

MÁRCIA RODRIGUES CARVALHO

**IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO POR FUNGOS
(*MONASCUS RUBER* E *ASPERGILLUS VERSICOLOR*) E
SEUS EFEITOS NO METABOLISMO LIPÍDICO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

MÁRCIA RODRIGUES CARVALHO

**IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DA FERMENTAÇÃO POR FUNGOS
(*MONASCUS RUBER* E *ASPERGILLUS VERSICOLOR*) E
SEUS EFEITOS NO METABOLISMO LIPÍDICO**

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

APROVADA: 15 de fevereiro de 2001.

Prof. Luiz Cláudio de A. Barbosa
(Conselheiro)

Prof^a Neuza Maria B. Costa
(Conselheira)

Prof^a Maria Eliana L. R. de Queiroz

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

Prof. José Humberto de Queiroz
(Orientador)

Aos meus filhos Júlia e Lucas, pela convivência restrita que este trabalho nos proporcionou.

AGRADECIMENTO

Aos meus pais, pelo amor, pela dedicação, pela confiança e pelo apoio em todos os anos de minha vida.

À minha Tia Ivone, pela ajuda imprescindível, sem a qual não poderia realizar este trabalho.

À minha irmã Poliana e às minhas Tias Jeane e Conceição, que me deram o indispensável apoio.

Ao meu esposo André, pela ajuda e compreensão.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Bioquímica e Biologia molecular, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro e pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Departamento de Nutrição, pela oportunidade de realizar os ensaios biológicos; à professora Neuza, pelos conselhos indispensáveis; e aos laboratoristas Dona Zezinha e Sr. Adão, pela ajuda imprescindível.

Ao professor José Humberto de Queiróz, pela orientação e dedicação.

Ao professor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, pelos preciosos conselhos e pela indispensável colaboração na realização deste trabalho.

Ao NIPA, especialmente à professora Eliana e ao Alexandre.

Ao LASA, especialmente a Fernando, Adilson, Larissa, Ricardo e Roqueline, pela valiosa ajuda e pelo companheirismo.

Aos amigos e colegas Wander, Gal, Márcia, Roberta, Gislene, Flaviano, Simone e Dayse, pela colaboração e pela constante disponibilidade em ajudar.

Aos laboratoristas Sr. Antônio, Eduardo e Jéferson, pela colaboração neste trabalho.

Aos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

MÁRCIA RODRIGUES CARVALHO, filha de Ed Geraldo Rezende Carvalho e Lia Lourdes Rodrigues Carvalho, nasceu em 9 de fevereiro de 1972, na cidade de Viçosa, Minas Gerais.

Em dezembro de 1997, graduou-se em Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG.

Em março de 1998, iniciou os estudos no Programa de Mestrado em Agroquímica, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 15 de fevereiro de 2001.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Doenças cardiovasculares e colesterol.....	3
2.1.1. Biossíntese de colesterol.....	5
2.1.2. Transporte do colesterol e outros lipídios.....	8
2.1.3. Lipoproteínas.....	8
2.2. Inibidores da síntese de colesterol e monacolinas.....	10
2.2.1. Experimentos <i>in vivo</i>	13
2.3. Monacolinas.....	16
2.3.1. Estrutura e propriedades.....	16
2.3.2. Biossíntese de monacolinas.....	16
2.3.3. Modelo de interação enzimática.....	17
2.3.4. Produção das monacolinas.....	19

2.3.5. Identificação da mevinolina.....	20
2.3.6. Dosagem de mevinolina por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE.....	20

Página

3. MATERIAL E MÉTODOS.....

.....22

3.1. Microrganismos.....	22
3.2. Produção do arroz fermentado	24
3.3. Obtenção do extrato metanólico do arroz fermentado.....	25
3.4. Ensaio biológico de curta duração, com aplicação de Triton.....	26
3.5. Ensaio biológico utilizando colesterol e ácido cólico na dieta.....	27
3.6. Análise estatística.....	29
3.7. Identificação de mevinolina por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE.....	30
3.7.1. Análise do padrão de mevinolina.....	30
3.7.2. Conversão do padrão de mevinolina em a forma ácida (ácido mevinolínico).....	30
3.7.3. Conversão da forma ácida em lactona.....	31
3.8. Estudo químico do arroz fermentado por <i>Aspergillus versicolor</i>	32
3.8.1. Extração do arroz fermentado por <i>Aspergillus versicolor</i>	32
3.8.2. Fracionamento e análise do extrato obtido do arroz fermentado por <i>Aspergillus versicolor</i>	32
3.8.2.1. Purificação da fração M5(3).....	35
3.8.2.2. Purificação das frações M1(5), M1(7) e M6(3).....	35
3.8.2.3. Análises das frações M1(5), M1(7) e M6(3).....	36
3.9. Avaliação da atividade inseticida das lactonas.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. Estudo dos efeitos do arroz fermentado por fungos sobre o metabolismo lipídico de ratos.....	38
4.1.1. Ensaio biológico de curta duração, com aplicação de Triton.....	38
4.1.2. Ensaio biológico utilizando colesterol mais ácido cólico na dieta....	42
4.2. Identificação de mevinolina por CLAE.....	48
4.2.1. Análise do padrão na forma ácida (ácido mevinolínico).....	48
4.2.2. Análise do padrão após conversão da forma ácida em lactona	49
4.2.3. Análise dos extratos de <i>Monascus ruber</i> e <i>Aspergillus versicolor</i> ..	49
4.3. Estudo químico do extrato de arroz fermentado por <i>Aspergillus versi-</i>	

<i>color</i>	53
4.3.1. Obtenção do extrato.....	53
4.3.2. Fracionamento do extrato de <i>A. versicolor</i> em coluna de sílica-gel.....	53
	Página
4.3.3. Identificação de novas lactonas das frações M1(5) e M1(7).....	54
4.3.4. Avaliação da atividade inseticida das lactonas.....	59
4.3.5. Caracterização do peróxido de ergosterol no extrato de arroz fermentado por <i>A. versicolor</i>	59
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
APÊNDICES.....	73
APÊNDICE A.....	74
APÊNDICE B.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA	Batata-dextrose-ágar
CEA	Coefficiente de eficiência alimentar
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
C	Colesterol
AC	Ácido cólico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
EM	Espectrometria de massa
R _f	Fator de retenção em cromatografia de camada delgada
IV	Infravermelho
δ _s	Deformação angular simétrica no plano
ν	Estiramento
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
NOE	Efeito nuclear de Overhausen

HMBC	“Higher multiple bond correlated”
HMQC	“Higher multiple quantum correlated”
COSY	Experimento homonuclear de RMN
δ	Deslocamento químico
MHz	Megahertz
Hz	Hertz
S	Simpleto
D	Dupleto
Dd	Duplo dupleto
Tdd	Triplo duplo dupleto
T	Triplete
M	Multiplete
J	Constante de acoplamento escalar
m/z	Razão entre a massa e a carga de um fragmento
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
TMS	Tetrametilsilano
THF	Tetraidrofurano
DCM	Diclorometano
FA	Fase aquosa
FO	Fase orgânica

RESUMO

CARVALHO, Márcia Rodrigues, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2001. **Identificação de produtos da fermentação por fungos (*Monascus ruber* e *Aspergillus versicolor*) e seus efeitos no metabolismo lipídico.** Orientador: José Humberto de Queiroz. Conselheiros: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Neuza Maria Brunoro Costa.

Os fungos do gênero *Monascus* são tradicionalmente conhecidos por produzirem corantes utilizados na indústria alimentícia e pela produção da mevinoxina, uma substância utilizada na redução do colesterol sérico. Esta substância possui ação competitiva com a enzima hidroximetilglutaril-Coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), a qual regula a biossíntese do colesterol. Foram realizados testes *in vivo* para determinar a atividade biológica do arroz fermentado pelo *Monascus ruber*. Aliado a este estudo, foi testada outra cepa de fungo identificada como *Aspergillus versicolor*, a qual se apresenta frequentemente como contaminante de alimentos. Nesse sentido, foram realizados dois testes biológicos para se determinar a ação hipolipidêmica destes fungos em ratos machos da raça Wistar, com hiperlipidemia induzida por Triton ou por 1% de colesterol mais 0,1% de ácido cólico. Os resultados obtidos nos ensaios biológicos demonstram que o arroz fermentado por *M.*

ruber tende a reduzir os níveis de colesterol total nos animais testados. O estudo dos extratos de *Monascus ruber* e *Aspergillus versicolor* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) não detectou a presença de mevinoxina nestes extratos. O fracionamento do extrato de *Aspergillus versicolor*, em coluna de sílica-gel, permitiu o isolamento de duas novas lactonas, cujas estruturas foram estabelecidas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C , espectroscopia no infravermelho (IV) e espectrometria de massas (EM). Uma das lactonas apresentou potencial como inseticida, com mortalidade de 75% em relação ao controle. Ainda deste extrato foi isolado o peróxido de ergosterol, o qual foi identificado pelas mesmas técnicas citadas anteriormente. Embora este composto tenha sido isolado anteriormente em outros meios, não foi encontrado na literatura relato associado à produção de peróxido de ergosterol por cepas de *Aspergillus versicolor*.

ABSTRACT

CARVALHO, Márcia Rodrigues, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2001. **Identification of products of the fermentation of the fungi (*Monascus ruber* and *Aspergillus versicolor*) and yours effects on lipidic metabolism.** Adviser: José Humberto de Queiroz. Committee members: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa and Neuza Maria Brunoro Costa.

The fungi from the genus *Monascus* are traditionally known by producing stain used in the food industry and for the one of the production of the mevinoлин, one substance used in the serum cholesterol-lowering. This substance possesses competitive action with the enzyme hydroxymethylglutaryl-Coenzyme reductase (HMG-CoA reductase), which regulates biosynthesis of the cholesterol. Tests had been carried *in vivo* to determine the biological activity of the fermented rice for the *Monascus ruber*. Ally to this study, was tested another strains of fungus identified as *Aspergillus versicolor*, which presents frequent as contaminant of foods. In this direction two biological assays had been carried through to determine the hypolipidemic action of these fungi in male rats of the Wistar race, with induced hyperlipidemy for Triton or for 1% of cholesterol more 0.1% of cholic acid. The results obtained in the biological assays demonstrate that the fermented rice for *M. ruber* tends to reduce the total cholesterol levels in the tested animals. The study of extracts

of *Monascus ruber* and *Aspergillus versicolor* for High Liquid Performance Chromatography (HPLC) revealed the absence of mevinolin in these extracts. The fractionation of the extract of *Aspergillus versicolor* in silica gel column providing the isolation of two new lactones, whose structures had been established by spectroscopy of nuclear magnetic resonance (NMR) of ^1H and ^{13}C , infrared spectroscopy (IR) and the mass spectrometry (MS). One of the lactones presented potential as insecticide with 75% mortality relative to control. Still of this extract the ergosterol peroxide was isolated, which was identified by the same techniques. Although this compound has been isolated previously in other means, was not found in literature report associated to the production of ergosterol peroxide for strains of *Aspergillus versicolor*.

1. INTRODUÇÃO

Dados do perfil de mortalidade no Brasil indicam que as doenças do aparelho circulatório, com predomínio das doenças cerebrovasculares e doença isquêmica do coração, representam a primeira causa de mortes. Em 1989, esse conjunto de doenças representava 28% dos óbitos, indicando sua importância como problema de saúde pública (CERVATO et al., 1997).

Dentre as patologias pertencentes ao grupo de doenças do aparelho circulatório, a doença cardiovascular aterosclerótica tem sido considerada problema de saúde pública, na Europa e América do Norte, desde o começo do século passado (CERVATO et al., 1997).

Diversos estudos epidemiológicos têm fornecido uma visão sobre os fatores de riscos envolvidos na etiologia da doença cardiovascular aterosclerótica. Assim, dentre os fatores de risco considerados de maior importância destacam-se a hipertensão arterial, as dislipidemias, a obesidade, o diabetes melito e alguns hábitos relacionados ao estilo de vida, como dieta rica em calorias, gorduras saturadas, colesterol e sal, consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo e sedentarismo. A dieta, por sua vez, está presente na etiologia das dislipidemias e da obesidade, podendo ainda atuar como agravante do diabetes melito (CERVATO et al., 1997).

Por ser considerado um problema de saúde pública, a ciência tem demonstrado grande interesse em desenvolver pesquisas relacionadas à redução de hiperlipidemias.

Várias pesquisas têm mostrado que alguns alimentos e substâncias naturais podem combater a hiperlipidemia. Entre outras, citam-se a inclusão do feijão na dieta de animais experimentais (COSTA et al., 1993), o uso de flavonóides, que são compostos fenólicos largamente distribuídos em plantas

comestíveis e não-comestíveis (PEREIRA, 1999), e o uso da mevinolina, uma substância produzida por fungos que possui a propriedade de reduzir os níveis de colesterol sérico (ENDO et al., 1986b; LI et al., 1998).

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar o efeito de alimentos fermentados por fungos sobre o metabolismo lipídico e identificar novas substâncias produzidas nesses meios.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Doenças cardiovasculares e colesterol

Pesquisas já demonstraram que a hiperlipidemia e a aterosclerose podem ocorrer em consequência de vários fatores, como, por exemplo, a deficiência relativa de ácidos graxos poliinsaturados. A deposição de placas de lipídios na parede interna das artérias (ateromas) parece ocorrer mais rapidamente quando as concentrações de lipídios séricos estão elevadas. O material depositado possui composição semelhante à dos lipídios séricos no momento da deposição. A concentração de lipídios plasmáticos é determinada, em parte, pela composição da dieta. Quando quantidades maiores são incluídas em dietas experimentais, as consequências variam de acordo com a quantidade de colesterol e a composição da dieta (LEHNINGER, et al., 1995).

A ocorrência da aterosclerose está relacionada aos altos níveis do colesterol ligado às lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e existe correlação entre os baixos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e a doença arterial (LEHNINGER et al., 1995).

Segundo RUBINSTEIN et al. (1991), o Programa Nacional de Educação do Colesterol de Israel concluiu que o nível de colesterol desejado é inferior a 200 mg/dL (5,18 mmol/L), e o limite é de 200 a 240 mg/dL. Níveis de colesterol acima de 240 mg/dL (6,2 mmol/L) precisam ser reduzidos, e os pacientes que possuem doenças arteriais coronarianas definidas ou que apresentam pelo menos dois fatores de risco necessitam reduzir seus níveis de colesterol para níveis abaixo de 200 mg/dL. Os fatores de risco mais importantes são: sexo masculino, fumar acima de 10 cigarros por dia, história familiar de doenças coronarianas prematuras, hipertensão, diabetes

melito, níveis das lipoproteínas de alta densidade (HDL) menores que 35 mg/dL, história de doenças cerebrovasculares ou doenças vasculares periféricas oclusivas e obesidade (peso 30% acima do normal).

Sem dúvida alguma, o colesterol é o lipídio natural que apresenta o maior número de publicações, em razão da forte correlação existente na espécie humana entre os altos níveis de colesterol no sangue e a incidência de doenças do sistema cardiovascular. Menos alardeado é o papel crítico do colesterol na estrutura de membranas e como precursor dos hormônios esteróides e dos ácidos biliares. O colesterol, no entanto, não é necessário na dieta dos mamíferos, pois o fígado pode sintetizá-lo a partir de precursores mais simples (LEHNINGER et al., 1995).

O colesterol é um esteróide de 27 carbonos (Figura 1), componente essencial da membrana das células, precursor imediato de hormônios esteroidais e substrato para formação de ácidos biliares, os quais são requeridos para absorção de gorduras e vitaminas lipossolúveis no intestino. O colesterol é também requerido para a formação das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) no fígado, utilizadas para transporte de gorduras do fígado para outros tecidos (ALBERTS, 1988).

Trata-se de um lipídio que está contido em alimentos de origem animal. No corpo, apresenta-se como colesterol livre ou esterificado com ácidos graxos. Plantas não contêm colesterol, mas podem sintetizar compostos similares, como o ergosterol. Uma pequena porção de colesterol do corpo é obtida dos alimentos, mas a molécula é completamente dispensável na dieta. O colesterol dietético é muito bem absorvido (60 a 80%), enquanto esteróis de plantas são pobremente absorvidos - menos de 5% (BRODY, 1994).

Aproximadamente 300 a 500 mg de colesterol entram no corpo humano diariamente pela dieta, e um adicional de 700 a 900 mg é sintetizado por vários órgãos do corpo, principalmente o fígado (ALBERTS, 1988). O colesterol sintetizado no organismo é secretado via bile, principalmente na forma de sais biliares. Os ésteres de colesterol da dieta são hidrolisados a colesterol livre e ácidos graxos pela colesterol esterase pancreática. Depois da entrada no enterócito, o colesterol livre é convertido novamente em ésteres de colesterol pela acil CoA: colesterol aciltransferase. Algumas evidências sugerem que a absorção do colesterol dietético é mediada pela proteína transportadora de membrana da borda em escova no intestino (BRODY, 1994).

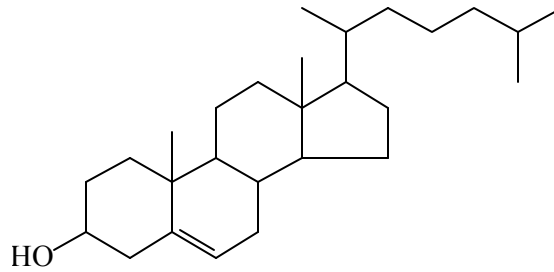


Figura 1 - Estrutura do colesterol.

2.1.1. Biossíntese de colesterol

O colesterol é um componente normal do sangue, sendo seus níveis influenciados pela composição da dieta, apesar de, a maior parte ser sintetizada no fígado. Outros tecidos também possuem esta capacidade de síntese, como células do intestino, glândula da supra-renal, pele, artéria aorta e órgãos reprodutores, entre outros (MONTEIRO e ROSADO, 1993).

Os níveis de colesterol plasmático não variam muito devido a mudanças na quantidade de colesterol da dieta. A ingestão dietética abaixo dos níveis típicos resulta numa mudança muito pequena do colesterol disponível, em razão da síntese endógena (9 a 12 mg/kg de peso corporal/dia). Portanto, um homem de 70 kg sintetiza cerca de 700 mg/dia. A redução da ingestão pode resultar em aumento da taxa biossintética do colesterol. Este aumento se deve ao aumento da atividade de uma das enzimas da via biossintética do colesterol, a hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMG CoA redutase). Entretanto, o aumento da ingestão de colesterol acima dos níveis normais pode não resultar em aumento correspondente na sua absorção (BRODY, 1994).

Embora a estrutura molecular deste composto de 27 átomos de carbono sugira uma biossíntese de grande complexidade, todos os seus átomos de carbono são fornecidos por um único precursor, o acetato. Nos vertebrados, a maior parte da síntese do colesterol ocorre no fígado. Uma pequena fração do colesterol sintetizado ali é incorporada nas membranas dos hepatócitos, porém a maior parte dele é exportada em uma das duas formas: ácidos biliares ou ésteres do colesterol. Os ácidos biliares, e seus sais, são derivados do colesterol relativamente hidrofílicos e auxiliam na digestão dos lipídios. Os ésteres do colesterol são formados no fígado, por meio da ação da enzima acil-CoA-colesterol aciltransferase (ACAT). Esta enzima catalisa a transferência de um ácido graxo ligado à coenzima A para o grupo hidroxila do

colesterol, convertendo o colesterol em uma substância ainda mais hidrofóbica. Os ésteres de colesterol são armazenados no fígado ou transportados para outros tecidos que empregam colesterol (LEHNINGER et al., 1995).

A síntese de colesterol ocorre via mevalonato e esqualeno, sendo o precursor a acetil-CoA, produzida durante o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (Figura 2). Existem cerca de 21 etapas na rota biossintética para a produção total do colesterol. A etapa inicial da síntese de colesterol inclui a formação de acetoacetil-CoA, hidroximetil glutarato e ácido mevalônico. A conversão de hidroximetil glutarato em ácido mevalônico se dá pela ação da enzima hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), sendo esta a reação limitante da via de formação do colesterol. Por meio de uma série de reações de condensação, o mevalonato é transformado em um hidrocarboneto de cadeia longa, o esqualeno, que produz o lanosterol, que é posteriormente transformado em colesterol (RUSSELL, 1992).

A elevada ingestão de alimentos calóricos, em alguns casos associados à obesidade, aumenta a atividade da HMG-CoA redutase, ocorrendo superprodução de colesterol.

