colesterol da dieta, o sintetizado nos tecidos extra hepáticos (e levados ao fígado por meio do HDL-c) e o produzido a partir da síntese *de novo* no fígado. As principais rotas de efluxo do colesterol hepático são o colesterol livre secretado na bile, o colesterol convertido em sais e ácidos biliares e o secretado por meio do VLDL-c (HARVEY e FERRIER, 2012; HSIEH et al. 2014; YU et al., 2014).

Como principais pontos de regulação do colesterol plasmático pode-se citar: a absorção intestinal de colesterol; a captação do colesterol hepático pelo LDL-c; a síntese hepática de colesterol *de novo* (com ênfase para a HMGCR) e a excreção biliar (LAM et al., 2008).

Antes de moléculas de colesterol serem absorvidas pelo receptor NPC1L1, nos enterócitos, é necessário sua emulsificação, a partir de micelas mistas de sais biliares e lipídeos. A formação de micelas aumenta a área de superfície das gotículas de lipídeos hidrofóbicos, de forma que as enzimas digestivas possam agir (WANG, 2007; HARVEY e FERRIER, 2012).

A NPC1L1 é uma proteína expressa em células que formam a borda em escova dos enterócitos, sendo o jejuno proximal a região em que a sua expressão é mais elevada. Ela é muito importante porque pode determinar a quantidade de colesterol que circula para o fígado, ao permitir, ou não, que ele seja descartado como esteróis neutros (CASTRO-TORRES et al., 2014).

Em oposição direta a NPC1L1, verifica-se que o heterodímero de transportadores ABC, G5 (ABCG5) e G8 (ABCG8) inibe a absorção de colesterol e esteróis vegetais da dieta mediando o efluxo destes esteróis a partir dos enterócitos de volta ao lúmen intestinal e promovendo a secreção eficiente de colesterol e esteróis vegetais de hepatócitos para a bile (YU et al., 2014).

A expressão de ABCG5 e ABCG8 é regulada principalmente ao nível da transcrição. O LXR α , um fator de transcrição nuclear ativado pelo ligante, envolvido no controle do metabolismo dos lípidos, é considerado o principal regulador da expressão de mRNA de ABCG5 e ABCG8 (CALKIN e TONTONNOZ, 2013; YU et al., 2014).

LXR α é um receptor nuclear. Os receptores nucleares traduzem sinais hormonais, metabólicos e nutricionais em alterações na expressão gênica. Consistem num domínio de ligação ao DNA e num domínio de ligação ao ligante. Os LXRs são ativados por oxisteróis e expressos em tecidos com uma elevada atividade metabólica, incluindo o hepático e o adiposo, e em macrófagos (CALKIN e TONTONNOZ, 2013).

Retomando a absorção intestinal: as moléculas de colesterol absorvidas atingem o retículo endoplasmático, onde a ACAT2 (*Acyl-CoA: cholesterol acyl transferase*) esterifica o colesterol. Ésteres de colesterol são, então, conduzidos à biogênese dos quilomícrons (WANG, 2007; HARVEY e FERRIER, 2012; CASTRO-TORRES et al., 2014).

O colesterol circulante necessita de uma vesícula de transporte para protegê-lo da natureza aquosa do plasma, visto que é um lipídio. Essa função é exercida por lipoproteínas (VLDL, LDL, HDL), partículas esféricas complexas, variadas em tamanho e composição, que sofrem a ação de enzimas e proteínas de transferência no plasma e são continuamente remodeladas durante o seu trânsito (DANIELS et al., 2009; GOEDEKE e FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2012).

Remanescentes de quilomícrons são absorvidos pelos hepatócitos, que secretam lipídeos em partículas de VLDL-c, que por sua vez são transformadas na circulação em LDL-c (WANG, 2007; GOEDEKE e FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2012).

As LDL-c são as principais lipoproteínas transportadoras de colesterol hepático para os tecidos periféricos (DANIELS et al., 2009; LOTTEMBERG, 2009). Sua absorção ocorre através de receptores, os LDLR, e é um exemplo clássico de endocitose mediada por receptor (GOEDEKE e FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2012). A maior parte das LDL-c é removida da circulação pelo fígado e o restante, pelos tecidos periféricos. Ao se ligarem a receptores específicos, são internalizadas e degradadas (LOTTEMBERG, 2009; HARVEY e FERRIER, 2012; SATO, 2015).

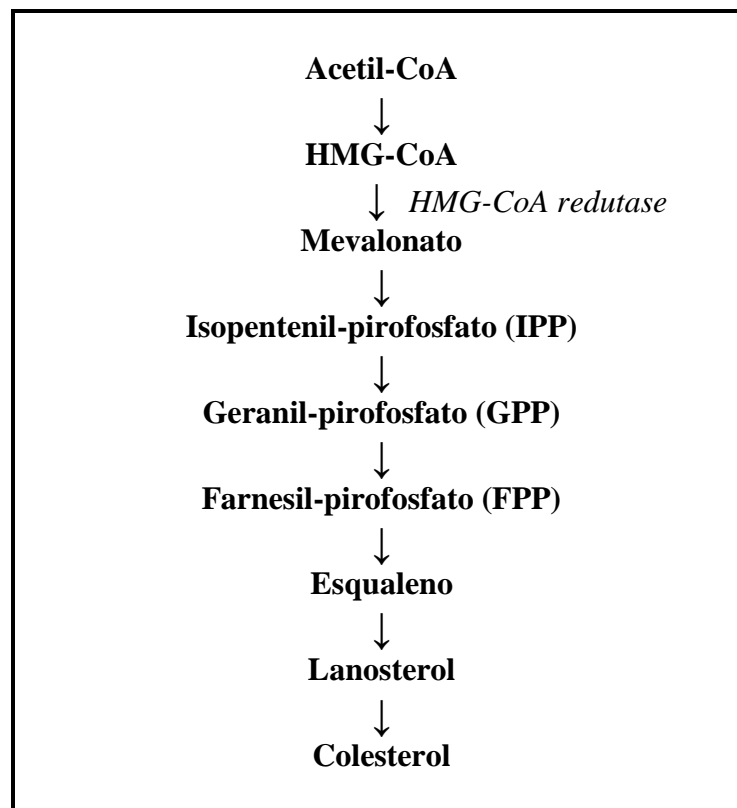
A biossíntese e absorção de colesterol pelos LDLR são rigorosamente reguladas ao nível da transcrição através do controle de retroalimentação negativo, que é mediado por proteínas de ligação a elementos reguladores de esteróis (SREBPs). Em particular, a SREBP2 é ativada de um

modo dependente do colesterol e, assim, é significativamente envolvida na regulação da expressão desses genes associados ao metabolismo do colesterol (SATO, 2015).

A via de síntese endógena do colesterol compreende mais de 20 reações catalisadas enzimaticamente e está esquematizada resumidamente na Figura 1.

O colesterol é sintetizado no retículo endoplasmático a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA) através da via do mevalonato. A primeira etapa envolve a condensação sequencial de três moléculas de acetil-CoA pelas enzimas acetil-CoA acetil transferase e HMG-CoA-sintase, que originam a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Esta é reduzida a mevalonato, pela HMG-CoA redutase microsossomal, uma etapa limitante da síntese do colesterol (GOEDEKE e FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2012).

Figura 1 – Esquema simplificado da rota de biossíntese do colesterol.



Fonte: Adaptado de HARVEY e FERRIER (2012).

A HMGCR é regulada pela quantidade de colesterol intracelular, sendo que seu excesso inibe a atividade da enzima. Quando as células acumulam quantidades excessivas de esteróis, a atividade da HMGCR diminui mais de 90 % e o número de LDLR também diminui. Em contraste,

quando o colesterol intracelular é esgotado, as células mantêm um nível de atividade elevado desta enzima e também expressam um grande número de LDLR na sua superfície (LOTTEMBERG, 2009; SATO, 2015).

Ao nível da transcrição, a expressão do gene da HMGCR é regulada pelas proteínas de ligação do elemento regulador do esterol (SREBP). A SREBP1 regula de forma independente a síntese de ácidos graxos, enquanto a SREBP2 regula a síntese de colesterol. A ativação proteolítica de SREBPs e a consequente produção de colesterol e ácidos graxos é inibida pelo aumento do colesterol livre intracelular (CALKIN e TONTONNOZ, 2013; WU et al., 2013).

SREBPs são produzidos como precursores e são ligados a sensores de colesterol, os SCAPs (SREBP *cleavage activating protein*), que são ativados quando a concentração de esteróis é baixa. O SREBP2 se liga preferencialmente aos promotores de genes envolvidos na captação e biossíntese de colesterol, tais como HMGCR, enzima limitante da velocidade na síntese do colesterol, e LDLR, responsável pela remoção do LDL-c da circulação (ISHII et al., 2004; LAM et al., 2008; MA et al., 2011; GOEDEKE e FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2012; WU et al., 2013).

Após a síntese, o colesterol deixa o retículo endoplasmático e é convertido em ésteres de colesterol, principalmente pela enzima ACAT, de modo a impedir o excesso de acumulação de colesterol livre no plasma e nas membranas intracelulares (GOEDEKE e FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2012). Como as células não podem degradar o colesterol, o excesso de colesterol é removido dos tecidos periféricos e transportado para o fígado por meio do HDL-c, para reutilização a partir da síntese *de novo* ou excreção. Esse processo é tradicionalmente referido como transporte reverso do colesterol (VAN DER VELDE et al. 2010).

O primeiro passo no transporte reverso do colesterol é a transferência de colesterol para moléculas pobres em lipídeos no plasma, tais como apoAI e HDL-c, via transportador ABCA1 (CALKIN e TONTONNOZ, 2013). LXRs também regulam o ABCA1 para realizar efluxo de colesterol. ABCG1 promove o efluxo de colesterol e é provável que ABCA1 e ABCG1 ajam em conjunto para promover a remoção de colesterol em contextos fisiológicos através HDL-c (CALKIN e TONTONNOZ, 2013).

A HDL-c serve como o principal receptor para o colesterol celular libertado de tecidos extra-hepáticos, e está inversamente correlacionada com o risco de doença cardiovascular aterosclerótica (GOEDEKE e FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2012).

O excesso de colesterol é eliminado nas fezes por secreção na bile ou conversão em ácidos e esteróis neutros (WANG, 2007; VAN DER VELDE et al., 2010; JIA et al., 2011; MA et al., 2011b). O fígado é o único órgão que pode remover quantidades em excesso de colesterol convertendo-o em ácidos biliares através de vários processos enzimáticos e excretando-os para a bile. A maioria dos sais biliares (aproximadamente 90%) são reabsorvidos no intestino delgado inferior através de um transportador de ácido biliar e são então transportados de volta para o fígado (SATO, 2015).

2.2. DIGESTÃO PROTEICA E PEPTÍDEOS BIOATIVOS

A digestão da proteína inicia-se no estômago através de pepsinas em pH ácido. Proteases pancreáticas, tripsina, α -quimotripsina e carboxipeptidases, em meio alcalino, hidrolisam os polipeptídeos no lúmen do intestino delgado, produzindo principalmente oligopeptídeos e aminoácidos livres. Oligopeptídeos passam por uma segunda hidrólise causada pelas peptidases nas vilosidades intestinais, produzindo tripeptídeos, dipeptídeos e mais aminoácidos livres. Aminoácidos livres são absorvidos por uma variedade de transportadores específicos, localizados na membrana da borda em escova de células epiteliais do intestino. Já a absorção dos di e tripeptídeos ocorre pelo PEPT1 (*Proton-dependent peptide transporter 1*) (DEAN e MA, 2007; GILBERT et al., 2008; SEGURA-CAMPOS et al., 2011; BOUZERZOUR et al., 2012; FURUTANI et al., 2013; SPANIER, 2014).

O PEPT1 é um membro da família POT (*próton-dependent oligopeptide transporter*), transporta especificamente di e tripeptídeos e se localiza principalmente nas células epiteliais da borda em escova (MA et al., 2011a; NEWSTEAD, 2011; SPANIER, 2014). Este transportador pode reconhecer um largo espectro de substratos, que variam em tamanho molecular, carga e solubilidade e tem potencial para o transporte de 400 diferentes dipeptídeos e 8000 tripeptídeos (MA et al., 2011a).

Os peptídeos são suscetíveis à extensa hidrólise pela sequência de peptidases gástricas, pancreáticas e da membrana da borda em escova do intestino delgado. Além disso, os que chegam a ser absorvidos podem sofrer hidrólise rápida no sangue. Por outro lado, alergias alimentares mediadas por imunoglobulinas E (IgE), provavelmente representam uma das pistas mais claras de que grandes polipeptídeos podem sobreviver à digestão gastrointestinal e chegar à circulação

sistêmica (GILBERT et al., 2008; BOUZERZOUR et al., 2012). Assim, os peptídeos que resistem ao processo digestivo e chegam intactos ao intestino podem atravessar o epitélio e entrar na corrente sanguínea em quantidade capaz de gerar efeito sistêmico. Há evidências de que rotas paracelulares e transcelulares permitem a captação de peptídeos intactos (SEGURA-CAMPOS et al., 2011; BOUZERZOUR et al., 2012).

Nutricionalmente, a qualidade das proteínas ingeridas depende da sua composição em aminoácidos e da ausência de fatores antinutricionais que podem limitar a digestibilidade e capacidade de absorção. Mas, além disso, proteínas dietéticas podem constituir rica fonte de peptídeos bioativos, capazes de gerar, além do valor nutritivo, outros efeitos fisiológicos positivos ao organismo (SAAVEDRA et al., 2013).

Durante a digestão, enzimas proteolíticas libertam os peptídeos com sequências de aminoácidos que eram inativas no núcleo da proteína de origem, mas, uma vez libertados, podem exibir propriedades especiais (SEGURA-CAMPOS et al., 2011; GARCIA et al. 2013). Embora algumas proteínas alimentares sejam capazes de provocar os seus efeitos atuando diretamente na sua forma intacta, geralmente são peptídeos (normalmente entre 3 a 20 aminoácidos) derivados da proteína matriz, que são de maior interesse (RUTHERFURD-MARKWICK, 2012).

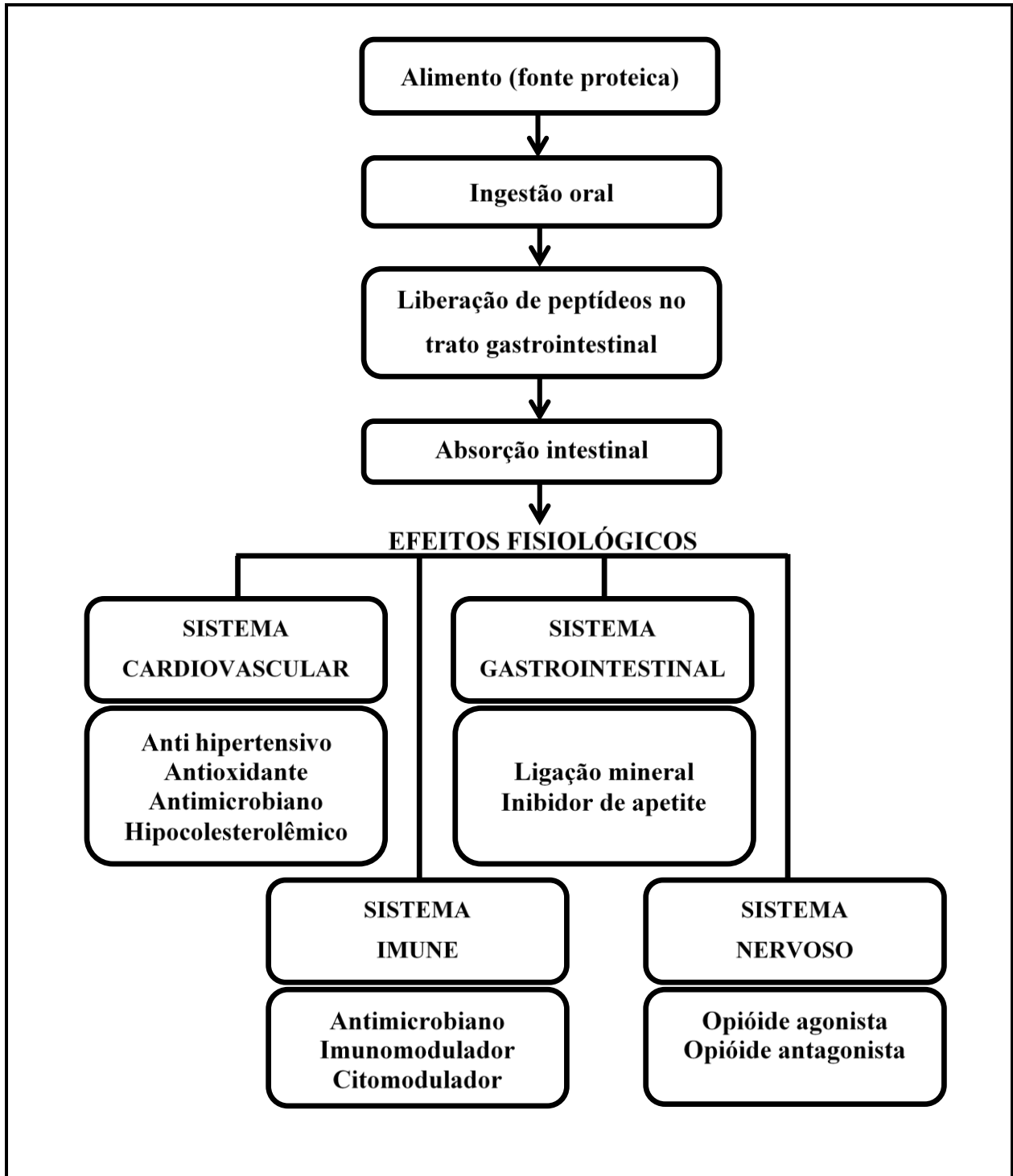
Peptídeos bioativos derivam de diversas proteínas de origem animal e vegetal, tais como: leite humano e bovino, peixe, ovos, carne, soja, arroz e cereais. Dependendo da sua sequência de aminoácidos, podem apresentar diversas atividades: imunomoduladora, antitumoral, antioxidante, anti-hipertensiva, hipocolesterolêmica, dentre outras (SAAVEDRA et al., 2013; MALAGUTI et al. 2014).

A Figura 2 reflete o caminho até o surgimento de peptídeos bioativos, além de possíveis efeitos fisiológicos gerados por eles.

Estes peptídeos podem exercer as suas ações tanto localmente, sobre a barreira intestinal e os tecidos linfóides associados ao intestino, quanto após passagem ao sangue, porém, em ambos os casos necessitam sobreviver à ação das enzimas digestivas (SEGURA-CAMPOS et al., 2011; BOUZERZOUR et al., 2012; RUTHERFURD-MARKWICK, 2012).

Deste modo, diversos estudos têm sido conduzidos com diferentes alimentos, no sentido de verificar a bioacessibilidade, biodisponibilidade e eficácia de peptídeos bioativos.

Figura 2 – Estrutura fisiológica da bioatividade de peptídeos.



Fonte: Adaptado de MADUREIRA et al. (2010).

A ideia de biodisponibilidade é importante, pois para qualquer componente com alegações de propriedades benéficas à saúde, deve ser demonstrado que ele realmente é digerido e absorvido,

e chega à circulação sistêmica ou local alvo, para ser capaz de executar função positiva ao organismo (PARADA e AGUILERA, 2007; FERNÁNDEZ-GARCÍA et al. 2009; RUTHERFURD-MARKWICK, 2012). O conceito de biodisponibilidade inclui o de bioacessibilidade.

A bioacessibilidade é definida como a fração de um composto que é libertado a partir da sua matriz, no trato gastrointestinal e, assim, torna-se disponível para absorção intestinal (ou seja, para entrar na corrente sanguínea). Bioacessibilidade inclui toda a sequência de acontecimentos que ocorrem durante a transformação digestiva dos alimentos em material que pode ser assimilado pelo organismo, que pode ser absorvido/assimilado pelas células do epitélio intestinal, e assim, que pode participar do metabolismo pré-sistêmico (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al. 2009; MARZE et al., 2013; MARZE et al., 2014).

As pesquisas *in vivo* e ensaios clínicos são necessários para demonstrar o efeito fisiológico de peptídeos, mas estudos *in vitro* também são importantes. Na prática, qualquer método *in vitro* inevitavelmente não corresponde à precisão que pode ser alcançada por um estudo *in vivo*, devido à complexidade inerente ao processo (HUR et al., 2011). Para evitar a realização de um estudo de bioatividade irrelevante, é conveniente realizar medições de bioacessibilidade para testar se o composto de interesse tem chance de ser absorvido. Assim, a seleção adequada da forma química, a qual o composto bioativo é absorvido, pode ser feita para executar subsequentemente o ensaio de bioatividade (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2009).

