

SUELY TEREZINHA XAVIER VALENTE

EFEITO DE CORANTES NATURAIS NOS NÍVEIS DE COLESTEROL E  
TRIACILGLICERÓIS SÉRICOS EM RATOS HIPERLIPIDÊMICOS

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Curso de Agroquímica,  
para obtenção do título de “*Magister  
Scientiae*”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
JULHO - 1998

SUELY TEREZINHA XAVIER VALENTE

EFEITO DE CORANTES NATURAIS NOS NÍVEIS DE COLESTEROL E  
TRIACILGLICERÓIS SÉRICOS EM RATOS HIPERLIPIDÊMICOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Agroquímica, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

APROVADA: 22 de dezembro de 1997.

---

Prof<sup>ª</sup> Tânia Toledo de Oliveira  
(Conselheira)

---

Prof. Tanus Jorge Nagem  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>ª</sup> Maria Eliana L.R. Queiróz

---

Prof. José Humberto de Queiróz

---

Prof<sup>ª</sup> Cremilda Rosa da Silva  
(Orientadora)

Ao meu marido Francisco.

Aos meus filhos Flávia, Rafael e Raquel.

À minha mãe Marina, com saudades.

## **AGRADECIMENTO**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e Departamento de Tecnologia de Alimentos, com os quais muito pude aprender durante nosso convívio.

Um agradecimento especial aos professores Cremilda Rosa da Silva, Tania Toledo de Oliveira, Tanus Jorge Nagem, Maria Eliana L.R. Queiróz e José Humberto de Queiróz, pela atenção dispensada.

À Empresa CHr. Hansen Ind. e Comércio Ltda., pelo fornecimento dos corantes naturais testados neste trabalho.

À professora Neuza Maria Brunoro Costa, do Departamento de Nutrição e Saúde, e ao professor Efraim Lázaro Reis, do Departamento de Química da UFV, que permitiram a utilização dos seus laboratórios para a realização da parte experimental.

Aos colegas do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa Aplicada (NIPA), especialmente a Reinaldo, Marley, Silvia e Kelly, e à funcionária Maria José da Silva Lessa, do Departamento de Nutrição e Saúde, pela ajuda na condução dos experimentos.

Aos meus pais e às amigas Márcia, Penha, Cláudia e Silvana, pelo carinho e pelo constante incentivo.

## **BIOGRAFIA**

SUELY TEREZINHA XAVIER VALENTE, filha de Orivaldo Costa Xavier e Marina Therezinha Amorim Xavier, nasceu em Juiz de Fora, Estado de Minas Gerais, em 1<sup>o</sup> de fevereiro de 1958.

Em março de 1976, iniciou o curso de graduação em Farmácia - Bioquímica na Universidade Federal de Juiz de Fora, concluindo-o em dezembro de 1979.

Em março de 1995, iniciou o curso de Mestrado em Agroquímica na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em dezembro de 1997.

## CONTEÚDO

	Página
LISTA DE QUADROS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	x
EXTRATO .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Colesterol e seu metabolismo .....	3
2.1.1. Biossíntese do colesterol .....	4
2.1.2. Catabolismo - conversão de colesterol a sais biliares .....	9
2.1.3. Absorção intestinal do colesterol .....	13
2.1.4. Transporte de colesterol - lipoproteínas plasmáticas	14
2.1.4.1. Transporte de lipídios exógenos .....	17
2.1.4.2. Transporte de lipídios endógenos .....	21
2.1.4.3. Transporte reverso de colesterol (metabolismo de HDL).....	27
2.2. Corantes naturais .....	30

	Página
2.2.1. Corante cúrcuma .....	30
2.2.2. Corante antocianina.....	40
2.2.3. Corante carmim .....	51
2.2.4. Corante monascus .....	62
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	69
3.1. Origem e manutenção dos animais.....	69
3.2. Corantes naturais testados .....	70
3.2.1. Corante natural de cúrcuma em pó.....	70
3.2.2. Corante natural de antocianina em pó.....	70
3.2.3. Corante carmim .....	71
3.2.4. Corante monascus .....	72
3.3. Triton WR-1339 .....	72
3.4. Delineamento experimental.....	72
3.4.1. Experimento I: avaliação de efeito da dose de 40 mg dos corantes naturais em ratos pré-tratados com Triton WR - 1339.....	73
3.4.1.1. Procedimento experimental.....	73
3.4.1.2. Dosagens bioquímicas .....	74
3.4.2. Experimento II: avaliação do efeito da dose de 80 mg dos corantes naturais em ratos pré-tratados com Triton WR-1339.....	76
3.4.2.1. Procedimento experimental.....	76
3.4.2.2. Dosagens bioquímicas .....	77
3.5. Análise estatística .....	77
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	78
4.1. Efeito dos corantes cúrcuma, antocianina, carmim e monascus nos níveis de colesterol total sérico.....	78
4.2. Efeito dos corantes cúrcuma, antocianina, carmim e monascus nos níveis de HDL-colesterol sérico .....	84
4.3. Efeito dos corantes cúrcuma, antocianina, carmim e monascus nos níveis de triacilgliceróis séricos.....	86

5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

## LISTA DE QUADROS

		Página
1	Principais características das lipoproteínas plasmáticas, em humanos .....	16
2	Características das apoproteínas .....	18
3	Taxonomia do gênero <i>Monascus</i> (espécies reconhecidas e sinônimos correspondentes).....	64
4	Descrição dos tratamentos aplicados aos animais nos experimentos I e II.....	76
5	Resumo das análises de variância conjunta dos dados obtidos nas dosagens de colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis séricos. Experimentos I e II .....	79
6	Valores médios de colesterol total sérico (mg/dL) obtidos com os tratamentos aplicados aos animais nos experimentos I e II, 48 horas após a indução da hiperlipidemia.....	79
7	Valores médios de HDL-colesterol sérico (mg/dL) obtidos com os tratamentos aplicados aos animais	

	nos experimentos I e II, 48 horas após a indução da hiperlipidemia.....	84
		Página
8	Valores médios de triacilgliceróis (mg/dL) obtidos com os tratamentos aplicados aos animais nos experimentos I e II, 48 horas após a indução da hiperlipidemia .....	87

## LISTA DE FIGURAS

	Página
1	Via de biossíntese do colesterol..... 5
2	Conversão de colesterol a sais biliares ..... 10
3	Desenho esquemático do metabolismo de LDL (captação e internalização da partícula por receptores específicos) ..... 24
4	Esquema geral do metabolismo de lipoproteínas ..... 30
5	Estrutura dos pigmentos curcuminóides identificados na <i>Curcuma longa</i> L..... 34
6	Estruturas de antocianidinas de ocorrência natural..... 43
7	Transformações estruturais das antocianinas em função do pH..... 46
8	Estrutura do ácido carmínico e de alguns outros pigmentos de insetos da superfamília Coccoidea..... 53

	Página
9	Quelato alumínico do ácido carmínico (provável estrutura)..... 57
10	Estruturas dos pigmentos produzidos por fungos do gênero <i>Monascus</i> ..... 65
11	Estrutura do Triton WR-1339 (Tyloxapol)..... 73
12	Porcentagens médias de redução dos níveis de colesterol total sérico com os tratamentos aplicados aos animais, nos experimentos I e II ..... 80
13	Porcentagens médias de redução dos níveis de HDL-colesterol sérico com os tratamentos aplicados aos animais, nos experimentos I e II..... 85
14	Porcentagens médias de redução dos níveis de triacilgliceróis séricos com os tratamentos aplicados aos animais, nos experimentos I e II ..... 87

## EXTRATO

VALENTE, Suely Terezinha Xavier, M. S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 1998. **Efeito de corantes naturais nos níveis de colesterol e triacilgliceróis séricos em ratos hiperlipidêmicos.** Orientadora: Cremilda Rosa Silva. Conselheiros: Tania Toledo de Oliveira e Tanus Jorge Nagem.

Propriedades fisiológicas e farmacológicas dos princípios ativos de corantes naturais comumente utilizados como aditivos alimentares têm sido demonstradas em alguns estudos. Com o objetivo de avaliar o efeito dos corantes naturais cúrcuma, antocianina (cascas de uva), carmim e monascus nos níveis de colesterol e triacilgliceróis sangüíneos, dois experimentos foram realizados com ratos hiperlipidêmicos. Os corantes fornecidos por via oral a ratos albinos, da raça Wistar, com peso médio inicial de 225 g, foram avaliados no experimento I, na dose de 40 mg, e no experimento II, na dose de 80 mg. Para indução da hiperlipidemia, os animais foram previamente tratados com Triton WR-1339, na dose de 300 mg/kg de peso corporal, por via intraperitoneal. Os resultados, verificados 48 horas após a aplicação de Triton-WR-1339, mostraram que a administração dos

corantes cúrcuma, antocianina, carmim e monascus resultou em diminuição significativa dos níveis de colesterol total sérico, com as duas doses testadas, verificando-se maior efeito de redução com a dose de 80 mg. Os níveis de HDL-colesterol também mostraram-se reduzidos significativamente com a administração dos quatro corantes, nas doses testadas. A dose de 80 mg apresentou também maior efeito de redução. Com os corantes cúrcuma, antocianina e monascus, observou-se redução significativa dos níveis de triacilgliceróis séricos com as duas doses testadas, não se verificando, entretanto, diferença significativa, quanto a este efeito, entre as doses de 40 e 80 mg. A administração do corante carmim, nas doses testadas, não apresentou efeito de redução significativa dos níveis de triacilgliceróis séricos.

## **ABSTRACT**

VALENTE, Suely Terezinha Xavier, M. S., Universidade Federal de Viçosa, July 1998. **Effect of natural colorants on serum triacylglycerols and cholesterol levels in hyperlipidemic rats.** Adviser: Cremilda Rosa Silva. Committee Members: Tania Toledo de Oliveira and Tanus Jorge Nagem.

Some studies have been conducted on the physiological and pharmacological properties of the active principles of natural colorants commonly used as food additives. Aiming to evaluate the effect of the natural colorants turmeric, anthocyanin (grape skin), carmine and monascus on blood triacylglycerols and cholesterol, two experiments were carried out using hyperlipidemic rats. Colorants orally administered to albino rats of the Wistar strain, with an initial mean weight of 225 g were thus evaluated: experiment I (40 mg dose) and experiment II (80 mg dose). In order to induce hyperlipidemia, the animals were injected intraperitoneally with 300 mg of Triton-WR1339 per kg/body weight. At 48 h after the Triton injection, the results showed that the administration of the natural colorants tested produced a significant decrease of the total serum cholesterol levels at the two tested doses, with the 80 mg dose showing a greater reduction. The

HDL-cholesterol levels were also shown to be significantly reduced as a result of the administration of the four colorants at the doses tested, with the 80 mg dose also presenting a greater reduction effect. Turmeric, anthocyanin and monascus presented a significant reduction of the serum triacylglycerols levels at both doses without, however, presenting any significant difference between the 40 and 80 mg doses. The administration of carmine at the doses tested did not exhibit a significant reduction effect on the serum triacylglycerols levels.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de corantes naturais em alimentos processados industrialmente constitui atualmente uma tendência mundial, em função da maior demanda por produtos naturais. Dessa forma, é esperado que estes corantes façam parte, cada vez mais, da nossa alimentação.

Estudos experimentais em animais têm demonstrado, entretanto, que, além de conferirem cor aos alimentos, muitos dos corantes naturais não se apresentam como substâncias inócuas ao organismo, dependendo da dose utilizada. Paralelamente a estudos relacionados com a segurança na utilização destes corantes, propriedades fisiológicas e farmacológicas têm sido atribuídas aos seus princípios ativos.

Efeitos no metabolismo lipídico, principalmente na redução dos níveis de colesterol na corrente sangüínea de animais experimentais, têm sido demonstrados em alguns estudos, embora poucas publicações sobre este assunto estejam disponíveis.

À curcumina, princípio colorante da cúrcuma, um corante obtido a partir dos rizomas da planta *Curcuma longa* L., têm sido atribuídas várias propriedades farmacológicas, entre as quais atividade antiinflamatória e hipocolesterolêmica no organismo animal, além de

efeito no aumento da secreção biliar e da excreção de sais biliares colesterol e bilirrubina (AMMON e WAHL, 1991).

As antocianinas, juntamente com outros flavonóides, amplamente encontradas em vegetais, têm sido investigadas como substâncias ativas biologicamente. Atividades antioxidativa e antiinflamatória e efeitos no metabolismo lipídico em animais experimentais têm sido relatados em alguns estudos (IGARASHI et al., 1990; TAMURA e YAMAGAMI, 1994).

Tradicionalmente utilizado pelos povos asiáticos, o corante monascus, produzido pela fermentação do arroz por fungos do gênero *Monascus*, encontra aplicação devido às suas propriedades corantes, organolépticas e antimicrobianas em alimentos, embora FINK-GREMMELS e LEISTNER (1989) tenham demonstrado efeito de redução dos níveis de lipídios séricos, em animais experimentais, com o uso de um extrato metanólico dos pigmentos produzidos por *Monascus purpureus*.

Considerando, portanto, a maior utilização destes corantes, principalmente através de produtos industrializados, e a importância do melhor conhecimento de seus efeitos no organismo humano, neste trabalho procurou-se avaliar os corantes cúrcuma, antocianina (cascas de uva), carmim e monascus quanto ao potencial efeito de redução dos níveis de colesterol e triacilgliceróis sanguíneos, em ratos hiperlipidêmicos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Colesterol e seu metabolismo**

O colesterol é um lipídio esterol que está presente no organismo animal, tanto nos tecidos como nas lipoproteínas plasmáticas, seja sob a forma livre ou (combinado com ácidos graxos) como éster de colesterol (MAYES, 1990).

O colesterol livre é um componente de todas as membranas celulares, sendo a principal forma na qual ele está presente em muitos tecidos, constituindo-se exceções o córtex adrenal, o plasma e as placas ateromatosas, onde ésteres de colesterol predominam. Também na linfa intestinal e no fígado, uma significativa proporção de colesterol encontra-se esterificada (THOMPSON, 1989).

Sua importância fisiológica reside no amplo papel que desempenha no organismo animal, como precursor de sais biliares e de hormônios glicocorticóides e mineralocorticóides, na síntese de hormônios sexuais e na formação de vitamina D, e principalmente como um elemento estrutural, nas membranas celulares (BRODY, 1994).

Amplamente distribuído em todas as células de mamíferos, particularmente no tecido nervoso, o colesterol, nas membranas celulares, atua como um moderador da fluidez, estabilizando suas estruturas, sobretudo no lado externo das membranas plasmáticas,

onde é geralmente mais abundante (GRANNER, 1990; STRYER, 1995).

Por outro lado, o colesterol é também o principal constituinte dos cálculos biliares. Entretanto, seu principal papel nos processos patológicos é como um fator na gênese da aterosclerose das artérias vitais, causando doença cerebrovascular, coronariana e vascular periférica (MAYES, 1990).

Do total de colesterol presente no organismo, uma pequena fração é proveniente da dieta, por meio da ingestão de alimentos de origem animal, visto que plantas não produzem colesterol, embora sintetizem compostos similares como sitosterol, ergosterol e digitálicos, os quais são muito pouco absorvidos pelo organismo. Considerado dispensável na dieta, a maior parte do colesterol provém da síntese endógena, principalmente de origem hepática (BRODY, 1994).

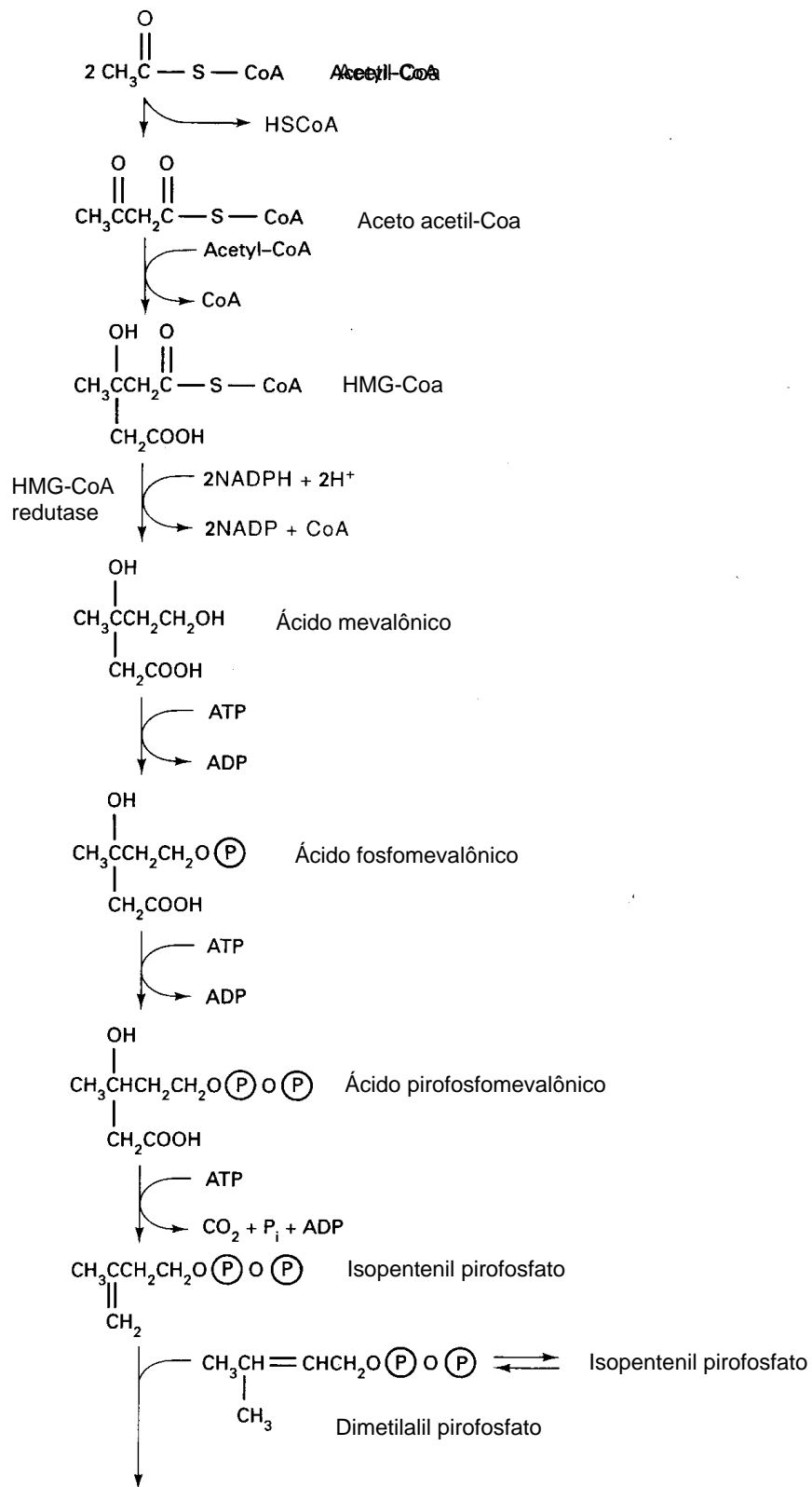
### **2.1.1. Biossíntese do colesterol**

A via de síntese do colesterol no organismo é um processo complexo que dá origem também a outros importantes poliisoprenóides nas células, como dolicolis e isoprenóides da cadeia lateral da ubiquinona (RUDNEY e SEXTON, 1986). As reações principais estão esquematizadas na Figura 1.

O acetil-CoA é a fonte de todos os 27 átomos de carbono da molécula, sendo as frações microssomal e citosólica da célula as responsáveis pela síntese (MAYES, 1990).

A via biossintética do colesterol pode ser dividida em três etapas: formação de mevalonato, síntese de esqualeno a partir do mevalonato e ciclização do esqualeno a lanosterol e sua conversão a colesterol (MATHEWS e Van HOLDE, 1990).

Na primeira etapa, duas moléculas de acetil-CoA condensam-se pela ação de uma tiolase, originando acetoacetil-CoA, o qual reage com uma terceira molécula de acetil-CoA, formando 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA), reação catalisada pela HMG-CoA sintetase. Pela ação de outra enzima, a HMG-CoA redutase, HMG-CoA é reduzido a mevalonato. Esta reação é irreversível e considerada etapa limitante na síntese do colesterol.



FONTE: BRODY (1994).

Figura 1 - Via de biossíntese do colesterol.

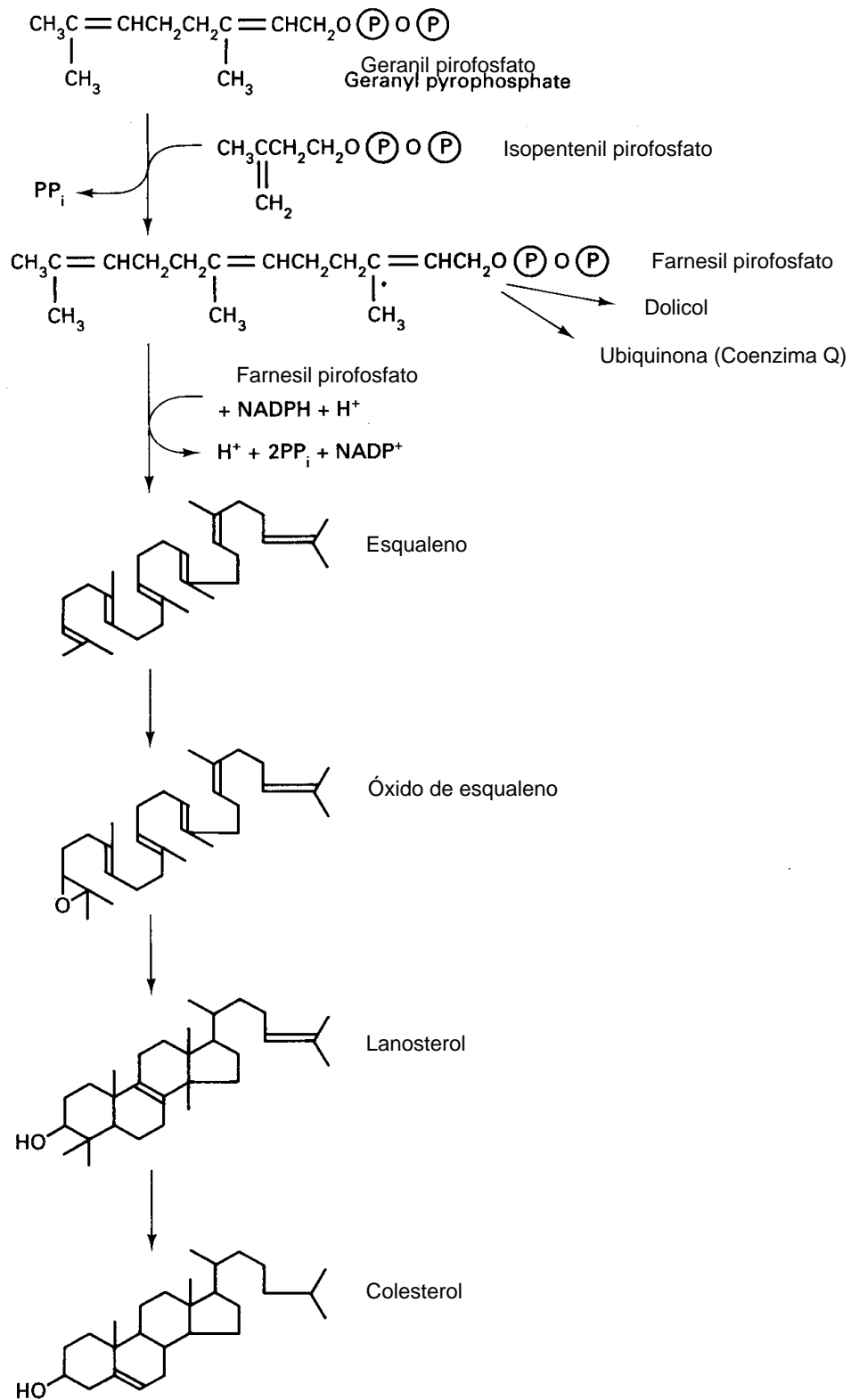


Figura 1, Cont.

Na etapa seguinte, o mevalonato forma isopentenil pirofosfato, a unidade isoprenóide ativa, através de três reações consecutivas, envolvendo ATP, duas fosforilações e uma descarboxilação acoplada à hidrólise do ATP, a ADP e  $P_i$ . Os passos seguintes consistem na polimerização das unidades isoprenóides: isopentenil pirofosfato condensa-se ao seu isômero dimetilalil pirofosfato, formando o intermediário  $C_{10}$ , geranyl pirofosfato, que, após nova condensação com outra molécula de isopentenil pirofosfato, resulta em farnesil pirofosfato com 15 átomos de carbono (BRODY, 1994).

Até esse estágio todas as reações, com exceção da que envolve a HMG-CoA redutase, ocorrem no citosol. A próxima enzima, farnesil transferase ou esqualeno sintetase, está ligada às membranas do retículo endoplasmático. Esta enzima, NADPH-dependente, une duas moléculas de farnesil pirofosfato, originando um composto intermediário, pré-esqualeno pirofosfato, no qual ocorrem eliminação de pirofosfato e rearranjo, para produzir o esqualeno, composto linear com 30 átomos de carbono (MATHEWS e Van HOLDE, 1990).

Alternativamente, farnesil pirofosfato pode também ser usado na síntese de outros importantes poliisoprenóides, como dolicol, um álcool poliisoprenil formado pela adição de 16 resíduos de isopentenil pirofosfato, o qual faz parte da síntese de glicoproteínas no retículo endoplasmático, ou, ainda, a cadeia lateral da ubiquinona (coenzima Q), co-fator na cadeia respiratória das mitocôndrias, formada pela adição de mais três a sete unidades isoprenóides (MAYES, 1990; BRODY, 1994).

A etapa final da síntese começa com a ciclização do esqualeno e, em contraste com as anteriores, requer oxigênio molecular (STRYER, 1995). Primeiramente, há formação de um composto intermediário, epóxido de esqualeno, pela ação de uma oxidase de função mista presente no retículo endoplasmático, a esqualeno epoxidase, com participação de  $O_2$  e NADPH. Por movimentação de elétrons através de

quatro duplas ligações e migração de dois grupos metila, ocorre então a ciclização do epóxido de esqualeno, formando lanosterol, catalisada pela enzima óxido esqualeno: lanosterol ciclase.

Finalmente, ocorre a conversão de lanosterol a colesterol, nas membranas do retículo endoplasmático, compreendendo cerca de 20 reações que envolvem a remoção de três grupos metila, a redução de uma dupla ligação por NADPH e a migração de outra dupla ligação (MATHEWS e Van HOLDE, 1990; STRYER, 1995).

O total de síntese de colesterol no organismo humano é estimado em 9 a 13 mg/kg/dia (GRUNDY, 1978), com o fígado contribuindo com 50% da síntese total; o intestino, com cerca de 15%; e a pele, com grande parte do restante (MAYES, 1990).

Muitos dos fatores que regulam a biossíntese do colesterol atuam modulando a atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase, a qual reduz HMG-CoA a ácido mevalônico (RUDNEY e SEXTON, 1986).

Tanto o jejum quanto a ingestão de colesterol reduzem acentuadamente a atividade da enzima HMG-CoA redutase no fígado. Um mecanismo de *feedback* controla a síntese do colesterol, uma vez que tanto a síntese quanto a atividade dessa enzima são inibidas pelo colesterol (SMITH et al., 1983).

A capacidade do colesterol dietético de suprimir a síntese endógena envolve pelo menos dois mecanismos distintos: no primeiro, a síntese da enzima HMG-CoA redutase é inibida provavelmente em nível de transcrição pelo colesterol; e, no segundo, a atividade da enzima pode ser modulada por um mecanismo envolvendo a fosforilação e desfosforilação cíclica da enzima (MATHEWS e Van HOLDE, 1990).