Estudos em todo o mundo mostram estreita correlação estatística entre os níveis de colesterol no sangue e a morte por doenças coronarianas (MONTEIRO e ROSADO, 1993).

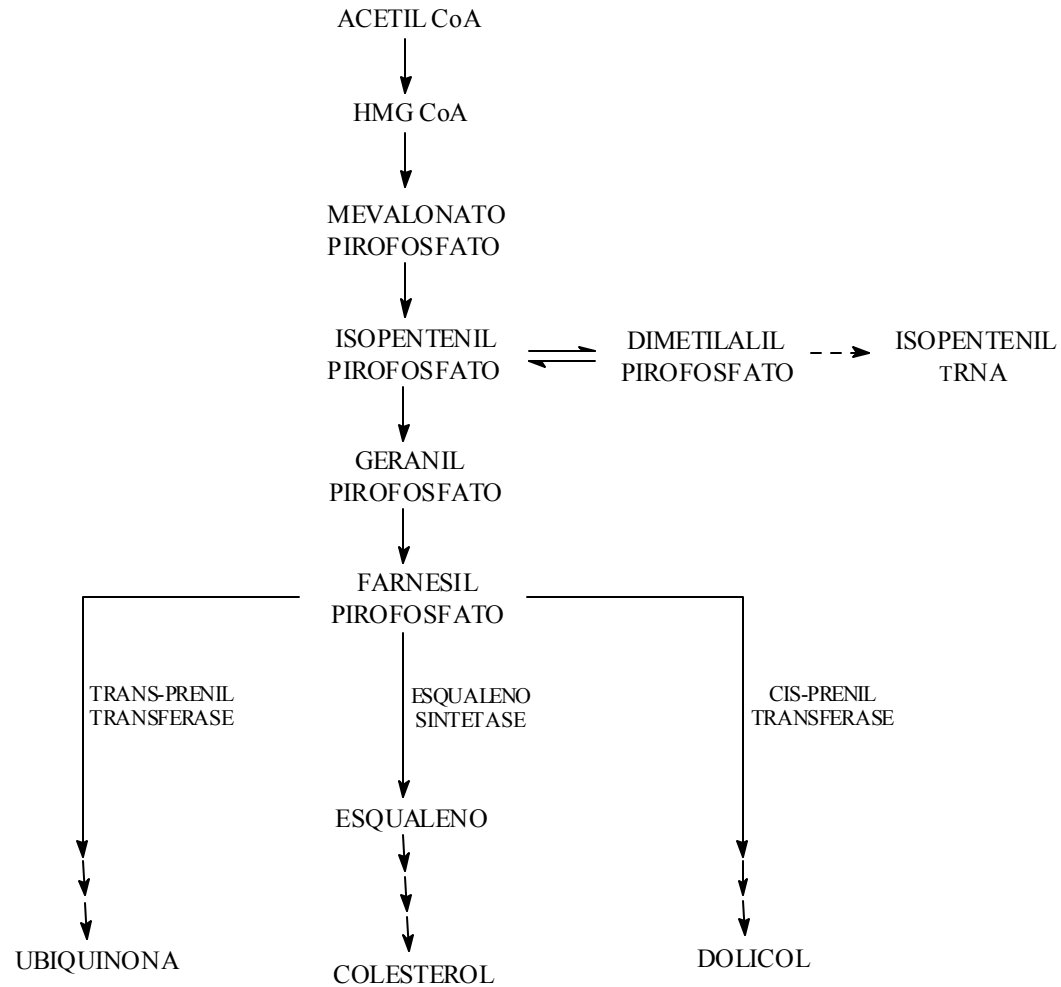


Figura 2 - Esquema da via biossintética do colesterol.

2.1.2. Transporte do colesterol e outros lipídios

O colesterol, os ésteres do colesterol e os lipídios em geral são essencialmente insolúveis em água. Estes lipídios precisam, entretanto, ser transportados de um tecido de origem, no fígado onde eles são sintetizados, ou no intestino onde são absorvidos, para os tecidos nos quais eles serão armazenados ou consumidos (MONTEIRO e ROSADO, 1993).

Os lipídios são transportados de um para outro tecido pelo plasma sanguíneo na forma de lipoproteínas plasmáticas, que são agregados moleculares de proteínas transportadoras específicas, chamadas de apolipoproteínas, com combinações variadas de fosfolipídios, colesterol, ésteres do colesterol e triacilgliceróis (MONTEIRO e ROSADO, 1993).

As apolipoproteínas são utilizadas para formar várias classes de lipoproteínas, que são agregados esféricos com lipídios hidrofóbicos no centro e cadeias laterais hidrofílicas dos aminoácidos das proteínas na superfície. Combinações variadas de lipídios e proteínas produzem diferentes lipoproteínas, as quais variam de densidade muito baixa (VLDL) até lipoproteínas de densidade alta (HDL). Estas lipoproteínas podem ser separadas entre si por ultracentrifugação e visualizadas com o emprego da microscopia eletrônica (LEHNINGER et al., 1995).

2.1.3. Lipoproteínas

Os lipídios da dieta incluem triglicerídios, fosfolipídios, ésteres de colesterol e vitaminas lipossolúveis. Esses nutrientes requerem um tipo especial de maquinário bioquímico para facilitar sua assimilação e distribuição pelo corpo. O aparato bioquímico usado inclui sais biliares, apolipoproteínas, albuminas séricas e proteínas ligadoras de vitaminas. Apolipoproteínas são primariamente sujeitas a essa seção. O prefixo apo é usado para se referir a proteínas e o termo lipoproteína refere-se ao complexo apolipoproteína e lipídios (BRODY, 1994).

Cada classe de lipoproteína tem uma função específica, determinada por seu lugar de síntese, composição lipídica e conteúdo de apolipoproteína. Pelo menos nove apolipoproteínas são encontradas entre as lipoproteínas do plasma humano; elas podem ser distinguidas por seu tamanho, suas reações com anticorpos específicos e sua distribuição característica nas classes de lipoproteínas. Estas proteínas-componentes agem como sinalizadoras, tanto dirigindo as lipoproteínas para tecidos específicos, como ativando enzimas que agem sobre elas (LEHNINGER et al., 1995).

Combinações de lipídios e proteínas produzem partículas com diferentes densidades (MONTEIRO e ROSADO, 1993).

As lipoproteínas são classificadas em quatro tipos:

1. Quilomícrons.
2. VLDL: "*Very Low Density Lipoprotein*" (lipoproteína de muito baixa densidade).

3. LDL: “*Low Density Lipoprotein*” (lipoproteína de baixa densidade).

4. HDL: “*High Density Lipoprotein*” (lipoproteína de alta densidade).

As lipoproteínas são partículas grandes, que apresentam massa molecular de 150 mil a 30 bilhões (BRODY, 1994).

As lipoproteínas são sintetizadas no intestino e no fígado. Aquelas que são sintetizadas no intestino contêm lipídios assimilados da dieta e são chamadas de quilomícrons. Estas lipoproteínas localizadas nos enterócitos entram na corrente sanguínea, via sistema linfático. Já as lipoproteínas agrupadas no fígado e que contêm lipídios originados da corrente sanguínea e da síntese *in vivo* no fígado são chamadas de muito baixa densidade (VLDL), sendo secretadas do fígado para a corrente sanguínea. O fígado também sintetiza e secreta outras lipoproteínas, chamadas de alta densidade (HDL). Os quilomícrons contêm pequena proporção de proteína, enquanto HDL tem relativamente alto conteúdo de proteínas (BRODY, 1994). (Quadro 1).

Ainda segundo BRODY (1994), as doenças coronarianas estão associadas aos elevados níveis séricos de colesterol-LDL e baixos níveis de colesterol-HDL.

Quadro 1 - Composição das partículas lipoprotéicas

(%)

Lipoproteína

Proteína

Lipídios

Lipoproteína		Proteína	Lipídios
Quilomícron	3×10^{10} Da	1	99
Lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL)	$5 \text{ a } 10 \times 10^6$ Da	10	90
Lipoproteína de baixa densidade (LDL)	$2,2 \text{ a } 3,5 \times 10^6$ Da	25	75
Lipoproteína de alta densidade (HDL)	$1,5 \text{ a } 4,0 \times 10^5$ Da	50	50

Fonte: BRODY (1994).

2.2. Inibidores da síntese de colesterol e monacolíinas

No desenvolvimento da aterosclerose e das doenças coronarianas, o alto nível de colesterol no sangue é considerado um importante fator de risco. Mais de 70% do colesterol total do sangue é derivado da síntese *in vivo* em humanos; assim, é esperado que estes níveis possam ser reduzidos como resultado da inibição da sua biossíntese. Em muitas situações esta inibição ocorre pela HMG-CoA redutase (EC 1.1.1.34), a enzima que catalisa a reação limitante da biossíntese do colesterol.

Foi demonstrado que alguns compostos de origem microbiana, incluindo ML-236B (compactina) MB-530B, CS-514, pravastatina, simvastatina e mevinoxilina, inibem competitivamente a HMG-CoA redutase (NAKAMURA e ABELES, 1985; ENDO e HASUMI, 1985; TSUJITA et al., 1986; ENDO et al., 1986a; KUMAGAI et al., 1990).

A mevinolina, também conhecida como Monacolina K, Lovastatina, MB-530B, MK-803, MDS-803, é uma potente droga usada em humanos para reduzir os níveis de colesterol sanguíneo (JUZLOVÁ et al., 1996; NAKAMURA e ABELES, 1985). A mevinolina é um produto da fermentação de fungos como *Aspergillus terreus*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium brevicompactum*, *Monascus ruber*, *Eupenicillium*, *Trichoderma* e *Pleurotus ostreatus* (JUZLOVÁ et al., 1996; GULLO et al., 1981; ALBERTS, 1990; YOSHIZAWA et al., 1994; ENDO et al., 1986a; ENDO et al., 1985a; NAKAMURA et al., 1990; KYSILKA e KREN, 1993). ENDO et al. (1986a) mencionaram ainda a capacidade de algumas outras estirpes de fungos produzirem a mevinolina, como *Phoma* sp. M4452, *Doratomyces nanus* IFO 9551 e *Gymnoascus umbrinus* IFO 8450.

Segundo JUZLOVÁ et al. (1996), o gênero *Monascus*, que inclui quatro espécies: *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber* e *M. floricornis*, pertence à classe Ascomycetes e à família Monascae. Os gêneros *M. vitreus* e *M. pubigerus* pertencem a *M. ruber* e a *M. pilosus*, respectivamente, segundo a nova taxonomia deste gênero (HAWKSWORTH e PITT, 1983). Estes fungos são fontes de vários metabólitos secundários de estrutura policetílica, e, das 124 estirpes de *Monascus* testadas, 17 demonstraram capacidade de produzir a mevinolina (JUZLOVÁ et al., 1996).

Segundo WANG et al. (1997), o arroz fermentado com *M. ruber* tem sido utilizado em animais e em humanos para reduzir efetivamente os níveis de lipídios séricos, pela atividade inibidora da HMG-CoA redutase e também por conter ácidos graxos insaturados, que podem ajudar na redução de lipídios séricos.

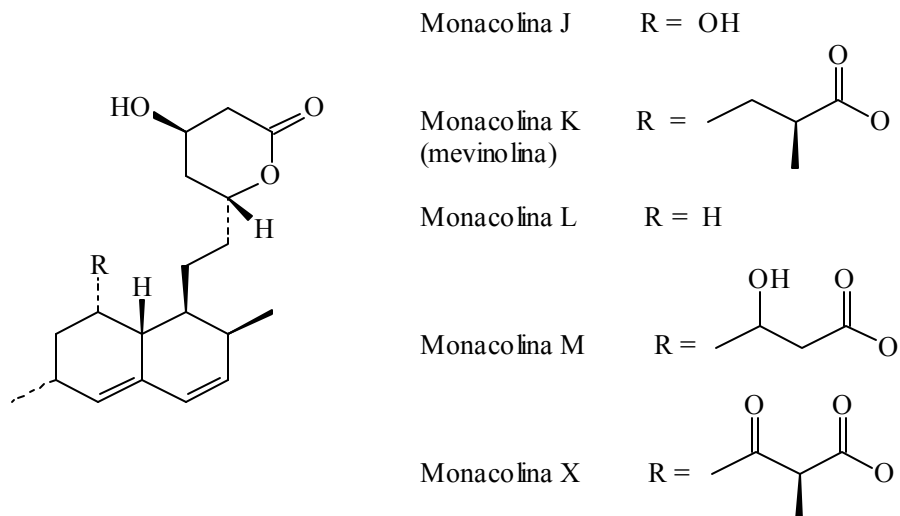
BROWN et al. (1978) demonstraram que a compactina, também conhecida como ML-236B, é um potente inibidor competitivo do HMG-CoA redutase. Em extratos de fibroblastos humanos, a afinidade da enzima pelo ML-236B é aproximadamente 10.000 vezes maior que a afinidade para o substrato natural HMG-CoA.

Além da conhecida propriedade de reduzir os níveis de lipídios séricos pela produção da mevinolina, os fungos do gênero *Monascus* também produzem grandes quantidades de ácidos graxos insaturados, podendo auxiliar na redução desses lipídios (WANG et al., 1997).

Fungos do gênero *Monascus* são tradicionalmente utilizados como corantes em alimentos e são produzidas em uma mistura de seis pigmentos: monascina e ankaflavina (pigmentos amarelos), rubropunctatina e monascorubrina (pigmentos laranjas) e rubropunctamina e monascorubramina (pigmentos vermelhos) (MARTÍNKOVÁ et al., 1995; FABRE et al., 1993). Recentemente, mais dois novos pigmentos amarelos foram descobertos, sendo denominados amarelo II e xantomonascina A (JUZLOVÁ et al., 1996; BLANC et al., 1994). Além disso, alguns autores citam a atividade antibiótica do extrato de *Monascus* e também efeitos hipotensivo, nefrotóxico, teratogênico e supressor do crescimento de tumores *in vivo* (KOHAMA et al., 1987; BLANC et al., 1995; MARTÍNKOVÁ et al., 1995; JUZLOVÁ et al., 1996; WONG e BAU, 1977; NOZAKI et al., 1991).

Tradicionalmente, o *Monascus* é utilizado no oriente para tratamento de doenças como indigestão, contusões musculares, disenteria e carbúnculo na medicina veterinária (JUZLOVÁ et al., 1996).

Além da mevinolina (monacolina K), existem outros compostos relacionados que são metabólitos secundários do fungo *Monascus ruber*, dentre eles as monacolininas J, L, M e X (Figura 3), e estes compostos também inibem especificamente a enzima HMG-CoA redutase (NAKAMURA et al., 1990; KOMAGATA et al., 1989; ENDO et al., 1985a; ENDO e HASUMI, 1985; ENDO et al., 1986a).



Fonte: ENDO e HASUMI (1985) e ENDO (1986b).

Figura 3 - Estruturas das monacolinas J, K, L, M e X.

Fungos do gênero *Aspergillus*, além de possuírem a propriedade de reduzir o colesterol, por sintetizarem a mevinolina, são conhecidos também por possuírem outras atividades importantes, como a produção de micotoxinas em produtos alimentícios como cereais (ALBERTS, 1990; ABARCA et al., 1997).

Culturas de *Aspergillus versicolor* possuem a capacidade de produzir micotoxinas conhecidas, como esterigmatoxina, presente em produtos agrícolas (ABRAMSON e CLEAR, 1996).

2.2.1. Experimentos *in vivo*

Recentes estudos com cães têm sugerido que a mevinolina pode regular a taxa catabólica de LDL pelo aumento do número de receptores hepáticos de LDL. Os coelhos parecem ter receptores similares que são suscetíveis à regulação pelo colesterol dietético e por seqüestrante do ácido biliar (KROON et al., 1982).

KROON et al. (1982), avaliando o efeito da mevinolina nos níveis séricos de colesterol em coelhos com hipercolesterolemia endógena, verificaram que os animais tratados com mevinolina por 39 dias, com doses administradas de 2 mg/kg/dia, tiveram seus níveis de colesterol sérico reduzidos em 37%,

em média, enquanto doses de 6 mg/kg/dia resultaram num decréscimo de 48%, quando comparadas ao grupo controle.

Estudos realizados por ZHU et al. (1992) avaliaram o efeito da mevinolina na supressão e regressão da aterosclerose em coelhos que consumiram dieta hiperlipídica e receberam doses diárias de 10 e 20 mg de mevinolina. Como resultado, foi constatado que a mevinolina é bem tolerada e eficaz no tratamento de hipercolesterolemia e suprime a aterosclerose aórtica e pulmonar.

ENDO (1979) isolou o composto ativo mevinolina e realizou dois experimentos distintos para avaliar o efeito hipocolesteremiante do composto. No primeiro, utilizou ratos com hipercolesterolemia induzida por Triton WR-1339, recebendo dose de 10 mg/kg de mevinolina, dissolvida em suspensão salina, via intraperitoneal. Após 14 horas, os animais foram sacrificados e o colesterol plasmático determinado. No segundo experimento, foi avaliado o mesmo efeito da mevinolina em dois coelhos, que receberam duas doses diárias de 1 mg/kg/dia durante cinco dias. Foi observado que, no primeiro experimento, houve redução dos níveis de colesterol de 23% e, no segundo, foram obtidos plasmas de três e cinco dias, onde se verificou redução de 12,3 e 21,6% em um animal e 10,1 e 26,2% no outro, respectivamente.

Em estudos realizados com ratos, foi avaliada a inibição competitiva da mevinolina e do ML-236B. Os animais foram separados em dois grupos, onde ambos foram tratados com Triton WR-1339, sendo administradas doses de mevinolina e ML-236B a 0, 6, 12 e 18 horas depois da injeção de Triton nas doses de 1, 5 e 25 mg/kg. A mevinolina produziu significativa redução do colesterol plasmático e hepático quando usadas as doses de 4 e 20 mg/kg, enquanto o ML-236B não demonstrou atividade em doses de 4 mg/kg, mas somente em 20 e 100 mg/kg, demonstrando a superioridade da mevinolina em relação ao ML-236B, considerado um potente inibidor da síntese de colesterol (ENDO, 1980).

KRITCHEVSKY et al. (1981) observaram a influência da mevinolina, em experimentos com coelhos com aterosclerose. Neste experimento, foram utilizados dois grupos de coelhos, ambos alimentados com dieta aterogênica, por oito semanas, e um dos grupos recebeu dose diária de 2,5 mg/kg de mevinolina. Ao final do experimento, foi observado que a mevinolina reduziu significativamente os níveis de colesterol e fosfolípidios séricos. O grupo controle de coelhos exibiu aterosclerose mais severa, e as lesões na artéria aorta do grupo controle foram significativamente mais severas que a do grupo com a droga-teste. Também foi observado que as lesões na aorta torácica do

grupo controle foi 38% mais severa que no grupo-teste. Assim, a mevinolina foi eficaz na inibição da aterosclerose induzida por colesterol em coelhos.

LI et al. (1998) analisaram três grupos experimentais de animais, sendo dois com coelhos e um com codorna, quanto à redução de colesterol. No primeiro grupo estudado, coelhos tiveram hipercolesterolemia induzida endogenamente, aumentando de 1,81 para 7,51 mmol/L em 60 dias. O primeiro grupo foi tratado com arroz fermentado por *Monascus purpureus*, com doses de 0,2, 0,4 e 0,8 g/kg/dia, durante 30 dias, havendo redução significativa do colesterol total (TC) nas doses de 0,4 e 0,8 g/kg/dia de arroz fermentado, sem redução significativa do HDL-colesterol (HDL-c). Com a dose de 0,2 g/kg/dia não houve redução significativa do colesterol total. No segundo experimento, também usando coelhos, mas com hipercolesterolemia induzida exogenamente por dieta aterogênica, foi observado o seguinte resultado: animais que receberam doses orais de *M. purpureus* de 0,8 g/kg/dia, durante 40 dias, não tiveram aumento da concentração do colesterol total (TC), do triacilglicerol (TG) e da relação TC:HDL-c. No terceiro grupo, usando codornas e hiperlipidemia induzida exogenamente com dieta aterogênica, o fermentado de *M. purpureus* foi dado em doses orais de 0,1, 0,2 e 0,4 g/kg/dia, durante duas semanas. O resultado mostrou mais uma vez grande capacidade de impedir o aumento das concentrações do TC e TG séricos, demonstrando que o fermentado de *M. purpureus* reduz o TC e TG em coelhos e codornas com hiperlipidemia e suprime a aterosclerose induzida por dieta aterogênica.

