

MARIANA JUSTE CONTIN GOMES

**AÇÃO DA FARINHA DE FEIJÃO CARIOCA (*Phaseolus vulgaris* L.) E SEU
HIDROLISADO PROTEICO NO METABOLISMO DE LIPÍDIOS E NA FUNÇÃO
ENDOTELIAL E INTESTINAL DE CAMUNDONGOS BALB-C ALIMENTADOS
COM DIETA ATEROGÊNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

G633a
2018
Gomes, Mariana Juste Contin, 1992-
Ação da farinha de feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) e seu hidrolisado proteico no metabolismo de lipídios e na função endotelial e intestinal de camundongos BALB-c alimentados com dieta aterogênica / Mariana Juste Contin Gomes. – Viçosa, MG, 2018.
xii, 49 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Hércia Stampini Duarte Martino.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 40-48.

1. Peptídeos. 2. Aterosclerose. 3. Farinha de feijão.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição.

II. Título.

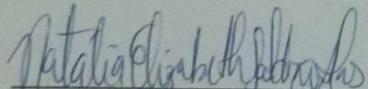
CDD 22. ed. 613.282

MARIANA JUSTE CONTIN GOMES

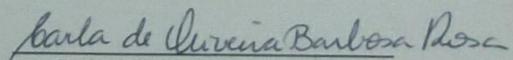
**AÇÃO DA FARINHA DE FEIJÃO CARIOCA (*Phaseolus vulgaris* L.) E SEU
HIDROLISADO PROTEICO NO METABOLISMO DE LIPÍDIOS E NA
FUNÇÃO ENDOTELIAL E INTESTINAL DE CAMUNDONGOS BALB-C
ALIMENTADOS COM DIETA ATEROGÊNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

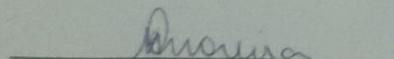
APROVADA: 23 de fevereiro de 2018.



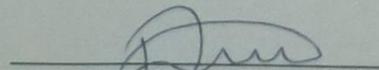
Natália Elizabeth Galdino Alves



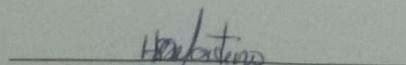
Carla de Oliveira Barbosa Rosa
(Coorientadora)



Maria Eliza de Castro Moreira
(Coorientadora)



Renata Celi Lopes Toledo
(Coorientadora)



Hércia Stampini Duarte Martino
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar a cada dia e por me proporcionar mais esta vitória.

Aos meus pais Everardo e Marli, por estarem sempre presentes na minha vida, me incentivando, apoiando e sendo compreensivos nos momentos de ausência.

Aos meus irmãos César e Beatriz, pela amizade, companheirismo e amor fraterno.

Ao meu noivo Daniel, pelo amor, apoio, dedicação e por buscar sempre a nossa felicidade.

À minha orientadora, professora Hércia, pelo grande ensinamento, por ser um exemplo de perseverança e nos fazer crescer diariamente na vida pessoal e profissional.

À minha amiga Sâmara Lima, que iniciou o projeto feijão *in vivo* e que foi uma grande parceira em todos os momentos, sobretudo os de dificuldade. Você tornou esta etapa mais leve, obrigada!

À Renata Celi, pela amizade e pelo apoio incondicional no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por todo o ensinamento e por estar presente na realização das análises.

À minha amiga Natália Galdino, por confiar a mim e à Sâmara a continuidade de seu trabalho e por nos ajudar nos momentos difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Experimental, pelo carinho e pelo trabalho em equipe, que é essencial para a qualidade dos nossos resultados.

A todos os meus colegas do Departamento de Nutrição e Saúde, por contribuírem, mesmo que indiretamente, para o término desta etapa.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições científicas. Vocês são essenciais para o nosso processo de crescimento e amadurecimento.

À Universidade Federal de Viçosa, agradeço por fazer parte desta valiosa jornada!

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos e à Embrapa pela parceria.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1 O feijão e o seu valor nutricional	3
3.2 Propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos de feijão carioca..	5
3.3 O metabolismo de lipoproteínas e o consumo de feijão.....	7
3.4 Métodos de indução de aterosclerose	9
3.5 Disfunção endotelial.....	10
3.6 Aterosclerose e a formação da placa de ateroma	13
3.7 Disbiose intestinal e o consumo de feijão	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Desenho do estudo	19
4.2 Matéria-prima.....	20
4.2.1 Amostras	20
4.2.2 Cocção, processamento dos feijões e obtenção do hidrolisado proteico.....	20
4.3 Ensaio biológico.....	21
4.3.1 Dietas experimentais	22
4.3.2 Eutanásia	23
4.4 Avaliação de indicadores de adiposidade, peso corporal e consumo alimentar de camundongos alimentados com dieta aterogênica	24
4.5 Avaliação do metabolismo lipídico e do índice aterogênico de camundongos alimentados com dieta aterogênica.....	24
4.6 Quantificação do marcador de regulação da pressão arterial de camundongos alimentados com dieta aterogênica.....	24
4.6.1 Quantificação de angiotensina II no soro	24
4.7 Avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios e da função endotelial no tecido cardíaco de camundongos alimentados com dieta aterogênica	25
4.8 Avaliação da saúde intestinal de camundongos alimentados com dieta aterogênica	26
4.8.1 Quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)	26

4.8.2 Análise histomorfométrica	27
4.9 Aspectos éticos.....	28
4.10 Análises estatísticas.....	28
5. RESULTADOS.....	28
5.1 Indicadores de adiposidade, peso corporal e consumo alimentar.....	28
5.2 Perfil de lipídios e índice aterogênico de camundongos alimentados com dieta aterogênica.....	30
5.3 Efeitos da farinha de feijão e de seu hidrolisado proteico na inflamação e na disfunção endotelial em camundongos alimentados com dieta aterogênica.....	31
5.4 Avaliação da saúde intestinal de camundongos alimentados com dieta aterogênica	33
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO GERAL	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXO 1	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PRODUÇÃO DE FEIJÃO E ÁREA DE COLHEITA NO BRASIL, PERÍODO DE 2010 – 2014.....	4
FIGURA 2. MECANISMOS REGULATÓRIOS DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO	13
FIGURA 3. MECANISMOS ENVOLVIDOS COM A FORMAÇÃO INICIAL DA PLACA ATEROSCLERÓTICA E O PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	15
FIGURA 4. PLACA ATEROSCLERÓTICA INSTÁVEL	16
FIGURA 5. MECANISMOS PELOS QUAIS A MICROBIOTA INTESTINAL PODE FAVORECER O DESENVOLVIMENTO DE ATEROSCLEROSE.....	18
FIGURA 6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	22
FIGURA 7. EVOLUÇÃO SEMANAL DO CONSUMO ALIMENTAR (A) E DO GANHO DE PESO (B), ÍNDICE DE LEE (C) E ACÚMULO DE GORDURA VISCERAL (D) DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA ATEROGÊNICA.....	29
FIGURA 8. PERFIL LIPÍDICO E ÍNDICE ATEROGÊNICO (IA) DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA ATEROGÊNICA.....	31
FIGURA 9. EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR DE NECROSE TUMORAL A (TNF-A) (A), DE ANGIOTENSINA II NO TECIDO CARDÍACO (B), A QUANTIFICAÇÃO DE ANGIOTENSINA II NO SORO (C), EXPRESSÃO DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL (E-NOS) (D), MOLÉCULA DE ADESÃO CELULAR-VASCULAR-1 (VCAM-1) (E) E METALOPROTEINASE DE MATRIZ 9 (MMP-9) (F) EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA ATEROGÊNICA.....	32
FIGURA 10. CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA NAS FEZES DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA ATEROGÊNICA.....	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DAS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	23
TABELA 2. HISTOMORFOMETRIA DO CÓLON E PESO DO CECO DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA ATEROGÊNICA.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Dieta aterogênica + farinha integral de feijão cozido
AG	Ácidos graxos
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AH	Dieta aterogênica + hidrolisado proteico
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
APO	Apolipoproteínas
AT 1	Receptor de angiotensina I
CA	Controle aterogênico
CCK	Colecistoquinina
CMC	Camada muscular circular
CML	Camada muscular longitudinal
CN	Controle normal
DPP-IV	Dipeptidyl peptide protease IV
ECA	Enzima conversora de angiotensina
e-NOS	Óxido nítrico sintase endotelial
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GLP-2	Peptídeo semelhante ao glucagon 2
HDL	lipoproteínas de alta densidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IA	Índice aterogênico
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IDL	Lipoproteínas de densidade intermediária
IL	Interleucinas
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LPL	Lipase lipoproteica
LPS	Lipopolissacarídeos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
NF-κB	Fator de transcrição nuclear <i>kappa</i> B
ON	Óxido nítrico

PTU	6-propil-2-thiouracil
QM	Quilomícrons
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TLR-4	Receptores tipo Toll-like 4
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

RESUMO

GOMES, Mariana Juste Contin, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Ação da farinha de feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) e seu hidrolisado proteico no metabolismo de lipídios e na função endotelial e intestinal de camundongos BALB-C alimentados com dieta aterogênica.** Orientadora: Hércia Stampini Duarte Martino. Coorientadores: Carla de Oliveira Barbosa Rosa, Maria Eliza de Castro Moreira e Renata Celi Lopes Toledo.

O feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa amplamente consumida no Brasil e no mundo, é rica em compostos fenólicos, proteínas, peptídeos bioativos e fibras alimentares e apresenta baixo custo, representando uma importante fonte de nutrientes para a população. O hidrolisado proteico de feijão é considerado fonte de peptídeos bioativos, com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-hipertensivas e de controle glicêmico. Em todo o mundo, as mortes por doenças crônicas como a aterosclerose são prevalentes e são agravadas pelo hábito alimentar inadequado. Dessa forma, torna-se importante investigar as propriedades do feijão e seus derivados proteicos na adiposidade, no metabolismo de lipídios e na função endotelial e intestinal. Este trabalho investigou o efeito modulatório da farinha integral de feijão carioca e de seu hidrolisado proteico na adiposidade, no metabolismo de lipídios e na função endotelial e intestinal de camundongos BALB/c alimentados com dieta aterogênica. O genótipo de feijão comum BRSMG Madrepérola foi utilizado para o ensaio biológico, composto por 48 animais adultos, os quais foram divididos em quatro grupos experimentais (n= 12): CN: controle normal (AIN-93M); CA: controle aterogênico; AF: dieta aterogênica + farinha de feijão cozido; AH: dieta aterogênica + hidrolisado proteico (700 mg/ Kg) e receberam os tratamentos durante nove semanas. Foram avaliados: indicadores de adiposidade, o peso corporal e o consumo alimentar, o perfil de lipídios e o índice aterogênico, além da expressão do fator de necrose tumoral α (TNF- α), angiotensina II (Ang II), óxido nítrico sintase endotelial (e-NOS), molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) no coração, a quantificação de Ang II no soro e a avaliação de preditores da saúde intestinal como a histomorfometria do cólon e a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Durante as três primeiras semanas, o grupo AH apresentou menor consumo alimentar ($p < 0,05$) comparado ao CA. Já o grupo AF apresentou o maior consumo ($p < 0,05$) na quinta, sexta e sétima semanas experimentais. Em função disso, observou-se menor ganho de peso ($p < 0,05$) no grupo AH em relação ao CA e ganho de peso no grupo AF semelhante ao CA ($p > 0,05$). A adiposidade no grupo AH reduziu comparado ao CA ($p < 0,05$), entretanto, o ganho de gordura visceral não diferiu dos

demais com dieta aterogênica ($p > 0,05$). Os grupos AF e AH apresentaram atividade hipolipidêmica reduzindo ($p < 0,05$) a concentração de triacilglicerídeos em relação aos controles (CN e CA) e de colesterol total em relação ao CA. Além disso, AF melhorou o metabolismo de lipídios reduzindo ($p < 0,05$) LDL e o índice aterogênico comparado ao CA. A inflamação foi reduzida ($p < 0,05$) nos grupos AF e AH em relação ao CA, além de AH reduzir a expressão e a concentração de Ang II e aumentar ($p < 0,05$) a expressão de e-NOS em relação aos controles, indicando manutenção da homeostase vascular mediante a dieta aterogênica. Como mediadores da saúde intestinal, o grupo AF apresentou maior ($p < 0,05$) peso do ceco comparado aos demais grupos, e a profundidade de criptas foi maior ($p < 0,05$) nos grupos que receberam dieta aterogênica em relação ao CN. Entretanto a concentração dos AGCC entre os grupos que receberam dieta aterogênica não se diferiu ($p > 0,05$). Portanto, a farinha de feijão melhorou o metabolismo de lipídios mediante a ingestão de dieta aterogênica, indicando o efeito do conteúdo de fenólicos e das fibras alimentares. O hidrolisado proteico de feijão foi capaz de reduzir as medidas biométricas e o consumo alimentar em função da sua composição rica em compostos fenólicos e peptídeos bioativos, além de efeito anti-inflamatório e vasodilatador, sugerindo potenciais benefícios na disfunção endotelial e na prevenção de doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

GOMES, Mariana Juste Contin, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Action of carioca bean flour (*Phaseolus vulgaris* L.) and its protein hydrolyzate in lipid metabolism and endothelial and intestinal function in BALB-C mice fed with atherogenic diet.** Adviser: Hércia Stampini Duarte Martino. Co-advisers: Carla de Oliveira Barbosa Rosa, Maria Eliza de Castro Moreira and Renata Celi Lopes Toledo.

The carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a widely consumed legume in Brazil and in the world, it is rich in phenolic compounds, proteins, bioactive peptides and dietary fiber, also it presents low cost, representing an important source of nutrients for the population. Bean protein hydrolyzate is considered a source of bioactive peptides with antioxidant, anti-inflammatory, antihypertensive and glycemic control properties. Across the world, deaths from chronic diseases such as atherosclerosis present a high prevalence and they are aggravated by inadequate eating habits. Thus, it is important to investigate the properties of these foods in the adiposity, lipid metabolism and endothelial and intestinal function. This study investigated the modulatory effect of carioca bean whole flour and its protein hydrolyzate on adiposity, lipid metabolism and endothelial and intestinal function in BALB/c mice fed atherogenic diet. The BRSMG Madrepérola common bean genotype was used for the biological assay, composed of 48 adult animals, which were divided into four experimental groups (n=12): CN: normal control (AIN-93M); CA: atherogenic control; AF: atherogenic diet + cooked bean flour; AH: atherogenic diet + protein hydrolyzate (700 mg/ Kg) and they were feed with these diets for nine weeks. Indicators of adiposity, body weight, food intake, lipid profile and the atherogenic index were analyzed. In addition, it was evaluated the gene expression of: tumor necrosis factor α (TNF- α), angiotensin II (Ang II), endothelial nitric oxide synthase (e-NOS), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in the cardiac tissue, and the quantification of Ang II in the serum. It was also evaluated the predictors of the intestinal health such as the colon histomorphometry and the concentration of short chain fatty acids (AGCC) in the feces. During the first three weeks, the AH group presented lower food intake ($p < 0,05$) compared to the CA group, whereas the AF group had the highest consumption ($p < 0,05$) in the fifth, sixth and seventh experimental weeks. As a result, we observed a lower weight gain ($p < 0,05$) of AH compared to the CA, and weight gain in the AF group similar to CA ($p > 0,05$). The adiposity in the AH group decreased ($p < 0,05$) compared to CA, however, the visceral fat gain did not differ from the others with atherogenic diet ($p > 0,05$). The AF and AH groups presented hypolipidemic activity,

reducing ($p < 0,05$) the concentration of triacylglycerides compared to the controls (CN and CA) and total cholesterol compared to the CA. In addition, AF improved lipid metabolism by reducing ($p < 0,05$) LDL and atherogenic index compared to the CA group. The inflammation decreased ($p < 0,05$) in the AF and AH groups compared to the CA, besides that the AH group reduced the gene expression and concentration of Ang II and increased ($p < 0,05$) the e-NOS expression compared to the controls, indicating maintenance of vascular homeostasis by the atherogenic diet. Regarding to the gut health, the AF group presented higher ($p < 0,05$) cecum weight compared to the other groups, and the crypt depth was higher ($p < 0,05$) in the groups that received the atherogenic diet compared to the CN. However, the AGCC concentration did not differ ($p > 0,05$) between the groups that received the atherogenic. Therefore, the bean meal improved the lipid metabolism through ingestion of atherogenic diet, indicating the effect of phenolic content and dietary fiber. Bean protein hydrolyzate was able to reduce biometric measurements and food consumption due to its composition rich in phenolic compounds and bioactive peptides, as well as an anti-inflammatory and vasodilatory effect, suggesting potential benefits in endothelial dysfunction and in the prevention of cardiovascular diseases.

1. INTRODUÇÃO

O excesso de gordura saturada, colesterol e açúcares na alimentação, bem como o elevado consumo de alimentos industrializados, ultraprocessados e o baixo consumo de fibra alimentar caracterizam o hábito inadequado, que interfere no metabolismo de lipídios e induz o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas, hipertensão arterial e obesidade (SHI et al., 2017). As doenças cardiometabólicas são responsáveis pela morte de cerca de 17,5 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2014), dentre elas, tem-se a aterosclerose, uma doença inflamatória crônica que acomete a camada íntima de artérias de médio e grande calibre com acúmulo de gordura e de colesterol, levando à formação de trombos e à obstrução da luz vascular (SBC, 2013). O hábito alimentar inadequado, a hipertensão e, ou o tabagismo estimulam a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), provocam lesões no endotélio vascular e levam ao processo aterogênico (WHO, 2011). As dietas aterogênicas são caracterizadas por conter quantidades elevadas de gordura saturada e trans, colesterol (principalmente LDL), sacarose e ácido cólico, sendo este último um composto naturalmente presente na bile, que quando suplementado na dieta contribui para maior absorção de gordura e colesterol e o seu aumento na circulação sistêmica contribui com o processo de oxidação da LDL (PELLIZZON, 2008).

A inflamação é um estado limitante para o desenvolvimento de lesões endoteliais, que caracterizam as primeiras manifestações fisiológicas da aterosclerose. Concomitantemente, ocorre a perda da homeostase vascular, onde se observa constrição dos vasos, liberação aumentada de citocinas pró-inflamatórias e pró-trombóticas, além do aumento de moléculas de adesão celular, oxidação de LDL e aumento de espécies reativas de oxigênio (HUSAIN et al., 2015). Nesse sentido, o hábito alimentar inadequado é um fator relevante para o desenvolvimento destas doenças, e o consumo regular de leguminosas tem mostrado efeitos benéficos na redução de processos inflamatórios e aumento da defesa antioxidante do organismo, contribuindo para a melhora do estado de saúde da população (MARVENTANO et al., 2017).

O feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa de baixo custo, amplamente consumida no Brasil e em outros países, principalmente da América do Sul, América Central e da África (CASTRO GUERREIRO et al., 2016). Devido a sua composição fonte de compostos fenólicos, minerais, fibras alimentares e proteínas, o estudo do feijão se intensificou nos últimos anos (DIAS et al., 2015; AI et al., 2016). A

farinha de feijão cozido possui compostos benéficos e apresentou em estudo *in vitro* propriedades anti-hiperlipidêmicas, anti-inflamatórias e anti-hipertensiva (ALVES et al 2016ab). As fibras solúveis e insolúveis e fitoquímicos como a catequina, o kaempferol (LIMA, 2017), os fitoesteróis e as saponinas (DOMINGUEZ-USCANGA; LOARCA-PIÑA; DE MEJIA, 2017) foram identificados na farinha de feijão carioca. Esses compostos atenuam danos ao DNA e impedem a oxidação de LDL colesterol causados pela dieta aterogênica (DE CAMARGO et al., 2014).

Os hidrolisados proteicos de feijão é fonte de peptídeos bioativos com propriedades de reduzir a inflamação e a aterogênese (ALVES et al., 2016ab). Estudo *in vitro* mostrou efeito anti-inflamatório e antioxidante promovido pelo peptídeo VELVGPK e efeitos importantes na inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) pelas sequências: LVTTTVDL; QTSTPLFS; VELVGPK e TRGVLV (ALVES et al., 2016b). A ação hipolipidêmica, antioxidante e inibidora da enzima *dipeptidyl peptide protease IV* (DPP-IV), que atua na regulação da fome e saciedade, também foram observados *in vitro* (TOLEDO et al., 2016; MOJICA et al., 2017). Em nosso grupo de pesquisa foi identificado elevado conteúdo de fenólicos totais no hidrolisado proteico de feijão carioca ($1.025,6 \pm 99,14 \mu\text{g EAG/g}$ de amostra) e na farinha de feijão ($140,0 \pm 5,87 \mu\text{g EAG/g}$), o que poderia contribuir com efeitos importantes na prevenção de doenças crônicas (LIMA, 2017).

Além da importância de se investigar estratégias de prevenção de doenças a partir dos efeitos da farinha de feijão e do seu hidrolisado proteico, ressalta-se a necessidade de se avaliar a combinação dos peptídeos bioativos, juntamente com as fibras alimentares do feijão na função intestinal. As fibras são nutrientes (JEW et al., (2015) que modulam a função intestinal, sofrem fermentação bacteriana no ceco e no cólon, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que são fundamentais na nutrição e manutenção dos enterócitos (FERKET, 2004), atuam no metabolismo de lipídios reduzindo o colesterol plasmático, a glicemia e o risco de desenvolvimento de câncer colorretal (KACZMARCZYK; MILLER; FREUND, 2012).

A atuação do feijão e de seu hidrolisado proteico na via regulatória da aterosclerose não está bem esclarecida. Apesar dos resultados positivos na modulação de marcadores inflamatórios e ateroscleróticos encontrados por estudos *in vitro*, o desenvolvimento de estudos *in vivo* é necessário para elucidar os efeitos destes tratamentos na prevenção do ganho de peso, na adiposidade, no metabolismo de lipídios e na via de disfunção endotelial, reduzindo o risco da aterogênese. A hipótese do

presente estudo baseia na premissa que a dieta aterogênica consumida por camundongos BALB/c durante nove semanas, induzirá alterações corporais e aumentará a oxidação de LDL, culminando em danos endoteliais. O consumo de farinha de feijão e de seu hidrolisado proteico reduzirá o ganho de peso e melhorará o metabolismo de lipídios, reduzindo a inflamação, o risco de alteração endotelial e regulará a função intestinal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito modulatório da farinha integral de feijão carioca e de seu hidrolisado proteico no metabolismo de lipídios e na função endotelial e intestinal de camundongos BALB/c alimentados com dieta aterogênica.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da ingestão de farinha integral de feijão e de seu hidrolisado proteico sobre indicadores de adiposidade, ganho de peso corporal e consumo alimentar de camundongos adultos alimentados com dieta aterogênica;
- Avaliar o efeito da ingestão de farinha integral de feijão e de seu hidrolisado proteico no metabolismo de lipídios e índice aterogênico de camundongos adultos alimentados com dieta aterogênica;
- Investigar o efeito da ingestão de farinha integral de feijão e de seu hidrolisado proteico na expressão de marcadores inflamatórios, de regulação da pressão arterial e da função endotelial em camundongos adultos alimentados com dieta aterogênica;
- Avaliar o efeito da ingestão de farinha integral de feijão e de seu hidrolisado proteico na saúde intestinal de camundongos adultos alimentados com dieta aterogênica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O feijão e o seu valor nutricional

O feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa amplamente cultivada e consumida em todo o mundo, principalmente em países da América do Sul, América Central e países da África (CASTRO GUERREIRO et al., 2016). No ranking

dos 20 países que mais produzem feijão no mundo, o Brasil ocupa o 3º lugar, com produção média de 3,2 milhões de toneladas por ano (FAO, 2017). Apesar da elevada produtividade, nos últimos anos observa-se grande variação na produção desta leguminosa, em decorrência principalmente de mudanças climáticas, como longas estações de seca ou chuvas intensas (Figura 1) (AGROLINK, 2013).

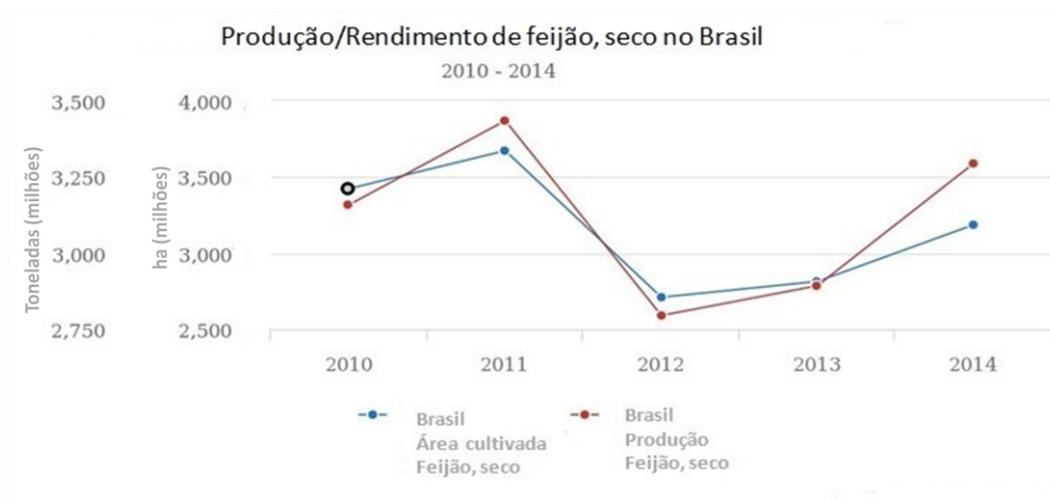


Figura 1. Produção de feijão e área de colheita no Brasil, período de 2010 – 2014 (Adaptado de FAO, 2017).

O consumo médio *per capita* de feijão no Brasil é de 182,9 g/dia. O consumo de outras preparações a base de feijão corresponde a 8,4 g/dia e a aquisição de outras leguminosas ainda se mantém baixo, cerca de 1,3 g/dia (POF, 2011). Nos últimos anos o consumo de feijão pela população brasileira passou por um decréscimo. A melhora da situação socioeconômica do país levou a mudanças nos hábitos alimentares, que resultaram na busca pela praticidade das preparações e por alimentos que demandam menor tempo de preparo. Este perfil alimentar está aliado ao consumo de produtos processados, ultraprocessados e ricos em aditivos químicos, que os tornam menos saudáveis (VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ et al., 2012).

A composição química dos feijões varia de acordo com a espécie, técnicas de cultivo e condições geográficas. O feijão comum apresenta em média 60 a 70 % de carboidratos, 15 a 30 % de proteína, 0,7 a 2 % de lipídios e 21 a 26 % de fibra alimentar total (MARTINO et al., 2012). Estudo recente mostrou o conteúdo de fibra alimentar total do feijão comum em torno de 26,7 % (DIAS et al., 2015) e o conteúdo proteico entre 18 a 21 % (DIAS et al., 2015; AI et al., 2016). As fibras solúveis e insolúveis, os fitoquímicos (catequina, kaempferol, fitoesteróis e saponinas) (LIMA, 2017; DOMINGUEZ-USCANGA; LOARCA-PIÑA; DE MEJIA, 2017) e os peptídeos

bioativos presentes no hidrolisado proteico de feijão regulam o metabolismo de lipídios, a inflamação, a pressão arterial (ALVES et al., 2016ab) e previnem a oxidação de LDL (DE CAMARGO et al., 2014).

Apesar do feijão fornecer um elevado conteúdo proteico, estas são incapazes de ser digeridas *in natura*. Além da estrutura rígida, os fitoquímicos com ação antinutricional dificultam o acesso de enzimas do trato gastrointestinal, sendo necessária a cocção desta leguminosa antes do consumo, alterando a estrutura dos grãos e facilitando a digestibilidade (NAKITTO; MUYONGA; NAKIMBUGWE, 2015; HAYAT et al., 2014).

Após o tratamento térmico, as proteínas do feijão se tornam mais hidrofílicas, facilitando a hidrólise enzimática *in vivo* e *in vitro*. A digestão enzimática *in vitro* tem sido utilizada para extrair peptídeos com potencial bioativo presentes nos feijões e têm proporcionado novos estudos que buscam desvendar propriedades biológicas benéficas para a saúde, bem como a redução de risco de doenças e agravos crônicos não transmissíveis (ALVES et al., 2016ab; LUNA-VITAL et al., 2015). Dessa forma, torna-se importante avaliar os benefícios do feijão e de seus componentes com propriedades funcionais, esclarecendo a importância do consumo desta leguminosa pela população.

3.2 Propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos de feijão carioca

O hidrolisado proteico de um alimento é o substrato resultante da digestão das proteínas que o compõem. A hidrólise dessas proteínas é feita naturalmente pelas enzimas do trato gastrointestinal de humanos e animais, mas pode ser realizada *in vitro*, por meio das enzimas como a pepsina, tripsina, quimiotripsina e pancreatina, que simulam a digestão gastrointestinal, liberando peptídeos bioativos (ALVES et al., 2016a; LUNA-VITAL et al., 2015).

Os peptídeos biologicamente ativos gerados em função da hidrólise enzimática podem variar de acordo com as enzimas utilizadas nesse processo (LUNA-VITAL et al., 2015). Lawers e Scharpé (1997) observaram que a digestão das proteínas utilizando simultaneamente as enzimas pepsina e pancreatina promove uma melhor extração de peptídeos bioativos, uma vez que apresenta ação sinérgica semelhante à do trato gastrointestinal.

Diversos estudos têm avaliado as propriedades dos peptídeos bioativos extraídos de feijão carioca na prevenção de doenças, na interação desses peptídeos com o sistema

antioxidante e o seu papel no tratamento de doenças crônicas como a aterosclerose, diabetes mellitus e hipertensão (MOJICA et al., 2016; LUNA-VITAL et al., 2015; ALVES et al., 2016a). Os peptídeos bioativos do feijão carioca podem modular a resposta insulínica do organismo inibindo a *dipeptidyl peptide protease IV* (DPP-IV). A DPP-IV é degradante do peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) que tem a função de regular a atividade de incretinas como a insulina e o glucagon retardando o esvaziamento gástrico (MOJICA et al., 2016). Uma vez inibida, a DPP-IV deixa de exercer o seu efeito sobre a GLP-1 e a resposta à fome se torna prolongada.

Foi demonstrado em estudos *in vitro* que os peptídeos bioativos do feijão carioca reduzem o acúmulo de gordura em adipócitos do tipo 3T3-L1. O tratamento com hidrolisado proteico resultou na inibição de 13 a 25 % do acúmulo de gordura nestas células, sugerindo uma interação com o metabolismo lipídico (TOLEDO et al., 2016). Alves et al. (2016ab) observaram em seu estudo *in vitro* com células THP-1 derivada de monócitos humanos, redução da inflamação e aumento da defesa antioxidante resultante do tratamento com hidrolisado proteico de feijão carioca. O mecanismo proposto foi relacionado com a redução de espécies reativas de oxigênio, minimizando a liberação de mediadores inflamatórios, o que nos leva a acreditar no potencial terapêutico dos peptídeos do feijão e buscar esclarecer os possíveis mecanismos de ação destes nas vias da aterogênese *in vivo*.

Além disso, sequências de peptídeos bioativos foram identificadas no hidrolisado proteico de feijão, capazes de atuar no sistema regulatório da pressão arterial, bloqueando a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), que impede a conversão de Angiotensina I em Angiotensina II, potente vasoconstritor vascular, responsável pela elevação da pressão arterial. Alves et al. (2016b) identificaram as sequências LVTTTVDL, QTSTPLFS, VELVGPK, TRGVLV nos peptídeos do hidrolisado proteico de feijão carioca que são inibidoras da ECA. Rui et al. (2013) também encontraram peptídeos com capacidade inibitória da ECA em hidrolisado proteico de feijão vermelho, evidenciando uma importante via regulatória da pressão arterial e da aterogênese, que pode ser modulada a fim de prevenir o desenvolvimento destas doenças.

Exercendo ação regulatória, o óxido nítrico no endotélio participa da homeostase vascular, com forte ação vasodilatadora. É sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (e-NOS) e exerce importante efeito regulador do fluxo sanguíneo coronariano (DIAS; NEGRÃO; KRIEGER, 2011), protege a camada endotelial da agregação

plaquetária e da adesão de leucócitos e impede a migração celular (células musculares lisas) na camada interna dos vasos (DE LA ROSA et al., 2010). Não foram encontrados estudos que avaliam a função dos peptídeos bioativos extraídos de feijão carioca na regulação da síntese de e-NOS, porém, já está claro a presença de peptídeos com atividade inibitória da ECA e o seu efeito cardiovascular, entretanto, os mecanismos que regulam a expressão de marcadores de vasodilatação endotelial advindos dos peptídeos do feijão ainda não são claros.

Estudos que avaliaram os efeitos da administração de hidrolisados proteicos *in vivo* testaram concentrações de 100 mg/kg (ONUH et al., 2015) a 600 mg/kg de peso corporal (LI et al., 2006; LI et al., 2007), entretanto foram utilizados modelos experimentais de hipertensão. Mojica et al. (2017) avaliou a bioatividade dos peptídeos de hidrolisado proteico de feijão em modelos experimentais de hiperglicemia utilizando a concentração de 200 mg/kg, entretanto não obteve os resultados desejados, sugerindo a necessidade de estudos que testem dosagens mais elevadas de hidrolisado proteico em animais normais recebendo dieta hiperlipídica, a fim de se avaliar os efeitos do mesmo na prevenção de doenças.

3.3 O metabolismo de lipoproteínas e o consumo de feijão

O fígado desempenha uma importante função na digestão e na captação de lipídios pelo trato gastrointestinal devido a sua função de síntese dos ácidos biliares. A bile apresenta propriedades emulsificantes, facilitando a digestão dos lipídios. Após o processo de solubilização pelos ácidos biliares e de digestão, os ácidos graxos (AG) são transportados no plasma ligados à albumina ou outras proteínas transportadoras até o local de atuação (LIMA; COUTO, 2006).

Os lipídios são transportados no plasma na forma de lipoproteínas de acordo com sua densidade, sendo classificadas em: quilomícrons (QM), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (EISENBERG; LEVY, 1975). As apolipoproteínas (Apo) são proteínas que compõem as lipoproteínas e conferem a função de formação das partículas de lipoproteínas, atuam como ligantes dos receptores de membrana e como cofatores das enzimas envolvidas no metabolismo de lipoproteínas (SBC, 2013).

O fígado reesterifica os lipídios e os secreta diretamente no sangue na forma de VLDL, partícula rica em triacilglicerídeos. A VLDL sofre a ação da lipase lipoproteica

(LPL) e seus remanescentes formados são chamados de IDL. Do total de IDL circulante, cerca de 50 % é removido da circulação pelo fígado, e o restante é convertido em LDL (JONES; KUBOW, 2003). As LDL são constituídas por um núcleo rico em colesterol esterificado e ao seu redor uma monocamada de fosfolipídios e colesterol. Essa lipoproteína é fonte de colesterol para a formação de membranas e síntese de hormônios esteroides, sendo sua principal função, transportar o colesterol do fígado para os tecidos. A regulação homeostática do colesterol é feita pela ativação ou inibição dos receptores de LDL de acordo com a demanda de colesterol pelo organismo (SBC, 2013). O transporte reverso do colesterol remove o excesso de colesterol dos tecidos periféricos e das lipoproteínas levando-o de volta ao fígado, processo mediado pela HDL. O colesterol é captado por receptores hepáticos específicos e excretado pela bile (MARANHÃO; FREITAS, 2014). Os roedores possuem o metabolismo de colesterol diferente do humano, eles apresentam baixos níveis da proteína de transporte de éster de colesterol e elevada concentração de proteína transportadora de fosfolipídios, fazendo com que a maior parte do colesterol seja transportado na fração HDL no plasma (TSUTSUMI; HAGI; INOUE, 2001), por isso as mudanças no perfil lipídico desses animais são mais difícil de serem observadas e a indução de obesidade e síndrome metabólica se tornam dificultadas.

Diversos estudos mostraram, tanto em humanos como em animais, que o consumo de feijão atua no metabolismo do colesterol e melhora o perfil de lipídios plasmático, exercendo efeito protetor de doenças crônicas (BAZZANO et al., 2011; ROSA et al., 1998; ZHU; JIANG; THOMPSON, 2012). Em estudo experimental *in vivo*, o consumo de feijão compondo de 30-60 % da dieta diminuiu o colesterol plasmático em 15-20 %, o LDL-c, os triacilglicerídeos e reduziu o ganho de peso corporal, indicando forte potencial desta leguminosa em atuar na regulação do metabolismo de lipídios (ZHU; JIANG; THOMPSON, 2012).