A simulação da digestão fisiológica, por estudos *in vitro*, é uma ferramenta muito útil na avaliação da estabilidade do peptídeo bioativo contra enzimas digestivas (SEGURA-CAMPOS et al., 2011). Testes *in vitro* são comuns, mais reprodutíveis e demandam menor tempo e custo, em comparação a bioensaios. Testes *in vivo*, em outros mamíferos ou em seres humanos, são caros e ainda menos viáveis devido a dificuldades técnicas e restrições éticas (HUR et al., 2011; BOUZERZOUR et al., 2012). De qualquer forma, o processo de validação *in vivo* deve ser realizado para delinear a confiabilidade dos modelos *in vitro* (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2009).

O objetivo de um modelo de digestão é simular a degradação de alimentos, tanto quanto possivelmente similar ao processo fisiológico humano, o que claramente é uma tarefa difícil. Assim, três áreas do sistema digestivo são consideradas: boca, estômago e intestino. A boca é essencial ao processo de digestão humana, mas em abordagens *in vitro* ela muitas vezes não é

incluída pelo fato do alimento permanecer neste compartimento durante um período relativamente curto de tempo. Para a simulação da digestão gástrica, o material teste normalmente é sujeito a pepsina em pH 2. Para simular o intestino delgado se adicionam enzimas intestinais (tripsina, pancreatina), sais biliares e bicarbonato para ajuste do pH para os níveis observados no intestino (DEAN e MA, 2007; BOUZERZOUR et al., 2012).

Apesar da relevância do assunto e dos extensos esforços de investigação, as questões relacionadas com a resistência, absorção/distribuição e possíveis atividades biológicas de peptídeos derivados de alimentos continuam com lacunas de conhecimento (BOUZERZOUR et al., 2012). Dentre as dificuldades na caracterização e rastreamento de peptídeos resultantes da digestão gastrointestinal podem ser citados os diferentes níveis de complexidade das matrizes alimentares e a grande variedade de produtos da digestão gerados pela ação simultânea de proteases com especificidade de clivagem diversa (BOUZERZOUR et al., 2012). Além disso, os modelos preditivos de digestões de proteínas diferem principalmente uns dos outros por: 1. Natureza da matéria-prima; 2. Número e a tipologia das etapas sequenciais que simulam a digestão oral-gastrointestinal; 3. Composição dos fluidos digestivos utilizados em cada passo, incluindo enzimas e a sua atividade/concentração, pH, tampões; 4. Tempo de incubação de cada passo, e; 5. Agitação mecânica e fluidos aplicados nas diferentes fases do processo de digestão (BOUZERZOUR et al., 2012).

O interesse ascendente em ingredientes de proteína de alta qualidade para satisfazer a procura de uma população global crescente gera expectativas sobre peptídeos bioativos. O aumento da funcionalidade desses ingredientes proteicos pode ser conseguido através de processamento, fermentação ou hidrólise enzimática, podendo todos estes resultar na produção de sequências peptídicas curtas com várias bioatividades (RUTHERFURD-MARKWICK, 2012; MALAGUTI et al. 2014; O'KEEFFE e FITZGERALD, 2015).

Do ponto de vista agrônômico, cultivares, condições ambientais e práticas agrônômicas afetam significativamente o conteúdo de peptídeos bioativos, sugerindo que a sua concentração em culturas e, eventualmente em alimentos pode ser favorecida por melhoramento e pela otimização das condições de crescimento (MALAGUTI et al. 2014).

Existe uma necessidade de utilizar avançadas ferramentas moleculares e proteômicas para decifrar os mecanismos moleculares de ação de peptídeos em várias doenças e para o estabelecimento da sua segurança e eficácia (O'KEEFFE e FITZGERALD, 2015).

2.3. FEIJÃO CAUPI E PEPTÍDEOS HIPOCOLESTEROLÊMICOS

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) tem sido foco de estudo em diversas áreas, como melhoramento genético, técnicas de cultivo, valor nutricional, entre outras. As formas cultivadas no Brasil são conhecidas com vários outros nomes, como: feijão de praia, feijão fradinho, feijão de rama, feijão macassar, feijão de corda e feijão de metro (FREIRE FILHO, 1981; EMBRAPA, 1987).

Esta leguminosa constitui a principal cultura de subsistência das regiões Norte e Nordeste do Brasil e é alimento frequente no hábito alimentar de famílias de baixa renda (IBGE, 2002; MOUSINHO, 2005). Em 2011 foram colhidos no Brasil aproximadamente 1,6 milhão de hectares, com produção de 822 mil toneladas, média de 525 kg/ha. A maior produção concentrou-se no Nordeste, com 84% da área plantada e 68% da produção nacional. Além disso, a cultura do feijão caupi mantém a cada ano 1,2 milhão de empregos diretos (SINIMBU, 2012).

O feijão caupi é uma boa fonte de proteínas (aproximadamente 24 %) e apresenta carboidratos, vitaminas, minerais (com destaque para o ferro, zinco e manganês) e aminoácidos essenciais, além de possuir considerável quantidade de fibras alimentares (16,6 % de insolúvel e 2,7 % de solúvel) e baixa quantidade de gordura (2,2 %) (FROTA, 2007).

A maioria de suas proteínas são globulinas (50 a 70 %) e albuminas (4 a 12 %). A fração vicilina 7S é considerada predominante entre as globulinas e consiste de duas cadeias polipeptídicas de 56 e 52 kDa (NIELSEN et al., 1988; NUGDALLAH e TINAY, 1997; FALADE e KOLAWOLE, 2013).

Nos últimos anos, trabalhos conduzidos no Laboratório de Propriedades Funcionais de Alimentos da Faculdade de Saúde Pública/Universidade de São Paulo geraram evidências de que a proteína do feijão caupi possui efeitos hipocolesterolemizantes e hepatoprotetores (FROTA et al., 2008; FROTA, 2011; MARQUES, 2013; MARQUES et al., 2015a; 2015b).

FROTA (2007), ao estudar o efeito hipocolesterolemizante do isolado proteico do feijão caupi em hamsters hipercolesterolemizados, observou que houve redução de 20 % no colesterol total e de 22% no colesterol não-HDL quando comparado ao grupo controle com dieta com caseína. Efeito hepatoprotetor também foi encontrado a medida que houve reduzido acúmulo de gordura nos hepatócitos, mesmo na presença de dieta contendo quantidades elevadas de gorduras. Ressalta-se que não foi encontrada diferença (grupo isolado x grupo controle) quanto à excreção de ácidos

biliares e colesterol nas fezes dos animais, indicando que a redução do colesterol plasmático não foi mediada pelas vias de excreção de colesterol.

Ao avaliar o efeito do consumo diário de 25 g de proteína de feijão caupi em humanos, FROTA (2011) observou que ele foi capaz de reduzir o colesterol total em 8,4 % e o LDL-c em 14,4 %. Neste trabalho a proteína do feijão caupi foi isolada e serviu de base para a produção de um shake.

MARQUES (2013) estudou os efeitos, *in vitro*, de peptídeos do feijão caupi na atividade enzimática da HMGCR e encontrou capacidade de inibição da atividade enzimática por peptídeos do feijão caupi cru, cozido e extrusado.

Além disso, outras análises *in vitro* evidenciaram capacidade antioxidante e de solubilização micelar do colesterol pelo hidrolisado proteico do feijão caupi (MARQUES et al., 2015a; 2015b).

Os resultados obtidos com a proteína do feijão caupi isolada em modelos animais (FROTA et al., 2008), humanos (FROTA, 2011) e *in vitro* (MARQUES, 2013; MARQUES et al., 2015a; 2015b) geraram evidências de que peptídeos do feijão caupi são capazes de agir positivamente na regulação do colesterol no organismo. Entretanto outros estudos continuam sendo necessários, no sentido de comprovar eficácia em condições experimentais diferentes, elucidar o mecanismo de ação responsável por este resultado e identificar os peptídeos atuantes.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a biodisponibilidade de peptídeos em modelos animais após ingestão de isolado proteico de feijão caupi e avaliar parâmetros ligados ao metabolismo do colesterol após consumo de dieta contendo o isolado proteico do feijão caupi.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar peptídeos, derivados da hidrólise do isolado proteico do feijão caupi.

Identificar peptídeos no sangue de animais, derivados da ingestão de isolado proteico do feijão caupi.

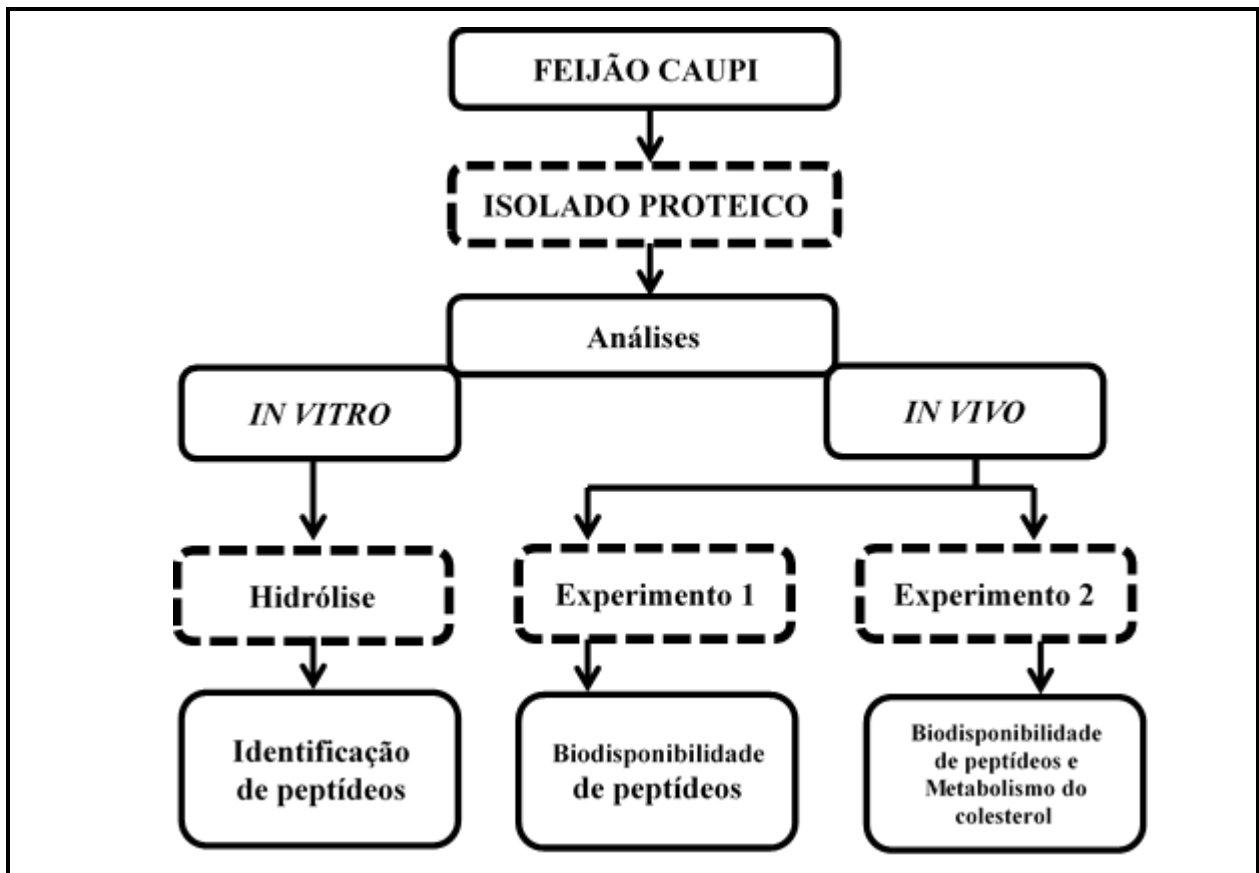
Analisar o impacto do consumo de dieta contendo o isolado proteico de feijão caupi em parâmetros relacionados ao metabolismo do colesterol de hamsters.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 3 mostra o esquema geral do trabalho.

Dois experimentos *in vivo* foram conduzidos: um de fase aguda, através do qual se pretendeu conhecer a biodisponibilidade dos peptídeos formados na digestão da proteína do feijão caupi, além de identificá-los; e outro de média duração, por meio do qual se pretendeu, principalmente, inferir sobre os mecanismos de ação dos peptídeos do feijão caupi no metabolismo do colesterol.

Figura 3 – Esquema geral do trabalho.



Fonte: Autoria própria.

Os ensaios biológicos seguiram o protocolo experimental conforme as normas do *Canadian Concil on Animal Care* (OLFERT et al., 1993). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais da Faculdade de Medicina da USP (CEUA FM-USP), protocolos 089 de

07/07/2014 e 096 de 08/10/2014 e pelo Comitê de Ética no uso de Animais do Instituto de Medicina Tropical da USP (IMT-USP), protocolo 000291A de 30/09/2014.

Os animais foram alojados individualmente em gaiolas com maravalha autoclavada, em local arejado. A temperatura foi controlada entre 20 e 25 °C, umidade relativa de 55 %, com janelas escurecidas para o controle do ciclo de claro/escuro de 12 horas.

4.1. MATÉRIA PRIMA

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio, foi fornecido pela Embrapa Produtos e Mercado, escritório de Petrolina-PE.

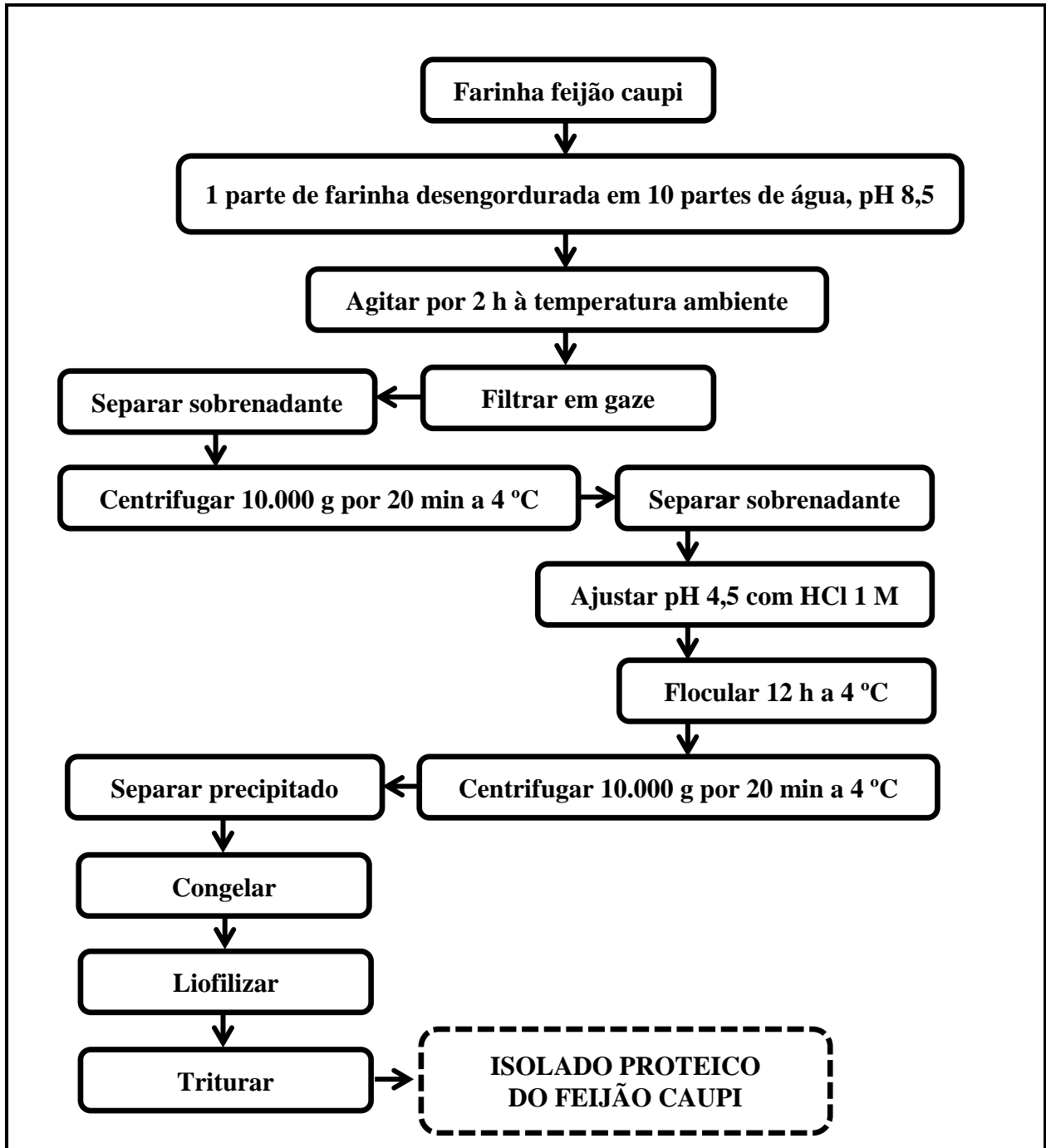
Os grãos foram triturados em moinho de martelos e tamisados em peneira de 0,4 mm pela empresa Molini Alimentos, São Paulo-SP. A farinha obtida foi acondicionada em sacos de polietileno revestidos por papel pardo, selados e mantidos sob refrigeração até utilização na produção do isolado proteico.

ISOLADO PROTEICO

A farinha do feijão caupi cru foi desengordurada com hexano na proporção 1:6 m/v por 4 horas sob agitação e seca naturalmente em capela, *overnight*.

A proteína isolada do feijão caupi foi obtida por precipitação isoelétrica da farinha desengordurada. O isolamento proteico foi baseado em metodologia proposta por FROTA (2007) e MARQUES (2013). Posteriormente o isolado proteico foi liofilizado, homogeneizado e então, pronto para a utilização nos experimentos. O fluxograma deste procedimento se encontra na Figura 4.

Para caracterização da farinha do feijão caupi integral, desengordurado e isolado proteico foram realizadas análises de composição centesimal: umidade, cinzas, proteína (fator de conversão de 6,25) e lipídeos (AOAC, 2010). O teor de carboidratos foi calculado por diferença. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

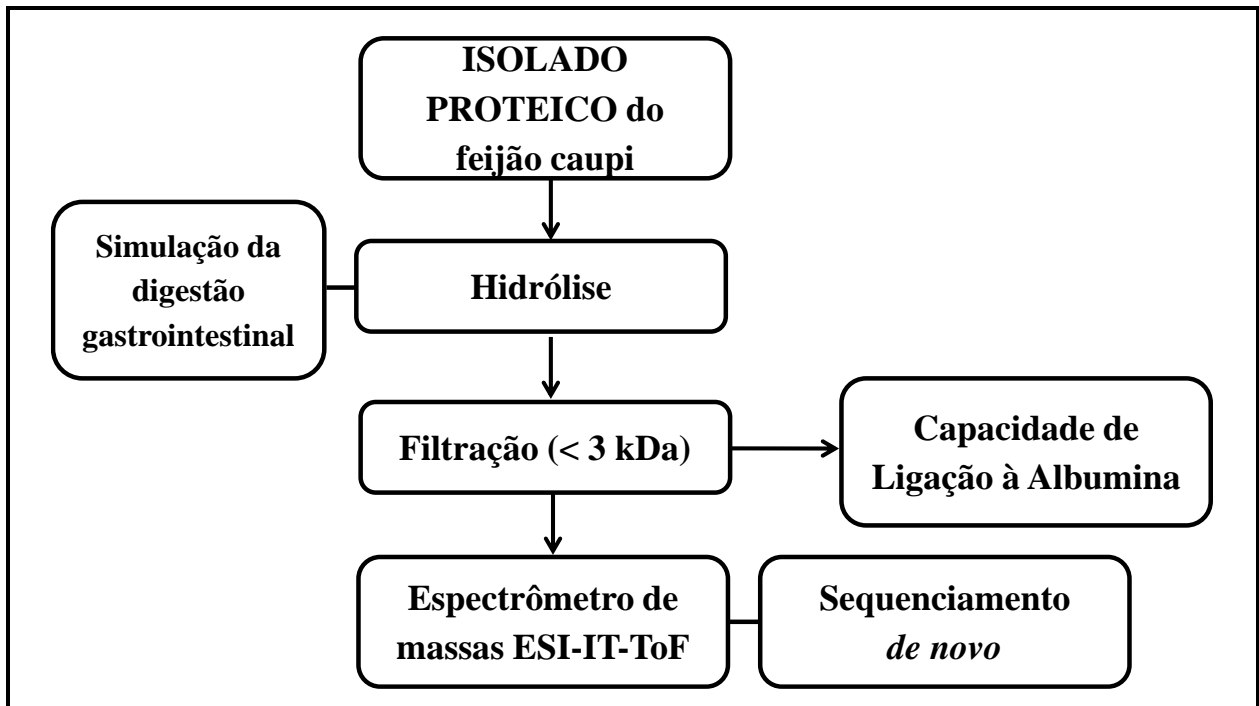
Figura 4 – Fluxograma do isolamento proteico da farinha de feijão caupi.