Em seres humanos, WANG et al. (1997) avaliaram o efeito de um preparado de arroz fermentado com fungo do gênero *Monascus* em pacientes com hiperlipidemia, num período de oito semanas. Como resultado, houve redução de 22,7% do colesterol total, 30,9% do LDL, 34,0% de triacilglicerol e aumento de 19,9% do HDL, e 93,2% dos pacientes obtiveram benefícios com arroz fermentado.

Analisando o efeito da mevinolina em humanos, RUBINSTEIN et al. (1991) utilizaram um grupo de 28 pacientes com níveis de colesterol plasmático de 200 a 240 mg/dL. A mevinolina geralmente é utilizada em doses que variam de 20 a 80 mg/dia, mas o estudo foi conduzido com doses de somente 10 mg/dia. O resultado obtido pelo experimento foi a redução do colesterol plasmático em 19% e também a redução dos níveis de LDL-colesterol em 24% após 20 semanas de tratamento. Todos os 28 pacientes tiveram seus teores de colesterol diminuídos para valores abaixo de 200 mg/dL, e somente um paciente teve os níveis de LDL-colesterol maiores que 130 mg/dL. Concluiu-se que valores aceitáveis de colesterol são conseguidos com 10 mg de mevinolina por dia.

2.3. Monacolínas

2.3.1. Estrutura e propriedades

A mevinolína (monacolína K) (Figura 3) possui fórmula molecular $C_{24}H_{36}O_5$ e se apresenta na forma de um pó branco, solúvel em metanol, etanol, acetona, clorofórmio e benzeno e insolúvel em n-hexano e éter de petróleo.

A elucidação completa da estrutura das monacolínas K, J, M e X (Figura 3) foi conseguida pela aplicação de técnicas de espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear (RMN) de carbono e hidrogênio, pela equipe de AKIRA ENDO (ENDO, 1979; ENDO e HASUMI, 1985; ENDO et al., 1985a).

2.3.2. Biossíntese de monacolínas

A biossíntese da mevinolína tem sido estudada por vários pesquisadores, indicando que a parte principal de seu esqueleto é um policetídeo, originado do acetato (KOMAGATA et al., 1989).

GULLO et al. (1981) afirmaram que, durante a fermentação do fungo *Aspergillus terreus*, mevinolína e diidromevinolína são produzidas em duas formas distintas: lactona e forma ácida livre (GULLO et al., 1981; ALBERTS, 1990).

Segundo FRIEDRICH et al. (1995), a mevinolína foi convertida em metil éster, quando extraída com metanol e estocada por três dias sob refrigeração. Ainda segundo estes autores, a mevinolína pode ser convertida em sua respectiva forma ácida, primeiramente formando sais de sódio e, conseqüentemente, o ácido, de acordo com BROWN et al. (1978).

A mevinolína, o primeiro desta classe de agentes que possui o uso clínico aprovado, foi quimicamente modificada para formar a simvastatina. Mevinolína e simvastatina são lactonas consideradas pró-drogas inativas que precisam ser enzimática ou quimicamente convertidas em suas respectivas formas abertas (diidroxiácido) para apresentar atividade inibitória da HMG-CoA

redutase (Figura 4) (ALBERTS, 1990; KYSILKA e KREN, 1993). Essa conversão enzimática ocorre eficientemente no fígado, e os estudos realizados em animais concluem que as lactonas são mais bem toleradas que os hidroxiácidos ativos (ALBERTS, 1990).

Ainda segundo ALBERTS (1990), estas duas pró-drogas lactônicas, que são muito eficazes no controle da hipercolesterolemia, possuem bom perfil de tolerância associado a uma boa complacência dos pacientes.

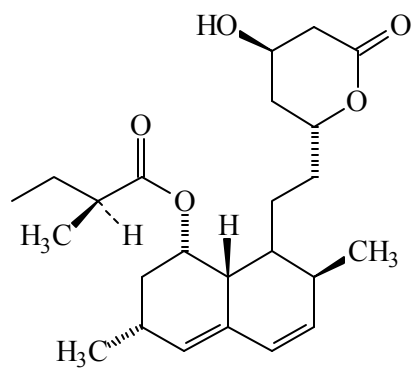
2.3.3. Modelo de interação enzimática

De acordo com NAKAMURA e ABELES (1985), a HMG-CoA redutase catalisa a redução do HMG-CoA para ácido mevalônico, e o co-fator NADPH é requerido para exercer essa atividade.

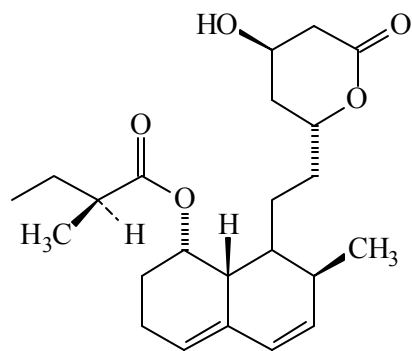
A HMG-CoA redutase é uma enzima microsomal que catalisa a etapa dependente do NADPH (forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) para redução do HMG-CoA para ácido mevalônico (ALBERTS, 1990). O mevalonato é um intermediário para a biossíntese do colesterol, sendo produzido a partir da acetil-CoA através de três enzimas chamadas de acetoacetil-CoA tiosase, HMG-CoA sintase e HMG-CoA redutase (KUMAGAI et al., 1990).

O mevalonato é um precursor de inúmeros metabólitos essenciais, incluindo ubiquinona (coenzima Q), dolicol e colesterol. Além disso, intermediários da biossíntese estão envolvidos na isopentilação do ácido ribonucléico transportador (t RNA), na farnesilação do grupo prostético heme da citocromo oxidase e na, recentemente descoberta, farnesilação de inúmeras proteínas, incluindo as oncogênicas. O importante bloqueio de parte da síntese do farnesil com inibidores da HMG-CoA redutase previne a expressão de proteínas oncogênicas (ALBERTS, 1990).

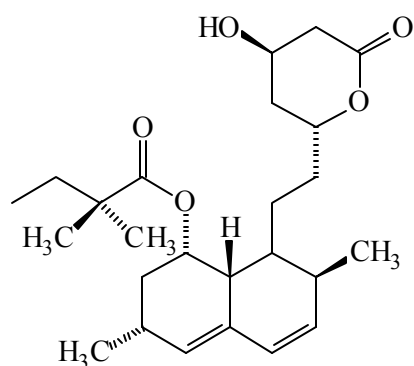
A inibição da HMG-CoA redutase pela mevinolina e compactina é do tipo competitiva em relação a HMG-CoA. A porção inibidora ativa desses compostos são os hidroxiácidos correspondentes ao substrato, no caso o HMG-CoA, onde o anel lactônico é hidrolisado (NAKAMURA e ABELES, 1985).



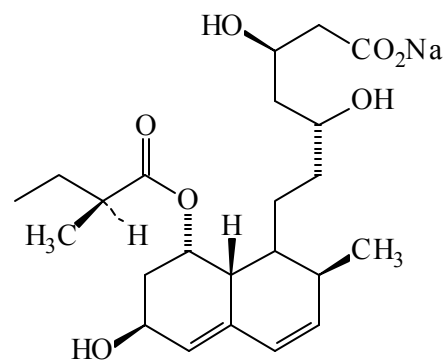
Lovastatina



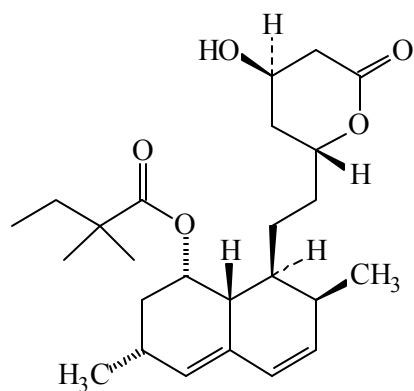
Mevastatina



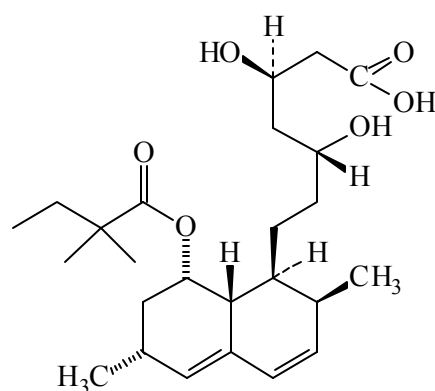
Simvastatina



Pravastatina



Pró-droga



Inibidor ativo

Fonte: ALBERTS (1988).

Figura 4 - Estruturas dos inibidores de HMG-CoA redutase, da "pró-droga" e da forma inibidora ativa da simvastatina.

ENDO (1980) verificou que a inibição da HMG-CoA redutase pela mevinolina era competitiva em relação a HMG-CoA e não-competitiva em relação a NADPH.

O hidroxiácido da cadeia lateral da compactina e o da mevinolina se assemelham ao ácido mevalônico, e, provavelmente, parte dos hidroxiácidos desses compostos ocupa o sítio de ligação do HMG da enzima. Com base nos fatos citados, os autores concluíram que HMG-CoA ou CoASH impede a ligação da monacolina e da compactina com a HMG-CoA redutase. O NADPH não possui esse efeito, mostrando que a monacolina e a compactina interagem com o domínio HMG e CoASH do sítio ativo. Os autores sugerem ainda que a alta afinidade da mevinolina e da compactina pela HMG-CoA redutase se deve a interações simultâneas de duas áreas de ligações separadas: o domínio HMG e a região hidrofóbica, demonstrando assim que compostos com interações simultâneas com dois sítios de ligações da enzima podem demonstrar altíssima constante de ligação (NAKAMURA e ABELES, 1985).

Resultados indicam que a mevinolina é um inibidor específico da HMG-CoA redutase, e este é quatro a cinco vezes mais ativo que o ML-236B, em ambos os sistemas: *in vitro* e *in vivo* (ENDO, 1980).

2.3.4. Produção das monacolinas

As monacolinas (K, L, M, J e X) são produzidas por via fermentativa, utilizando-se fungos dos gêneros *Monascus* e *Aspergillus*.

A produção da mevinolina, comercialmente, é feita por fermentação em meio líquido, utilizando-se cepas da espécie *Monascus ruber*. As condições gerais de fermentação são: temperatura entre 25 e 30 °C, pH entre 6,0 e 7,0, aerobiose, meio enriquecido com minerais, fonte de nitrogênio e carbono variadas e tempo de fermentação próximo de 10 dias. A produção da mevinolina no meio varia entre 10 e 20 µg/mL, além da produção das monacolinas L, J e X (ENDO e HASUMI, 1985; ENDO et al., 1985a).

A produção da mevinolina por *Aspergillus terreus* é relatada por diversos autores (KYSILKA e KREN, 1993; GULLO et al., 1981; ALBERTS, 1988, 1990; JUZLOVÁ et al., 1996). As condições de cultura são semelhantes às aquelas

utilizadas para *Monascus ruber*, porém, o tempo de fermentação em geral é bem menor, em média de cinco a seis dias.

2.3.5. Identificação da mevinolina

Diversas técnicas têm sido utilizadas para identificar e quantificar a mevinolina nos meios fermentados por fungos.

ENDO (1979), identificando a mevinolina após sua extração em meio líquido, pôde verificar que ela apresentava temperatura de fusão igual a 157 - 159 °C e fator de retenção (R_f) em cromatografia em camada delgada (CCD) (Merck, Kieselgel 60F₂₅₄) de 0,47, com diclorometano-acetona (4:1) como fase móvel.

2.3.6. Dosagem de mevinolina por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

A produção de mevinolina por fermentação resulta em concentrações muito baixas no final do processo, em torno de 20 µg/mL. Assim, a purificação exige várias etapas de extração com solventes orgânicos, concentração e separação por coluna cromatográfica de sílica-gel (ENDO, 1979; ENDO e HASUMI, 1985). A dosagem, entretanto, pode ser relativamente facilitada utilizando-se da propriedade de absorção de radiação ultravioleta que as monacolinas apresentam.

Assim, a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrofotometria no ultravioleta tem sido relatada por diferentes autores.

FRIEDRICH et al. (1995) utilizaram coluna Spherisorb ODS 2, fase móvel: tampão fosfato de potássio (pH 7,7)-acetonitrila (35:65), com fluxo de 0,7 mL/minuto e detector UV em 237 nm. Após extração do meio com metanol, os autores obtiveram no cromatograma os picos referentes à mevinolina, o padrão na forma ácida e o pico da forma metil éster.

KYSILKA e KREN (1993) utilizaram meio fermentado por *Aspergillus terreus* e padrão de mevinolina. A forma ácida do padrão foi obtida pela hidrólise alcalina da mevinolina, conforme ENDO et al. (1985b). Os compostos foram eluídos isocraticamente com metanol e 18 mM-ácido ortofosfórico

(77,5:22,5), com fluxo de 0,5 mL/minuto e detector UV em 238 nm. O cromatograma obtido da amostra fermentada apresentou três picos, sendo o primeiro desconhecido, o segundo correspondente ao ácido mevinolínico e o terceiro o da mevinolina.

GULLO et al. (1981) utilizaram, em suas análises por CLAE, radiação ultravioleta (UV) com detecção em 237 nm, temperatura em 60 °C e fluxo de 2,0 mL/minuto e sistema de solventes: acetonitrila-metanol-água (69:2:29), onde os picos correspondentes à mevinolina e diidromevinolina foram obtidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

Neste trabalho foram utilizadas duas cepas de fungos filamentosos:

- *Monascus ruber* CCT 1236 - adquirida da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, Campinas, SP.
- *Aspergillus versicolor* - isolada em laboratório a partir de amostras de tofu (produto fermentado de soja) e identificada pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello , Campinas, SP (Figura 5).



Figura 5 - Fotografia de colônia do *Aspergillus versicolor* em meio BDA (batata-dextrose-ágar).

3.2. Produção do arroz fermentado

Inicialmente, foram pesados 100 g de arroz - marca Germann, parboilizado, longo fino, tipo 1 - e colocados em erlenmeyers de 250 mL. Adicionou-se a cada erlenmeyer 0,05% de MgSO₄, 0,05% de KH₂PO₄ e 0,5% NH₄Cl, dissolvidos em 60 mL de água destilada, como meio de enriquecimento, conforme ENDO (1979) e ENDO et al. (1986a), obtendo-se assim um teor de umidade relativa de, aproximadamente, 45%. Os erlenmeyers foram vedados com rolhas de algodão, sendo estas envolvidas com papel-alumínio, e deixados em repouso por 15 horas, para que a água fosse absorvida, a fim de se obter umidade mais homogênea do grão. Após a absorção da água, os erlenmeyers foram levados à autoclave e esterilizados a 120 °C, por 20 minutos. Após a esterilização, eles foram resfriados à temperatura ambiente, por três horas.

Depois de resfriados, os meios foram inoculados, com as cepas mantidas em tubos de ensaio com meio BDA. Para o processo de inoculação, foi adicionada água destilada e esterilizada nos tubos contendo a cepa (*M. ruber* e *Aspergillus versicolor*), e estes foram agitados manualmente. A inoculação se fez utilizando uma pipeta esterilizada, adicionando-se 0,5 mL da suspensão de esporos em cada erlenmeyer. Após a inoculação, os frascos foram agitados manualmente e colocados em estufa incubadora, a 28 °C por 13 e 9 dias, respectivamente para *M. ruber* e *A. versicolor* (Figura 6).

O arroz fermentado com *M. ruber* e *A. versicolor* foi usado como parte da dieta experimental de animais no ensaio biológico. Após a fermentação, o arroz foi espalhado em bandeja de polietileno e colocado em estufa com circulação de ar à temperatura de 65 °C, durante 24 horas. Após resfriado, o arroz foi triturado em multiprocessador, e a farinha obtida foi utilizada como parte da dieta experimental dos animais.

Extratos do arroz fermentado com *Monascus ruber* e *Aspergillus versicolor* também foram utilizados misturados à dieta experimental, nesse mesmo ensaio biológico.



Figura 6 - Arroz fermentado pelo *Monascus ruber*.

3.3. Obtenção do extrato metanólico do arroz fermentado

Para a obtenção do extrato metanólico do arroz fermentado, foram utilizados 100 mL de metanol para 100 g de arroz fermentado, permanecendo este material sob agitação durante uma hora em erlenmeyer tampado, em temperatura ambiente. O processo foi repetido mais uma vez, sendo o material extraído reunido e filtrado com auxílio de vácuo. Após a filtração, o solvente foi retirado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, levando à produção de 3,68 g e 2,24 g de extrato metanólico obtido do arroz fermentado por *A. versicolor* e *M. ruber*, respectivamente.

O aspecto físico desses extratos consistia em substâncias pastosas de coloração escura, marrom para *M. ruber* e cinza para *A. versicolor*.

3.4. Ensaio biológico de curta duração, com aplicação de Triton

Este primeiro ensaio biológico teve como objetivo testar o efeito de dois extratos obtidos de alimento fermentado por fungos (*M. ruber* e *A. versicolor*) e do próprio alimento fermentado incluído na dieta dos animais.

Foram utilizados 48 ratos machos, da raça Wistar, com peso médio de 250 g, alimentados com ração comercial.

Durante o experimento foram utilizados seis grupos de oito animais, três grupos-teste e três grupos-controle. Dos três grupos-teste, dois receberam doses de 2 mg dos extratos produzidos a partir dos fungos *Monascus ruber* e *Aspergillus versicolor*, misturados a 5 g da dieta mais Triton. O terceiro grupo-teste recebeu o Triton mais o arroz fermentado pelo fungo *M. ruber*, substituindo o amido e o amido dextrinizado da mesma dieta, perfazendo 53% do total da dieta-controle. Os outros três grupos foram constituídos de um controle sem Triton, o outro com dieta-controle, mas com Triton, e o último recebendo dieta-controle com arroz puro, substituindo 53% do amido desta, mais Triton (Quadro 2). Todos os animais receberam água e ração à vontade. Durante todo o experimento, permaneceram em ambiente com temperatura controlada em torno de 22 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas.

A indução da hiperlipidemia foi feita por meio de aplicação do detergente Triton WR-1339, via intraperitoneal, na dose de 300 mg por quilo de peso corporal, diluído em solução de NaCl 0,9%.

Quadro 2 - Relação dos grupos de animais com seus respectivos tratamentos

Grupos	Tratamentos
D1	Dieta-controle
D2	Dieta + Triton
D3	Dieta + arroz puro + Triton
D4	Dieta + 2 mg de extrato de <i>A. versicolor</i> + Triton
D5	Dieta + 2 mg de extrato de <i>M. ruber</i> + Triton
D6	Dieta + arroz fermentado por <i>M. ruber</i> + Triton

Os animais ficaram três dias em adaptação, recebendo dieta comercial e água à vontade, e depois foram deixados em jejum de 12 horas. Após o jejum, os animais receberam o Triton, e, logo em seguida, foram dadas as dietas-teste. Após 72 horas, os animais foram sacrificados com dióxido de carbono, por via inalatória, sendo o sangue coletado através de punção cardíaca. As amostras de sangue foram centrifugadas a 7.100 g durante 15 minutos, para obtenção do soro, o qual foi congelado até o momento da análise de colesterol total, HDL e triacilglicerol. As amostras do soro foram analisadas no Laboratório Santa Rita, Viçosa, MG, utilizando aparelho automático multiparamétrico seletivo de química clínica, CLINLINE 150, bioMÉRIEUX e kits de dosagem sérica da marca BIOLAB.

3.5. Ensaio biológico utilizando colesterol e ácido cólico na dieta

Este experimento teve como objetivo verificar, por um período mais longo, a atividade redutora de lipídios de uma dieta contendo arroz fermentado por *M. ruber*. Foi utilizada uma dieta-padrão AIN-93G, segundo REEVES et al. (1993) (Quadro 3), e a ela adicionado 0,1% de ácido cólico e 1,0% de colesterol cristalino. Neste ensaio biológico foram utilizados quatro grupos-teste, com oito animais cada, num total de 32 animais. Foram utilizados ratos machos da raça Wistar, pesando em média 250 g. O arroz utilizado em parte da dieta experimental foi empregado como substituto do amido e do amido dextrinizado, perfazendo 53% do total da dieta. Os animais receberam dieta e água à vontade durante o experimento, ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada em torno de 22 °C. A relação dos grupos de animais e as suas dietas-teste são mostradas no Quadro 4.

Os animais receberam as dietas e água destilada à vontade ao longo do experimento, o qual teve duração de 28 dias.

Semanalmente, todos os animais eram pesados, sendo feito o controle do consumo alimentar, assim como do coeficiente de eficiência alimentar (CEA), o qual relaciona o ganho de peso em relação ao consumo.