Além disso, o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) representa uma importante fonte de fitoquímicos com propriedades hipolipidêmicas e compostos bioativos específicos (ALVES et al., 2016a), além de elevado conteúdo de fibra alimentar solúvel (2,51 g/100 g) e insolúvel (15,38 g/100 g) (LIMA, 2017), que exercem efeito hipocolesterolêmico pela inibição da absorção de lipídios no intestino, ligação em ácidos biliares e consequente aumento da excreção de colesterol nas fezes. Os AGCC produzidos durante a fermentação das fibras do feijão, juntamente com fitohemaglutininas, regulam o apetite pela ativação de receptores hormonais no intestino, bloqueando a ação de

hormônios como a grelina (RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2015). A presença de inibidores de α -amilase e de fitohemaglutinina no feijão diminuem a absorção de carboidratos e estimulam a liberação de colecistoquinina (CCK), um hormônio gastrointestinal que regula a digestão de gordura e proteínas e está relacionado com a sensação de saciedade, indicando efeitos fisiológicos benéficos dos fitoquímicos, dos compostos bioativos e das fibras no perfil biométrico e no metabolismo de lipídios (SONG et al., 2016; FANTINI et al., 2009).

3.4 Métodos de indução de aterosclerose

A indução de lesões ateroscleróticas em roedores é muito utilizada em estudos *in vivo* que buscam avaliar os mecanismos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares ou avaliar métodos de tratamento das mesmas. Muito utilizado pela comunidade científica são os animais *knockout*, os quais são geneticamente modificados para não expressar algum gene específico, levando então à alteração do fenótipo dos animais (BENAVIDES; GUÉNET, 2003). Mutações para o desenvolvimento de obesidade é utilizado em estudos que visam avaliar o desenvolvimento de doenças crônicas e de síndrome metabólica. A mutação no gene *Lepr*, receptor de leptina, leva ao ganho rápido de peso, uma vez que a leptina é um hormônio responsável pelo controle do apetite e do peso corporal e vem se mostrando um bom exemplo para o desenvolvimento de síndrome metabólica e comorbidades decorrentes, como as doenças cardiovasculares, dentre elas a hipertensão arterial, disfunção do ventrículo, hipertrofia e fibrose, bem como o aumento do estresse oxidativo no tecido cardíaco e inflamação, alterações diretamente relacionadas com o desenvolvimento e progressão de aterosclerose (NORATTO et al., 2015; MURASE et al., 2012).

Outro tipo de mutação muito utilizada em animais para estudos de obesidade e doenças cardiovasculares é a deleção do gene da apolipoproteína E (ApoE). A ApoE está diretamente envolvida com o metabolismo do colesterol por ser constituinte dos quilomicrons e da lipoproteína de densidade intermediária (IDL), que é essencial para o catabolismo das lipoproteínas regulando sua concentração na corrente sanguínea. Animais *knockout* para ApoE desenvolvem hipercolesterolemia facilmente quando ingerem dieta *high fat*, observando aumento de colesterol total e LDL, redução de HDL e aumento da atividade pró-inflamatória e pró-aterogênica (BHAT et al., 2015; EBRAHIMIAN et al., 2015).

Os métodos supracitados, apesar de serem largamente utilizados em estudos *in vivo*, apresentam elevado custo, uma vez que os animais geneticamente modificados são mais caros que os convencionais. Sendo assim, outras formas de indução de hipercolesterolemia e obesidade podem ser utilizadas, como é o caso do tratamento com dieta *high fat* por um longo período (até a indução) (NATAL, et al., 2016) ou mesmo a utilização de drogas que atuam no sistema hormonal. Muito utilizado em estudos que visam a hipercolesterolemia e alteração cardiovascular é o composto 6-propil-2-thiouracil (PTU), um antagonista dos hormônios tireoidianos T3 e T4 e indutor de hipotireoidismo. O PTU desencadeia uma resposta fisiológica ao hipotireoidismo com diminuição do metabolismo, aumento de colesterol total, LDL colesterol e triacilglicerídios (LIOU et al., 2005). Estudos que utilizaram o PTU como indutor de hipotireoidismo e hipercolesterolemia têm mostrado efeitos positivos, com a diminuição dos hormônios tireoidianos e da atividade hepática em camundongos, evidenciando que este composto é promissor para o desenvolvimento de comorbidades precursoras de doenças cardiovasculares (PANDA; KAR, 2005; PANDA; KAR; PATIL, 2009).

3.5 Disfunção endotelial

A disfunção endotelial envolve diversos mecanismos extracelulares que culminam no dano ao endotélio vascular causado pela ação de radicais livres, podendo ser definida como uma disfunção dos mecanismos de sinalização celular e vascular mediado pela alteração dos processos de transferência de elétrons, envolvendo radicais livres. A disfunção endotelial é uma alteração maléfica que antecede o surgimento de diversas outras doenças, dentre elas a aterosclerose (BAHIA et al., 2004).

O endotélio é dotado de inúmeras funções, dentre elas a capacidade de regular a homeostase dos vasos por meio da modulação da expressão de mediadores de adesão celular, regulação do tônus vascular e da proliferação e migração de células musculares lisas, além da fagocitose de moléculas de LDL oxidada no meio intracelular (DAVIGNON; GANZ, 2004). A oxidação de LDL é um evento que antecede o desenvolvimento da aterosclerose e contribui para o surgimento da mesma. Precedido por um dano endotelial, moléculas de LDL são expostas à íons de metais de transição, enzimas e outros catalisadores podendo ser oxidada. Inicialmente, as moléculas de LDL oxidada ativam cascatas de sinalização inflamatória atraindo citocinas e quimiocinas e aumentando a concentração de citocinas pró-inflamatórias no espaço subendotelial (YOSHIDA; KISUGI, 2010). O acúmulo de LDL oxidada age como um imunógeno,

ativa o sistema de defesa, atrai células endoteliais de adesão e recruta monócitos para a região na tentativa de restabelecer a homeostase (KANG et al., 2015).

Outras moléculas interagem na parede endotelial desempenhando funções específicas que contribuem para o desenvolvimento da disfunção endotelial e seus agravantes, como é o caso das moléculas de adesão. Exercendo funções diretamente relacionadas com o dano ao endotélio, com a inflamação e com o estresse oxidativo, a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) apresentam sua expressão aumentada em meio à essas alterações e levam à maior migração de células do sistema imune para o endotélio, como os leucócitos, linfócitos e monócitos, que atuam localmente ativando o processo inflamatório e a formação da placa aterosclerótica (figura 2) (STEYERS; MILLER, 2014).

Um dos reguladores chave no processo de controle cardiovascular é o óxido nítrico (ON), um radical livre com ação vasoativa responsável pelo controle hemodinâmico entre dilatação e constrição dos vasos sanguíneos. Na disfunção endotelial, a biodisponibilidade de ON endotelial fica prejudicada por diversos fatores como a sua baixa produção ou pela degradação das moléculas em função do estresse oxidativo (DIAS; NEGRÃO; KRIEGER, 2011).

Mecanismos regulatórios da óxido nítrico sintase endotelial (e-NOS) é mostrado na figura 2 abaixo. A liberação de ON é inibida tanto pela atuação do fator de necrose tumoral α (TNF- α) quanto pelo aumento da concentração de LDL oxidada no meio intracelular. Por se ligar ao seu receptor, o TNF- α ativa a cascata de sinalização inflamatória levando ao aumento da expressão do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B), que induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias. A supressão de e-NOS leva à síntese diminuída de ON e conseqüente dano à homeostase vascular (STEYERS; MILLER, 2014).

Em função do envelhecimento, da inatividade física e, em grande parte, dos hábitos alimentares da população, o desenvolvimento de doenças cardiovasculares é crescente em todo o mundo, sendo considerada a causa de maior mortalidade, principalmente em países subdesenvolvidos (OPAS/OMS, 2016). Como fator diretamente envolvido com os mecanismos de regulação arterial tem-se o Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA), um sistema de controle enzimático da homeostase da pressão arterial (MARTELLI, 2010). Resumidamente, a renina, enzima produzida pelas células justaglomerulares dos rins, é secretada em função do aumento nos níveis de sódio circulante e constrição vascular. Esta enzima atua na conversão do

angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I), forma inativa do peptídeo. Na membrana de células alvo, como as da musculatura lisa vascular, células miocárdicas, adrenais e cerebrais, receptores de Ang I (AT 1) medeiam a sua conversão em angiotensina II (Ang II), sua forma ativa (MARTELLI, 2010).

Diversos estudos têm avaliado o papel da Ang II na regulação do envelhecimento vascular e no processo de aterogênese (KUNIEDA, 2006; GARRIDO; GRIENGLING, 2009; DOUGHAN; HARRISON; DIKALOV, 2008). Sabe-se que a concentração deste peptídeo aumenta com o envelhecimento e exerce efeito na patogênese da aterosclerose. Mediado pela Ang II, mecanismos da cascata inflamatória e de envelhecimento vascular são ativados e ocorre uma baixa liberação de ON, desencadeando danos ao endotélio (figura 2) (KUNIEDA, 2006).

A vasoconstrição é um evento primário que ocorre no endotélio lesionado, sendo causada pelo aumento de Ang II e endotelinas (peptídeos que promovem constrição dos vasos sanguíneos) e são responsáveis pelo aumento da pressão arterial. Em contrapartida, elementos vasodilatadores são liberados a fim de regular a homeostase local, como o ON e prostaciclina (HUSAIN et al., 2015; DE ANDRADE; DE OLIVEIRA SANTOS; VILELA-MARTIN, 2014). Além disso, a Ang II está envolvida na produção de espécies reativas de oxigênio por meio de um mecanismo de ativação de NADPH oxidase. O aumento anormal desta enzima provoca o aumento da liberação de superóxido, um radical livre reativo com ação danosa aos tecidos. Esse processo contribui para a diminuição da biodisponibilidade de ON e a gênese de doenças como hipertensão e aterosclerose (DOUGHAN; HARRISON; DIKALOV, 2008; GARRIDO; GRIENGLING, 2009).

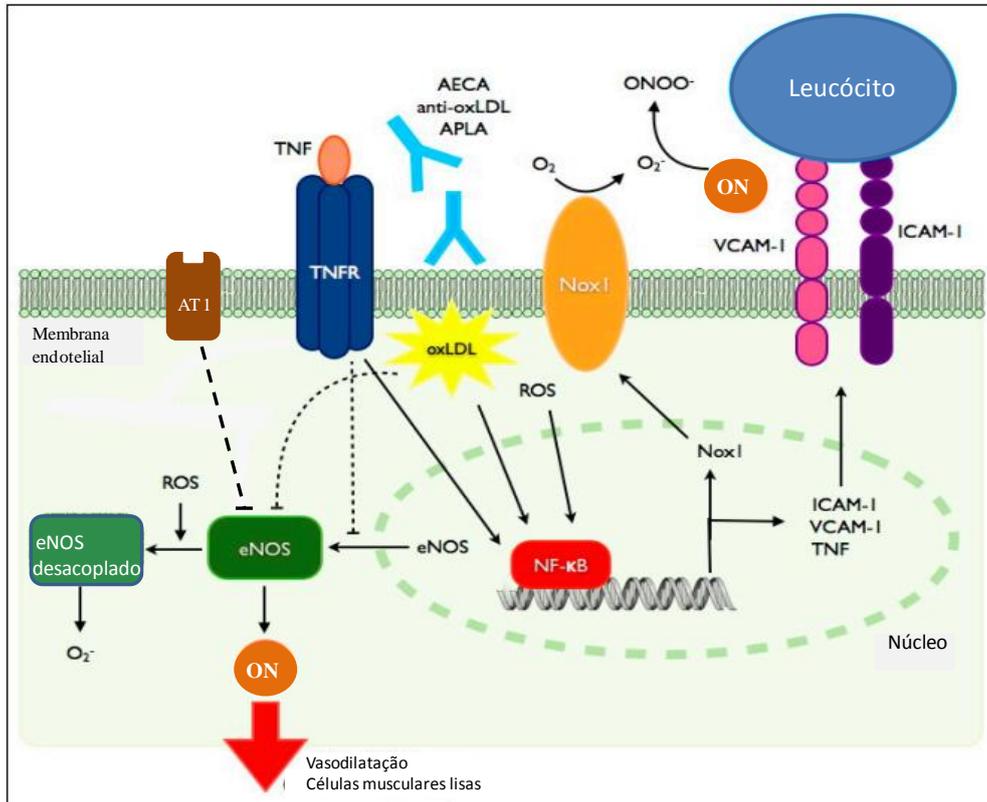


Figura 2. Mecanismos regulatórios da síntese de óxido nítrico. ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1; VCAM-1: molécula de adesão celular vascular-1; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; Nox1: NADPH-oxidase-1; ROS: espécies reativas de oxigênio; AECA: anticorpos anti-células endoteliais; APLA: anticorpos antifosfolipídicos; AT 1: receptor de angiotensina I. Setas contínuas indicam ativação e setas pontilhadas indicam inibição. Fonte: Adaptado de Steyers; Miller (2014).

3.6 Aterosclerose e a formação da placa de ateroma

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que acomete a camada íntima das artérias de médio e grande calibre. Esta doença é caracterizada pelo acúmulo de gordura e colesterol no lúmen dessas artérias, causando placas irregulares que reduzem a passagem do fluxo sanguíneo e tornam os vasos mais rígidos, resultando em doenças como a doença arterial coronariana (ataque cardíaco), doença cerebrovascular (acidente vascular cerebral) e outras doenças da aorta e artérias (WHO, 2011). Dentre as principais causas de morte por doenças não comunicáveis no mundo em 2012, 46,2% foram causadas por doenças cardiometabólicas, sendo um total de 17,5 milhões de casos. Destes, 7,4 milhões foram devidos a ataques cardíacos (doença cardíaca isquêmica) e 6,7 milhões foram devidos a acidente vascular encefálico (WHO, 2014).

O desenvolvimento de placas de ateroma se dá por inúmeros fatores, como o hábito alimentar, a hipertensão arterial ou o tabagismo, os quais modulam o metabolismo de lipoproteínas e a resposta do organismo ao processo saúde/doença e são desencadeados por um processo inflamatório. A inflamação é um estado limitante para

o desenvolvimento de doenças crônicas, como a hipertensão arterial sistêmica, a aterosclerose, as dislipidemias e a disfunção endotelial. A inflamação crônica de baixo grau e sistêmica resulta em danos à tecidos e órgãos durante um longo período. O estilo de vida e os hábitos alimentares podem levar a um estado pró-inflamatório silencioso, culminando no desenvolvimento e progressão de doenças crônicas, muitas vezes irreversíveis (DE ANDRADE; DE OLIVEIRA SANTOS; VILELA-MARTIN, 2014). No endotélio vascular, a presença de uma lesão culmina na perda da integridade dos vasos e ocorre aumento da permeabilidade das células que constituem as artérias, permitindo a passagem de lipoproteínas plasmáticas e o seu acúmulo no espaço subendotelial, caracterizando o desenvolvimento inicial das placas de ateroma (SBC, 2013).

Diante dos fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose, a hipercolesterolemia é considerada a causa mais importante. O excesso de colesterol circulante leva ao estímulo para o desenvolvimento da lesão inicial e inicia a deposição de lipoproteínas nas artérias (NICHOLLS et al., 2011; WEBER; NOELS, 2011). Com o surgimento das primeiras lesões, um processo inflamatório é iniciado no local, podendo evoluir de acordo com o agravamento da aterosclerose (POBER; SERRA, 2007).

O processo inflamatório se inicia com a produção de fatores quimiotáticos de monócitos, como a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), que promove a migração de monócitos para a região afetada. Além disso, a disfunção endotelial estabelecida na região atrai moléculas de adesão como a VCAM-1 e ICAM-1, além de outras moléculas estimuladas pela inflamação que se estabelece, proporcionando no local um aumento de monócitos, neutrófilos e linfócitos T, que estimulam ainda mais o processo inflamatório (BUI; PREMPEH; WILENSKY, 2009; SCOTT, 2004). A formação inicial das placas de ateroma, bem como a atuação das moléculas envolvidas com o processo inflamatório inicial está ilustrado na figura 3.

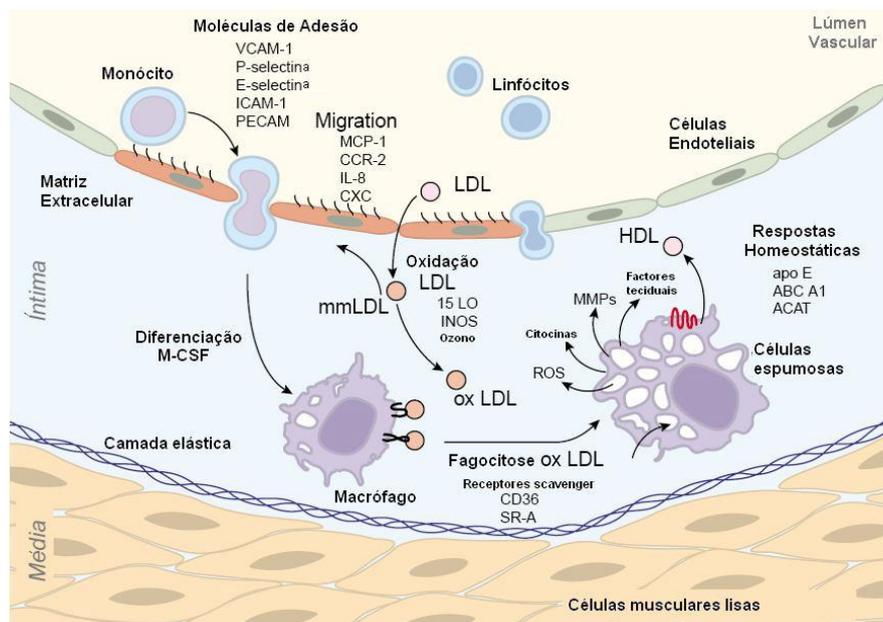


Figura 3. Mecanismos envolvidos na formação inicial da placa aterosclerótica e o processo inflamatório (Borges, 2009, adaptado de Scott, 2004).