A fosforilação, a qual inativa a enzima, parece ser controlada por dois sistemas sinalizadores diferentes: AMP-cíclico e um sistema dependente de cálcio. Um aumento no nível do AMP-cíclico na célula estimula a atividade de uma quinase que fosforila HMG-CoA redutase.

Um aumento no nível de íons cálcio estimula muitas quinases, incluindo aquela que age sobre a HMG-CoA, embora a importância dessas mudanças na atividade da redutase não esteja totalmente esclarecida (BRODY, 1994).

Fatores hormonais têm sido também relacionados com a regulação da síntese do colesterol. A administração de insulina ou de hormônios tireoidianos aumenta a atividade da HMG-CoA redutase, enquanto glucagon ou os glicocorticóides reduzem-na (MAYES, 1990).

Nas células, a síntese do colesterol é controlada através da taxa na qual o colesterol é captado a partir da corrente sanguínea. A homeostase é mantida por um mecanismo que coordena a ingestão dietética de colesterol, a taxa de colesterol endógeno e a taxa de colesterol utilizado pelas células. O mecanismo envolve um receptor específico para lipoproteínas de baixa densidade, que são as principais responsáveis pelo transporte de colesterol na corrente sanguínea (MATHEWS e Van HOLDE, 1990).

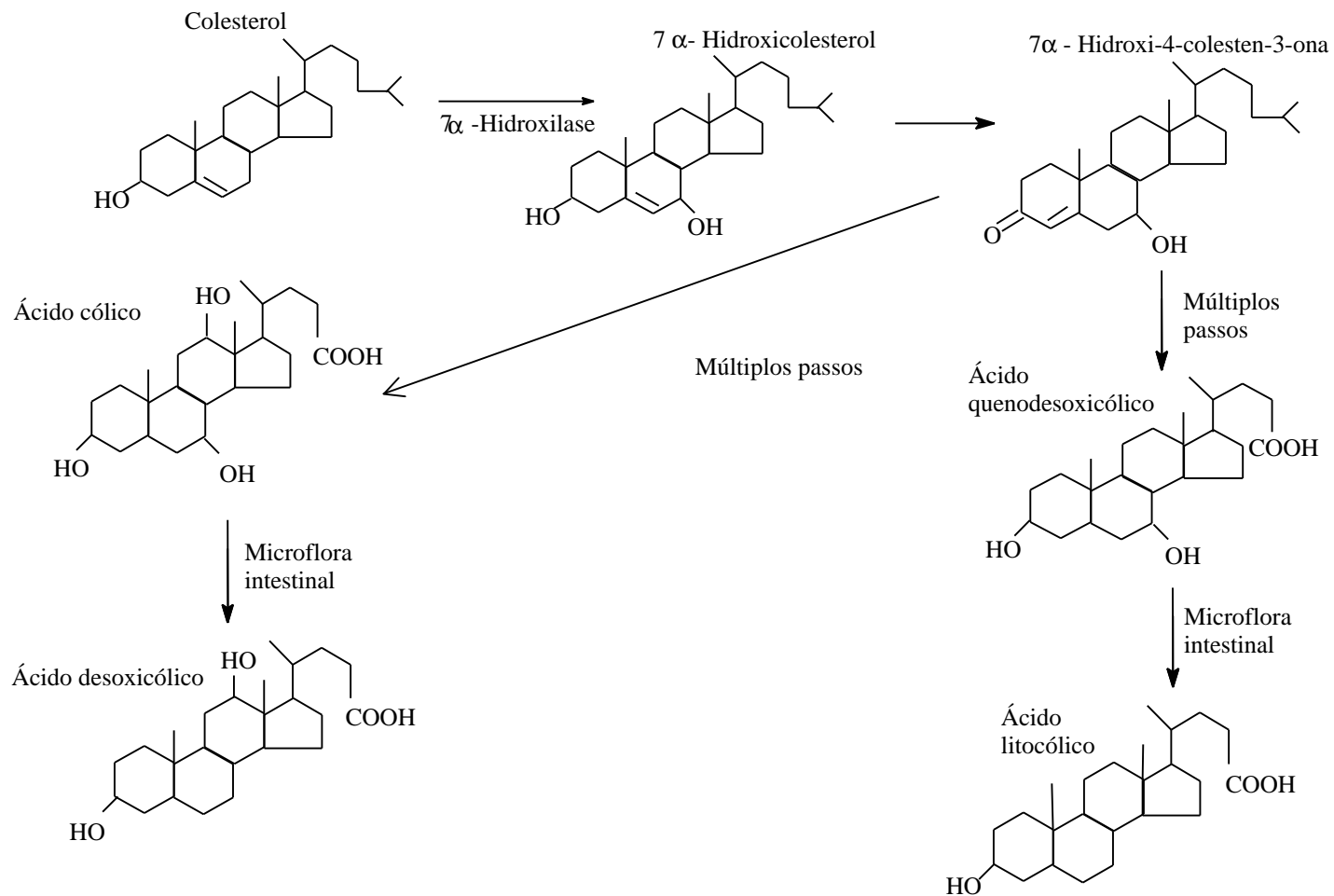
### **2.1.2. Catabolismo - conversão de colesterol a sais biliares**

Sais biliares podem ser considerados os produtos finais do catabolismo do colesterol. Esses compostos, juntamente com o próprio colesterol, que também está presente na bile, representam o único percurso expressivo para a eliminação do colesterol do organismo (MAYES, 1982).

A biossíntese dos sais biliares, no fígado, envolve reações de hidroxilação e diminuição da cadeia lateral da molécula do colesterol, formando suas estruturas (MAYES, 1990). A Figura 2 mostra essa conversão esquematizada.

A 7 $\alpha$ -hidroxilação do colesterol é o primeiro passo na biossíntese dos sais biliares e a reação que limita a velocidade da via de síntese desses compostos. A reação é catalisada pela 7 $\alpha$ -hidroxilase, uma enzima microsomal que requer oxigênio, NADPH e citocromo P-450 como parte do sistema (MAYES, 1990). As reações seguintes constituem-se também de hidroxilações catalisadas por oxidases

microsomais de função mista, além da modificação da cadeia lateral, na qual um hidrocarboneto saturado com oito carbonos é convertido em uma cadeia de cinco carbonos com um terminal carboxilato (MATHEWS e Van HOLDE, 1990).



FONTE: BRODY (1994).

Figura 2 - Conversão de colesterol a sais biliares.

Os principais ácidos biliares sintetizados pelo fígado humano são o ácido cólico, o mais abundante, e o ácido quenodesoxicólico. Na bile, estes ácidos biliares, chamados de primários, encontram-se normalmente conjugados com os aminoácidos glicina e taurina. A conjugação ocorre nas células hepáticas, onde os ácidos biliares recentemente sintetizados encontram-se na forma de ésteres da coenzima A, ou seja, colil ou quenodesoxicolil-CoA. Esses derivados da coenzima A são acoplados, através de ligação amídica, com a glicina e taurina, formando os ácidos: glicocólico ou glicodesoxicólico e taurocólico ou taurodesoxicólico (SMITH et al., 1988; MAYES, 1990).

Após a secreção no intestino delgado, os ácidos biliares primários podem ainda sofrer alterações estruturais em razão da atividade de bactérias intestinais. Essas alterações incluem a clivagem da ligação peptídica dos ácidos biliares conjugados - essas ligações resistem à hidrólise por proteases e peptidases intestinais, mas são rapidamente clivadas por enzimas bacterianas (BRODY, 1994) - e a  $7\alpha$ -desidroxilação, que produz os sais biliares secundários: ácido desoxicólico, a partir do ácido cólico, e ácido litocólico, a partir do ácido quenodesoxicólico (Figura 2).

Ácidos biliares são secretados com a bile sob a forma de sais de sódio e potássio. Segundo MATHEWS e Van HOLDE (1990), todos os ácidos biliares encontram-se na forma de sais no pH fisiológico, o que torna o termo sais biliares mais exato que ácidos biliares.

Embora sais biliares sejam produtos da degradação do colesterol, esses compostos não se apresentam como produtos destinados à eliminação pelo organismo. Após serem utilizados para promover a emulsificação, hidrólise e absorção de lipídios no intestino delgado, eles são, na sua maioria, absorvidos (cerca de 95%) por absorção passiva, no jejuno e cólon, ou por absorção ativa, no íleo terminal, retornando ao fígado através da circulação portal, e incorporados ao *pool* hepático (BHAGAVAN, 1977; MARINETTI, 1990).

Após absorção no fígado, os sais biliares são reutilizados, sendo estocados na vesícula biliar e, por estímulo alimentar, liberados no duodeno através da bile. No processo da circulação entero-hepática, o *pool* de sais biliares no organismo pode circular duas ou mais vezes durante a digestão de uma refeição e, num período de 24 horas, dez vezes ou mais. Assim, embora a quantidade total de sais biliares presentes no organismo humano seja de cerca de 2 a 4 g, este utiliza uma quantidade muito superior durante a digestão (SMITH et al., 1988; BRODY, 1994).

A circulação entero-hepática dos sais biliares é um processo eficiente, com somente uma pequena fração dos sais biliares, cerca de 500 mg/dia, sendo eliminada nas fezes. Entretanto, a cada dia uma quantidade equivalente àquela perdida é sintetizada a partir do colesterol, pelo fígado, mantendo-se o reservatório de sais biliares na mesma dimensão (MAYES, 1990). Situações que causem bloqueio na reabsorção dos sais biliares, como é o caso do emprego da resina colestiramina, estimulam a síntese desses compostos, com conseqüente aumento da degradação de colesterol no fígado, levando à redução significativa do colesterol plasmático. Esse recurso terapêutico vem sendo usado no tratamento da hipercolesterolemia (TIKKANEN e NIKKILA, 1987; ILLINGWORTH, 1988; BRODY, 1994).

A síntese de sais biliares é regulada, através de *feedback* negativo, pelos produtos da reação, sendo exercida pelas enzimas 7 $\alpha$ -hidroxilase e HMG-CoA redutase. As atividades dessas duas enzimas, freqüentemente, ocorrem em paralelo, sendo difícil afirmar se a inibição da síntese ocorre primeiramente no passo da HMG-CoA redutase ou na reação da 7 $\alpha$ -hidroxilase. Esta última enzima pode também ser regulada por fosforilação-desfosforilação, como ocorre com a HMG-CoA redutase. No entanto, ao contrário do que ocorre com a HMG-CoA redutase, a forma fosforilada é a ativa (MARINETTI, 1990; MAYES, 1990).

Outros produtos resultantes do metabolismo do colesterol incluem os hormônios esteróides, formados nas gônadas e no córtex supra-renal, e a vitamina D formada na pele, a partir do precursor 7-desidrocolesterol (SMITH et al., 1983).

Embora essas sínteses sejam fisiologicamente importantes, elas representam apenas uma quantidade muito pequena da massa do total de colesterol que é metabolizado no organismo. Cerca de 50% do total de colesterol é eliminado após conversão para sais biliares, sendo o restante eliminado por excreção de colesterol biliar (LINSCHER e VERGOESEN, 1988).

### **2.1.3. Absorção intestinal do colesterol**

O *pool* de colesterol presente no trato intestinal é heterogêneo, sendo derivado de dieta, bile e descamação de células da mucosa intestinal. O colesterol biliar é mais rapidamente absorvido, porque alcança o intestino na forma livre e agregado a micelas, enquanto o colesterol dietético encontra-se principalmente na forma esterificada, insolúvel no meio aquoso intestinal. Para que seja absorvido, o colesterol dietético deve ter previamente hidrolisada sua ligação éster com ácido graxo pela enzima colesterol esterase pancreática, visto que o colesterol livre atravessa a membrana intestinal, mas não os seus ésteres (SMITH et al., 1988; LINSCHER e VERGOESEN, 1988).

Sais biliares são necessários para a emulsificação dos ésteres de colesterol e para a subsequente emulsificação do colesterol livre, juntamente com outros produtos da digestão lipídica, embora ácidos graxos neutralizados com  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$  no intestino delgado, formando sabões, e monoacilgliceróis possam também atuar como detergentes e complementar a função dos sais biliares (SMITH et al., 1988; MARINETTI, 1990).

A solubilização do colesterol e dos outros produtos da digestão lipídica, através da incorporação em micelas mistas com sais biliares

conjugados, é, no entanto, considerada essencial no processo de absorção. As micelas aumentam acentuadamente a velocidade de liberação desses produtos para a mucosa intestinal do jejuno, onde são absorvidos por difusão passiva, através das membranas das células epiteliais (SMITH et al., 1988).

A absorção do colesterol intestinal não é completa, sendo cerca de 50% absorvido e o restante excretado nas fezes. O colesterol não absorvido pode ser metabolizado pela flora intestinal e convertido em colestanol e coprostanol, os quais são muito pouco absorvidos e, portanto, também eliminados nas fezes (MARINETTI, 1990).

A capacidade de absorção do colesterol pelo organismo humano é limitada, em comparação com a absorção apresentada por outras espécies animais, sendo estimada em 2 a 4 mg/dia/kg de peso corporal, enquanto cães e roedores podem absorver 35 a 50 vezes esta quantidade (TURLEY e DIETSCHY, 1982).

Segundo GRUNDY (1983), vários fatores metabólicos podem ser considerados como determinantes de uma menor absorção de colesterol. Dentre estes, destacam-se: a baixa quantidade de sais biliares; o aumento da velocidade do trânsito intestinal, com redução no tempo disponível para absorção; a redução na secreção da lipase pancreática, retirando o colesterol da fase micelar; a deficiência na capacidade da mucosa intestinal em esterificar o colesterol; e a competição para absorção do colesterol biliar com o colesterol exógeno.

Outros fatores que também podem reduzir a absorção do colesterol intestinal incluem esteróis de plantas, como o  $\beta$ -sitosterol, por inibição competitiva (MAHSON et al., 1982), fibras solúveis na dieta, as quais aumentam a excreção fecal de sais biliares (HOPEWELL et al., 1993), além da dieta baixa em gorduras, pela redução da quantidade de ácidos graxos disponível para formação de micelas (MAHAN e ARLIN, 1995).

Após a entrada no enterócito, a maioria do colesterol livre é

convertida novamente em ésteres de colesterol pela enzima acil-CoA: colesterol aciltransferase e, juntamente com outros lipídios reesterificados e proteínas específicas, incorporada aos quilomícrons (BRODY, 1994).

#### **2.1.4. Transporte de colesterol - lipoproteínas plasmáticas**

Por serem insolúveis em meio aquoso, a maioria dos lipídios exógenos ou endogenamente sintetizados é transportada no plasma sob a forma de estruturas organizadas, macroagregados moleculares, denominadas lipoproteínas. A solubilização no meio aquoso depende do arranjo molecular no qual triacilgliceróis e colesterol esterificado estão envolvidos por fosfolipídios e colesterol livre e também da interação entre esses componentes com proteínas específicas, as apolipoproteínas ou apoproteínas (apo) (GARCIA e OLIVEIRA, 1992; LOPES et al., 1996).

As lipoproteínas plasmáticas são caracterizadas por suas propriedades físico-químicas, como a mobilidade eletroforética e o intervalo de densidade (BREWER JÚNIOR et al., 1988; LOPES et al., 1996), sendo, porém, a densidade a propriedade física na qual se baseia a atual classificação (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

Pelo método de ultracentrifugação preparativa, seis classes distintas de lipoproteínas podem ser isoladas do plasma pós-prandial: quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e lipoproteínas de densidade alta (HDL), subdivididas em HDL<sub>2</sub> e HDL<sub>3</sub> (THOMPSON, 1989).

A densidade das lipoproteínas aumenta proporcionalmente ao aumento do teor protéico e à redução do conteúdo lipídico, conforme os dados apresentados no Quadro 1.

Segundo MARINETTI (1990), as lipoproteínas plasmáticas são moléculas dinâmicas em um estado constante de síntese e degradação, trocando ativamente certos lipídios e proteínas, umas com as outras.

As lipoproteínas são sintetizadas no fígado e no intestino ou formadas no plasma, pela transformação de outras lipoproteínas (CHAPMAN, 1982).

A interação entre as apoproteínas e os lipídios das lipoproteínas ocorre através de regiões apolares hidrofóbicas das apoproteínas com colesterol esterificado, triacilgliceróis e com as cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolipídios e, ainda, através de ligações iônicas entre aminoácidos da região alfa-hélice das apoproteínas e a “cabeça” polar dos fosfolipídios (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

Quadro 1 - Principais características das lipoproteínas plasmáticas, em humanos

Classe de Lipoproteínas	QM	VLDL	IDL	LDL	HDL <sub>2</sub>	HDL <sub>3</sub>
Densidade inferior (g/ml)	-	0,950	1,006	1,019	1,063	1,125
Densidade superior (g/ml)	0,950	1,006	1,019	1,063	1,125	1,210
Diâmetro (Å)*	800-5.000	300-800	250-350	180-280	90-120	50-90
Mobilidade eletroforética	origem	pré-beta	pré-beta	beta	alfa	Alfa
% massa total						
Col. -éster	5	12	23	38	16	12
Col.-livre	2	7	8	10	6	3
Triglicerídeo	84	55	32	9	4	4
Fosfolipídeo	7	18	21	22	30	26
Apolipoproteínas	2	8	16	21	44	55
Principais apolipoproteínas*	A-I, A-II, A-IV B-48, C-I, C-II,C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100, E	B-100	A-I, A-II	A-I, A-II

FONTE: GARCIA e OLIVEIRA (1992); \* DE JONES et al. (1994).

As apoproteínas desempenham papel importante no metabolismo lipídico. Além da função estrutural, permitindo a solubilização das lipoproteínas, contribuem para a regulação do metabolismo das lipoproteínas, modulando a atividade de enzimas como a lecitina: colesterol aciltransferase e lipoproteína-lipase, ligando-se também a receptores da superfície celular e, assim, determinando os sítios de captação e a taxa de degradação dos outros constituintes das

lipoproteínas, sobretudo o colesterol (THOMPSON, 1989).

A composição de apoproteínas de cada lipoproteína é variável. Segundo BREWER JÚNIOR et al. (1988), quatorze apoproteínas foram identificadas e caracterizadas no plasma humano: apoA-I, apoA-II, apo-IV, apoB-100, apoB-48, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoD, apoE, apoF, apoG, apoH e apo(a).

As apoproteínas são sintetizadas como pré-apoproteínas e, após processamento, convertem-se em apoproteínas, apresentando-se glicosiladas, aciladas ou fosforiladas. Algumas permanecem fixas na lipoproteína, enquanto outras podem ser trocadas entre as diferentes lipoproteínas. Variam em estrutura e função nas diferentes espécies animais, variando amplamente de tamanho (pesos moleculares de 7.000 a 500.000), e ocorrem em várias isoformas (MARINETTI, 1990). No Quadro 2 encontram-se algumas características das apoproteínas.

#### **2.1.4.1. Transporte de lipídios exógenos**

Os quilomícrons são os responsáveis pelo transporte dos lipídios provenientes da dieta aos seus locais de metabolismo ou armazenamento. Estas partículas são sintetizadas no retículo endoplasmático das células da mucosa intestinal e migram para o complexo de Golgi, para serem posteriormente liberadas por exocitose na linfa mesentérica (HAVEEL e HAMILTON, 1988).

As partículas liberadas pelas células da mucosa intestinal são chamadas de quilomícrons nascentes. A composição lipídica destas partículas reflete a da dieta, sendo constituídas principalmente de triacilgliceróis, com quantidades menores de fosfolipídios, colesterol livre, ésteres de colesterol e proteínas (Quadro 1). Os quilomícrons são transportados, via ducto torácico, até a circulação sistêmica, interagindo no plasma com lipoproteínas de alta densidade (HDL), as quais servem como reservatório de apoC e apoE e transferem estas apoproteínas para os quilomícrons, enquanto ocorre a transferência de

apoA-I e A-IV dos quilomícrons para as HDL (GARCIA e OLIVEIRA, 1992; LOPES et al., 1996).

Nas paredes dos capilares da maioria dos tecidos, e principalmente dos tecidos adiposo, cardíaco e muscular esquelético, os triacilgliceróis contidos nos quilomícrons são hidrolisados pela ação da enzima lipase lipoprotéica, liberando monoglicerídios, ácidos graxos e glicerol, os quais, nos tecidos adiposo, hepático e muscular, poderão ser utilizados pelo organismo para armazenamento, sínteses hepáticas ou como substrato energético (LOPES et al., 1996).

Quadro 2 - Características das apoproteínas

Apoproteína	Principal Lipoproteína	Peso Molecular (X 10 <sup>3</sup> )	Local de Síntese	Concentração Sérica (mg/dL)	Função
A-I	HDL	28,3	Intestino Fígado	100-150	Co-fator da LCAT; proteína estrutural da HDL
A-II	HDL	17,0	Intestino Fígado?	30-50	Proteína estrutural da HDL
A-IV	QM	46,0	Intestino	15	Desconhecida
B-100	VLDL IDL LDL	54,9	Fígado	80-100	Formação intracelular ou transporte transcelular de VLDL; interação com receptor apoB/E
B-48	QM	26,5	Intestino Fígado?	?	Formação intracelular ou transporte transcelular de quilomícrons e VLDL. Interação com receptor apoB/E?
C-I	HDL	6,5	Fígado	<10	Co-fator da LPL do tecido adiposo (particularmente ácidos graxos saturados)
C-II	QM  VLDL, HDL	8,8	Fígado	3-8	Co-fator da LPL do tecido adiposo
C-III	QM VLDL HDL	8,9	Fígado	8-15	Desconhecida; pode participar na captação de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis pelas células
D	HDL	20,0	?	10	Desconhecida: transferência de colesterol esterificado de uma lipoproteína a outra?
E	QM VLDL HDL	39,0	Fígado	3-5	Interação com receptores apoB/E e com receptores apoE; Inibidor da LPL do tecido adiposo?

F	HDL	30,0	?	?
G	VLDL	75,0	?	?
H	QM	45,0	?	?

---

FONTE: MARINETTI (1990).

Os quilomícrons, após a hidrólise dos triacilgliceróis, tornam-se partículas menores e mais densas, sendo denominados quilomícrons remanescentes. Estas partículas possuem maior conteúdo relativo de colesterol esterificado quando comparadas aos quilomícrons presentes na linfa, além de receberem colesterol esterificado proveniente das HDL, através de um processo de transferência de lipídios, mediado por uma proteína específica, denominada proteína de transferência de colesterol esterificado. A perda de volume dos quilomícrons promove rearranjo dos seus componentes, favorecendo a incorporação de apoE e perda de fosfolipídios, colesterol livre, apoC e apoA, que podem retornar às HDL ou, ainda, dar origem a partículas precursoras das HDL (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

Os quilomícrons remanescentes são captados pelas células hepáticas, através do processo de endocitose mediada por receptor. A remoção ocorre através de receptores celulares específicos, de alta afinidade para apoE, localizados na membrana celular. Segundo ANDERSEN et al. (1977) e BREWER JÚNIOR et al. (1988), o fígado possui os receptores apoB/E (receptor de LDL) e receptores apoE, que podem captar e internalizar os quilomícrons. No entanto, segundo GARCIA e OLIVEIRA (1992), a ligação entre a partícula remanescente e o seu lugar de remoção no hepatócito é dependente da interação entre apoE e o receptor apoE. A apoE possui regiões ricas em aminoácidos básicos, que constituem o domínio de reconhecimento pelo receptor apoE ou receptor de partículas remanescentes. A apoB-48 exerce função estrutural na partícula remanescente e não participa da interação entre a lipoproteína e o receptor.

Partículas grandes, ainda ricas em triacilgliceróis, permanecem

mais tempo na circulação, por serem excluídas do espaço intercelular e impedidas de atravessar os sinusóides hepáticos. Na superfície das células endoteliais hepáticas, outra lipase lipoprotéica (lipase hepática) atua na hidrólise de triacilgliceróis dessas partículas remanescentes, constituindo-se na última etapa do metabolismo dos quilomícrons antes de sua remoção plasmática (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

A enzima lipase lipoprotéica hepática apresenta-se como uma enzima distinta da lipase lipoprotéica periférica. Ambas são liberadas no plasma pela administração endovenosa de heparina e estão envolvidas no catabolismo de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (quilomícrons e VLDL), sendo, no entanto, a lipase periférica a mais ativa. Esta enzima é ativada por apoC-II (que promove a hidrólise de triacilgliceróis, facilitando a ligação de quilomícrons e VLDL com a enzima) e inibida por cloreto de sódio e sulfato de protamina; já a enzima hepática não é afetada pelos inibidores e ativadores da enzima periférica. Ambas as enzimas possuem atividade como fosfolipase-A, especialmente a lipase hepática, que atua na hidrólise de triacilgliceróis residuais e fosfolípidios de partículas remanescentes, participando na formação de LDL e na conversão de HDL<sub>2</sub> em HDL<sub>3</sub> (THOMPSON, 1989).

No interior das células hepáticas, pela ação de enzimas específicas, os quilomícrons são degradados a seus componentes básicos, ou seja, aminoácidos livres, ácidos graxos, glicerol, bases nitrogenadas (colina, etanolanina e serina) e colesterol livre. Este colesterol, proveniente principalmente da dieta, é convertido, em grande parte, em sais biliares ou usado na síntese de outras lipoproteínas (MARINETTI, 1990).

O pico de quilomicronemia ocorre normalmente entre três e seis horas após a ingestão de lipídios na alimentação e, então, declina gradualmente. A taxa de remoção de quilomícrons do plasma é rápida, com meia-vida de menos de uma hora, e normalmente eles não são detectados após 12 horas de jejum (THOMPSON, 1989).

Níveis elevados de quilomícrons conferem ao plasma uma aparência leitosa e podem causar hipertrigliceridemia, devido ao alto teor de triacilgliceróis contido nessas partículas. A persistência de quilomícrons na circulação sanguínea pode ser secundária em relação à deficiência hereditária de lipase lipoprotéica ou de seu ativador apoC-II (NOVAZZI e MARTINEZ, 1994).

#### **2.1.4.2. Transporte de lipídios endógenos**

No retículo endoplasmático das células hepáticas são formadas as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Estas lipoproteínas transportam triacilgliceróis, fosfolipídios e colesterol do fígado para outros tecidos do organismo. A principal função destas lipoproteínas é carrear triacilgliceróis de origem endógena aos tecidos periféricos, para suprimento energético, durante os períodos de reduzida disponibilidade exógena (LOPES et al., 1996).

A síntese de VLDL é estimulada pelo aumento do fluxo de ácidos graxos livres para o fígado e também em situações que ocasionem aumento na taxa de síntese de ácidos graxos endógenos, como ocorre durante a alta ingestão de carboidratos (THOMPSON, 1989).

Do retículo endoplasmático onde colesterol, triacilgliceróis, fosfolipídios e apoproteínas são formados, as VLDL são transportadas em vesículas até o complexo de Golgi, onde podem sofrer algumas modificações, as quais envolvem adição ou remoção de resíduos de carboidratos nas apoproteínas. Através de vesículas secretórias, as VLDL são transportadas para a superfície celular, onde ocorre fusão com a membrana plasmática e liberação dessas partículas no espaço de Disse. As VLDL, então, migram para os sinusóides hepáticos e entram na circulação sistêmica (MARINETTI, 1990).

A composição lipídica e as propriedades das VLDL são

apresentadas no Quadro 1. Essas lipoproteínas possuem uma única cópia de apoB-100 por molécula, sendo triacilgliceróis seu principal constituinte lipídico (LOPES et al., 1996).