Fonte: Adaptado de MARQUES (2013).

4.2. EXPERIMENTO *IN VITRO*

O esquema geral do Experimento *in vitro* é mostrado na Figura 5, a seguir.

Figura 5 – Esquema geral do Experimento *in vitro*.



Fonte: Autoria própria.

4.2.1. HIDRÓLISE

Foi realizada hidrólise do isolado proteico do feijão caupi, baseada no método sugerido por MINEKUS et al. (2014). 2,5 g de isolado proteico foram pesados e adicionados de 7,5 mL de NaCl 30 mM, ajustando-se ao pH 3,0. Em seguida acrescentou-se pepsina 1: 270 mg proteína (P7012, Sigma), sendo a mistura levada ao banho por 2 horas a 37 °C, com agitação. Após este tempo o pH foi ajustado para 7,0 e adicionou-se pancreatina 1:125 mg proteína (P7545, Sigma; atividade equivalente 8x U.S.P.), sendo a mistura levada ao banho por mais 2 horas a 37 °C, com agitação. Em seguida os tubos foram deixados por 20 min a 80 °C para inativação da enzima.

As amostras foram centrifugadas a 10000 g/15 min/15 °C. O sobrenadante foi coletado e filtrado a 3 kDa (Centricon YM 3 3,000 MWCO; 7500 g/ 40 min/10 °C), seguindo para a liofilização.

4.2.2. CAPACIDADE DE LIGAÇÃO À ALBUMINA

A análise de ligação do hidrolisado com a albumina foi baseada no método descrito por KOLY et al. (2015).

Utilizou-se a albumina de soro bovino (BSA) (A9647, Sigma), sendo a solução de BSA preparada em tampão de Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 , pH 7,40, na concentração de 1,32 mg BSA/mL tampão.

O hidrolisado liofilizado foi pesado em diferentes tubos, adicionados de 2,5 mL de solução de albumina, para obtenção das seguintes concentrações: 1,75; 3,5; 7,0; 10,5; 14,0 e 17 mg de hidrolisado/mL solução de albumina. Para cada uma dessas concentrações foi preparada solução controle contendo o hidrolisado e o tampão fosfato. O branco foi composto somente por solução de albumina.

200 μL de cada concentração, em triplicata, foram pipetados em placa e levados ao leitor de placas Spectra Max MS, Molecular Devices, Programa SoftMaxPro5.41, para leitura nos comprimentos de onda de excitação de 280 e 293 nm, nas temperaturas de 25 e 35 °C, emissão de 320 a 500, set 5 nm.

4.2.3. PEPTÍDEOS

O hidrolisado liofilizado foi dissolvido em ácido fórmico 0,5% e depositado em placas de 96 poços em injetor automático SIL-20A para análise em espectrômetro de massas LC/MS equipado com ionizador ESI e analisador de massas IT-TOF (Shimadzu, Japão).

Os peptídeos foram separados em coluna Discovery C18 1.5 (2 \times 50 mm) usando como fase móvel 0,5% ácido fórmico (A) e acetonitrila 90% contendo 0,5% de ácido fórmico (B) em um gradiente linear de B para A de 0 a 100% durante 15 min, sob fluxo constante de 0,2 mL.min⁻¹.

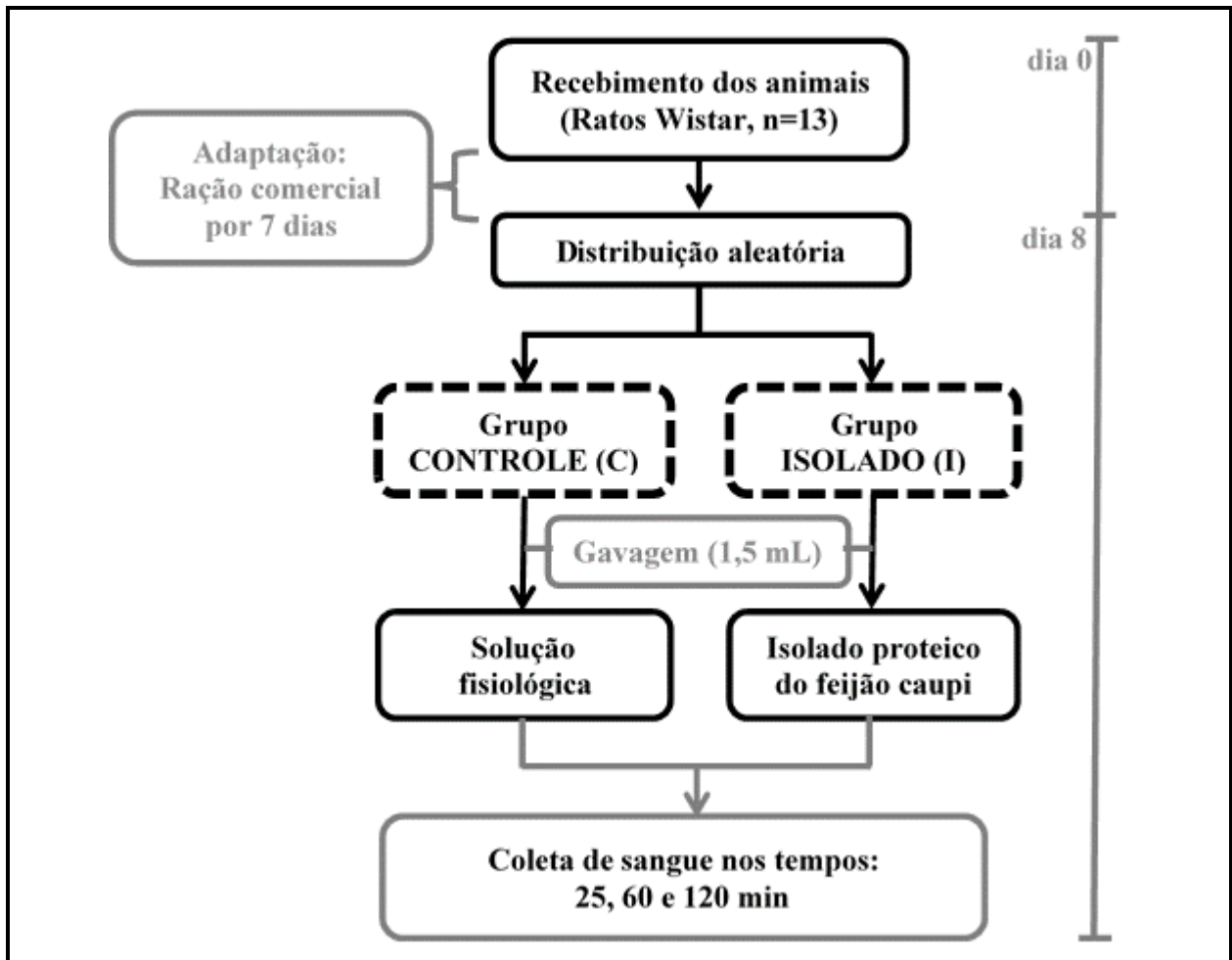
Após confirmação dos estados de carga, foi realizado o sequenciamento *de novo* de peptídeos, onde o íon de interesse foi selecionado em uma janela de massa de 0,5 m/z e fragmentado. Os espectros foram obtidos na faixa de 100 a 3000 m/z. As amostras foram analisadas preferencialmente em modo positivo a um fluxo de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$.

A aquisição dos dados se deu pelo software LCMS Solution Suite (Shimadzu). O espectro gerado foi analisado pelo software Peaks Mass Spectrometry (BioinformaticsSolutions Inc., Canadá), esse software foi usado para o sequenciamento *de novo*. A sequência peptídica gerada foi comparada com um espectro teórico, obtido pelo Protein Prospector.

4.3. EXPERIMENTO *IN VIVO* 1

O esquema geral do Experimento *in vivo* 1 se encontra na Figura 6, a seguir.

Figura 6 – Esquema geral do Experimento *in vivo* 1.



Fonte: Autoria própria.

4.3.1. ANIMAIS

Foram utilizados 13 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus, rodentia, mammalia*), com 21 dias de idade (recém desmamados), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP.

A partir do período de adaptação de sete dias, os animais foram distribuídos por amostragem casual sistemática, conforme discriminado no Quadro 1, em: basal (n=1), referente ao tempo

pré dose (tempo zero); três grupos “isolado” (n=9), nas concentrações de 250, 375 e 500 mg de isolado/Kg peso do animal e um grupo controle (n=3), considerando os tempos de sacrifício em 25, 60 e 120 minutos após gavagem.

Quadro 1 – Distribuição dos animais, segundo grupos. Experimento *in vivo* 1.

Animal	Tempo (min)	Sigla
Basal	-	B B
Isolado 250 mg/Kg	20	B Ia1
	60	B Ia2
	120	B Ia3
Isolado 375 mg/Kg	20	B Ib1
	60	B Ib2
	120	B Ib3
Isolado 500 mg/Kg	20	B Ic1
	60	B Ic2
	120	B Ic3
Controle	20	B Ca
	60	B Cb
	120	B Cc

Fonte: Autoria própria.

4.3.2. DIETA

Durante o período de sete dias de adaptação, os animais receberam ração comercial NUVILAC CRI (Nuvital Nutrientes AS, Colombo-PR) e água *ad libitum*.

Após este período eles foram submetidos a jejum de 8 horas. A partir de então receberam um total de 1,5 mL por gavagem, sendo que aos grupos “isolado” foi administrado o isolado proteico dissolvido em solução salina 0,9 % e aos grupos controle, somente solução salina.

4.3.3. COLETA E ANÁLISE DE MATERIAL BIOLÓGICO

A coleta de material biológico e o sacrifício dos animais foram realizados no 8º dia do experimento.

Após jejum de 8 horas os animais foram submetidos à gavagem e, de acordo com os tempos pré determinados conforme o Quadro 1, foram anestesiados via intraperitoneal com cloridrato de xilasina (Rompun, Bayer®) – 1 mg/kg de peso (pré anestésico) e cloridrato de ketamina (Ketalar, Pfizer®) – 10 mg/kg de peso (anestésico geral).

O sangue foi coletado por punção cardíaca e armazenado em tubos BD Vacutainer® distintos para a obtenção do soro (tubo amarelo, BD SST II Advancer) e do plasma (tubo lilás, K₂ EDTA) após centrifugação por 10 minutos a 1200 g, sob temperatura ambiente. A centrifugação ocorreu até a primeira hora após coleta, em centrífuga.

Dando seguimento os materiais resultantes do sangue foram submetidos à filtração e à purificação conforme descrito nos itens 4.3.3.1. e 4.3.3.2., respectivamente.

4.3.3.1. FILTRAÇÃO

Alíquotas do material de interesse foram acondicionadas em filtro (Centricon YM 3 3,000 MWCO), previamente preparado segundo recomendação do fabricante, e levados para centrifugação a 7.500 x g por 20 min (centrífuga Sigma 3 18 K), para obter os peptídeos contidos na fração menor que 3 kDa.

4.3.3.2. PURIFICAÇÃO

O material resultante da filtração foi submetido ao método de purificação SEP PAK C18, segundo recomendações do fabricante. Após anexar uma seringa à coluna Sep Pak, a amostra contendo os peptídeos foi passada, depois foi feita lavagem com 10 mL da solução A (98 % de água miliQ; 2 % CH₃CN e 0,1 % ácido fórmico). A seguir a amostra foi eluída com duas vezes de 1 mL de solução B (65 % CH₃CN; 35 % água miliQ e 0,1 % ácido fórmico), gerando a amostra purificada, que foi coletada em tubo de 2 mL e liofilizadas.

4.3.3.3. PEPTÍDEOS

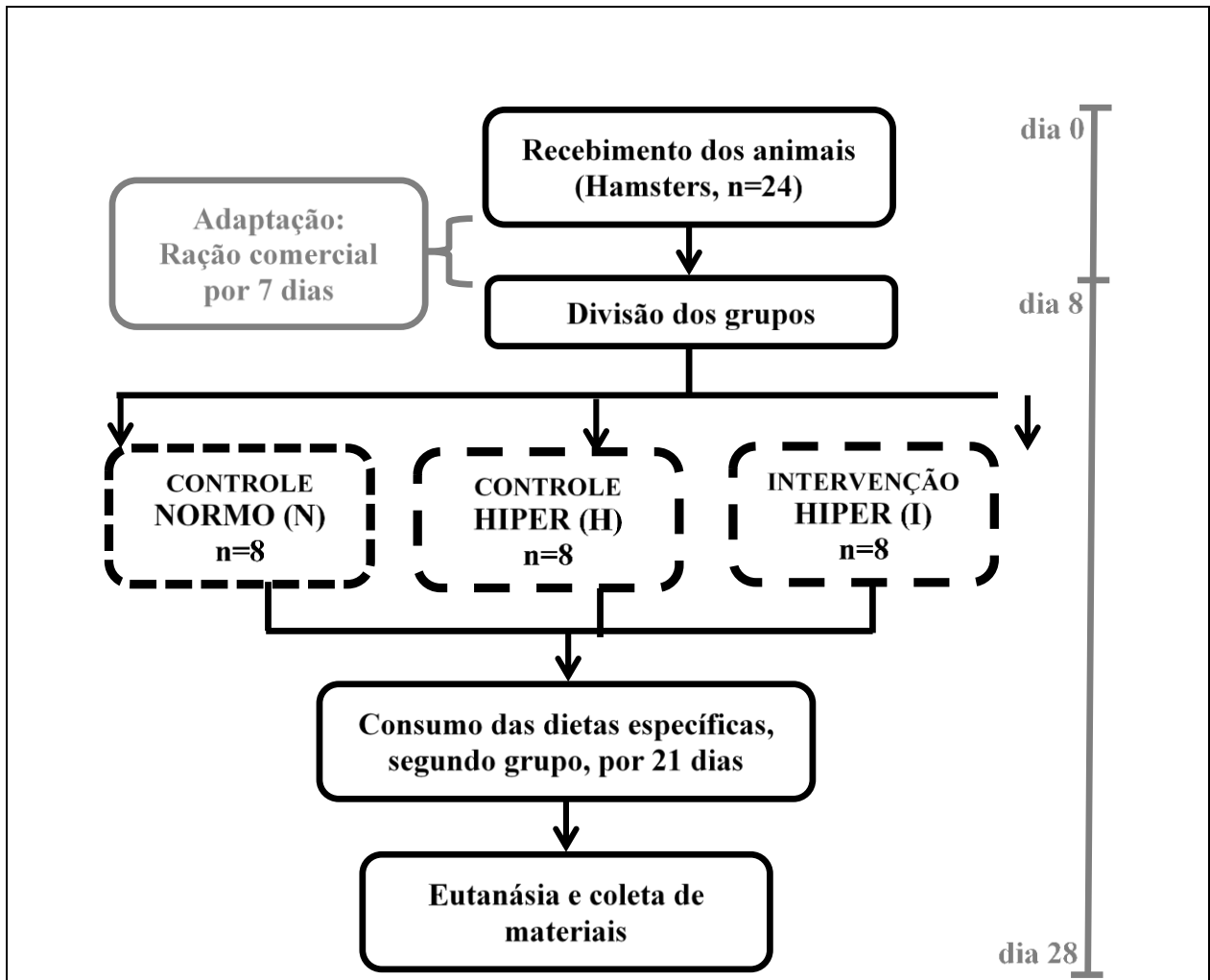
As amostras liofilizadas foram dissolvidas em ácido fórmico 0,5% e o procedimento foi seguido como descrito no item 4.2.3.

Das frações obtidas foram excluídas aquelas iguais entre animais intervenção *versus* controles e basais; e aquelas encontrados somente em controles e basais.

4.4. EXPERIMENTO *IN VIVO* 2

Na Figura 7 a seguir é mostrado o esquema geral do Experimento *in vivo* 2.

Figura 7 – Esquema geral do Experimento *in vivo* 2.



Fonte: Autoria própria.

4.4.1. ANIMAIS

Foram utilizados 32 hamsters, linhagem Golden Syrian, com 21 dias de idade (recém desmamados) e padrão sanitário convencional, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP.

Optou-se em utilizar esta espécie por ser um roedor pequeno, sensível a dietas suplementadas com colesterol e ricas em gorduras (DORFMAN, 2005), muito empregado em estudos que avaliam o efeito de drogas e dietas no metabolismo lipídico e aterosclerose. O perfil de lipoproteínas do hamster assemelha-se mais com o dos humanos do que outros roedores, pois apresentam na circulação a proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP),

característica que não está presente em ratos e camundongos selvagens (NISTOR et al., 1987; LOCK et al., 2005).

Além disso, nos hamsters aproximadamente 50 % do colesterol plasmático é transportado nas partículas LDL-c. Estes animais também regulam a secreção de ácidos biliares e sintetizam colesterol hepático e ácidos biliares de maneira similar aos humanos (BRAVO et al., 1994; ZHANG et al., 2009).

A partir do período de adaptação de sete dias, os animais foram distribuídos por amostragem casual sistemática, em 3 grupos de, à priori, oito animais cada, segundo Quadro 2 a seguir.

Quadro 2 – Discriminação dos grupos de animais, segundo tipo de dieta administrada. Experimento *in vivo* 2.

Grupo	Sigla	Descrição do grupo
Controle Normo	N	Consumidor da dieta normo contendo caseína. Usado como controle quanto à indução de hipercolesterolemia.
Controle Hiper	H	Consumidor da dieta hipercolesterolemizante contendo caseína. Usado como controle de dieta rica em colesterol e ácidos graxos saturados.
Intervenção Hiper	I	Consumidor da dieta hipercolesterolemizante contendo isolado proteico de feijão caupi.

Fonte: Autoria própria.

Um dos animais do grupo N morreu durante o experimento, sendo a causa não identificada. Desta forma esse grupo passou a ser composto por 7 animais.

4.4.2. DIETA

Os animais passaram por um período de sete dias de adaptação durante o qual receberam ração comercial NUVILAC CRI (Nuvital Nutrientes AS, Colombo-PR) e água *ad libitum*.

Após este período os animais receberam dieta específica de acordo com o grupo, por 21 dias, considerando a técnica *pair feeding*, assegurando equiparar a ingestão entre os grupos, a fim de excluir efeitos por diferenças de ingestão calórica (CASTER e ARMSTRONG, 1956).

A formulação das rações está descrita no Quadro 3 e foi baseada nas recomendações nutricionais do *National Research Council* (1995), conforme exposto na Tabela 1, e acrescidas de mistura de minerais e vitaminas adequada ao crescimento de hamsters, de acordo com as

recomendações para roedores em fase de crescimento da *American Institute of Nutrition*, AIN-93G (REEVES et al., 1993).

Tabela 1 – Necessidades nutricionais de hamsters em fase de crescimento (animal com 35 a 130 g).

Componentes da dieta	Quantidade (g/100 g)
Fibras	5 a 15
Carboidratos	65
Lipídios	4 a 20
Proteínas	18 a 24

Fonte: *National Research Council* (1995).

As rações foram fabricadas por encomenda, com ingredientes purificados. Elas foram peletizadas e embaladas pela empresa Prag Soluções Biociências, Jaú-SP e armazenadas em refrigerador (4 a 7 °C) para conservação.

Segundo protocolo de preparação, os ingredientes foram pesados individualmente e misturados a seco. A seguir, água foi adicionada para homogeneização e formação da massa, colocada em um extrusor para adquirir a forma de *pellets*, os quais foram secos a 50 °C por 20 horas. O processo de peletização é necessário para obtenção da textura adequada das rações aos hábitos dos roedores.

Ao término deste processo os *pellets* foram resfriados, embalados em sacos de polietileno à vácuo, rotulados, envoltos em plástico de polietileno escuro (para evitar a oxidação dos ingredientes) e acondicionados sob refrigeração até o momento do transporte.

A caseína foi usada como fonte proteica das rações controle. O isolado proteico do feijão caupi, previamente produzido em escala laboratorial, foi fornecido para a produção da ração do grupo intervenção (I/Isolado).

Para avaliar o efeito do consumo da proteína de feijão caupi em animais com moderado aumento da colesterolemia foi adicionado 0,1 % de colesterol e 13,5 % de óleo de coco às rações. Esta composição e quantidade de lipídeos mostrou ser capaz de induzir hipercolesterolemia nos hamsters em estudos prévios (FROTA, 2007; DIAS, 2012; ZHANG et al., 2009).

O perfil de aminoácidos foi dosado com o objetivo principal de avaliar a existência de aminoácidos limitantes. As análises foram realizadas pelo laboratório CBO Análises, Campinas-SP.

Quadro 3 – Formulação planejada das dietas administradas, segundo grupo de animais. Experimento *in vivo* 2.