Após a entrada dos monócitos na íntima das artérias, eles sofrem diferenciação e fagocitam moléculas de LDL oxidada que se acumulam no local. Os macrófagos, carregados de colesterol, se tornam células espumosas (figura 3), que são depositadas na camada íntima dos vasos formando a primeira camada da placa aterosclerótica. À medida que mais células vão adentrando neste espaço, uma grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios e fatores de crescimento, como o fator estimulador de colônias de macrófagos, MCP-1, interleucinas (IL) como a IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-18 e TNF- α são liberados, atraindo mais moléculas envolvidas com a cascata inflamatória (CAM; DE MEJIA, 2012; LIBBY, 2006).

As células musculares lisas são características da camada média dos vasos sanguíneos. Com a atuação de mediadores inflamatórios na região, essas células tendem a migrar para a camada íntima, onde sofrem proliferação e produzem matriz extracelular fibrosa, rica em colágeno. As metaloproteinases constituem uma família de endopeptidases que degradam matriz extracelular e são secretadas por neutrófilos, monócitos, macrófagos e fibroblastos. A metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) pertence a uma classe de enzimas que degrada colágeno do tipo IV e matriz extracelular. A sua expressão se torna aumentada mediante o estresse inflamatório, aumentando a instabilidade de placas aterogênicas (MA et al., 2014). A placa aterosclerótica totalmente desenvolvida, onde podemos observar a presença de um

núcleo lipídico revestido por material fibroso produzido pelas células musculares está ilustrado na figura 4 (SBC, 2013).

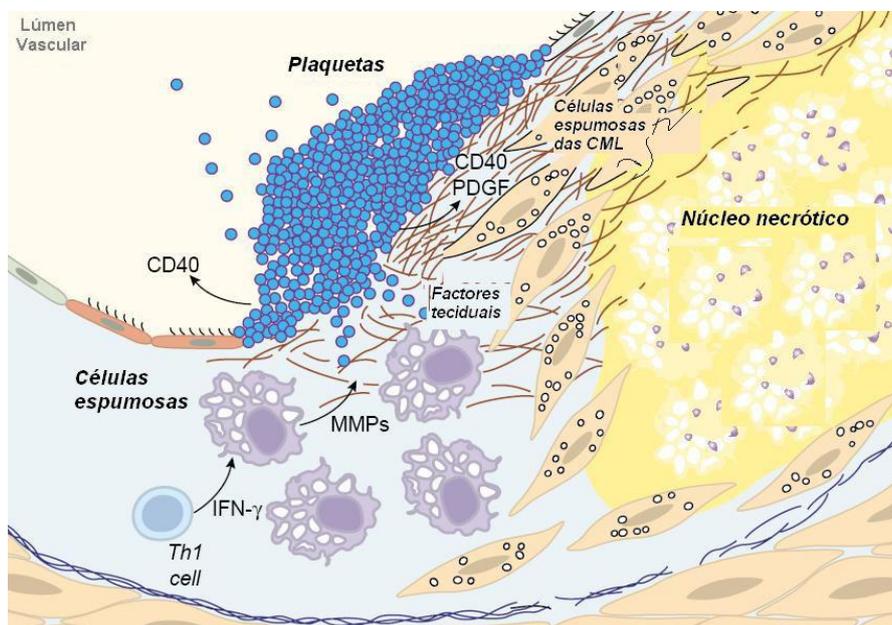


Figura 4. Placa aterosclerótica instável (Borges, 2009, adaptado de Scott, 2004).

A perda da homeostase e o desenvolvimento de mecanismos pró-inflamatórios e pró-apoptóticos possibilitam o rompimento da placa aterosclerótica e deslocamento para a corrente sanguínea. O rompimento da massa celular rica em colesterol leva a um dano ainda maior na parede das artérias, atraindo plaquetas e fatores de coagulação (SCOTT, 2004). No decorrer do tempo, o processo aterosclerótico sem tratamento leva à instabilidade clínica dos pacientes, com elevado risco de desenvolver lesões graves, formação de trombos, infarto agudo do miocárdio e isquemia (BUI; PREMPEH; WILENSKY, 2009).

3.7 Disbiose intestinal e o consumo de feijão

A disbiose intestinal é caracterizada por alterações na microbiota intestinal, causadas por um estado de estresse. Essas mudanças provocam uma redução da diversidade microbiana e consequentemente, o aumento de comunidades específicas. Juntamente com a mudança do padrão microbiano, a disbiose provoca um aumento da liberação de mediadores inflamatórios e estresse oxidativo, culminando no aumento do risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias do intestino e outras doenças crônicas (WEISS; HENNET, 2017).

A microbiota intestinal residente do organismo de humanos e de animais varia de acordo com a genética, modo de nascimento, idade, hábitos alimentares, dentre outros. O tipo de alimentação é um dos principais fatores determinantes da composição microbiana do trato gastrointestinal, sendo modificada ao longo da vida de acordo com as alterações dos tipos de alimentos consumidos, quantidade e frequência de alimentação (CAESAR et al., 2015).

A microbiota intestinal exerce importantes efeitos na digestão e no metabolismo de macronutrientes não digeríveis como as fibras alimentares, culminando na produção de alguns metabólitos como os AGCC e de compostos bioativos, que serão utilizados por outras células, mantendo a homeostase do organismo. A avaliação da microbiota intestinal pode ser realizada por técnicas de culturas independentes, ou por métodos que avaliam o conjunto microbiano, visando descrever a taxonomia e a funcionalidade da microbiota residente (ALOU; LAGIER; RAOULT, 2016).

Existem evidências de que a colonização por bactérias comensais exercem efeitos sobre o metabolismo de lipídios, o desenvolvimento de placas ateroscleróticas e de doenças cardiometabólicas (CHISTIakov et al., 2015). Além disso, o tipo de dieta e a qualidade dos lipídios ingeridos exercem efeitos distintos na microbiota. Caesar et al. (2015) avaliaram a microbiota intestinal e a inflamação em camundongos alimentados com banha de porco e com óleo de peixe, observando que a composição lipídica da banha, rica em gordura saturada, promoveu um aumento de tecido adiposo branco, ativação de marcadores inflamatórios e apresentaram baixa sensibilidade à insulina em relação aos animais que receberam óleo de peixe. Esse estudo mostrou também que os camundongos alimentados com óleo de peixe tiveram um aumento na taxa de *Lactobacillus*, mostrando que a qualidade da gordura ingerida exerce efeito na composição e na diversidade da microbiota intestinal.

É evidente a implicação da microbiota na inflamação e conseqüentemente no processo aterosclerótico (CHISTIakov et al., 2015). Apesar disso, ainda são necessários estudos que busquem uma forma de modular as respostas da microbiota frente à alimentação. Alguns mecanismos pelos quais a microbiota intestinal pode afetar o desenvolvimento da aterosclerose são apresentados na figura 5. A liberação de lipopolissacarídeos (LPS) por bactérias gram-negativas pode ser reconhecida pelos receptores tipo Toll-like 4 (TLR-4) nos macrófagos, regulando negativamente a expressão de um supressor de colesterol denominado fator de transcrição X no fígado (LXR) e aumentando a expressão de receptores lipídicos e receptor de adiponectina 2

(AdipoR2), culminando no aumento de lipídios nas células. Além disso, o aumento de LPS diminui a expressão de peptídeo semelhante ao glucagon 2 (GLP2) que reduz a integridade do epitélio do cólon, aumentando a inflamação (CHISTIakov et al., 2015).

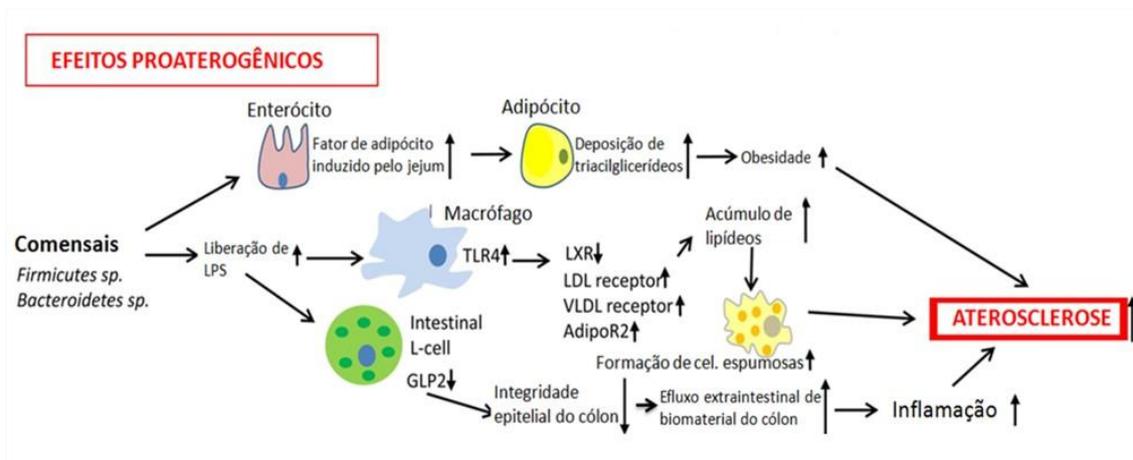


Figura 5. Mecanismos pelos quais a microbiota intestinal pode favorecer o desenvolvimento de aterosclerose. LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; LPS: lipopolissacarídeos; TLR4: receptor tipo Toll-like 4; LXR: fator de transcrição do receptor X no fígado; AdipoR2: receptor de adiponectina tipo 2; GLP2: peptídeo semelhante ao glucagon 2 (Adaptado de Chistiakov et al., 2015).

Estudos que avaliam a relação entre o consumo de feijão carioca, rico em fibras e compostos bioativos, associado a uma dieta aterogênica e a composição da microbiota intestinal são ainda escassos. O feijão carioca apresenta um elevado conteúdo de compostos fenólicos, fibra alimentar e proteínas (MARTINO et al., 2012), porém, as fibras solúveis do feijão podem ser utilizadas pelas bactérias intestinais para fermentação, favorecendo a produção de AGCC como o ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, que são fontes de energia e metabólitos fenólicos aos enterócitos (GOFFREDO et al., 2016).

A fermentação desses compostos, coletivamente, exercem efeitos benéficos para a manutenção da microbiota, principalmente em relação aos polifenóis e seus metabólitos, que contribuem com a modulação do crescimento de bactérias benéficas e inibição do crescimento de bactérias patogênicas, levando à redução na liberação e absorção de LPS (CARDONA et al., 2013).

Monk e colaboradores (2016) avaliaram recentemente em seu estudo o efeito do consumo de farinha de feijão cranberry (cultivares CBX9148 e CBX9151) sobre biomarcadores da defesa microbiana, inflamação e a comunidade microbiana do cólon de camundongos. O estudo mostrou um aumento significativo na atividade microbiana em função da maior produção de AGCC em relação ao controle, não encontraram

diferença significativa na taxa de taxonomia microbiana fecal, porém encontraram um efeito da dieta em relação à diversidade microbiana.

Os AGCC são produzidos a partir de sacarídeos não absorvidos e exercem efeitos importantes para a saúde intestinal. Os principais AGCC encontrados no intestino grosso são o ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico (OLIVEIRA; HAMMES, 2016). O ácido acético pode reduzir a glicemia por meio da ativação da via AMPK no fígado e redução da expressão de enzimas da gliconeogênese (SAKAKIBARA et al., 2006). O ácido propiônico pode estar associado com o aumento da glicemia por atuar como precursor da gliconeogênese (REILLY; ROMBEAU, 1993). O ácido butírico é utilizado como fonte energética para os enterócitos e está associado com a capacidade de modular a expressão da glutathione S-transferase, uma isoenzima que detoxifica compostos cancerígenos e está associado ao estresse oxidativo (KILNER, et al., 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

O armazenamento e o processamento dos feijões foram realizados previamente no Laboratório de Análise Sensorial e Processamento de Novos Produtos (DNS/UFV) como parte do projeto DarkBean desenvolvido em parceria com a EMBRAPA Arroz e Feijão.

O presente estudo foi realizado nos laboratórios de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS), Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral (DBG), Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia (DMB), Laboratório de Metabolismo e Fermentação e Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Agentes Infecciosos e Parasitários do Departamento de Bioquímica (BQI), pertencentes à Universidade Federal de Viçosa (UFV – Viçosa, Minas Gerais).

Este trabalho é uma continuidade de um estudo inicial, *in vitro*, denominado "Efeito do armazenamento de feijões carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre a composição nutricional e fitoquímica e propriedades anti-inflamatória e antiaterosclerótica de seus hidrolisados proteicos em células de macrófagos humanos" (ALVES, 2017), que encontrou efeito anti-inflamatório e inibidor da formação de células espumosas e de aterosclerose. Estes resultados proporcionaram a continuidade

dos estudos com o feijão carioca e seu hidrolisado proteico, levando ao interesse de avaliar os efeitos do consumo de feijão carioca e seu hidrolisado proteico *in vivo*, por meio deste trabalho, e de outra dissertação intitulada "Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.): ação do armazenamento sobre a composição química e nutricional e efeito *in vivo* da farinha integral e de seu hidrolisado proteico no estresse oxidativo e na inflamação", que encontrou redução de medidas biométricas, do consumo alimentar e da glicemia em camundongos BALB/c que consumiram hidrolisado proteico de feijão, sugerindo modulação de mecanismos de regulação da fome (LIMA, 2017).

4.2 Matéria-prima

4.2.1 Amostras

O genótipo de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) BRSMG Madrepérola, variedade Carioca, foi gentilmente cedido pela EMBRAPA. Essa linhagem de feijão apresenta características de resistência aos processos de escurecimento e endurecimento e foi obtida por meio de pesquisas de melhoramento genético. O plantio e colheita dos grãos foram realizados em Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil.

Os grãos foram semeados nos dias 26 e 27 de maio de 2014, em sistema de plantio direto, com espaçamento de 0,45 m em linha, 12 sementes por metro, adubação de base com fosfato monoamônico (MAP) (04-52-00) (200 Kg/ha) e adubação de cobertura com uréia (200 Kg/ha). A colheita ocorreu durante os meses de agosto e setembro de 2014, na Fazenda Capivara da EMBRAPA Arroz e Feijão. Após a colheita, os grãos foram acondicionados em sacos de tecido, separados em três repetições, à temperatura ambiente ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$), sem controle de umidade relativa do ar e foram armazenados sob congelamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por seis meses (180 dias) no Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV) até o início do experimento.

4.2.2 Cocção, processamento dos feijões e obtenção do hidrolisado proteico

A cocção, processamento e obtenção do hidrolisado proteico foram previamente realizados no estudo de Alves et al. (2016a). Resumidamente, os grãos foram cozidos sob pressão em calor úmido (proporção de 1:2, p/v) por (40 ± 5 min), em triplicata, com mínimo teor de água de cocção residual. Após cocção os grãos foram secos em estufa com circulação de ar (MA 035, Marconi®, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por 8 horas a

60 °C e triturados em moinho (Grinder Vertical Rotor MAO 090 CFT, Marconi®, Piracicaba, São Paulo, Brasil), com peneira de 600 µm. As farinhas foram embaladas à vácuo e mantidas à -18 °C até o momento das análises.

O hidrolisado proteico foi obtido por meio de digestão enzimática simulada conforme metodologia proposta por Megías et al. (2004), com modificações por Alves et al. (2016a). Brevemente, a farinha integral do feijão foi suspensa em água na proporção de 1:20 p/v seguido de digestão enzimática com pepsina/substrato 1:20 (p/p) em pH 2.0 por 2 horas e com pancreatina/substrato 1:20 (p/p) em pH 7,5 por 2 horas, ambas em temperatura de 37 °C. O processo foi interrompido por aquecimento a 75 °C por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas na velocidade de 20.000 xg a 4°C por 15 minutos e a proteína hidrolisada isolada foi dializada para remoção de sais por meio de filtração em membrana de celulose com ponto de corte de 500 Da e posteriormente liofilizada. As amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento das análises.

4.3 Ensaio biológico

O efeito da farinha integral do feijão e de seu hidrolisado proteico foi avaliado por meio de ensaio biológico. Foram utilizados 48 camundongos machos adultos (*Mus musculus*, classe Rodentia), linhagem BALB/c. Os animais foram divididos em 4 grupos com 12 animais em cada, de modo que a diferença da média dos pesos entre os grupos não excedesse 0,5 g. Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente com temperatura controlada a 22 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro controlado automaticamente e receberam água destilada *ad libitum* e suas respectivas dietas experimentais durante o período de nove semanas (Figura 6).

Os quatro grupos experimentais consistiam em dois controles e dois grupos teste, destes, um grupo recebeu farinha de feijão carioca e o outro grupo recebeu o hidrolisado proteico de feijão, fonte de peptídeos bioativos, sendo denominados: Grupo CN: controle normal; Grupo CA: controle aterogênico; Grupo AF: Dieta aterogênica + farinha integral de feijão cozido; Grupo AH: Dieta aterogênica + hidrolisado proteico.

O hidrolisado proteico foi oferecido ao grupo AH na concentração de 700 mg/Kg de peso corporal, que foi estabelecida conforme os resultados do estudo de Mojica et al. (2017). Além disso, foi fornecido aos animais (exceto ao grupo CN) um inibidor dos hormônios da tireoide (T3 e T4) com a finalidade de assegurar a indução de

hipercolesterolemia (JORIS et al., 1983; PELLIZZON, 2008). O composto 6-propil-2-thiouracil (PTU) foi calculado na concentração de 10 mg/Kg de peso, de acordo com os estudos de Panda; Kar (2005) e Panda; Kar; Patil (2009). Os compostos supracitados foram ofertados por gavagem oral intragástrica, totalizando o volume de 0,5 mL/dia. O PTU foi diluído em água ou junto com o hidrolisado proteico, como mostrado na figura 6.

As soluções do hidrolisado proteico e do PTU foram preparadas semanalmente, de acordo com a média de peso semanal dos animais por grupo e foram armazenadas a -18 °C. A mistura das soluções que foram ofertadas aos animais foi feita imediatamente antes da sua utilização, a fim de se evitar qualquer interação entre os componentes da mesma bem como possível contaminação microbiológica.