Os ácidos graxos empregados na formação das VLDL, no fígado, são provenientes da captação de ácidos graxos livres do plasma (hidrólise de quilomícrons, VLDL ou triacilgliceróis do tecido adiposo), da hidrólise intracelular (partículas remanescentes) ou da síntese “de novo”. Da mesma forma, o colesterol das VLDL pode ser derivado da síntese “de novo” ou do catabolismo das lipoproteínas captadas pelo fígado (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

O metabolismo das VLDL assemelha-se ao dos quilomícrons. As partículas adquirem, no plasma, apoC-I, apoC-II, apoC-III e apoE das HDL circulantes, resultando nas VLDL maduras. Estas partículas têm também sua estrutura alterada pela interação com lipase lipoprotéica, na superfície do endotélio capilar, e, além disso, são enriquecidas com moléculas de colesterol esterificado proveniente das HDL, através da reação de transferência de lipídios. Concomitantemente, a VLDL cede triacilgliceróis, fosfolipídios, apoC e apoE para as HDL. Os remanescentes de VLDL gerados recebem a denominação de lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) (LOPES et al., 1996).

A taxa de *turnover* das VLDL, em humanos, é menos rápida do que a dos quilomícrons, com uma meia-vida de duas a quatro horas (THOMPSON, 1989).

As VLDL remanescentes, ou IDL, são partículas menores que as VLDL e possuem somente apoB-100 e apoE em sua estrutura (Quadro 1). Essas lipoproteínas seguem duas vias metabólicas: são removidas pelo fígado e degradadas em seus componentes básicos ou transformadas em LDL. Em condições normais, 60 a 70% das IDL são removidas rapidamente da circulação pelas células hepáticas, através de receptores específicos: receptores B/E e receptores de partículas

remanescentes (LOPES et al., 1996).

As partículas não removidas pelo fígado interagem com a lipase lipoprotéica hepática, perdendo mais triacilgliceróis e fosfolípidios, além da perda de apoE, o que acarreta alterações adicionais de composição e propriedades destas partículas, produzindo as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), ricas em colesterol, e contendo quase exclusivamente apoB-100 (BREWER JÚNIOR et al., 1988). A composição e as propriedades das LDL estão relacionadas no Quadro 1.

A maioria das LDL é formada a partir do catabolismo das IDL, embora possa ocorrer produção direta pelo fígado. As LDL são as principais moléculas transportadoras de colesterol no plasma e as responsáveis pelo oferecimento de colesterol para as células extra-hepáticas, sendo esta a forma preferencial de obtenção de colesterol, em detrimento da síntese intracelular. Nas células, este colesterol poderá ser usado na síntese de membranas celulares e hormônios esteroidais.

Ao contrário das VLDL e IDL, as LDL têm vida-média relativamente longa (aproximadamente três dias). Após cumprirem suas funções como carreadoras de colesterol, 70 a 75% das LDL são captadas pelo fígado através de ligação com receptores específicos B/E. O restante utiliza uma segunda via, não dependente de receptor, de ação mais lenta (LOPES et al., 1996).

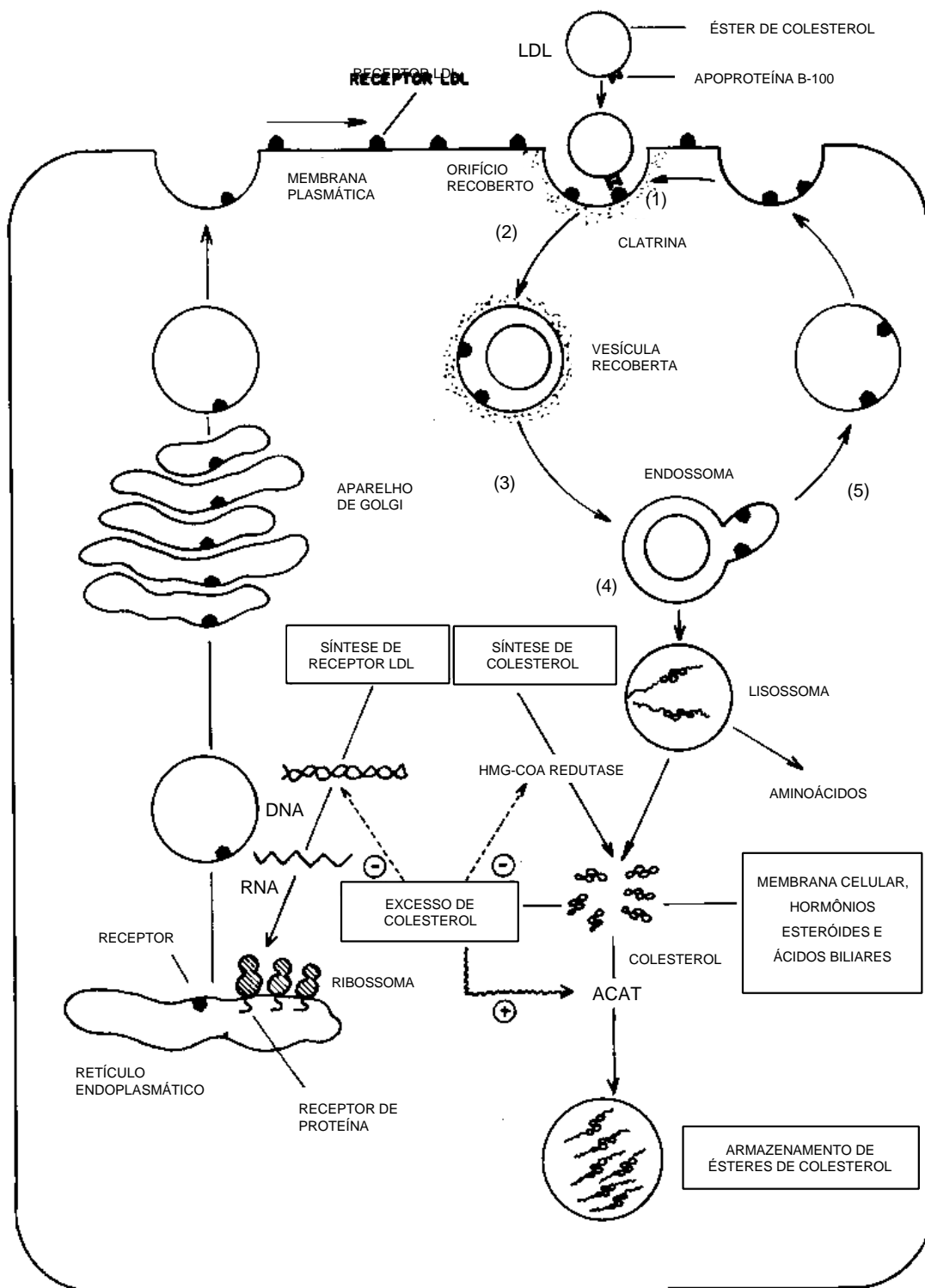
As IDL são também captadas por receptores B/E; dessa forma, ocorre competição entre IDL e LDL por esta via de remoção. No entanto, a presença de maior número de cópias de apoE por partícula de IDL determina maior afinidade da IDL pelo receptor B/E; conseqüentemente, sua taxa de remoção plasmática é mais rápida, quando comparada com a da LDL (HAVEEL, 1984; GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

O receptor de LDL é uma proteína composta por 839 aminoácidos. A região de ligação é a porção terminal, que é composta de oito seqüências repetidas de aminoácidos carregados negativamente.

Essa parte de receptor contém 322 aminoácidos e interage com resíduos de aminoácidos da apoB-100, carregados positivamente. A porção C-terminal serve para localizar o receptor na superfície da célula, junto à região hidrofóbica da membrana celular. Essa atividade do receptor é importante na determinação do catabolismo de LDL. O receptor é sintetizado pelo retículo endoplasmático rugoso e transportado até a superfície celular, migrando para regiões específicas, onde se agrega e pode interagir com as LDL (GOLDSTEIN e BROWN, 1984).

As LDL são captadas pelas células extra-hepáticas, através do processo de endocitose mediada por receptor B/E. A internalização das LDL inicia-se com a ligação dessas partículas aos receptores, na membrana plasmática da célula, conforme mostrado na Figura 3.

Existem aproximadamente 40.000 receptores por célula, sendo este número maior no fígado e nas glândulas adrenais. Os receptores estão localizados em regiões da membrana chamadas fossetas revestidas,



FONTE: MARINETTI (1990).

Figura 3 - Desenho esquemático do metabolismo de LDL (captação e internalização da partícula por receptores específicos).

as quais perfazem 2% da superfície celular e contêm a proteína clatrina. Esta proteína forma polímeros na parte intracelular da membrana citoplasmática, causando a invaginação das fossetas (englobando receptor e lipoproteína) e formando vesículas recobertas que se transformam em endossomos, após despolimerização e perda de clatrina. Estes endossomos são transformados em vesículas desacopladoras, as quais têm pH interno baixo, cerca de 5, mantido por uma bomba de ATP, ocasionando a dissociação entre as LDL e os receptores. Os receptores retornam à membrana plasmática para recomeçarem o ciclo, e os endossomos que contêm as lipoproteínas fundem-se com lisossomos, formando lisossomos secundários, onde os componentes das lipoproteínas são degradados em seus constituintes elementares. O colesterol livre resultante pode ser incorporado em membranas da célula ou, quando em excesso, transportado para o fígado pelo transporte reverso do colesterol, mediado pela HDL (MARINETTI, 1990).

A captação de LDL pelas células é um processo altamente regulado. O aumento do conteúdo celular de colesterol livre desencadeia três efeitos regulatórios: supressão da síntese endógena de colesterol, pela inibição da enzima HMG-CoA redutase e também pela supressão da transcrição do gene para esta enzima, além de acelerada degradação da mesma; ativação da acil-coA: colesterol aciltransferase, promovendo o armazenamento do excesso de colesterol na forma de gotículas de ésteres de colesterol; e regulação da síntese do próprio receptor de LDL, pela redução do conteúdo de mRNA para o receptor. A redução da síntese do receptor assegura que o colesterol não será captado em excesso pela célula, retirando-o de outras células que dele necessitem, mesmo quando os níveis extracelulares estejam muito elevados. Quando os níveis de colesterol intracelular diminuem, a regulação faz-se no sentido contrário, ocorrendo maior produção de receptores B/E (MATHEWS e Van HOLDE, 1990).

Muitos tecidos são capazes de sintetizar todo o colesterol que necessitam, não dependendo da produção hepática ou da dieta como fonte de colesterol. Entretanto, nos períodos de divisão celular intensa,

como no crescimento e na regeneração de tecidos, as células necessitam de grandes quantidades de colesterol. Órgãos como a glândula adrenal e as gônadas, que sintetizam hormônios esteróides, também necessitam de colesterol como matéria-prima na biossíntese destes hormônios. Essas células expressam número maior de receptores de LDL em suas membranas plasmáticas para captação dessas partículas da corrente sanguínea. Assim, as células ajustam o número de receptores de LDL, em suas membranas, de acordo com suas necessidades de colesterol (BRODY, 1994).

No organismo humano, o resultado do processo regulador do número de receptores de LDL pelo colesterol intracelular, principalmente no fígado, condiciona o nível plasmático da LDL. Isto ocorre pelo controle não apenas da velocidade de remoção dessas partículas do plasma, mas também da sua produção. Como estes receptores também removem as IDL, precursoras de LDL, sua permanência mais longa na circulação gera mais LDL, sendo esta a razão pela qual a estimulação da atividade dos receptores B/E provoca redução na concentração de LDL no plasma superior à prevista pelo aumento apenas de sua remoção plasmática (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

Influências genéticas, ambientais e terapêuticas podem regular o nível de LDL na circulação sanguínea através da modulação da atividade dos receptores teciduais dessas partículas. Fatores ambientais, como a alimentação com alto teor de colesterol, podem sobrecarregar o fígado, diminuindo assim o número de receptores de LDL e, em decorrência, elevando o nível dessa lipoproteína no plasma. Dietas ricas em gorduras saturadas têm efeito semelhante, mas por mecanismos não totalmente esclarecidos. Por outro lado, manipulações que diminuem o conteúdo tecidual de colesterol - como as resinas quelantes de sais biliares - diminuem a reabsorção intestinal desses ácidos, induzindo aumento na conversão hepática de colesterol em sais biliares. Ainda, a administração de inibidores da HMG-CoA redutase é acompanhada de aumento no número de receptores hepáticos para LDL, o que, conseqüentemente, diminui o nível plasmático de LDL

(GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

Mutações no gene do receptor da LDL traduzem defeitos fenotípicos na proteína receptora. Estas mutações pertencem a quatro classes gerais: mutações que levam à insuficiência da síntese do receptor (mais comum); mutações nas quais o receptor é sintetizado, mas não migra do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, a fim de ser transportado para a membrana citoplasmática; mutações nas quais o receptor é sintetizado, processado normalmente e alcança a superfície celular, mas não se liga à LDL (anormalidade no local de ligação); e mutações nas quais o receptor alcança a superfície da célula e se liga à LDL, mas não é capaz de se deslocar para as fossetas revestidas, devido a um defeito no segmento citoplasmático do receptor, diminuindo consideravelmente a interiorização das LDL. Como resultado dessas mutações, há redução da remoção de LDL da circulação sangüínea, causando acúmulo plasmático desta lipoproteína (MATHEWS e Van HOLDE, 1990).

#### **2.1.4.3. Transporte reverso de colesterol (metabolismo de HDL)**

As concentrações de colesterol nos tecidos extra-hepáticos podem ser aumentadas pelo menos por dois mecanismos: síntese “de novo” ou captação de LDL. Como o colesterol não pode ser degradado nos tecidos periféricos, ele deve retornar ao fígado para excreção ou degradação. Este processo é chamado de transporte reverso do colesterol (GRUNDY, 1983).

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) são as principais lipoproteínas envolvidas no mecanismo de remoção do colesterol dos tecidos extra-hepáticos (EISENBERG, 1984). Estas lipoproteínas representam um grupo heterogêneo de pequenas lipoproteínas que diferem quanto a composição e densidade. São constituídas de um núcleo de ésteres de colesterol, recoberto com colesterol não-esterificado, fosfolipídios e apoproteínas. As principais apoproteínas são apoA-I e apoA-II, podendo estar presentes também quantidades

menores de apoC e apoE (GRUNDY, 1983).

Estas lipoproteínas podem ser sintetizadas no fígado e intestino (BRODY, 1994) ou formadas a partir dos constituintes de superfície liberados pela lipólise das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis, como quilomícrons e VLDL (EISENBERG, 1983).

Segundo GARCIA e OLIVEIRA (1992), quando quilomícrons e VLDL perdem triacilgliceróis (remodelação intravascular mediada pela enzima lipase lipoprotéica), ocorre diminuição do volume da partícula; dessa forma, componentes de superfície, como colesterol livre, fosfolípidios e apoproteínas, são liberados, formando macroagregados moleculares de forma discoidal, precursores da HDL-plasmática. Porém, a formação de partículas discóides só é demonstrada *in vitro* e em perfusão de fígado isolado, pois, no plasma e interstício, estas lamelas são rapidamente transformadas em partículas esféricas, por aumento do conteúdo de colesterol esterificado. Esse mecanismo é mediado por uma enzima presente na superfície da HDL, denominada lecitina: colesterol aciltransferase (LCAT).

A LCAT é uma enzima sintetizada no fígado, exercendo sua função no plasma, onde esterifica o colesterol agregado à superfície da HDL. Esta enzima é ativada por apoA-I, apoA-II, possivelmente por apoC-I e atua na transferência de um ácido graxo insaturado da posição 2 de lecitina para o grupo hidroxil do colesterol, produzindo éster de colesterol e lisolecitina (MARINETTI, 1990).

As HDL nascentes, lipoproteínas de forma discóide, ricas em fosfolípidios, contendo apoA e possivelmente apoE, são partículas que têm alta afinidade por colesterol não-esterificado. O processo de incorporação de colesterol pelas HDL inicia-se com a interação destas partículas com estruturas que contenham colesterol livre na interface com o meio aquoso, como lipoproteínas menos densas (quilomícrons, VLDL e LDL) ou membranas celulares (macrófagos, fibroblastos, hemácias ou outras células extra-hepáticas). Através deste mecanismo as células eliminam o excesso de colesterol livre (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

O colesterol, após esterificação na superfície da HDL, é

incorporado ao seu núcleo, resultando em partículas esféricas denominadas HDL<sub>3</sub>. Na circulação, HDL<sub>3</sub> recebe constituintes adicionais. Além de o colesterol celular ser uma fonte contínua de colesterol, ele pode ser adquirido durante a degradação de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (VLDL e quilomícrons). Colesterol não-esterificado, fosfolípidios e apoC e apoE liberadas durante a lipólise podem também ser incorporados a HDL. Essas modificações, juntamente com a ação contínua da LCAT, podem expandir a HDL<sub>3</sub>, produzindo uma partícula maior, a HDL<sub>2</sub> (GRUNDY, 1983).

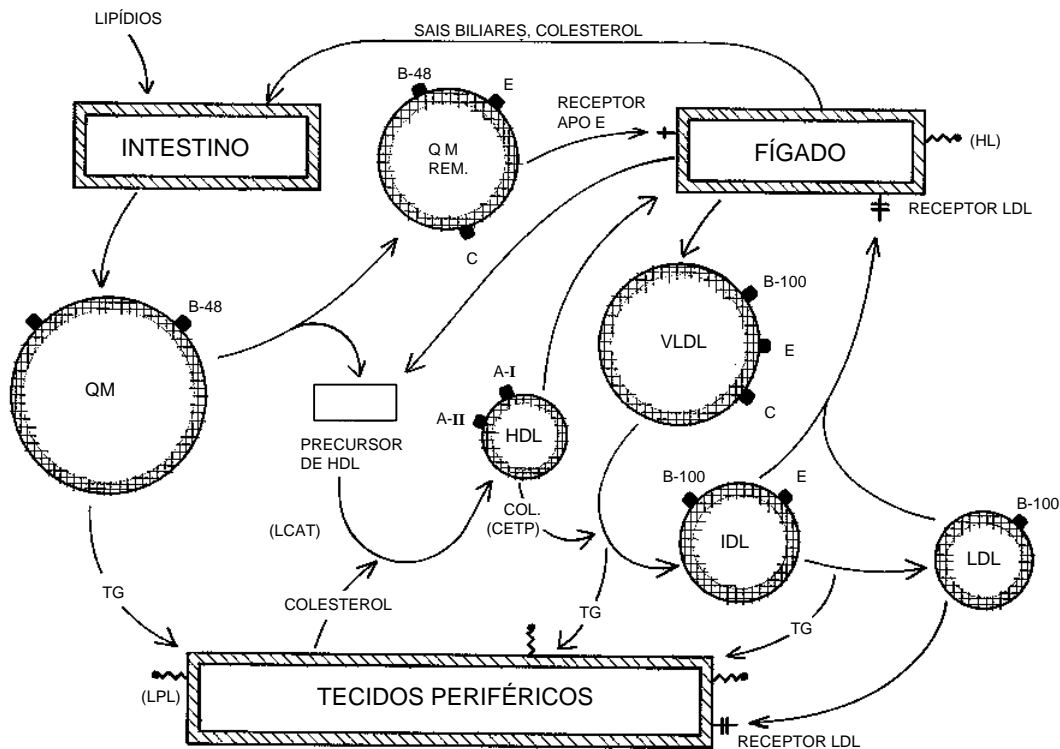
A HDL<sub>2</sub> transfere colesterol esterificado para outras classes de lipoproteínas, como quilomícrons, quilomícrons remanescentes, VLDL e IDL, que são rapidamente removidas pelo fígado, caracterizando o transporte reverso de colesterol pela “via indireta”. Esta transferência é mediada pela proteína de transferência de colesterol esterificado, que possui também a função de transferir triacilgliceróis no sentido contrário, ou seja, de lipoproteína ricas em triacilgliceróis para a HDL. Na circulação hepática, triacilgliceróis e fosfolípidios da HDL<sub>2</sub> são hidrolisados pela lipase lipoproteína hepática, dando origem a HDL<sub>3</sub>, que, ao retornar aos tecidos extra-hepáticos, reinicia o ciclo de captação de colesterol. Nesta etapa metabólica ocorre também a transferência de colesterol esterificado da HDL<sub>2</sub> para o fígado pela “via direta”, ou seja, sem o envolvimento de outras classes de lipoproteínas (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

O mecanismo pelo qual ocorre captação hepática da HDL não está totalmente esclarecido, existindo controvérsias na literatura sobre a existência de um receptor específico para a interação de HDL com o hepatócito. Outro ponto também não elucidado no metabolismo das HDL é a forma como se processa o fluxo de colesterol em sentidos opostos, entre a lipoproteína e a célula: a HDL, nos tecidos extra-hepáticos (macrófagos e fibroblastos), retira colesterol livre, enquanto doa colesterol esterificado para os hepatócitos (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

O processo de transporte reverso do colesterol, permitindo que o excesso de colesterol dos tecidos periféricos seja levado ao fígado, onde

ele pode ser metabolizado, segundo GRUNDY (1983) e MARINETTI (1990), poderia explicar porque níveis elevados de HDL-colesterol conferem proteção à aterosclerose e à doença arterial coronariana.

Na Figura 4 é mostrado um esquema geral do metabolismo das lipoproteínas plasmáticas, em humanos.



FONTE: MARINETTI (1990).

Figura 4 - Esquema geral do metabolismo de lipoproteínas.

## 2.2. Corantes naturais

### 2.2.1. Corante cúrcuma

A cúrcuma em pó comercial consiste no rizoma seco e pulverizado da *Curcuma longa* L., planta herbácea pertencente à família *Zingiberaceae*, originária do sul e sudeste da Ásia e cultivada na Índia,

na China, em Formosa, na Indonésia, em Java, nas Filipinas, no Caribe, no norte da Austrália e na América do Sul, entre outros (GOVINDARAJAN, 1980; MATHAI, 1979).

Também conhecida como açafroeira ou açafirão-da-terra no Brasil, as regiões de maior cultivo da *Curcuma* encontram-se nos estados de Goiás, Mato Grosso e São Paulo (OLIVEIRA et al., 1992).

A *Curcuma longa* L. é uma planta que apresenta a vantagem de não exigir cuidados especiais em seu cultivo, desenvolvendo-se bem em diversas condições tropicais, em altitudes que variam do nível do mar a 1.500 m e em temperaturas de 20 a 30°C. Seu ciclo vegetativo varia de 7 a 9 meses, e a propagação da planta é feita utilizando-se seus rizomas. Estes rizomas crescem agrupados no subsolo, abaixo do colo da planta, organizados numa estrutura normalmente denominada “mão”, onde rizomas menores, “dedos”, agrupam-se ao redor de um maior, chamado “pião” (MAIA, 1991). A planta pode atingir até 1 m de altura, sendo a colheita dos rizomas feita manual ou mecanicamente, quando a parte aérea da planta começa a secar e as folhas tornam-se amarelas, geralmente 7 a 8 meses após o plantio. Após o corte das folhas e do caule os rizomas são retirados da terra, lavados e secos, para serem processados (GOVINDARAJAN, 1980; OLIVEIRA et al., 1992).

O processamento do rizoma consiste no fatiamento (2 a 5 mm) e na secagem solar ou artificial, para posterior moagem. Anteriormente ao processo de secagem, os rizomas podem ser submetidos ao processo de cura, que consiste no cozimento em água, a fim de gelatinizar o amido, o que diminui o tempo de secagem, destrói enzimas oxidativas e reduz a carga microbiana (GOVINDARAJAN, 1980).

SAMPATHU et al. (1988) estudaram o efeito de três diferentes métodos de pré-tratamentos dos rizomas: cozimento em água, cozimento em água alcalina e não-cozimento, de rizomas inteiros e fatiados, em relação a tempo de secagem, teor de oleorresina e

curcumina. Cozimento e, ou, fatiamento ajudaram a reduzir drasticamente o período de secagem, sem diferença no teor de curcumina. A eficiência da extração da curcumina em acetona foi maior em amostras não-cozidas (92-94%) do que em cozidas (76-84%).

Em estudos realizados por KRISHNAMURTHY et al. (1975) e PRASAD e SINGH (1980), foram verificados outros pré-tratamentos na preparação dos rizomas de *Curcuma*, como: fervura em água, fervura em salmoura a 5%, fervura em solução a 0,1% de carbonato de sódio, vapor, descascamento e fatiamento, seguidos por secagem mecânica e ao sol. Observou-se que os pré-tratamentos não forneceram diferenças significativas no teor de curcumina e óleo volátil, diminuíram o tempo de secagem e propiciaram melhor aparência ao produto seco.

Quanto à composição química da *Curcuma*, segundo GOVINDARAJAN (1980), poucas informações encontram-se disponíveis, e muitas variações nos teores percentuais estabelecidos para seus constituintes têm sido encontradas. No entanto, segundo esse mesmo autor, o amido como reserva de carboidratos dos rizomas é esperado ser o seu maior componente; e, além de constituintes comumente encontrados em plantas, como proteína, lipídios e fibra, a *Curcuma* apresenta também componentes característicos: os pigmentos curcuminóides, responsáveis pela cor amarela (2 a 5%), e o óleo volátil (2 a 6%).

MARTINS e RUSIG (1992), em um trabalho de revisão sobre a cúrcuma como corante natural, para uso alimentício, reuniram os seguintes dados, obtidos a partir de vários autores, sobre a composição dos rizomas da *Curcuma longa* L.: óleo essencial: 1,3 a 5,5%/2,8 a 6,0%/ou no máximo 2%, constituído principalmente por turmerona e desidroturmerona e de um percentual menor de outras cetonas aromáticas; umidade: 9,0 a 19,0%; amido: 30,0 a 50,0%; pentosanas: 4,7%; proteína bruta: 6,0 a 11,0%; fibra: 2,0 a 6,0%; e substância corante - curcumina: 2,5 a 8,1%.

O teor de curcumina varia em função de variedade, local de plantio, práticas agrícolas, fertilização e maturidade dos rizomas. O teor de amido possivelmente se relaciona com o grau de maturação (KRISHNAMURTHY et al., 1975; MATHAI, 1979; GOVINDARAJAN, 1980).

A curcumina é um pó cristalino, inodoro, pouco solúvel em água, éter de petróleo e benzeno, solúvel em etanol, metanol, ácido acético glacial e propileno glicol e muito solúvel em acetona e éter etílico. Na forma de pó fino pode ser dispersa em óleo. Quimicamente, o corante é identificado como um diferuloilmetano: 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona, de fórmula molecular  $C_{21}H_{20}O_6$  (PEROTTI, 1975).

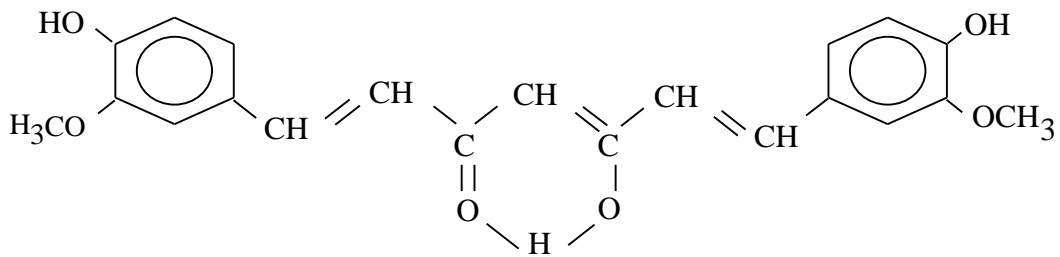
A *Curcuma* contém ainda outros pigmentos, derivados desmetoxilados da curcumina, desmetoxicurcumina e bidesmetoxicurcumina, os quais foram identificados através de técnica de cromatografia em coluna, utilizando-se sílica-gel e benzeno como eluente. Os dois derivados reagem de maneira similar a curcumina com cloreto férrico e a outros reagentes, sendo análogos estruturalmente (Figura 5) (GOVINDARAJAN, 1980).

Os três componentes, curcumina, desmetoxicurcumina e bidesmetoxicurcumina, têm sido estimados por cromatografia de camada delgada, apresentando manchas de coloração amarelo-avermelhada, amarelo-alaranjada e amarela, respectivamente. Todas as manchas apresentam fluorescência amarela sob luz ultravioleta. O espectro de fluorescência apresenta excitação a 435 nm e emissão a 520 nm. Apresentam pontos de fusão de 183°C, 168°C e 224°C e massas moleculares de 368, 338 e 308, respectivamente. O espectro de absorção tem pequena variação para os três componentes: 429 nm para curcumina, 424 nm para desmetoxicurcumina e 419 nm para bidesmetoxicurcumina (GOVINDARAJAN, 1980).