Quadro 3 - Composição da dieta AIN-93 G

Ingredientes	g/kg de dieta
Amido	398
Caseína ($\geq 85\%$ de proteína)	200
Amido dextrinizado	132
Sacarose	100
Óleo de soja	70
Fibra	50
Mistura de vitaminas	35
Mistura de minerais	10
L- cistina	3
Bitartarato de colina	2,5

Fonte: REEVES et al. (1993).

Quadro 4 - Relação dos grupos de animais e suas respectivas dietas -teste

Grupos	Tratamentos
T1	Dieta-controle
T2	Dieta + colesterol + ácido cólico
T3	Dieta + arroz puro + colesterol + ácido cólico
T4	Dieta + arroz fermentado com fungo <i>M. ruber</i> +colesterol + ácido cólico

Após os 28 dias, os animais foram deixados em jejum por 24 horas e sacrificados com dióxido de carbono, por via inalatória, sendo o sangue coletado através de punção cardíaca. As amostras de sangue foram centrifugadas a 7.100 g por 15 minutos, para obtenção do soro, o qual foi congelado até o momento da análise de colesterol total, HDL e triacilgliceróis. Na determinação dos lipídios séricos foram utilizados métodos enzimáticos e

colorimétricos, usando *kits* da marca BIOLAB obtidos comercialmente para determinação de triacilgliceróis, colesterol total e colesterol-HDL.

3.6. Análise estatística

O ensaio biológico de curta duração, com hiperlipidemia induzida por Triton, foi instalado segundo o delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos (D1 = dieta, D2 = dieta + Triton, D3 = dieta + Triton + arroz puro, D4 = dieta + Triton + 2 mg de extrato de *A. Versicolor*, D5 = dieta + Triton + 2 mg de extrato de *M. ruber* e D6 = dieta + Triton + arroz fermentado por *M. ruber*), em oito repetições. Cada repetição foi constituída por um animal.

Foram mensurados o colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis, cujos dados foram submetidos a teste de normalidade e de homogeneidade de variâncias.

Procedeu-se à análise de variância e ao teste F ($P < 0,05$ e $P < 0,01$).

Os tratamentos-controle (D1 e D2) foram comparados entre si por meio do teste F. A comparação dos demais tratamentos (D3, D4, D5 e D6) entre si foi feita por meio do teste de Duncan a 5% de probabilidade, e cada um desses tratamento foi comparado com os controles por meio do teste de Dunnett ($P < 0,05$).

O ensaio biológico de longa duração, com hiperlipidemia induzida por colesterol mais ácido cólico (col. + ác. cólico), foi instalado segundo o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (T1 = dieta, T2 = dieta + col. + ác. cólico, T3 = dieta + col. + ác. cólico + arroz puro e T4 = dieta + col. + ác. cólico + arroz fermentado por *M. ruber*), em oito repetições. Cada repetição foi constituída por um animal.

Foram mensurados o colesterol total, o colesterol-HDL, o triacilglicerol, o ganho de peso, o consumo e o coeficiente de eficiência alimentar, cujos dados foram submetidos a teste de normalidade e de homogeneidade de variâncias. À exceção do consumo, os dados foram transformados em log (x) e posteriormente submetidos à análise de variância e ao teste F ($P < 0,05$ e $P < 0,01$).

Os tratamentos-controle (T1 e T2) foram comparados entre si por meio do teste F. Os tratamentos T3 e T4 também foram comparados entre si pelo teste F e com cada um dos controles, por meio do teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

3.7. Identificação da mevinolina por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

As análises para identificação da mevinolina por CLAE foram feitas em temperatura ambiente, utilizando aparelho de marca SHIMADZU LC 10-AV, coluna SUPELCO C-18/250 mm x 0,5 mm, detector UV, $\lambda = 237$ nm, com fluxo de 0,7 mL/min e fase móvel: tampão fosfato de potássio pH 7,7 - acetonitrila (35:65), segundo FRIEDRICH et al. (1995).

3.7.1. Análise do padrão de mevinolina

O padrão de mevinolina foi obtido em farmácia de manipulação na forma cristalizada (pó branco), sendo solubilizado em metanol. Foi utilizada a concentração de 1.000 ppm para estabelecer as condições cromatográficas e o tempo de retenção da mevinolina por CLAE.

Logo após os testes, o padrão foi estocado sob refrigeração, por 60 horas, e novamente analisado por CLAE, para observação da sua estabilidade química.

3.7.2. Conversão do padrão de mevinolina em forma ácida (ácido mevinolínico)

Na tentativa de se obter a forma ácida da mevinolina (ácido mevinolínico), foi utilizada a seguinte metodologia: preparou-se uma solução de 1.000 ppm de mevinolina pura em 1 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹. A solução foi aquecida a 50 °C em banho-maria e agitada em ultra-som por uma hora. Esta solução foi, então, ajustada para pH 7,7, com HCl 6 mol L⁻¹, e analisada por CLAE (FRIEDRICH et al., 1995).

3.7.3. Conversão da forma ácida em lactona

a) Procedimento 1

Inicialmente foram pesados 50 mg de mevinolina e solubilizou-se em 15 mL de tetraidrofurano (THF) e 1 mL de NaOH 0,2 mol L⁻¹. A solução foi aquecida em banho-maria, a 50 °C, sendo mantida sob agitação em agitador

magnético por uma hora e meia. A solução foi então transferida para um erlenmeyer de 125 mL e adicionaram-se mais 15 mL de THF. Após esta etapa, a solução foi titulada com HCl 6 mol L⁻¹ até atingir pH 3. Em seguida, adicionou-se MgSO₄ e filtrou-se o material. O solvente foi então evaporado, sob pressão reduzida.

Adicionou-se éter dietílico para solubilização do composto e, em seguida, hexano, para recristalização, e deixou-se evaporar. Após a evaporação do solvente, adicionou-se somente hexano, para a lavagem dos cristais, sendo a mistura agitada e o solvente retirado com auxílio de uma pipeta. O sólido foi seco com N₂ e analisado por espectroscopia no infravermelho em espectrômetro PERKIM ELMER SPECTRUM 1000 (Departamento de Química - UFV), na faixa de 500 a 4.000 cm⁻¹, sendo os espectros obtidos em pastilhas de KBr.

b) Procedimento 2

Foram pesados 50 mg de mevinolina e solubilizou-se em 5 mL de THF mais 0,5 mL de NaOH 0,2 mol L⁻¹, sendo a solução agitada e aquecida a 40 °C, por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, foram adicionadas mais 6 gotas de NaOH 0,2 mol L⁻¹ e novamente agitou-se e aqueceu-se a solução. Adicionou-se MgSO₄, para retirada da água do meio, e filtrou-se o material. Ao material recolhido em balão borbulhou-se HCl gasoso diretamente na solução, durante seis minutos, sendo uma pequena amostra retirada e filtrada para análise por CCD (éter etílico puro).

3.8. Estudo químico do arroz fermentado por *Aspergillus versicolor*

3.8.1. Extração do arroz fermentado por *Aspergillus versicolor*

A extração foi realizada segundo ENDO et al. (1985a), após a incubação por nove dias, adicionando-se acetato de etila na proporção de um litro de solvente por quilo de arroz, sendo o pH do meio ajustado para aproximadamente 3,0 com HCl

concentrado. A solução foi agitada por 30 minutos em temperatura ambiente, sendo então transferida para um funil de separação. A fase orgânica (FO) foi secada com Na_2SO_4 e filtrada em papel-filtro. Em seguida, o solvente foi removido por destilação em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, à temperatura de aproximadamente 50 °C até a secura. O sólido obtido foi então dissolvido em 100 mL de benzeno.

À fase orgânica foram adicionados 100 mL de solução de Na_2CO_3 5%; agitou-se vigorosamente, sendo a fase aquosa recolhida. A fase orgânica foi misturada com 50 mL de NaOH 0,2 mol L^{-1} , agitada e deixada em repouso à temperatura ambiente por duas horas, sendo a fase aquosa recolhida. Este procedimento foi repetido duas vezes.

As fases aquosas foram reunidas e o pH ajustado para aproximadamente 3,0, usando HCl concentrado. A solução foi então extraída com 50 mL de acetato de etila e a fase orgânica recolhida. O processo foi repetido várias vezes, para total extração. Finalmente, as fases orgânicas foram reunidas e o solvente foi retirado por destilação em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, até secura. O sólido obtido foi solubilizado em 100 mL de diclorometano e acetato de etila (8:2), sendo os sólidos insolúveis removidos por filtração e o papel-filtro lavado com esta mesma solução.

Após essa etapa, o filtrado foi levado ao evaporador rotatório sob pressão reduzida para remoção do solvente, obtendo-se 13,481 g de extrato, que posteriormente foi fracionado em coluna cromatográfica de sílica-gel.

3.8.2. Fracionamento e análise do extrato obtido do arroz fermentado por *Aspergillus versicolor*

Inicialmente escolheu-se o sistema de solventes, utilizando-se CCD; em seguida, o extrato bruto foi submetido ao fracionamento em coluna de sílica-gel (funil de vidro sinterizado com 3 cm de diâmetro e 80 cm de altura). As frações foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com o seu comportamento cromatográfico. O fluxograma (Figura 7) mostra todos os fracionamentos realizados a partir do extrato de *A. versicolor*.

Foram obtidas inicialmente sete frações com os seguintes solventes e misturas de solventes: hexano-éter dietílico (3:1) (frações M1(1), M1(2) e M1(3)); hexano-éter dietílico (2:1) (frações M1(4) e M1(5)); hexano-éter dietílico (1:1 a 1:3) (fração M1(6)); e hexano-éter dietílico (1:6) e éter dietílico puro (fração M1(7)). As frações obtidas foram analisadas por espectroscopia no infravermelho em espectrômetro PERKIM ELMER SPECTRUM 1000, na faixa

de 500 a 4.000 cm^{-1} . As amostras sólidas foram analisadas em pastilhas de KBr a 1%, e as líquidas, em filmes sobre placas de NaCl.

A segunda coluna (M2) foi realizada a partir da fração M1(4), sendo utilizadas as seguintes misturas de solventes: hexano-éter dietílico (2:1) (fração M2(1)) e hexano-éter dietílico (1:1) (frações M2(2) e M2(3)).

A terceira coluna (M3) foi elaborada a partir da fração M2(1), utilizando-se o sistema de solvente hexano-éter dietílico (2:1) (frações M3(1) e M3(2)).

Na quarta coluna (M4), foi utilizada a mistura éter dietílico-hexano (3:1) para separação das cinco frações.

A quinta coluna (M5) foi realizada a partir da fração M4(1), utilizando-se os seguintes sistemas de solventes: hexano-éter dietílico (2:1) (frações M5(1) e M5(2)) e hexano-éter dietílico (1:1 e 1:3) (fração M5(3)). Na fração M5(3), realizou-se extração líquido-líquido antes de ela ser separada na coluna cromatográfica de sílica-gel.

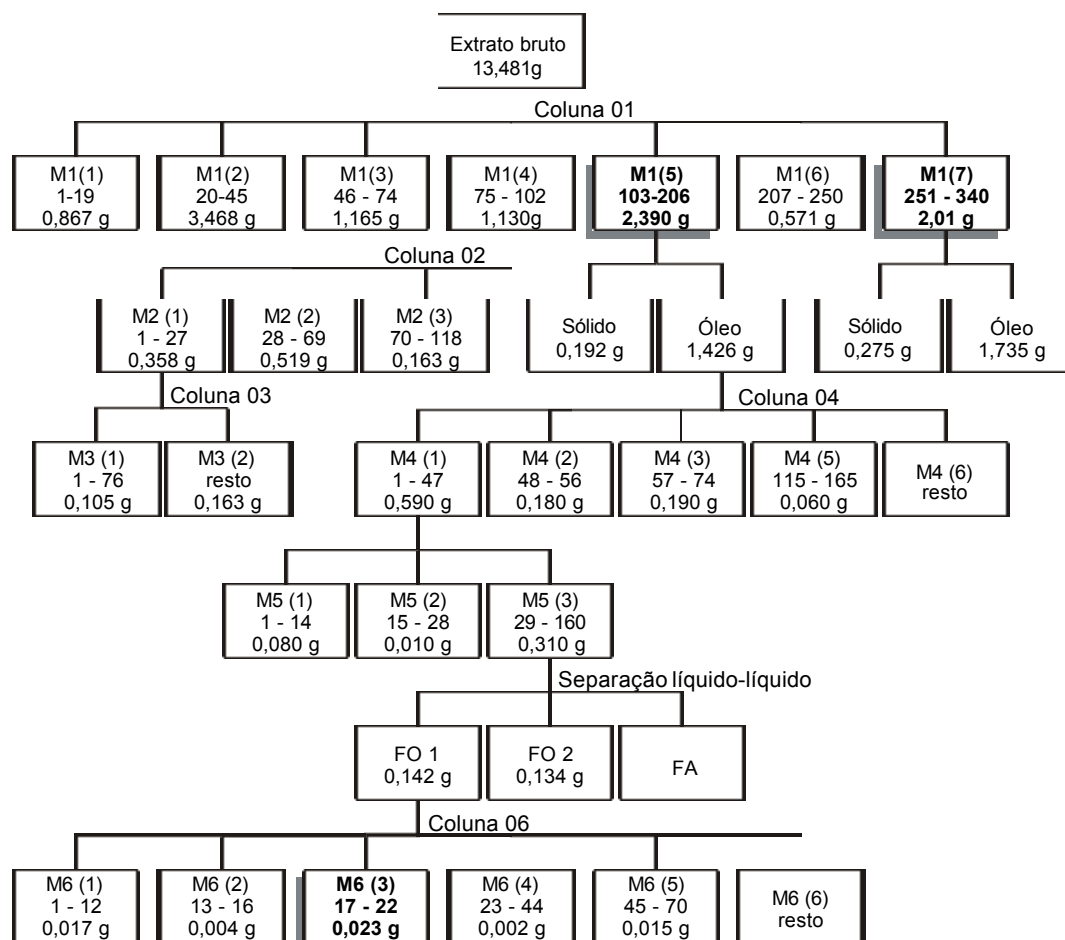


Figura 7 - Fluxograma das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato do arroz fermentado pelo fungo *Aspergillus versicolor*.

3.8.2.1. Purificação da fração M5(3)

Após uma análise prévia para a escolha do melhor solvente, a amostra foi solubilizada em 10 mL de éter dietílico e adicionaram-se 10 mL de NaOH 2 mol L⁻¹. A solução foi agitada vigorosamente em funil de separação e deixada em repouso, para separação das fases, sendo coletada a fase aquosa (FA). Foram adicionados à fase orgânica (FO) mais 10 mL de éter dietílico e 7 mL de NaOH 2 mol L⁻¹, sendo feita nova agitação e depois separadas as FA e FO1.

Em um erlenmeyer, as fases aquosas foram reunidas e a elas foram adicionados 30 mL de éter dietílico para solubilizar a camada escura que

permanecia na amostra. Ainda na fase aquosa, adicionaram-se 5 mL de HCl 3 mol L⁻¹, em seguida mais 1,8 mL de HCl concentrado e, finalmente, mais 16 gotas do mesmo HCl, até pH próximo a 1. O material foi novamente levado para um funil de separação, foram adicionados 10 mL de éter dietílico e agitou-se. A fase aquosa (FA) ácida foi separada da fase orgânica (FO) e nela foi repetido o processo de extração mais duas vezes, tendo um total de 30 mL de FO2. A partir daí fez-se análise por CCD, para observação das FO1 e FO2 .

O sexto fracionamento (M6) foi realizado a partir da FO1, obtida da fração M5(3). Para a realização deste fracionamento foi utilizado o sistema de solventes éter dietílico-hexano (1:1) durante todo o processo, sendo no final separadas cinco frações.

Todas as frações obtidas foram analisadas por espectroscopia no infravermelho, CCD e também pelo seu estado físico aparente.

3.8.2.2. Purificação das frações M1(5), M1(7) e M6(3)

No caso da purificação da fração M1(5), após cinco dias estocada em temperatura ambiente, fez-se a separação da parte visivelmente cristalizada da parte oleosa. Para isso, adicionou-se hexano-éter dietílico (1:3) em pequena quantidade, mas suficiente para lavar os cristais. A solução foi agitada, levemente aquecida em banho-maria e filtrada a vácuo, separando os cristais do óleo.

A fração M1(7) foi submetida ao mesmo procedimento descrito para purificação da fração M1(5), diferindo no sistema de solventes utilizado (éter dietílico puro). Os cristais obtidos foram separados por meio de filtração a vácuo em papel-filtro, sendo a porção cristalizada submetida à análise.

A fração M6(3), obtida após fracionamento em coluna de sílica-gel, conforme descrito em 3.7.2., apresentou-se cristalizada após secar dos solventes. A fração foi lavada com hexano puro em pequeno volume, e a solução, agitada. Após essa etapa, o solvente foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, sendo o processo repetido mais uma vez. A amostra foi analisada em CCD, utilizando como fase móvel éter dietílico-hexano (1:1).

3.8.2.3. Análises das frações M1(5), M1(7) e M6(3)

As porções cristalizadas das frações M1(5) e M1(7) foram submetidas à análise por CCD, utilizando como fase móvel éter dietílico-hexano (5:1) para ambas as frações. Estas frações foram analisadas por espectroscopia no infravermelho (espectrômetro PERKIM ELMER SPECTRUM 1000). As amostras foram analisadas em pastilha de KBr, na faixa de 500 a 4.000 cm^{-1} . Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , 300 MHz) e de carbono (RMN de ^{13}C , 75 MHz) foram registrados em espectrômetro BRUKER AVANCE 400 (Departamento de Química - Universidade de Warwick, Coventry, Inglaterra). Utilizou-se dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$) como solvente e TMS como padrão interno.

Para a análise da fração M6(3), os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , 400 MHz) e de carbono (RMN de ^{13}C , 100 MHz) foram registrados em espectrômetro BRUKER AVANCE 400 (Departamento de Química - Universidade de Warwick, Coventry, Inglaterra). Utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente e TMS como padrão interno.

3.9. Avaliação da atividade inseticida das lactonas

Realizou-se um ensaio biológico de atividade inseticida com as duas lactonas isoladas das frações M1(5) e M1(7), utilizando-se a metodologia descrita por PAULA et al. (2000). As espécies de insetos testadas foram: *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Coleoptera: Scolitidae), Coleoptera: Staphylinidae, *Diaphania hyalinata* (L) e *Diaphania nitidalis* (Cr.) (Lepidoptera: Pyralidae). Foram utilizados 10 insetos para cada classe anteriormente descrita, sendo estes transferidos para placas de Petri. As lactonas foram testadas topicamente em doses de 6,76, 7,55, 2,12 e 2,12 μg de substância/mg de inseto, sendo os resultados obtidos comparados a um grupo-controle. Todos os grupos de insetos foram mantidos em temperatura de 25 (\pm 0,5) $^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 75 (\pm 5)%, com fotoperíodo de 12 horas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo dos efeitos do arroz fermentado por fungos sobre o metabolismo lipídico de ratos

Produtos à base de arroz fermentado por fungos do gênero *Monascus* são tradicionalmente utilizados na culinária oriental, principalmente devido aos corantes produzidos durante a fermentação (FABRE et al., 1993; MARTÍNKOVÁ et al., 1995).

Segundo WANG et al. (1997), estes produtos fermentados também podem reduzir os níveis de lipídeos séricos em animais e humanos. Nesse sentido, foram feitos ensaios visando estudar os efeitos do arroz fermentado por *M. ruber* e do extrato deste produto sobre as taxas de colesterol e triacilgliceróis, em ratos. Também foi testado o extrato do arroz fermentado por *A. versicolor*, que são fungos normalmente encontrados como contaminantes de alimentos.

Os experimentos foram planejados para testar tanto os efeitos agudos como os efeitos a longo prazo de dietas contendo arroz fermentado e extratos dos mesmos, sobre as taxas de lipídios dos animais.

4.1.1. Ensaio biológico de curta duração, com aplicação de Triton

O ensaio biológico de curta duração objetivou testar o efeito do extrato elaborado a partir do arroz fermentado pelos fungos *A. versicolor* e *M. ruber* e também pelo arroz fermentado por *M. ruber* sobre os níveis de colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis dos ratos. Os animais foram tratados com Triton, visando elevar rapidamente os níveis de colesterol sanguíneo e, dessa forma, acentuar os efeitos dos tratamentos.