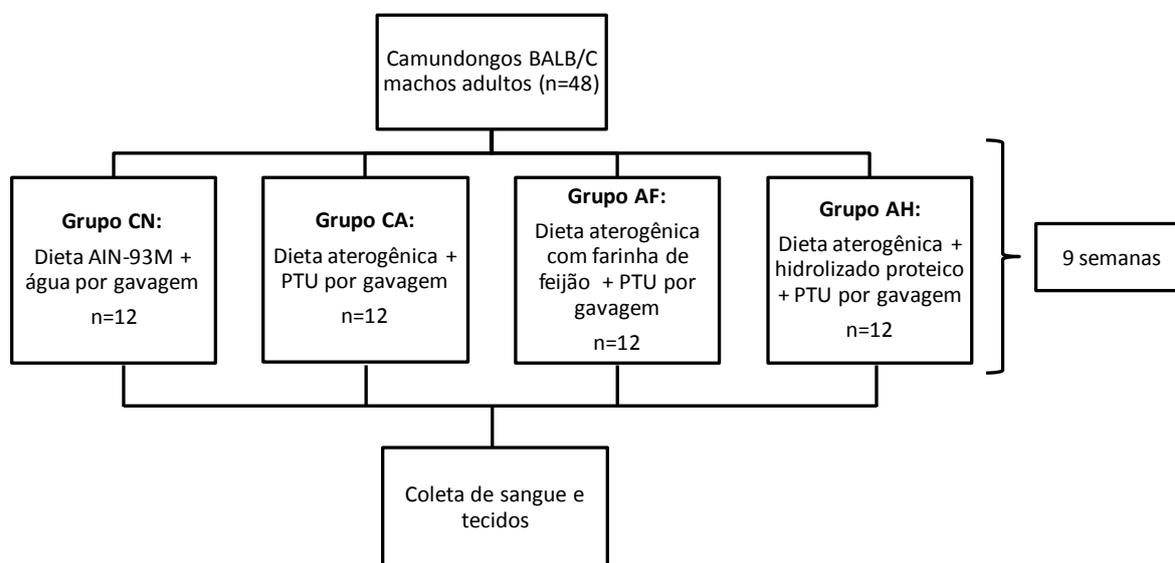


Figura 6. Delineamento experimental. Grupo CN: controle normal; Grupo CA: controle aterogênico; Grupo AF: dieta aterogênica + farinha integral de feijão cozido; Grupo AH: dieta aterogênica + hidrolisado proteico; PTU: 6-propil-2-thiouracil.

4.3.1 Dietas experimentais

A composição das dietas experimentais é mostrada na tabela 1 e foi baseada na dieta padrão AIN-93M, indicada para manutenção de animais adultos (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). A dieta aterogênica utilizada no presente estudo consistiu na AIN-93M suplementada com 2% de colesterol, 0,5% de ácido cólico (COLINACOCA et al., 2014), 20% de sacarose e 20% de gordura hidrogenada (ANANDHI; THOMAS; GERALDINE, 2014). A dieta do grupo AF foi adicionada de farinha de feijão carioca cozido na proporção de 346,60 g/Kg de dieta, a qual foi calculada para substituir 50% do conteúdo proteico dessa dieta. O teor de fibras das dietas foi ajustado

para equiparar ao grupo AF, considerando o conteúdo de fibras presente na farinha de feijão ajustada, totalizando 6,2 %.

Todos os ingredientes foram pesados em balança semi-analítica da marca GEHACA[®], modelo BG2000, misturados manualmente e peneirados em peneiras de plástico. Os ingredientes foram homogeneizados em batedeira industrial da marca Leme[®] por 15 minutos. As dietas foram acondicionadas em sacos de polietileno, devidamente rotulados e armazenados em freezer a -20 °C.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.

Ingrediente (g/Kg)	Grupos			
	CN	CP	AF	AH
Amido de milho	422,96	---	---	---
Farinha de feijão	---	---	346,60	---
Sacarose	100,00	300,00	218,63	300,00
Gordura vegetal hidrogenada	---	200,00	200,00	200,00
Caseína (82%)	170,73	218,19	124,47	218,19
Amido dextrinizado	155,00	105,50	---	105,50
Celulose microcristalina	62,01	62,01	---	62,01
Óleo de soja	40,00	40,00	36,00	40,00
Mix mineral	35,00	35,00	35,00	35,00
Mix vitamínico	10,00	10,00	10,00	10,00
Colesterol	---	20,00	20,00	20,00
Bitartarato de colina	2,50	2,50	2,50	2,50
Ácido cólico	0,00	5,00	5,00	5,00
L-cistina	1,80	1,80	1,80	1,80
Carboidrato (%)	76,29	45,89	44,35	45,89
Proteína (%)	19,21	24,69	24,85	24,69
Lípido (%)	4,50	29,42	30,80	29,42
Fibra (%)	6,2	6,2	6,2	6,2
DC (Kcal/g)	3,75	4,83	4,67	4,83

CN: controle normal; CA: controle aterogênico; AF: dieta aterogênica + farinha integral de feijão cozido; AH: dieta aterogênica + hidrolisado proteico; DC: densidade calórica. Composição química da farinha de feijão: carboidratos: 44,98 %; proteínas: 24,63 %; lipídeos: 1,17 %; fibras: 17,89 % (LIMA, 2017).

4.3.2 Eutanásia

Ao final da 9ª semana, após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com Isoflurano (Isoforine, Cristália[®]) e eutanasiados por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos com gel (BD Vacutainer[®]) e centrifugados a 1.006 x g por 10 minutos (FANEM[®], São Paulo, Brasil) para obtenção do soro. O coração foi removido, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C para avaliação de marcadores de disfunção endotelial e aterosclerose. Os tecidos adiposos mesentérico,

epididimal e retroperitoneal foram removidos e pesados. O ceco foi retirado, pesado e as fezes armazenadas em seu interior foi retirada, imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C. Um fragmento do cólon foi retirado e fixado em solução de Karnovsky (1:1 em volume de gliceraldeído – 4 % e formaldeído – 4 %) por 24 h e mantidos em álcool 70 % para análise histológica.

4.4 Avaliação de indicadores de adiposidade, peso corporal e consumo alimentar de camundongos alimentados com dieta aterogênica

O peso corporal e o consumo alimentar dos animais foram monitorados semanalmente durante o período experimental. O perímetro da cintura e o comprimento naso-anal foram aferidos no final da última semana do experimento para avaliação da adiposidade, mensurada pelo índice de Lee de acordo com Bernardis e Patterson (1968), que consiste na razão entre a raiz cúbica do peso corporal (g) e o comprimento naso-anal (cm) x 1000.

Após a eutanásia, os tecidos adiposos mesentérico, retroperitoneal e epididimal foram removidos e pesados, a fim de se verificar o depósito de gordura nos animais. A quantificação de gordura visceral total foi calculada pelo somatório dos tecidos adiposos coletados.

4.5 Avaliação do metabolismo lipídico e do índice aterogênico de camundongos alimentados com dieta aterogênica

As amostras de soro foram utilizadas para quantificação das concentrações de colesterol total, HDL, LDL e triacilglicerídeos, que foram avaliadas por métodos colorimétricos de acordo com as instruções do fabricante (Bioclin®), no analisador automático para química analítica BS-200 (Mindray®, Shenzhen, China). O índice aterogênico (IA) foi calculado pela seguinte fórmula: (Colesterol total – HDL colesterol)/ HDL colesterol (KIM et al., 2016).

4.6 Quantificação do marcador de regulação da pressão arterial de camundongos alimentados com dieta aterogênica

4.6.1 Quantificação de angiotensina II no soro

A quantificação de Ang II (forma ativa) no soro foi avaliada pela técnica de imunoenensaio, por meio dos procedimentos do kit *Angiotensin II EIA Kit* (Sigma-Aldrich®). Resumidamente, foram adicionados 100 µl do anticorpo primário anti-angiotensina II em cada poço da placa, que continha o anticorpo secundário. A placa foi

incubada durante 90 minutos à temperatura ambiente com agitação suave, a solução foi descartada e a placa foi lavada 4 vezes com tampão de lavagem 1x. Posteriormente, foi adicionado 100 µl de amostra e dos padrões em seus respectivos poços, seguido de incubação por 150 minutos à temperatura ambiente com agitação. Em seguida, a solução foi descartada e a placa foi lavada sucessivamente para a adição de 100 µl de solução de HRP-Streptavidina a cada poço, que foi novamente incubada durante 45 minutos com agitação, à temperatura ambiente. O substrato TMB One-Step Substrat Reagent foi adicionado, incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente, com agitação e em luminosidade baixa e posteriormente foi adicionado 50 µl da solução de parada para a realização da leitura da absorbância, que foi feita a 450 nm em leitor de ELISA (Thermo Scientific®, modelo Multiskan GO).

A quantificação de Ang II das amostras foi realizada por meio de curva-padrão com o auxílio do software SigmaPlot® e os resultados foram expressos em pg/mL de soro.

4.7 Avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios e da função endotelial no tecido cardíaco de camundongos alimentados com dieta aterogênica

A expressão de TNF- α , Angiotensina II, e-NOS, VCAM-1 e MMP-9 foram determinadas no tecido cardíaco. Para isso, 100 mg do tecido foi previamente triturado por moagem, utilizando gral e pistilo em condições de baixa temperatura para homogeneização do mesmo.

O RNA total foi extraído com o auxílio do reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O RNA isolado foi usado para sintetizar o cDNA utilizando o kit de transcrição Reversa (Invitrogen Corp, Grand Island, NY) de acordo com o protocolo do fabricante. A expressão dos níveis de mRNA foi realizado pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR) com SYBR green PCR master mix da Applied Biosystems (Foster City, CA) com volume de reação de 10 µL. A quantificação foi realizada no equipamento AB StepOne Real Time PCR System, utilizando o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green, utilizando Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA). O ciclo da PCR envolveu a desnaturação inicial de 95°C (20segundos) e então 40 ciclos, com 3 segundos de desnaturação (95 °C) e 30 segundos de anelamento (60 °C), seguidos da curva padrão de dissociação. Os dados de PCR real time foram analisados pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Foram utilizadas sequências de “primers” (Integrated DNA Technologies®) senso e anti-senso do **TNF- α** : senso 5'- ACG GCA TGG ATC TCA AAG AC -3', anti-senso 5'- AGA TAG CAA ATC GGC TGA CG -3'; **Angiotensina II**: senso 5'- CCC ATC ACC ATC TGC ATA GC -3', anti-senso 5'- GTT ATC CGA AGG CCG GTA AG -3'; **e-NOS**: senso 5'- GCT GAG AGC CTG CAA TTA CTA -3', anti-senso 5'- GGA TTT GCT GCT CTG TAG GT -3'; **VCAM-I**: senso 5'- TCT CTC AGG AAA TGC CAC CC -3', anti-senso 5'- CAC AGC CAA TAG CAG CAC AC -3' e **MMP-9**: senso 5'- GTC CCA CTA TAC CTC CCA CG -3', anti-senso 5'- ATT GCA AGG ATT GTC TGC CG -3'.

A expressão relativa dos níveis de mRNA foram normalizadas pelo controle endógeno GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) para camundongos: senso 5'- AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG -3' e anti-senso 5'- TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA -3'. Todas as etapas foram realizadas em condições livre de RNase.

4.8 Avaliação da saúde intestinal de camundongos alimentados com dieta aterogênica

4.8.1 Quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

A análise de AGCC seguiu metodologia proposta por Smiricky-Tjardes et al. (2003) com modificações. Durante toda a extração as amostras permaneceram em gelo a fim de se manter a baixa temperatura. Inicialmente, 50 mg de fezes do ceco foram pesadas em microtubos, foi acrescentado 950 μ l de água MiliQ e as amostras foram homogeneizadas com o auxílio de beads. O processo de homogeneização consistiu em um ciclo de 30 minutos onde as amostras passaram por um período de agitação em vórtex por 5 minutos, seguido de repouso em gelo por 5 minutos, homogeneização por 1 minuto e repouso em gelo por mais 5 minutos, até completar os 30 min, para completa extração dos ácidos graxos presentes na amostra. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas três vezes consecutivas a 19.350 x g por 30 min a 4°C (Hitachi Koki Co., Ltd®, Tokyo, Japão) para coleta do sobrenadante. O sobrenadante da última centrifugação foi então filtrado em um filtro de 0,45 μ m com o auxílio de uma seringa e acondicionado em *vials*. Foi realizada a quantificação dos AGCC por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

O sistema de cromatografia consistiu em um detector duplo Dionex Ultimate 3000 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) acoplado a um detector de índice de

refração Shodex RI-101. Os AGCC foram separados numa coluna de exclusão de íons ROA Phenomenex Rezex (300 × 7,8 mm) (Phenomenex Inc. Torrance, CA, EUA) mantida a 45 °C. As análises foram realizadas de forma isocrática nas seguintes condições: a fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 5 mmol l⁻¹, com taxa de fluxo de 0,7 ml min⁻¹, temperatura da coluna 40 °C, volume de injeção 20 µl. A identificação e quantificação dos ácidos graxos foram feitas através de padronização externa, em que a concentração de cada um foi calculada através das respectivas áreas e tempos de retenção nos cromatogramas. Foram preparadas nove concentrações diferentes dos padrões de ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico (Volatile free acid mix, Cód. 46975, Sigma Aldrich, USA), em ácido sulfúrico 5 mmol L⁻¹, para as curvas de calibração. Cada solução foi injeta separadamente e em seguida todas juntas. A quantificação foi feita por meio da utilização da curva padrão nas concentrações de 0,08 a 10 mM.

4.8.2 Análise histomorfométrica

Os fragmentos do cólon, previamente fixados em solução de karnovsky e mantidos em álcool 70 % foram desidratados em soluções crescentes de álcool gradiente e imersos em uma solução de resina por 24 h. Após esse período, os fragmentos foram imersos em resina pura de infiltração por 2 h para posterior emblocamento. Este processo consistiu na imersão dos fragmentos em uma solução de resina pura (93,17 %) adicionada de endurecedor (6,83 %). O material permaneceu armazenado em estufa a 60 °C por 48 h para secagem.

Foram obtidos cortes histológicos semi-seriados de 3 µm de espessura em micrótomo automático (Reichert-Jung[®]) utilizando navalha de vidro, e submetidos à coloração com hematoxilina/eosina. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck[®]) e analisadas em microscópio de luz CX31 Olympus. As imagens foram obtidas em câmera digital SC 020 por meio do software Analysis GETIT, Olympus.

Para medir a profundidade das criptas e a espessura das camadas musculares internas e externas foram selecionados vinte campos aleatórios por animal. Apenas as criptas com epitélio definido e conjuntivo visível foram utilizadas (CAVALIERE et al., 2013).

As imagens das secções histológicas foram capturadas com a objetiva de 20 x e as medidas foram tomadas com auxílio do aplicativo ImagePro-Plus[®] versão 4.5 (Media Cybernetics).

4.9 Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais com os animais foram realizados em consonância com os princípios éticos na experimentação animal, sendo a pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/ UFV), Viçosa, MG, processo nº 97/2015 (ANEXO 1).

4.10 Análises estatísticas

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O ensaio biológico seguiu delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de médias de Newman-Keuls para comparação entre todos os grupos experimentais. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism[®] versão 5.0 considerando o nível de 5 % de significância.

5. RESULTADOS

5.1 Indicadores de adiposidade, peso corporal e consumo alimentar

Como mostrado na figura 7A, o consumo alimentar do grupo que recebeu dieta aterogênica + hidrolisado proteico (AH) durante as três primeiras semanas experimentais foi menor ($p < 0,05$) que o grupo controle normal (CN) e controle aterogênico (CA). Na quinta, sexta e sétima semanas o grupo com dieta aterogênica + farinha integral de feijão cozido (AF) apresentou o maior consumo alimentar ($p < 0,05$) e os demais grupos não se diferiram entre si ($p > 0,05$). Entre a primeira e a última semana de tratamento, o consumo alimentar não diferiu ($p > 0,05$) entre os grupos AF e AH. O ganho de peso dos animais apresentou diferenças a partir da quarta semana (fig. 7B). O grupo AH reduziu o ganho de peso comparado ao CA e AF em cerca de 27,4 % ($p < 0,05$), equiparando-se ao CN, entretanto, o grupo AF apresentou o ganho de peso igual ao CA ($p > 0,05$). A diferença de média de peso inicial dos animais foi padronizada de modo que não diferisse entre os grupos. Apesar do menor ganho de peso apresentado pelo grupo AH, o peso final não diferiu ($p > 0,05$) dos controles CN e CA, porém foi 9,0 % menor ($p < 0,05$) em relação ao grupo AF (fig. 7C).

A adiposidade, avaliada pelo índice de Lee, reduziu no grupo AH em relação ao CA ($p < 0,05$), equiparando ao CN (fig. 7D). Além disso, o grupo AF reduziu o índice de Lee ao ponto de ser similar ao CN, no entanto não diferiu do CA ($p > 0,05$). Os grupos

que receberam dieta aterogênica apresentaram menor acúmulo de gordura visceral ($p < 0,05$) que o grupo CN (fig. 7E).