Componentes (g)	DIETAS		
	N	I	H
Isolado Proteico Feijão ^a	-	291	-
Caseína ^b	287,00	-	287,00
L-cistina	2,50	-	2,50
Amido de milho	365,50	361,60	365,50
Gordura coco	-	135,00	135,00
Óleo soja	147,00	11,00	11,00
Colesterol	-	1,00	1,00
Bitartarato colina	3,00	3,00	3,00
Mistura vitaminas	10,00	10,00	10,00
Mistura minerais	35,00	35,00	35,00
Celulose	100,00	100,00	100,00
Sacarose	50,00	50,00	50,00
Fósforo (KH ₂ PO ₄)	-	2,4	-
Peso final	1000	1000	1000

Composição				
CHO	g	546,21	545,36	546,21
	%	54,6	54,5	54,6
LIP	g	147,00	147,00	147,00
	%	14,7	14,7	14,7
PTN	g	239,56	239,78	239,56
	%	24,0	24,0	24,0
FIBRAS	g	100,00	100,00	100,00
	%	10,0	10,0	10,0

Considerando: ^a 82,4 %; ^b 82,6 % de proteína em base úmida.

CHO: carboidrato; LIP: lipídeo; PTN: proteína.

Os resultados obtidos se encontram na Tabela 2 a seguir. Comparando os valores quanto à recomendação da FAO, bem como a outro trabalho realizado com a mesma matéria prima (FROTA, 2007), se considerou desnecessária a adição de aminoácidos na dieta isolado.

Sendo o fosforo um nutriente importante no processo de expressão proteica, o mesmo foi quantificado no isolado proteico e na caseína, obtendo-se os valores de 0,8 e 1,81 % respectivamente. Os valores foram ajustados na composição da ração.

Tabela 2 – Perfil de aminoácidos do isolado proteico do feijão caupi.

AA	%	Recomendação FAO (1991)	% Frota (2007)
Ácido Aspartico	11,62		-
Ácido Glutâmico	17,69		-
Serina	5,63		-
Glicina	4,32		3,1
Histidina	3,29	1,9	3,0
Taurina	0,00		-
Arginina	7,44	-	6,8
Treonina	3,30	3,4	3,7
Alanina	5,13		-
Prolina	5,27		-
Valina	4,18	3,5	6,0
Metionina	1,29		1,1
Cistina	1,69	-	0,4
Soma Met+Cist	2,99	2,5	1,5
Isoleucina	4,00	2,8	4,3
Leucina	8,63	6,6	8,1
Tirosina	3,39		2,0
Fenilalanina	6,04		5,4
Soma Tir+Fen	9,42	6,3	
Lisina	7,09	5,8	6,7
Triptofano	0,89	1,1	1,0

4.4.2.1. Composição Centesimal

Os teores de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos foram determinados de acordo com métodos da AOAC (2010).

O teor de colesterol foi determinado de acordo com a metodologia proposta por CSALLANY et al. (1989) e TERPSTRA et al. (1998).

O perfil de ácidos graxos das dietas foi avaliado segundo descrito a seguir.

Os ácidos graxos foram determinados como ésteres metílicos de ácidos graxos através de cromatografia gasosa. A extração dos lipídeos foi feita por através de técnica de coluna seca (MARMER e MAXWELL, 1981). A formação de ésteres metílicos seguiu o método sugerido por HARTAM e LAGO (1973).

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia em Cromatógrafo a gás Chrompack CP 9002 (Middelburg, Holanda), equipado com coluna capilar CPSil88 for FAME de

50 metros, tamanho de partícula 0,2 um. O forno foi operado com temperatura inicial de 100 °C e final de 240 °C, com rampa de 5 °C/min. A temperatura da coluna foi de 100 °C, do injetor 270 °C e detector 300 °C. o gás de arraste utilizado foi o hidrogênio, com fluxo de 1,5 mL/min, razão de divisão 1:70. Foi injetado o volume de 1 uL de amostra.

Os picos dos principais ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados através do tempo de retenção comparado com padrões Sigma (St Louis, USA), para *fatty acid methyl esters mixture* (189-19), *linolenic acid methyl ester cis/trans isomers* (L8404) e *linolenic acid methyl ester, isomer mix* (L6034).

A análise foi qualitativa, sendo a proporção de cada ácido graxo calculada dividindo-se a área do seu pico pela área total da corrida.

4.4.3. GANHO DE PESO E CONSUMO ALIMENTAR

Durante o período experimental os animais foram pesados em balança digital semi-analítica modelo MA-BS 2000 Marconi, duas vezes por semana no mesmo horário, para avaliar o ganho de peso.

A partir da razão entre ganho de peso e a quantidade de ração consumida, foi calculado o Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) de cada dieta.

A ingestão das dietas foi determinada diariamente durante os 21 dias de experimento. A quantidade ingerida foi calculada por meio da diferença entre a quantidade ofertada e as sobras deixadas no comedouro.

4.4.4. COLETA E ANÁLISE DE MATERIAL BIOLÓGICO

Excetuando-se as fezes, a coleta de material biológico e o sacrifício dos animais foram realizados no 22º e 23º dias do experimento.

Optou-se por não deixar os animais em jejum, uma vez que eles possuem a capacidade de armazenar alimentos em suas bochechas; e que não se verificou diferença no perfil das lipídico de hamsters submetidos a jejum de 18 horas ou não submetidos à jejum em estudo prévio (WEIGAND e DAGGY, 1991).

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com cloridrato de xilasina (Rompun, Bayer®) – 10 mg/kg de peso (pré anestésico) e cloridrato de ketamina (Ketalar, Pfizer®) – 100 mg/kg de peso (anestésico geral), seguido de exsanguinação.

Os materiais utilizados para análises estão discriminados no Quadro 4, a seguir.

Quadro 4 – Tipo de análises realizadas, segundo material biológico. Experimento *in vivo* 2.

Material	Análise de
Sangue	Colesterol total e frações, triglicerídeos, alanina aminotransferase Identificação de peptídeos
Fígado	Colesterol total Lipídeos totais HMGCR (atividade enzimática, expressão) SREBP2, LDL-cR, ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8, LXR α , AMPK (expressão)
Fezes	Colesterol total Ácidos biliares

Fonte: Autoria própria.

O sangue foi coletado por punção cardíaca e acondicionado em tubos BD Vacutainer® (Tubo Gel BD SST® II Advance®) e centrifugado (3000 x g, 15 minutos, 4 °C) até duas horas após a coleta, sendo o plasma separado para análises posteriores.

O fígado foi removido imediatamente após o sacrifício. As frações hepáticas foram coletadas, pesadas em balança analítica (Shimadzu Modelo AX 200) e armazenadas em microtubos (*Eppendorf*) em gelo seco. Posteriormente os mesmos foram armazenados em ultrafreezer (- 80 °C) até as análises.

Para coleta individual das fezes os ratos foram mantidos em gaiolas adaptadas com dois fundos, nos últimos quatro dias de experimento. As fezes foram pesadas diariamente, acondicionadas em frascos de polietileno e liofilizadas (Operon Modelo FDB-5503, Japão) por 72 horas. Após secagem foram pesadas, trituradas e armazenadas a - 20 °C até análises.

4.4.3.1. Sangue

Lipídeos Séricos

A análise de lipídeos no soro foi realizada no Laboratório de Lípidos (LIM10) da FMUSP.

As determinações das concentrações plasmáticas de colesterol total (CT) e triglicérides (TG) foram realizadas manualmente pelo método enzimático-colorimétrico utilizando kits Labtest (Labtest Diagnóstica – Minas Gerais – Brasil).

O perfil das lipoproteínas do plasma foi determinado por cromatografia em gel filtração (FPLC) no sistema de cromatografia líquida AKTA Purifier (GE Healthcare Bio-Sciences – Uppsala – Sweden). 100 µL de plasma foi injetado na coluna Superose 6HR 10/30 (GE Healthcare 17-5172-01) e a eluição realizada em fluxo constante de 0,5 mL/min com tampão Tris (Tris 10mM, NaCl 150mM, EDTA 1 mM e NaN₃ 0,03%, pH 7,0). Foram coletadas frações de 0,2 ml em placas de 96 poços utilizando o coletor de frações. O CT e o TG das frações foram dosados por método enzimático-colorimétrico utilizando kits Labtest (Labtest Diagnóstica – Minas Gerais – Brasil) para a determinação das lipoproteínas VLDL, LDL e HDL.

Peptídeos

As amostras de plasma foram submetidas à filtração 3 kDa, conforme descrito no item 4.3.3.1. Posteriormente foram liofilizadas, dissolvidas em ácido fórmico 0,5% e o procedimento foi seguido como descrito no item 4.2.3.

Das frações obtidas foram excluídas aquelas iguais entre animais intervenção *versus* controles; e aquelas encontrados somente em controles.

4.4.3.2. Fígado

Colesterol total

Para a determinação da concentração hepática de colesterol foi utilizado o método proposto por KATSANIDIS e ADDIS (1999), com algumas modificações: amostra de 100 mg de fígado foi homogeneizada em solução de saponificação [hidróxido de potássio na concentração de 11 g/100 mL diluído em etanol 55 % (v/v)]. A amostra foi colocada em banho maria por 15 min a 80 °C. Após resfriamento foi realizada a partição, sendo a fase orgânica selecionada para análise. A quantificação do colesterol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em equipamento (HPLC) da marca Shimadzu SCL-10AD, equipado com injetor automático SIL-20A HT, controlador CBM 20A, forno de coluna CTO 20A e detector de arranjo de diodos SPD M20A, com coluna cromatográfica Cyano (Phenomenex). A fase móvel foi preparada com n-hexano/isopropanol (97:3 v/v), com fluxo isocrático de 1 mL/min. O detector usado foi o UV, com leitura no comprimento de onda de 206 nm. A quantificação foi realizada utilizando curva de calibração de colesterol padrão da SteraloidsInc-USA. As análises foram realizadas em triplicata.

Lipídeos Totais

Para a obtenção do extrato lipídico hepático foi utilizada a metodologia proposta por BLIGH e DYER (1959) com adaptações.

Amostras de 100 mg de fígado foram adicionadas de 500 µl KCl 0,88 % (m/v), homogeneizadas em desmembrador, adicionadas de 300 µl metanol e homogeneizadas em vortex. A seguir, o extrato foi filtrado em papel qualitativo e lavado três vezes com 1000 µL de clorofórmio para a extração total dos lipídeos.

A quantidade de lipídeos extraídos foi determinada gravimetricamente e a análise foi realizada em triplicata.

Expressão gênica

Para inferir o efeito sobre a síntese, metabolismo e transporte do colesterol, também foi avaliada a expressão do RNAm hepático dos seguintes genes (códigos assay): HMGCR (Hs00168352_m1), SREBP2 (Hs01081784_m1), LDLR (Hs00181192_m1), ABCA1 (Hs01059118_m1), ABCG1 (Hs01555189_m1), ABCG5 (Hs00223686_m1), ABCG8 (Hs00223690_m1), AMPK (Hs01562315_m1) e LXR α (Hs00172885_m1).

Alíquotas da amostra foram obtidas para extração do RNA total, utilizando o conjunto de reagentes RNeasy mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) seguindo as indicações do fornecedor.

O rendimento do RNA total foi avaliado por espectrofotometria no ultravioleta (UV) utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop[®] (NanoDrop Technologies INC., Wilmington, DE, EUA) e o grau de pureza do RNA determinado pela relação A 260 nm/A 280 nm. A integridade do RNA foi avaliada utilizando-se o equipamento bioanalyzer[®] 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

O cDNA foi gerado a partir de 1 µg de RNA, utilizando-se 200 ng de iniciadores aleatórios (random primers) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), DTT 10 mmoles/L (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), dNTPs 500 µmoles/L (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), 200 U de transcriptase reversa (RT) (SuperScript[™] II RT RNase H-) e tampão de RT [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3), KCl 375 mM, MgCl₂ 15mM] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). O ensaio de transcrição reversa foi realizado em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA, EUA) com as seguintes etapas: 25 °C por

10 min, 42 °C por 50 min e 70 °C por 15 min. O cDNA obtido foi armazenado a – 20 °C até a realização do PCR.

A expressão do RNAm dos genes foi realizada por reação de transcrição reversa seguida de amplificação por PCR em tempo real, por procedimento previamente descrito por GENVIGIR et al. (2010).

A medida quantitativa da expressão do RNAm dos genes estudados foi realizada por PCR em tempo real utilizando o sistema de amplificação TaqMan®RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) empregando-se o equipamento ABI Prism 7500 FAST (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise da expressão gênica foi realizada por método de quantificação relativa.

Com a finalidade de escolher o gene endógeno mais adequado para o modelo usado no trabalho atual, vários genes foram testados (B2M, GAPDH, HPRT1 e UBC) e analisados no programa GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002). Os iniciadores e as sondas marcadas com fluoróforo foram fornecidos em solução 20 vezes concentrada pelo serviço “Assay by design” e/ou “Assay on demand” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O gene endógeno escolhido foi HPRT1 (Hs02800695_m1).

As análises de quantificação relativa da expressão de RNAm dos genes estudados foram realizadas utilizando o método do ΔC_t , com base na fórmula $2^{-\Delta C_t}$. Previamente, foram calculadas as eficiências de todos os ensaios, sendo considerados adequados valores entre 90 e 110 % (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Atividade HMGCR

A atividade da enzima HMGCR no fígado foi medida por meio do Kit CS 1090 da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA) com adaptações baseadas no trabalho de CONG et al. (2012).

Fragmentos de cerca de 50 mg de tecido hepático dos animais foram homogeneizados em 250 μ L de tampão de extração, contendo 100 mM de tampão de fosfato (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 em pH 7,5), 200 mM de KCl, 5 mM de EGTA, 5 mM de EDTA, 10 mM de DTT, 1 μ g/ml aprotinina e 0,5 μ g/mL-1 de leupeptina (1:3 wt/vol) no gelo, por 45 segundos, em desmembrador (amplitude 45), e centrifugados por 5 min. a 3100 rpm e 4 °C.

Para a análise da atividade da HMGCR foram utilizados 20 μ L do sobrenadante. As leituras foram obtidas a partir de Leitor de Placas da marca Spectramax® M5 da Molecular Devices e o

software Softmax® Pro5. A absorvância a 340 nm foi monitorizada em intervalos de tempo de 20 segundos, para um tempo total de 25 minutos.

Uma unidade da atividade da HMG-CoA redutase corresponde a conversão de 1 μmol de NADPH a NADP formado por minuto a 37 °C.

A concentração de proteína hepática foi determinada por meio do Kit de Ensaio de Proteínas BCA Pierce (Thermo Scientific, USA).

Os resultados foram obtidos em triplicata.

4.4.3.3. Fezes

Colesterol

Alíquotas de 50 mg de fezes (previamente liofilizadas, trituradas em moinho IKA – WERKE Modelo M20 e homogeneizadas) foram submetidas à saponificação com 700 μL de metanol e 220 μL de solução de NaOH 5M, em banho-maria a 80 °C, com agitação constante, durante duas horas.

Após resfriamento, adicionou-se solução saturada de NaCl, e o colesterol foi extraído três vezes com 700 μL de éter de petróleo (TERPSTRA et al., 1998).

A amostra foi então seca e ressuspensa em 1 mL de n-hexano grau HPLC para a separação, identificação e quantificação do colesterol, que foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em equipamento da marca *Shimadzu* Modelo LC-10AD (*Shimadzu Scientific Instruments-Inc-Japan*) equipado com injetor automático SIL-20A HT, controlador CBM-20A, forno de coluna CTO-20A e detector de arranjo de diodos SPD-M20A, com coluna cromatográfica Cyano (Phenomenex). O volume de injeção foi de 20 μL . A fase móvel foi constituída por n-hexano/isopropanol nas concentrações de 97:3 (v/v), com fluxo isocrático de 1 mL/minuto. O detector utilizado foi o UV/VIS com varredura, com leitura no comprimento de onda de 206 nm.

A quantificação foi realizada por padronização externa empregando-se curva de calibração de colesterol padrão *Sterolids Inc-USA*. A identificação foi realizada pela comparação do tempo de retenção de cada pico com o do padrão. O tempo de retenção foi de 4,8 minutos (CSALLANY et al., 1989).

A análise foi realizada em triplicata.

Ácidos Biliares

Os ácidos biliares foram quantificados utilizando o *kit* comercial enzimático colorimétrico *Total Bile Acids Assay*, da marca Diazyme (San Diego, USA).

Alíquotas de 50 mg de fezes foram homogeneizadas com 1 mL de tert-butanol a 50 % (v/v) e mantidas em banho-maria, com agitação, a 37 °C por 20 minutos, para extração das frações lipídicas. As amostras foram então centrifugadas (10.000 x g por 2 minutos) para obtenção do sobrenadante, contendo os ácidos biliares (VAN DER MEER et al., 1985).

Na sequência, em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (fundo plano, transparente, Greiner Bio-one GmbH) foram pipetados 135 µL do reagente R1 (Thio-NAD > 0.1 mM, Buffer), 2 µL do sobrenadante (amostra) ou padrão (contido no *kit*) ou água deionizada (branco), a placa foi agitada e incubada a 37 °C por 3 minutos (em leitor de placas, modelo SpectraMax M5, Molecular Devices Inc) e mediou-se a absorbância do branco a 405 nm. Foram então pipetados 45 µL do reagente R2 (3- α -HSD > 2kU/L, NADH > 0.1mM, Buffer) contidos no *kit*, seguidos de agitação da placa. As amostras e o padrão foram então submetidos às leituras de absorbância em leitor de placas a 37 °C a 405 nm nos tempos 60 e 120 minutos.

Na presença de Tio-NAD, a enzima 3- α hidroxisteróide desidrogenase converte os ácidos biliares em 3-cetoesteróides e Tio-NADH. A taxa de formação de Tio-NADH é determinada pela mudança de absorbância a 405 nm, mensurada entre os 60 e 120 segundos de reação.

Para o cálculo da quantidade de ácidos biliares nas amostras, foi utilizada a equação fornecida pelo *kit* e depois ajustada para grama de fezes secas

A análise foi realizada em triplicata.

4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para comparar diferença entre três grupos independentes foi empregado o teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*, quando detectada diferença entre grupos.

As médias foram consideradas diferentes ao nível de 5 % de significância.

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Os gráficos gerados foram elaborados no Microsoft Office- Excel 2007 e o pacote estatístico utilizado foi o *Statistical Package for Social Science 20.0* (SPSS-IBM).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

A composição centesimal da matéria prima empregada neste trabalho é expressa na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3 – Composição centesimal (g.100 g⁻¹) das farinhas de feijão caupi: integral, desengordurado e isolado proteico, em base seca.

Composição	FEIJÃO CAUPI		
	Integral	Desengordurado	Isolado proteico
Umidade	10,4 ± 1,16	9,05 ± 0,06	10,89 ± 0,37
Cinzas	1,97 ± 0,01	1,93 ± 0,01	0,98 ± 0,00
Proteínas	22,87 ± 0,23	21,83 ± 0,05	94,41 ± 1,46
Lipídeos	1,95 ± 0,05	0,5 ± 0,02	0,98 ± 0,08
Carboidratos totais*	73,21	75,74	3,63

*Os carboidratos totais foram calculados por diferença.

Valores expressos em média ± desvio padrão de três determinações da mesma amostra.

O teor proteico do feijão caupi observado neste trabalho se mostrou consonante à faixa indicada na literatura, para diversos cultivares desse feijão (valores entre 20 e 26 g/100 g), sendo que o mesmo comportamento foi observado para os teores de lipídeos (variação de 1,2 a 4,8/100 g).

O teor lipídico do feijão caupi é considerado baixo, assim como o das leguminosas em geral. Verifica-se variabilidade na composição de ácidos graxos, mas predominância de insaturados. Dentre os saturados, o palmítico é preponderante (média de 30 %), enquanto o esteárico ocorre em concentrações mais baixas (média de 4 %). A variabilidade pode ocorrer de acordo com o genótipo, origem, localização, clima, condições ambientais e tipo de solo no qual esta leguminosa cresce (FROTA, 2007; MARQUES, 2013).

Quanto as cinzas do feijão caupi observou-se no trabalho atual, valor relativamente menor ao observado em outros (variação de 2,6 a 3,5/100 g), porém, que não é considerado tão destoante (MAIA et al., 2000; SALGADO et al., 2005; FROTA, 2007; MARQUES, 2013).

O teor de lipídeos observado no feijão caupi desengordurado comprova que o processo de desengorduramento foi eficiente, com redução de 74 % em relação ao feijão integral.

A observação da composição centesimal do isolado proteico do feijão caupi revela que o processo de isolamento foi eficiente, apresentando 94 % de pureza e pequenas quantidades de gordura e cinzas. Em trabalhos anteriores realizados nesse grupo de pesquisa, os resultados obtidos para a pureza foram de 92 % (FROTA, 2007) e de 91,2 % (MARQUES, 2013). Para ser considerado isolado, o mínimo de teor proteico deve ser de 90 % (UZZAN, 1988).

5.2. METABOLISMO DO COLESTEROL (EXPERIMENTO *IN VIVO* 2)

5.2.1. CARACTERIZAÇÃO DAS DIETAS, CONSUMO E GANHO DE PESO DOS ANIMAIS

A composição centesimal das três dietas é mostrada na Tabela 4.