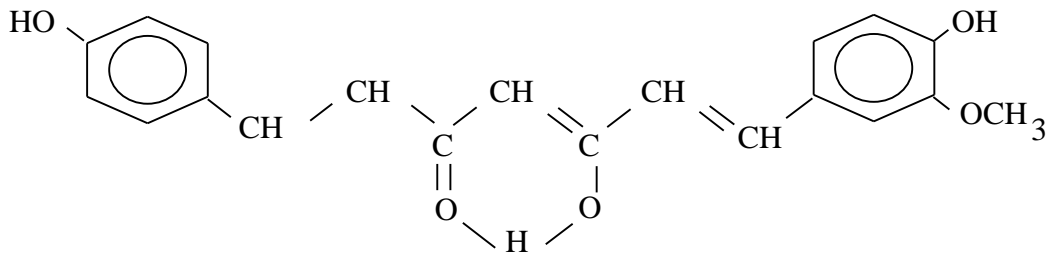
O pigmento apresenta pouca estabilidade à luz, embora seja

bastante estável ao calor (AUSLANDER et al., 1977).

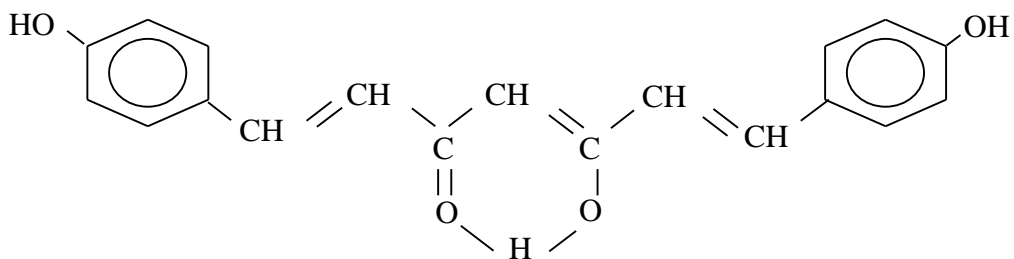
Em meio ácido, pH 4 a 5, a curcumina mantém a cor amarela; no entanto, a adição de álcali muda a cor para marrom avermelhado. A cor e a absorvância decrescem rapidamente com o tempo, quando o pH muda de 7 para 10. A absorvância mantém-se constante entre pH 4 e 7 (GOVINDARAJAN, 1980).



Curcumina



Desmetoxicurcumina



Bidesmetoxicurcumina

FONTE: GOVINDARAJAN (1980).

Figura 5 - Estrutura dos pigmentos curcuminóides identificados na *Curcuma longa* L.

O óleo volátil obtido por extração da cúrcuma em pó varia de amarelo-pálido a amarelo-alaranjado, com odor residual dos rizomas da cúrcuma. O aroma da cúrcuma é devido a cetonas sesquiterpênicas, formadas por aproximadamente 59% de ar-turmerona (ou desidroturmerona) e turmerona, numa proporção de 40 e 60% respectivamente. O óleo volátil contém ainda um percentual menor de cetonas aromáticas, como zingibereno (25%), d- $\alpha$ -felandreno (1%), d-sabineno (0-6%), cineol (1%) e borneol (0-5%) (KRISHNAMURTHY et al., 1976).

Além do pó de *Curcuma*, dois outros produtos básicos da *Curcuma* encontram-se comercialmente disponíveis: a oleorresina e o extrato purificado. O pó de *Curcuma* é um constituinte indispensável ao *curry* indiano (GOVINDARAJAN, 1980), sendo também utilizado em pasta de mostarda e em condimentos, produtos nos quais o seu aroma característico é desejável (ABEA, 1984).

A oleorresina de *Curcuma* é obtida pela extração com solventes do pó de *Curcuma* seco, constituindo-se num produto altamente viscoso, marrom-alaranjado, com 30 a 40% de curcumina, 15 a 20% de óleo volátil e apresentando aroma característico da *Curcuma* e sabor residual amargo. Entretanto, quando diluída em níveis de uso, obtém-se uma cor amarelo-brilhante. A oleorresina é largamente utilizada em picles, maioneses, mostarda, revestimentos de filés de peixe congelado, produtos cárneos, massas alimentícias, bebidas não-alcoólicas, gelatinas, manteiga, queijos, etc., sendo a função predominante a de colorir o produto (ABEA, 1984).

Entretanto, como a curcumina é insolúvel em água e muitos sistemas de alimentos contêm significativa quantidade de água, o pigmento não colore esses sistemas sem algum tipo de emulsificante (SASTRY, 1970). Para uso comercial, a oleorresina de *Curcuma* é geralmente misturada com um solubilizante, como propileno glicol, polisorbato ou óleo vegetal, para facilitar o seu uso (KRISHNAMURTHY

et al., 1976).

O extrato de curcumina purificado consiste no corante sem aroma e sabor residual, concentrado, obtido por extração com solventes do pó de *Curcuma* seco (FREUND et al., 1988). Em alguns produtos alimentícios, como bebidas, gelatinas, queijos, manteigas, sorvetes e produtos de confeitaria, nos quais o aroma da cúrcuma é indesejável, o uso do extrato de curcumina torna-se preferível (PEROTTI, 1975).

Segundo SAMBAIAH et al. (1982), a cúrcuma é um dos condimentos mais comuns na Índia, sendo usado principalmente por suas propriedades de corante e, em parte, por seu *flavour*. No entanto, paralelamente a este uso, muitas aplicações medicinais têm sido também descritas no sistema de medicina tradicional indiano.

Como remédio caseiro, segundo GOVINDARAJAN (1980), os rizomas da *Curcuma* encontram indicação como carminativo, na dispepsia, nas afecções da pele, além de serem usados, externamente, na forma de pasta, no alívio de luxações, contusões e inflamações das juntas.

AMMON e WAHL (1991) relacionaram vários trabalhos sobre as propriedades farmacológicas de extratos da planta, da curcumina, seu principal princípio ativo, como também de seu óleo volátil. Resultados positivos foram demonstrados por vários pesquisadores sobre a atividade antiinflamatória da *Curcuma*, usando um modelo clássico para estudar os efeitos de agentes antiinflamatórios. Este modelo consiste em testar a ação inibitória de substâncias no desenvolvimento de edema - a fase exsudativa da inflamação - em pata de ratos, induzido pela injeção local de substâncias como, por exemplo, a carragenina. Entre os trabalhos relacionados por esses autores estão os de Yegnanarayan et al. (1976), que investigaram vários extratos secos (éter de petróleo, álcool e água) da *Curcuma longa*, por administração intraperitoneal, constatando, após quatro horas, que o extrato aquoso foi o mais ativo

na redução do edema; os de Srimal e Dhawan (1985), que, utilizando curcumina, também encontraram efeito positivo no teste de edema agudo induzido por carragenina em camundongos e ratos após administração oral. Entretanto, as doses requeridas foram muito mais altas do que as doses necessárias pela administração intraperitoneal, que forneciam resultados similares; os de Chandra e Gupta (1972), que constataram que o óleo volátil, na dose de 0,1 mL/kg/dia, oralmente, pode também suprimir edema agudo; e os de Ghatak e Basu (1972), em um experimento de indução do processo de artrite por formalina, que, como antiartrítico, encontraram cerca de 45 a 50% de inibição, utilizando 0,1 mg/kg de curcuminato de sódio e 3 mg/kg de curcumina, ambos administrados oralmente, em comparação com 5 mg/kg de hidrocortisona, por administração intraperitoneal.

Entre outros trabalhos relacionados por AMMON e WAHL (1991) encontra-se o de Ramprasad e Sirsi (1956), que relataram o efeito de curcumina como colagogo e colerético. Estes autores examinaram o efeito de curcuminato de sódio na secreção biliar em cachorros, encontrando 100% de aumento na quantidade de secreção, após a administração intravenosa de 25 mg/kg. O óleo essencial apresentou efeito similar, porém menos potente. Verificou-se também diminuição na concentração de sólidos na bile; a quantidade total de sais biliares, colesterol e bilirrubina excretados sob o efeito da droga foi aumentada, e a quantidade de ácidos graxos permaneceu constante. Bhavanishankar e Screenivasa Murthy (1979) investigaram os efeitos antibacterianos de *Curcuma longa*, *in vitro*, encontrando uma supressão significativa no crescimento de uma larga variedade de microrganismos pelo óleo volátil (4,5-90 µL/100 mL). Curcumina (2,5-50 mg/100 mL) somente inibiu *Staphylococcus aureus*, e o extrato alcoólico (10-200 mg/100 mL) de *Curcuma longa* induziu mudanças morfológicas em *Streptococci*, *Lactobacilli* e *Staphylococci*. Mishra e Sahu (1977) também observaram atividade fungistática contra vários

dermatófilos, *in vitro*, com o uso de um extrato de *Curcuma longa*. Dhar et al. (1968) constataram que um extrato etanólico dos rizomas foi eficaz contra *Entamoeba histolytica*, *in vitro*.

Na literatura, entre outros trabalhos encontrados, inclui-se o de SHARMA (1976), que estudou a atividade antioxidante *in vitro* de curcumina, utilizando preparações de cérebro de rato, observando 95% de inibição da peroxidação lipídica na presença de  $5,15 \times 10^{-3}$  M de curcumina.

CONNERY et al. (1991) estudaram o efeito inibitório de curcumina e alguns outros compostos da dieta relacionados estruturalmente (ácidos clorogênico, cafeico e ferúlico) na promoção de tumor e metabolismo do ácido araquidônico. Curcumina apresentou efeito inibidor na promoção de tumor na pele de camundongos, induzido por 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato; os outros compostos apresentaram efeito inibidor menos potente. Também foram constatadas inibição da atividade da enzima ornitina descarboxilase e inflamação na pele de camundongos, além da inibição do metabolismo do ácido araquidônico, que induz processo inflamatório *in vivo*, e da atividade das enzimas lipoxigenase e ciclooxigenase *in vitro*.

GOUD et al. (1993) analisaram o efeito da cúrcuma na atividade de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, em tecidos hepáticos de ratos alimentados com cúrcuma nas doses de 0,1; 0,5; 1,5 e 10%, durante quatro semanas. Observou-se elevação na atividade da enzima UDP glicuronil transferase em ratos alimentados com 10% de cúrcuma na dieta e da enzima glutathione-S-transferase com 5 e 10% de cúrcuma, sugerindo que a cúrcuma pode atuar na promoção de mecanismos que aumentem os processos de destoxificação do organismo, atenuando os efeitos de vários carcinógenos dietéticos.

Estudando o efeito de curcumina nos níveis de colesterol sérico e hepático em ratos alimentados com colesterol, nas doses de 0,1; 0,25 e 0,5% da dieta, SUBBA RAO et al. (1970) verificaram redução desses

níveis. Em dieta sem colesterol, a adição de 0,5% de curcumina purificada na dieta resultou em elevação desses níveis. Menor deposição de colesterol foi encontrada no fígado dos animais alimentados com curcumina, além do aumento na excreção fecal de sais biliares e colesterol, tanto em ratos normais como nos hipercolesterolêmicos.

SRINIVASAN e SAMBAIAH (1991) estudaram o efeito de curcumina na alimentação de ratos, na dose de 0,5%, por três meses, na atividade da enzima colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilase e nos níveis de colesterol sérico e hepático, em ratos. A curcumina foi adicionada a uma dieta básica, na dose de 0,5%, por três meses. Foi observado aumento na atividade da enzima colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilase, embora efeitos hipocolesterolêmicos ou redução da concentração de colesterol no fígado dos animais alimentados com curcumina não tenham ocorrido. Esses autores concluíram que esta situação teria sido resultado de uma simultânea estimulação da biossíntese do colesterol hepático, paralelamente ao catabolismo do colesterol a sais biliares.

Sobre o metabolismo da cúrcuma/curcumina, segundo a JOINT FAO/WHO... (1982), estudos em ratos sugerem que 60% de uma suspensão aquosa de curcumina é absorvida, tendo a suspensão em óleo maior absorção. Curcumina não-modificada não é detectada na urina ou no sangue e não se acumula nos tecidos ou gorduras. A curcumina sofre rápido metabolismo, e, apesar de os metabólitos não terem sido completamente identificados, o uso de curcumina marcada com <sup>14</sup>C tem demonstrado que os principais metabólitos biliares são glicuronídeos de tetrahidrocurcumina e hexahidrocurcumina e, em menores quantidades, ácido desidroferúlico e ácido ferúlico.

Quanto ao aspecto de segurança na ingestão da cúrcuma, alguns autores pesquisaram possíveis efeitos tóxicos do corante. Entre estes, encontram-se os trabalhos de BHAVANISHANKAR e SREENIVASA MURTHY (1987), os quais investigaram a cúrcuma na dose de 500 mg/kg de peso corporal e seu extrato alcoólico na dose de

60 mg/kg de peso corporal, adicionados à dieta de ratos, por três gerações. Não foi observada diferença significativa nos índices de fertilidade, de gestação, de viabilidade e de lactação e na média do número de filhotes vivos, entre os animais submetidos aos tratamentos e o controle.

SAMBALIAH et al. (1982), utilizando os rizomas de *Curcuma* e curcumina na dieta de ratos nas dosagens de 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0 e 10%, não observaram qualquer efeito adverso no crescimento, na taxa de eficiência alimentar, nos níveis de constituintes sangüíneos (hemoglobina, proteína total, albumina, globulina, aminotransferases séricas (TGO e TGP) e fosfatase alcalina e na contagem de leucócitos ou eritrócitos.

BHAVANISHANKAR et al. (1986) estudaram os efeitos de cúrcuma na dose de 500 mg/kg de peso corporal e de seu extrato alcoólico na dose de 60 mg/kg de peso corporal em ratos e macacos por 12 e 9 meses, respectivamente, constatando que a resposta ao crescimento, a utilização de alimentos e calorias, o peso de órgãos, os constituintes sangüíneos e as análises de urina (açúcar, albumina, corpos cetônicos, sais biliares e pigmentos biliares) dos animais não mostraram qualquer diferença em comparação aos respectivos animais do tratamento controle.

BHAVANISHANKAR et al. (1980) estudaram o efeito de suplementação da dieta de macacos (grupos de três macacos adultos fêmeas) com cúrcuma, na dose de 2,5 g/kg de peso corporal, e de um extrato alcoólico na dose de 300 mg/kg de peso corporal, por três semanas. Comparados aos controles, não foram observados efeitos relacionados ao tratamento, quanto a mortalidade, ganho de peso ou exames patológicos de coração, fígado e rins.

### **2.2.2. Corante antocianina**

As antocianinas compreendem um grupo de pigmentos de ocorrência natural, os quais são responsáveis pelas colorações azul, vermelha, púrpura e violeta de muitas espécies no reino vegetal (JACKMAN et al., 1987).

Como outros compostos fenólicos, as antocianinas estão localizadas nos vacúolos das células. Estes pigmentos são solúveis em água e, apesar de se acumularem essencialmente nas células epidérmicas de flores e frutos, são freqüentemente encontrados também em outras partes da planta, como raízes e folhas (BROUILLARD, 1983).

As antocianinas formam as cores de muitos frutos e vegetais, sendo provavelmente o corante mais comum, de cor vermelha, em sucos de frutas, vinhos e geléias; elas têm sido identificadas em matérias vegetais tão diversas quanto maçãs, uvas, morangos, framboesas, cerejas, cascas de batata-doce, cebola-roxa, repolho-roxo, rabanete e ruibarbo, para citar apenas alguns dos muitos outros frutos e vegetais (TIMBERLAKE e BRIDLE, 1980; FREUND et al., 1988).

Uma das mais importantes funções das antocianinas na área da percepção visual é a atração de animais (principalmente insetos e pássaros) com propósito de polinização e disseminação de sementes; e, por esta razão, é de considerável valor na coevolução das interações entre plantas e animais (BROUILLARD, 1983; STRACK e WRAY, 1989).

Sintetizadas por quase todas as plantas superiores, as antocianinas caracterizam-se por possuírem a estrutura carbônica  $-C_6-C_3-C_6-$  e, portanto, fazerem parte do grupo de compostos conhecidos coletivamente como flavonóides. Entretanto, apesar de possuírem a mesma origem biossintética, as antocianinas diferem dos outros flavonóides naturais por absorverem fortemente a luz visível (BROUILLARD, 1982; JACKMAN et al., 1987).

Modelos experimentais têm demonstrado, no entanto, que, em condições tão similares quanto possíveis às condições naturais (temperatura ambiente e soluções aquosas ligeiramente ácidas), muitas

das antocianinas encontradas na natureza são estáveis, porém na forma descolorida. Portanto, mecanismos *in vivo* devem existir para estabilizar a cor à custa de estruturas descoloridas. Tendo em vista que muitas substâncias coexistem com as antocianinas nos vacúolos das células (outros compostos fenólicos, proteínas, peptídeos, produtos da degradação de ácidos nucléicos, açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e minerais como íons cálcio, potássio e magnésio), certamente algumas destas substâncias podem interagir com as antocianinas, resultando na prevenção da perda de cor ou mesmo intensificando-a (BROUILLARD, 1983).

De acordo com BOBBIO e BOBBIO (1992), a coloração de uma mesma antocianina pode variar nas plantas pela sua associação com cátion, por efeito do pH e por associação com outros compostos presentes na planta, notadamente outros flavonóides não-antociânicos.

As antocianinas encontradas na natureza são glicosídeos de antocianidinas. A estrutura básica das antocianidinas é o cátion flavilium (2-fenilbenzopirilium), a partir do qual as seis antocianidinas mais comuns - pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina -, juntamente com oito estruturas raras, são derivadas na natureza pela adição de grupos hidroxila e por metilação desses grupos (STRACK e WRAY, 1989) (Figura 6).

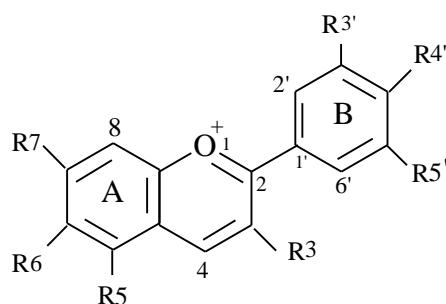
Em geral, as antocianidinas não se acumulam nas plantas, e os pigmentos ocorrem em flores e frutas, principalmente na forma glicosilada, ou seja, de antocianinas. As antocianidinas são mais instáveis e menos solúveis em água que as antocianinas, indicando que a glicosilação confere solubilidade e estabilidade ao pigmento (BROUILLARD, 1982).

As classes mais comuns de glicosídeos são 3-monosídeos, 3-biosídeos e 3-triosídeos, como também 3,5 diglicosídeos e, mais raramente, 3,7-diglicosídeos. Os monossacarídeos, glicose, galactose, ramnose e arabinose, são os açúcares mais freqüentemente encontrados, seguidos por xilose. Os dois mais importantes tipos de glicosídeos são 3-monosídeos e 3,5 diglicosídeos (STRACK e WRAY,

1989).

Segundo BOBBIO e BOBBIO (1992), ligado ao carbono da posição 3 da antocianidina existe sempre um açúcar, exceto no caso das desoxiantocianinas, em que o açúcar geralmente está ligado na posição 5. Poucas são as antocianinas conhecidas glicosiladas na posição 7, e os açúcares nas posições 5 e 7 são sempre glicose. Em muitos pigmentos, os resíduos de açúcar ligados ao carbono na posição 3 da antocianina são acilados, estando estes ácidos ligados na hidroxila da posição 3 e, menos freqüentemente, na posição 6 do açúcar.

Os grupos acil comumente encontrados nas antocianinas são ácidos aromáticos (ácidos fenólicos), entre os quais os mais freqüentes são os ácidos hidroxicinâmicos, p-cumárico, caféico e ferúlico, sendo mais raramente encontrados os ácidos hidroxibenzóicos. Ácidos alifáticos podem também estar presentes, como os ácidos acético, oxálico, malônico, succínico e málico, sendo conhecidas estruturas de



Cátion flavilium

Antocianidina	Substituição (R)						
	3	5	6	7	3'	4'	5'
<i>Estruturas comuns</i>							
Pelargonidina	OH	OH	H	OH	H	OH	H
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
Peonidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H
Delfinidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
Petunidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH
Malvidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe
<i>Estruturas raras</i>							
Aurantidina	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
6-hidroxicianidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H
5-metilcianidina	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H

Rosinidina	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H
Pulquelidina	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH
Europinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH
Hirsutidina	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe
Capensinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe

FONTE: Adaptado de STRACK e WRAY (1989).

Figura 6 - Estruturas de antocianidinas de ocorrência natural.

antocianinas que contêm ambos, ácidos alifáticos e aromáticos (STRACK e WRAY, 1989).

A metoxilação na estrutura das antocianinas usualmente tem lugar nas posições 3' e 5'. Raras são as antocianinas com uma metoxila nas posições 7 e 5 (MAZZA e BROUILLARD, 1987).

Segundo FRANCIS (1992), devido ao grande número de possíveis combinações de antocianidinas, açúcares e grupos acil, são conhecidas aproximadamente 300 antocianinas.

Apesar de largamente disseminadas na natureza, são poucas as fontes de antocianinas utilizáveis comercialmente (ARAÚJO, 1995), destacando-se as cascas de uva, como subproduto da indústria do vinho, o qual, devido à sua grande importância em alguns países, leva à disponibilidade de grandes quantidades de cascas de uva. Estas contêm altas concentrações de pigmentos antociânicos, os quais estão disponíveis comercialmente sob o nome genérico de enocianinas (FRANCIS, 1992).

Os processos de obtenção das enocianinas incluem extrações com solução aquosa de anidrido sulfuroso ou com solventes alcoólicos acidificados. O produto final pode estar na forma de líquido concentrado, pasta ou pó (MARKAKIS, 1982).

As uvas contêm cerca de 25 pigmentos (dependendo da variedade), os quais são basicamente mono e diglicosídeos das seis mais comuns antocianidinas, relacionadas na Figura 6. Os corantes comerciais derivados de uvas geralmente têm porção apreciável de pigmentos polimerizados (acima de 50% ou mesmo mais), dependendo

do tempo de produção do corante e do tratamento ao qual foi submetido (FRANCIS, 1992).

Antocianinas derivadas de uvas têm sido utilizadas como corantes alimentares por muitos anos, embora haja limitações no seu emprego, devido a sensibilidade a mudanças de pH do meio e problemas de estabilidade dos pigmentos, visto que antocianinas reagem com ácido ascórbico, metais, açúcares e oxigênio, sofrendo influência da luz e temperatura, além da ação de enzimas, produzindo polímeros e produtos de degradação (FRANCIS, 1992).

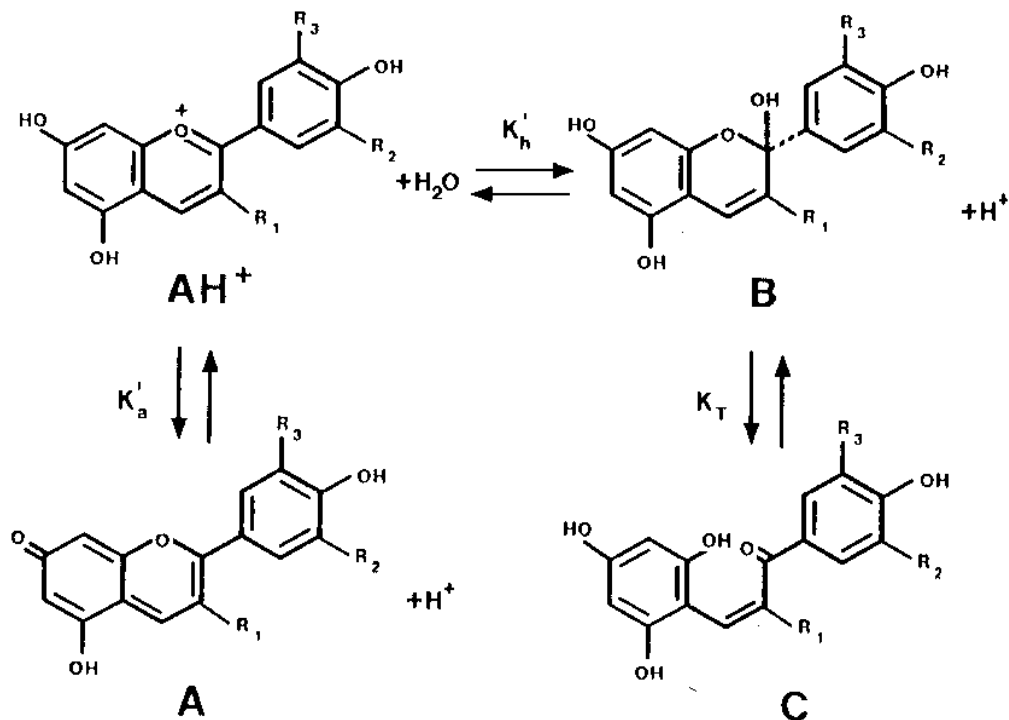
A cor das antocianinas em solução depende de vários fatores, como concentração, solvente, temperatura, pH, estrutura do pigmento e presença de substâncias que reagem reversível ou irreversivelmente com as antocianinas (BROUILLARD, 1982).

Segundo JACKMAN et al. (1987), o pH tem influência marcante na cor das soluções de antocianinas. Como resultado de sua natureza anfotérica, as antocianinas comportam-se algumas vezes como indicadores de pH. Estas apresentam coloração vermelha intensa, quando em pH abaixo de 3. Quando o pH da solução é aumentado, a coloração vermelha tende a desaparecer, com as soluções tornando-se incolores na faixa de pH de 4 a 5. Com aumentos adicionais de pH, as soluções de antocianinas apresentam coloração púrpura e azul, mudando, após estocagem ou aquecimento, de azul para amarelo.

De acordo com IACOBUCCI e SWEENY (1983), em valores de pH abaixo de 2, as antocianinas existem principalmente na forma de cátion flavilium ( $AH^+$ ), sendo vermelhas quando  $R_3 = O$  - açúcar ou amarelas quando  $R_3 = H$  (Figura 7). Com o aumento do pH ocorrem perda de prótons e formação de uma base quinoidal (A) vermelha ou azul. A hidratação do cátion flavilium ( $AH^+$ ) produz um composto incolor, denominado carbinol ou pseudobase (B). O equilíbrio pode deslocar-se para a formação de chalconas (C), que também é incolor. As quantidades relativas de cátion ( $AH^+$ ), forma quinoidal (A), carbinol (B) e

chalcona (C), no equilíbrio, variam tanto com o pH quanto com a estrutura da antocianina.

Segundo BOBBIO e BOBBIO (1992), além do pH, a luz é o segundo fator em importância na alteração da cor das antocianinas, sendo a alteração mais intensa quando o fator luz é combinado com o efeito do oxigênio.



FONTE: IACOBUCCI e SWEENY (1983).

Figura 7 - Transformações estruturais das antocianinas em função do pH.

O corante não é estável ao aquecimento prolongado, alterando sua coloração original para castanho-escuro. Perda de coloração e escurecimento também podem ocorrer durante o armazenamento; portanto, o uso de baixa temperatura é recomendado. Em temperaturas acima de 60°C, ocorrem hidrólise da ligação 3-glicosídica, liberando a aglicona, e abertura hidrolítica do anel, com formação do derivado de chalcona, que se degrada a compostos escuros insolúveis de natureza polifenólica. A estabilidade das antocianinas à degradação térmica

aumenta com a diminuição do pH e a ausência de oxigênio (ARAÚJO, 1995).