Os resultados do Quadro 5 evidenciam que não houve redução significativa ($p > 0,05$) nos valores de colesterol total nos animais experimentais, embora mostrem tendência de redução do colesterol em ratos tratados com Triton mais arroz fermentado por *M. ruber* (D6). Observou-se que o grupo

tratado com *M. ruber* apresentou redução de 7,12 e 17,57%, em relação aos controles com e sem Triton, respectivamente.

Vários trabalhos relatam que os fungos do gênero *Monascus* produzem a mevinolina, que é um potente inibidor da síntese de colesterol *in vivo* (RUBINSTEIN et al., 1991). ENDO (1979) relata a redução de 23% no nível de colesterol total em ratos tratados com 10 mg/kg de mevinolina. Entretanto, a concentração deste composto nos meios fermentados é da ordem de 10 a 20 mg/L de meio de cultura (ENDO e HASUMI, 1985; ENDO et al., 1985a). Análises posteriores por CLAE e CCD em laboratório não detectaram mevinolina nos meios fermentados por *M. ruber* e *A. versicolor*. Segundo WANG et al. (1997), o arroz fermentado com *M. ruber* contém, além da mevinolina, ácidos graxos insaturados, que podem contribuir na redução do colesterol sérico. Os resultados desse ensaio estão mostrados no Quadro 5.

Foi observado neste experimento que a injeção intraperitoneal do Triton não foi eficaz na indução da hipercolesterolemia nos animais, o que pode ser constatado pelos valores, estatisticamente iguais, dos níveis de colesterol dos grupos D e T (D1 e D2) mostrados no Quadro 5.

O Triton vem sendo utilizado com sucesso em vários estudos para a indução da hipercolesterolemia (PEREIRA, 1999; GOMES, 1998), porém neste experimento sua eficiência não pôde ser observada após 72 horas da aplicação da droga. Esse fato, possivelmente, se refere ao tempo de ação da droga, que foi reduzido quando os teores de colesterol sanguíneo foram analisados. Segundo ISHIKAWA e FIDGE (1979), a hipercolesterolemia induzida por esta droga, em ratos, atinge os níveis máximos vinte horas após a aplicação, começando a partir daí um processo de redução.

Quadro 5 - Níveis médios de colesterol total, em mg/dL, e percentual de variação em relação aos tratamentos-controle, de ratos submetidos a diferentes dietas

Grupos	Dietas	Colesterol total (mg/dL)	Variação em relação a:	
			Dieta	Dieta + Triton
D1	Dieta (D)	124,50 A	-	-
D2	Dieta + Triton (T)	110,50 A	-	-
D3	D + T + arroz puro	113,56 a	-8,79	+2,77
D4	D + T + 2 mg de extrato de <i>A. versicolor</i>	111,87 a	-10,14	+1,24
D5	D + T + 2 mg de extrato de <i>M. ruber</i>	114,88 a	-7,73	+3,96
D6	D + T + arroz fermentado por <i>M. ruber</i>	102,63 a	-17,57 *	-7,12

Na coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem pelo teste F ($p < 0,05$).

Na coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p>0,05$).

* Estatisticamente diferente dos controles pelo teste de Dunnett ($p<0,05$).

De acordo com os dados mostrados no Quadro 6, verificou-se que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos experimentais que receberam tratamento (D3 a D6) e o controle (D1). Entretanto, quando comparados com o controle que recebeu dieta mais Triton (D2), observou-se redução significativa ($p<0,05$) dos níveis de HDL-colesterol nos grupos tratados, excetuando-se o grupo tratado com arroz mais extrato de *M. ruber* (D5). Como não há diferença entre os três grupos, os resultados sugerem que o arroz por si só induz uma redução dos níveis de HDL-colesterol em ratos tratados com Triton.

Os níveis mais baixos de HDL-colesterol dos grupos tratados, em relação ao grupo-controle com Triton (D2), constituem um aspecto negativo, visto que altos níveis de HDL-colesterol estão relacionados à redução do risco de doenças cardiovasculares (LEHNINGER et al., 1995; KRAUSE e MAHAN, 1995).

Quadro 6 - Níveis médios de HDL-colesterol, em mg/dL, e percentual de variação em relação aos tratamentos-controle, de ratos submetidos a diferentes dietas

Grupos	Dietas	HDL -colesterol (mg/dL)	Variação em relação a:	
			Dieta	Dieta + Triton
D1	Dieta (D)	33,25 B	-	-
D2	Dieta + Triton (T)	39,38 A	-	-
D3	D + T + arroz puro	32,13 a	-3,37	-18,41 *
D4	D + T + 2 mg de extrato de <i>A. versicolor</i>	32,25 a	-3,01	-18,11 *
D5	D + T + 2 mg de extrato de <i>M. ruber</i>	34,50 a	+3,76	-12,39
D6	D + T + arroz fermentado por <i>M. ruber</i>	32,00 a	-3,76	-18,74 *

Na coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem pelo teste F ($p<0,05$).

Na coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p>0,05$).

* Estatisticamente diferente dos controles pelo teste de Dunnett ($p<0,05$).

Enquanto os resultados relativos aos níveis de colesterol não foram conclusivos, os dados referentes aos níveis de triacilgliceróis (Quadro 7) mostram uma significativa redução ($p < 0,05$) destes nos animais tratados com arroz fermentado por *M. ruber* (D6). A redução de 31,12% observada nesse grupo, no entanto, não difere daquela de 23,22% observada no grupo D3 tratado com arroz puro, sugerindo que o efeito redutor dos níveis de triacilgliceróis possa estar relacionado ao arroz. Esse efeito aparente, por sua vez, pode estar relacionado a uma menor digestibilidade devido à granulação do cereal na dieta experimental, a qual era maior que a granulação do amido utilizado nos outros grupos. Esses resultados sugerem que este alimento produz uma resposta glicêmica menor e, conseqüentemente, diminui os valores de triacilgliceróis. A literatura relata uma correlação entre baixos níveis de glicose e baixos níveis de triacilgliceróis, o que pode justificar tais suposições (SHILS et al., 1994).

Esses resultados apontam para a necessidade de se fazerem novos estudos para avaliar a resposta glicêmica do arroz associada a uma redução de triacilgliceróis sanguíneo.

Quadro 7 - Níveis médios de triacilgliceróis, em mg/dL, e percentual de variação em relação aos tratamentos-controle, de ratos submetidos a diferentes dietas

Grupos	Dietas	Triacilgliceróis (mg/dL)	Variação em relação a:	
			Dieta	Dieta + Triton
D1	Dieta (D)	82,75 A	-	-
D2	Dieta + Triton (T)	84,50 A	-	-
D3	D + T + arroz puro	64,88 ab	-21,60	-23,22
D4	D + T + 2 mg de extrato de <i>A. versicolor</i>	78,00 a	-5,74	-7,69
D5	D + T + 2 mg de extrato de <i>M. ruber</i>	81,63 a	-1,35	-3,40
D6	D + T + arroz fermentado por <i>M. ruber</i>	57,00 b	-31,12	-32,54 *

Na coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem pelo teste F ($p < 0,05$).

Na coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula

não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

* Estatisticamente diferente dos controles pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

4.1.2. Ensaio biológico utilizando colesterol mais ácido cólico na dieta

O segundo ensaio biológico teve como objetivo testar o efeito do arroz fermentado pelo fungo *M. ruber* quanto ao seu poder hipocolesterolemizante, em que os animais foram tratados com dietas experimentais durante 28 dias.

Os resultados obtidos para colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis, no soro sanguíneo de ratos, com hiperlipidemia induzida oralmente, por colesterol e ácido cólico, são apresentados nos Quadros 8, 9 e 10.

Os Quadros 11, 12 e 13 apresentam os resultados das médias de ganho de peso, consumo alimentar e eficiência de conversão alimentar (CEA) dos ratos após 28 dias de ensaio.

De acordo com os dados apresentados no Quadro 8, a hipercolesterolemia não foi induzida pela dieta contendo colesterol mais ácido cólico, pois o valor médio do grupo-controle T2 que recebeu essas substâncias foi significativamente menor ($p < 0,05$) que o do grupo que não as recebeu. Esse resultado é inesperado, uma vez que vários trabalhos utilizando esta mesma metodologia constataram a hipercolesterolemia (PEREIRA, 1999; GOMES, 1998). Por outro lado, essa redução nos níveis de colesterol pôde ser observada em outro experimento realizado no próprio laboratório, por outros pesquisadores, utilizando ratos da mesma linhagem genética.

Embora os valores do colesterol total sanguíneo estejam dentro da faixa de normalidade, durante a retirada do sangue pela punção cardíaca foi observado que os fígados dos animais que receberam colesterol mais ácido cólico estavam visivelmente mais pálidos e maiores que o grupo que não recebeu estas substâncias indutoras, sugerindo uma manifestação de retenção de lipídio no fígado.

Em animais sadios, a biossíntese de colesterol é regulada de forma a manter os níveis sanguíneos constantes, e o excesso de colesterol na dieta é um fator inibitório da biossíntese (LEHNINGER et al., 1995). Essa inibição por retroalimentação poderia explicar em parte os resultados observados.

Os ratos pertencentes ao grupo T4, tratados com arroz fermentado por *M. ruber*, mostraram redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de colesterol total somente se comparados ao controle (T1) que não recebeu colesterol mais ácido cólico. Tomando como referência o controle que recebeu essas substâncias, a diminuição de 14,47% nos valores médios de colesterol total não é significativamente diferente ($p > 0,05$); nesse caso, pode ser considerado apenas como uma tendência de diminuição desses níveis, nos ratos tratados com arroz fermentado por *M. ruber*.

WANG et al. (1997) relatam que os meios fermentados por *M. ruber* possuem ácidos graxos insaturados, podendo contribuir na redução dos níveis de colesterol total.

Os resultados apresentados no Quadro 9 evidenciam uma redução do HDL-colesterol, quando comparados com o controle (T1) sem colesterol mais ácido cólico. Entretanto, quando comparados com o grupo-controle (T2) que recebeu dieta com colesterol mais ácido cólico, os grupos T3 e T4 são estatisticamente iguais. Assim, conclui-se que o arroz fermentado por *M. ruber* não reduz os níveis de HDL-colesterol dos animais utilizados nesse experimento.

Quadro 8 - Níveis médios de colesterol total, em mg/dL, e percentual de variação em relação aos tratamentos-controle, de ratos submetidos a diferentes dietas

Grupos	Dietas	Colesterol total (mg/dL)	Variação em relação a:	
			Dieta	Dieta + C + AC
T1	Dieta (D)	143,08 A	-	-
T2	Dieta + colesterol + ácido cólico (C + AC)	108,16 B	-	-
T3	D + C + AC + arroz puro	109,56 a	-23,43	+1,29
T4	D + C + AC + arroz fermentado por <i>M. ruber</i>	92,51 a	-35,34 *	-14,47

Na coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem pelo teste F ($p < 0,05$).

Na coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

* Estatisticamente diferente dos controles pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Quadro 9 - Níveis médios de HDL-colesterol, em mg/dL, e percentual de variação em relação aos tratamentos-controle, de ratos submetidos a diferentes dietas

Grupos	Dietas	HDL-colesterol (mg/dL)	Variação em relação a:	
			Dieta	Dieta + C + AC
T1	Dieta (D)	47,41 A	-	-
T2	Dieta + colesterol + ácido cólico (C + AC)	33,03 B	-	-
T3	D + C + AC + arroz puro	36,48 a	-23,05 *	+10,45
T4	D + C + AC + arroz fermentado por <i>M. ruber</i>	33,05 a	-30,29 *	+0,06

Na coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem pelo teste F ($p < 0,05$).

Na coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

* Estatisticamente diferente dos controles pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Os resultados apresentados no Quadro 10 mostram uma redução nos valores sangüíneos de triacilgliceróis nos grupos T2, T3 e T4 que receberam o colesterol mais ácido cólico, quando comparados com grupo-controle T1, semelhante aos resultados apresentados no Quadro 9, relacionados aos níveis de colesterol total. Esse fato não era esperado, uma vez que diversos trabalhos apontam resultados contrários (PEREIRA, 1999; GOMES, 1998). Por outro lado, a inclusão do arroz fermentado por *M. ruber* na dieta contendo colesterol mais ácido cólico não proporcionou nenhuma mudança significativa desse parâmetro ($p > 0,05$), comparado ao grupo-controle T2 com dieta contendo as mesmas substâncias.

Quadro 10 - Níveis médios de triacilgliceróis, em mg/dL, e percentual de variação em relação aos tratamentos-controle de ratos submetidos a diferentes dietas

Grupos	Dietas	Triacilgliceróis (mg/dL)	Variação em relação a:	
			Dieta	Dieta + C + AC
T1	Dieta (D)	107,16 A	-	-
T2	Dieta + colesterol + ácido cólico (C + AC)	40,61 B	-	-
T3	D + C + AC + arroz puro	64,94 a	-62,20 *	+60,31 *
T4	D + C + AC + arroz fermentado por <i>M. ruber</i>	46,30 a	-56,79 *	+14,29

Na coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem pelo teste F ($p < 0,05$).

Na coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

* Estatisticamente diferente dos controles pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Os efeitos do arroz fermentado sobre o consumo alimentar, o ganho de peso e o coeficiente de eficiência alimentar dos animais também foram analisados. Os resultados apresentados no Quadro 11, relacionados ao ganho de peso, mostraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratados e os controles. Entre os grupos tratados também foi observada diferença significativa ($p < 0,05$).

O grupo T4, tratado com dieta contendo arroz fermentado por *M. ruber*, apresentou menor ganho de peso, em relação ao grupo-controle T1, porém, em relação ao grupo-controle T2 com colesterol mais ácido cólico, esse comportamento não foi confirmado; ao contrário, apresentou uma tendência de ganho de peso. Confirmando essa tendência, o grupo T3, que recebeu a dieta com arroz puro, comparado ao mesmo controle, teve um aumento no ganho de peso de 80,03%. Resultados semelhantes foram observados para os coeficientes de eficiência alimentar (Quadro 13), o que é coerente, uma vez que os valores de consumo alimentar médio (Quadro 12) foram estatisticamente iguais para controles e tratamentos. O conjunto desses resultados sugere que o arroz puro, adicionado às dietas contendo colesterol e ácido cólico, aumenta o ganho de peso, não interferindo no consumo, aumentando também o coeficiente de eficiência alimentar dos ratos. O grupo T4, que recebeu dieta contendo arroz fermentado com *Monascus ruber*, mostrou forte tendência no mesmo sentido. Entretanto, em relação ao grupo T1, sem colesterol e ácido cólico, observaram-se resultados contrários; outros trabalhos serão necessários para avaliar de maneira conclusiva esses efeitos.

Quadro 11 - Ganho de peso médio, em gramas, e percentual de variação em relação aos tratamentos-controle, de ratos submetidos a diferentes dietas

Grupos	Dietas	Ganho de peso (g)	Variação em relação a:	
			Dieta	Dieta + C + AC
T1	Dieta (D)	87,88 A	-	-
T2	Dieta + colesterol + ácido cólico (C + AC)	48,88 B	-	-
T3	D + C + AC + arroz puro	88,00 a	+0,14	+80,03 *
T4	D + C + AC + arroz fermentado por <i>M. ruber</i>	62,13 b	-29,30 *	+27,11

Na coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem pelo teste F ($p < 0,05$).

Na coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

* Estatisticamente diferente dos controles pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Quadro 12 - Consumo médio, em gramas, e percentual de variação em relação aos tratamentos-controle, de ratos submetidos a diferentes dietas

Grupos	Dietas	Consumo (g)	Variação em relação a:	
			Dieta	Dieta + C + AC
T1	Dieta (D)	136,61 A	-	-
T2	Dieta + colesterol + ácido cólico (C + AC)	123,69 A	-	-
T3	D + C + AC + arroz puro	127,88 a	-6,39	+3,39
T4	D + C + AC + arroz fermentado por <i>M. ruber</i>	128,06 a	-6,26	+3,53

Na coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem pelo teste F ($p < 0,05$).

Na coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

* Estatisticamente diferente dos controles pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Quadro 13 - Coeficiente de eficiência alimentar (CEA) médio e percentual de variação em relação aos tratamentos-controle, de ratos submetidos a diferentes dietas

Grupos	Dietas	CEA	Variação em relação a:	
			Dieta	Dieta + C + AC
T1	Dieta (D)	0,64 A	-	-
T2	Dieta + colesterol + ácido cólico (C + AC)	0,37 B	-	-
T3	D + C + AC + arroz puro	0,68 a	+6,25	+83,78 *
T4	D + C + AC + arroz fermentado por <i>M. ruber</i>	0,48 b	-25,00 *	+29,73

Na coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem pelo teste F ($p < 0,05$).

Na coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

* Estatisticamente diferente dos controles pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

4.2. Identificação da mevinolina por CLAE

Inicialmente, após a obtenção dos extratos, buscou-se fazer a confirmação da presença da mevinolina, utilizando-se CCD e CLAE. Essa confirmação foi necessária, uma vez que a mevinolina se apresenta na forma de lactona, mas podem existir derivados em outras formas químicas distintas, como na forma ácida (ácido mevinolínico), na forma de sal e, ainda, na forma de éster metílico, sendo esta última um produto de reação, a qual ocorre durante extração com metanol (FRIEDRICH et al., 1995). No meio fermentado, é possível encontrar as diferentes formas químicas, sendo, assim, necessário conhecer o comportamento químico destas.

Foi feita, então, a análise do padrão de mevinolina, para determinação do seu tempo de retenção. Nas condições cromatográficas utilizadas, a mevinolina apresentou tempo de retenção de 13,02 minutos (Figura 9). A análise em CCD revelou valor de Rf de 0,42 (hexano-éter dietílico 1:2) para a mevinolina e de 0,87 para o éster metílico (éter dietílico puro).

Os extratos metanólicos dos meios fermentados por *M. ruber* e *A. versicolor* foram submetidos à identificação por CLAE, utilizando-se inicialmente o padrão na forma de lactona. Após os testes, constatou-se a ausência de picos referentes ao padrão de mevinolina em torno de 13 minutos

em ambos os extratos. Após estocado durante 60 horas, o extrato foi novamente analisado por CLAE, para se estabelecer a estabilidade química e a presença do éster metílico, um subproduto da reação da lactona com metanol (FRIEDRICH et al., 1995). Constatou-se a ausência do éster metílico em meios fermentados por *M. ruber*.

4.2.1. Análise do padrão na forma ácida (ácido mevinolínico)

Buscou-se também analisar a presença ou não da forma ácida, sendo feitos testes com o material na tentativa de se realizar a conversão completa da mevinolina para ácido mevinolínico, conforme descrito no item 3.6.2.

O cromatograma obtido (CLAE) não apresentou pico com menor tempo de retenção que o da mevinolina (13,02 minutos), levando à conclusão de que o procedimento utilizado não foi satisfatório para a conversão. Essa conclusão baseou-se no fato de que o ácido mevinolínico teria menor tempo de retenção que a mevinolina, por se tratar de uma substância mais polar.

4.2.2. Análise do padrão após conversão da forma ácida em lactona

Uma vez que não se conseguiu a obtenção do padrão do ácido mevinolínico, considerando-se que nas amostras (extratos) poderia se ter este derivado e só havia o padrão na forma de lactona, buscou-se, por outras metodologias (item 3.6.3.), converter o padrão de lactona em ácido e novamente interconvertê-lo em lactona.

O espectro no IV obtido da amostra do procedimento 1 (3.6.3.a) não evidenciou a formação nem do ácido nem da lactona interconvertida, sendo essa metodologia não mais utilizada.

O resultado do procedimento 2 (3.6.3.b), obtido por meio da análise por CCD (hexano-éter dietílico 1:2), evidenciou, por meio de comparação com o padrão de mevinolina, a formação da lactona (R_f de 0,42), sendo esse processo utilizado para o tratamento dos extratos na metodologia de análise destes.

4.2.3. Análise dos extratos de *Monascus ruber* e *Aspergillus versicolor*

Finalmente, com o objetivo de identificar o teor de mevinolina nos diferentes meios fermentados por *Monascus ruber* e *Aspergillus versicolor*, foi realizado um amplo estudo com base em técnicas de extração sólido-líquido, cromatografia, espectroscopia no IV e RMN.

Observando-se o cromatograma do extrato metanólico de *M. ruber*, verificou-se a presença de um pico com tempo de retenção próximo ao padrão de mevinolina, sendo feita, então, uma co-injeção (injeção contendo padrão mais amostra), para a certificação da presença da mevinolina neste extrato. Verificou-se a não-sobreposição dos picos, confirmando assim a ausência da mevinolina nos extratos de *M. ruber* (Figura 10).