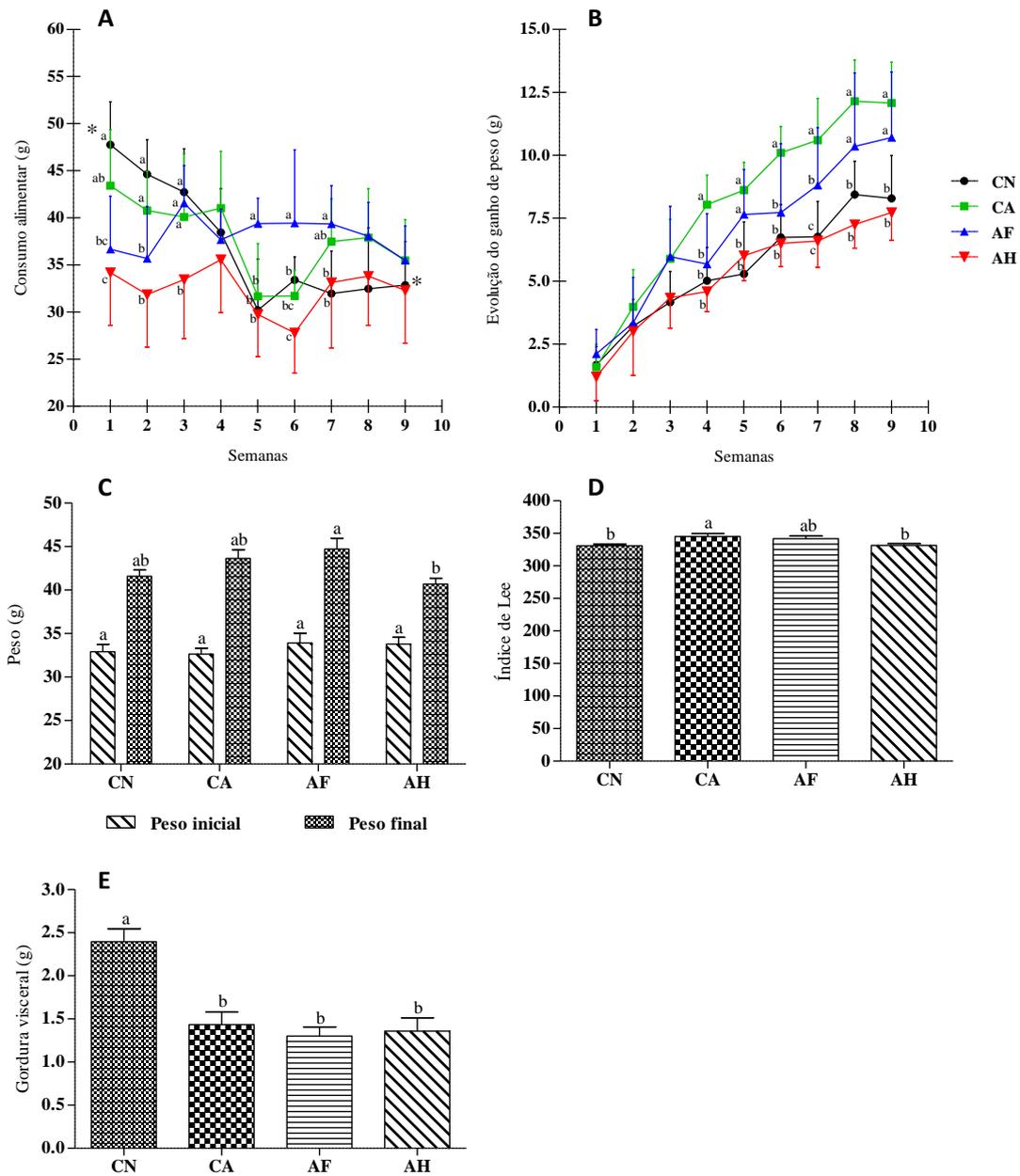


Figura 7. Evolução semanal do consumo alimentar (A) e do ganho de peso (B), peso inicial e final (C), índice de Lee (D) e acúmulo de gordura visceral (E) de camundongos alimentados com dieta aterogênica (n=8). CN: controle normal; CA: controle aterogênico; AF: dieta aterogênica + farinha de feijão; AH: dieta aterogênica + hidrolisado proteico. Diferentes letras nas colunas indicam diferença pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). * indica diferença significativa no consumo alimentar entre a 1ª e a 9ª semana.

5.2 Perfil de lipídios e índice aterogênico de camundongos alimentados com dieta aterogênica

A farinha de feijão e seu hidrolisado proteico reduziu ($p < 0,05$) a concentração sérica de triacilglicerídeos em relação ao grupo CA e estes foram menores ($p < 0,05$) que o CN (fig. 8A). Os grupos teste AF e AH apresentaram valores de colesterol total menores que o grupo CA ($p < 0,05$) (fig. 8B). Além disso, AF reduziu o LDL colesterol e melhorou o índice aterogênico (IA) comparado ao CA ($p < 0,05$). Em contrapartida, AH não foi capaz de prevenir o aumento de LDL e do IA, permanecendo igual ao CA, apesar de não se diferenciar do CN ($p > 0,05$) (fig. 8C e 8E). As dietas aterogênicas adicionadas de farinha de feijão ou associada com o hidrolisado proteico não preveniram o efeito deletério da dieta aterogênica sobre o ($p < 0,05$) HDL colesterol (fig. 8D) em relação ao CN e tornaram os grupos teste semelhantes ao CA ($p > 0,05$).

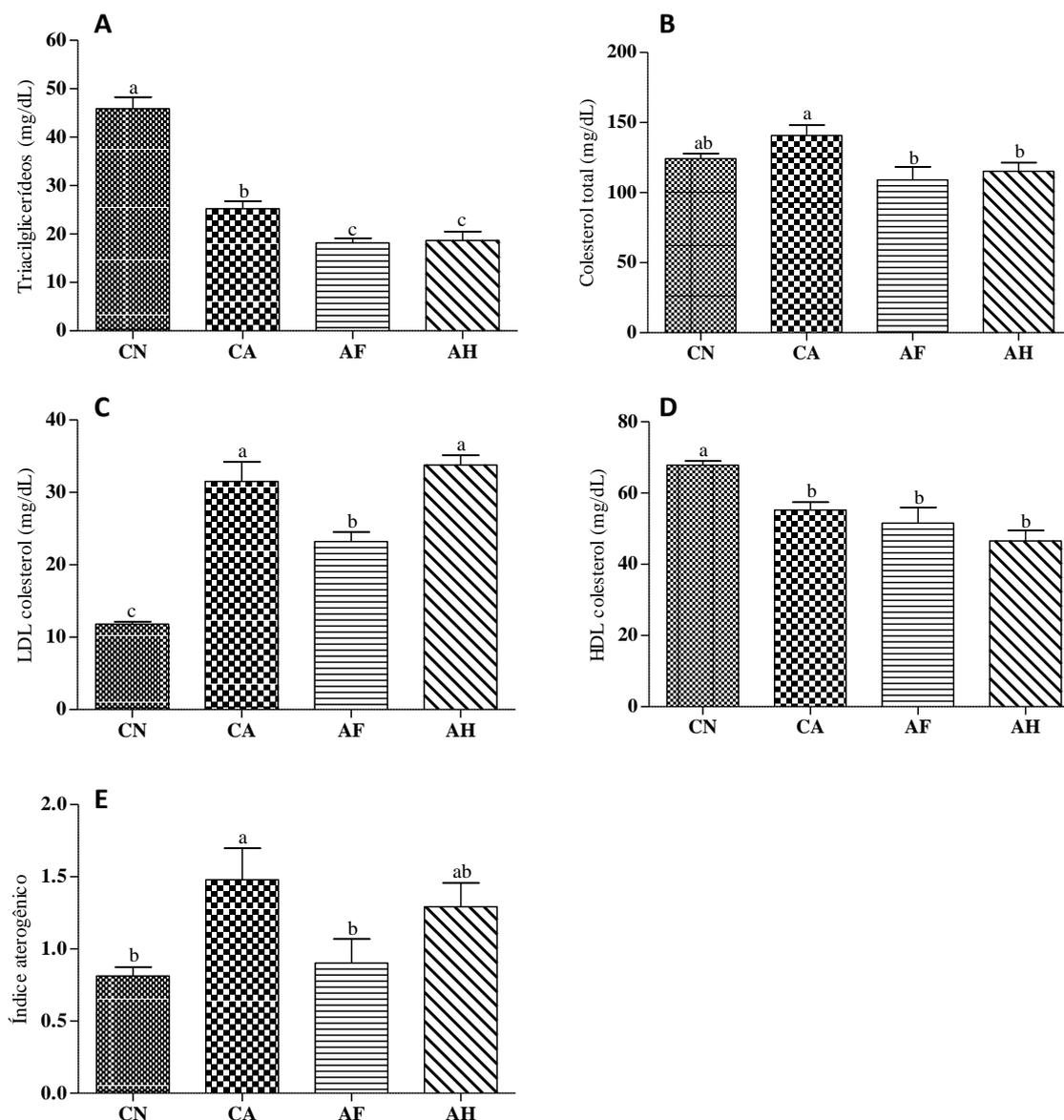


Figura 8. Perfil lipídico e índice aterogênico (IA) de camundongos alimentados com dieta aterogênica (n=8). CN: controle normal; CA: controle aterogênico; AF: dieta aterogênica + farinha de feijão; AH: dieta aterogênica + hidrolisado proteico; IA: (Colesterol total – HDL colesterol)/ HDL colesterol. Diferentes letras indicam diferença pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

5.3 Efeitos da farinha de feijão e de seu hidrolisado proteico na inflamação e na disfunção endotelial em camundongos alimentados com dieta aterogênica

Os tratamentos com feijão e seu hidrolisado proteico reduziram ($p < 0,05$) a expressão de TNF- α comparado ao grupo CA, equiparando ao CN (fig. 9A). O grupo AF aumentou ($p < 0,05$) a expressão gênica de Ang II no tecido cardíaco e a concentração de Ang II no soro, enquanto o grupo AH apresentou menor expressão de Ang II ($p < 0,05$) em relação ao CA (fig. 9B) e concentração igual ao CA ($p = 0,083$). Além disso, o grupo AH apresentou maior ($p < 0,05$) expressão de e-NOS em relação aos

demais grupos experimentais (fig. 9D). Entretanto, não houve diferença na expressão de VCAM-1 entre os grupos ($p>0,05$) (fig. 9E). Apesar da aparente redução da expressão de MMP-9 para o grupo AF, este permaneceu igual ao controle aterogênico ($p>0,05$) e os grupos teste apresentaram valores iguais ($p>0,05$) ou inferiores ($p<0,05$) ao controle normal (fig. 9F).

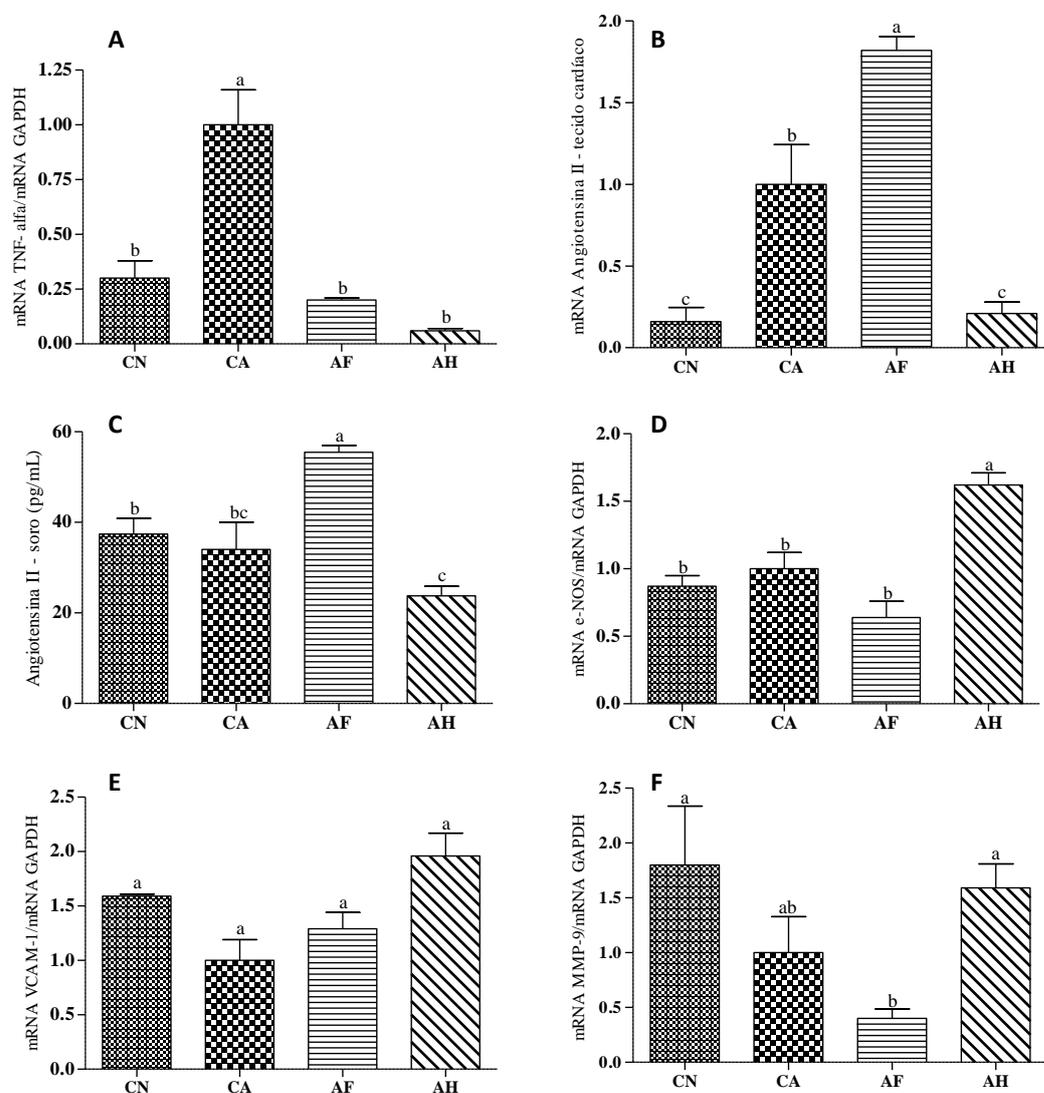


Figura 9. Expressão gênica do fator de necrose tumoral α (TNF- α) (A), de Angiotensina II no tecido cardíaco (B), quantificação de angiotensina II no soro (C), expressão de óxido nítrico sintase endotelial (e-NOS) (D), molécula de adesão celular-vascular-1 (VCAM-1) (E) e metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) (F) em camundongos alimentados com dieta aterogênica ($n=3$). CN: controle normal; CA: controle aterogênico; AF: dieta aterogênica + farinha de feijão; AH: dieta aterogênica + hidrolisado proteico. Diferentes letras indicam diferença pelo teste de Newman-Keuls ($p<0,05$).

5.4 Avaliação da saúde intestinal de camundongos alimentados com dieta aterogênica

A saúde intestinal pode ser avaliada de diversas formas, por meio de estudo histológico do intestino, produção de AGCC, avaliação do pH intestinal e da microbiota residente no intestino. No presente estudo, medidas histomorfométricas do cólon e o peso do ceco foram avaliados e, como mostrado na tabela 2, o grupo que recebeu farinha de feijão apresentou maior peso do ceco quando comparado aos demais grupos experimentais ($p < 0,05$). Em relação às medidas histológicas, a profundidade de criptas foi maior ($p < 0,05$) nos grupos que receberam dieta aterogênica em relação ao grupo CN. As camadas musculares circular e longitudinal nos grupos testes foi igual ao CA ($p > 0,05$) (tabela 2).

Tabela 2. Histomorfometria do cólon e peso do ceco de camundongos alimentados com dieta aterogênica.

	CN	Dieta aterogênica		
		CA	AF	AH
Peso do ceco (g)	0,26±0,06 ^b	0,29±0,06 ^b	0,49±0,14 ^a	0,33±0,06 ^b
Profundidade de criptas	71,92±13,89 ^b	97,26±8,22 ^a	88,80±8,11 ^a	87,35±6,17 ^a
CMC	44,51±8,84 ^a	40,67±5,56 ^a	39,93±6,56 ^a	39,34±6,41 ^a
CML	20,96±3,32 ^a	17,05±2,04 ^b	17,49±1,38 ^b	19,21±2,84 ^{ab}

CN: controle normal; CA: controle aterogênico; AF: dieta aterogênica + farinha de feijão; AH: dieta aterogênica + hidrolisado proteico; CMC: camada muscular circular (interna); CML: camada muscular longitudinal (externa) (n=8). Diferentes letras indicam diferença pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Com relação à produção de AGCC, observou-se que o grupo AF apresentou menor ($p < 0,05$) produção de ácido acético (fig. 11A) em relação ao CN e não se diferiu dos demais grupos com dieta aterogênica ($p > 0,05$). A produção de ácido propiônico (fig. 11B) nos grupos AF e AH foi igual ao grupo CA ($p > 0,05$) e menor ($p < 0,05$) que o grupo CN. A produção de ácido butírico (fig. 11C) não diferiu entre os grupos experimentais ($p > 0,05$).

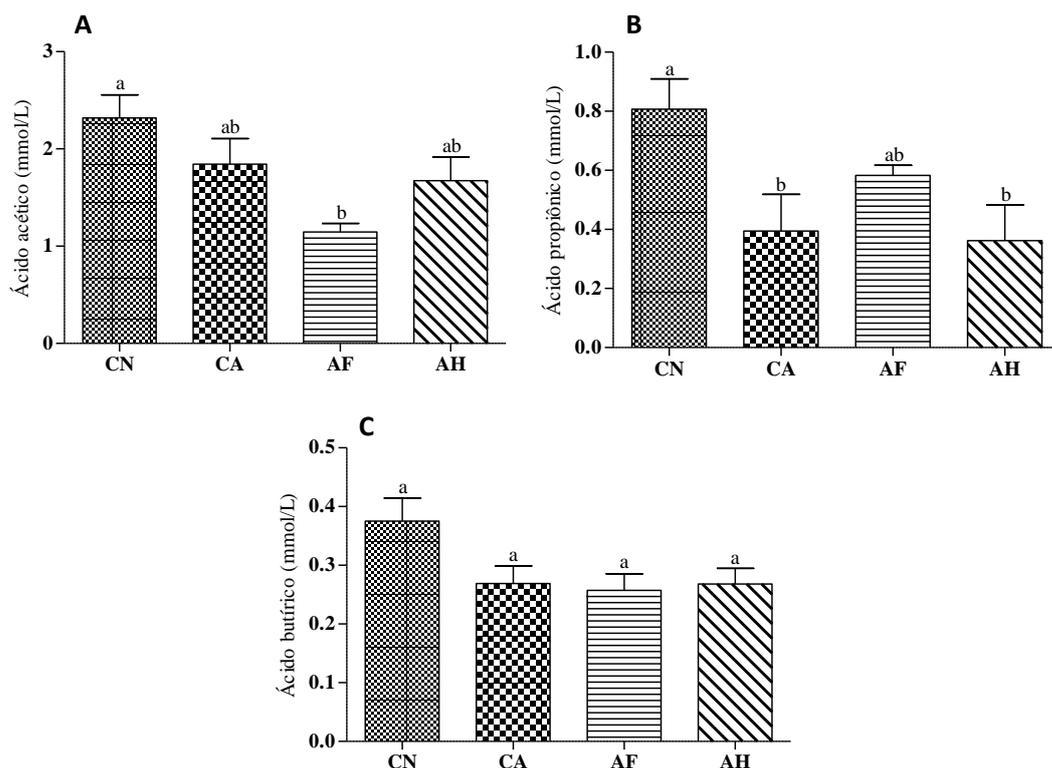


Figura 10. Concentração de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes de camundongos alimentados com dieta aterogênica (n=8). CN: controle normal; CA: controle aterogênico; AF: dieta aterogênica + farinha de feijão; AH: dieta aterogênica + hidrolisado proteico. Diferentes letras indicam diferença pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos da farinha integral de feijão cozido e de seu hidrolisado proteico na adiposidade, no metabolismo de lipídios e na função endotelial e intestinal de camundongos BALB/c alimentados com dieta aterogênica, devido ao conteúdo de compostos fenólicos na farinha e no hidrolisado proteico (LIMA, 2017), bem como a presença de peptídeos bioativos identificados no hidrolisado proteico, com ação antioxidante e anti-inflamatória, de redução do acúmulo de gordura em adipócitos e diminuição de processos aterogênicos *in vitro* (ALVES et al., 2016ab; MOJICA et al., 2016; TOLEDO et al., 2016).