A distribuição dos macronutrientes foi considerada semelhante entre as três dietas e refletiu concordância com a composição planejada (exposta no Quadro 2).

Tabela 4 – Composição centesimal (g.100 g⁻¹) das dietas em base seca. Experimento *in vivo* 2.

Composição	DIETAS		
	N	H	I
Umidade	9,08 ± 0,61	11,03 ± 0,21	8,68 ± 0,09
Cinzas	1,91 ± 0,003	1,91 ± 0,003	1,95 ± 0,003
Proteínas	26,15 ± 0,64	26,46 ± 0,13	27,83 ± 0,21
Lipídeos	15,65 ± 0,5	14,45 ± 0,65	15,22 ± 0,36
Carboidratos totais*	56,29	57,18	55,00

Valores expressos em média ± desvio padrão de três determinações da mesma amostra.

Não houve diferença estatística entre os grupos.

* Valor obtido por diferença.

As principais diferenças na composição de ácidos graxos entre as dietas podem ser observadas na Tabela 5 a seguir. Estas diferenças se dão pela presença de óleo de coco e colesterol nas dietas hipercolesterolemizantes, comparado à dieta normo, à base de óleo de soja.

Os ácidos graxos saturados presentes nas dietas hiper, como caprílico, cáprico, láurico e mirístico, além do palmítico (que aparece nas três rações), são associados a alterações no metabolismo do colesterol, como por exemplo, diminuição dos LDLR no fígado e aumento da trigliceridemia (LOTTENBERG, 2009).

Os ácidos graxos dietéticos têm um efeito considerável nas concentrações plasmáticas de LDL-c e, portanto, no risco de doença coronária. Sabe-se que ácidos graxos *trans* têm efeito prejudicial sobre os lipídeos do plasma, enquanto que os PUFAs da família n-6 e os MUFAs diminuem as concentrações plasmáticas de LDL-c. Entre as ácidos graxos saturados, o esteárico parece ter um efeito neutro sobre o LDL-c, enquanto que os ácidos láurico, mirístico e palmítico são hipercolesterolêmicos (FERNANDEZ e WEST, 2005).

Tabela 5 – Perfil de ácidos graxos (g.100 g⁻¹) das dietas. Experimento *in vivo* 2.

Ácidos graxos		DIETAS		
		N	H	I
8:0	Caprílico	-	10,4	8,5
10:0	Cáprico	-	6,0	5,2
12:0	Láurico	0,5	53,7	50,9
14:0	Mirístico	0,4	11,8	12,4
16:0	Palmítico	12,9	5,6	7,8
18:0	Esteárico	3,5	1,3	-
18:1 n9	Oléico	24,6	7,2	9,0
18:2 n6	Linoléico	52,3	3,7	5,5
18:3 n3	Linolênico	5,8	0,3	0,7

A Tabela 6 apresenta os dados de consumo alimentar e peso dos animais. Não houve diferença estatística entre os grupos para nenhum dos parâmetros indicados, confirmando a homogeneidade entre os animais estudados.

A técnica *per feeding* utilizada assegura que a ingestão diária da ração seja equivalente, e desta forma, uma vez que as dietas são isocalóricas, a tendência é que o ganho de peso seja similar entre os grupos.

Ressalta-se que os valores de digestibilidade verdadeira da proteína do feijão caupi e da caseína encontrados por FROTA (2007), a partir da oferta à hamsters, de dietas de composição similar as usadas no trabalho atual, foram de 96,8 e 98,8 % respectivamente e não refletiram diferença estatística entre si. Esta informação exclui a teoria de que efeitos do isolado proteico do feijão caupi no metabolismo do colesterol poderiam ser decorrentes da menor digestibilidade proteica, como acontece quando o grão integral do feijão caupi (digestibilidade de 87,2 %) é usado, em comparação à caseína. O processo de isolamento e suas características como desnaturação proteica e eliminação de fatores antinutricionais provavelmente são os fatores que permitem a digestão proteica completa.

Tabela 6 – Peso inicial e final, ingestão diária média e total de dieta, ganho de peso e CEA (coeficiente de eficiência alimentar) dos hamsters. Experimento *in vivo* 2.

Variáveis	GRUPOS		
	N	H	I
Peso inicial (g)	90 ± 10,64	91 ± 11,16	95,77 ± 13,07
Peso final (g)	115,10 ± 10,86	120,74 ± 12,44	125,47 ± 8,37
Ganho de peso total (g)	24,9 ± 13,81	29,83 ± 14,00	29,71 ± 10,54
Ingestão diária média (g)	9,12 ± 0,48	9,24 ± 1,46	9,08 ± 0,62
Ingestão (g/kg peso)	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01
CEA (%)	15,81 ± 8,65	17,51 ± 8,15	17,89 ± 5,54

Valores expressos em média ± desvio padrão de três determinações da mesma amostra.

Não houve diferença estatística entre os grupos.

CEA= (ganho de peso/consumo total de ração)*100.

5.2.2. PERFIL DE LIPÍDEOS SÉRICOS

A Figura 8 mostra as diferenças de concentrações do colesterol total e suas frações no plasma.

Os grupos H e I obtiveram valores similares entre si e apresentaram maiores concentrações para CT, VLDL-c e HDL-c quando comparados ao grupo N.

No que se refere ao LDL-c o grupo I apresentou valor superior aos demais.

Figura 8 – Concentrações séricas de CT, VLDL-c, LDL-c e HDL-c dos hamsters. Experimento *in vivo* 2.

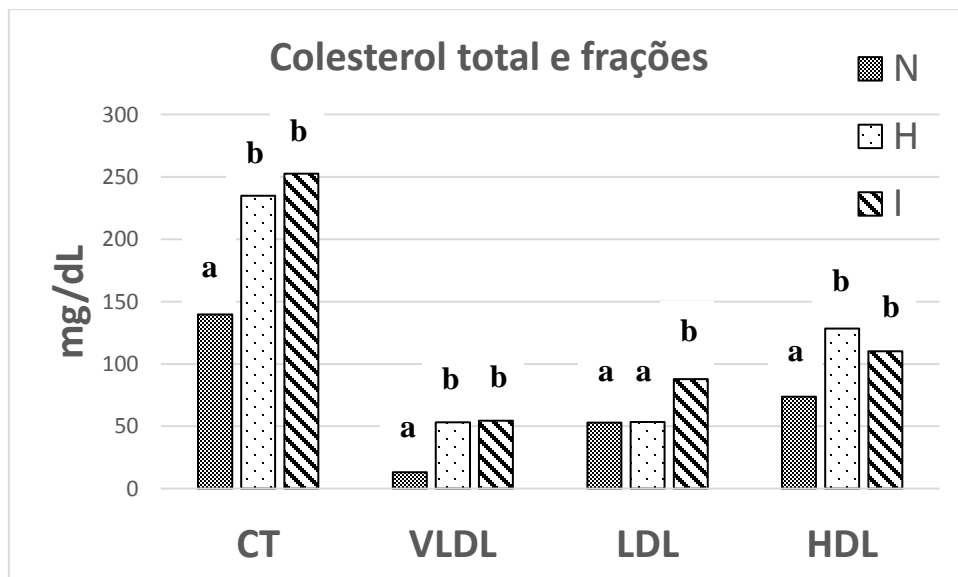
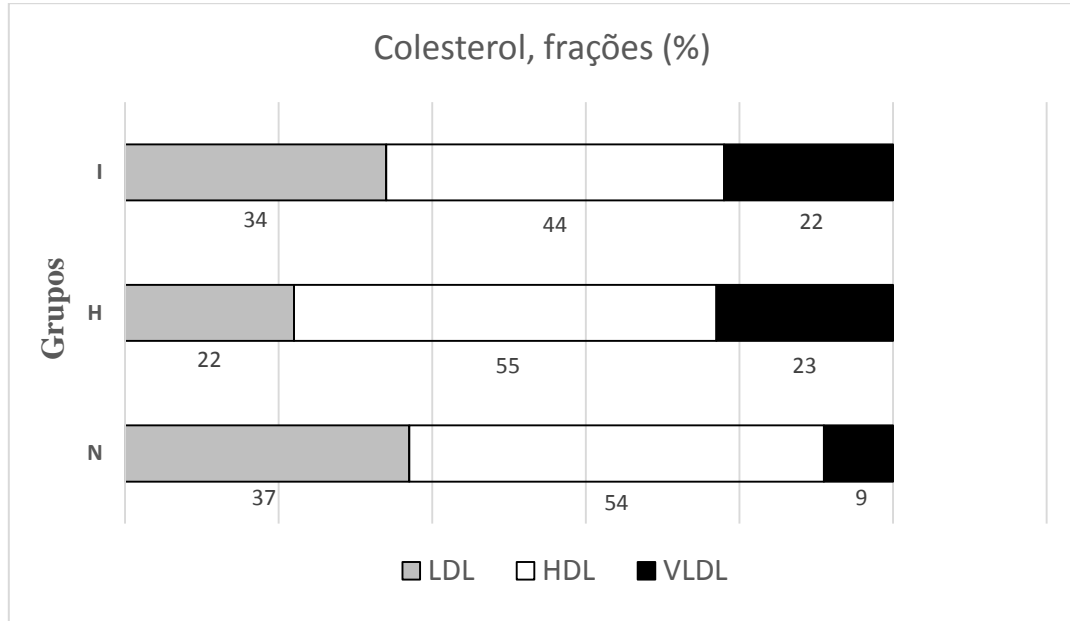


Figura 9 – Distribuição do colesterol total sérico dos hamsters. Experimento *in vivo* 2.



A partir da Figura 9 pode-se observar as diferenças na distribuição das lipoproteínas que compõem o colesterol total.

Destaca-se que, ao calcular a porção HDL-c/CT obteve-se os seguintes valores para os grupos N, H e I respectivamente: 0,54; 0,55 e 0,43, que não diferiram estatisticamente entre si.

As Figuras 10 e 11 revelam os resultados quanto ao perfil de triglicerídeos nos hamsters avaliados.

O valor dos TG séricos totais foi maior nos grupos H e I quando comparados ao grupo N.

Não houve diferença na composição das partículas de triglicerídeos.

A razão TG/HDL-c foi calculada obtendo-se os valores 1,61; 1,59 e 2,35 para os grupos N, H e I, respectivamente.

Figura 10 – Concentração de triglicerídeos séricos dos hamsters. Experimento *in vivo* 2.

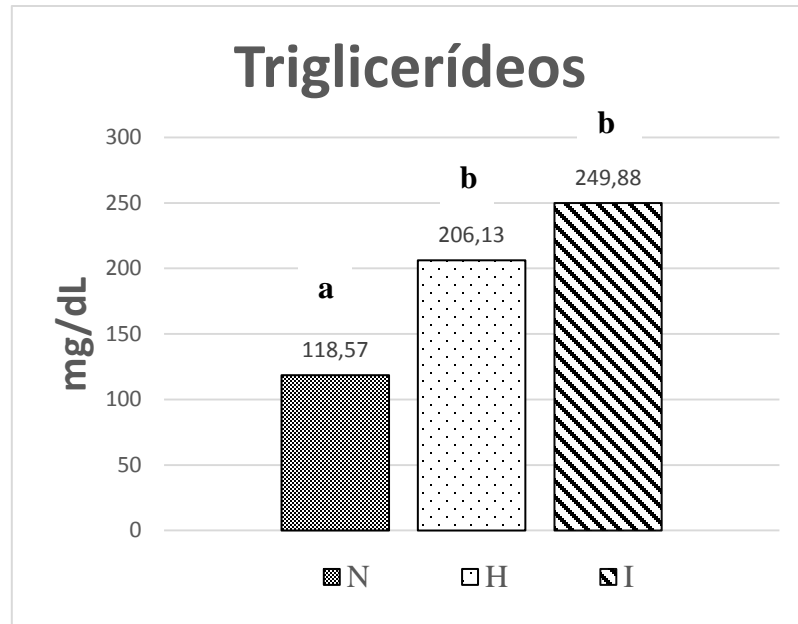
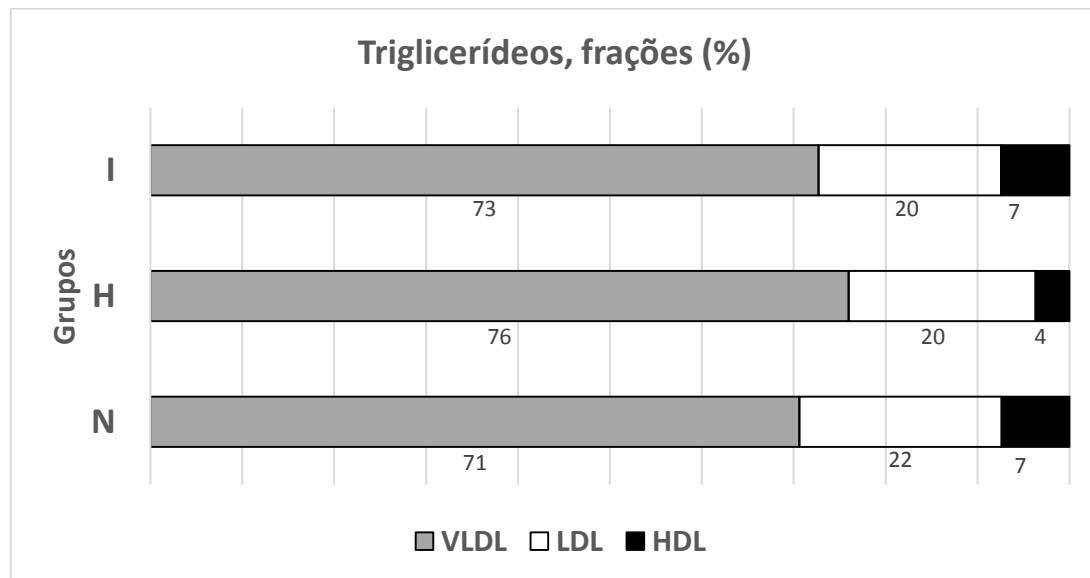


Figura 11 – Composição do triglicerídeo sérico dos hamsters. Experimento *in vivo* 2.



FROTA (2007) comparou três grupos experimentais de hamsters, com dietas hipercolesterolêmicas à base de caseína, proteína do feijão caupi integral cozido ou isolado proteico do feijão caupi. Foi observada diferença estatisticamente significativa no teor de CT e HDL-c entre todos os grupos, sendo maior no grupo caseína, seguido do isolado e feijão. A razão HDL-c/CT e TG não diferiu entre os grupos.

FONTANARI et al. (2012) investigaram a matéria prima tremoço e utilizou o mesmo desenho experimental que a autora citada no parágrafo anterior. Os dados mostraram diferença estatística para CT e colesterol não HDL-c, que foram maiores no grupo caseína, quando comparado aos demais. A fração HDL-c foi maior no grupo tremoço integral e para TG houve diferença somente entre o grupo tremoço integral *versus* isolado proteico, sendo maior no primeiro.

DIAS (2012) estudou os feijões preto e carioca no metabolismo lipídico de hamsters a partir de dois ensaios, denominados A e B. No ensaio A, a composição dietética foi de dieta hipercolesterolemizante (13,5 % gordura de coco + 0,1 % de colesterol - idêntica ao trabalho atual) + 20 % de caseína para o grupo controle; dieta hipercolesterolemizante + 15 % de farinha integral cozida liofilizada de feijão (carioca ou preto) e complementação do teor proteico total (para 20 %) com caseína (cerca de 215 g/kg de dieta). No ensaio B a composição dietética foi hipercolesterolemizante conforme ensaio A + 18 % de caseína para o grupo controle; dieta hipercolesterolemizante + 60 % de farinha integral cozida liofilizada de feijão (carioca ou preto) e complementação do teor proteico total (para 18 %) com caseína (cerca de 75 g/kg de dieta) (DIAS, 2012).

Após 21 dias recebendo as dietas experimentais os animais foram avaliados. No ensaio A não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto aos teores de CT, HDL-c e TG. Sendo que a fração não HDL-c foi maior no grupo feijão preto em comparação ao grupo controle. No ensaio B, com maiores concentrações de farinha integral dos feijão, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto aos teores de CT e fração não HDL-c. Para TG foi encontrado maiores valores no grupo feijão preto em relação ao controle (DIAS, 2012).

Assim a autora concluiu que os feijões não foram capazes de proteger contra o efeito hipercolesterolemizantes da dieta referindo que a diferença de perfis de aminoácidos entre as leguminosas pode ser uma das razões para o resultado apresentado; e/ou que a digestão proteica das variedades investigadas não tenham promovido a formação de peptídeos bioativos (DIAS, 2012).

No trabalho de FROTA (2007), citado anteriormente, o grupo feijão integral foi capaz de mostrar resultados positivos no metabolismo do colesterol, mas ressalta-se que neste trabalho, foi induzida hipercolesterolemia nos animais antes de introduzir as dietas testes.

Estudos evidenciam que, as mudanças na concentração de colesterol são dependentes dos valores iniciais, no sentido de que, quanto maior o colesterol inicial (VLDL-c ou LDL-c), maior é a redução percebida (ANDERSON, JOHNSTONE e COOK-NEWELL, 1995; WEGGEMANS e TRAUTWEIN, 2003; DEWELL; HOLLENBECK e HOLLENBECK, 2006).

5.2.3. LIPÍDEOS TOTAIS E COLESTEROL NO FÍGADO

Na Tabela 7 são mostradas variáveis relacionadas ao fígado dos animais avaliados.

Verificou-se maior concentração de colesterol hepático nos animais alimentados com dietas enriquecidas com colesterol e óleo de coco (H e I) em comparação com o grupo N. Entretanto, para os lipídeos hepáticos totais houve maior concentração no grupo H em relação ao grupo N, sendo que o grupo I não diferiu dos demais.

O peso total do fígado, bem como valores de ALT não revelaram diferença estatística entre os grupos.

O conteúdo de gordura do fígado reflete o equilíbrio entre várias vias metabólicas envolvidas na síntese e eliminação de triglicerídeos, como a lipólise no tecido adiposo e a lipogênese *de novo*, a esterificação de triglicerídeos, a oxidação de ácidos graxos e a síntese/secreção de lipoproteínas no tecido hepático (FERRAMOSCA e ZARA, 2014).

O fígado rico em colesterol é a marca registrada da hiperlipidemia. Em hamsters o consumo de ácidos graxos saturados e colesterol promove aumento da esterificação do colesterol intracelular fazendo com que os hepatócitos aumentem de tamanho em até 28 % (OLIVEIRA et al., 2011; SINGH et al., 2013).

Tabela 7 – Peso do fígado, ALT (alanina aminotransferase), lipídeos totais e colesterol hepático dos hamsters. Experimento *in vivo* 2.

Variáveis	GRUPOS (X ± DP)		
	N	H	I
Colesterol (mg/100mg fígado)	0,20 ^a ± 0,02	0,28 ^b ± 0,03	0,25 ^b ± 0,02
Lipídeos totais (g/100 g fígado)	0,81 ^a ± 0,39	1,44 ^b ± 0,49	1,2 ^{a, b} ± 0,44
Peso do fígado (g)	2,74 ± 0,09	2,77 ± 0,11	2,73 ± 0,22
ALT (UI/L)	122,29 ± 152,56	118,13 ± 65,20	245,63 ± 178,07

Valores expressos em média ± desvio padrão.

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem entre si.

Onde não há letras, não há diferença estatística.

O colesterol hepático foi igualmente maior nos grupos H e I quando comparado ao N, o que pode ser justificado pelo maior teor de colesterol na ração desses dois grupos. Porém, o teor de lipídeos hepáticos totais foi maior no grupo H em comparação a N, sendo que I não diferiu dos demais. Esses resultados indicam que a deposição de gorduras no fígado dos animais I está sendo menor por outros tipos de gorduras que não o colesterol, quando comparado ao grupo H.

Como o colesterol não é a única forma de depósito de gorduras no fígado, se poderia pensar que o isolado proteico do feijão caupi limita a deposição de outros tipos de gorduras hepáticas, que não o colesterol, como por exemplo, na forma de triglicerídeos.

DIAS (2012) estudou o efeito dos feijões carioca e preto no metabolismo lipídico de hamsters com dieta hipercolesterolemizante, sendo a caseína a fonte proteica do grupo controle. Neste trabalho não foi encontrada diferença entre os grupos feijões e controle, quanto ao teor de lipídeos totais no fígado. Mas no que se refere ao colesterol hepático verificou-se que o grupo feijão carioca apresentou maior concentração quando comparado aos restantes.

ALT é classificada como uma enzima de escape, que indica lesão hepatocelular. Toxicidade, inflamação, hipóxia e traumatismo tecidual podem constituir a razão subjacente à sua elevação (CHAPMAN e HOSTUTLER, 2013).