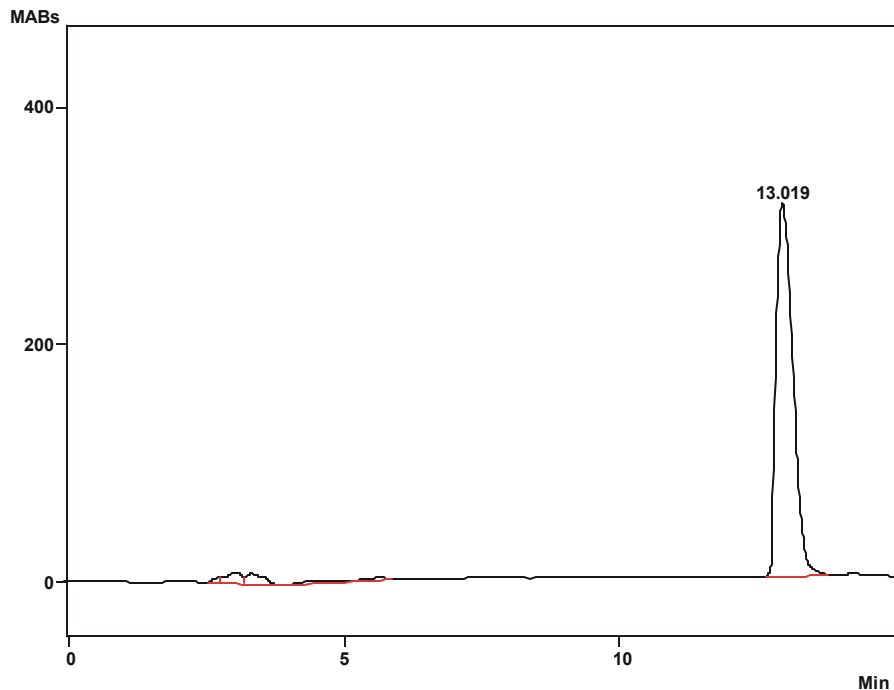


Figura 9 - Cromatograma do padrão de mevinolina em metanol (coluna C-18, fase móvel: tampão fosfato de potássio (pH 7,7)-acetonitrila (35:65), fluxo:0,7 mL/min, detector UV, $\lambda = 237$ nm).

Como a mevinolina pode ser interconvertida para a forma de éster metílico, tanto o padrão de mevinolina, solubilizada em metanol, como os

extratos metanólicos de *M. ruber* e *A. versicolor* foram estocados por três dias sob refrigeração, para se identificar a presença na forma de éster metílico. Após estes três dias, o padrão foi analisado por CLAE, onde foi observada a presença de um segundo pico em 14,58 minutos (Figura 11a). Após sete dias estocado, o padrão foi novamente analisado por CLAE, observando-se o aumento deste segundo pico (14,23 minutos) (Figura 11b) e a acentuada redução da forma de lactona, confirmando assim dados da literatura (FRIEDRICH et al., 1995).

O meio fermentado por *M. ruber* foi extraído com metanol e apresentou pH em torno de 5,0. Nessas condições, as formas de éster metílico e ácida são favorecidas em relação à forma lactônica da mevinolina. No cromatograma do extrato de *M. ruber*, obtido por CLAE, não se observou a presença de picos com tempo de retenção próximos ao do padrão utilizado, referente à forma de éster metílico. Dessa maneira, pode-se concluir que a forma ácida também não estava presente nesse meio.

O mesmo pôde ser observado no extrato metanólico de *A. versicolor*, concluindo-se finalmente pela ausência da mevinolina nas amostras analisadas.

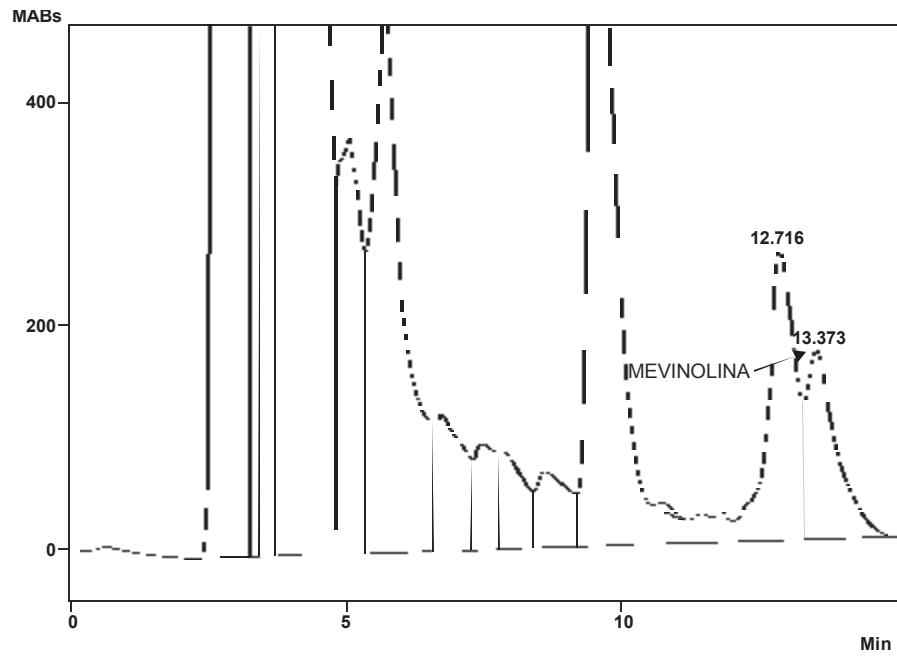


Figura 10 - Cromatograma da co-injeção (padrão de mevinolina mais extrato metanólico de *M. ruber*) (coluna C-18, fase móvel: tampão fosfato de potássio (pH 7,7)-acetonitrila (35:65), fluxo:0,7 mL/min, detector UV, $\lambda = 237$ nm).

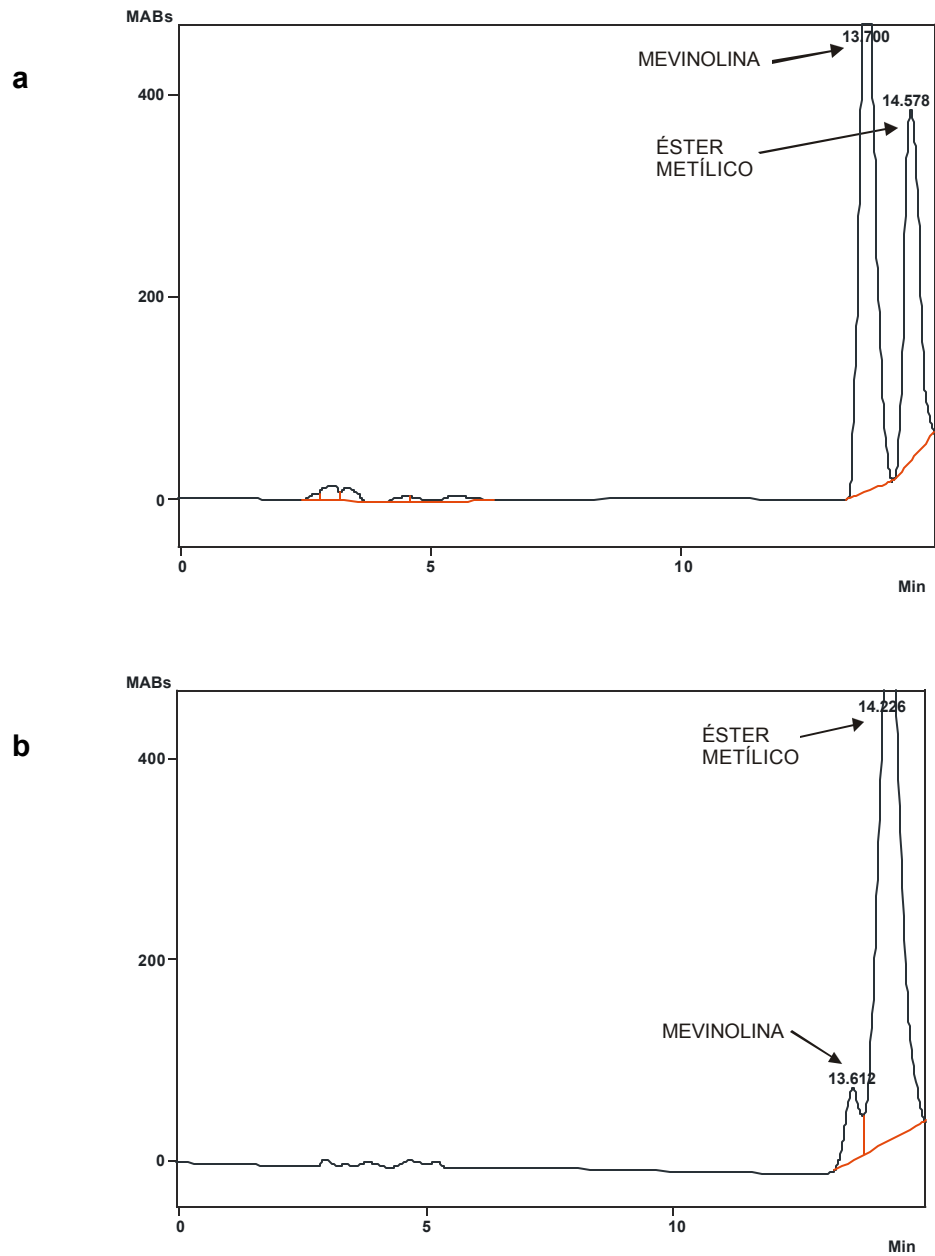


Figura 11 - Cromatograma do padrão de mevinolina em metanol: a) estocado durante três dias; b) estocado por sete dias (coluna C-18, fase móvel: tampão fosfato de potássio (pH 7,7)-acetonitrila (35:65), fluxo:0,7 mL/min, detector UV, $\lambda = 237$ nm).

4.3. Estudo químico do extrato de arroz fermentado por *Aspergillus versicolor*

4.3.1. Obtenção do extrato

O extrato foi obtido conforme metodologia descrita no item 3.7.1., sendo um total de 13,48 g de extrato de arroz fermentado por *Aspergillus versicolor*.

4.3.2. Fracionamento do extrato de *A. versicolor* em coluna de sílica-gel

Inicialmente, os meios fermentados foram submetidos à extração e concentração a vácuo, seguindo o procedimento descrito por ENDO et al. (1985a), visando purificar a mevinolina.

O extrato metanólico de *A. versicolor*, quando analisado em CCD, apresentou um ponto com Rf próximo ao do padrão, sendo assim realizado o fracionamento em coluna de sílica-gel, a fim de purificar este extrato e facilitar a identificação da mevinolina por CLAE.

Confirmada a ausência de mevinolina no extrato metanólico de *A. versicolor*, decidiu-se por fazer um estudo mais aprofundado, com a finalidade de identificar outras substâncias relacionadas que também apresentam atividade hipocolesterolemiantes, como monacolinhas L, X, M e J (ENDO e HASUMI, 1985; ENDO et al., 1985b; NAKAMURA et al., 1990; KOMAGATA et al., 1989).

O fracionamento do extrato do *A. versicolor* foi realizado através de diversas colunas cromatográficas de sílica-gel, conforme o esquema mostrado em Material e Métodos. A primeira coluna originou sete frações, sendo uma identificada como ésteres graxos e as demais como ácidos graxos. Do extrato analisado, as frações M1(2), M1(3), M1(4), M1(5), M1(6) e M1(7) referem-se aos ácidos graxos (Figura 12), e a fração M1(1), aos ésteres graxos. As frações caracterizadas como ácidos graxos e ésteres graxos perfazem 92,52 e 7,43% do total do extrato, respectivamente.

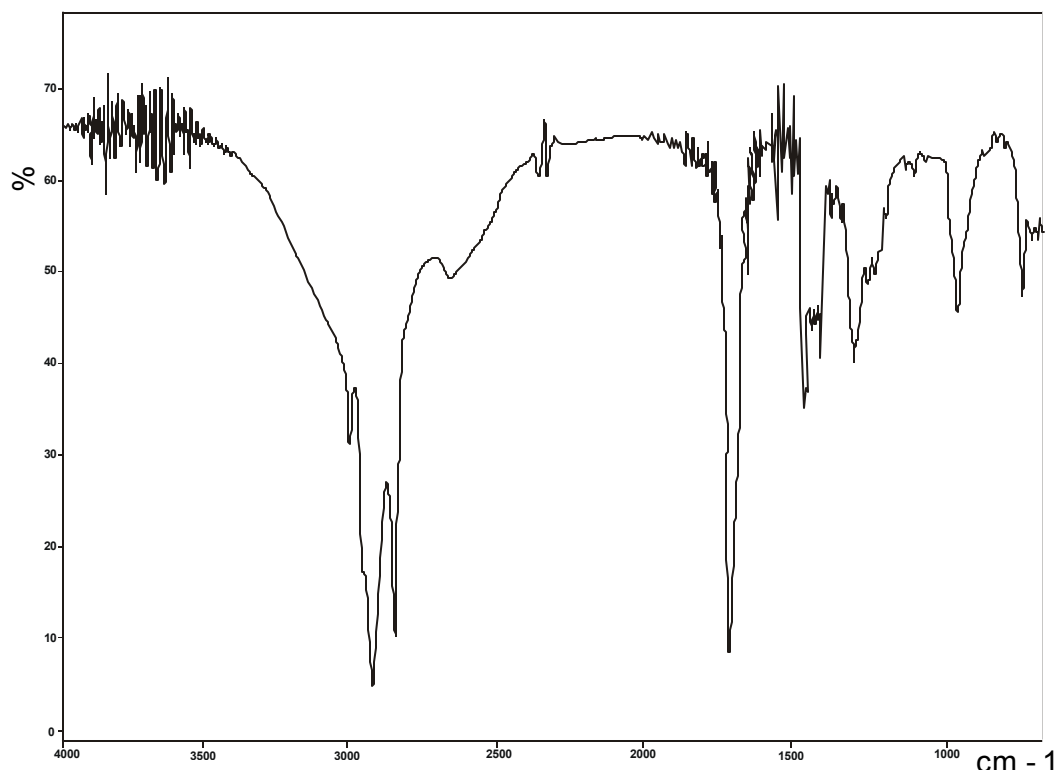


Figura 12 - Espectro no IV (NaCl) da fração M1(2).

4.3.3. Identificação de novas lactonas das frações M1(5) e M1(7)

As extrações feitas a partir do arroz fermentado pelos fungos *M. ruber* e *A. versicolor*, segundo FRIEDRICH et al. (1995), objetivaram se conseguir uma extração rápida e eficiente, uma vez que a monacolina é solúvel em metanol, dispensando assim uma extração feita com sistema de solventes.

As frações M1(5) e M1(7), após alguns dias estocadas à temperatura ambiente, mostraram uma fase oleosa e outra sólida, visivelmente cristalizada, com massas 1,426 g e 0,192 g, respectivamente. Os cristais foram lavados e separados da fase oleosa, como descrito em Material e Métodos.

As características físicas e o ponto de fusão com pequenas variações davam suporte à hipótese de que o composto era puro e, dessa forma, suas estruturas químicas puderam ser elucidadas.

A fase sólida da fração M1(5) mostrou-se solúvel em clorofórmio e insolúvel em hexano, com ponto de fusão de 207,6 a 209,4 °C e Rf de 0,30 (éter dietílico-hexano (5:1)), sugerindo tratar-se de uma substância pura.

O espectro no infravermelho (Figura 13) apresentou picos característicos de OH (3.422 cm^{-1}), de carbonila de lactona (1.736 cm^{-1}), de carbonila de cetona α,β -insaturada (1.654 cm^{-1}) e de C=C de anel aromático (1.618 cm^{-1} e 1.600 cm^{-1}), consoante com a literatura (SILVERSTEIN et al., 1991).

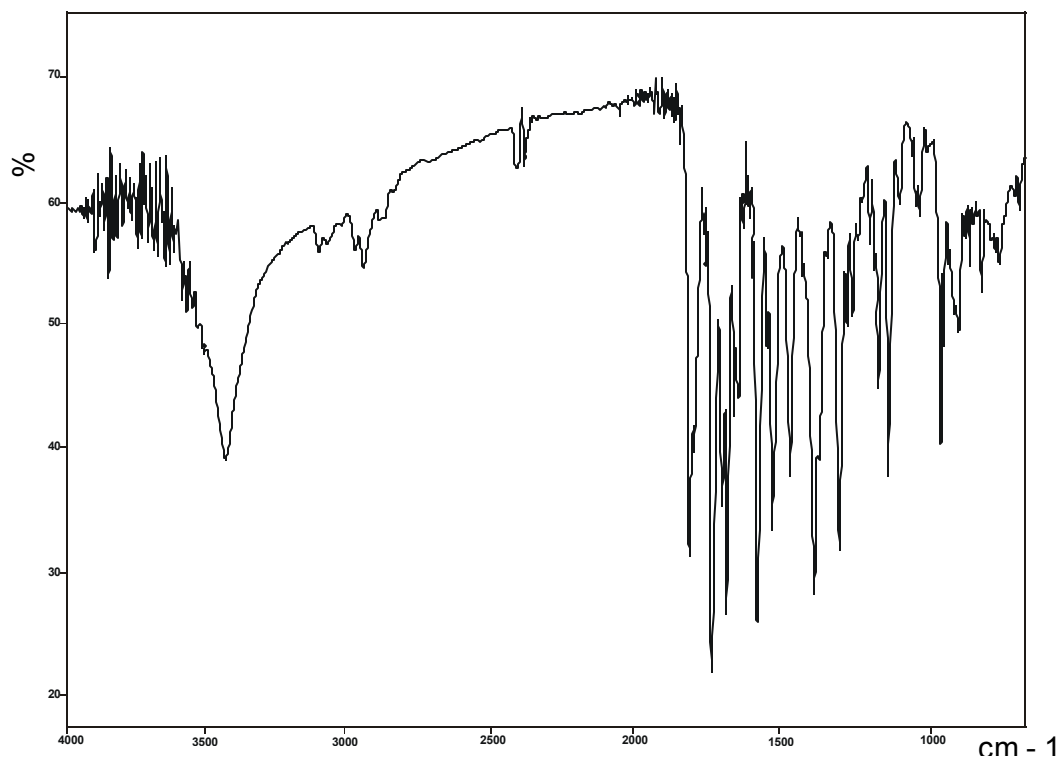


Figura 13 - Espectro no infravermelho (KBr) da fração M1(5) (sólido).

A fórmula molecular do composto foi estabelecida como $C_{16}H_{12}O_6$ (m/z 300,0634; calculado: 300,0634), utilizando espectrometria de massas (EM).

Pela análise do espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (Apêndice B - Figura 1B), observaram-se 16 sinais de carbono: duas

carbonilas (δ 155,5 e 180,1), sete carbonos não-hidrogenados, cinco carbonos aromáticos, um carbono metilênico alifático e um grupo metóxi (OCH_3) (Quadro 14).

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio apresentou um simpleto em δ 12,06, relativo ao hidrogênio do grupo hidroxila acoplado ao grupo carbonila, e dois sinais em δ 7,00 e δ 6,80, relativos aos hidrogênios aromáticos acoplados em *meta* (H-4 e H-2, respectivamente). A presença do grupo CH_2OH foi confirmada pelo duplete em δ 4,60 ($J = 5,4$ Hz) e pelo tripleto em 5,40 ($J = 5,4$ Hz). A presença do anel aromático 1,2,3-trissubstituído foi evidenciada pelo duplo duplete em δ 7,45 ($J = 7,3; 1,1$ Hz) e δ 7,77 ($J = 8,3; 1,1$ Hz) do H-7 e H-6, respectivamente.

O espectro obtido utilizando a técnica de “NOE” (“efeito nuclear Overhausen”) com irradiação em δ 3,90 (OCH_3) resultou num pequeno aumento do sinal relativo ao H-7, assim como do sinal relativo ao OH fenólico, indicando a presença de um anel central não-planar. Por meio da técnica de HMBC (“higher multiple bond correlated”), um efeito pronunciado de NOE foi também observado nos sinais relativos ao H-2 e ao H-4, quando se irradiou em δ 4,60 (CH_2).

Quadro 14 - Dados* de RMN de ^1H e ^{13}C dos sólidos obtidos das frações M1(5) e M1(7) (em DMSO- d_6 , (δ) e J/Hz)

Nº	$^1\text{H NMR}$		$^{13}\text{C NMR}$	
	M1(5)	M1(7)	M1(5)	M1(7)
1	12,06 (brs, OH)	12,25 (brs, OH)	160,5	160,8
2	6,80 (d, 1,1)	6,78 (d, 1,1)	107,7	107,5
3			154,5	154,4
4	7,00 (d, 1,1)	7,00 (d, 1,1)	104,2	104,2
5	7,77 (dd, 1,1)	8,3, 7,62 (d, 8,0)	119,7	120,5
6	7,93 (dd, 7,3)	8,3, 7,48 (d, 8,0)	136,0	125,7
7	7,45 (dd, 1,1)	7,3, 10,5 (brs, OH)	122,9	149,2
8			168,6	167,2
9			180,1	180,1
10			155,5	151,1
11			107,0	106,9
12			155,5	155,8
13			116,6	117,4
14			133,6	117,4
OH	5,40 (t, 5,4)	5,55 (brs)		
CH ₂ O	4,60 (d, 5,4)	4,60 (brs)	62,3	62,7
H				
OCH ₃	3,90 (s)	3,89 (s)	52,7	52,6

* Medida em 75 MHz para carbono-13 e 300 MHz para hidrogênio.

O composto obtido da fração M1(7) também se apresentou como uma mistura de óleo e sólido amarelo cristalino com massas de 1,735 g e 0,275 g, respectivamente. O sólido analisado desta fração apresentou-se insolúvel em clorofórmio e solúvel em diclorometano, com R_f de 0,18 (éter-dietílico-hexano (5:1)) e ponto de fusão de 250,5 a 251,6°C, sugerindo tratar-se de uma substância pura.

A fórmula molecular do composto, C₁₆H₁₂O₇, pôde ser deduzida por meio de duas técnicas distintas: espectrometria de massas (m/z 316,0584; calculado: 316,0583) e RMN ^{13}C .

O espectro no infravermelho (IV) apresentou bandas de absorção em 3.286 e 3.163 cm^{-1} , evidenciando a presença de OH; em 1.703 cm^{-1} , indicando lactona- α,β -insaturada; em 1.654 cm^{-1} , evidenciando cetona- $\alpha,\alpha',\beta,\beta'$ -

duplamente insaturada; e em 1.611 e 1.600 cm^{-1} , relativas a C=C de anel aromático.

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foi similar ao do composto obtido da fração M1(5), exceto para os sinais do anel aromático à esquerda. Dois dupletos (tipo AB, $J = 8.0$ Hz) foram observados em δ 7,48 e 7,62 e também um sinal largo em δ 10,5, de uma hidroxila extra, com a correspondente perda de ressonância de CH. Com base nessa informação, a hidroxila poderia estar localizada em C-5 ou C-7. Entretanto, as correlações utilizando HMBC somente foram consistentes com a estrutura proposta estando a hidroxila em C-7. Todos os sinais foram confirmados por COSY (experimento homonuclear de RMN) e HMQC (“high multiple quantum correlated”) e nenhuma interação foi observada com hidrogênios do anel, ao se utilizar a técnica de “NOE diff” com irradiação no grupo metóxi, nem o inverso. Também não foi observada hidroxilação em C-5. As estruturas dos compostos sólidos obtidos das frações M1(5) e M1(7) estão apresentadas na Figura 14.

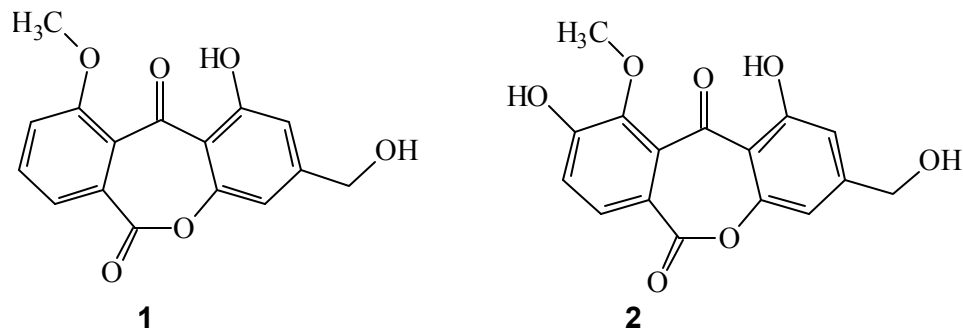


Figura 14 - Estrutura química das lactonas 1 (obtida da fração M1(5)) e 2 (obtida da fração M1(7)).

Após minuciosa pesquisa nos bancos de dados de compostos orgânicos, não sendo encontrada nenhuma referência, essas substâncias foram consideradas como inéditas até então, sendo submetidas à avaliação de sua atividade inseticida.

4.3.4. Avaliação da atividade inseticida das lactonas

Testou-se a atividade inseticida das duas novas lactonas, isoladas nas frações M1(5) e M1(7). Os resultados obtidos com os insetos testados (*Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Coleoptera: Scolitidae), Coleoptera: Staphylinidae, *Diaphania hyalinata* (L), *Diaphania nitidalis* (Cr.) (Lepidoptera: Pyralidae)) mostraram que a lactona obtida da fração M1(5) (Figura 14-1) não possui nenhuma atividade inseticida, enquanto a lactona obtida da fração M1(7) (Figura 14-2) mostrou-se tóxica para Coleoptera: Staphylinidae, com 72,5% de mortalidade, em relação ao grupo-controle.

Assim, o estudo químico do arroz fermentado por *A. versicolor* permitiu isolar e identificar duas novas substâncias, das quais uma apresentou promissora atividade biológica, devendo ser explorada em estudos futuros.

4.3.5. Caracterização do peróxido de ergosterol no extrato de arroz fermentado por *A. versicolor*

Conforme mostrado em Material e Métodos, a parte oleosa da fração M1(5) foi submetida a novos fracionamentos, utilizando mais três colunas de sílica-gel, até se obter uma fração com alta pureza, denominada fração M6(3). Esta fração apresentou-se como uma mistura de sólido amarelado e óleo, com massas de 0,0095 g e 0,0135 g, respectivamente. Após a purificação da parte cristalizada, esta apresentou-se como cristal branco, insolúvel em hexano.

Na análise do espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, observaram-se dois dupletos em δ 6,49 e δ 6,23 ($J = 8,4$ Hz) para a dupla ligação *cis*. Os dois duplos dupletos em δ 5,21 ($J = 15,2$ e $7,4$ Hz) e δ 5,31 ($J = 15,2$ e $8,1$ Hz) foram consistentes com a dupla ligação *trans*, vizinha a dois grupos CH. Também foram observados sinais correspondentes a seis grupos metila (Quadro 15), sendo dois simpletos e os demais sinais aparecendo como dupletos.

O espectro de DEPT (“Distortionless Enhancement of Polarization Transfer”) mostrou ressonâncias para seis grupos metila (δ 12,7, 17,4, 18,1, 19,5, 19,9 e 20,8), sete carbonos metilênicos (δ 20,5, 23,3, 27,9, 29,9, 34,6, 36,9 e 39,2), onze carbonos metínicos (δ 32,9, 39,6, 42,6, 51,4, 51,6, 56,1, 66,3, 130,6, 132,2, 135,1 e 135,5) e quatro carbonos não-hidrogenados (δ 36,8, 44,4, 79,3 e 82,0). Os sinais em δ 66,3, 79,3 e 82,0 indicaram a provável presença de três oxigênios (O) na molécula. Com esses dados, a fórmula molecular $C_{28}H_{46}O_3$ foi deduzida e confirmada por EM. Utilizando-se a fórmula molecular, obteve-se o índice de hidrogênio de 6, sugerindo a presença de duas duplas ligações e indicando que o composto pode ser tetracíclico.

Os dados sugeriram uma estrutura de um triterpeno tetracíclico, e a interpretação detalhada dos espectros de COSY (H-H), HMQC, HMBC e NOE levou à proposição da estrutura apresentada na Figura 15.

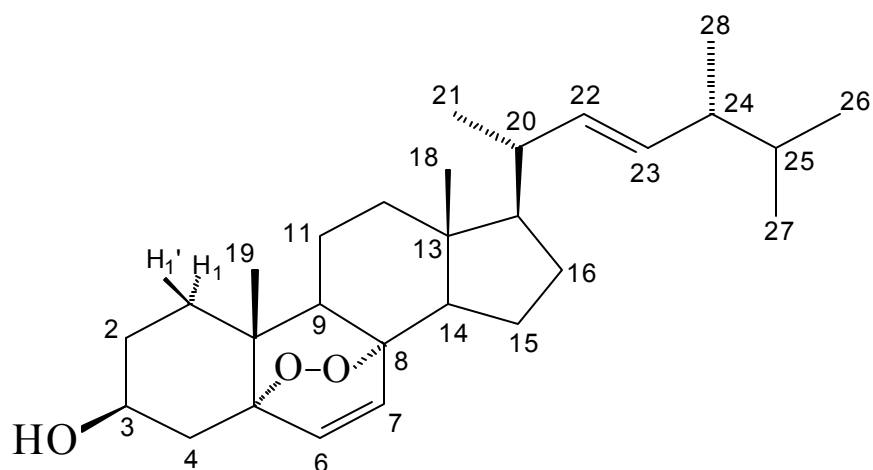


Figura 15 - Estrutura química do peróxido de ergosterol.

Quadro 15 - Dados de RMN ^{13}C (100 MHz), ^1H (400 MHz) δ (mult., J Hertz)) e correlações COSY (HH) e HMBC (H-C) do peróxido de ergosterol

nº	^{13}C NMR	^1H NMR	^1H - ^1H COSY	HMBC (H-C)
7	130,6	6,49 (d, 8,4)	6	5, 8, 9, 14
6	135,6	6,23 (d, 8,4)	7	5, 8, 10
23	132,2	5,13 (dd, 15,2, 8,1)	22, 24	28, 22, 20, 24
22	135,1	5,21 (dd, 15,2, 7,4)	23, 20	23, 17, 24, 21
5	82,0			
8	79,3			
3	66,3	3,96 (tdd, 11,4, 5,4, 9)	4, 4', 2, 2'	
17	56,1	1,15 (m)	20, 16', 16, 21	16, 12
9	51,6	1,49 (m)		7, 8
14	51,4	1,43 (m)		7, 6, 8, 9, 13
13	44,4			
24	42,6	1,78 (m)	28, 25, 23	23, 22, 25, 28, 27, 26
20	39,6	1,94 (m)	23, 17, 22	
16	39,2	1,86 (m)	16', 17	18
16'		1,16 (m)	16, 17	13, 14, 18

4	36,9	2,05 (dd, 13,6, 5,4)	4', 3	5, 3, 10, 2
4'		1,82 (dd, 13,6, 11,4)	4, 3	5, 3, 2
10	36,8			
1	34,6	1,88 (m)	1', 2, 2', 19	6, 5, 3, 10, 2, 19
1'		1,63 (m)	1, 2, 2', 19	5, 3, 10, 2, 19
25	32,9	1,39 (m)	27, 26, 24	27, 26, 24
2	29,9	1,75 (m)	2', 3, 1, 1'	
2'		1,45 (m)	2, 3, 1, 1'	
12	27,9	1,70 (m)	12', 11', 11	
12'		1,26 (m)	12	
15	23,3	1,39 (m)	15'	
15'		1,13 (m)	15	
11	20,5	1,53 (m)	12, 11'	
11'		1,33 (m)	12, 11	
21-Me	20,8	0,98 (d, 6,6)	20, 17	22, 17, 20
28-Me	17,4	0,89 (d, 6,9)	24	23, 25, 24
19-Me	18,1	0,87 (s)	1, 1'	5, 9, 10, 1
27-Me	19,9	0,82 (d, 6,6)	25	24, 25, 26
18-Me	12,7	0,80 (s)		14, 17, 13
26-Me	19,5	0,80 (d, 6,6)	25	24, 25, 27
OH		2,1		

O sinal em δ 3,96 foi atribuído a H3, e esse acoplamento sugeriu que o grupo OH fosse equatorial. O espectro de COSY mostrou correlações do H3 com hidrogênios em δ 2,05, 1,82, 1,75 e 1,42, sendo estes os sinais dos hidrogênios H4, H4', H2 e H2', respectivamente. Também pelo espectro de COSY, observando sinais de H2 e H2' em δ 1,63 e δ 1,88, foi possível estabelecer as posições de H1' e H1, respectivamente. As correlações nos espectros de HMBC de H6 (δ 6,23) com C5 (δ 79,3) e H7 (δ 6,49) com C8 (δ 82,0) foram consistentes com os outros dois hidrogênios do anel peróxido nos carbonos C5 (δ 79,3) e C10 (δ 36,8). As correlações do sinal em δ 0,87 (19-Me) com os carbonos C5 (δ 79,3), C10 (δ 36,8), C1 (δ 34,6) e C9 (δ 51,6) foram consistentes com o grupo metila do carbono C10.

O duplete em δ 0,98 foi atribuído ao grupo metila do carbono C20 (21-Me), com base nas correlações com os carbonos C20 (δ 39,6), C17 (δ 56,1) e C22 (δ 135,1).

A posição do grupo 28-Me (duplete em δ 0,89) foi confirmado pela correlação dos carbonos 23 (δ 132,2), 24 (δ 42,6) e 25 (δ 32,9). No espectro de COSY, ambos 27-Me e 26-Me foram correlacionados com H25, provando a existência do grupo isopropil. A confirmação de tal fato veio pelo espectro de HMBC, que revelou a correlação entre ambos os grupos (27-Me e 26-Me).

A correlação entre 21-Me e H20 no espectro de COSY (H-H) e outras correlações de 21-Me e H22, H17 e H20 no espectro de HMBC, finalmente, confirmaram a estrutura da cadeia lateral. As correlações a longa distância do hidrogênio do 18-Me com os carbonos 14, 17 e 13 levaram ao posicionamento da cadeia lateral no carbono 17.

A estereoquímica relativa do peróxido de ergosterol foi descoberta pelo espectro diferencial de NOE diff. (Quadro 16) e confirmada pelos dados da literatura (BARTON et al., 1972). A irradiação em 5-Me (δ 0,80) não resultou em

nenhuma intensificação do sinal de H14, suportando a estereoquímica *trans* para a junção do anel C/D. Uma pequena intensificação foi observada em H23 e H22, o que foi consistente com a orientação β da cadeia lateral. Um forte efeito observado na ressonância de H7 e uma perda no sinal em H9 deram suporte à orientação α do carbono 8 e também à estereoquímica *cis* para a junção B/C do anel.

A irradiação em 3-me (δ 0,87) resultou numa intensificação dos sinais de H7, H1 e H1', sendo consistente com a estereoquímica *trans* da junção A/B do anel com o oxigênio no carbono 5, sendo uma orientação β . Na Figura 2B do Apêndice B está apresentado o espectro de RMN de ^{13}C do peróxido de ergosterol.

O peróxido de ergosterol já foi isolado em outras culturas de fungos do gênero *Ganoderma lucidum* (LIN et al., 1990) e *Alnus glutinos* (KAHLOS e HILTUNEN, 1989). Em culturas de *Aspergillus versicolor* não foi encontrado nenhum relato de identificação desse composto.

O peróxido de ergosterol possui atividade antitumoral, relatada em experimentos realizados em carcinomas humanos (KAHLOS e HILTUNEN, 1989).

Quadro 16 - Dados de NOE para o peróxido de ergosterol

Irradiação	NOE
0,80 (18)	H-7 (6,3%), H-23, H-22, H-20 (6,3%), H-15', H-16', H-12', H-11', H-21
0,87 (19)	H-6 (3,4%), H-4' (6,8%), H-1' (3%), H-11+11' (13,6%), H-7 (1%)
0,98 (21)	H-23 (2,3%), H-22 (2,5%), H-20 (9,7%), H-18
20,5 (H4)	H-6 (2%), H-3 (5,7%), H-4' (15%)
3,96 (H3)	H-4 (3,6%), H-2 (3,6%), H-1' (3,6%)
5,13 (H23)	H-20 (8,2%), H-24 (8,2%), H-21 (1,4%), H-27, H-26
5,21 (H22)	H-20 (4,2%), H-24 (5,8%), H-17 (4,2%), H-23 (0,8%)

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste estudo, foi testado o efeito de produtos fermentados por fungos dos gêneros *Monascus ruber* e *Aspergillus versicolor* sobre os níveis séricos de colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis, em ratos, por meio de ensaios de curta e longa duração. No primeiro experimento, de curta duração, com aplicação de Triton, os animais receberam os extratos metanólicos do arroz fermentado pelos fungos *M. ruber* e *A. versicolor*, em doses de 2,0 g/ animal, além do arroz fermentado pelo fungo *M. ruber*, administrados na dieta. No segundo experimento, foi fornecido à dieta o arroz fermentado por *M. ruber* mais colesterol e ácido cólico na dieta, com a finalidade de se determinar a atividade hipolipidêmica desse alimento. Os resultados não foram totalmente satisfatórios, mas apresentaram tendência de redução do colesterol total em grupos de animais tratados com o arroz fermentado por *M. ruber*.

A busca de monacolininas nos meios fermentados por *M. ruber* e *Aspergillus versicolor* revelou que nenhuma forma dessa classe de compostos foi detectada por

meio da análise em CLAE, vendo-se a necessidade de novos estudos para se conhecer as propriedades biológicas desse produto fermentado.

Aliado a este estudo, foi feito o estudo químico dos extratos metanólicos de *M. ruber* e *A. versicolor*, em que se identificou por meio de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) a ausência da mevinolina. Entretanto, realizou-se um estudo do extrato de *A. versicolor* utilizando fracionamento em coluna de sílica-gel, onde foram isolados e determinados, por meio de RMN (ressonância magnética nuclear), EM e IV, dois novos compostos da classe das lactonas, desconhecidas até então na literatura, sendo, portanto, consideradas inéditas. Estas lactonas foram testadas biologicamente, determinando-se a atividade inseticida de uma delas, com redução de 72,5% em relação ao grupo-controle (CARVALHO et al., 2001). Ainda do extrato de *A. versicolor* foi isolado o peróxido de ergosterol, ao qual, segundo a literatura, é atribuída propriedade anticarcinogênica, que não foi determinada neste estudo (CARVALHO et al., 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M. L., BRAGULAT, M. R., CASTELLÁ, G., ACCENSI, F., CABAÑES, F. J. New ochratoxigenic species in the genus *Aspergillus*. **Journal of Food Protect.**, V. 60, p. 1580-1582, 1997.
- ABRAMSON, D., CLEAR, R. M. A convenient method for assessing mycotoxin production in cultures of *Aspergilli* and *Penicillia*. **Journal of Food Protect.** V 59, p. 642-644, 1996.
- ALBERTS, A. W. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. **The American Journal of Cardiology.** V. 62, p. 10J-15J, 1988.
- ALBERTS, A. W. Lovastatin and Simvastatin - inhibitors of HMG-CoA reductase and cholesterol biosynthesis. **Cardiology.** V. 77, p. 14 – 21, 1990.
- BADIMON, J. J., FUSTER, V., BADIMON, L. Role of high density lipoprotein in the regression of atherosclerosis. **Circulation.** V. 86, p. 86-94, 1992.
- BARTON, D. H. R., LECLERC, G., MAGNUS, P. D., MENZIES, I. D. An unusual synthesis of ergosterol acetate peroxide. **J. C. S. Chem. Comm.** V. p. 447-449, 1972.

- BLANC, P. J., LAUSSAC, P. J., BARS, J., BARS, P., LORET, M. O., PAREILLEUX, A., PROMÉ, D., PROMÉ, J. C., SANTERRE, A. L., GOMA, G. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. **International Journal of Food Microbiology**. V. 27, p. 201-213, 1995.
- BLANC, P. J., LORET, M. O., SANTERRE, A. L., PAREILLEUX, A., PROMÉ, D., PROMÉ, J. C., LAUSSAC, J. P., GOMA, G. Pigments of *Monascus*. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 4, p. 862-865, 1994.
- BRODY, T. **Nutrition Biochemistry**. Califórnia: Academic Express, 1994. 58p.
- BROWN, M. S., FAUST, J. R. GOLDSTEIN, L. Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-263B), a competitive inhibitor of the reductase. **Journal of Biological Chemistry**. v. 253, p. 1121-1128, 1978.
- CARVALHO, M. R., QUEIROZ, J. H., BARBOSA, L. C. A., HOWARTH, O.W. Chemical constituentes from *Aspergillus versicolor*. **22nd Int. Symp. Chem. Nat. Prod.** São Carlos, Brasil, 4-8 de setembro de 2000.
- CARVALHO, M. R., QUEIROZ, J. H., BARBOSA, L. C. A., HOWARTH, O.W. Novel lactones from *Aspergillus versicolor*. **Tetrahedron Letters**. v. 42, p. 809-811, 2001.
- CERVATO, A. M., MAZZILLI, R. N., MARTINS, I. S., MARUCCI, M. F. N. Dieta habitual e fatores de risco para doenças cardiovasculares. **Rev. Saúde Pública**, v. 31, n. 3, p. 227-235, 1997.
- COSTA, N. M. B., WALKER, A. F., LOW, A. G. The effect of graded inclusion of baked beans (*Phaseolus vulgaris*) on plasma and liver lipids in hypercholesterolaemic pigs given a Western-type diet. **British Journal of Nutrition**, v. 70, p. 515-524, 1993.
- DUJOVNE, C. A., CHREMOS, A. N., POOL, J. L., SCHNAPER, H., BRADFORD, R. H., SHEAR, C. L., HIGGINS, J., DOWNTON, M., FRANKLIN, F. A., NASH, T. D., GOULD, A. L., LANGENDÓ RFER, A. Expanded clinical evaluation of Lovastatin (EXCEL) study results: IV. Additional perspectives on the tolerability of Lovastatin. **The American Journal of Medicine**. V. 91 (suppl 1B) p. 1B-25S-1B-30S, 1991.
- DUTRA DE OLIVEIRA, J. E., MARCHINI, J. S. **Ciências Nutricionais**. Ed. Sarvier. São Paulo, 1998.

- ENDO, A. Biosynthesis of ML-236B (compactin) and monacolin K. **Journal of Antibiotics**, V. 38, n. 3, p.444-448, 1985.
- ENDO, A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *monascus* species. **Journal of Antibiotics**, V. 32, n. 8, p.852-854, 1979.
- ENDO, A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase. **Journal of Antibiotics**, V. 33, n. 3, p.334-336, 1980.
- ENDO, A., HASUMI, K. Dihydrimonacolin J and monacolin X new metabolites those inhibit cholesterol biosynthesis. **Journal of Antibiotics**, V.33, n. 3, p. 321-327, 1985.
- ENDO, A., HASUMI, K., NEGISHI, S. Monacolins J and L new inhibitors of cholesterol biosynthesis produced by *Monascus ruber*. **Journal of Antibiotics**, V.38, n. 3, p. 420-422, 1985 (a).
- ENDO, A., HASUMI, K., YAMADA, A., SHIMODA, R., TAKESHIMA, H. The synthesis of compactin (ML-236B) and monacolin K in fungi. **Journal of Antibiotics**, V.39, n. 11, p. 1609-1610, 1986 (a).
- ENDO, A., KOMAGATA, D., SHIMADA, H. Monacolin K, a new inhibitor of cholesterol biosynthesis. **Journal of Antibiotics**, V. 39, n. 12, p. 1670-1673, 1986 (b).
- ENDO, A., NEGISHI, Y., IWASHITA, T., MIZUKAWA, K., HIRAMA, M. Biosynthesis of ML-236B (compactin) and monacolin K. **Journal of Antibiotics**, V. 38, n. 03, p. 444-448, 1985 (b).
- FABRE, C. E., SANTARRE, A . L., LORET, M. O., BABERIAN, R., PAREILLEUX, G. G., BLANC, P. J. Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber* **Journal of Food Science**, v. 58, n. 5, p. 1099-1102, 1993.
- FARMER, U. A., GOTTO A. M. Risk factors of coronary disease. In: BRAUNWALD, E. **A textbook of cardiovascular medicine**. Philadelphia: W B Saunders, 1992, p. 1135-1139.
- FRIEDRICH, J., ZUZEK, M., BENCINA, M., CIMERMAN, A., STRANCAR, A., RADEZ, I. High-performance liquid chromatographic analysis of mevinolin as mevinolinic acid in fermentations broths. **Journal of Chromatography**, V. 704, p. 363 - 367, 1995.

- GOMES, S. M. **Efeito de flavonóides no metabolismo lipídico.** Viçosa-MG, UFV, 1998. 95 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) Universidade Federal de Viçosa, 1998
- GULLO, V., GOEGELMAN, R., PUTTER, I., LAM, Y. High- performance liquid chromatographic analysis of derivatized hypocholesteremic agents from fermentation broths. **Journal of Chromatography**, V. 212, p. 234-238, 1981.
- GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica.** 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 864p.
- HAWKSWORTH, D. L., PITT, J., I. A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural and microscopical characters. **Australian. J. Bot.** V. 31, p. 51-61, 1983.
- ISHIKAWA, T., FIDGE, N. Changes in the concentration of plasma lipoproteins and apoproteins following the administration of Triton WR 1339 to rats. **Journal of Lipid Research.** V. 20, p. 254-264, 1979.
- JUZLOVÁ, P., MARTÍNKOVÁ, L., KREN, V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. **Journal of Industrial Microbiology.** V. 16, p. 163-170, 1996.
- KAHLOS, K., HILTUNEN, R. Antitumour activity of extracts and compounds from *Inonotus radiatus*. **Fitoterapia.** V. LX, n. 2 p. 166-168, 1989.
- KYSILKA, R., KREN, V. Determination of lovastatin (mevinolin) and mevinolinic acid in fermentation liquids. **Journal of Chromatography.** V. 630, p. 415-417, 1993.
- KOHAMA, Y., MATSUMOTO, S., MIMURA, T., TANABE, N., INADA, A., NAKANISHI, T. Isolation and identification of hipotensive principles in red-mold rice. **Chemical Pharm. Bull.** V. 35, n. 6, p. 2484-2489, 1987.
- KOMAGATA, D., SHIMADA, H., MURAKAWA, S., ENDO, A. Biosynthesis of monacolins: conversion of monacolin L to monacolin J by a monooxygenase of *Monascus ruber*. **Journal of Antibiotics.** V. 42, n. 03. P. 407-412, 1989.
- KRITCHEVSKY, D., TEPPER, S., KLURFELD, D. Influence of mevinolin on experimental atherosclerosis in rabbits. **Pharmacological Research Communications**, V. 13, n. 10, p.921-926,1981.

- KROON, P. A., HAND, K. M., HUFF, J. W., ALBERTS, A. W. The effects of mevinolin on serum cholesterol levels of rabbits with endogenous hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, V. 44, p. 41-48, 1982.
- KRAUSE, M. V., MAHAN, L. K. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, 1995. 1052p.
- KUMAGAI, H., TOMODA, H., OMURA, S. Method of search for microbial inhibitors of mevalonate biosynthesis using animal cells. **The Journal of Antibiotics**, V.43, n. 4, p. 397-402, 1990.
- KYSILKA, R. Determination of lovastatins (mevinolin) and mevinolinic acid in fermentation liquids. **Journal of Chromatography**, V. 630, p. 415-417, 1993.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. **Princípios de bioquímica**. 2ª. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.
- LI, C., ZHU, Y., WANG, Y., ZHU, J. -S., CHANG, J., KRITCHEVSKY, D. Monascus purpureus-fermented rice (red yeast rice): a natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia. **Nutrition Research**. V. 18, n. 1, p. 71-81, 1998.
- LIN, C. -N., TOME, W. -P., WON, S. -J. A lanostanoide of formosan *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**. V. 29, n. 2, p. 673-675, 1990.
- MARTÍNKOVÁ, L., JUSLOVÁ, P., VESELÝ, D. Biological activity of polycetide pigments produced by the fungus Monascus. **J. Applied Bacteriology**. V 79, p. 609-616, 1995.
- MONTEIRO, J. B. R., ROSADO, L. E. F. P. L. **Nutrição e doenças cardiovasculares**. Viçosa, MG: UFV, 1993. 52p.
- NAKAMURA, C. E., ABELES, R. H., Mode of interaction of β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase with strong binding inhibitors: Compactin and related compounds. **Biochemistry**. v. 24, p. 1364-1376, 1985.
- NAKAMURA, T., KOMAGATA, D., MURAKAWA, S., SAKAI, K., ENDO, A. . Isolation and biosynthesis of 3- α -hydroxy-3,5-dihydromonacolin L. **The Journal of Antibiotics**, V.43, n.12, p. 1597-1600, 1990.

- NOZAKI, H., DATE, S., KONDO, H., KIYOHARA, H., TAKAODA, D., TADA, T., NAKAYAMA, M. Ankalactone, a new α,β -unsaturated γ -lactone from *Monascus anka*. **Agric. Biol. Chem.** V. 55, p. 899-900, 1991.
- PAULA, V. F., BARBOSA, L. C. A., DEMUNER, A. J., VELOSO, D. P., PIKANÇO, M. C. Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. **Pest Management Science.** V. 56, p. 168-174, 2000.
- PEREIRA, W. L. **Efeito hipolipidêmico de flavonóides, corantes naturais e suas associações.** Viçosa-MG, UFV, 1999. 138 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- PLUMP, A. S., SMMITH, J. D., HAYEK, T., ALTO-SETALA, K., VERSTUYFT, J. G., RUBIN, E. M., BRESLOW, J. L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in cels. **Cell**, v.71, p. 343-353, 1992.
- QUINTÃO, E. **Manual de referências em dislipidemias.** São Paulo, SP: FMUSP, 106P.
- REEVES, P. G., NILSEN, F. H., FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76^A rodent diet. **American Institute os Nutririon**, V. 22, p. 1939-1951, 1993.
- RUBINSTEIN, A., LURINE, Y., GROSKOP, I. Cholesterol-lowering effects of lovastatin in patients with initial total cholesterol levels 200 to 240 mg/dl (5.18 to 6.21 mmol/ liter). **The American Journal of Cardiology.** V. 68, n. 11, p. 1123-1126, 1991.
- ROSSOUW, J. Current in lipid lowering therapy: treatment of hyperlipidaemia in the young, in the elderly and in women. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, V.4, p. 81-88, 1990.
- RUSSEL, D. W. Cholesterol biosynthesis and metabolism. **Cardiovascular Drugs Therapy.** V.6, p. 103-110, 1992.
- SHILS, M. E., OLSON, J. A., SHIKE, M. **Modern nutrition in health and disease.** V. 2, cap. 70, 8. Ed. Philadelphia: Lea e Fediger, p. 1277-1278, 1994. .
- SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRIL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds.** 5 ed. New York: John Wiley & Sons, 1991. 564p.

- SMITH, E.L., HILL, R. L., LEHMAN, I. R. **Bioquímica; mamíferos**. 7. ed. São Paulo: Guanabara, 1983. 620p.
- TSUJITA, Y., KURODA, M., SHIMADA, Y., TANZAWA, K., ARAI, M., KANEKO, I., TANAKA, M., MASUDA, H., TARUMI, C., WATANABE, Y.,FUJII, S. CS-514, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase: tissue-selective inhibition of sterol synthesis and hypolipidemic effect on various animal species. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 877. p 50-60, 1986.
- WANG, J., LU, Z., CHI, J., WANG, W., SU, M., KOU, W., YU, P., YU, L., CHEN, L., ZHU, J., CHANG, J. Multicenter clinical trial of the serum lipid-lowering effects of a *Monascus purpureus* (red yeast) rice preparation from traditional chinese medicine. **Current Therapeutic Research**. V.58, n. 12, p. 964-978, 1997.
- WONG, H. C., BAU, Y. S. Pigmentation and antibacterial activity of fast neutron- and X-ray-induced strains of *Monascus purpureus*. **Went. Plant Physiology**. V. 60, p. 578-581, 1977.
- WONG, H., C., KOEHLER, P., E. Production and isolation of na antibiotic from *Monascus purpureus* and relationship to pigment production. **Journal of Food Science**. V.46, p. 589-592, 1981.
- WOOLLETT, L. A., DIETSCHY, J. M. Effect of long-chain fatty acids on low-density-lipoprotein-cholesterol metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**. V. 60 (suppl), p. 991S-996S, 1994.
- YOSHIZAWA, Y., WITTER, D., LIU, Y.,VEDERAS, J. Revision of the biosynthetic origin of oxigens in Mevinolin (Lovastatin) a hypocholesterolemic drug from *Aspergillus terreus* MF 4845. **J. American Chemical Society**. V. 116 p. 2693-2694, 1994.
- ZHU, B., Q., SIEVERS, R.,E., SUN, Y., P., ISENBERG, W., M., PARMLEY, W., W. Effect of lovovastatin on suppression and regression of atherosclerosis in lipid-fed rabbits. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. V. 19, p. 246-255, 1992.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Quadro 1A - Resumo da análise de variância de colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis de ratos submetidos a diferentes dietas

FV	GL	Quadrado médio		
		Colesterol total	HDL	Triacilgliceróis
Tratamentos	(5)	401,9803 ns	64,3834 *	1.007,1330 *
Controles (C)	1	784,0000 ns	150,0625 **	12,2500 ns
Tratados (T)	3	245,2828 ns	11,3636 ns	1.050,2500 ns
C vs T	1	488,2531 ns	137,7607 *	1.872,6650 *
Resíduo	42	193,3415	18,9940	389,1964
CV (%)		12,31	12,85	26,38

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 2A - Resumo da análise de variância de colesterol total, colesterol HDL e triacilgliceróis de ratos submetidos a diferentes dietas

FV	GL	Quadrado médio		
		Colesterol total ^{1/}	HDL ^{1/}	Triacilgliceróis ^{1/}
Tratamentos	(3)	0,0518 *	0,0464 **	0,2729 **
Controles (C)	1	0,0938 *	0,1113 **	0,7124 **
Tratados (T)	1	0,0178 ns	0,0075 ns	0,0518 ns
C vs T	1	0,0438 ns	0,0204 ns	0,0545 ns

Resíduo	28	0,0132	0,0053	0,0215
CV (%)		5,66	4,65	8,35

** F significativo a 1% de probabilidade.
* F significativo a 5% de probabilidade.
ns F não-significativo a 5% de probabilidade.
1/ Valores transformados para log (x).

Quadro 3A - Resumo da análise de variância de ganho de peso, consumo e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) de ratos submetidos a diferentes dietas

FV	GL	Quadrado médio		
		Ganho de peso ^{1/}	Consumo	CEA ^{1/}
Tratamentos	(3)	0,0584 **	235,4753 ns	0,0481 **
Controles (C)	1	0,0873 **	668,2226 ns	0,0513 **
Tratados (T)	1	0,0878 **	0,1406 ns	0,0923 **
C vs T	1	0,0001 ns	38,0627 ns	0,0007 ns
Resíduo	28	0,0096	190,7104	0,0055
CV (%)		5,26	10,70	-29,65

** F significativo a 1% de probabilidade.
ns F não-significativo a 5% de probabilidade.
1/ Valores transformados para log (x).

APÊNDICE B

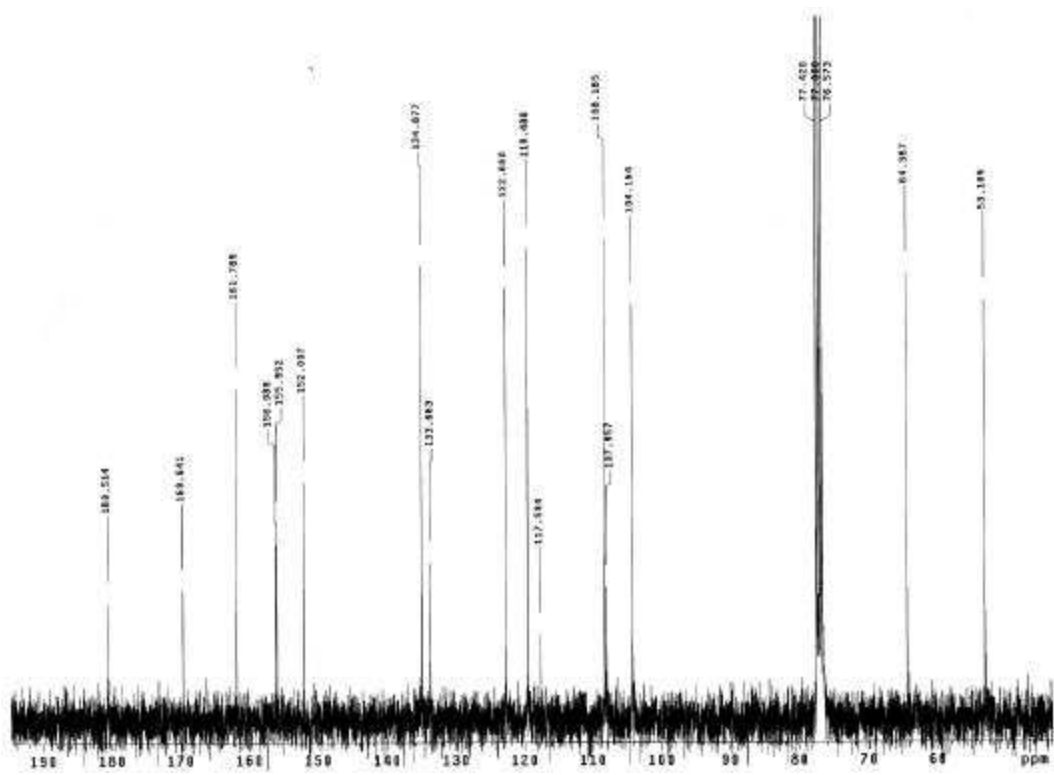


Figura 1B - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da fração M1(5).

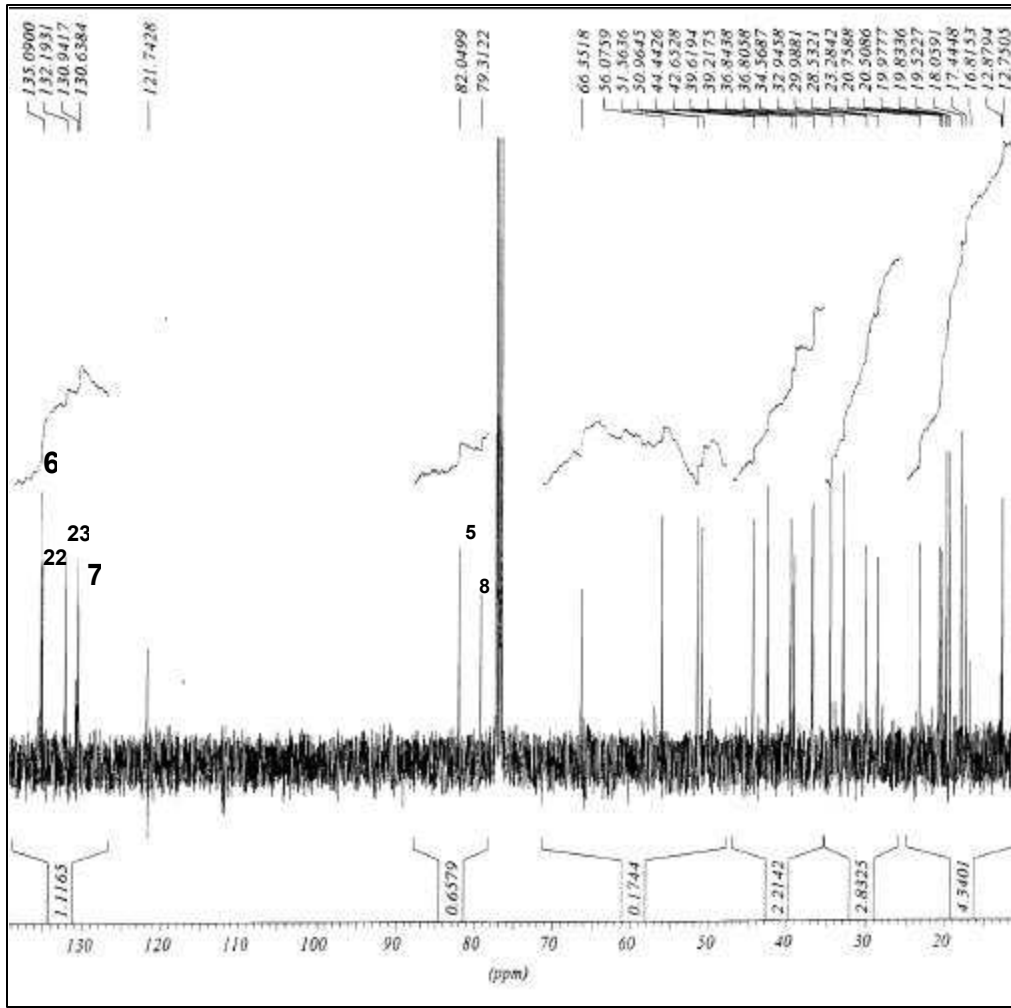


Figura 2B - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do peróxido de ergosterol.