As antocianinas reagem com íons bissulfito ou com dióxido de enxofre, sofrendo descoloração em processo reversível, causada provavelmente pela adição desses compostos nas posições 2 ou 4 das antocianinas, uma vez que em sais de flavilium nos quais estas posições não estejam livres esta reação não ocorre (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

Outro fator que também altera a estabilidade das antocianinas é a sua interação com ácido ascórbico, a qual causa a degradação de ambos os compostos, com descoloração dos pigmentos. Segundo ARAÚJO (1995), acredita-se que a auto-oxidação do ácido ascórbico, com formação de  $H_2O_2$ , promove a oxidação do núcleo flavilium, levando à perda de cor dos pigmentos.

No entanto, alguns fatores têm sido estabelecidos como responsáveis pelo aumento da estabilidade das antocianinas. Um aumento considerável na estabilidade ocorre quando estas contêm ácidos fenólicos na molécula, como também quando em presença de flavonóides não-antociânicos, especialmente flavonóis, como rutina e quercetina, além de outros compostos, como acetaldeído, aminoácidos, taninos, etc. Este aumento de estabilidade é atribuído ao fenômeno da copigmentação intermolecular, ou seja, a associação entre a antocianina e um outro composto (copigmento), o qual geralmente não apresenta cor por si mesmo, mas pode aumentar a estabilidade de espécies coloridas, além da copigmentação intramolecular, em que o copigmento é parte da molécula da antocianina (BROUILLARD, 1983).

Muitos estudos sobre antocianinas têm se direcionado para a identificação de novas fontes produtoras desses pigmentos, a elucidação de suas estruturas químicas e a procura de soluções para o problema da estabilidade dos pigmentos, que dificultam o seu emprego como corante na indústria de alimentos. Entretanto, segundo TAMURA e

YAMAGAMI (1994), mais recentemente, além de corantes, as antocianinas têm sido também investigadas com substâncias ativas biologicamente; e propriedades das antocianinas como agente antiinflamatório, anticonvulsivo e antioxidante têm sido demonstradas em alguns estudos.

As propriedades antioxidativas de antocianinas, como de outros compostos flavonóides e fenólicos encontrados em vegetais, frutos e no vinho, especialmente no vinho tinto, o qual é incluído mais amplamente e de forma mais constante na dieta de algumas culturas, têm sido relacionadas com a menor incidência de aterosclerose, doença arterial coronariana e tendências trombogênicas observadas nestas culturas (paradoxo francês), visto que o processo de peroxidação lipídica assume grande importância nesses processos patológicos (KINSELLA et al., 1993; TSUDA et al., 1994).

Relatos na literatura sobre propriedades fisiológicas ou farmacológicas das antocianinas incluem os trabalhos de MORAZZONI e MAGISTRETTI (1986), que verificaram os efeitos de uma dose oral única de antocianosídeos de *Vaccinium myrtillus* L. (VMA) quanto à atividade como prostaciclina em tecido arterial de ratos. Estes autores constataram que VMA aumenta a liberação de substâncias com atividade como PGI<sub>2</sub>, a partir do tecido arterial, após a administração de acetilsalicilato lisina, um inibidor da liberação dessas substâncias, concluindo que VMA, ao estimular a produção de substâncias com atividade de PGI<sub>2</sub>, pode atuar nos mecanismos fisiológicos de anti-agregação plaquetária, tornando-se útil na prevenção da formação de trombose.

BETTINI et al. (1993) estudaram a influência de antocianosídeos de *Vaccinium myrtillus* L. no processo de relaxamento induzido por acetilcolina, em artérias coronárias de bovinos, concluindo que VMA aumenta o relaxamento induzido por acetilcolina, por estimular tanto a liberação de prostaciclina como do fator de relaxamento derivado do

endotélio.

Lagruet et al. (1979), citados por TIMBERLAKE e HENRY (1988), num ensaio clínico com 54 pacientes diabéticos, aos quais foram fornecidos 500-600 mg de antocianinas de *Vaccinium myrtillus*/dia, por 8 a 33 meses, encontraram quase total normalização de colágeno polimérico e uma redução de 30% na glicoproteína estrutural, os quais causam estreitamento dos capilares sangüíneos em indivíduos diabéticos.

IGARASHI et al. (1990) estudaram o efeito de antocianinas isoladas de *Brassica campestris* L. nos níveis de colesterol sérico em ratos. As antocianinas foram incorporadas à dieta dos animais, juntamente com colesterol e ácido cólico, verificando-se que houve elevação dos níveis de HDL-colesterol, embora redução significativa dos níveis de colesterol total não tenha sido observada.

TAMURA e YAMAGAMI (1994) verificaram a ação antioxidativa de antocianinas monoaciladas isoladas de uvas *Muscat bailey* A. e compararam esta ação com a de compostos antioxidantes como  $\alpha$ -tocoferol, (+)-catequina e naringenina, encontrando efeito antioxidante maior para as antocianinas.

TSUDA et al. (1994) estudaram a atividade antioxidativa dos pigmentos de antocianinas 3-O- $\beta$ -D-glicosídeo e cianidina isolados de *Phaseolus vulgaris* L., utilizando sistemas de autoxidação de ácido linoléico, lipossomos, membrana de eritrócitos de coelho e sistemas microssomais de fígado de ratos, em que constataram a atividade antioxidativa tanto de 3-O- $\beta$ -D-glicosídeo quanto de cianidina em todos os sistemas testados, concluindo que estes pigmentos podem representar papel importante na prevenção da peroxidação lipídica de membranas celulares.

Segundo a JOINT FAO/WHO... (1982), a disponibilidade de informações sobre antocianinas sugere que estas são pobremente absorvidas do trato gastrointestinal. O metabolismo no organismo

animal é limitado, podendo ser devido à atividade da flora intestinal, embora metabólitos de antocianinas não tenham sido identificados. Quanto ao aspecto toxicológico, os dados disponíveis indicam que, numa variedade de frutos testados, as antocianinas apresentaram baixa ordem de toxicidade. Entre os trabalhos sobre testes toxicológicos realizados com antocianinas, são citados os de McGregor e Jurd (1978), em que o cloreto de cianidina não apresentou atividade mutagênica em testes utilizando a estirpe *Salmonella typhimurium* TA-98, com ou sem ativação metabólica. Brown e Dietrich (1979) relataram que cianidina e delphinidina foram inativas quanto à mutagenicidade em cinco diferentes estirpes de *Salmonella typhimurium* (TA-1535, TA-100, TA-1537, TA-1538 e TA-98), com e sem ativação. Haveland-Smith (1981) testaram antocianinas quanto a mutagenicidade em *Salmonella typhimurium* TA-1538 e indução de danos a DNA em *Escherichia coli* WF2. Em ambos os testes, com ou sem ativação metabólica, antocianinas não apresentaram resposta indutora. Em outro ensaio com *S. cerevisiae* D4 foi relatada resposta negativa quanto à conversão de genes.

Também quanto ao aspecto toxicológico, POURRAT et al. (1967) isolaram antocianinas de *Vaccinium murtillus* L. e investigaram a toxicidade destas antocianinas, utilizando diferentes animais como modelo animal. Os resultados encontrados são relatados a seguir.

### **Toxicidade aguda**

As DL<sub>50</sub> das antocianinas obtidas por diferentes vias de administração em camundongos e ratos foram:

Animal	Via de Administração	DL <sub>50</sub> (g/kg peso corporal)
camundongos	i.p.	4,11
	i.v.	0,84
	oral	— (DL <sub>0</sub> > 25)
ratos	i.p.	2,35
	i.v.	0,24
	oral	— (DL <sub>0</sub> > 20)

Estes pesquisadores concluíram haver ausência de toxicidade por via oral, relatando que doses tóxicas por via i.p. e i.v. resultaram em morte dos animais, após uma fase de sedação entrecortada por convulsões.

### **Toxicidade crônica**

Efeitos tóxicos foram investigados em ratos da raça Wistar, de ambos os sexos, com seis semanas de idade, por um período de 90 dias. Utilizaram-se doses de 3.000 e 1.200 mg/dia. Não foram observadas alterações hematológicas ou lesões anatomopatológicas acentuadas. O comportamento e o crescimento dos animais apresentaram-se normais.

Em cobaias, com doses de 3.000 mg/dia, após 15 dias de observação, as antocianinas foram perfeitamente toleradas.

### **Teratogenicidade**

Antocinianas não demonstraram ação teratogênica em ratos, coelhos e camundongos, quando administradas nas doses de 300, 600 e 1.800 mg/dia, mesmo após três gerações sucessivas.

### **2.2.3. Corante carmim**

Entre os corantes vermelhos naturais encontram-se a cochonilha ou sua laca de alumínio, o carmim, com ampla aplicação na indústria de alimentos (bebidas e produtos de confeitaria), cosméticos e produtos farmacêuticos (MORI et al., 1991).

Conhecido desde a Antigüidade, o emprego deste corante, segundo relato de LAURO (1995), possui um aspecto interessante:

“No velho mundo dos Astecas, o carmim era um tributo aos reis, sendo considerado mais valioso do que ouro. Este corante exigia o trabalho de centenas de súditos para vasculhar o deserto à procura da fonte do corante: os insetos cochonilha. Acredita-se que por volta de 1518, Cortez descobriu os Astecas usando cochonilha. Para os espanhóis, este era um corante surpreendente,

porquanto era consideravelmente mais forte do que outros corantes usados na Europa, naquela época. O governo espanhol transformou-o em uma exportação lucrativa, porém aos europeus não foi contado que era derivado de insetos. A crença geral era de que o corante era originário de uma planta nativa da América”.

O inseto cochonilha é uma das milhares de espécies de insetos da superfamília Coccoidea, as quais possuem ampla distribuição geográfica e vivem em estreita associação com específicas formas de vida vegetal. Antes da conquista da América Central e do Sul pela Espanha, pigmentos obtidos a partir de insetos já eram conhecidos e empregados no “Velho Mundo”. No Azerbaijão e na Armênia, corantes eram preparados a partir do inseto *Porphyrophora hameli*, que se desenvolve em raízes e caules de gramíneas, incluindo *Aeluropus laevis*. Na Europa, o *Kermes ilicis*, que cresce em várias espécies de *Quercus*, particularmente na *Quercus coccifera*, foi largamente empregado como fonte de corante, entre os séculos XII e XVII. Também na Europa, extratos de *Margarodes polonicus*, um inseto encontrado nas raízes de *Scleranthus perennis*, são citados como fonte de corantes. Os insetos “Lac” (*Laccifera lacca*), presentes da Índia até a Malásia, tendo como plantas hospedeiras árvores das espécies *Schleichera oleosa*, *Zizyphus mauretania* e *Butea monosperma*, constituem fontes de pigmentos e resinas (LLOYD, 1980).

A espécie *Dactylopius coccus* Costa é nativa da América Central e do Sul (regiões semi-áridas do Peru, da Bolívia, do Chile, das Ilhas Canárias e do México), onde é encontrada como parasita nas partes aéreas dos cactus *Opuntia* e *Nopalea*, especialmente *Nopalea cochenillifera* (GRANT e GAUNT, 1987; FRANCIS, 1987; LAURO, 1985).

O corante cochonilha é extraído dos corpos de insetos fêmeas, antes da época da postura de ovos; dessa forma, o pigmento pode constituir até 22% do seu peso seco (FRANCIS, 1987).

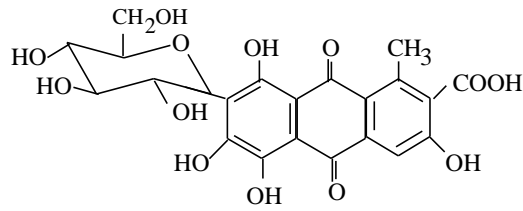
Segundo LLOYD (1980), o inseto fêmea é coletado ao atingir a

maturidade sexual, de 90 a 110 dias antes da desova, quando a concentração do pigmento é considerada maior.

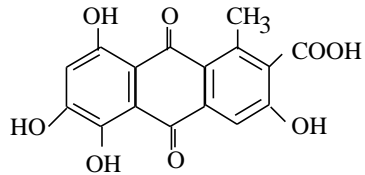
O processo de obtenção do corante envolve a extração dos corpos dos insetos secos (estes são coletados manualmente e secos ao sol até 1/3 do peso original), com água quente ou solução alcoólica-aquosa. Após filtração deste extrato, o líquido resultante é chamado cochonilha, termo também usado para se referir ao inseto e aos produtos preparados a partir do extrato (LAURO, 1995).

O principal pigmento encontrado na cochonilha é o ácido carmínico (7-D-glicopiranosil-3,5,6,8-tetrahidroxil-1-metil-9,10-dioxo-antraceno-2-ácido carboxílico), cuja estrutura corresponde a um  $\beta$ -C-glicosil derivado de antraquinona (FIECCHI et al., 1981) (Figura 8).

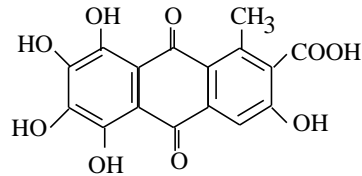
Os pigmentos de outros insetos, da superfamília Coccoidea, em especial os extraídos dos insetos Kermes e Lac, apresentam em comum uma estrutura baseada na molécula da antraquinona. O pigmento do inseto Kermes é o ácido kermésico, a aglicona do ácido carmínico, o



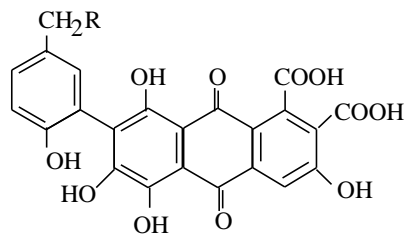
Ácido Carmínico



Ácido Kermésico

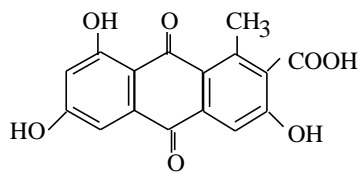


Ácido Ceroalbolínico

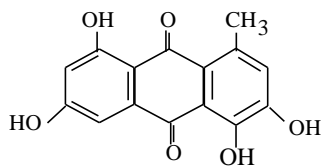


Ácido Lacaico

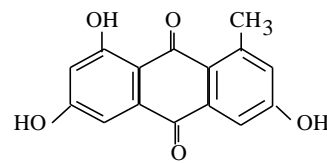
- A: R----- CH<sub>2</sub>-NH-COCH<sub>3</sub>
- B: R----- CH<sub>2</sub>OH
- C: R----- CH(NH<sub>2</sub>)COOH
- E: R----- CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>



Ácido D-lacaico



Eritrolacina



Desoxieritrolacina

FONTE: LLOYD (1980).

Figura 8 - Estrutura do ácido carmínico e de alguns outros pigmentos de insetos da superfamília Coccoidea.

qual ocorre também como um isômero, o ácido ceroalbolínico. No inseto “Lac”, os corantes são uma mistura complexa de ácidos lacáicos e compostos relacionados como eritrolacina e desoxieritrolacina (FRANCIS, 1987).

Entre os corantes produzidos a partir desses insetos, segundo LLOYD (1980), o carmim da cochonilha da América se sobrepõe aos demais, devido à sua melhor qualidade de corante e maior estabilidade, além da facilidade de coleta.

O ácido carmínico é solúvel em água e insolúvel em óleo. A solubilidade em água se deve ao seu arranjo com grupos hidrofílicos de açúcares, os quais se sobrepõem a grupos hidrofóbicos (STAPELFELDT et al., 1993).

A configuração estereoquímica da ligação glicosídica do ácido carmínico é de considerável significância na sua habilidade de formar complexos com uma variedade de metais (LLOYD, 1980). Através de espectrofotometria de massa e ressonância magnética, FIECCHI et al. (1981) determinaram que este grupamento glicosídico apresenta configuração  $\beta$ .

O espectro de absorção do ácido carmínico puro em 0,02 M de HCl apresenta pico de absorção máxima a 490 nm e mínima a 390 nm. Acima de 620 nm a absorção é mínima (MARSHALL e HOROBIN, 1974).

De acordo com JORGENSEN e SKIBSTED (1991), o ácido carmínico é susceptível à oxidação, e, em modelos experimentais, verificou-se que a degradação oxidativa do ácido carmínico é fortemente dependente do pH da solução, da pressão parcial de oxigênio e da exposição à luz.

Para STAPELFELDT et al. (1993), a fotooxidação na região de pH relevante para alimentos é insignificante, sendo o ácido carmínico pouco fotossensível. A fotooxidação é evidenciada como sendo originada da excitação de elétrons do ácido carmínico, o qual se torna mais exposto à oxidação e à formação de espécies degradadas, em altos valores de pH.

Segundo MADSEN et al. (1993), a degradação oxidativa de corantes como o ácido carmínico é de especial interesse, visto que a oxidação do pigmento juntamente com a oxidação lipídica em alimentos, sob certas condições, é capaz de iniciar o processo de rancificação. Estes autores, em um trabalho sobre o uso de cochonilha em produtos cárneos, verificaram que a oxidação lipídica não foi afetada pela presença do corante, o qual não demonstrou efeito prooxidativo quando o desenvolvimento de rancidez no produto adicionado de cochonilha foi comparado com o produto sem a sua adição.

Conforme LLOYD (1980), a maior parte do ácido carmínico pode ser obtida por tratamento do inseto seco com água fervente, resultando no extrato de cochonilha. A produção pode ser aumentada moendo-se os insetos, o que, entretanto, prejudica o processo de purificação posterior. Em ambos os casos, os pigmentos obtidos encontram-se ligados a resíduos insolúveis. Trabalhos citados pelo autor indicam que o melhor rendimento é obtido quando o inseto é tratado com soluções aquosas de enzimas proteolíticas na presença de surfactantes, sendo posteriormente purificado por cromatografia de troca iônica.

De acordo com MARSHALL e HOROBIN (1974), o ácido carmínico é obtido do extrato da cochonilha, e o método tradicional para o seu isolamento ocorre através da formação de complexos, para posterior precipitação do ácido. O extrato de cochonilha é adicionado de acetato, promovendo a precipitação. O precipitado formado é agrupado com etanol. Para suspensão do ácido carmínico dissolvido, é adicionado ácido sulfúrico concentrado. A solução de etanol é evaporada para produzir o vermelho-cristal, do qual serão extraídas as impurezas.

Soluções de ácido carmínico apresentam pouca pigmentação em pH abaixo de 7, onde possui alta fotoestabilidade, e em pH 4 sua pigmentação é pálida, dependendo da concentração. A combinação com metais, principalmente estanho e alumínio, possibilita a máxima absorção no visível, tornando o pigmento mais brilhante (LLOYD, 1980).

Dependendo do processamento, cerca de 4 a 5 kg de cochonilha são necessários para produzir 1 kg de carmim comercial. O processo pode envolver “banho” ou extração contínua da cochonilha em temperaturas de 90 e 100°C, em meio aquoso, antes da clarificação do extrato. Estágios subseqüentes sempre envolvem tratamento do extrato com um sal de alumínio. Os complexos resultantes podem ser tratados com etanol, em alta concentração, para precipitar um carmim solúvel, ou, alternativamente, eles podem ser isolados na forma insolúvel, em pH abaixo de 7, pela adição de sais de cálcio na solução final (LLOYD, 1980).

A complexação do ácido carmínico com alumínio provavelmente envolve a quelação de duas moléculas do ácido carmínico e uma molécula de alumínio, conforme ilustrado na Figura 9 (TAKAHASHI, 1987).

O carmim é constituído, após seu processamento, além do alumínio e cálcio, de fosfato, proteína, água e algum complexo formado com proteína (MARSHALL e HOROBIN, 1974).

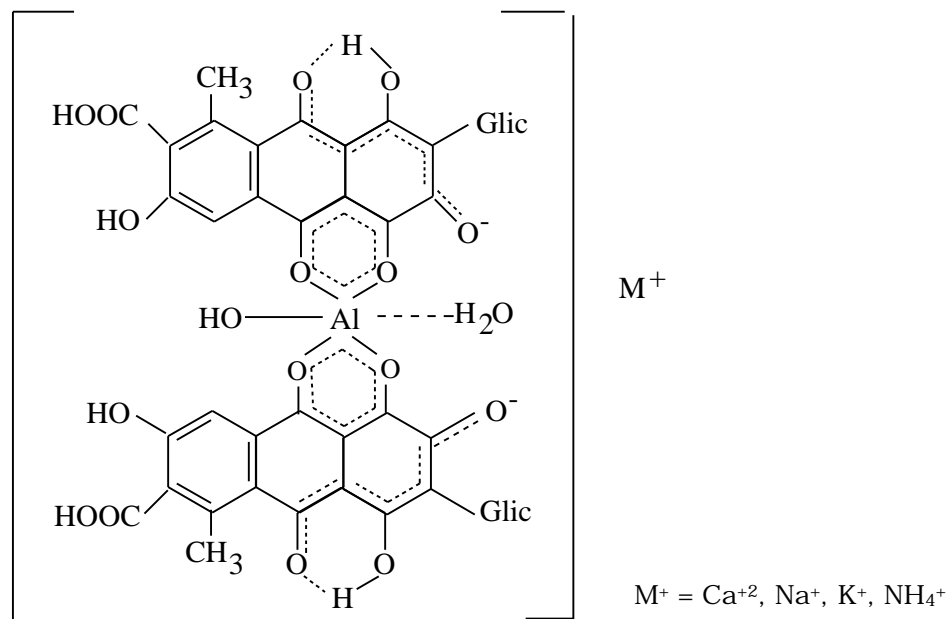
Segundo LLOYD (1980), o carmim comercial é caracterizado pela presença de vários aminoácidos que ocorrem em diferentes percentuais, observando-se, entretanto, que apresenta baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados e aromáticos e que ácidos aspártico e glutâmico, glicina e lisina correspondem a mais de 50% dos aminoácidos detectados.

O corante na forma de laca apresenta-se, geralmente, com um conteúdo de 50 a 53% de ácido carmínico, consistindo num pó dispersível em água, sendo insolúvel em álcool e óleo, porém solúvel em soluções alcalinas, como de hidróxido de amônio ou potássio (LAURO, 1995).

Em meio alcalino, o carmim é estável ao calor, à luz e ao oxigênio, apresentando-se na cor azul-roxeada e tornando-se menos azul à medida que o pH decresce. Sob condições ácidas, pH abaixo de 3,

a laca do ácido carmínico torna-se insolúvel (Figura 9) (GUIMARÃES, 1994).

Segundo FREUND et al. (1988), devido à característica do carmim de fixar-se em proteínas, ele torna-se útil na coloração de produtos à base de leite, como iogurtes, sorvetes e bebidas lácteas.



FONTE: TAKAHASHI (1987).

Figura 9 - Quelato aluminico do ácido carmínico (provável estrutura).

Enquanto o extrato de cochonilha tem aplicação principalmente na indústria de bebidas, outras aplicações do carmim incluem balas, confeitos, gelatinas, bebidas alcoólicas, geléias, doces, xarope de frutas, produtos cárneos, coberturas em produtos farmacêuticos, além de cosméticos, como produtos para cuidado da pele e do cabelo, batons, pós-faciais, *blushes*, etc. (LAURO, 1995).

Embora a cochonilha seja um corante conhecido e utilizado desde a Antigüidade, não foram encontrados na literatura pesquisada dados sobre o metabolismo do ácido carmínico, nem relatos sobre atividades fisiológicas no organismo humano ou animal.

Conforme PARKINSON e BROWN (1981), apesar de a estrutura do ácido kermésico ser similar à de muitas antraquinonas fenólicas e micotoxinas relacionadas, que possuem efeitos mutagênicos, carcinogênicos ou outros potenciais efeitos tóxicos, efeitos genotóxicos não têm sido observados, em estudos a curto prazo, com o ácido carmínico. Também estudos com uma variedade de antraquinona têm mostrado que glicosídeos de antraquinonas, em geral, são muito menos tóxicos do que suas agliconas e que C-glicosídeos são mais resistentes à hidrólise química ou biológica, isto é, por bactérias intestinais, do que o são os correspondentes O-glicosídeos.

Vários trabalhos realizados quanto ao aspecto toxicológico do emprego de cochonilha e carmim foram relacionados pela JOINT FAO/WHO... (1982). Entre estes, encontra-se o de Gaunt et al. (1976), que estudaram a teratogenicidade e embriotoxicidade do carmim em ratos. Foram utilizados quatro grupos de 30 fêmeas acasaladas, as quais receberam diariamente 0, 200, 500 ou 1.000 mg/kg de peso corporal de amônio de carmim, por intubação gástrica, durante os dias 0 a 20 de gestação. Um grupo de 17 animais, similares, recebeu uma solução de cloretos para fornecer uma ingestão de íons sódio, potássio e amônio igual àquela resultante da mais alta dose de carmim. Nenhum efeito adverso foi observado em peso corporal, índice de gestação, perdas na pré-implantação, peso médio do filhote e peso fetal. O grupo que recebeu a maior dose de carmim e o controle de cátions tiveram aumento no número de sítios de implantação e de perdas na pós-implantação. Este último efeito foi considerado como devido à inabilidade para manter o aumento do número de implantações, mais do que um efeito embriotóxico. Nenhum efeito teratogênico foi observado nos fetos, e o grau de ossificação dos ratos tratados com carmim tendeu a ser superior ao do controle. Barale et al. (1978) constataram que o ácido carmínico não produziu mutação reversa em quatro estirpes de *Salmonella typhimurium* (TA-1535, TA-1537, TA-98 e

TA-100), quando testado na presença e ausência de microsomas hepáticos obtidos de animais pré-tratados com fenobarbitona. Não houve evidência de conversões de genes quando o ácido carmínico foi testado similarmente, *in vitro*, com a estirpe *Saccharomyces cerevisiae* D, nem de mutações, *in vitro* ou *in vivo*, em ensaio mediado por hospedeiro, usando *Schizosaccharomyces pombe*. Grant et al. (1979) estudaram a toxicidade do carmim de cochonilha a ratos, por múltiplas gerações. Amônio de carmim foi administrado em ratos Wistar, em várias gerações, em concentrações dietéticas determinadas para fornecer a ingestão de 0, 50, 150 ou 500 mg/kg de peso corporal por dia. Animais de ambos os sexos foram usados em grupos de 36, para tratamento com carmim, e grupos de 60, para controle. Após um período determinado de tratamento, os animais originais (geração F<sub>0a</sub>) foram acasalados, para formarem a geração F<sub>1a</sub>, e depois acasalados novamente, para formarem a geração F<sub>1b</sub>. Os animais da geração F<sub>1a</sub> forneceram animais para a geração F<sub>2</sub>, a qual forneceu a geração F<sub>3</sub> final. Não houve efeito quanto a peso corporal, ingestão de água e comida, fertilidade ou peso dos órgãos nos adultos das gerações F<sub>0a</sub>, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> que possa ser atribuído ao tratamento. Exames *post mortem* e medidas de peso dos filhotes das gerações F<sub>1b</sub>, F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> não revelaram nenhuma diferença entre o grupo-controle e o teste. Exames histopatológicos de filhotes da geração F<sub>3</sub> não revelaram efeitos relacionados ao tratamento. Sobrevivência, crescimento e desenvolvimento de filhotes no grupo-teste foram similares aos do grupo-controle, a não ser por uma pequena demora na erupção dos dentes nos grupos com dosagens de 150 e 500 mg/kg das gerações F<sub>1b</sub> e F<sub>2</sub>. Nenhuma demora na erupção dos dentes foi observada na geração F<sub>3</sub>. Nas investigações teratogênicas, fetos de todos os grupos-testes da geração F<sub>3</sub> eram um pouco mais adiantados no grau de ossificação do esqueleto, comparado ao grupo-controle. Exames *post mortem* não revelaram diferenças significativas entre os animais do grupo-teste e os

do controle, exceto por pequeno aumento no número de corpos lúteos e perdas de pós-implantação no grupo que recebeu dosagem de 150 mg/kg da geração F<sub>1a</sub>, os quais foram considerados não-relacionados ao tratamento. Ford et al. (1981) realizaram um estudo a longo prazo em ratos, utilizando carmim, o qual foi misturado à dieta de grupos de 66 machos e 66 fêmeas, para fornecer ingestão diária de 50, 150 ou 500 mg/kg de peso corporal por dia, durante oito semanas. Um grupo de 114 machos e 114 fêmeas recebeu dieta básica como controle. O tratamento continuou enquanto cada fêmea foi acasalada com um macho de mesmo grupo, durante a gestação e a cria dos filhotes. Os jovens dessa ninhada foram usados para formar grupos de 54 machos e 54 fêmeas, que receberam a mesma dose de carmim, e 90 machos e 90 fêmeas foram usados para o controle. O tratamento para cada animal foi o mesmo dos animais que lhes deram origem e continuou até que um dos grupos alcançasse aproximadamente 20% de sobrevivência. Os machos que sobreviveram foram mortos na 108ª semana e as fêmeas, na 109ª semana. As dietas com 500 mg/kg de carmim não afetaram a sobrevivência dos ratos, o crescimento ou a ingestão de água e comida. Amostras de sangue foram tomadas nos meses 3, 6, 12 e 18 de alguns animais, não mostrando mudanças relacionadas com o tratamento. Nenhuma mudança foi encontrada quanto ao teste de concentração renal e análises semiquantitativas de urina a 3, 6, 9, 12 e 18 meses ou em química do sangue e peso dos órgãos no final do estudo. A incidência de tumores não foi afetada pelo tratamento. Houve mais fêmeas com hiperplasia da glândula mamária e ectasia do ducto em todos os grupos tratados que no grupo-controle e mais com pequenas mudanças no estômago com as duas maiores dosagens. Houve pequeno aumento na incidência de animais com vaginite ou nódulos linfáticos nas fêmeas e distensão sinusóide hepática, com a alta dose, nos machos. Nenhum desses achados foi considerado como sendo devido ao tratamento, concluindo os autores que o carmim administrado *in utero*

não foi carcinogênico.