Outros trabalhos com hamsters mostraram diferenças nas concentrações de ALT, no sentido de que dietas com alto teor de lipídeos aumentam sua quantidade ou dietas com a matéria prima teste (exemplos: extrato de *Hibiscus sabdariffa*, berberine) são capazes de diminuir este valor, indicando proteção ao tecido hepático (HUANG et al., 2015) ou são capazes de aumentá-lo, indicando toxicidade (LI et al., 2015).

CHANG et al. (2015) avaliaram o efeito de extrato a base de cacau, café, chá verde e garcinia em hamsters alimentados com dieta alta em colesterol e, em similaridade a este trabalho, não observaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

5.2.4. COLESTEROL E ÁCIDOS BILIARES NAS FEZES

Os teores de colesterol e ácidos biliares excretados nas fezes dos animais encontram-se na Tabela 8.

Os resultados evidenciaram maior concentração de colesterol fecal no grupo I quando comparado ao grupo N. Entretanto não houve diferença estatística entre os grupos I e H.

Para ácidos biliares não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

Em estudos de solubilidade micelar com feijão caupi, MARQUES et al. (2015a) e MARQUES et al. (2015b) indicaram que, tanto o hidrolisado proteico como um todo (massa molecular menor do que 3 kDa a 1 mg mL⁻¹), quanto frações específicas, são capazes de inibir a solubilização micelar, passo importante para a absorção de peptídeos pelas células da mucosa intestinal através de receptores NPC1L1.

Tabela 8 – Colesterol e ácidos biliares excretados nas fezes dos hamsters. Experimento *in vivo* 2.

Variáveis	GRUPOS (X ± DP)		
	N	H	I
Colesterol (mg/100g fezes)	76,3 ^a ± 34,9	93,7 ^{a, b} ± 36,6	120,0 ^b ± 24,3
Ácidos biliares (µmol/g fezes)	0,63 ± 0,29	0,47 ± 0,22	0,55 ± 0,18

Valores expressos em média ± desvio padrão.

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem entre si.

Onde não há letras, não há diferença estatística.

O maior valor de colesterol nas fezes no grupo I comparado ao N, certamente se deve a maior concentração de colesterol na ração. No grupo I comparado ao H, observou-se maior valor para o primeiro grupo, que poderia estar associado à capacidade de peptídeos do feijão caupi em inibir a solubilização micelar. Entretanto, destaca-se que não foi evidenciada diferença estatística entre esses dois grupos.

Outro mecanismo considerado pelo efeito hipocolesterolemizante das leguminosas e proteínas vegetais é o aumento da excreção de ácidos biliares. Entretanto não houve diferença estatística para este parâmetro entre os grupos neste trabalho.

DIAS (2012) observou que dieta com feijão carioca representou maior excreção de ácidos biliares, em comparação ao grupo de hamsters controle. O feijão preto teve o mesmo resultado obtido para o grupo controle. Ressalta-se que o resultado positivo observado para o feijão carioca pode ser devido ao conteúdo fibra do feijão, que foi usado na forma integral na pesquisa em questão.

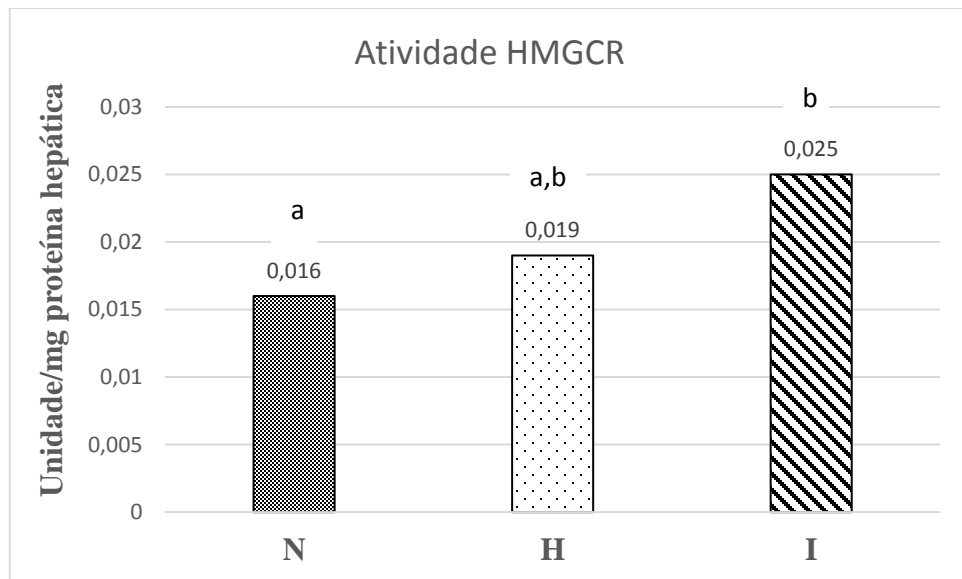
FROTA et al. (2008) observou maior excreção no grupo alimentado com feijão caupi integral *versus* o grupo caseína, mas também não encontrou diferença na excreção de colesterol e ácidos biliares entre os grupos caseína e isolado proteico, em consonância ao observado no trabalho atual.

5.2.5. ATIVIDADE HEPÁTICA DA HMGCR

O gráfico a seguir (Figura 12) mostra os níveis de atividade da HMGCR obtidos para os grupos estudados.

Verificou-se maior atividade no grupo I em relação ao N, sendo que o grupo H não apresentou diferença em relação aos demais grupos.

Figura 12 – Atividade hepática da HMGCR em hamsters. Experimento *in vivo* 2.



Esse resultado não corrobora com o maior teor de colesterol dietético oferecido ao grupo I, uma vez que, a inibição da HMGCR era esperada com a maior oferta de colesterol e desta forma, sem a necessidade de sua produção. Por outro lado, considerando que o grupo I obteve valores elevados de colesterol plasmático e hepático, também se pode dizer que este resultado seria consequência da produção de colesterol endógeno, via HMGCR, devido a uma inabilidade do organismo em manter a homeostase do colesterol.

A HMGR catalisa a reação que converte a molécula de HMGCoA em mevalonato e coenzimaA, produzindo NADP. O kit usado permite medir a atividade da HMGR a partir da oxidação do NADPH. À medida que o NADPH é oxidado pela HMGR na presença de HMG-CoA, há diminuição da absorvância a 340 nm, o que implica em atividade da enzima.

O *feedback* de regulação da biossíntese de colesterol é um processo fisiológico que permite que os seres humanos e outros animais se adaptem às mudanças nos níveis de colesterol dietético

e mantenham seus níveis de colesterol sérico e tecidual dentro de limites bastante estreitos, sendo que o esperado é que, em condições de excesso de colesterol, a HMGCR seja inibida, limitando-se assim a produção de mais colesterol (NESS, 2015).

WU et al. (2013) destacaram que, um aumento na biossíntese de colesterol foi encontrado em pacientes com doença gordurosa hepática não-alcoólica (NAFLD), indicando parecer que, no contexto da NAFLD, a regulação convencional dos esteróis sobre a síntese de colesterol hepático pode ser disfuncional.

MARQUES et al. (2015) mostraram a inibição da atividade da HMGCR por três frações peptídicas derivadas do feijão caupi. Os peptídeos presentes em todas as frações inibiram significativamente a atividade da HMGCR, sem diferenças significativas entre essas taxas de inibição (faixa de 47 a 57 %). Pravastatina, um inibidor conhecido utilizado como controle positivo, exibiu 80 % de inibição.

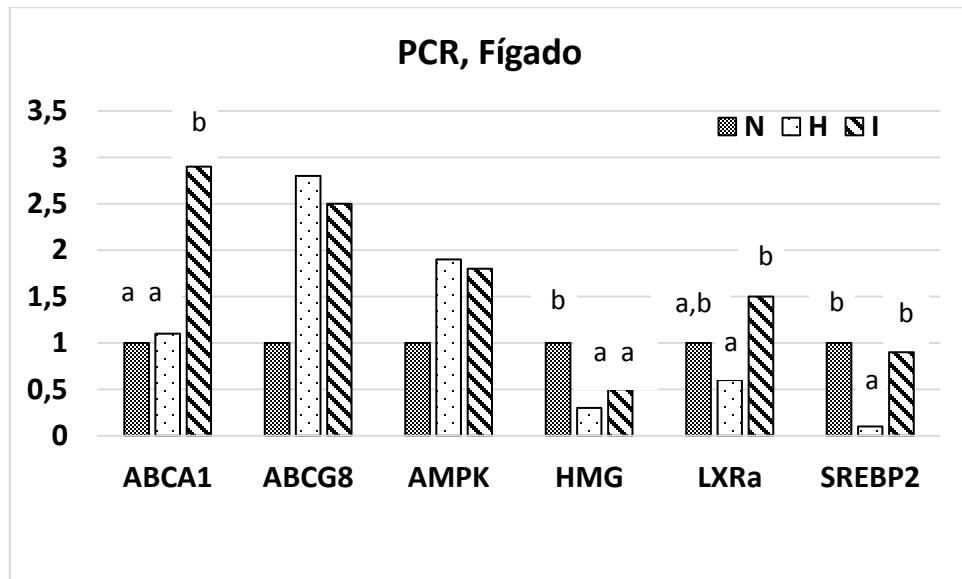
Ao investigar mecanismos pelos quais uma dieta rica em gordura causa ativação da HMGCR levando ao aumento da síntese *de novo* do colesterol em ratos, WU et al. (2013) demonstraram que, apesar de teor de colesterol 16 vezes maior na dieta hiperlipídica *versus* a dieta controle, a síntese de colesterol hepático manteve-se elevada nos animais do primeiro grupo. Os autores concluíram que a ativação da HMGCR pode ser uma resposta metabólica ao maior consumo de ácidos graxos na dieta, considerando que no trabalho em questão, não só o ácido graxo dietético total foi mais elevado em relação à dieta de controle, mas também, a quantidade total de ácidos graxos (aproximadamente 1000 vezes).

5.2.6. EXPRESSÃO POR PCR

A Figura 13 mostra o resultado referente à expressão de algumas proteínas envolvidas no metabolismo do colesterol analisadas.

Para os genes ABCG1, ABCG5 e LDLR não foram obtidos valores de expressão. Isto se justifica pelo fato de não ter havido resultado satisfatório na amplificação, uma vez que as sequências de *assays* utilizadas, apesar de compatíveis para humanos ou células caco, não foram compatíveis para o tecido hepático de hamsters.

Figura 13 – Expressão de genes relacionados com lipídeos no fígado de hamsters. Experimento *in vivo* 2.



Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Onde não há letras não houve diferença.

Os receptores nucleares são integradores de sinais hormonais e nutricionais, mediando as mudanças nas vias metabólicas dentro do corpo. Eles ativam ou reprimem a expressão gênica por ligação a regiões reguladoras de genes alvo e atuam em conjunto com co-ativadores e co-repressores. (CALKIN e TONTONNOZ, 2013).

LXR α é um receptor nuclear ativado por oxisteróis considerado como o principal regulador da expressão de ABCG5 e ABCG8 (YU et al., 2014). Além disso regula a expressão de ABCA1 e de proteínas de transporte de lipídeos como a CEPT e LPL, que coordenados por agonistas de LXR facilitam o transporte reverso do colesterol eficiente, da periferia para o fígado. Outra função importante do LXR é a promoção da lipogênese *de novo* - a biossíntese de ácidos graxos (CALKIN e TONTONNOZ, 2013). Ademais, já foi inferido que LXR regula negativamente a via de LDLR, refletindo mais um mecanismo de regulação da captação de colesterol (ZELCER et al., 2009).

LXR α refletiu menor expressão para o grupo H em comparação ao grupo I, sendo que o grupo N não diferiu dos demais. Não foi observada analogia no comportamento de expressão quanto aos dois genes regulados por este receptor e para os quais obteve-se valor comparativo

(ABCA1 e ABCG8). Uma vez que LXR α apresenta múltiplas formas de atuação, e considerando os resultados apresentados no trabalho atual, torna a tarefa de concluir difícil e limitada.

Os transportadores ABCG5 e ABCG8 formam um heterodímero obrigatório que limita a absorção intestinal e contribui para a secreção de colesterol e esteróis vegetais dos hepatócitos para a bile (YU et al., 2014).

Neste trabalho somente foi analisada a expressão desses genes no fígado, sendo que para ABCG5 não foram obtidos resultados. Entretanto ressalta-se que, uma vez que ABCG5 ou ABCG8 serve apenas como um semi transportador não funcional quando expresso sozinho e que existe a necessidade de atuação de ambos para formar o heterodímero e desta forma obter a funcionalidade de transporte do esterol (YU et al., 2014), acredita-se que a expressão de ABCG5 teria o mesmo comportamento observado para ABCG8.

Uma vez que os grupos H e I receberam maior concentração de colesterol da dieta, esperava-se que a expressão desses genes fosse maior nesses dois grupos quando comparados ao N. Porém, apesar da expressão de ABCG8 ter refletido maiores valores no grupo H e I, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos estudados.

ABCA1 medeia a secreção de colesterol celular livre a um aceitador extracelular, a apoAI, para formar HDL-c (WANG e SMITH, 2014).

No trabalho atual a expressão de ABCA1 foi maior no grupo I quando comparado aos demais. Já o valor de HDL-c para este mesmo grupo, foi similar ao grupo H e ambos foram maiores que o grupo N.

Uma teoria para este resultado é que pode ter havido importante contribuição da ABCA1 intestinal nos animais do grupo H, a ponto de tornar similar os níveis circulantes desta lipoproteína aos daqueles do grupo I.

O papel de ABCA1 na formação de partículas de HDL-c mostrou que o fígado é a fonte mais importante, com redução de aproximadamente 80% de HDL-c plasmático nos animais *knockout*. Desta forma, a ABCA1 hepática é crítica para manter os níveis circulantes de partículas de HDL-c por lipidação direta de apoAI, retardando o catabolismo de apoAI pelo rim e prolongando o seu tempo de residência no plasma. A deleção de ABCA1 intestinal conduz a uma redução de aproximadamente 30% na HDL-c plasmática, e a deleção de ABCA1 hepática e intestinal resulta numa diminuição de aproximadamente 90 % nos níveis plasmáticos de HDL-c (TIMMINS et al., 2005; BRUNHAM et al., 2006).

Via de regra, a ingestão aumentada de colesterol faz com que sua síntese seja diminuída por meio da inibição da enzima HMGCR, além de promover a redução dos LDLR no fígado (NESS, 2015).

Parte dessa informação pode ser, de certa forma, comprovada pelos resultados observados neste trabalho. Apesar de não terem sido obtidos dados quanto a expressão de LDLR, verifica-se que a expressão da HMGCR foi menor nos grupos com dieta hipercolesterolêmica (H e I) que no grupo N. Em outras palavras, a dieta rica em colesterol inibiu a expressão da HMGCR. Entretanto, os dados de atividade da HMGCR revelaram maior atividade para o grupo I, comparado ao N, sendo que H não diferiu entre dos restantes.

O SREBP2 é conhecido por regular a expressão hepática de HMGCR e LDLR, as principais proteínas envolvidas no enriquecimento do colesterol no fígado (SINGH et al., 2013).

De fato, TOVAR et al. (2005) verificaram que animais com dieta a base de proteína de soja apresentaram menor conteúdo de colesterol e aumento de SREBP2, na expressão de HMGCR e LDLR comparado aos ratos que receberam caseína.

No trabalho atual, a expressão do SREBP2 foi menor no grupo H quando comparada aos demais. Em comparação ao grupo N, há corroboração da ideia de que, com altas taxas de colesterol dietético há inibição do SREBP2 e da HMGCR. Mas o mesmo sentido não foi verificado para o grupo I, para o qual a expressão do SREBP2 foi similar a observada no grupo N.

Foi sugerido que a resistência à insulina e citocinas inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina (IL-6), ativam SREBP2 que induz o aumento da expressão dos LDLR e da HMGCR. Isto levaria ao aumento da biossíntese e da absorção de colesterol, que produziria a supressão da β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos livres e, ao mesmo tempo, efluxo de colesterol; essas situações em conjunto levariam ao acúmulo hepático de colesterol gerando a morte hepatocelular e inflamação hepática. Esta inflamação por sua vez, resultaria na ativação de macrófagos e neutrófilos que desencadeariam a liberação de citocinas e a ativação adicional de SERBP2, comprometendo ainda mais a situação (KABEL, ELMAABOUD e ALBARRAQ, 2015).

De fato, apesar da expressão da HMGCR ter sido menor para o grupo I, a atividade desta enzima se mostrou maior para este mesmo grupo, bem como a expressão de SREBP2. Entretanto as taxas de ALT, que seria um indicador de injúria hepática, não mostraram diferenças entre os grupos.

A AMPK é um regulador central da homeostase energética, que coordena as vias metabólicas e, assim, balanceia o suprimento de nutrientes com a demanda de energia. Como um sensor de energia celular, AMPK é ativada em resposta a uma variedade de condições que esgotam os níveis de energia celular, tais como a restrição de nutrientes (especialmente glicose), hipoxia e exposição a toxinas que inibem o complexo da cadeia respiratória mitocondrial (KIM et al., 2016).

Ressalta-se que a AMPK fosforila e inativa a acetil-CoA-carboxilase, que atua na etapa limitante da síntese *de novo* de ácidos graxos (HARVEY e FERRIER, 2012).

Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do AMPK. Acredita-se que, considerando a ampla capacidade de atuação deste regulador e uma vez que as dietas formuladas atendiam as recomendações energéticas (fato corroborado pelo ganho de peso dos animais ao longo do experimento), a AMPK não sofreu interferências em virtude das dietas oferecidas.

5.3. ABSORÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS

5.3.1. CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DA ALBUMINA

A ligação às proteínas plasmáticas é um fator muito importante na farmacocinética, farmacodinâmica e interação medicamentosa e de outros componentes com compostos e moléculas corporais (GHUMAN et al., 2005).

Como a albumina é uma proteína transportadora multifuncional em seres humanos, acredita-se que ela possa ser uma transportadora de peptídeos bioativos no plasma, até seu local de ação.

Essa suposta interação, peptídeo versus albumina, influenciaria grandemente a absorção, distribuição e metabolismo, refletindo na biodisponibilidade e toxicidade.

A albumina do soro humano (BSH) é a proteína mais abundante (40 mg/ml) no plasma sanguíneo. Esta proteína é composta por uma única cadeia polipeptídica não glicosilada contendo em sua seqüência 585 resíduos de aminoácidos (66 kDa), a qual se divide em três domínios (I, II e III), cada um contendo dois subdomínios (A e B) (MINGHETTI et al, 1986).

Neste estudo, a albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como uma proteína modelo devido ao seu baixo custo, disponibilidade e homologia estrutural com albumina de soro humano (MOREIRA et al., 2015).

Métodos espectrais são uma ferramenta poderosa para revelar a ligação de compostos com albumina a concentrações baixas. As afinidades de ligação podem ser determinadas por extinção de fluorescência, técnica que é usada para monitorizar as interações moleculares devido à sua alta sensibilidade, reprodutibilidade e relativa facilidade de utilização (MOREIRA et al., 2015).

Se BSA é excitada por comprimentos de onda de luz apropriada, todos os seus fluoróforos (triptofano, tirosina, fenilalanina) podem emitir fluorescência.

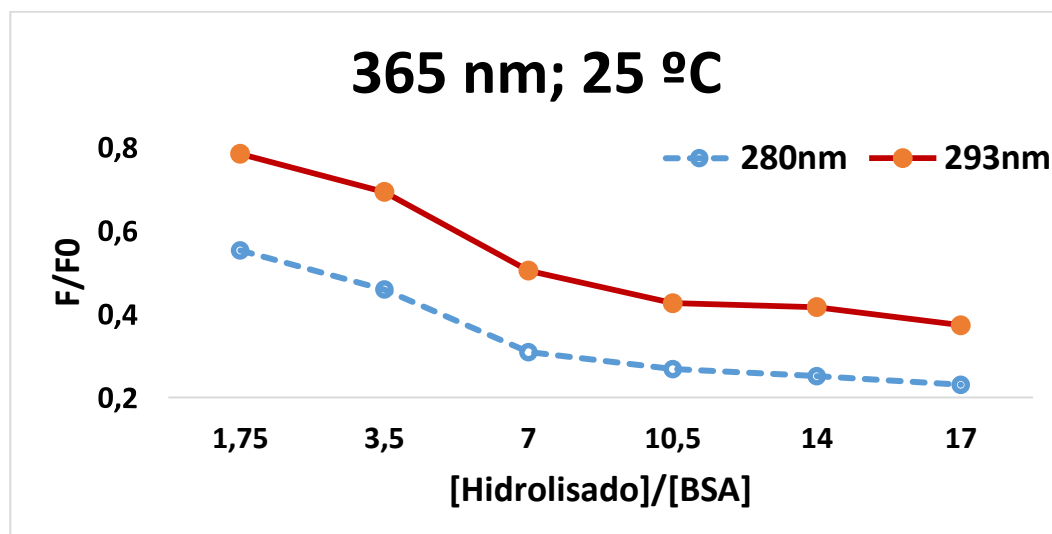
Quando um comprimento de onda de excitação de 280 nm é utilizado, a fluorescência da albumina provém de resíduos de triptofano e tirosina, enquanto que um comprimento de onda de 293 nm excita unicamente o resíduo de triptofano.