Alguns estudos têm observado que o consumo de dieta rica em gordura saturada e açúcar, como a dieta aterogênica utilizada neste estudo, leva ao desenvolvimento de dislipidemias, obesidade, inflamação e aterosclerose (FERREIRA et al., 2016; MONGUCHI et al., 2017). O grupo que recebeu o hidrolisado proteico de feijão preveniu o ganho de peso e melhorou a adiposidade, mesmo com o consumo alimentar igual ao grupo CA na maioria das semanas de tratamento. Este resultado pode ser

devido à presença de peptídeos bioativos no hidrolisado com propriedades hipolipidêmicas e inibidoras de enzima DPP-IV, que exerce uma relação inversa com a liberação de incretinas e a inibição do apetite (TOLEDO et al., 2016; MOJICA et al., 2017). Os peptídeos bioativos inibidores de DPP-IV presentes no hidrolisado proteico possivelmente desempenham papel importante na atividade da GLP-1, estimulando a secreção de insulina, regulando a glicemia e retardando o esvaziamento gástrico. Diferente do grupo AH, o ganho de peso e a adiposidade de AF foi equiparado ao CA, provavelmente favorecido pela maior ingestão alimentar entre a quinta e a sétima semana de experimento bem como pelo aumento da profundidade das criptas observado nesse grupo. Scoaris et al. (2010) propôs uma relação entre o aumento da profundidade de criptas em animais que consomem dieta rica em gordura e o ganho de peso, o que poderia ter contribuído para o resultado do grupo AF, enquanto no grupo AH onde o ganho de peso foi prevenido pela ação dos peptídeos.

Além disso, a menor deposição de gordura visceral observada nos grupos que receberam dieta aterogênica pode ter ocorrido em função da composição da dieta. A dieta do grupo CN foi baseada na AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), que contém 76 % de carboidratos (CHO), quantidade superior às dietas aterogênica e aterogênica + farinha de feijão, que contém aproximadamente 45 % de CHO. Apesar da concentração de CHO para os grupos ser adequado para roedores adultos, a menor concentração deste macronutriente pode levar à menor deposição de gordura visceral e de triacilglicerídeos. Da mesma forma, a maior concentração deste macronutriente pode levar ao aumento da glicemia, observado no estudo de Lima (2017). Sabe-se que o consumo elevado de carboidratos a longo prazo leva ao ganho de peso, resistência à insulina e ao desequilíbrio do perfil de lipídios (KAWASAKI et al., 2005; FEIJO, 2010), alterações estas que foram observadas no presente estudo.

O consumo de hidrolisado proteico e de farinha de feijão preveniu a alteração nos níveis séricos de triacilglicerídeos e de colesterol total e o grupo AF reduziu LDL em relação ao controle aterogênico. Esta melhora no perfil de lipídios dos animais pode ser decorrente das propriedades hipolipidêmicas e antioxidantes dos fitoquímicos do feijão e de seu hidrolisado proteico (RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al., 2015), além da presença de inibidores de α -amilase e de fitohemaglutininas, que diminuem a absorção de carboidratos e regulam a digestão de gordura e de proteínas (SONG et al., 2016; FANTINI et al., 2009), bem como a presença de fibra solúvel na farinha de feijão, que absorve água formando um gel no intestino, cuja viscosidade dificulta a solubilidade das

moléculas de lipídios pela bile e que possivelmente contribuiu para prevenir o aumento de LDL no grupo AF. A dieta aterogênica promoveu redução dos níveis de HDL quando comparado ao CN e a presença de farinha de feijão no grupo AF e de hidrolisado proteico no grupo AH não preveniram esse efeito deletério, evidenciado na literatura pela gordura saturada e trans (gordura hidrogenada) (SBC, 2013).

O índice aterogênico (IA) no grupo AH não diferiu dos controles, entretanto, a farinha de feijão no grupo AF preveniu o aumento do IA, que permaneceu igual ao CN. O IA é uma estimativa de aterogenicidade da dieta estabelecida a partir dos valores de colesterol total e HDL. No grupo AH observamos uma tendência para a redução de HDL ($p=0,086$), que possivelmente impediu a redução do índice. Song et al. (2016) também observaram melhora do perfil de lipídios em camundongos suplementados com extrato de *P. vulgaris* (50 mg/kg) e alimentados com dieta *high-fat* durante 14 semanas, mostrando que os efeitos regulatórios no metabolismo de lipídios se deve aos compostos presentes na leguminosa, possivelmente os compostos fenólicos. A análise da farinha de feijão e do hidrolisado proteico realizada pelo nosso grupo de pesquisa identificou maior concentração de compostos fenólicos no hidrolisado que na farinha (1.025,6 e 140,0 $\mu\text{g EAG/g}$ de amostra, respectivamente) (LIMA, 2017), o que pode ter contribuído para o processo anti-inflamatório, observado pela menor expressão de TNF- α .

O desencadeamento de respostas inflamatórias mediante a ingestão de dieta aterogênica pode ser observada de diversas formas, tanto pela ativação de fator de transcrição e liberação de marcador pró-inflamatório como o TNF- α , quanto pela liberação de marcadores de adesão celular, como o VCAM-1. No presente estudo, a expressão de TNF- α diminuiu nos grupos tratados com a farinha de feijão e com o seu hidrolisado proteico, provavelmente em função da presença dos compostos fenólicos com ação antioxidante na farinha e no hidrolisado, que inibem a cascata inflamatória, bem como a ação dos peptídeos bioativos com ação anti-inflamatória e antioxidativa (VELVGPK), identificados por Alves et al. (2016b).

Ao avaliar a expressão do mRNA de Ang II (forma ativa) no tecido cardíaco observou-se redução no grupo AH e aumento no grupo AF, em relação ao CA. Além disso, a concentração de Ang II circulante reduziu no grupo que recebeu o hidrolisado proteico de feijão em relação ao CN, apesar de não diferir do CA ($p=0,083$). Alves et al. (2016b) identificaram sequências de peptídeos biologicamente ativas com ação hipotensora presentes no hidrolisado proteico do feijão carioca (BRSMG Madrepérola)

que possivelmente bloquearam a conversão de Ang I em Ang II. Os autores, ao caracterizar os peptídeos bioativos do feijão carioca (BRSMG Madrepérola), encontraram sequências com elevado potencial de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) (LVTTTVDL; QTSTPLFS; VELVGPK; TRGVLV - 81,6 %; 93,4 %; 99,9 % e 99,9 % de probabilidade, respectivamente), que possivelmente impediram a conversão de Ang I em Ang II no grupo AH, diminuindo a vasoconstrição. Corroborando com estes achados, Rui et al. (2013) encontraram peptídeos com capacidade inibitória da ECA ($60,9 \pm 3,8$ %) no hidrolisado proteico de feijão vermelho, indicando que essas leguminosas possuem elementos naturalmente capazes de modular o processo de homeostase vascular. No entanto, no grupo AF, tanto a expressão quanto a concentração de Ang II aumentaram. Possivelmente, as frações proteicas intactas da farinha de feijão, por estarem presentes em quantidade inferior que no hidrolisado proteico, não foram suficientes para inibir a ECA, pois de acordo com Rui et al. (2013) e Alves et al. (2016b), os peptídeos de menor massa molecular disponíveis no hidrolisado apresentam maior efeito sistêmico, uma vez que têm maior probabilidade de atravessar a barreira intestinal para exercer a sua bioatividade.

Além disso, Alves et al. (2016b) elucidaram que o grau de hidrólise de feijões frescos pré-cozidos (40 min.) bem como aqueles armazenados por seis meses não é afetado, o que nos revela a possibilidade de acesso aos peptídeos mesmo após essas condições. Apesar dos estudos que apontam as propriedades terapêuticas dos peptídeos bioativos de diversos tipos comercialmente disponíveis de feijões em inibir a ECA (RUI et al., 2013; MOJICA; CHEN; MEJÍA, 2015; ALVES et al., 2016a), vale ressaltar que são pesquisas que testam os hidrolisados proteicos *in vitro*. Quando se avalia os efeitos do hidrolisado proteico e do alimento da forma em que é consumido, em modelo *in vivo*, esses resultados podem não ser similares. Outro fator importante que influencia os resultados biológicos se trata da concentração dos alimentos teste que são fornecidos, no caso do hidrolisado, foi administrado 700 mg/Kg de peso corporal (MOJICA et al., 2017) diariamente, ou seja, nós garantimos que os animais ingerissem em média 28,4 mg de hidrolisado proteico por dia. Considerando o rendimento do hidrolisado proteico a partir da farinha de feijão, que é de 51,2 % (ALVES et al., 2016b) e considerando a concentração de 346,60 g de farinha/Kg de dieta no grupo AF, observamos que os animais deste grupo consumiam em média 1,8 g de farinha de feijão por dia, que equivale a 0,9 mg de proteína hidrolisada por dia. Temos ainda que considerar que o consumo de farinha de feijão a partir da dieta pode sofrer as variações no processo de

digestão e absorção, reduzindo a biodisponibilidade das frações ativas dos peptídeos e assim influenciar no efeito final do produto.

Como mecanismo regulatório, observou-se no presente estudo que a expressão de e-NOS no grupo AH foi maior que nos demais grupos experimentais, provavelmente em função da supressão da ECA, que estimulou e-NOS e aumentou a produção de ON tendendo ao aumento da vasodilatação. De La Rosa, et al. (2010) observaram ativação da e-NOS e aumento na produção de ON ao avaliar proteínas extraídas de cereais que também apresentam atividade inibitória da ECA. Além disso, possivelmente os peptídeos bioativos modularam outros mediadores da disfunção endotelial e da regulação da pressão arterial, sendo necessários outros estudos *in vivo*. No grupo AF, não observou-se diferença entre a expressão de e-NOS e os grupos controle, possivelmente, a bioatividade da e-NOS foi suprimida durante as alterações no endotélio, potencializando os efeitos negativos da disfunção endotelial e a hipertensão (DE LA ROSA, et al., 2010). Tom et al. (2002) propôs um mecanismo onde a inibição da ECA poderia aumentar a expressão de bradicinina (vasodilatador), bem como ativar a expressão de e-NOS com o intuito de aumentar o fluxo sanguíneo e regular a pressão arterial, o que poderia justificar os resultados do grupo AF e AH do presente estudo. A disfunção endotelial ocasionada pelos fatores de risco presentes na dieta, bem como o estresse oxidativo, leva à expressão de moléculas de adesão como VCAM-1. No presente estudo, a expressão de VCAM-1 não diferiu entre os tratamentos. A redução da expressão de TNF- α nos grupos AF e AH, de certa forma, apresentou um efeito protetor da adesão celular e da oxidação da LDL, impedindo a progressão de eventos pró-aterogênicos, como a expressão de VCAM-1. Além disso, o período experimental possivelmente não foi suficiente para alterar as moléculas de adesão da mesma forma que observamos para o marcador inflamatório.

A expressão de MMP-9 reduziu no grupo AF em relação ao CN, apesar de não se diferir do CA, enquanto a expressão no grupo AH permaneceu igual aos controles CN e CA. Possivelmente, tanto a farinha de feijão quanto o hidrolisado proteico apresentaram efeito anti-inflamatório e anti-aterosclerótico, porém, atuaram em fases diferentes do processo de alteração endotelial, modulando marcadores distintos. O grupo AF demonstrou melhor resultado na expressão do MMP-9, além da redução do índice aterogênico.

Em decorrência da dieta aterogênica, alterações na função intestinal afetam uma série de fatores no organismo, apesar destes efeitos serem minimizados pela presença de

fibras alimentares. Como pudemos observar, o peso do ceco foi maior no grupo AF em comparação aos demais grupos. A dieta AF possui maior conteúdo de fibra alimentar solúvel em função da presença da farinha de feijão (2,51 e 15,38 g/100 g de fibra alimentar solúvel e insolúvel, respectivamente) (LIMA, 2017), as quais exercem efeitos importantes sobre a solubilidade e viscosidade do bolo fecal no intestino, podendo ser estimulantes ou inibitórios da sua distensão, peso e motilidade (MORAES; COLLA, 2006). Além disso, foi observado o aumento da profundidade de criptas nos grupos alimentados com a dieta aterogênica em relação ao CN, havendo uma relação entre o consumo de dieta hiperlipídica e o aumento da profundidade de criptas no intestino (ANDRADE et al., 2013; SCOARIS et al., 2010). No presente estudo, não foi observado diferença na espessura das camadas musculares do cólon nos grupos AF e AH em relação ao CA. Normalmente, a maior quantidade de fibra alimentar insolúvel na dieta aumenta a motilidade intestinal e o volume fecal, tendendo ao aumento da espessura das camadas musculares (MORAES; COLLA, 2006), entretanto, isto não foi observado. O tipo de fibra na dieta também pode influenciar a produção de AGCC, entretanto, os tratamentos com feijão não afetaram a produção dos ácidos orgânicos. Estudos com foco na microbiota intestinal, que possam avaliar as mudanças que ocorrem em detrimento aos padrões alimentares são necessários, a fim de esclarecer se os tratamentos com feijão carioca e seu hidrolisado proteico alteram as bactérias colonizadoras do trato gastrointestinal e a produção de AGCC.

7. CONCLUSÃO GERAL

O hidrolisado proteico de feijão reduziu as medidas biométricas e o consumo alimentar dos animais e a farinha de feijão modulou positivamente o metabolismo de lipídios. Tanto o hidrolisado quanto a farinha de feijão apresentaram atividade hipolipidêmica. O hidrolisado proteico preveniu a inflamação possivelmente pela ação dos fitoquímicos e dos peptídeos bioativos presentes, além de prevenir a vasodilatação por meio da diminuição de Ang II e aumento da expressão de e-NOS, associado à produção de ON, reduzindo o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Este trabalho abre uma nova linha de investigação *in vivo* sobre os efeitos preventivos da ingestão de farinha integral de feijão carioca e de seu hidrolisado proteico na inflamação e na disfunção endotelial e associa a especificidade dos peptídeos do feijão com o controle do ganho de peso, metabolismo de lipídios e com a homeostase vascular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROLINK. **Produção e suprimento mundial de feijão**. 2013. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/colunistas/producao-e-suprimento-mundial-de-feijao_386836.html>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2017.
- AI, Y.; CICHY, K. A.; HARTE, J. B.; KELLY, J. D.; NG, P. K. Effects of extrusion cooking on the chemical composition and functional properties of dry common bean powders. **Food chemistry**, v. 211, p. 538-545, 2016.
- ALOU, M. T.; LAGIER, J. C.; RAOULT, D. Diet influence on the gut microbiota and dysbiosis related to nutritional disorders. **Human Microbiome Journal**, v. 1, p. 3-11, 2016.
- ALVES, N. E. G. **Efeito do armazenamento de feijões carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre a composição nutricional e fitoquímica e propriedades anti-inflamatória e antiaterosclerótica de seus hidrolisados proteicos em células de macrófagos humanos**. [Tese] Universidade Federal de Viçosa-UFV, Viçosa. 2017.
- ALVES, N. E. G.; DE MEJÍA, E. G.; VASCONCELOS, C. M.; BASSINELLO, P. Z.; MARTINO, H. S. D. Postharvest storage of Carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.) did not impair inhibition of inflammation in lipopolysaccharide-induced human THP-1 macrophage-like cells. **Journal of Functional Foods**, n. 23, p. 154-166, 2016b.
- ALVES, N. E.; VASCONCELOS, C. M.; BASSINELLO, P. Z.; DE MEJIA, E. G.; MARTINO, H. S. D. Digested protein isolate from fresh and stored Carioca beans reduced markers of atherosclerosis in oxidized LDL-induced THP-1 macrophages. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 97-111, 2016a.
- ANANDHI, R.; THOMAS, P. A.; GERALDINE, P. Evaluation of the anti-atherogenic potential of chrysin in Wistar rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 385, p. 103-113, 2014.
- ANDRADE, G. F., et al. The addition of whole soy flour to cafeteria diet reduces metabolic risk markers in Wistar rats. **Lipids in health and disease**, v. 12, n.1, p. 145, 2013.
- BAHIA, L., et al. Endotélio e aterosclerose. **Revista da SOCERJ**. v. 17, n.1, p. 26-32, 2004.
- BAZZANO, L. A. et al. Non-soy legume consumption lowers cholesterol levels: a metaanalysis of randomized controlled trials. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.**, v. 21, p. 94-103, 2011.
- BENAVIDES, F. J.; GUÉNET, J. Manual de Genética de Roedores de Laboratorio, Principios Básicos y Aplicaciones. (2003). Cap. La transgénesis y la clonación en los roedores de laboratorio, p: 227-262.
- BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n.4, p. 527-528, 1968.

BHAT, O. M. et al. Interleukin-18-induced atherosclerosis involves CD36 and NF- κ B crosstalk in Apo E^{-/-} mice. **Journal of cardiology**, v. 66, n. 1, p. 28-35, 2015.

BORGES, L. G. **Função endotelial e a sua relação com a composição da placa aterosclerótica**. 64 f. [Dissertação] Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Universidade de Lisboa. Portugal, 2009.

BUI, Q. T.; PREMPEH, M.; WILENSKY, R. L. Atherosclerotic plaque development. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, p. 2109-13, 2009.

CAESAR, R.; TREMAROLI, V.; KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; CANI, P. D.; BÄCKHED, F. Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT inflammation through TLR signaling. **Cell metabolism**, v. 22, p. 658-668, 2015.

CAM, A.; DE MEJIA, E. G. Role of dietary proteins and peptides in cardiovascular disease. **Molecular nutrition & food research**, v. 56, p. 53-66, 2012.