Entre outros estudos encontrados na literatura, está o de GRANT e GAUNT (1987), que realizaram um trabalho com ratos fêmeas por três gerações seguidas, com dietas em concentrações de 50, 150 e 500 mg de carmim/kg/dia. Neste trabalho não foi constatado nenhum efeito adverso com relação a crescimento e fertilidade ou no desenvolvimento pré e pós-natal de todos os descendentes.

FORD et al. (1987) também investigaram o corante carmim sob os aspectos carcinogênico, teratogênico e embriogênico, avaliando três gerações de ratos. As dosagens utilizadas foram de 50, 150 e 500 mg/kg/dia, não se encontrando nenhum efeito adverso durante a extensão de vida dos animais.

MORI et al. (1991) estudaram o efeito de cochonilha em camundongos quanto a carcinogenicidade, utilizando 317 camundongos B<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub> de ambos os sexos. Com seis semanas de idade, os camundongos foram divididos em 3 grupos de 50 a 55 animais de cada sexo. Os animais foram alimentados com uma dieta contendo carmim nas concentrações de 0, 3 e 6%. Estas concentrações foram selecionadas com base nos resultados de testes toxicológicos realizados durante oito semanas, usando quatro grupos de camundongos B<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub> de ambos os sexos, que receberam carmim na dieta nas concentrações de 6; 3; 1,5 e 0,75%. Como nenhum camundongo mostrou toxicidade clara em nenhum órgão, as duas maiores concentrações foram escolhidas para o teste a longo prazo. Todos os animais receberam água e alimento *ad libitum*, sendo pesados mensalmente. No final do experimento, os animais foram mortos, e os principais órgãos, como fígado, baço, rim, pâncreas, coração e pulmão, foram pesados e autopsiados. Determinações clínicas e bioquímicas foram realizadas, como: atividade da fosfatase alcalina, transaminase glutâmico-oxalacético, transaminase glutâmico-pirúvico, concentração de proteína total, albumina, uréia e glicose, além de avaliação hematológica (eritrócitos, leucócitos e níveis de hemoglobina), utilizando-se amostras

de sangue obtidas de cinco machos e cinco fêmeas de cada grupo de animais, no final do experimento. Houve diminuição no ganho de peso dos animais em ambos os sexos, sendo ela particularmente marcante em fêmeas, no final do experimento. Não houve diferença significativa no peso dos órgãos entre o grupo-teste e o controle. Não houve evidência de efeito clínico, bioquímico ou hematológico. Todos os animais sobreviveram por mais de um ano, e menos de 25% morreram de pneumonia ou outras causas entre um ano após o início do experimento e o final deste. Não houve diferença estatística quanto à incidência de qualquer tumor entre o grupo-teste e o controle. Segundo esses autores, os resultados obtidos indicam que o carmim não tem efeito carcinogênico em camundongos ou efeitos promotores de tumor, sendo a incidência de tumores apresentada no experimento considerada de ocorrência espontânea.

#### **2.2.4. Corante *monascus***

Os povos asiáticos usam o produto da fermentação do arroz por fungos do gênero *Monascus* como corante e condimento na produção de alimentos, especialmente para a coloração de carnes, peixes e aves (FINK-GREMMELS e LEISTNER, 1989).

Segundo FRANCIS (1987), a fermentação do arroz por fungos do gênero *Monascus* produz uma massa vermelha, a qual pode ser usada como tal ou seca e na forma de pó, como corante.

Ang-Khak (também conhecido na literatura como ang-kak, ankak, anka, ang-quac, beni-koji, aga-koji, arroz-vermelho ou arroz-vermelho chinês), segundo PALO et al. (1960), é um produto da fermentação do arroz por *Monascus purpureus*, um dos fungos tradicionalmente usados no sul da China, na Tailândia, no Japão, nas Filipinas, na Indonésia, etc. (WONG e KOEHLER, 1981).

PALO et al. (1960) estudaram ang-kak e sua produção. O microrganismo foi isolado de amostras de ang-kak de um mercado de

Manila (Filipinas) e, pelas características morfológicas e culturais apresentadas, identificado como *Monascus purpureus* went. Esses autores verificaram que essa estirpe de fungo em estudo apresentou bom crescimento na faixa de pH de 3,5 a 7,5. A temperatura ótima para produção de cor vermelha no arroz por este fungo foi de cerca de 27°C. Diferentes qualidades de arroz comercial testadas na produção de angkak mostraram-se todas igualmente satisfatórias. Dos diversos métodos tentados para a produção de angkak, o que apresentou melhores resultados foi o crescimento do fungo em arroz autoclavado, previamente deixado de molho por 24 horas, com adição de água estéril à cultura em tempos predeterminados, para manter sua umidade e o microrganismo num estado vigoroso de crescimento.

*Monascus purpureus* foi primeiramente mencionado em “Pen Chaw Kang Mu” - Shih-Chun Li (uma monografia da medicina chinesa), publicada em 1590, em que procedimentos da fabricação do arroz-vermelho fermentado, usando este fungo, foram descritos, em adição a atividades terapêuticas deste arroz. Doenças significativamente curadas pelo arroz-vermelho fermentado incluíam indigestão, contusão muscular, disenteria, antraz, etc. O arroz-vermelho fermentado foi também usado para preservar carnes antes da introdução da refrigeração (WONG e KOEHLER, 1981).

Há milhares de anos, na China, segundo LIN (1973), fungos do gênero *Monascus* têm sido usados na indústria de fermentação para preparação de vinho tinto de arroz, vinho tinto Shao-Hsing e alimentos nativos, como o queijo de soja vermelho.

Segundo KUNZ e OBER (1987), as condições ideais para o crescimento de *Monascus purpureus* são temperatura de incubação de 30°C, pH 8, substrato rico em amido (farinha de amido de arroz) e quantidade suficiente de nitrogênio.

Três espécies do gênero *Monascus* pertencem ao grupo de fungos

que produzem pigmentos: *Monascus pilosus*, *Monascus purpureus* e *Monascus ruber*, cuja taxonomia e cujos sinônimos em uso foram descritos por Hawksworth e Pitt (1983) (FINK-GREMMLES e LEISTNER, 1989) (Quadro 3).

Os fungos do gênero *Monascus* produzem, além de grande quantidade de enzimas hidrolíticas, como  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, glicoamilase, protease e lipase, etc., também pigmentos vermelhos, amarelos e purpúreos. Os principais pigmentos incluem: monascorubrina, rubropunctatina, monascina, ankaflavina, rubropunctamina e monascorubramina (LIN, 1973; WONG e KOEHLER, 1983) (Figura 10).

A formação de pigmentos por *Monascus purpureus* é influenciada por temperatura, pH do meio, presença de diferentes tipos de substratos, qualidade de luz e também por hormônios sexuais e presença de complexos orgânicos de mercúrio (WONG et al., 1981; FINK-GREMMELS e LEISTNER, 1989).

Quadro 3 - Taxonomia do gênero *Monascus* (espécies reconhecidas e sinônimos correspondentes)

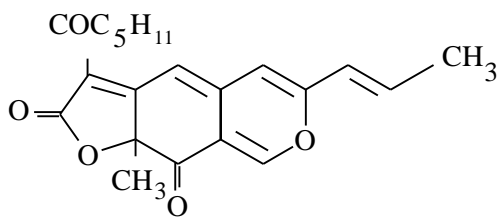
<i>M. pilosus</i>	<i>M. purpureus</i>	<i>M. ruber</i>
<i>M. pubigerus</i>	<i>M. albidus</i>	<i>Physomyces heterosporum</i>
<i>M. purpureo</i>	<i>M. anka</i>	<i>M. heterosporus</i>
<i>M. rubropunctatum</i>	<i>M. araneosus</i>	<i>Eurotiopsis gagoni</i>
<i>M. serorubeszcz</i>	<i>M. kaoliang</i>	<i>Allescheria gagoni</i>
	<i>M. major</i>	<i>M. barberi</i>
	<i>M. rubiginosus</i>	<i>M. fuliginosus</i>
	<i>M. vini</i>	<i>M. olei</i>
		<i>M. vitreus</i>
		<i>Bachusia terricola</i>

FONTE: FINK-GREMMELS e LEISTNER (1989).

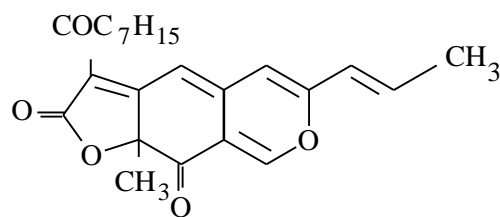
Os pigmentos do *Monascus* são sintetizados por condensação linear de unidades de acetato (KURONO et al., 1963). Os pigmentos monascorubrina, rubropunctatina, monascina e ankaflavina são considerados como sendo produzidos biossinteticamente, enquanto rubropunctamina e monascorubramina podem ser considerados derivados aminados dos dois primeiros pigmentos citados (FIELDING et al., 1961).

CARELS e SHEPHERD (1977) sugeriram que os pigmentos monascorubrina e rubropunctatina possam ser os únicos pigmentos sintetizados, visto que eles podem ser oxidados a monascina e ankaflavina.

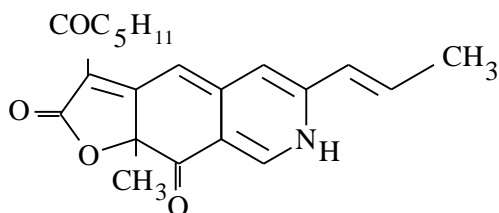
Monascina, ankaflavina, rubropunctatina e monascorubrina são pigmentos relativamente insolúveis em água. Essas moléculas, entretanto, reagem prontamente com compostos contendo grupos amina, via abertura do anel e rearranjo de Schiff, para formar compostos solúveis em água. Estes pigmentos são estáveis na faixa de pH de 2 a 10 e apresentam-se estáveis ao calor, podendo ser autoclavados (FRANCIS, 1987).



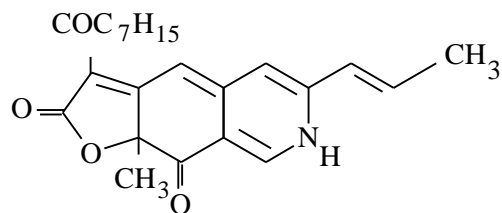
Rubropunctatina  
(vermelho)



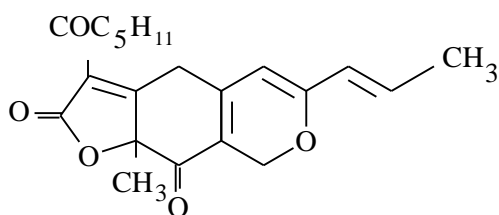
Monascorubrina  
(vermelho)



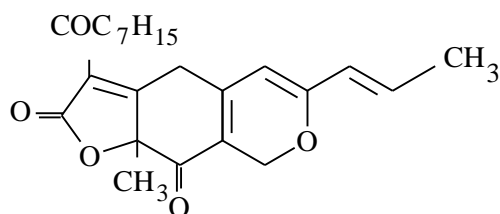
Rubropunctamina  
(violeta)



Monascorubramina  
(violeta)



Monascina  
(amarelo)



Ankaflavina  
(amarelo)

FONTE: LIN (1973).

Figura 10 - Estruturas dos pigmentos produzidos por fungos do gênero *Monascus*.

No entanto, segundo WONG e KOEHLER (1983), a baixa solubilidade em água, a sensibilidade ao calor e a descoloração dos pigmentos do *Monascus* impedem a utilização destes pigmentos na indústria alimentícia. Modificações químicas têm sido feitas, com a finalidade de aumentar a qualidade dos pigmentos. Estas modificações envolvem reações dos pigmentos com proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, ácido lacaico, quitosanas amino álcoois, etc., as quais, entretanto, podem encarecer o corante. Estes autores testaram a reação dos pigmentos com ácido aminoacético e ácido aminobenzóico, comparando estes pigmentos modificados àqueles usando ácido

glutâmico e gelatina, como agentes modificantes, concluindo que a cor e a estabilidade eram similares. Ainda de acordo com esses mesmos autores, investigações sobre o uso prático de *Monascus* como fonte de corantes alimentares são comuns na Tailândia e no Japão. Métodos de isolamento e modificação têm sido patenteados nestes países, como também nos Estados Unidos.

Até hoje, muitos estudos envolvendo fungos do gênero *Monascus* têm como finalidade a otimização das condições de cultura para produção de pigmentos. A esse respeito, FRANCIS (1987) relacionou os seguintes trabalhos: Lin e Lizuka (1982) estudaram diferentes substratos, como arroz, farelo de trigo, trigo, pão, milho, entre outros; Kim et al. (1977) estudaram o uso de melão e milho; Shepherd e Carels (1978) desenvolveram um processo em dois estágios, otimizado primeiro para crescimento e, posteriormente, para produção de pigmento; Tadao et al. (1982) estudaram o processo de crescimento, para otimização do tipo e da quantidade de pigmento; e Hiroi et al. (1979) Lin (1973) e Su et al. (1973) estudaram a seleção de estirpes, para produção de pigmento.

Entre outros trabalhos encontrados na literatura, incluem-se: YOSHIMURA et al. (1975), que estudaram a produção de pigmento por várias estirpes do gênero *Monascus* em cultura submersa; LIN e LIZUKA (1982), que estudaram a produção de pigmento extracelular por uma estirpe mutante de *Monascus* (*kaoling* sp. nov.), a qual produziu grande quantidade de pigmentos de *Monascus* em cultura sólida; LIN e DEMAIN (1991), que estudaram a regulação da produção de pigmentos por nutrientes, verificando que a produção foi estimulada por glutamato monossódico e inibida por altas concentrações de fosfato e  $MgSO_4$ ; e HAN e MUDGETT (1992), que estudaram os efeitos das pressões parciais de oxigênio e dióxido de carbono no crescimento e na produção de pigmentos por *Monascus purpureus*, em arroz.

Os pigmentos de Ang-Khak são utilizados nos países asiáticos

não só pela coloração, mas também pelo efeito antibacteriano e pela melhoria das propriedades organolépticas produzidos nos alimentos (FINK-GREMMELS e LEISTNER, 1989).

A atividade antibacteriana de *Monascus purpureus* foi relatada por WONG e BAU (1977). Estirpes isoladas de arroz-vermelho fermentado e algumas mutantes induzidas apresentaram atividade antibiótica a *Bacillus*, *Streptococcus* e *Pseudomonas*.

WONG e KOEHLER (1981) estudaram a produção e o isolamento do principal composto com atividade antibacteriana produzido por *Monascus purpureus*, a monascidina A, e a sua relação com a produção de pigmentos, verificando que a produção do antibiótico é usualmente acompanhada pelo aumento da produção dos pigmentos.

FINK-GREMMELS et al. (1989) realizaram o teste de monascus quanto à atividade antibacteriana na substituição do nitrito e nitrato em salsichas. Este apresentou ação inibitória para *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*.

FINK-GREMMELS e LEISTNER (1989) estudaram os pigmentos de *Monascus purpureus*, solúveis em metanol (extrato de ang-kak), quanto ao efeito tóxico e antiolesterolêmico em ratos. Estes autores concluíram que, em animais hiperlipidêmicos induzidos por alimentação, houve influência no metabolismo lipídico, manifestando-se como redução dos níveis de colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis plasmáticos. Efeitos tóxicos não foram verificados nos animais, utilizando-se 5 e 10 g/kg de peso corporal do extrato de pigmentos.

Segundo ENDO et al. (1985), monacolina K (mevinolina), composto com ação hipocolesterolêmica, que especificamente inibe a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase, foi isolada a partir dos fungos *Monascus ruber* e *Aspergillus terreus*. No entanto, referências sobre a produção deste composto por *Monascus purpureus*

não foi relatada, e, de acordo com FINK-GREMMELS e LEISTNER (1989), monacolina K não apresenta em sua estrutura um anel de tetrahydrofurano, o que evidencia não haver analogia estrutural entre monacolina K e os pigmentos produzidos por *Monascus*.

JAHN (1991) investigou amostras de extratos metanólicos de arroz fermentado por *Monascus purpureus* em testes, *in vitro*, para genotoxicidade. Teste para mutação de *Salmonella* apresentou resultado positivo, embora outros testes tenham apresentado resultado negativo, concluindo esse autor que os extratos não apresentaram genotoxicidade significativa.

FINK-GREMMELS et al. (1991) estudaram efeitos citotóxicos e genotóxicos de um extrato de *Monascus purpureus*. Enquanto a citotoxicidade não foi detectada, os extratos mostraram baixa genotoxicidade e apresentaram-se mutagênicos. No entanto, a genotoxicidade e mutagenicidade foram bem inferiores àquelas de compostos nitrosos formados em carnes curadas, o que levou esses autores a concluírem que extratos de *Monascus* podem ser uma alternativa para nitritos na produção de coloração vermelha em produtos cárneos.

BLANC et al. (1995) verificaram que, juntamente com a produção de *Monascus*, há formação de monascidina A. A análise de monascidina A revelou ser este composto citrinina, um metabólito tóxico de fungos. Ambos, *Monascus purpureus* e *Monascus ruber*, produziram citrinina em cultura submersa, levando esses autores a concluírem que os pigmentos de *Monascus*, para uso em alimentos, devem estar livres de citrinina e que monascidina A, apesar de ser antibiótico, não é um substituto apropriado para sais de nitrato, como aditivo antimicrobiano em alimentos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Os ensaios biológicos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde, e as dosagens bioquímicas, no Laboratório de Química Analítica do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa - Viçosa-MG.

#### **3.1. Origem e manutenção dos animais**

Foram utilizados ratos machos, albinos, da raça Wistar, com 60 dias de vida, provenientes do biotério do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa. No período pré-experimental os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, à temperatura ambiente (cerca de 25°C), com ciclo claro-escuro de 12 horas, e tiveram livre acesso à ração comercial Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes Ltda.) e água. No início do período experimental, após pesagem, os animais foram alojados em gaiolas individuais.

### **3.2. Corantes naturais testados**

Os corantes utilizados neste trabalho foram fornecidos pela Christian Hansen Ind. e Comércio Ltda., com as seguintes especificações.

#### **3.2.1. Corante natural de cúrcuma em pó**

Corante em pó oleossolúvel, produzido a partir da extração da oleorresina das raízes de *Curcuma longa* L., com uso de solventes aprovados pela Food and Agriculture Organization (FAO)/World Health Organization (WHO), e purificado por cristalização. Dependendo da dosagem utilizada, pode conferir diferentes tonalidades de cor, que vão do amarelo-brilhante ao amarelo-esverdeado.

#### **Dados técnicos**

Teor de curcumina (%): mínimo 94,0

- *Contagem máxima de microrganismos:*

Contagem total: máx.: 10.000 unidades formadoras de colônia (UFC)/g

Coliformes fecais: número mais provável (NMP): ausente/g

*Salmonella* sp.: ausente/25 g

Mofos e leveduras: máx.: 30 UFC/g

**Legislação:** isento de registro no Ministério da Saúde, conforme Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, capítulo X, artigos 57 e 58.

#### **3.2.2. Corante natural de antocianina em pó**

Corante em pó hidrossolúvel, produzido a partir da extração

aquosa da casca de uva. O extrato é concentrado por evaporação a vácuo, durante a qual as impurezas são removidas. Em valores de pH abaixo de 5, fornecem tonalidades que variam de rosa-clara a vermelho-framboesa. Em valores de pH maiores, variam de vermelho-azulado a azul. Os maiores princípios corantes são peonidina, malvidina, delphinidina e petunidina.

### **Dados técnicos**

Força corante: 1.125 - 1.375 unidades/g

- *Contagem máxima de microrganismos:*

Contagem total: máx.: 10.000 UFC/g

Coliformes fecais (NMP): ausente/g

*Salmonella* sp.: ausente/25 g

Mofos e leveduras: máx.: 30 UFC/g

**Legislação:** isento de registro no Ministério da Saúde, conforme Decreto

- Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, capítulo X, artigos 57 e 58.

### **3.2.3. Corante carmim**

Corante em pó, solúvel em soluções alcalinas e dispersível em água, gorduras e óleos, constituindo-se numa laca de cálcio - alumínio do ácido carmínico. Fornece tonalidades vermelho-claras ou escuras, dependendo do produto alimentício onde é aplicado e da quantidade empregada.

### **Dados técnicos**

Força corante: 47,5 - 52,5 % de ácido carmínico

Densidade óptica: DO<sub>494</sub>: 0,660 a 0,730

**Legislação** : ingestão diária aceitável (IDA): 0-5 mg/kg de peso corporal,

expresso como ácido carmínico (FAO/WHO).

#### **3.2.4. Corante monascus**

Pó fino para preparação de alimentos asiáticos. O produto fornece uma coloração vermelho-típica, a qual é o resultado da fermentação do amido de arroz pelo microrganismo *Monascus purpureus*. De *flavour* típico, constitui-se num preparado para ser usado no tempero de alimentos, na dosagem de 0,5 - 1g/kg.

**Legislação:** produto incluído na nomenclatura de substâncias sem quaisquer objeções (G.R.A.S.).

#### **3.3. Triton WR-1339**

Triton WR-1339, ou Tyloxapol (Sigma Aldrich Química Brasil Ltda.), é um detergente não-aniônico, de estrutura polimérica (Figura 11), que foi utilizado como agente para indução da hiperlipidemia nos animais experimentais.

#### **3.4. Delineamento experimental**

Para avaliação do efeito dos corantes naturais cúrcuma, antocianina (cascas de uva), carmim e monascus nas concentrações de lipídios sangüíneos, foram realizados dois experimentos, utilizando-se 72 ratos machos, albinos, da raça Wistar. No primeiro experimento, os corantes foram administrados na dose de 40 mg e, no segundo, na dose de 80 mg, em ratos previamente hiperlipidêmicos induzidos por Triton WR-1339. Nos dois experimentos, foram avaliados os efeitos dos corantes nas concentrações de colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis.

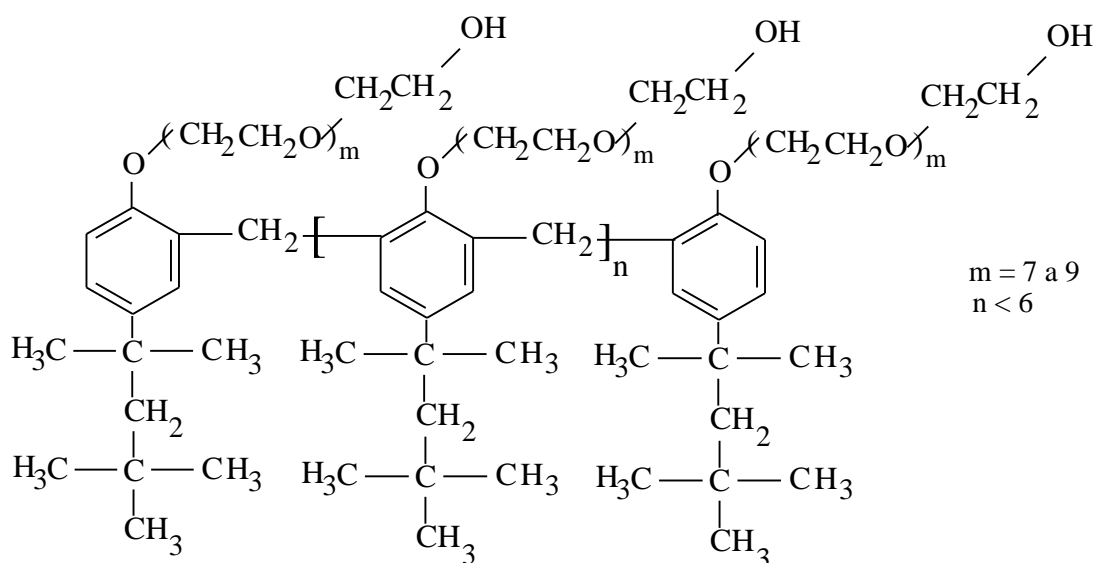


Figura 11 - Estrutura do Triton WR-1339 (Tyloxapol).

### 3.4.1. Experimento I: avaliação do efeito da dose de 40 mg dos corantes naturais em ratos pré-tratados com Triton WR-1339

#### 3.4.1.1. Procedimento experimental

Os animais, em número de 36, com peso médio inicial de 225 g, foram divididos em seis grupos de seis animais cada e distribuídos entre os grupos experimentais A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>5</sub> e A<sub>6</sub>.

Para indução da hiperlipidemia, foi administrado aos animais, dos grupos A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>5</sub> e A<sub>6</sub>, Triton WR-1339 (Tyloxapol) na dosagem empregada pela metodologia proposta por SHARMA (1979), ou seja, o Triton foi injetado intraperitonealmente nos animais, na dose de 300 mg/kg de peso corporal, dissolvido em solução salina (NaCl 0,15 M), de modo a obter-se uma solução com concentração de 78 mg/mL. De

acordo com o peso dos animais, diferentes quantidades dessa solução foram aplicadas, utilizando-se seringas descartáveis com capacidade de 1 mL. O grupo A<sub>1</sub> serviu como parâmetro de avaliação da indução da hiperlipidemia.

Vinte quatro horas após a injeção de Triton WR-1339, foram fornecidos aos animais dos grupos A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>5</sub> e A<sub>6</sub> os corantes cúrcuma, antocianina (cascas de uva), carmim e monascus, respectivamente. Os corantes, na forma de pó, foram administrados na dose única de 40 mg, misturados a 10 g da ração comercial Nuvilab CR1. Aos grupos A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> foram fornecidos somente 10 g da ração, com o grupo A<sub>2</sub> constituindo-se no grupo-controle do experimento.

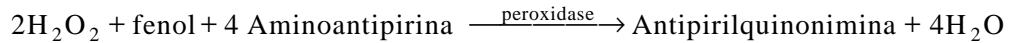
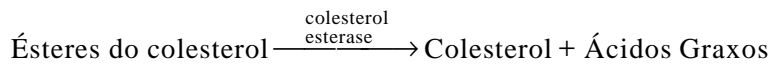
Quarenta e oito horas após a aplicação do Triton WR-1339, todos os animais foram anestesiados por inalação com éter etílico e submetidos a uma incisão da cavidade torácica, e as amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca. Após coagulação do sangue, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos, para separação do soro, e mantidas a 8°C até o momento das análises.

### **3.4.1.2. Dosagens bioquímicas**

#### **A) Colesterol Total**

As dosagens de colesterol total no soro dos animais foram feitas com base na metodologia proposta por ALLAIN et al. (1974), utilizando-se o kit enzimático da marca Analisa (COD - ANA, Cat 260 - Belo Horizonte - MG).

Segundo essa metodologia, o colesterol total é determinado nas amostras de soro de acordo com as seguintes reações:



Estas reações resultam na formação de cor vermelha, cuja intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra. As leituras de absorvância foram feitas a  $\lambda = 500 \text{ nm}$ , utilizando-se espectrofotômetro (Hittachi U 2000).

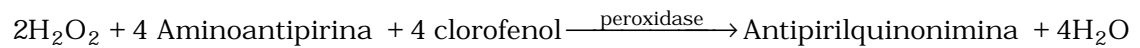
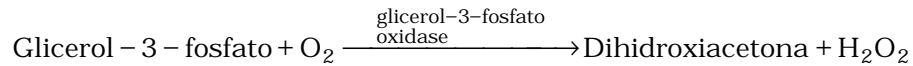
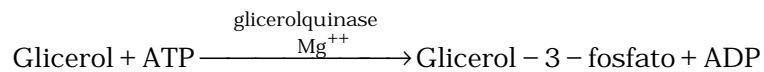
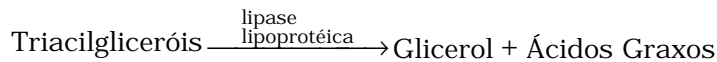
### **B) HDL-Colesterol**

O HDL-Colesterol foi determinado seguindo a metodologia proposta por WARNICK et al. (1985), utilizando-se o kit da marca Analisa, com o sistema para precipitação de lipoproteínas (Cat. 213 - Belo Horizonte-MG). Segundo esta metodologia, as lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são precipitadas pelo ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio, e, após centrifugação da amostra, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (HDL) é determinado no sobrenadante, utilizando-se a metodologia para dosagem de colesterol total descrita anteriormente.

### **C) Triacilgliceróis**

Os triacilgliceróis foram determinados seguindo a metodologia proposta por FOSSATI e PRENCIPE (1982), utilizando-se o kit enzimático de marca Analisa (Cat. 259 - Belo Horizonte-MG).

Nessa metodologia, os triacilgliceróis são determinados de acordo com as seguintes reações:



Estas reações resultam na formação de cor vermelha, cuja intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de triacilgliceróis na amostra. As leituras de absorbância foram feitas a  $\lambda = 510 \text{ nm}$ , utilizando-se espectrofotômetro (Hittachi U 2000).

### **3.4.2. Experimento II: avaliação do efeito da dose de 80 mg dos corantes naturais em ratos pré-tratados com Triton WR-1339**

#### **3.4.2.1. Procedimento experimental**

O segundo experimento seguiu o mesmo procedimento experimental do primeiro. Foram utilizados 36 animais com peso médio inicial de 225 g, os quais foram distribuídos em seis grupos experimentais, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub> e B<sub>6</sub>, com a numeração correspondendo aos mesmos tratamentos aplicados aos animais do primeiro experimento (Quadro 4). O experimento II diferiu do primeiro somente pela dose dos corantes cúrcuma, antocianina, carmim e monascus que foi fornecida aos animais, a qual foi o dobro da dose avaliada no primeiro experimento, ou seja, 80 mg.

Quadro 4 - Descrição dos tratamentos aplicados aos animais nos experimentos I e II

Grupos Experimentais	Tratamentos
A <sub>1</sub> e B <sub>1</sub>	Animais não tratados com Triton.
A <sub>2</sub> e B <sub>2</sub>	Animais tratados com Triton. (Grupo-controle do experimento)
A <sub>3</sub> e B <sub>3</sub>	Animais tratados com Triton + Corante Cúrcuma
A <sub>4</sub> e B <sub>4</sub>	Animais tratados com Triton + Corante Antocianina
A <sub>5</sub> e B <sub>5</sub>	Animais tratados com Triton + Corante Carmim
A <sub>6</sub> e B <sub>6</sub>	Animais tratados com Triton + Corante Monascus

#### **3.4.2.2. Dosagens bioquímicas**

A determinação dos valores de colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis seguiu a mesma metodologia empregada no experimento I.

#### **3.5. Análise estatística**

Foram realizados dois experimentos, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (T<sub>1</sub> = Triton; T<sub>2</sub> = Triton + Cúrcuma; T<sub>3</sub> = Triton + antocianina; T<sub>4</sub> = Triton + Carmim; e T<sub>5</sub> = Triton + Monascus) e seis repetições, em que foram empregadas duas diferentes doses dos corantes a serem testados (experimento I = 40 mg e experimento II = 80 mg). Os dados obtidos com os grupos experimentais A<sub>1</sub> (experimento I) e B<sub>1</sub> (experimento II) não foram incluídos na análise estatística.

Os dados foram analisados por meio de análise de variância individual, para as três variáveis em estudo (colesterol total, HDL-

colesterol e triacilgliceróis), e procedeu-se à análise conjunta dos dados obtidos com as duas diferentes doses, sendo as médias comparadas pelo teste F. O teste de Dunnett, adotando-se um nível de 5% de probabilidade, foi utilizado para comparar os valores médios de colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis, obtidos dos grupos tratados com os corantes, com o valor médio do grupo-controle. A dispersão das médias foi expressa pelo erro-padrão.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os níveis de lipídios sanguíneos, em ratos albinos da raça Wistar, tratados com Triton WR-1339, foram determinados após a administração dos corantes cúrcuma, antocianina, carmim e monascus, nas doses de 40 e 80 mg.

O resumo das análises de variância conjunta e testes F dos dados obtidos nas dosagens de colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis séricos são apresentados no Quadro 5.

De acordo com esses resultados, observa-se que a interação entre as doses e os tratamentos aplicados aos animais não apresentou efeito significativo ( $P > 0,05$ ), pelo teste F, para os três parâmetros avaliados (colesterol-total, HDL-colesterol e triacilgliceróis). Entretanto, os tratamentos apresentaram efeito significativo para os três parâmetros, em nível de 1% de probabilidade. Com as doses de 40 e 80 mg, também observa-se significância em nível de 1% de probabilidade, exceto para triacilgliceróis, cujo efeito de doses não foi significativo.

### **4.1. Efeito dos corantes cúrcuma, antocianina, carmim e monascus nos níveis de colesterol total sérico**

Os valores médios de colesterol total obtidos com os tratamentos aplicados aos animais nos experimentos I e II encontram-

se relacionados no Quadro 6.

Quadro 5 - Resumo das análises de variância conjunta dos dados obtidos nas dosagens de colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis séricos. Experimentos I e II

FV	GL	Quadrados Médios		
		Colesterol Total	HDL-colesterol	Triacilgliceróis
Doses (D)	1	572,4532 **	1.361,3610 **	2,7606 ns
Tratamentos (T)	4	2.782,8540 **	454,5056 **	839,3267 **
D x T	4	31,7941 ns	28,1652 ns	16,0342 ns
Resíduo	50	23,7470	62,2354	47,0899
CV (%)		5,32	12,14	11,07

\*\* F significativo em nível de 1% de probabilidade.  
ns F não-significativo em nível de 5% de probabilidade.

Quadro 6 - Valores médios de colesterol total sérico (mg/dL) obtidos com os tratamentos aplicados aos animais nos experimentos I e II, 48 horas após a indução da hiperlipidemia

Tratamentos	Doses		Média
	40 mg	80 mg	
Não-tratados	66,80 ± 2,34	67,69 ± 2,08	67,25 ± 1,50
Triton (controle)	119,06 ± 3,62	114,79 ± 1,32	116,93 ± 1,95 a
Triton + cúrcuma	94,03 ± 1,83	88,24 ± 1,96	91,14 ± 1,55 b
Triton + antocianina	81,57 ± 1,94	78,41 ± 1,64	79,99 ± 1,30 b
Triton + carmim	82,40 ± 0,98	76,33 ± 1,25	79,37 ± 1,19 b
Triton + monascus	96,14 ± 2,65	84,53 ± 1,27	90,34 ± 2,24 b
Média	94,64 A	88,46 B	

Na linha, A > B, pelo teste F.  
Na coluna, b difere de a, pelo teste de Dunnett (P<0,05).

Pelos resultados apresentados, observa-se que o grupo de animais tratados com Triton WR-1339 (grupo-controle do experimento), 48 horas após a injeção intraperitoneal de 300 mg/kg de peso corporal do reagente, apresentou elevação média de 42,5% nos níveis de colesterol total sérico, em relação ao grupo de animais não-tratados.

Os grupos de animais tratados com os corantes cúrcuma, antocianina, carmim e monascus apresentaram valores médios de colesterol total significativamente reduzidos, em comparação ao grupo-controle.

Dos corantes fornecidos aos animais, o que apresentou maior porcentagem média de redução dos níveis de colesterol total sérico, em relação ao controle, foi o corante carmim, seguido pelos corantes antocianina, monascus e cúrcuma. As porcentagens médias de redução são mostradas na Figura 12.

Pela comparação dos dados obtidos com o emprego das doses de 40 e 80 mg, observa-se também que, para a média dos quatro corantes testados, a dose de 80 mg reduziu significativamente os níveis de colesterol total em relação à dose de 40 mg, sendo esta redução em torno de 6,5%.

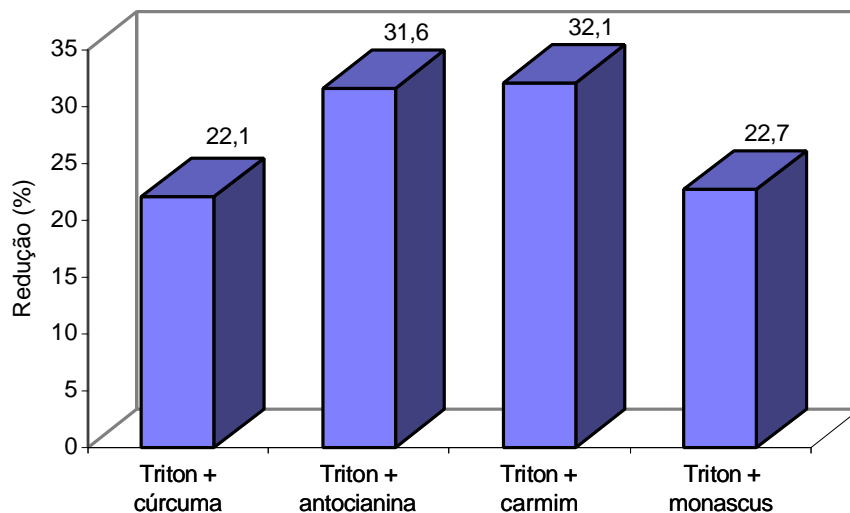


Figura 12 - Porcentagens médias de redução dos níveis de colesterol total sérico com os tratamentos aplicados aos animais, nos experimentos I e II.

Esse efeito de redução dos níveis de colesterol total sérico apresentado pelo corante cúrcuma é concordante com relatos na literatura sobre o efeito apresentado por extratos da planta *Curcuma longa* L. ou de seu principal princípio ativo isolado, a curcumina, responsável por suas propriedades como corante.

SUBBA RAO et al. (1970) relataram que grupos de ratos alimentados com curcumina e colesterol na dieta apresentaram níveis de colesterol total sérico e hepático reduzidos, quando comparados a um grupo alimentado somente com colesterol. Nesse experimento, as doses de curcumina adicionadas à dieta dos animais foram de 0,1; 0,25 e 0,5%, as quais não apresentaram diferença significativa quanto ao efeito de redução do colesterol total, levando estes autores a sugerirem que, mesmo com doses menores que 0,1% de curcumina na dieta, a redução das concentrações de colesterol poderia ocorrer.

Segundo AMMON e WAHL (1991), efeitos similares foram também observados por Pachauri e Mukherji (1970), utilizando um extrato etéreo de *Curcuma longa* L., na dose de 1 g, na alimentação de coelhos hipercolesterolêmicos, e por Dixit et al. (1988), que constataram redução significativa dos níveis de colesterol total em ratos pré-tratados com Triton, usando um extrato etanólico de *Curcuma longa* (50%) na dose de 300 mg/100 g.

Por outro lado, SUBBA RAO et al. (1970) e SRINIVASAN e SAMBAIAH (1991) encontraram elevação dos níveis de colesterol sérico em ratos alimentados com 0,5% de curcumina em dietas básicas sem a adição de colesterol. Estes últimos pesquisadores justificaram esse efeito pelo aumento da biossíntese de colesterol, paralelamente ao catabolismo de colesterol a sais biliares, com base na constatação de que curcumina aumentou a atividade da enzima colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilase (enzima limitante da via de síntese de sais biliares a partir do colesterol), e, no entanto, não se verificou redução dos níveis de colesterol.

Quanto ao efeito de redução apresentado pelo corante carmim, um aditivo corante com longa história de uso em alimentos, não foi encontrada na literatura pesquisada referência anterior sobre este efeito pelo uso do corante, nem do seu princípio ativo corante, o ácido carmínico.

Antocianinas, juntamente com outros compostos flavonóides, encontrados amplamente no reino vegetal, têm sido investigadas quanto a seus efeitos no metabolismo lipídico.

A atividade hipocolesterolêmica de vários compostos flavonóides tem sido relatada na literatura. Isoflavonóides como biochanina A, formononetina e pratenseina apresentaram redução dos níveis de colesterol sérico em ratos tratados com Triton WR-1339 (SHARMA, 1979). Este efeito também foi observado com os compostos pterosupina e liquiritigenina, quando testados em ratos com hiperlipidemia induzida tanto por dieta quanto por Triton WR-1339 (JAHROMI et al., 1993). Outros compostos, como taxifolina, rutina e catequina, têm sido também relatados como apresentando atividade de redução do colesterol sangüíneo (ITAYA e IGARASHI, 1992).

Antocianinas isoladas das raízes da planta *Brassica campestris* L., identificadas como cianidina-3-diglicosídeo-5-monoglicosídeo (rubrobrassicina), cianidina-3,5-diglicosídeo e cianidina-3-monoglicosídeo, foram testadas nas doses de 0,03% de rubrobrassicina e 0,045% de uma mistura das duas outras, na proporção de 2:1, respectivamente, quanto a seus efeitos nos níveis de colesterol sérico. Adicionadas na alimentação de ratos, juntamente com colesterol e colato de sódio, verificou-se, após três semanas, que os animais tratados com a mistura das duas antocianinas apresentaram níveis de colesterol total sérico menores que o controle, porém não em grau estatisticamente significativo, enquanto rubrobrassicina praticamente não mostrou efeito de redução (IGARASHI et al., 1990).

O efeito de redução dos níveis de colesterol total sérico,

apresentado neste trabalho pelo corante monascus, foi também encontrado por FINK-GREMMELS e LEISTNER (1989), utilizando extrato metanólico dos pigmentos produzidos por *Monascus purpureus*, testado em ratos com dieta induzindo hiperlipidemia.

O corante monascus é utilizado pelos povos asiáticos como condimento e corante, assim como para estabilidade microbiológica de produtos de carne e peixe. Quanto a este uso, alguns aspectos devem ser considerados.

O corante monascus tem sido investigado, na Alemanha, quanto a suas propriedades antibacterianas, na tentativa de seu emprego em produtos cárneos, em substituição a sais de nitrito e nitrato (FINK-GREMMELS et al., 1989). Muitos estudos têm relatado a atividade antibacteriana do corante monascus (WONG e BAU, 1977; WONG e KOEHLER, 1981; FINK-GREMMELS et al., 1989), sendo esta atividade atribuída a monascidina A, composto com ação antibiótica, o qual, segundo WONG e KOEHLER (1981), é produzido juntamente com os pigmentos de *Monascus purpureus*.

No entanto, mais recentemente, BLANC et al. (1995), investigando os pigmentos produzidos por *Monascus purpureus* e *Monascus ruber*, caracterizaram estruturalmente monascidina A como citrinina, um metabólito tóxico produzido por vários fungos, concluindo que o corante monascus, para uso como aditivo alimentar, não deve conter monascidina A.

Outro aspecto a ser considerado em relação ao uso do corante monascus é que outra espécie de fungo do gênero monascus, *Monascus ruber*, produz, como resultado do seu metabolismo, monacolina K, um composto com ação hipocolesterolêmica que inibe a enzima HMG-CoA redutase, embora não tenham sido encontradas referências na literatura pesquisada sobre a produção deste metabólito por *Monascus purpureus*.

O efeito de redução dos níveis elevados de colesterol sanguíneo

é considerado de extrema importância no organismo humano, devido à já estabelecida relação entre níveis elevados de colesterol e aterosclerose, levando ao surgimento de doenças vasculares cardíacas, encefálicas e periféricas, de grande incidência em nossa população.

#### **4.2. Efeito dos corantes cúrcuma, antocianina, carmim e monascus nos níveis de HDL-colesterol sérico**

Os valores médios de HDL-colesterol obtidos com os tratamentos aplicados aos animais, nos experimento I e II, encontram-se relacionados no Quadro 7.

Quadro 7 - Valores médios de HDL-colesterol sérico (mg/dL) obtidos com os tratamentos aplicados aos animais nos experimentos I e II, 48 horas após a indução da hiperlipidemia

Tratamentos	Doses		Média
	40 mg	80 mg	
Não-tratados	47,87 ± 2,16	49,47 ± 2,51	48,67 ± 1,60
Triton (controle)	78,16 ± 2,97	72,57 ± 2,79	75,37 ± 2,12 a
Triton + cúrcuma	65,89 ± 1,41	54,51 ± 2,87	60,20 ± 2,30 b
Triton + antocianina	66,50 ± 2,50	57,29 ± 3,75	61,90 ± 2,56 b
Triton + carmim	69,81 ± 2,24	61,88 ± 6,60	65,85 ± 3,53 b
Triton + monascus	68,50 ± 1,19	54,98 ± 2,56	61,74 ± 2,44 b
Média	69,77 A	60,25 B	

Na linha, A > B, pelo teste F.

Na coluna, b difere de a, pelo teste de Dunnett (P<0,05).

Pelos resultados apresentados, observa-se que os efeitos dos corantes cúrcuma, antocianina, carmim e monascus nos níveis de HDL-colesterol mostraram-se similares aos obtidos nos níveis de colesterol total. Os quatro corantes testados apresentaram efeito de redução

significativo dos valores de HDL-colesterol quando comparados ao grupo-controle. A maior dose, 80 mg, apresentou também maior efeito de redução em relação à dose de 40 mg, sendo esta redução em torno de 13,6%.

As porcentagens médias de redução dos níveis de HDL-colesterol sérico são mostradas na Figura 13.

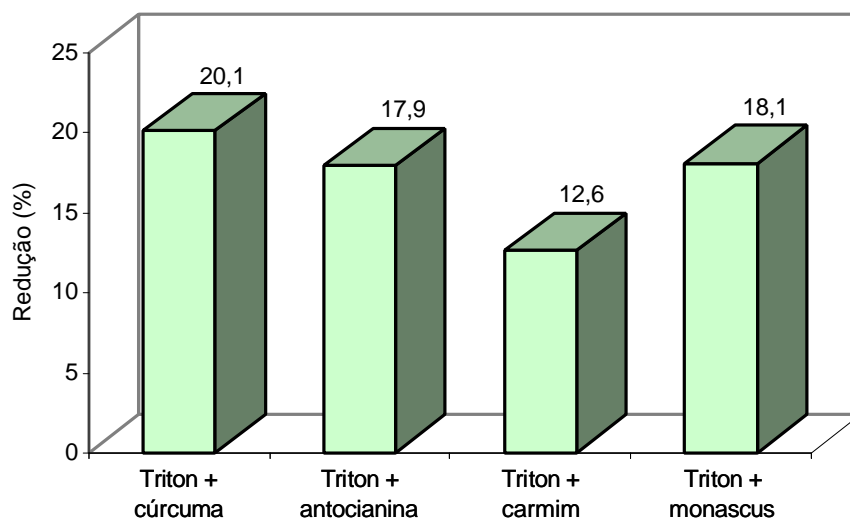


Figura 13 - Porcentagens médias de redução dos níveis de HDL-colesterol sérico com os tratamentos aplicados aos animais, nos experimentos I e II.

O efeito de redução nos níveis de HDL-colesterol sérico com o uso de um extrato metanólico dos pigmentos produzidos por *Monascus purpureus* foi também observado por FINK-GREMMLES e LEISTNER (1989).

Dixit et al. (1988), citados por AMMON e WAHL (1991), utilizando um extrato etanólico de *Curcuma longa*, constataram também efeito de redução nos níveis de HDL-colesterol em ratos pré-tratados com Triton WR-1339.

Este efeito de redução nos níveis de HDL-colesterol apresentado nas condições experimentais deste trabalho não é um efeito desejável. A elevação desses níveis no organismo humano é considerada um fator preventivo no processo de acumulação de colesterol na corrente sanguínea, visto que as lipoproteínas de alta densidade são as responsáveis pelo transporte reverso de colesterol, ou seja, transportam o colesterol das células periféricas para o fígado, onde o seu excesso pode ser metabolizado (MARINETTI, 1990).

Quanto a este efeito de redução apresentado nos níveis de HDL-colesterol sérico, um fator a ser considerado é a influência do método de indução da hiperlipidemia, nos animais experimentais, por Triton WR-1339. ISHIKAWA e FIDGE (1979) constataram modificações das concentrações plasmáticas de lipoproteínas e apoproteínas após a administração de Triton WR-1339 a ratos, por via endovenosa, na concentração de 250 mg/kg de peso corporal. Estes pesquisadores verificaram que as concentrações de lipídios e proteínas na partículas de HDL encontravam-se reduzidas após aplicação de Triton, sendo essa alteração mais acentuada nas concentrações de colesterol.

#### **4.3. Efeito dos corantes cúrcuma, antocianina, carmim e monascus nos níveis de triacilgliceróis séricos**

Os valores médios de triacilgliceróis séricos obtidos com os tratamentos aplicados aos animais, nos experimentos I e II, são mostrados no Quadro 8.

Pelos resultados apresentados, observa-se que os grupos de animais tratados com os corantes cúrcuma, antocianina e monascus apresentaram valores médios de triacilgliceróis significativamente reduzidos, em comparação ao grupo-controle. Com o corante carmim, os valores médios de triacilgliceróis apresentaram-se reduzidos, porém não significativamente em relação ao controle. Com as doses de 40 e 80 mg dos quatro corantes testados, observa-se também que elas não

apresentaram diferença significativa entre si quanto à intensidade do efeito de redução.

As porcentagens médias de redução dos níveis de triacilgliceróis séricos são mostradas na Figura 14.

Efeito de redução nos níveis de triacilgliceróis séricos foi também verificado por Dixit et al. (1988), citados por AMMON e WAHL (1991), com o uso de um extrato etanólico de *Curcuma longa*, em ratos pré-tratados com Triton WR-1339.

Quadro 8 - Valores médios de triacilgliceróis (mg/dL) obtidos com os tratamentos aplicados aos animais nos experimentos I e II, 48 horas após a indução da hiperlipidemia

Tratamentos	Doses		Média
	40 mg	80 mg	
Não-tratados	38,27 ± 1,90	39,81 ± 2,52	39,04 ± 1,52
Triton (controle)	71,73 ± 2,72	74,06 ± 4,21	72,90 ± 2,42 a
Triton + cúrcuma	56,15 ± 3,28	57,12 ± 2,45	56,64 ± 1,96 b
Triton + antocianina	54,42 ± 2,56	55,50 ± 3,14	54,96 ± 1,94 b
Triton + carmim	68,46 ± 2,35	69,82 ± 2,68	69,14 ± 1,71 a
Triton + monascus	58,16 ± 1,40	54,56 ± 2,34	56,36 ± 1,41 b
Média	61,78 A	62,21 A	

Na linha, A > B, pelo teste F.

Na coluna, b difere de a, pelo teste de Dunnett (P<0,05).

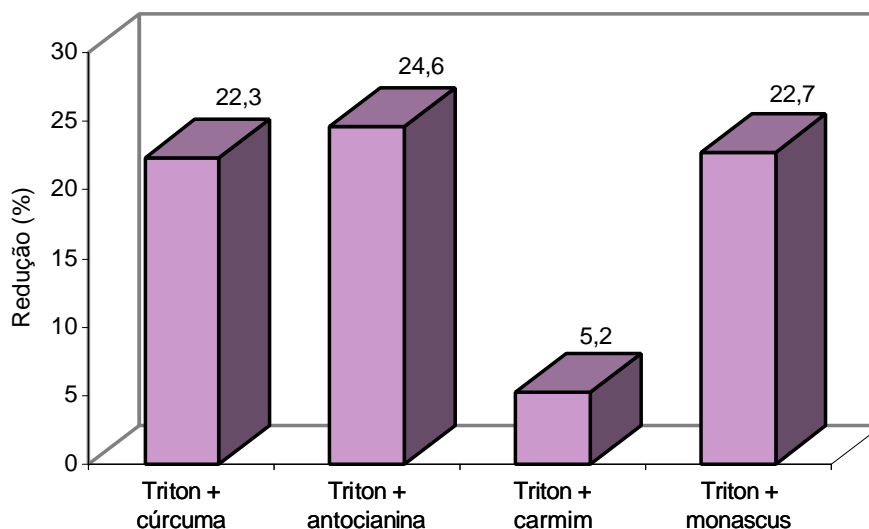


Figura 14 - Porcentagens médias de redução dos níveis de triacilgliceróis séricos com os tratamentos aplicados aos animais, nos experimentos I e II.

Alguns estudos em que antocianinas e outros flavonóides foram testados quanto ao efeito nos níveis de triacilgliceróis séricos são concordantes em indicar o mesmo efeito. SHARMA (1979) verificou o efeito de redução nos níveis de triacilgliceróis, em ratos pré-tratados com Triton WR-1339, testando os isoflavonóides biochanina A, formononetina e pratenseina. ITAYA e IGARASHI (1992) relataram o efeito de redução dos níveis de triacilgliceróis e ácidos graxos livres por malvina contida em uvas (*Vitis coignetiae* P.) em ratos alimentados com dieta sem colesterol. CHOI et al. (1991) constataram que catequina, isolada da planta *Prunus davidiana*, testada em ratos hiperlipidêmicos induzidos por dieta, apresentou redução significativa dos níveis de triacilgliceróis séricos. JAHROMI et al. (1993) verificaram redução significativa nos níveis de triacilgliceróis séricos em ratos hiperlipidêmicos induzidos tanto por dieta quanto por Triton WR-1339, utilizando o flavonóide pterosupina, isolado da planta *Pterocarpus marsupin*.

FINK-GREMMELS e LEISTNER (1989) também encontraram níveis de triacilgliceróis séricos reduzidos em ratos, com o uso de um extrato metanólico dos pigmentos produzidos por *Monascus purpureus*.

O efeito de redução dos níveis séricos elevados de triacilgliceróis é considerado um resultado positivo no organismo humano, não só na prevenção da pancreatite aguda, mas também porque há evidências de que a hipertrigliceridemia esteja relacionada ao aumento da concentração sérica de fatores da coagulação sangüínea e, também, à diminuição da atividade fibrinolítica do soro. Tais alterações no sistema de coagulação podem facilitar o processo da aterosclerose (NOVAZZI e MARTINEZ, 1994).

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Dois experimentos foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito dos corantes naturais cúrcuma, antocianina (cascas de uva), carmim e monascus nos níveis de colesterol e triacilgliceróis sangüíneos, em ratos hiperlipidêmicos. No primeiro experimento foram utilizados 36 animais machos, albinos, da raça Wistar, com peso médio inicial de 225 g, os quais foram divididos em seis grupos experimentais: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>5</sub> e A<sub>6</sub>. O grupo A<sub>1</sub> serviu como referência para a avaliação da indução da hiperlipidemia. Nos animais dos grupos A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>5</sub> e A<sub>6</sub> foi injetado Triton WR-1339, na dose de 300 mg/kg de peso corporal, por via intraperitoneal. O grupo A<sub>2</sub> constituiu-se no grupo-controle do experimento. Vinte e quatro horas após a aplicação do Triton, foram fornecidos os corantes cúrcuma, antocianina, carmim e monascus aos grupos experimentais A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>5</sub> e A<sub>6</sub>, respectivamente, na dose única de 40 mg, misturados a 10 g de ração comercial. Aos grupos A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> foram fornecidos somente 10 g de ração. Quarenta e oito horas após a aplicação do Triton, todos os animais foram anestesiados com éter etílico, e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, separando-se o soro para as dosagens de colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis. No segundo experimento, foram

utilizados 36 animais, divididos em seis grupos experimentais: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub> e B<sub>6</sub>, com a numeração correspondendo aos mesmos tratamentos aplicados aos animais no experimento I, seguindo-se o mesmo procedimento experimental, sendo, porém, os corantes testados na dose de 80 mg.

A análise conjunta dos resultados obtidos nos experimentos I e II mostrou os seguintes resultados: a administração dos corantes cúrcuma, antocianina, carmim e conascus resultou em diminuição significativa dos níveis de colesterol total sérico, com as duas doses testadas, verificando-se maior efeito de redução com a dose de 80 mg; os níveis de HDL-colesterol também mostraram-se reduzidos significativamente com a administração dos quatro corantes, nas doses testadas; a dose de 80 mg apresentou também maior efeito de redução; com os corantes cúrcuma, antocianina e monascus, observou-se redução significativa dos níveis de triacilgliceróis séricos com as duas doses testadas, não se verificando, entretanto, diferença significativa, quanto a este efeito, entre as doses de 40 e 80 mg; e a administração do corante carmim, nas doses testadas, não apresentou efeito de redução significativa dos níveis de triacilgliceróis séricos.

Pelos resultados obtidos nas condições experimentais deste trabalho, pode-se concluir que:

- Os corantes cúrcuma, antocianina (cascas de uva), carmim e monascus apresentaram efeito de redução nos níveis de colesterol total sérico com as doses de 40 e 80 mg, sendo a intensidade deste efeito maior com a dose de 80 mg.

- Os quatro corantes avaliados reduziram os níveis de HDL-colesterol, com as doses de 40 e 80 mg, sendo a intensidade desse efeito maior com a dose de 80 mg. No entanto, observa-se que, para obter conclusões mais exatas sobre os efeitos destes corantes nos níveis de HDL-colesterol, estes devem ser avaliados empregando-se outro método de indução de hiperlipidemia aos animais, visto que, segundo

ISHIKAWA e FIDGE (1979), alterações dos níveis dos componentes das lipoproteínas de alta densidade foram constatadas após a administração de Triton WR-1339.

- Os corantes cúrcuma, antocianina e monascus apresentaram efeito de redução dos níveis de triacilgliceróis séricos com as doses de 40 e 80 mg, não se verificando diferença na intensidade deste efeito entre as doses de 40 e 80 mg.

- O corante carmim não apresentou efeito de redução nos níveis de triacilgliceróis com as doses de 40 e 80 mg.

De acordo com o estudo realizado, são apresentadas as seguintes sugestões:

- Dar continuidade aos estudos destes corantes em animais, para verificar as possíveis variações na atividade hipolipidêmica apresentada, decorrentes da concentração e origem dos corantes, como também para que se obtenham dados que possam esclarecer os mecanismos de ação envolvidos.

- Avaliar as doses utilizadas em experimentos de maior duração que permitam averiguar a segurança com uso continuado destas doses;

- Avaliar o corante monascus quanto à presença de citrinina, como também se há produção de monacolina K pela espécie *Monascus purpureus*.

- Testar a atividade hipolipidêmica destes corantes em outras espécies animais, nas quais o metabolismo lipídico seja o mais semelhante possível ao metabolismo lipídico de humanos, antes que estes corantes naturais possam ser considerados, além de aditivos alimentares, componentes alimentares que possam trazer benefícios ao organismo humano.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEA - Associação Brasileira de Engenheiros de Alimentos. Seção regional do Estado de São Paulo. **Aplicação tecnológica de aditivos e nutrientes em alimentos**. São Paulo: 1984. 111p.
- ALLAIN, C.C., POON, L.S., CHAN, C.S., RICHMOND, W., FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clin. Chem.**, Washington, v.20, n.4., p.470-475, 1974.
- AMMON, H.P.T., WAHL, M.A. Pharmacology of *Curcuma longa* - Review. **Planta Med.**, Stuttgart, v.57, p.1-7, 1991.
- ANDERSEN, J.M., NERVI, F.O., DIETSCHY, J.M. Rate constants for the uptake of cholesterol from various intestinal and serum lipoproteins fractions by the liver of the rat *in vivo*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.486, p.298-307, 1977.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos**: teoria e prática. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1995. 335p.
- AUSLANDER, M., GOLDBERG, M., HILL, J.A., WEISS, A.L. Naturally occurring colorants, a stability evaluation. **Drug comest. Ind.**, Duluth, v.121, n.6, p.55-60, 1977.

- BETTINI, V., ARAGNO, M.B., BETTINI, G., BRAGGION, G., CALORE, L., MORIMANDO, I., PENADA, G. Facilitating influence of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on the acetylcholine-induced relaxation of isolated coronary arteries: role of the endothelium-derived relaxing factor. **Fitoterapia**, Milan, v.64, n.1., p.45-57, 1993.
- BHAGAVAN, N.V. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1977. 819p.
- BHAVANISHANKAR, T.N., NARASIMHA MURTHY, K., SREENIVASA MURTHY, V. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa* L.) - Long term toxicity studies in albino rats and monkeys. **J. Food Sci. Technol.**, Mysore, v.23, p.287-290, 1986.
- BHAVANISHANKAR, T.N., SHANTHA, N.V., RAMESH, H.P., SREENIVASA MURTHY, I.A., SREENIVASA MURTHY, V. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats. **Indian J. Exp. Biol.**, New Delhi, v.18, p.73-75, 1980.
- BHAVANISHANKAR, T.N., SREENIVASA MURTHY, V. Reproductive response of rats fed turmeric (*Curcuma longa* L.) and its alcoholic extract. **J. Food Sci. Technol.**, Mysore, v.24, p.45-49, 1987.
- BLANC, P.J., LAUSSAC, J.P., LE BARS, J., LE BARS, P., LORET, M.O., PAREILLEUX, A., PROME, D., PROME, J.C., SANTERRE, A.L., GOMA, G. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.27, p.201-213, 1995.
- BOBBIO, F.O., BOBBIO, P.A. Pigmentos Naturais. In: \_\_\_\_\_. **Introdução a química de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 1992. p.191-225.
- BOBBIO, F.O., BOBBIO, P.A. Pigmentos. In: \_\_\_\_\_. **Química do processamento de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 1992. p.105-119.
- BREWER JÚNIOR, H.B., GREGG, R.E., HOEG, J.M., FOJO, S.S. Apolipoproteins and lipoproteins in human plasma: an overview. **Clin. Chem.**, Washington, v.34, n.8 (B), B<sub>4</sub>-B<sub>8</sub>, 1988.
- BRODY, T. **Nutritional biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1994. 658p.

- BROUILLARD, R. The *in vivo* expression of anthocyanin colour in plants. **Phytochemistry**, Oxford, v.22, n.6, p.1311-1323, 1983.
- BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p.1-40.
- CARELS, M., SHEPHERD, D. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* species in submerged shaken culture. **Can J. Microbiol.**, Ottawa, v.23, n.10, p.1360-1372, 1977.
- CHAPMAN, M.J. Les lipoprotéines et le foie. **Gastroenterol Clin. Biol.**, v.6, Vineuil, p.482-499, 1982.
- CHOI, J.S., YOKOZAWA, T., OURA, H. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v.54, n.1, p.218-224, 1991.
- CONNAY, A.H. LYSZ, T., FERRARO, T., ABIDI, T.F., MANCHAND, P.S., LASKIN, J.D., HUANG, M.T. Inhibitory effects of curcumin and some related dietary compounds on tumor promotion and arachidonic acid metabolism in mouse skin. **Adv. Enzyme Regul.**, Oxford, v.31, p.385-396, 1991.
- DE JONES, P.H., PATSCH, J., GOTTO JÚNIOR, A.M. The biochemistry of blood lipid regulation and the assessment of lipid abnormalities. In: SCHLANT, R.C., ALEXANDER, R.W. (Eds.). **The heart arteries and veins**. 8.ed. New York: McGraw-Hill, 1994. p. 973-987.
- EISENBERG, S. High density lipoprotein metabolism. A review. **J. Lipid. Res.**, Bethesda, v.25, p.1017-1057, 1984.
- EISENBERG, S. Lipoproteins and lipoprotein metabolism. A dynamic evaluation of the plasma fat transport system. **Klin. Wochenschr.**, Berlin, v.61, p.119-132, 1983.
- ENDO, A., HASUMI, K., NEGISHI, S. Monacolins J and L new inhibitors of cholesterol biosynthesis produced by *Monascus ruber*. **J. Antibiot.**, Tokyo, v.38, n.3, p.420-422, 1985.
- FIECCHI, A., ANASTASIA, M., GALLI, G., GARIBOLDI, P. Assignment of  $\beta$  configuration to the c-glicosyl bonds in carminic acid. **J. Org. Chem.**, Washington, v.46, p.1511, 1981.

- FIELDING, B.C., HOLKER, J.S.E., JONES, D.F., POWELL, A.D.G., RICHMOND, K.W., ROBERTSON, A., WHALLEY, W.B. The chemistry of fungi. Part 39. The structure of monascin. **J. Chem. Soc.**, Cambridge, v.1961, p. 4579, 1961.
- FINK-GREMMELS, J., GLENN, E., LEISTNER, L. Monascus extrates: an alternative to nitrite and nitrate in sausages? **Mitteilungsbl. Bundesanst. Fleischforsch. Kulmb.**, Bonn, n.105, p.325-329, 1989.
- FINK-GREMMELS, J., HENNING, A., LEISTNER, L. Studies on cytotoxicity and genotoxicity of a *Monascus* extract. **Mitteilungsbl. Bundesanst. Fleischforsch. Kulmb.**, Bonn, n.111, p.38-44, 1991.
- FINK-GREMMELS, J., LEISTNER, L. Biological effects of *Monascus purpureus*. **Fleischwirtsch**, Frankfurt, v.69, n.1, p.115-122, 1989.
- FORD, G.P., GOPAL, T., GRANT, D., GAUNT, I.F., EVANS, J.G., BUTLER, W.H. Chronic toxicity/carcinogenic study of carmine of cochineal in the rat. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.25, n.12, p.897-902, 1987.
- FOSSATI, P., PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clin. Chem.**, Washington, v.28, n.10, p.2077-2080, 1982.
- FRANCIS, F.J. A new group of food colorants. **Trends Food Sci. Technol.**, Oxford, v.3, p.27-30, 1992.
- FRANCIS, F.J. Lesser-known food colorants. **Food. Technol.**, Chicago, p.62-68, 1987.
- FREUND, P.R., WASHAM, C.J., MAGGION, M. Natural color for use in foods. **Cereal Foods World**, St. Paul, v.33, n.7, p.553-559, 1988.
- GARCIA, R.C., OLIVEIRA, H.C.F. Fisiologia das Lipoproteínas. In: QUINTÃO, E. (Ed.). **Colesterol e aterosclerose**. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1992. p.1-30.
- GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. Progress in understanding the LDL - receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. **J. Lipid. Res.**, Bethesda, v.25, p.1450-1468, 1984.

- GOUD, V.K., POLASA, K., KRISHNASWAMY, K. Effect of turmeric on xenobiotic metabolising enzymes. **Plant Foods Hum. Nutr.**, Dordrecht, v.44, p.87-92, 1993.
- GOVINDARAJAN, V.S. Turmeric - chemistry, technology, and quality. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Boca Raton, v.12, n.3, p.199-301, 1980.
- GRANNER, D.K. Membranas: Estrutura, arranjo e função. In: MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A. et al. (Eds.) **Harper**: bioquímica 6.ed. São Paulo: Atheneu, 1990. p.454-472.
- GRANT, D., GAUNT, I.F. Three-generation reproduction study on carmine of cochineal in the rat. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.25, n.12, p.903-912, 1987.
- GRUNDY, S.M. Absorption and metabolism of dietary cholesterol. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v.3, p.71-96, 1983.
- GRUNDY, S.M. Cholesterol metabolism in man. (Medical progress). **West. J. Med.**, San Francisco, v.128, p.13-25, 1978.
- GUIMARÃES, I.S.S. Corantes naturais: os sucedâneos dos artificiais. **Rev. Bras. Cor. Nat.**, Viçosa, v.2, n.1, p.88-99, 1994.
- HAN, O., MUDGETT, R.E. Effects of oxygen and carbon dioxide partial pressures on *Monascus* growth and pigment production in solid-state fermentations. **Biotechnol. Prog.**, Washington, v.8, n.1., p.5-10, 1992.
- HAVEL, R.J. The formation of LDL: mechanisms and regulation. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.25, p.1570, 1984.
- HAVEL, R.J., HAMILTON, R.L. Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. **Hepatology**, Philadelphia, v.8, n.6., p.1689-1704, 1988.
- HOPEWELL, R.D., YEARTER, R., ULLRICH, I. Soluble fiber: effect on carbohydrate and lipid metabolism. **Prog. Food. Nutr. Sci.**, Oxford, v.17, p.159-182, 1993.
- IACOBUCCI, G.A., SWEENEY, J.G. The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins and related flavylum salts. **Tetrahedron**, Oxford, v.39, n.19, p.3005-3038, 1983; Tetrahedron-report, 154.

- IGARASHI, K., ABE, S., SATOH, J. Effects of Atsumi-kabu (Red Turnip, *Brassica campestris* L.) anthocyanin on serum cholesterol levels in cholesterol-fed rats. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.54, n.1, p.171-175, 1990.
- ILLINGWORTH, D.R. An overview of lipid; lowering drugs. **Drugs**, Langhorne, v.36, n.3, p. 63-71, 1988. Supplement.
- ISHIKAWA, T., FIDGE, N. Changes in the concentration of plasma lipoproteins and apoproteins following the administration of Triton WR-1339 to rats. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v.20, p.254-264, 1979.
- ITAYA, S., IGARASHI, K. Effects of taxifolin on the serum cholesterol level in rats. **Biosci. Biotech. Biochem.**, Tokyo, v.56, n.9, p.1492-1494, 1992.
- JACKMAN, R.L., YADA, R.Y., TUNG, M.A. et al. Anthocyanins as food colorants - A review. **J. Food Biochem.**, Westport, v.11, p.201-247, 1987.
- JAHN, A. Evaluation of genotoxicity of a *Monascus* extract by three *in vitro* tests. **Mitteilungsbl. Bundesanst. Fleischforsch. Kulmb.**, Bonn, n.114, p.379-387, 1991.
- JAHROMI, M.A.F., RAY, A.B., CHANSOURIA, J.P.N. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Pterocarpus marsupium*. **J. Nat. Prod.**, Columbus, v.56, n.7, p.989-994, 1993.
- JOINT FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Toxicological evaluation of certain food additives**. Geneva: 1982. p.42-264. (WHO Food Additives Series, 17).
- JORGENSEN, K., SKIBSTED. L.H. Light sensitivity of cochineal. Quantum yields for photodegradation of carminic acid and conjugate bases in aqueous solution. **Food chem.**, oxford, v.40, p.25-34, 1991.
- KINSELLA, J.E., FRANKEL, E., GERMAN, B., KANNER, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. **Food Technol.**, Chicago, v.47, n.4, p.85-89, 1993.
- KRISHNAMURTHY, N., MATHEW, A.G., NAMBUDIRI, E.S., SHIVASHANKAR, S., LEWIS, Y.S., NATARAJAN, C.P. Oil and oleoresin of turmeric. **Trop. Sci.**, London, v.18, n.1, p.37-45, 1976.

- KRISHNAMURTHY, M.N., PADMABAI, R., NATARAJAN, C.P., KUPPUSWAMY, S. Colour content of turmeric varieties and studies on its processing. **J. Food Sci. Technol.**, Mysore, v.12, n.1, p.12-14, 1975.
- KUNZ, B., OBER, P. Wachstums und stoffwechseluntersuchungen von *Monascus purpureus*. **BioEngineering**, Gräfelfing, v.3, p.18-26, 1987.
- KURONO, M., NAKANISHI, K., SHINDO, K., TADA, M. Biosynthesis of monascorubrin and monascoflavin. **Chem. Pharm. Bull.**, v.11, p.358-362, 1963.
- LAURO, G.J. **Handbook of natural colors**. Placentia: La Monde, 1995. p.14-16.
- LIN, C.F. Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. for the production of pigment in a submerged culture. **J. Ferment. Technol.**, Amsterdam, v.51, n.6, p.407-414, 1973.
- LIN, C.F., LIZUKA, H. Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.43, n.3, p.671-676, 1982.
- LIN, T.F., DEMAIN, A.L. Effect of nutrition of *Monascus* sp on formation of red pigments. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.36, n.1., p.70-75, 1991.
- LINSCHAEER, W.G., VERGOESEN, A.J. Lipids. In: SHILS, M.E., YOUNG, V.R. (Eds.) **Modern nutrition in health and disease**. 7.ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1988. p.72-107.
- LLOYD, A.G. Extraction and chemistry of cochineal. **Food Chem.**, Oxford, v.5., p.91-107, 1980.
- LOPES, L.M., SOARES, J.A.C., LOPES, I.E.L., PINTO, L.E.S.A., MARTINEZ, T.L.R. Metabolismo das lipoproteínas. In: MARTINEZ, T.L.R., LOURENÇO, D.M. (Eds.) **Avaliação e conduta nos riscos trombo e aterogênico**. São Paulo: Art Plus, 1996. p.61-69.
- MADSEN, H.L., STAPELFELDT, H., BERTELSEN, G., SKIBSTED, L.H. Cochineal as a colorant in processed pork meat. Colour matching and oxidative stability. **Food Chem.**, Oxford, v.46, p.265-271, 1993.

- MAHAN, L.K., ARLIN, M.T. **Krause**: alimentos, nutrição e dietoterapia. 8.ed. São Paulo: Roca, 1995. 957p.
- MAHSON, F.H., GRUNDY, S.M., CROUSE, J.R. Optimising the effect of plant sterols on cholesterol absorption in man. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.35, p.697-700, 1982.
- MAIA, N.B. A cúrcuma como corante. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, 2, 1991, Campinas. **Resumo...** Campinas: ITAL, 1991. p.65 (Seminário Apresentado no 1º Simpósio Internacional de Urucum).
- MARINETTI, G.V. **Disorders of lipid metabolism**. New York: Plenum Press, 1990. 226p.
- MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in food. In: \_\_\_\_\_. **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p.163-180.
- MARSHALL, P.N., HOROBIN, R.W. A simple assay procedure for carmine and carminic acid samples. **Stain Technol.**, Baltimore, v.40, n.1, p.19-28, 1974.
- MARTINS, M.C., RUSIG, O. Cúrcuma - um corante natural. **Bol. SBCTA**, Campinas, v.26, n.1, p.53-65, 1992.
- MATHAI, C.K. The pattern of rhizome yield and their accumulation of commercially important chemical constituents in turmeric (curcuma spices) during growth and development. **Qual. Planta - Plant Foods Hum. Nutr.**, Dordrecht, v.28, n.3, p.219-225, 1979.
- MATHEWS, C.K., Van HOLDE, K.E. **Biochemistry**. Reedwood: Benjamin/Cummings Publishing Company, 1990. 1129p.
- MAYES, P.A. Colesterol: Síntese, transporte e excreção. In: MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A. (Eds.) **Harper**: bioquímica, 6.ed. São Paulo: Atheneu, 1990. p.247-258.
- MAYES, P.A. Digestão e Absorção no trato gastrointestinal. In: HARPER, H.A., RODWELL, V.W., MAYES, P.A. (Eds.) **Manual de química fisiológica**. São Paulo: Atheneu, 1982. p. 258-272.
- MAZZA, G., BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. **Food Chem.**, Oxford, v.25, p.207-225, 1987.

- MORAZZONI, P., MAGISTRETTI, M.J. Effects of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on prostacyclin-like activity in rat arterial tissue. **Fitoterapia**, Milan, v.57, n.1, p.11-14, 1986.
- MORI, H., IWATA, H., TANAKA, T., MORISHITA, Y., MORI, Y., KOJIMA, T., OKUMURA, A. Carcinogenicity study of cochineal in B<sub>6</sub> C<sub>3</sub> F<sub>1</sub>, mice. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.29, n.9, p.585-588, 1991.
- NOVAZZI, J.P., MARTINEZ, T.L.R. Dislipidemias: critérios diagnósticos. In: LEITE, P.F., MARTINEZ, T.L.R., HALPERN, M.S.C., NOVAZZI, J.P., FONSECA, F.A.H.F., DIAS, J.C.A. (Eds.) **Risco cardiovascular: fatores metabólicos e nutricionais - diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Loyola, 1994. p.51-60.
- OLIVEIRA, V.P., GHIRALDINI, J.E., SACRAMENTO, C.K. O cultivo de plantas produtoras de corantes. **Ver. Bras. Cor. Nat.**, Vitória da Conquista, v.1, n.1, p.232-237, 1992.
- PALO, M.A., ADEVA, L.V., MACEDA, L.M. A study on ang-kak and its production. **Philipp. J. Sci.**, Manila, v.89, n.1, p.1-19, 1960.
- PARKINSON, T.M., BROWN, J.P. Metabolic fate of food colorants. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v.1 p.175-205, 1981.
- PEROTTI, A.G. La Curcumina - un utile colorante vegetale poco noto. **Ind. Aliment.**, Pinerolo, v.14, n.6., p. 66-68, 1975.
- POURRAT, H., BASTIDE, P. DORIER, P., POURRAT, A., TRONCHE, P. Préparation et activité thérapeutique de quelques glycosides d'anthocyanes. **Chimie Thérapeutique**, Paris, n.1, p.33-38, 1967.
- PRASAD, J., SINGH, A. Processing of turmeric. **Fiji Agric. J.**, Suva, v.42, n.2, p.23-25, 1980.
- RUDNEY, H., SEXTON, R.C. Regulation of cholesterol biosynthesis. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v.6, p.245-272, 1986.
- SAMBALIAH, K., RATANKUMAR, S., KAMANNA, V.S., SATYANARAYANA, M.N., RAO, M.V.L. Influence of turmeric and curcumin on growth, blood constituents and serum enzymes in rats. **J. Food Sci. Technol.**, Mysore, v.19, p.187-190, 1982.

- SAMPATHU, S.R., KRISHNAMURTHY, N., SOWBHAGYA, H.B., SHANKARA NARAYANA, M.L. Studies on quality of turmeric in relation to curing methods. **J. Food Sci. Technol.**, Mysore, v.25, n.3., p.152-155, 1988.
- SASTRY, P.S. Curcumin content of turmeric. **Res. Ind.**, Stanford, v.15, n.4, p.250-260, 1970.
- SHARMA, O.P. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.25, p.1811-1812, 1976.
- SHARMA, R.D. Effect of various isoflavones on lipid levels in triton-treated rats. **Atherosclerosis**, Limerick, v.33, p.371-375, 1979.
- SMITH, E.L., HILL, R.L., LEHMAN, I.R., LEFKOWITZ, R.J., HANDLER, P., WHITE, A. **Bioquímica mamíferos**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 620p.
- SMITH, E.L., HILL, R.L., LEHMAN, I.R., LEFKOWITZ, R.J., HANDLER, P., WHITE, A. **Principles of biochemistry**: general aspects. 7.ed. New York: Mc Graw-Hill, 1983. 886p.
- SRINIVASAN, K., SAMBAIAH, K. The effect of spices on cholesterol 7 $\alpha$ -Hidroxiase activity and on serum e hepatic cholesterol levels in the rat. **Internat. J. Vit. Nutr. Res.**, Bern, v.61, p.364-369, 1991.
- STAPELFELDT, H., JUN, H., SKIBSTED, L.H. Fluorescence properties of carminic acid in relation to aggregation, complex formation and oxygen activation in aqueous food models. **Food Chem.**, Oxford, v.48, p.1-11, 1993.
- STRACK, D., WRAY, V. Anthocyanins. In: \_\_\_\_\_. **Methods in plant biochemistry**. Academic Press, 1989. p.325-356.
- STRYER, L. **Biochemistry**. 4.ed. New York: W.H. Freeman and Company, 1995. 1064p.
- SUBBA RAO, D., CHANDRA SEKHARA, N., SATYANARAYANA, M.N., SRINIVASAN, M. Effect of curcumin on serum and liver cholesterol levels in the rat. **J. Nutr.**, Bethesda, v.100, p.1307-1316, 1970.
- TAKAHASHI, M.Y. **Monografias de corantes naturais para fins alimentícios**: padrões de qualidade e identidade. 2.ed. São Paulo: 1987. 118p.

- TAMURA, H., YAMAGAMI, A. Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from *Muscat Bailey A* grape. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.42, n.8, p.1612-1615, 1994.
- THOMPSON, G.R. **A handbook of hyperlipidaemia**. London: Current Science, 1989. 235p.
- TIKKANEN, M.J., NIKKILA, E.A. Cholesterol and cardiovascular disease. Current pharmacologic treatment of elevated serum cholesterol. **Circulation**, Dallas, v.76, p.529, 1987.
- TIMBERLAKE, C.F., BRIDLE, P. Anthocyanins. In: WALFORD, J. (Ed.) **Developments in food colours**. London: Applied Science Publishers, 1980. p.115-149.
- TIMBERLAKE, C.F., HENRY, B.S. Anthocyanins as natural food colorants. In: CODY, V., ELLIOT JUNIOR, M., HARBOME, J.B., BERETEZ, A. **Plant flavonoids in biology and medicine II: biochemical, cellular, and medicinal properties**. New York: Alan R. Liss, 1988. P.107-121. (Progress in Clinical and Biological Research, 280).
- TURLEY, S.D., DIETSCHY, J.M. Cholesterol metabolism and excretion by the liver. In: ARIAS, I., POPPER, H., SCHACHTER, D., SHAFRITZ, D.A. (Eds.) **The liver: biology and pathobiology**. New York: Raven Press, 1982. p.467-492.
- TSUDA, T., WATANABE, M., OHSHIMA, K., NORINOBU, S., CHOI, S.W., KAWAKISHI, S., OSAWA, T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside and cyanidin. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.42, n.11, p.2407-2410, 1994.
- WARNICK, G.R., NGUYENT, T., ALBERS, A.A. Comparison of improved precipitation methods for quantification of high-density lipoprotein cholesterol. **Clin. Chem.**, Washington, v.31, n.2, p.217-222, 1985.
- WONG, H.C., BAU, Y.S. Pigmentation and antibacterial activity of fast neutron and X-ray induced strains of *Monascus purpureus* went. **Plant Physiol.**, Bethesda, v.60, p.578-581, 1977.
- WONG, H.C., KOEHLER, P.E. Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. **J. Food Sci.**, Chicago, v.46, p.589-592, 1981.
- WONG, H.C., KOEHLER, P.E. Production of red water-soluble *Monascus* pigments. **J. Food Sci.**, Chicago, v.48, p.1200-1203, 1983.

WONG, H.C., LIN, Y.C., KOEHLER, P.E. Regulation of growth and pigmentation of *Monascus purpureus* by carbon and nitrogen concentrations. **Mycologia**, New York, v.73, p. 649-654, 1981.

YOSHIMURA, M., YAMANAKA, S., MITSUGI, K., HIROSE, Y. Production of *Monascus* pigment in a submerged culture. **Agr. Biol. Chem.**, Tokyo, v.39, n.9, p.1789-1795, 1975.