Esta análise permitiu comparar a fluorescência de BSA excitado a 280 e 293 nm na presença do hidrolisado proteico do feijão caupi, para determinar as interações deste com os resíduos de BSA.

F_0 é a intensidade de fluorescência de BSA, e F é a intensidade de fluorescência de BSA na presença do hidrolisado. Essa razão (F/F_0) foi comparada em comprimentos de onda de excitação 280 e 293 nm, a 25 °C e emissão de 365 nm.

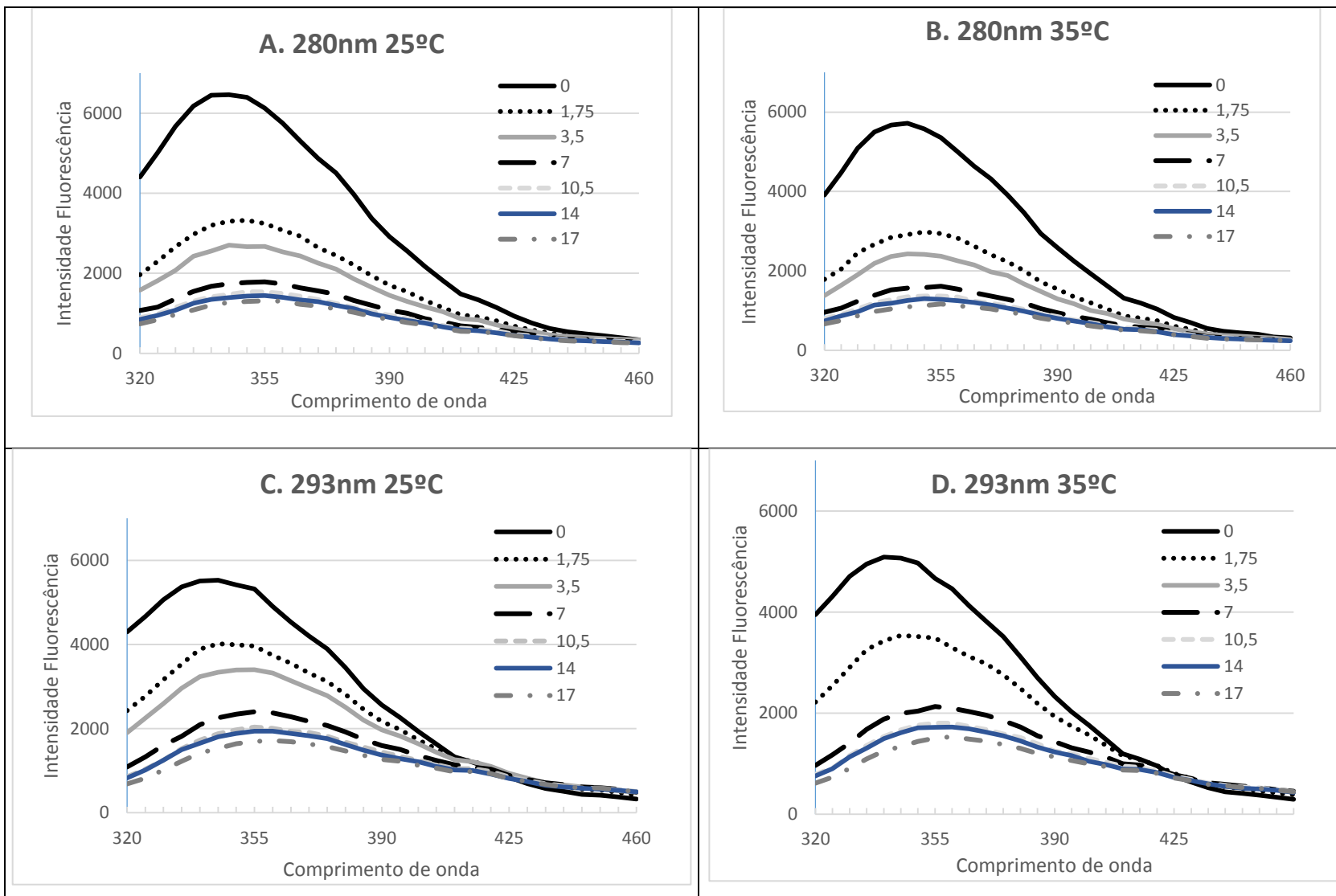
A Figura 14 mostra que a fluorescência de BSA na presença do hidrolisado, excitado a 280 nm é diferente daquela a 293 nm. Esta diferença indica que tanto resíduos de tirosina quanto de triptofano participaram das interações moleculares entre o hidrolisado e BSA.

Figura 14 – Fluorescência de BSA excitado a 280 e 293 nm na presença do hidrolisado proteico do feijão caupi. Experimento *in vitro*.



A Figura 15 mostra que a fluorescência do BSA diminuiu gradualmente com o aumento da concentração de hidrolisado, indicando que houve forte interação e transferência de energia entre o hidrolisado e BSA em ambos os comprimentos de onda de excitação de BSA (λ_{max} BSA = 280 e 293 nm) a 25 °C e a 35 °C. Como resultado, houve extinção da fluorescência intrínseca da BSA, mas nenhuma mudança significativa do comprimento de onda de emissão máxima foi observada.

Figura 15 – Fluorescência de BSA excitado a 280 e 293 nm, a 25 e 35 C°, na presença do hidrolisado. Experimento *in vitro*.



5.3.2. PEPTÍDEOS, EXPERIMENTO *IN VITRO*

Tabela 9 – Fragmentos identificados como possíveis peptídeos, a partir da hidrólise do isolado proteico do feijão caupi. Experimento *in vitro*.

Peptídeo	ALC ^a	MM (Da) ^b
TLVNSETPGR	30	1073.16
VDVNLVSGCPA	25	1073.22
WLGKSW	21	775.89
MGGALPYGRGGLVENM	21	1621.88

^a Selecionados fragmentos com ALC (average local confidence) maior ou igual a 20 %.

^b Massa Molecular. Determinada usando Innovagen's peptide property calculator.

Após obtenção das frações identificadas a partir da hidrólise foi feita a confrontação com banco de dados. Verificou-se se as mesmas já haviam sido encontrados no feijão caupi e para tanto foi utilizado o Blast, e o termo de busca *vigna unguiculata* (tx 3917).

O Blastp é um programa da família Blast, que quer dizer *basic local alignment sequence tool*, ou ferramenta básica de alinhamento local de sequências, e faz alinhamentos entre sequências.

Ao informar a sequência de interesse, o programa indica se a mesma já foi identificada em banco de dados, baseados em pesquisas e literatura científica. Seu acesso pode ser feito por meio da página <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>>.

As frações obtidas da hidrólise não obtiveram 100 % de correlação para o feijão caupi. Isso indica que não houve correspondência com os peptídeos já identificados, mas não exclui a possibilidade de representarem peptídeos do feijão caupi que ainda não foram identificados.

As mesmas frações foram investigadas quanto a sua possível atividade biológica, de acordo com o BIOPEP database (disponível em <<http://www.uwn.edu.pl/biochemia>>), mas não foram encontrados registros.

5.3.3. PEPTÍDEOS, EXPERIMENTO *IN VIVO* 1 (RATOS)

Tabela 10 – Fragmentos identificados como possíveis peptídeos, a partir do soro de animais após gavagem com isolado proteico do feijão caupi. Experimento *in vivo* 1.

Animal	Peptídeo	ALC ^a	MM (Da) ^b
c2	EANDLR	39	716.74
c2	EMGSSC	23	612.68
a1	ESFVVAAGL	23	892.01
a1	MADMGGPSDL	26	993.12
c3	MADMGPBSDL	21	993.12
a1	MASLDVKESLA	23	1163.34
a1	MASLEGRLA	37	947.11
a1	MCLDVNPT	47	892.06
b3	MDNLAL	47	675.8
b3	RDTSTPS	34	762.77
c1	RMCGGPS	27	762.95
c1	SDSALAL	33	675.73

^a Selecionados fragmentos com ALC (average local confidence) maior ou igual a 20 %.

^b Massa Molecular. Determinada usando Innovagen's peptide property calculator.

Após obtenção das frações identificadas foi feita a confrontação com banco de dados. Verificou-se se as mesmas já haviam sido encontrados no feijão caupi e para tanto foi utilizado o Blast, e o termo de busca *vigna unguiculata* (tx 3917).

Nenhum dos fragmentos obteve 100% correlação BLAST para o feijão caupi. Isso indica que não houve correspondência com os peptídeos já identificados, mas não exclui a possibilidade de representarem peptídeos do feijão caupi que ainda não possuem identificação conhecida.

Para pesquisa quanto a possível atividade biológica, de acordo com o BIOPEP, não foram encontrados registros.

5.3.4. PEPTÍDEOS, EXPERIMENTO *IN VIVO* 2 (HAMSTERS)

Para as análises conduzidas a partir do soro de hamsters foram identificados dois fragmentos: YYGA e HTLA.

A consulta ao BLAST com o termo “Blast hamsters (tx 10026)” revelou que os mesmos são peptídeos endógenos de hamsters.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando publicações anteriores deste mesmo grupo de pesquisa com a mesma matéria prima empregada neste trabalho, acreditou-se que a proteína do feijão caupi era efetiva na redução do colesterol.

MARQUES trabalhou com experimentos *in vitro* e com células caco2 e seus resultados tem evidenciado capacidade da proteína do feijão caupi, ou de peptídeos derivados desta proteína, em inibir a solubilização micelar do colesterol e a atividade da HMGCR, bem como atividade antioxidante (MARQUES, 2013; MARQUES et al., 2015a; 2015b).

FROTA trabalhou com hamsters e humanos e seus resultados evidenciaram capacidade da proteína do feijão caupi em atuar positivamente no metabolismo do colesterol de organismos hipercolesterolêmicos (FROTA, 2007; 2011; FROTA et al., 2008; 2015).

Tendo como base principal estas informações, o objetivo da tese atual foi aprofundar o conhecimento acerca do mecanismo e da identificação de peptídeos envolvidos nessa propriedade hipocolesterolêmica.

Para delinear o possível mecanismo de redução de colesterol induzido pela proteína do feijão caupi se pretendeu avaliar seu efeito sobre a regulação transcricional de diferentes genes hepáticos envolvidos no metabolismo do colesterol, usando hamsters alimentados com a dieta normolipídica e hipercolesterolêmica.

Entretanto nossos resultados não mostraram capacidade de redução do colesterol plasmático, ou nenhum outro efeito protetor marcante da proteína do feijão caupi, quanto ao metabolismo do colesterol. Fato que não extinguiu, mas diminuiu a estímulos em se identificar peptídeos bioativos no isolado proteico do feijão caupi.

Destaca-se que o desenho experimental usado no trabalho com hamsters desenvolvido por FROTA (2007) caracteriza diferenças quanto ao do trabalho atual, sendo a principal delas o fato da hipercolesterolemia ter sido induzida antes do início da oferta das dietas testes.

ANDERSON et al. (1995) analisaram 38 estudos clínicos controlados e concluíram que a substituição da proteína animal pela da soja reduz os níveis de CT, LDL-c e TG, sendo que esta redução é ainda mais evidente em indivíduos com maior nível de colesterol no início do estudo.

Diferenças quanto à composição de aminoácidos do feijão também podem ser destacadas, mesmo que em pequena proporção.

Esses fatores, somados, poderiam explicar essa distinção nos resultados encontrados para ambos os trabalhos.

Mesmo diante dos resultados não esperados quanto ao metabolismo do colesterol verificou-se se os fragmentos encontrados a partir da hidrólise do isolado proteico do feijão caupi eram encontrados no sangue dos ratos e dos hamsters estudados. Sendo que as análises evidenciaram alguns íons, mas a interpretação não pode ser realizada, uma vez que a baixa qualidade dos espectros não permitiu a dedução da sequência.

MARQUES et al. (2015b) identificaram algumas sequências a partir de hidrolisado do feijão caupi, que possuíam como possível atividade biológica a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), dentre outras. As sequências identificadas nesta pesquisa foram procuradas no sangue dos animais estudados. Entretanto esta análise também não revelou similaridades. Cabe ressaltar que a metodologia de hidrólise empregada neste trabalho citado possui diferenças em relação a empregada no trabalho atual.

Ademais, não foram verificadas similaridades entre os fragmentos encontrados em cada um dos três experimentos conduzidos.

Os resultados do trabalho atual não evidenciaram efeito positivo da proteína do feijão caupi quanto ao metabolismo do colesterol. Porém, trabalhos anteriores mostraram ação positiva de peptídeos provenientes dessa matéria prima em indicadores de redução do colesterol.

A presença de peptídeos bioativos pode contribuir para aumentar a qualidade da proteína alimentar e adicionar "funcionalidade" a alimentos consumidos diariamente, mas, de qualquer forma, o feijão caupi é considerado um alimento rico em nutrientes e outros compostos favoráveis ao adequado funcionamento do organismo, como as fibras, que trazem benefícios à saúde. Sendo assim recomenda-se consumi-lo como parte de uma alimentação saudável, variada e equilibrada.

7. CONCLUSÕES

Foram encontrados fragmentos correspondentes a possíveis peptídeos identificados a partir da hidrólise proteica do feijão caupi, ou a partir do plasma dos animais estudados. Entretanto não foram verificados fragmentos similares entre os experimentos. Além disso, os mesmos não foram encontrados como sequências previamente identificadas para o feijão caupi a partir de banco de dados.

Apesar de pesquisas anteriores a este trabalho terem evidenciado a capacidade do isolado proteico do feijão caupi em inibir a atividade da HMGCR, a solubilização micelar ou melhorar o perfil de lipídeos plasmáticos, no trabalho atual esta matéria prima não mostrou atuação positiva quanto ao metabolismo do colesterol de hamsters nas condições experimentais utilizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. **Official methods of analysis of the Association Chemistry**. 18. Gaithersburg: 2010.
- ANDERSON, J. W.; JOHNSTONE, B. M.; COOK-NEWELL, M. E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipid. **N. Engl. J. Med.**, v. 33, p. 276-82, 1995.
- ARAÚJO, D. V.; TAVARES, L. R.; VERÍSSIMO, R.; FERRAZ, M. B.; MESQUITA, E. T. Custo da insuficiência cardíaca no Sistema Único de Saúde. **Arq Bras Cardiol**, v. 84, n. 5, p. 422-7, 2005.
- BLIGH E.G, DYER W.J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. **Can J Biochem Physiol.** v. 37, n.8, p. 911-7, 1959.
- BOUZERZOUR, K.; MORGAN, F.; CUINET, I.; BONHOMME, C.; JARDIN, J.; LE HUËROU-LURON, I.; DUPONT, D. In vivo digestion of infant formula in piglets: protein digestion kinetics and release of bioactive peptides. **British Journal of Nutrition**, n. 12, p. 2105-14. 2012.
- BRAVO, E.; CANTAFORA, A.; ORFU, G.; Why prefer the Golden Syrian hamster to the Wistar rat in experimental studies on plasm lipoprotein metabolism? **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 107, n.2, p. 347-55, 1994.
- BRUNHAM, L. R.; KRUIT, J. K.; IQBAL, J.; FIEVET, C.; TIMMINS, J. M.; PAPE, T. D.; COBURN, B. A.; BISSADA, N.; STAELS, B.; GROEN, A. K.; HUSSAIN, M. M.; PARKS, J. S.; KUIPERS, F.; HAYDEN, M. R. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis *in vivo*. **J Clin Invest.**, n. 116, p. 1052-62, 2006.
- CALKIN, A.C.; TONTONOZ, P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 13, n. 4, p. 213-24. 2012.
- CASTER, W. O.; ARMSTRONG, W. D. Pair feeding as a control procedure in metabolic studies of the x-irradiated rat. **The Journal of Nutrition**, v. 59, n. 1, p. 57-65, 1956.
- CASTRO-TORRES, I. G.; O-ARCINIEGAB, M. D.; BRAVO-DUARTEC, G. A.; GALLEGOS-ESTUDILLOD, J.; DOMÍNGUEZ-ORTÍZD, M. Á.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. Intestinal and hepatic Niemann–Pick C1L1 proteins: Future therapeutic targets for cholesterol gallstones disease? **Eur J Pharmacol.**, v. 728C, p. 77-81. 2014.
- CHANG, C. W.; HSU, Y. J.; CHEN, Y. M.; HUANG, W. C.; HUANG, C. C.; HSU, M. C. Effects of combined extract of cocoa, coffee, green tea and garcinia on lipid profiles, glycaemic markers and inflammatory responses in hamsters. **BMC Complement Altern Med.**, v. 15, p. 269, 2015.
- CHAPMAN, S. E, HOSTUTLER, R. A. A laboratory diagnostic approach to hepatobiliary disease in small animals. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v. 43, p. 1209–25, 2013.
- CONG, R.; JIA, Y; LI, R; NI, Y; YANG, X; SUN, Q; PARVIZI, N; ZHAO, R. Maternal low-protein diet causes epigenetic deregulation of HMGCR and CYP7 α 1 in the liver of weaning piglets. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 12, p. 1647-54. 2012.
- CHO, S. J.; JULLERAT, M. A.; LEE, C. H. Identification of LDL-Receptor transcription stimulating peptides from soybean hydrolysate in human hepatocytes. **J. Agric. Food Chem.** v. 56, p. 4372–6. 2008.

- CSALLANY, A. S.; KINDOM, S. E.; ADDIS, P. B.; LEE, J. HPLC method for quantification of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. **Journal of Food Lipids**, v. 24, n. 7, p. 645-51, 1989.
- DANIELS, T. F; KILLINGER, K. M.; MICHAL, J. J.; WRIGHT, R. W. JR.; JIANG, Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis, and cardiac health. **Int. J Biol Sci.**, v. 5, p. 474-88, 2009.
- DEAN, J. R., MA, R. Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: A critical review. **Chemosphere**, v. 68, p. 1399-407. 2007.
- DEWELL, A.; HOLLENBECK, P. L. W.; HOLLENBECK, C. B. Critical review: a critical evaluation of the role soy protein and isoflavone supplementation in the control of plasma cholesterol concentrations. **J. Clin. Endocrinol Metab**, v. 65, p. 1281-9, 2006.
- DIAS, J. M. **Efeito de duas variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris*) no metabolismo lipídico de hamsters**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública, 2012.
- DORFMAN, S. E.; WANG, S.; VEGA-LÓPEZ, S.; JAUHAINEM, M.; LICHTENSTEIN, A. H. Dietary fatty acids and cholesterol differentially modulate HDL cholesterol metabolism in Golden Syrian hamsters. **The Journal of Nutrition**, v.135, n.3, p. 492-8, 2005.
- EMBRAPA. Unidade de execução de âmbito estadual de Rio Branco. **Cultura do caupi no estado do Acre**.: Folder 1987.
- FALADE, K. O.; KOLAWOLE, T. A. Effect of irradiation dose on physical, functional and pasting properties of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) cultivars. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n. 2, p. 47–159, 2013.
- FERNANDEZ, M. L.; WEST, K. L. Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. **J. Nutr.**, v. 135, n. 9, p. 2075-8. 2005.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, p. 751–60. 2009.
- FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. **World J Gastroenterol.**, v. 20, n. 7, p. 1746-55, 2014.
- FONTANARI, G. G; BATISTUTI, J. P.; CRUZ, R. J.; SALDIVA, P. H. N.; ARÊAS, J. A. G. Cholesterol-lowering effect of whole lupin (*Lupinus albus*) seed and its protein isolate. **Food Chemistry**. p.1521-6, 2012.
- FREIRE FILHO, F. R. **Características botânicas e agrônômicas de cultivares de feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. (EMBRAPA-UEPAE de Teresina. Boletim de Pesquisa, 4). Teresina. 1981. 45 p.
- FROTA, K. M. G. **Efeito do feijão caupi e da proteína isolada no metabolismo lipídico em hamsters hipercolesterolemizados**. 2007. 136 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana Aplicada). Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- FROTA, K. M. G; MENDONÇA, S.; SALDIVA, P. H.; CRUZ, R. J.; ARÊAS, J. A. Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. 235-40, 2008.

FROTA, K. M. G. **Efeito da proteína isolada de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) nos marcadores de risco para doença cardiovascular em pacientes hipercolesterolêmicos.** 2011. 129 p. Tese (Doutorado em Nutrição em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo, São Paulo.

FURUTANI, J.; SEGAWA, H.; ARANAMI, F.; KUWAHARA, S.; SUGANO, M.; BANNAI, K.; YAMATO, H.; ITO, M.; MIYAMOTO, K. Dietary Inorganic Phosphorus Regulates the Intestinal Peptide Transporter PepT1. **J Ren Nutr.**, v. 23, n. 2, p. e11-20, 2013.

GENVIGIR, F. D. V.; RODRIGUES, A. C.; CERDA, A.; ARAZI, S. S.; WILLRICH, M. A.; OLIVEIRA, R.; HIRATA, M. H.; DOREA, E. L.; BERNIK, M. M.; CURI, R.; HIRATA, R. D. Effects of lipid-lowering drugs on reverse cholesterol transport gene expressions in peripheral blood mononuclear and HepG2 cells. **Pharmacogenomics**, v. 11, n. 9, p. 1235-46, 2010.

GILBERT, E. R.; WONG, E. A.; WEBB, K. E. J. Board-invited review: peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. **J Anim Sci.**, v. 86, n. 9, p. 2135-55. 2008.

GOEDEKE, L.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. Regulation of cholesterol homeostasis. **Cell Mol Life Sci.**, v. 69, n. 6, p. 915-30, 2012.

GROEN, A. K.; BLOKS, V. W.; VERKADE, H.; KUIPERS, F. Cross-talk between liver and intestine in control of cholesterol and energy homeostasis. **Molecular Aspects of Medicine**, in press, 2014. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299714000144#>>. Acesso em: 07/02/2014.

HALLIKAINEN M.; HALONEN, J.; KONTTINEN, J.; LINDHOLM, H.; SIMONEN, P.; NISSINEN, M. J.; GYLLING, H. Diet and cardiovascular health in asymptomatic normo- and mildly-to-moderately hypercholesterolemic participants - baseline data from the BLOOD FLOW intervention study. **Nutr Metab (Lond)**, v. 10, n. 1, p. 62. 2013.

HARTAM, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 475, n. 22, p. 475-6. 1992.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. Colesterol e metabolismo dos esteroides. In: _____. **Bioquímica ilustrada**. 5ª ed. Porto Alegre : Artmed. 2012. p. 219-44.

HORTON, J. D.; CUTHBERT, J. A.; SPADY, D. K. Dietary fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein (LDL), transport by altering LDL receptor protein and mRNA levels. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 2, p. 743-9, 1993.

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

HSIEH, Y. L.; YEH, Y. H.; LEE, Y. T.; HSIEH, C. H. Ameliorative effect of *Pracparatum mungo* extract on high cholesterol diets in hamsters. **Food Funct.**, v. 5, n. 1, p. 149-57, 2014.

HSU, S.; TON, V. K.; DOMINIQUE ASHEN, M.; MARTIN, S. S.; GLUCKMAN, T. J.; KOHLI, P.; SISSON, S. D.; BLUMENTHAL, R. S.; BLAHA, M. J. A clinician's guide to the ABCs of cardiovascular disease prevention: the Johns Hopkins Ciccarone Center for the Prevention of Heart Disease and American College of Cardiology CardioSource Approach to the Million Hearts Initiative. **Clin Cardiol.**, v. 36, n. 7, p. 383-93. 2013.

- HUANG, T.-W.; CHANG, C.-L.; KAO, E.-S.; LIN, J.-H. Effect of Hibiscus sabdariffa extract on high fat diet-induced obesity and liver damage in hamsters. **Food Nutr Res.**, v. 59, 2015.
- HUI, D. Y.; LABONTE, E. D.; HOWLES, P. N. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. III. Intestinal transporters and cholesterol absorption. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 294, p. G839-43, 2008.
- HUR, S. J.; LIM, B. O.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, J. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1-12. 2011.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA, IBGE. Sistema IBGE de recuperação automática – **SIDRA: Banco de dados agregados**. 2002.
- JIA, L.; BETTERS, J. L.; YU, L. Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) Protein in intestinal and hepatic cholesterol transport. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 73, p. 239-59, 2011.
- KABEL, A. M.; ABD-ELMAABOUD, M. A.; ALBARRAQ, A. A. Ameliorative potential of omega 3 fatty acids and HMG-CoA reductase inhibitors on experimentally-induced non-alcoholic steatohepatitis. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. 2015.
- KATSANIDS, E.; ADDIS, P. B. Novel HPLC analysis of tocopherols, tocotrienols and cholesterol in tissue. **Free Rad Biol Med.**, v. 27, p. 1137-40. 1999.
- KIM J. et al. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. **Exp Mol Med.**, v. 1, n. 48, p. 224, 2016.
- KOLY; S. F. et al. Analysis of aceclofenac and bovine serum albumin interaction using fluorescence quenching method for predictive, preventive, and personalized medicine. **EPMA J.**, v. 6, p. 24, 2015.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the heat of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-5. 1970.
- LAM, C. K.; ZHANG, Z.; YU, H.; TSANG, S. Y.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Y. Apple polyphenols inhibit plasma CETP activity and reduce the ratio of non-HDL to HDL cholesterol. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 52, p. 950-8. 2008.
- LI, X.-Y. et al. Effect of Berberine on promoting the excretion of cholesterol in high-fat diet-induced hyperlipidemic hamsters. **J Transl Med.**, v. 13, p. 278, 2015.
- LIASET, B.; MADSEN, L.; HAO, Q.; CRIALES, G.; MELLGREN, G.; MARSCHALL, H. U.; HALLENBORG, P.; ESPE, M.; FRØYLAND, L.; KRISTIANSEN, K. Fish protein hydrolysate elevates plasma bile acids and reduces visceral adipose tissue mass in rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, p. 254-62. 2009.
- LIU, X.; ZHANG, M.; ZHANG, C.; LIU, C. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory, antihypertensive and antihyperlipidaemic activities of protein hydrolysates from *Rhopilema esculentum*. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2134-40. 2012.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)}. **Method. Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

LOCK, A. L.; HORNE, C. A. M.; BAUMAN, D. E.; SALTER, A. M. Butter naturally enriched in conjugated linoleic acid and vaccenic acid alters tissue fatty acids and improves the plasma lipoprotein profile cholesterol-fed hamsters. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 8, p. 1934-9, 2005.

LOTEMBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, p. 595-607, 2009.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-75, 1951.

MA, K.; HU, Y.; SMITH, D. E. Peptide transporter 1 is responsible for intestinal uptake of the dipeptide glycylsarcosine: studies in everted jejunal rings from wild-type and pept1 null mice. **J Pharm Sci**., v. 100, n. 2, p. 767-74. 2011a.

MA, K. Y.; YANG, N.; JIAO, R.; PENG, C.; GUAN, L.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Y. Dietary calcium decreases plasma cholesterol by down-regulation of intestinal Niemann–Pick C1 like 1 and microsomal triacylglycerol transport protein and up-regulation of CYP7A1 and ABCG 5/8 in hamsters. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 55, p. 247-58. 2011b.

MADUREIRA, A. R.; TAVARES, T.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 437-55. 2010.

MAIA, F. M. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; MATOS, M. R. T.; MOREIRA, R. A.; VASCONCELOS, I. M. Proximate composition, amino acid content and haemagglutinating and trypsin-inhibiting activities of some Brazilian *Vigna unguiculata* (L) Walp cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 453-8, 2000.

MALAGUTI, M. et al. Bioactive peptides in cereals and legumes: agronomical, biochemical and clinical aspects. **Int J Mol Sci.**, v. 15, n.11, p. 21120-35, 2014.

MARMER, W. N.; MAXWELL, R. J. Dry column method for the quantitative extraction and simultaneous class separation of lipids from muscle tissue. **Lipids**, v. 5, p. 365-71. 1981.

MARQUES, M. R. **Ação hipocolesterolêmica de hidrolisados de feijões caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp)**. Dissertação (Mestrado em Nutrição em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo, São Paulo.

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. 43-8, 2015.

MARQUES, M. R.; SOARES-FREITAS, R. M.; Carlos, A. C. C.; Siguemoto, É. S.; FONTANARI, G. G.; ARÊAS, J. A. G. Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilisation into micelles. **Food Chemistry**, v. 168, p. 288-93, 2015.

MARZE, S. Bioaccessibility of nutrients and micronutrients from dispersed food systems: impact of the multiscale bulk and interfacial structures. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 53, n. 1, 2013.

MARZE, S. A coarse-grained simulation to study the digestion and bioaccessibility of lipophilic nutrients and micronutrients in emulsion. **Food Funct.**, v. 5, p. 129-39. 2014.

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food Funct.**, v. 5, p. 1113-24, 2014.

MOUSINHO, F. E. P. **Viabilidade econômica do feijão caupi no Estado do Piauí**. 2005. Tese (Doutorado em Irrigação e Drenagem)-Escola Superior de Agricultura" Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MOREIRA, M. B. et al. investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Quim. Nova**, v. 38, n. 2, p. 227-232, 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of laboratory animal**. 4th Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition., 1995. 192 p.

NESS, G. C. Physiological feedback regulation of cholesterol biosynthesis: Role of translational control of hepatic HMG-CoA reductase and possible involvement of oxysterols. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 5, p. 667-73, 2015.

NEWSTEAD, S. Towards a structural understanding of drug and peptide transport within the proton-dependent oligopeptide transporter (POT) family. **Biochem. Soc. Trans.** v. 39, p. 1353-8. 2011.

NIELSEN, S. S. et al. Comparative digestibility of legume storage proteins. **J. Agric. Food Chem.**, v. 36, n. 5, p. 896–902, 1988.

NISTOR, A.; BULLA, A.; FILIP, D.A.; RADU, A.; The hyperlipidemic hamsters as a model of experimental atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 68, n.1-2, p. 159-63, 1987.

NUGDALLAH, G. A; EL TINAY, A. H. Effect of cooking on cowpea protein fractions. **Plant Foods Hum Nutr.**, v. 51, n. 3, p. 277-82, 1997.

O'KEEFFE, M. B; FITZGERALD, R. J. Identification of short peptide sequences in complex milk protein hydrolysates. **Food Chem.**, v. 184, p. 140-6, 2015.

OLFERT, E.; CROSS, B. M.; MCWILLIAM, A. A. **Guide to the care and use of experimental animal**. 2 ed., v. 1, Canadian Council, 1993.

OLIVEIRA, T. V.; MANIERO, F.; SANTOS, M. H. H., M.D.; BYDŁOWSKI, S. P.; MARANHÃO, R. C. Impact of high cholesterol intake on tissue cholesterol content and lipid transfers to high-density lipoprotein. **Nutrition**, v. 27, n. 6, p.713-8, 2011.

PARADA, J.; AGUILERA, J. M. food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. R21-R32, 2007.

PECOCHE, C. B. G. Realidades que instruem o espírito. In: _____. **Introdução ao conhecimento logosófico**. 3 ed. São Paulo : Editora Logosófica. 2011. p. 121.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; TAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 A rodent diet. **Journal Nutrition**, v.123, p.1939-51, 1993.

RIBEIRO, R. A.; MELLO, R. G. B.; MELCHIOR, R.; DILL, J. C.; HOHMANN, C. B.; LUCCHESI, A. M.; STEIN, R. Custo anual do manejo da cardiopatia isquêmica crônica no Brasil: perspectiva pública e privada. **Arq Bras Cardiol**, v. 85, n. 1, p. 3-8, 2005.

- ROSA, R. D. S.; SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; SOUZA, M. D. F. M. D.; LIMA, A. K. D.; MOURA, L. D. Internações por diabetes mellitus como diagnóstico principal na rede pública do Brasil, 1999-2001. **Rev Bras Epidemiol**, v. 10, n. 4, p. 465-78, 2007.
- RUTHERFURD-MARKWICK, K. J. Food proteins as a source of bioactive peptides with diverse functions. **Br J Nutr**, v. 108, Suppl 2, p. S149-57, 2012.
- SAAVEDRA, L.; HEBERT, E. M.; MINAHK, C.; FERRANTI, P. An overview of “omic” analytical methods applied in bioactive peptide studies. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 925-34. 2013.
- SALGADO, S. M.; GUERRA, N. B.; ANDRADE, S. A.; C. LIVERA, A.V.S. Caracterização físico-química do grânulo do amido do feijão caupi. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 3, p. 525-30, 2005.
- SATO, R. Functions of cholesterol metabolites. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 61, Suppl S151-3, 2015.
- SEGURA-CAMPOS, M.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D.; HERNANDEZ-ESCALANTE, V. M. Bioavailability of bioactive peptides. **Food Reviews International**, v. 27, p. 213–26. 2011.
- SINGH, V. et al. Curcuma oil ameliorates hyperlipidaemia and associated deleterious effects in golden Syrian hamsters. v. 110, n. 3, p. 437-46, 2013.
- SINIMBU, F. Embrapa Meio Norte. **O feijão-caupi como alternativa sustentável em sistemas produtivos**. Reportagem de 31/07/2012. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2012/julho/5a-semana/o-feijao-caupi-como-alternativa-sustentavel-em-sistemas-produtivos/?searchterm=feij%C3%A3o%20caupi>).
- SPANIER, B. Transcriptional and functional regulation of the intestinal peptide transporter PEPT1. **J Physiol.**, p 871-9. 2014.
- TERPSTRA, A. H. M.; LAPRE, J. A.; VRIES, H. T.; BEYNEN, A. C. Dietary pectin with high viscosity lowers plasma cholesteryl ester transfer protein activity in hamsters. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 11, p. 1944-9, 1998.
- TIMMINS, J. M.; LEE, J. Y.; BOUDYGUINA, E.; KLUCKMAN, K.D.; BRUNHAM, L.R.; MULYA, A.; GEBRE, A.K.; COUTINHO, J.M.; COLVIN, P.L.; SMITH, T.L.; HAYDEN, M.R.; MAEDA, N.; PARKS, J. S. Targeted inactivation of hepatic abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoa-i. **J Clin Invest.**, n. 115, p. 1333-42, 2005.
- UZZAN, A. Vegetable protein products from seeds: technology and uses in the food industry. In: HUDSON, B. J. (Ed). **Development in food proteins**. New York : Elsevier Applied Science, 1988, p. 73-118.
- VAN DER VELDE, A. E.; BRUFAU, G.; GROEN, A. K. Transintestinal cholesterol efflux. **Current Opinion in Lipidology**, v. 21, n. 3, p. 167-71, 2010.
- VAZ, L. C. M. A. **Efeito da ingestão de proteína de amaranto no metabolismo do colesterol em ratos**. São Paulo, 2010. Dissertação (Mestrado em Nutrição em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo, São Paulo.

VAN DER MEER, R.; VRIES, H.; GLATZ, F. C. T butanol extraction of faeces: a rapid procedure for enzymic determination of faecal bile acids. In: BEYBEN, A. C.; GEELEB, M. J. H.; KATAN, M. B.; SCHOYTEN, J. A. **Cholesterol metabolism in health and disease: studies in the Netherlands**. Wageningen: Ponsen & Looijen, p. 113-19, 1985.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, 2002.

WANG, D. Q. H. Regulation of intestinal cholesterol absorption. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 69, p. 221-48. 2007.

WANG, S.; SMITH, J. D. ABCA1 and nascent HDL biogenesis. **Biofactors**, V. 40, N. 6, P. 547-54, 2014.

WEGGEMAINS, R. M.; TRAUTWEIN, E. A. Relation between soy associated isoflavones and LDL and HDL cholesterol concentrations in humans: a meta-analysis. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 57, p. 940-6, 2003.

WU, N. et al. Activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase during high fat diet feeding. **Biochim Biophys Acta**. v. 1832(10):1560-8. 2013.

YU, X. H. et al. ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. **Clin Chim Acta**. 20;428, p. 82-8, 2014.

ZELCER, N.; HONG, C.; BOYADJIAN, R.; TONTONOZ, P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol- dependent ubiquitination of the LDL receptor. **Science**, v. 325, p. 100-4, 2009.

ZHANG Z; WANG, H.; JIAO, R.; PENG, C.; WONG, Y. M.; YEUNG, V. S.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Y. Choosing hamsters but not rats as a model for studying plasma cholesterol-lowering activity of functional foods. **Mol Nutr Food Reser.**, v. 53, p. 921-30, 2009.

CURRÍCULOS LATTES

04/02/2017

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Bianka Caliman Salvador)



English

Imprimir
currículo

Dados gerais Formação Atuação Projetos Produções Eventos +



Bianka Caliman Salvador

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/4793677258451604>

Última atualização do currículo em 14/01/2017

Nutricionista pela Universidade Federal de Viçosa (2007) e Mestre em Ciência da Nutrição por esta mesma Universidade (2009). Atualmente é doutoranda no Curso de Pós Graduação de Nutrição em Saúde Pública, da Faculdade de Saúde Pública da USP. Tem atuado principalmente quanto aos temas: análises físico-químicas de alimentos, hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos, metabolismo do colesterol e fatores de risco cardiovascular. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome

Bianka Caliman Salvador

Nome em citações bibliográficas

SALVADOR, Bianka Caliman

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
Rua Dr Arnaldo, 715, Departamento de Nutrição
Cerqueira César
01246904 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30617765

Formação acadêmica/titulação

2013

Doutorado em andamento em Nutrição em Saúde Pública.
Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP/USP, Brasil.
Título: Biodisponibilidade de peptídeos do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) e sua relação com o metabolismo do colesterol.
Orientador: José Alfredo Gomes Arêas.

2007 - 2009

Mestrado em Ciência da Nutrição (Conceito CAPES 5).
Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil.
Título: Gestação, parto e nascimento e sua relação com marcadores de risco para síndrome metabólica em adolescentes de 10 a 13 anos, Viçosa-MG. Ano de Obtenção: 2009.
Orientador: Sílvia Eloiza Priore.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
Palavras-chave: adolescentes; estado nutricional; hipótese fetal.
Grande área: Ciências da Saúde

2002 - 2007

Graduação em Nutrição.
Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil.

Formação Complementar

2013 - 2014

Inglês. (Carga horária: 60h).
Universia Brasil S.A., UNIVERSIA, Brasil.

2013 - 2013

Introdução ao uso do software Stata. (Carga horária: 30h).
Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP/USP, Brasil.



José Alfredo Gomes Arães

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1B - Cx.EL - Ciência e Tecnologia de Alimentos

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/088733040361021>

Última atualização do currículo em 27/11/2018

Graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade de São Paulo (1973), Mestrado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (1979), Doutorado em Food Science, University of Nottingham, Inglaterra (1982), Pós-doutorado junto ao Biomembrane Unit, Dep. of Biochemistry, University of Oxford, Inglaterra (1990-1992), Vice-presidente da SBCTA (2004-2005), Coordenador do Programa de Pós-graduação em Saúde Pública da FSP/USP (2001-2006), Coordenador da área de Alimentos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (2001-2006), Membro do Comitê de Saúde Coletiva da CAPES (2004-2006). Atualmente Professor Titular da Universidade de São Paulo junto ao Dep. de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública. Atua na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Nutrição e Saúde Pública, Propriedades Funcionais de Alimentos, Biofísica de Alimentos, e Alimentos Funcionais. Temas principais de pesquisa: alimentos funcionais, alimentos e Saúde, peptídeos bioativos, metabolismo do colesterol, alimentos não convencionais, alimentos especiais, intervenções nutricionais, processamento de alimentos e valor nutritivo, emulsões alimentícias, ressonância magnética nuclear aplicada a alimentos, extrusão. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome

José Alfredo Gomes Arães

Nome em citações bibliográficas

ARÃES, J. A. G., ARÃES, J. A. G., ARÃES, J. A. G., ARÃES, José A. G., ARÃES, José A. G., ARÃES, JOSÉ ALFREDO GOMES, ARÃES, J. A. G., ARÃES, JOSÉ ALFREDO GOMES, ARÃES, JOSÉ ALFREDO GOMES

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição,
Av. Dr. Arnaldo, 713
Cesquefia César
01246-900 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 305127058
Fax: (11) 30517703
URL de Homepage: <http://www.nutricao.fsp.usp.br/funcionais>

Formação acadêmica/titulação

1982 - 1982

Doutorado em Food Science,
University of Nottingham, NG7 2RD, Inglaterra.
Título: Influence of Lipid-protein Interactions on Characteristics of Extruded Cereal Protein, Ano de obtenção: 1982.
Orientador: Robert A. Lawrence.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
Palavras-chave: Food Protein; Extrusion of Protein; Recovery of Amino; Functional Properties; Novel Products; Protein Upgrade.
Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos / Especialidade: Química, Física, Físico-Química e Biologia dos Alim. e dos Nut. e Alimentos.
Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos / Especialidade: Propriedades Funcionais de Alimentos.
Setores de atividade: Nutrição e Alimentação; Produção Animal; Indústrias de Serviços Veterinários; Produtos e Processos Biotecnológicos.

1974 - 1979

Mestrado em Ciências dos Alimentos,
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Transformações do amido na banana verde (Musa acuminata L.): Papel de Fosforilase e Fosfatase, Ano de Obtenção: 1979.
Orientador: Franco Maria Lajolo.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
Palavras-chave: Amadurecimento; Amido; Banana; Fisiologia Pós-colheita.
Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos / Especialidade: Fisiologia Pós-Colheita.
Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Ciência de Alimentos.
Setores de atividade: Produção Vegetal.

1968 - 1973

Graduação em Farmácia e Bioquímica