CARDONA, F.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; TULIPANI, S.; TINAHONES, F. J.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 24, p. 1415-22, 2013.

CASTRO GUERRERO, N. A.; ISIDRA ARELLANO, M. C.; MENDOZA COZATL, D. G.; VALDÉS LÓPEZ, O. Common Bean: A Legume Model on the Rise for Unraveling Responses and Adaptations to Iron, Zinc, and Phosphate Deficiencies. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1-7, 2016.

CAVALIERE, G. A. **Fontes de sorgo e concentração de taninos**. [Tese]. Universidade Federal de São Carlos (UFScar) – São Paulo, SP. 2013.

CHISTIYAKOV, D. A.; BOBRYSHV, Y. V.; KOZAROV, E.; SOBENIN, I. A.; OREKHOV, A. N. Role of gut microbiota in the modulation of atherosclerosis-associated immune response. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

COLINA-COCA, C. et al. Effects of hypercholesterolemic diet enriched with onion as functional ingredient on fatty acid metabolism in Wistar rats. **Food Research International**, v. 64, p. 546-552, 2014.

D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

DAVIGNON, J.; GANZ, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, v. 109, p. III27-III32, 2004.

DE ANDRADE, D. O.; DE OLIVEIRA SANTOS, S. P.; VILELA-MARTIN, J. F.. Inflamação, disfunção endotelial e eventos agudos na hipertensão arterial. **Hipertensão**, v. 21, n.3, p. 129-133, 2014.

DE CAMARGO, A. C., et al. Low molecular weight phenolics of grape juice and winemaking byproducts: Antioxidant activities and inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein cholesterol and DNA strand breakage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n.50, p. 12159-12171, 2014.

- DE LA ROSA, A. P. B., et al. Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: antihypertensive role of amaranth peptides. **Nitric Oxide**, v. 23, n. 2, p. 106-111, 2010.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.
- DIAS, D. M.; MOREIRA, M. E. C.; GOMES, M. J. C.; LOPES TOLEDO, R. C.; NUTTI, M. R.; PINHEIRO SANT'ANA, H. M.; MARTINO, H. S. D. Rice and bean targets for biofortification combined with high carotenoid content crops regulate transcriptional mechanisms increasing iron bioavailability. **Nutrients**, v. 7, p. 9683-9696, 2015.
- DIAS, R. G.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, M. H. Óxido nítrico e sistema cardiovascular: ativação celular, reatividade vascular e variante genética. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 96, n.1, p. 68-75, 2011.
- DOMINGUEZ-USCANGA, A.; LOARCA-PIÑA, G.; DE MEJIA, E. G. Baked corn (*Zea mays* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) snack consumption lowered serum lipids and differentiated liver gene expression in C57BL/6 mice fed a high-fat diet by inhibiting PPAR γ and SREBF2. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 50, p. 1-15, 2017.
- DOUGHAN, A. K.; HARRISON, D. G.; DIKALOV, S. I. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction. **Circulation research**, v. 102, n.4, p. 488-496, 2008.
- EBRAHIMIAN, T. et al. Absence of four-and-a-half LIM domain protein 2 decreases atherosclerosis in ApoE $^{-/-}$ Mice. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 114, n. 114, 2015.
- EISENBERG, S.; LEVY, R. I. Lipoprotein metabolism. **Advances in Lipid Research**, v. 13, 1975.
- FANTINI, N., et al. Reducing effect of a *Phaseolus vulgaris* dry extract on food intake, body weight, and glycemia in rats. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n.19, p. 9316-9323, 2009.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT. Crop statistics**. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2017.
- FEIJO, F. M. **Efeito da suplementação com sacarina e sacarose no ganho de peso e consumo energético em ratos Wistar com dieta não restrita**. [dissertação] Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRS, Porto Alegre, 2010.
- FERKET, P.R. Alternatives to antibiotics in poultry production: responses, practical experience and recommendations. **Proceedings of Alltech's Annual Symposium**, Lexington, USA, p. 54-67, 2004.
- FERREIRA, P. A., et al. Considerações sobre a dieta AIN-93M elaborada para modelos biológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 3, n. 2, p. 103-108, 2016.

- GARRIDO, A. M.; GRIENGLING, K. K. NADPH oxidases e sinalização do receptor de angiotensina II. **Endocrinologia molecular e celular**, v. 302, n. 2, p. 148-158, 2009.
- GOFFREDO, M. et al. Role of gut microbiota and short chain fatty acids in modulating energy harvest and fat partitioning in youth. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 101, p. 4367-4376, 2016.
- HAYAT, I.; AHMAD, A.; MASUD, T.; AHMED, A.; BASHIR, S. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, p. 580-592, 2014.
- HERNÁNDEZ-SALAZAR, M. et al. In vitro fermentability and antioxidant capacity of the indigestible fraction of cooked black beans (*Phaseolus vulgaris* L.), lentils (*Lens culinaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 9, p. 1417-1422, 2010.
- HUSAIN, K., et al. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. **World journal of biological chemistry**, v. 6, n.3, p. 209, 2015.
- JEW, S. et al. Nutrient essentiality revisited. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 203-209, 2015.
- JONES, P. J. H.; KUBOW, S. Lipídios, esteróis e seus metabólitos. In: SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 9ª Ed. Barueri – SP: Manole, cap. 4, p. 71-101, 2003.
- JORIS, I., et al. Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. I. Adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats. **The American Journal of Pathology**, v. 113, p. 341-358, 1983.
- KACZMARCZYK, M. M.; MILLER, M. J.; FREUND, G. G. The health benefits of dietary fiber: beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. **Metabolism**, v. 61, p. 1058-1066, 2012.
- KANG, Moo Rim, et al. Cardiovascular protective effect of glabridin: Implications in LDL oxidation and inflammation. **International immunopharmacology**, n. 29, v. 2, p. 914-918, 2015.
- KAWASAKI, T., et al. Long-term sucrose-drinking causes increased body weight and glucose intolerance in normal male rats. **Br J Nutr.**, v. 93, n. 5, p. 613-8, 2005.
- KILNER, J. et al. A proteomic analysis of differential cellular responses to the short-chain fatty acids butyrate, valerate and propionate in colon epithelial cancer cells. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 4, p. 1146-1156, 2012.
- KIM, J. H. et al. Anti-obesity effect of extract from fermented *Curcuma longa* L. through regulation of adipogenesis and lipolysis pathway in high-fat diet-induced obese rats. **Food & nutrition research**, v. 60, n.1, p. 30428, 2016.
- KUNIEDA, T. Angiotensin II Induces Premature Senescence of Vascular Smooth Muscle Cells and Accelerates the Development of Atherosclerosis via a p21-Dependent Pathway. **Vascular Medicine – Circulation**, v. 114, p. 953-960, 2006.

- LAWERS, A.; SCHARPÉ, S. *Pharmaceutical Enzymes (Drugs and the Pharmaceutical Sciences (1st Ed))*. New York-Basel-Hong Kong: Marcel Dekker, Inc. 1997.
- LI, G. et al. Antihypertensive effect of alcalase generated mung bean protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats. **European Food Research and Technology**, v. 222, n. 5-6, p. 733-736, 2006.
- LI, G. et al. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, n. S1, p. 275-280, 2007.
- LIBBY, P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 456S-460S, 2006.
- LIMA, E. S.; COUTO, R. D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 169-78, 2006.
- LIMA, S. L. S. **Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.): ação do armazenamento sobre a composição nutricional e efeito da farinha integral e de seu hidrolisado proteico no estresse oxidativo e na inflamação em camundongos Balb/c alimentados com dieta hipercolesterolêmica**. [dissertação] Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa. 2017.
- LIU, Y. M., et al. Osteopontin gene expression in the aorta and the heart of propylthiouracil-induced hypothyroid mice. **Journal of biomedical science**, v. 12, n. 6, p. 869-880, 2005.
- LUNA-VITAL, D. A.; MOJICA, L.; DE MEJÍA, E. G.; MENDOZA, S.; LOARCA-PIÑA, G. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. **Food Research International**, v. 76, p. 39-50, 2015.
- MA, Y.; YABLUCHANSKIY, A.; HALL, M. E.; LINDSEY, M. L. Using plasma matrix metalloproteinase-9 and monocyte chemoattractant protein-1 to predict future cardiovascular events in subjects with carotid atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 232, p. 231–233, 2014.
- MALAFAIA, A. B., et al. Obesity induction with high fat sucrose in rats. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 26, p. 17-21, 2013.
- MARANHÃO, R. C.; FREITAS, F. R. HDL metabolism and atheroprotection: predictive value of lipid transfers. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 65, p. 1-41, 2014.
- MARTELLI, A. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona e Homeostase Cardiovascular. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 12, n. 4, p. 51-5, 2010.
- MARTINO, H. S. D., et al. Nutritional and Bioactive Compounds of Bean: Benefits to Human Health. In: TUNICK, M. H.; MEJÍA, E. G. D. **Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds**. Pennsylvania: American Chemical Society, v.1109, 2012. Nutritional and Bioactive Compounds of Bean: Benefits to Human Health, p.233-258.

- MARVENTANO, S. et al., Legume consumption and CVD risk: a systematic review and meta-analysis. **Public Health Nutrition**, v. 20, p. 245-254, 2017.
- MCBURNEY, M. I.; THOMPSON, L. U. Effect of human fecal inoculums on *in vitro* fermentation variables. **Br J Nutr**, v. 58, p. 233–243, 1987.
- MEGÍAS, C.; YUST, M.; PEDROCHE, J.; LQUARI, H.; GIRON-CALLE, J.; ALAIZ, M. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. **J Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 1928-1932, 2004.
- MOJICA, L., et al. Evaluation of the hypoglycemic potential of a black bean hydrolyzed protein isolate and its pure peptides using *in silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches. **Journal of Functional Foods**, v. 31, p. 274-286, 2017.
- MOJICA, L.; CHEN, K.; MEJÍA, E. G. Impact of Commercial Precooking of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) on the Generation of Peptides, After Pepsin–Pancreatin Hydrolysis, Capable to Inhibit Dipeptidyl Peptidase-IV. **Journal of food science**, v. 80, n.1, 2015.
- MOJICA, L.; LUNA-VITAL, D. A.; GONZÁLEZ DE MEJÍA, E. Characterization of peptides from common bean protein isolates and their potential to inhibit markers of type-2 diabetes, hypertension and oxidative stress. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2016.
- MONGUCHI, T., et al. Excessive intake of trans fatty acid accelerates atherosclerosis through promoting inflammation and oxidative stress in a mouse model of hyperlipidemia. **Journal of Cardiology**, 2017.
- MONK, J. M., et al. Diets enriched with cranberry beans alter the microbiota and mitigate colitis severity and associated inflammation. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 28, p. 129-139, 2016.
- MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **REF** [periódico na internet] v.3, n.2, p.99-112, 2006.
- MURASE, T. et al. Cardiac remodeling and diastolic dysfunction in DahlS. Z-Lepr fa/Lepr fa rats: a new animal model of metabolic syndrome. **Hypertension Research**, v. 35, n. 2, p. 186, 2012.
- NAKITTO, A. M.; MUYONGA, J. H.; NAKIMBUGWE, D. Effects of combined traditional processing methods on the nutritional quality of beans. **Food science & nutrition**, v. 3, p. 233-241, 2015.
- NATAL, D. I. G. et al. Ubá mango juice intake decreases adiposity and inflammation in high-fat diet-induced obese Wistar rats. **Nutrition**, v. 32, p.1011 - 1018, 2016.
- NICHOLLS, S. J., et al. Impact of statins on progression of atherosclerosis: rationale and design of SATURN (Study of Coronary Atheroma by InTravascular Ultrasound: effect of Rosuvastatin versus AtorvastatiN). **Current medical research and opinion**, v. 27, p. 1119-1129, 2011.
- NORATTO, G. et al. Consumption of polyphenol-rich peach and plum juice prevents risk factors for obesity-related metabolic disorders and cardiovascular disease in Zucker rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 26, n. 6, p. 633-641, 2015.

OLIVEIRA, A. M.; HAMMES, T. O. Microbiota e barreira intestinal: implicações para obesidade. **Clinical and biomedical research**. v. 36, n. 4, p. 222-229, 2016.

ONUH, J. O., et al. Kinetics of in vitro renin and angiotensin converting enzyme inhibition by chicken skin protein hydrolysates and their blood pressure lowering effects in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 133-143, 2015.

OPAS/OMS. Organização Pan-Americana da Saúde/ Organização Mundial da Saúde. **Determinantes Sociais e Riscos para a Saúde, Doenças Crônicas não Transmissíveis e Saúde Mental. Doenças Cardiovasculares**. 2016. Disponível em >http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=839. Acesso em: 18 de dezembro de 2017.

PANDA, S.; KAR, A. Guggulu (*Commiphora mukul*) potentially ameliorates hypothyroidism in female mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 78–80, 2005.

PANDA, S.; KAR, A.; PATIL, S. Soy sterols in the regulation of thyroid functions, glucose homeostasis and hepatic lipid peroxidation in mice. **Food Research International**, v. 42, p. 1087–1092, 2009.

PELLIZZON, M. A. Diet-induced atherosclerosis/hypercholesterolemia in rodent models. **Brief scientific Literature Review**, 2008.

POBER, J. S. e SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 803-15, 2007.

POF - PESQUISA DE ORÇAMENTOS FAMILIARES. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009 : análise do consumo alimentar pessoal no Brasil** / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. 150 p.

RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A. K., et al. Potential role of bioactive compounds of *Phaseolus vulgaris* L. on lipid-lowering mechanisms. **Food Research International**, v. 76, p. 92-104, 2015.

REEVES P. G., NIELSEN F. H., FAHEY JR., 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-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939–1951, 1993.

REILLY , K. J.,ROMBEAU, J.L. Metabolism and potential clinical applications of short-chain fatty acids. **Clinical Nutrition**. v.12, p. S97-S105, 1993.

ROSA, C. O. et al. The cholesterol-lowering effect of black, cariouinha and red beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in hypercholesterolemic rats. **Arch Latinoam Nutr.**, v. 48, p. 306–310, 1998.

RUI, X., et al. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides of small red bean (*Phaseolus vulgaris*) hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n.3, p. 1116-1124, 2013.

SAKAKIBARA, S., YAMAUCHI, T., OSHIMA, Y., TSUKAMOTO., Y., KADOWAKI, T. Acetic acid activates hepatic AMPK and reduces hyperglycemia in

diabetic KK-A(y) mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.344, p. 597-604, 2006.

SBC. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose**: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, Supl. 1, p. 1-22, 2013.

SCHLOSS, P. D., et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SCOARIS, C. R., et al. Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. **Nutrition**, v. 26, n.3, p. 312-320, 2010.

SCOTT, J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. **Current opinion in genetics & development**, v. 14, n. 3, p. 271-279, 2004.

SHI, F., et al. Hypolipidemic effect and protection ability of liver-kidney functions of melanin from Lachnum YM226 in high fat diet fed mice. **Food & Function**, 2017.

SMIRICKY-TJARDES, M. R., et al. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. **Journal of animal science**, v. 81, n.10, p. 2535-2545, 2003.

SONG, H., et al. Dietary *Phaseolus vulgaris* extract alleviated diet-induced obesity, insulin resistance and hepatic steatosis and alters gut microbiota composition in mice. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 236-244, 2016.

STEYERS, C. M.; MILLER, F. J. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 7, p. 11324-11349, 2014.

SU, C. et al. L-carnitine ameliorates dyslipidemic and hepatic disorders induced by a high-fat diet via regulating lipid metabolism, self-antioxidant capacity, and inflammatory response. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 497-508, 2015.

TOLEDO, M. E. O., et al. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein-derived peptides increased insulin secretion, inhibited lipid accumulation, increased glucose uptake and reduced the phosphatase and tensin homologue activation *in vitro*. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 160-177, 2016.

TOLEDO, M. E. O.; DE MEJIA, E. G.; SIVAGURU, M.; AMAYA-LLANO, S. L. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein-derived peptides increased insulin secretion, inhibited lipid accumulation, increased glucose uptake and reduced the phosphatase and tensin homologue activation *in vitro*. **Journal of Functional Foods**, n. 27, p. 160-177, 2016.

TOLEDO, T. C. F.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Avaliação química e nutricional do feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) cozido por diferentes métodos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, 2008.

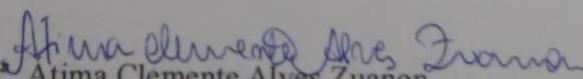
- TOM, B., et al. Bradykinin potentiation by ACE inhibitors: a matter of metabolism. **British journal of pharmacology**, v. 137, n. 2, p. 276-284, 2002.
- TSUTSUMI, K.; HAGI, A.; INOUE, Y. The relationship between plasma high density lipoprotein cholesterol levels and cholesteryl ester transfer protein activity in six species of healthy experimental animals. **Biol Pharm Bull.**, v. 24, p. 579–581, 2001.
- VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G., et al. Tendências da frequência do consumo de feijão por meio de inquérito telefônico nas capitais brasileiras, 2006 a 2009. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, p. 3363-3370, 2012.
- WEBER, C.; NOELS, H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. **Nature medicine**, v. 17, p. 1410-1422, 2011.
- WEISS, G. A.; HENNET, T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-19, 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control**. Geneva: 2011. 153 p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. Geneva: 2014. 302 p.
- YOSHIDA, Hiroshi; KISUGI, Reiko. Mechanisms of LDL oxidation. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 23-24, p. 1875-1882, 2010.
- ZHU, Z.; JIANG, W.; THOMPSON, H. J. Edible dry bean consumption (*Phaseolus vulgaris* L.) modulates cardiovascular risk factors and diet-induced obesity in rats and mice. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. S1, p. S66-S73, 2012.

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 97/2015, intitulado "Feijão comum *Phaseolus vulgaris* L.: efeito do armazenamento sobre a composição nutricional e resposta hipolipemiante e hipocolesterolêmica da farinha integral, hidrolisado e peptídeo bioativo em ratos", coordenado pela professora Hércia Stampini Duarte Martino do Departamento de Nutrição e Saúde, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 04/03/2016, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 97/2015, named "Common bean *Phaseolus vulgaris* L.: effect of storage on the nutritional composition and lipid-lowering response and hypocholesterolemic the whole meal, hydrolyzed and bioactive peptide in rats", is in agreement with the a actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on March 04, 2016 valid for 12 months.


Prof. Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV