GUILHERME AUGUSTO TEIXEIRA

**Estudo da produção de monacolina k por *Monascus Ruber* Van Tiegham e
secagem do extrato por spray dryer**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas

Ribeirão Preto

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE**

Catálogo na Publicação
Serviço de Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Teixeira, Guilherme Augusto

Estudo da produção de monacolina K por *Monascus Ruber* Van Tieghem e secagem do extrato por spray dryer / Guilherme Augusto Teixeira; orientador Luis Alexandre Pedro de Freitas – Ribeirão Preto, 2007.

125 p. : il. ; 30cm

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

1- *Monascus ruber* – monacolina K. 2 – pigmentos – spray dryer –. 3 – CLAE – validação. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Guilherme Augusto Teixeira

Estudo da produção de monacolina k
por *Monascus Ruber* Van Tiegham e
secagem do extrato por spray dryer

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Mestre. Área de Concentração:
Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

*À minha querida esposa, Cristiane Cardoso
Correia Teixeira pelo incentivo, apoio e carinho.
Sem você, a realização deste trabalho não seria
possível. Muito obrigado!*

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Luiz Antônio Teixeira Ruy
e Maria Zuleide Leoni Teixeira com
muito amor e carinho...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram direta e indiretamente neste trabalho.

Ao Bom Deus, pela benção da vida, pelas felizes inspirações que recebi e por todas as pessoas que colocaste em meu caminho durante este trabalho e que muito contribuíram para a sua realização.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas, pela confiança, paciência, compreensão, ensinamentos e dedicação.

À Profa. Dra. Maria José Vieira da Fonseca, pelo auxílio prestado na validação da cromatografia líquida de alta eficiência e que, gentilmente cedeu espaço para a realização desta.

Ao amigo Franklin Carlos Tomazini, Técnico do Laboratório de Física Industrial, pelo auxílio na montagem dos equipamentos, pelo carinho e amizade a mim dispensada.

Ao Técnico José Roberto Jabor do Laboratório de Controle de qualidade, pela paciência, pela dedicação e pelos ensinamentos.

Às amigas Flávia, Técnica do Laboratório de Física Industrial e Vivian Ruiz, estagiária do Laboratório de Física Industrial, pelo auxílio nos experimentos de fermentação. A ajuda de vocês foi indispensável para a realização deste trabalho.

Aos pós-graduandos e estagiários do Laboratório de Física Industrial, pelo convívio, amizade, e esclarecimentos.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

Ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, pela oportunidade na realização do curso de Mestrado.

Enfim, a todos meu MUITO OBRIGADO!

*“Deus Quer, o homem sonha, a obra
nasce”*

Fernando Pessoa

RESUMO

Monascus é um fungo ascomiceto tradicionalmente utilizado na China. Os povos orientais utilizam o produto de sua fermentação em arroz não aglutinado, ao qual dão o nome de "Angkak", e no inglês, "Red yeast rice". Sabe-se que este extrato contém substâncias hipocolesterolêmicas, como a Monacolina K, inibidor competitivo da enzima HMG-CoA. Este trabalho se insere neste contexto uma vez que consiste na otimização da fermentação e secagem do extrato de *Monascus ruber*. Embora já existam estudos sobre a atividade biológica deste extrato, os quais comprovam seus benefícios, não há muitos estudos que visam otimizar a sua fermentação em meio submerso e a secagem do extrato. Para tanto, foram avaliados diversos parâmetros na fermentação através de dois planejamentos fatoriais. No primeiro planejamento, as variáveis estudadas foram o meio de cultura (meio arrozina-glicose e meio sólido de arroz) e agitação (0 rpm e 10 rpm). A agitação promoveu um leve aumento na produção de monacolina-K, já o meio líquido foi mais eficiente na produção desta substância do que o meio sólido de arroz. Baseado neste experimento escolheu-se o meio fermentativo para os demais estudos. No segundo experimento as variáveis estudadas foram a adição no meio arrozina-glicose de zinco, amônio e glutamato. Neste experimento pôde-se verificar que a produção de monacolina K e de pigmentos foi maior no meio com concentrações intermediárias de zinco e de glutamato e com concentrações maiores de amônio. No estudo da secagem, realizou-se um planejamento Box – Benkhin, a fim de se avaliar a influência da proporção do adjuvante: fármaco, do tempo de incorporação do excipiente e da temperatura sobre características do extrato seco como: densidade aparente, densidade de compactação, fator de Hausner, umidade residual, atividade de água, atividade antioxidante e teor de monacolina K. Em relação à proporção do adjuvante: droga pode-se afirmar que a menor produz pós com menor atividade de água e teor de umidade, porém todos os pós obtidos tiveram seu teor de umidade e atividade de água dentro do ideal e a análise estatística mostrou que a proporção do adjuvante: droga não influenciou de forma significativa a atividade de água e o teor de umidade; a proporção 7,5:1 produz melhor rendimento e pós com melhores propriedades de fluxo, por possuírem menores valores de índice de compressibilidade e fator de hausner, já com a proporção 10:1 fornece pós com maior teor de monacolina e maior atividade antioxidante. Em relação à temperatura pode-se afirmar que utilizando-se 50°C obteve-se pós com melhores propriedades de fluxo, ou seja, menor índice de compressibilidade e menor e fator de hausner. Utilizando temperatura de 80°C obteve-se menor atividade antioxidante, maior rendimento e maior teor de monacolina K. Contudo, a análise estatística mostrou que a temperatura não influenciou de forma significativa o teor de monacolina K. Com uma temperatura maior, 110°C obteve-se menor teor de umidade e maior teor de pigmentos vermelhos. Em relação ao tempo de mistura do adjuvante pode-se afirmar que com 1 minuto obteve-se maior teor de pigmentos e pós com melhores propriedades de fluxo, com 5 minutos obteve-se menor teor de pigmentos, maior rendimento, maior teor de monacolina K e menor atividade de água, já com 10 minutos obteve-se menor teor de umidade e maior porcentagem de inibição. A análise estatística demonstrou que o tempo de mistura não influencia de forma significativa a atividade antioxidante.

SUMMARY

Monascus ruber is an ascomycete fungus traditionally used in China. Eastern peoples use the product of its fermentation in rice non-agglutinated, which they call 'Ang-kak' (red yeast rice, in English). It is known that this extract contains hypocholesterolemic substances such as the Monacoline K, a competitive inhibitor of the HMG-CoA enzyme. This work comes into this context since it consists in the optimization of the fermentative and drying processes of the *Monascus ruber*'s extract. Despite the existence of studies on the biological activity of this extract, which support its benefits, not many aimed at optimizing the fermentative process in submerged conditions and the drying of the extract. This work aimed at optimizing the fermentative process and the drying of the *Monascus ruber*'s extract. In order to do such, several parameters of the fermentative process were evaluated through two factorial plannings. In the first one, the variables studied were the modes of culture (liquid culture and solid-state culture) and agitation (0 rpm and 10 rpm). Agitation led to a slight increase in the production of Monacoline-K, and the liquid culture was more efficient in the production of this substance than the solid-state culture. Based on these findings, the fermentative substrate for the following experiments was chosen. In the second experiment, the variables studied were the addition of zinc, ammonium and glutamate in the liquid culture. It was observed that the production of monacoline-k and pigments was increased in the substrates with intermediary concentrations of zinc and glutamate and higher concentration of ammonium. In the drying study, a Box-Benkhin planning was adopted in order to assess the influence of the adjuvant: drug proportion, excipient incorporation time and temperature over the characteristics of the dried extract, such as: apparent density, compactation density, Hausner factor, residual humidity, water activity, antioxidant activity and monacoline-K levels. Regarding the adjuvant: drug proportion, it can be stated that the 5:1 proportion produces powders with smaller water activity and humidity levels, however, all the powders obtained presented humidity levels and water activity within the ideal and, besides that, the statistical analysis showed that the adjuvant: drug proportion had no significant influence on water activity or humidity levels; the proportion of 7,5:1 produces greater quantities and powders with better flow properties, since they have lower values of IC and FH; and with the proportion of 10:1, powders with higher levels of monacoline-K and greater antioxidant activity can be obtained. Concerning temperature, it was observed that powders with better flow properties (lower IC and FH) were obtained at 50°C. At 80°C, lower antioxidant activity, greater quantities and higher levels of monacoline-K were observed, however, the statistical analysis showed that the temperature had no significant effect on the levels of monacoline-K. With a higher temperature (110°C), lower humidity levels and higher red pigment levels were obtained. Concerning the mix time adjuvant: drug proportion, it can be stated that with 1 minute higher levels of pigment and powders with better flow properties were obtained; lower levels of pigment, greater quantities, higher levels of monacoline-K and lower water activity were obtained with 5 minutes and; lower humidity level and greater percentage of inhibition were observed with 10 minutes, however, the statistical analysis showed that the mix time has no significant influence on the antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via Metabólica.....	26
Figura 2 - Formas de reprodução do gênero <i>Monascus</i> ilustrando a formação de cadeia de conídeos após 2 dias crescendo em BDA.....	29
Figura 3 – Morfologia do fungo ascomiceto, <i>Monascus ruber</i>	29
Figura 4 – Estruturas químicas dos pigmentos de <i>Monascus ruber</i>	30
Figura 5 – Estrutura química da monacolina – K.....	32
Figura 6 – Esquema da transformação da HMG-CoA em mevalonato, pela enzima HMG-CaA redutase.....	33
Figura 7 – Esquema simplificado da síntese de colesterol (DEVLIN, 2003).....	33
Figura 8 – Biossíntese e distribuição do colesterol.....	34
Figura 9 – Spray dryer.....	43
Figura 10 – Fatores que afetam o resultado da secagem.....	45
Figura 11- Cubo de experimentos com três variáveis e dois níveis	49
Figura 12 - Planejamento Box-Behnken para 3 variáveis.....	50
Figura 13 – Equipamento utilizado para realização da fermentação.....	57
Figura 14- Equipamento para medida de atividade de água.	68
Figura 15 – Cromatograma do padrão lovastatina (A) e do extrato de <i>Monascus ruber</i> (B)....	70
Figura 16 - Curva analítica das 13 concentrações do padrão lovastatina.....	71
Figura 17 – Gráficos das respostas relativas <i>versus</i> log da concentração.....	71
Figura 18 – Curva analítica com concentrações dentro da faixa linear.....	72
Figura 19 - Gráfico de superfície de resposta do teor de monacolina K em função do teor de amônio (NH ₄) e glutamato (GMS).....	81
Figura 20 - Gráfico de superfície de resposta do teor de monacolina K em função do teor de zinco (Zn) e amônio (NH ₄).....	81
Figura 21 - Gráfico de superfície de resposta do teor de monacolina K em função do teor de zinco (Zn) e glutamato (GMS).....	82
Figura 22 - Gráfico de superfície de resposta da razão $ABS^{500}/_{400}$ em função do teor de amônio (NH ₄) e glutamato (GMS).....	83
Figura 23 - Gráfico de superfície de resposta do teor da razão $ABS^{500}/_{400}$ em função do teor de zinco (Zn) e amônio (NH ₄).....	83

Figura 24 - Gráfico de superfície de resposta da razão $ABS^{500}/_{400}$ em função do teor de zinco (Zn) e glutamato (GMS).....	84
Figura 25 - Gráfico de superfície de resposta da razão a/b em função do teor de zinco (ZN) e glutamato (GMS).....	85
Figura 26 - Gráfico de superfície de resposta do teor da razão a/b em função do teor de zinco (Zn) e amônio (NH_4).....	85
Figura 27 - Gráfico de superfície de resposta da razão $ABS^{500}/_{400}$ em função do teor de amônio (NH_4) e glutamato (GMS).....	86
Figura 28 - Gráfico de superfície de resposta de L em função do teor de zinco (Zn) e amônio (NH_4).....	87
Figura 29 - Gráfico de superfície de resposta de L em função do teor de amônio (NH_4) e glutamato (GMS).....	88
Figura 30 - Gráfico de superfície de resposta do de L em função do teor de zinco (Zn) e amônio (NH_4).....	88
Figura 31- Gráfico de superfície de resposta do rendimento em função do teor de TA:TS e tempo.	97
Figura 32- Gráfico de superfície de resposta do rendimento em função do tempo e da temperatura.	97
Figura 33- Gráfico de superfície de resposta do rendimento em função da temperatura e de TA:TS.	98
Figura 34- Gráfico de superfície de resposta de umidade em função da temperatura e de TA:TS.	99
Figura 35- Gráfico de superfície de resposta de umidade em função da temperatura e do tempo.....	99
Figura 36- Gráfico de superfície de resposta de umidade em função do tempo e de TA:TS.....	100
Figura 37 - Gráfico de superfície de resposta do teor de monacolina K em função do teor de TA:TS e temperatura.....	101
Figura 38 - Gráfico de superfície de resposta do teor de monacolina K em função do tempo e temperatura.	102
Figura 39 - Gráfico de superfície de resposta do teor de monacolina K em função do tempo e de TA:TS.	102

Figura 40- Gráfico de superfície de resposta da densidade aparente em função da temperatura e de TA:TS.....	103
Figura 41- Gráfico de superfície de resposta da densidade aparente em função da temperatura e do tempo.	104
Figura 42- Gráfico de superfície de resposta da densidade aparente em função do tempo e de TA:TS.	104
Figura 43- Gráfico de superfície de IC em função de TA:TS e temperatura.....	105
Figura 44- Gráfico de superfície de resposta de IC em função do tempo e temperatura.....	106
Figura 45- Gráfico de superfície de IC em função de TA:TS e tempo.....	106
Figura 46- Gráfico de superfície de FH em função de TA:TS e temperatura.....	107
Figura 47- Gráfico de superfície de FH em função de tempo e temperatura.....	108
Figura 48- Gráfico de superfície de IC em função de TA:TS e tempo.....	108
Figura 49- Gráfico de superfície de AW em função de TA:TS e temperatura.....	109
Figura 50- Gráfico de superfície de AW em função de tempo e temperatura.....	110
Figura 51- Gráfico de superfície de AW em função de TA:TS e tempo.....	110
Figura 52- Gráfico de superfície de resposta da razão $ABS^{500}/_{400}$ em função de TA:TS e temperatura.....	111
Figura 53 - Gráfico de superfície de resposta da razão $ABS^{500}/_{400}$ em função do tempo e temperatura.....	112
Figura 54 - Gráfico de superfície de resposta da razão $ABS^{500}/_{400}$ em função do tempo e TA:TS.....	112
Figura 55 - Gráfico de superfície de resposta da %inibição em função de TA:TS e temperatura.....	113
Figura 56 - Gráfico de superfície de resposta da %inibição em função do tempo e temperatura.....	114
Figura 57 - Gráfico de superfície da %inibição em função do tempo e TA:TS.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplo de planejamento fatorial fracionado.....	48
Tabela 2 - Fatoração completa com apenas duas variáveis, por exemplo, x^1 e x^2 ...	49
Tabela 3- Fatoração fracionada, considerando x^3 com uma interação (produto) de x^1 e x^2	59
Tabela 4 - Modelo de experimento gerado pela técnica Box-Behnken.....	51
Tabela 5– Fatores estudados e seus níveis no planejamento fatorial 2^2	56
Tabela 6– Planejamento fatorial e seus fatores codificados (BOX et al, 1978).....	56
Tabela 7 – Composição do meio arrozina - glicose e meio arroz e água.....	57
Tabela 8 – Fatores estudados e seus níveis.....	58
Tabela 9 – Planejamento Box – Benkhin e seus fatores codificados (BOX et al, 1978)	58
Tabela 10– Composição mantida constante do meio arrozina – glicose.....	59
Tabela 11 – Fatores estudados e seus níveis no planejamento Box-Behnken.....	65
Tabela 12 – Planejamento Box – Benkhin e seus fatores codificados.....	65
Tabela 13 - Condições operacionais utilizadas para secagem por spray drying.....	66
Tabela 14 – Recuperação, Erro relativo (exatidão).....	73
Tabela 15 – Precisão intra-ensaio e inter-ensaio.....	74
Tabela 16 – Resultados obtidos nos experimentos de fermentação por dois diferentes meios de cultura.....	75
Tabela 17 – Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao teor de monacolina.....	76
Tabela 18 - Resultados obtidos no experimento de fermentação por meio arrozina-glicose.....	76
Tabela 19 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao teor de monacolina K nos extratos fluidos.....	77
Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes a $ABS^{500}/_{400}$	78
Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes a a/b.....	79
Tabela 22 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes a L.....	80

Tabela 23 - Resultados obtidos no experimento de secagem.....	90
Tabela 24 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao rendimento de secagem.....	91
Tabela 25 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao teor de umidade.....	91
Tabela 26 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao teor de monacolina K.....	92
Tabela 27 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes a densidade aparente do pó.....	93
Tabela 28 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao índice de compressibilidade.....	93
Tabela 29 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao fator de Hausner.....	94
Tabela 30- Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes a atividade de água.....	95
Tabela 31- Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes a $ABS^{500/400}$	95
Tabela 32- Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes a atividade antioxidante.....	96

LISTAS DE ABREVIATURAS

% inib.	% inibição
a/b	Tonalidade vermelha/tonalidade amarela
Abs 500/400	Absorbância 500nm/ Absorbância 400nm
AW	Atividade de água
CV	Coefficiente de variação
da	Densidade aparente
dc	Densidade de compactação
DPPH	difenilpicrilhidrazil
E	Erro relativo
FH	Fator de Hausner
GMS	Glutamato
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IC	Índice de compressibilidade
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LQ	Limite de quantificação
Monacol.; K	Teor de monacolina K
Rend.	Rendimento
S	Desvio padrão
s	Desvio padrão do branco
T	Tempo de incorporação do adjuvante
TA:TS	Teor de adjuvante: teor sólidos extrato
Temp.	Temperatura
Umid.	Umidade
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade
X	Média

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 – Fungos.....	24
2.1.1 – Morfologia.....	27
2.1.1.1 – <i>Monascus ruber</i>	28
2.1.1.2– Metabólitos do fungo	30
2.2 - Atividade hipocolesterolêmica de <i>Monascus</i>	32
2.2.1 – Estatinas	35
2.3 – Fermentação	36
2.3.1 – Histórico	36
2.3.2 – Processo de fermentação.....	38
2.3.3 – Fermentação - <i>Monascus ruber</i>	41
2.3.3.1 - Meio sólido	41
2.3.3.2 - Meio de cultura submerso	42
2.4 - Spray – dryer	42
2.5 – Planejamento experimental.....	46
2.6 –Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	51
3. OBJETIVOS	54
3.1 - Objetivo geral	54
3.2 - Objetivos específicos.....	54
4. MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1 – Obtenção de <i>Monascus ruber</i>	55
4.2 – Recuperação do inóculo	55
4.3 – Fermentação	55
4.3.1 – Fermentação utilizando dois diferentes meios de cultura.....	55
4.3.2 – Fermentação utilizando meio arrozina - glicose com diferentes aditivos.....	58

4.4 – Extração	59
4.5 - Caracterização do extrato da massa micelial.....	60
4.5.1 - Validação da metodologia para quantificação de monacolina K em Cromatografia Líquida de Alta eficiência.....	60
4.5.1.1 – Linearidade e curva analítica.....	60
4.5.1.2– Precisão	61
4.5.1.3 – Exatidão.....	61
4.5.1.4 – Limite de quantificação e limite de detecção	62
4.5.2 – Quantificação de monacolina K nos extratos	62
4.5.2.1 – Curva analítica de monacolina	63
4.5.3 – Determinação de pigmentos de <i>Monascus ruber</i>	63
4.5.3.1- Análise por espectrofotometria	63
4.5.3.2 – Análise por colorimetria.....	63
4.5.4 – Atividade antioxidante.....	64
4.6 - Secagem e caracterização do extrato seco pela técnica de spray drying	64
4.6.1– Caracterização do extrato seco	66
4.6.1.1 -Densidade aparente	66
4.6.1.2 -Densidade de compactação	66
4.6.1.3 -Fator de Hausner e Índice de Compressibilidade.....	67
4.6. 1.4 -Umidade residual	67
4.6. 1.5 - Atividade de água, aw	67
4.6. 1.6 - Determinação de pigmentos de <i>Monascus ruber</i>	68
4.6.1.7 -Quantificação de monacolina no extrato seco	68
4.6.1.7.1 – Recuperação da etapa do “clean-up”.....	68
4.6.1.8 – Atividade antioxidante	69
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO	70
5.1- Cromatografia líquida de alta eficiência	70
5.2 – Validação da metodologia para quantificação de lovastatina em Cromatografia Líquida de Alta eficiência	70
5.2.1 – Linearidade	70
5.2.2 - Recuperação e exatidão do “clean up” da amostra.....	72

5.2. 3 - Precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio.....	74
5.2. 4 – Sensibilidade.....	75
5.3 – Estudo da produção de Monacolina k por dois diferentes meio de cultura...	75
5.4 – Estudo da produção de Monacolina por meio arrozina – glicose com diferentes aditivos	76
5.4.1 – Teor de monacolina K nos extratos fluidos	77
5.4.2 – Produção de pigmentos por espectrofotometria	78
5.4.3 – Produção de pigmentos por colorimetria, a/b	79
5.4.4 – Produção de pigmentos por colorimetria, índice de reflexão, L.....	80
5.4.5 – Gráficos das respostas estudadas	80
5.4.5.1 – Gráficos do teor de monacolina k no extrato fluido	80
5.4.5.2 - Gráficos da razão $ABS^{500}/_{400}$	82
5.4.5.3 - Gráficos da razão a/b	84
5.4.5.4 - Gráficos intensidade de reflexão. L	87
5.5 - Estudo da secagem e caracterização do extrato seco pela técnica de spray drying.....	89
5.5.1 – Rendimento da secagem	90
5.5.2 – Teor de umidade	91
5.5.3 – Teor de monacolina K do extrato seco	92
5.5.4 – Densidade aparente, da	92
5.5.5 – Índice de compressibilidade (IC)	93
5.5.6 – Fator de Hausner, FH.....	94
5.5.7 – Atividade de água AW.....	95
5.5.8 – Pigmentos, $ABS^{500}/_{400}$	95
5.5.9 – Atividade antioxidante, % de inibição	96
5.5.10 – Gráficos das respostas estudadas	97
5.5.10.1 – Gráficos do rendimento de secagem	97
5.5.10.2 – Gráficos do teor de umidade dos extratos secos.....	98
5.5.10.3 – Gráficos do teor de monacolina k no extrato seco	101
5.5.10.4 - Gráficos de densidade aparente.....	103
5.5.10.5 - Gráficos de índice de compressibilidade	105
5.5.10.6 - Gráficos de Fator de Hausner.....	107

5.5.10.7- Gráficos de atividade de água	109
5.5.10.8- Gráficos da razão $ABS^{500}/_{400}$	111
5.5.10.9- Gráficos de atividade antioxidante, % inibição	113
 6- CONCLUSÕES	 116
 7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	 118
 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 119

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde o início da civilização para o alívio e cura de doenças através de ervas e folhas (VIEGAS, BOLZAN, BARREIRO, 2006). No entanto, este uso era artesanal e sem bases científicas. As pessoas apenas colhiam os materiais necessários e os processavam de maneiras simples: mascando, amassando, misturando com outros, preparando chás, etc. Com o passar do tempo, este uso foi se aperfeiçoando, de acordo com a cultura de cada povo, e dura até os dias de hoje (BLANC, 1998).

As civilizações Egípcias, Greco-romana e Chinesa merecem destaque pelos valiosos exemplos de utilização dos recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa. A medicina Chinesa desenvolveu-se de tal forma que ainda hoje é possível encontrar estudos sobre as diversas plantas medicinais utilizadas comumente nesta terapia a fim de se comprovar seu mecanismo de ação e isolar seus princípios (VIEGAS, BOLZAN, BARREIRO, 2006).

A história do Brasil está ligada ao comércio de produtos naturais, do pau Brasil era extraído a brazilina, que facilmente se oxidava a brazileína, um corante de cor vermelha utilizado para escrever e para tingir roupas. Além da brazilina, diversos outros corantes foram extraídos de fontes naturais, dentre estes, temos a morina, extraída da *Chorophora tinctoria*, que permaneceu em destaque até o surgimento das anilinas. Até o final do século XIX somente os corantes naturais eram disponíveis, com isso estes produtos tinham um enorme valor comercial (VIEGAS, BOLZAN, BARREIRO, 2006). Contudo, houve uma diminuição do uso de corantes naturais no final do século XIX com o desenvolvimento dos corantes sintéticos pelas indústrias alimentícias. Nos últimos vinte anos, a preocupação dos consumidores com a qualidade dos alimentos vêm aumentando, e assim, estabeleceu-se uma tendência cada vez maior de preferência por produtos

naturais. Com o progresso da ciência e tecnologia, a população reconhece gradualmente que os pigmentos sintéticos podem induzir o câncer (MORITZ, 2005).

É preciso ressaltar também a valiosa contribuição dos indígenas e dos povos primitivos, pois seu profundo conhecimento químico da natureza foi de fundamental importância no descobrimento de muitos fármacos e substâncias tóxicas. Dentre as descobertas merecem destaque as substâncias extraídas de microrganismos (VIEGAS, BOLZAN, BARREIRO, 2006).

Monascus ruber, um ascomiceto, é usado há muito tempo na culinária oriental para a produção de pigmentos, comidas fermentadas e bebidas. O corante produzido por esse fungo é atualmente utilizado em carnes, molhos de tomates, chocolates, sorvetes, vinagre, picles, sopas e cremes. São os pigmentos naturais mais empregados em países asiáticos, principalmente no Japão (PANAGOU, SKANDAMIS, NYCHAS 2003). Seis tipos de pigmentos são conhecidos: rubropunctatina e monascorubrina (laranja), rubropunctamine e monarubramine (vermelhos) e monascine e ankaflavine (amarelos) (PASTRANA et. al., 1995). Estimativas mostram que o consumo brasileiro de extrato de *Monascus* seja da ordem 500 toneladas por ano, o que movimenta cerca de cinco milhões de reais por ano. Este consumo pode aumentar tendo em vista seu grande potencial. Desde 1999, *Monascus ruber* vem despertando o interesse de pesquisadores do mundo todo, devido à atividade hipocolesterolêmica de um dos seus metabólitos, a monacolina K (MANZONI et al., 1999).

A monacolina-k pertence à classe das estatinas as quais possuem atividade inibitória sobre a enzima 3-hidroxi-glutaril Co-A redutase, envolvida na biossíntese do colesterol (MANZONI et al., 1999).

Altas taxas de colesterol sérico, ou hipercolesterolemia é reconhecida desde 1950 como fator de risco de doenças coronarianas (VIEGAS, BOLZAN, BARREIRO, 2006) sendo, atualmente, um dos maiores problemas de saúde pública. Ao longo dos anos essa substância se

deposita na forma de gordura formando os ateromas nas artérias, que podem impedir o fluxo sanguíneo. A arterosclerose, portanto, é a responsável pelo enfarte do miocárdio e do cérebro sendo pois, uma das principais causas de morte nos Estados Unidos, Europa Ocidental e também no Brasil (GONÇALVES et. al., 2000).

Diversos estudos têm sido realizados a fim de aumentar a produção de pigmentos e da monacolina pelo *Monascus ruber* e, simultaneamente, diminuir a produção da citrinina, uma substância nefrotóxica (PASTRANA et. al., 1995). Cabe ressaltar que os estudos apresentados atualmente, tanto no Brasil quanto nos países citados, são realizados, na maioria, com fermentação sólida. No estado sólido, a produção de pigmentos vermelhos por espécies do fungo *Monascus* é maior (JACOBSEN e WASILESKI, 1994) devido à difusão dos pigmentos intracelulares na matriz sólida. Em cultura submersas os pigmentos permanecem no micélio devido à baixa solubilidade destes no meio. Diversos estudos tentando aumentar a eficiência destes processos (meio de cultivo sólido) são relatados, justificando sua importância econômica (TENG e FELDHEIM, 2001). Por isso, torna-se necessário investir mais no estudo de fermentação em cultivo submerso com o objetivo de a tornar competitiva, uma vez que este tipo de fermentação é de fácil mistura, permitindo condições uniformes para o crescimento da cultura. Permitem, também, mais fácil controle sobre as condições de cultivo como pH, oxigênio dissolvido, temperatura, velocidade de agitação e concentração de nutrientes. O alto calor específico e a alta condutividade térmica auxiliam no controle da temperatura (ROSSI, 2006).

Este trabalho se insere neste contexto uma vez que consiste na otimização da fermentação e secagem de *Monascus ruber*. Embora já existam estudos sobre a atividade biológica do extrato de *Monascus ruber*, os quais comprovam seus benefícios, não há muitos estudos que visam otimizar a sua fermentação em meio submerso e a secagem do extrato. Otimizando a fermentação, obteremos um produto mais rico em monacolina, substância de interesse, o que o torna mais

eficaz. Otimizando a secagem, teremos um produto estável e com todas condições e técnicas padronizadas, o que torna mais fácil a reprodutibilidade e produtividade do processo. Além disso, extratos secos apresentam maior estabilidade química e menor susceptibilidade à contaminação microbiológica. Alta produção de pigmento e de monacolina-k e a padronização são pré-requisitos para aplicação na indústria. Com o extrato seco padronizado, torna-se possível produzir formas farmacêuticas sólidas (comprimidos ou cápsulas), que poderão ser utilizadas em testes clínicos, além disso, podem ser utilizados como produto intermediário ou final; além de proporcionarem facilidade de manipulação, armazenamento, transporte e maior precisão de dosagem (SHARAPIN ET. AL., 2000).

Este trabalho visou encontrar um meio no qual o fungo *Monascus ruber* apresente maior produtividade da monacolina K, a qual foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE. Além disso, a utilização do processo de secagem por Spray Drying foi avaliado, nos aspectos relativos à estabilidade da monacolina K e propriedades farmacotécnicas do pó.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Fungos

Amplamente encontrados na natureza, os fungos são essenciais na degradação e reciclagem da matéria orgânica. Presentes em quase todos os nichos ecológicos, os fungos melhoram acentuadamente nossa qualidade de vida e contribuem na produção de alimentos e bebidas alcoólicas; outros podem servir à medicina fornecendo metabólitos bioativos úteis, como antibióticos e agentes imunossupressores (ciclosporinas). Estão descritas cerca de 69.000 espécies de fungos embora estejam estimadas 1.500.000 espécies diferentes por todo o mundo (BROOKS, BUTEL e MORSE, 2000).

As substâncias produzidas pelos fungos, tais como, toxinas e antibiótico, entre outras, são utilizadas por eles como marcadores de território e como meio de defesa (LACAZ, PORTO, J.E.C.MARTINS et al., 2002). Além disso, eles liberam enzimas para se alimentarem e, estas, degradam os substratos em moléculas mais acessíveis que são depois absorvidas e assimiladas. De um modo geral, existem três fatores que contribuem para o seu sistema de defesa: o sistema de enzimas degradativas, que está acoplado a um mecanismo de *feedback* de modo que a produção de enzimas é controlada de acordo com a quantidade de recursos disponíveis; a fase final da degradação, que é realizada por enzimas associadas à parede do fungo e por fim, a produção de antibióticos, toxinas ou outros produtos supressores do crescimento de outros organismos (ALEXOUPOULOS, MIMS e BLACKWELL, 1996).

Estudos demonstram que os antibióticos são produzidos pelos fungos em situações de limitação de nutrientes, garantindo assim, sua sobrevivência. Por exemplo, os antibióticos produzidos por *Aspergillus* e *Penicillium* os ajudam a defender os grãos ricos em amido do

ataque de outros microrganismos, pois impedem o seu desenvolvimento (ALEXOUPOULOS, MIMS e BLACKWELL, 1996).

Podem-se considerar as características biológicas dos fungos e as estratégias do seu ciclo de vida um dos maiores desafios biotecnológicos. (ALEXOUPOULOS, MIMS e BLACKWELL, 1996). São inúmeras as aplicações biotecnológicas utilizando fungos. Esses organismos transformam o acetil CoA e malonil CoA (principalmente na condensação destes dois compostos), a partir de moléculas simples como a glicose, em produtos altamente complexos (Figura 1). A capacidade enzimática, o potencial bioquímico e sua adaptação às condições extremas de vida em meio líquido têm sido explorados para a produção de moléculas de interesse industrial (penicilinas, cefalosporinas), alcalóides, enzimas (α -amilase, celulase), ácidos orgânicos (ácido cítrico) e pigmentos alimentares (ex. Anka) (HAJJAJ, KLAEBE, GOMA et al., 2000b; CARDENAS, SCHNEWEIS, MEYER, HORMANSDORFER et al., 2001). Dentre os pigmentos alimentares, comuns na natureza, estão os carotenóides, melanina, quinona e mais especificamente monascidinas (DUFOSSÉ et al., 2005).

O uso de microrganismos para produção de corantes tem sido cada vez mais estudado visto que pesquisas demonstram que os corantes sintéticos possuem efeitos tóxicos, além de serem mutagênicos e carcinogênicos. (EL-KADY, EL-MARAGHY e ZOHRI, 1994; SCUDAMORE e HETMANSKI, 1995; KREJCI, BRETZ e KOECHEL, 1996). Por isso, existe a grande necessidade de descoberta de novos pigmentos naturais, uma vez que estes são de grande valia para a indústria de alimentos, pois para esta, a cor é extremamente importante e fator determinante na palatabilidade e aparência dos alimentos (GUNNARD, WASILESKI e ALAN, 1994).

Figura 1 - Via Metabólica. Fonte: (HAJJAJ, BLANC, GROUSSAC et al., 1999a)

Embora os corantes sejam considerados essenciais à indústria de alimentos, podendo ser obtidos através de fontes naturais, este campo ainda não é bem explorado, em particular os produzidos por microrganismos. Tal fato demonstra que os países em desenvolvimento também podem investir neste campo de conhecimento, buscando competir neste mercado, principalmente o Brasil devido a sua imensa biodiversidade (MORITZ, 2005).

A primeira história de sucesso na produção de pigmentos usando microrganismo foi na Europa na produção de β -caroteno do fungo *Blakeslea*, em 1995. O β -caroteno produzido desta maneira é equivalente quimicamente ao produzido sinteticamente tendo, portanto, seu uso aceito como corante em alimentos (DUFOSSÉ et al., 2005).

Os corantes vermelhos produzidos por culturas em meios sólidos (arroz, por exemplo) são os mais estudados na Ásia, por diversas espécies do gênero *Monascus*; utilizados principalmente para colorir alimentos fermentados, (PASTRANA et al., 1995), ao qual dão o nome de "Ang-kak", e no inglês, "Red yeast rice" (LOTONG; SUWANARIP, 1989). Seu uso foi primeiramente descrito na dinastia Tang, como agente corante e de sabor na preparação de alimentos, como peixe, molho de peixe, pasta de peixe, vinho de arroz, carnes e temperos. Há relatos do uso de "Ang-kak", no livro de Medicina Herbal Chinesa publicado no primeiro século (DUFOSSÉ et al., 2005). Os chineses o usavam, para tratar indigestões, diarreias, melhorar circulação sanguínea, traumas, entre outras (DUFOSSÉ et al., 2005).

Em 1884, o botânico Philippe van Thieghen isolou um mofo purpúreo na batata e o nomeou de *Monascus ruber*. Went isolou em 1895 um fungo vermelho do mofo do arroz e o nomeou de *Monascus purpureus* (DUFOSSÉ et al., 2005). Na Grécia, *Monascus ruber* tem sido isolado em azeitonas verdes e tem sido um problema para a agricultura uma vez que este fungo é resistente a altas temperaturas (PANAGU, SKANDAMIS, NYCHAS, 2003). Então várias outras espécies foram isoladas no mundo (DUFOSSÉ et al., 2005).

Monascus é freqüentemente usado no sudeste da china, no Japão e sudoeste da Ásia (DUFOSSÉ et al., 2005). Nos Estados Unidos, sua introdução ocorreu na segunda metade da década de 1990, sendo utilizado como um suplemento alimentar para a diminuição do nível de colesterol sérico (BLANC, 1998). Mais de 50 patentes já foram pedidas no Japão, Estados Unidos, França e Alemanha e em todos estes países utiliza-se pigmentos de *Monascus* em alimentos (DUFOSSÉ et al., 2005). Isto devido as recentes descobertas de suas atividades terapêuticas e de seu uso industrial (BLANC, 1998).

2.1.1 - Morfologia

Os fungos se reproduzem de maneira sexuada e assexuada produzindo estruturas denominadas esporos (reprodução sexuada) ou conídeos (reprodução assexuada). Os esporos, ao

encontrar condições adequadas para sua sobrevivência se desenvolvem originando tubos germinativos, fungo filamentosos, ou blastoconídeo, fungo leveduriforme (LACAZ et al., 2002).

Os tubos germinativos se desenvolvem originando hifas, o conjunto desta denomina-se micélio. Existem dois tipos de micélio, o responsável pela nutrição, denominado micélio vegetativo e o responsável pela produção dos esporos, micélio reprodutor (LACAZ et al., 2002).

2.1.1.1 – *Monascus ruber*

O gênero *Monascus* foi dividido em sete espécies: *M. ruber*; *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. floridans*, *M. pallens* e *M. sanguineus* (BLANC, 1998). Porém, as espécies de maior interesse são: *M. ruber*, *M. pilosus* e *M. purpureus*, os quais compreendem a maioria das linhagens isoladas no alimento oriental. (DUFOSSÉ et al., 2005, MARTINKOVA et al., 1999).

Monascus ruber, fungo filamentosos, apresenta numerosos ascocarpos circulantes com cadeias de conídeos isolados ou ligados a hifas. Apresenta também ascocarpos ovais e conídeos ligados a hifas indiferenciadas, como ilustrado na Figura 2.

Colônias do fungo *Monascus ruber* (Figura 3), saprófitas do solo, possuem uma topografia levemente rugosa de coloração púrpura, circulares e flocosas, possui um crescimento relativamente rápido em meio batata dextrose ágar, 5 dias, à temperatura ambiente. Cresce também em meios ágar Sabouraud, ágar Czapek's, agar extrato de malte; além de arroz e outros grãos (milho, soja). A temperatura ideal para seu crescimento pode variar de 20° C a 32°C, porém para a produção de pigmentos o ideal é de 27°C a 30°C (MACARIO, PALO e MACEDA, 1960).

Figura 2 - Formas de reprodução do gênero *Monascus* ilustrando a formação de cadeia de conídeos após 2 dias crescendo em PDA (a); germinação dos conídeos após 6 horas em ágar Sabouraud (b-c); cleistotécio após 48 em ágar Sabouraud (d - e); cleistotécio jovem (f - g).
Fonte: MACARIO et al, (1960).

Figura 3 – Morfologia do fungo ascomiceto, *Monascus ruber*

2.1.1.2– Metabólitos do fungo

Os principais metabólitos produzidos por *Monascus* são policetídeos, que são formados por condensação de acetilcoA com um ou mais malonilcoA, seguida de uma descarboxilação. Estes metabólitos consistem em pigmentos, monacolina e sob certas condições, micotoxina (DUFOSSÉ et al., 2005).

Pelo menos seis tipos de pigmentos produzidos pelo *Monascus* são conhecidos: rubropunctatina e monascorubrina (laranja), rubropunctamine e monascorubramine (vermelhos) e monascine e ankaflavine (amarelos) (PASTRANA et. al., 1995). Estes pigmentos são produzidos como uma mistura de compostos, vermelho, laranja e amarelo, que geralmente é usada sem uma separação embora os principais compostos de interesse comercial sejam os vermelhos (CARVALHO et al., 2004). Na Figura 4 estão ilustradas as estruturas moleculares dos pigmentos.

Figura 4 – Estruturas químicas dos pigmentos de *Monascus ruber* (CARVALHO et al., 2004)

Em 1977, Wong e Bau descreveram propriedades antibacterianas de um metabólito que foi nomeado monacolina A, a qual foi efetiva contra *Bacillus*, *Streptococcus* e *Pseudomonas* (DUFOSSÉ et al., 2005). A atividade antibacteriana foi testada em carnes tendo ação inibitória para *Listeria monocitogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* podendo, portanto, substituir nitritos e nitratos, conservantes utilizados na conservação de carnes e embutidos (GREMMELS, LEITSNER, 1991).

Existem ainda relatos da presença de ácido γ -aminobutírico no extrato aquoso de arroz fermentado, o qual tem mostrado diminuir a pressão sanguínea “in vivo” sem afetar a atividade da enzima conversora de angiotensina I. Além disso, também foi isolado desses extratos o ácido dimerúmico (YANG et.al, 2004) o qual possui atividade antioxidante (YU, LEE, PAN, 2006).

Entretanto, durante os últimos dez anos, pesquisadores vêm descobrindo entre os metabólitos do *Monascus sp*, uma micotoxina nefrotóxica, a citrinina, a qual tinha sido previamente encontrada em fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. Com isso o uso do arroz fermentado com *Monascus sp* tem sido bastante questionado, apesar de seus efeitos benéficos para a saúde (CHEN and HU, 2005). Entretanto, Sabater-Vilar et. al. (1999) concluíram que nenhum efeito adverso tem sido relatado com o uso do arroz fermentado, uma vez que o uso deste ocorre há séculos, isso pode ser devido a baixas concentrações de micotoxinas encontradas, que podem variar de 0,2 a 17,1 $\mu\text{g/g}$ (WANG, JU, ZHOU, 2005). Deve-se ressaltar também que com a dose utilizada do corante (0,01%) seria necessário ingerir mais de 200 kg de alimento com o corante para atingir a dose letal, 10 mg/kg. (CHEN, HU, 2005).

No Japão, o nível máximo de citrinina permitida é de 200nanogramas/g, na China e na Europa o nível máximo de citrinina ainda está sendo discutido (CHEN, HU, 2005).

Dentre as espécies de *Monascus* o *M. ruber* produz o menor teor de citrinina (WANG, JU, ZHOU, 2005). É possível controlar a produção de citrinina mudando a composição do meio de

cultura, uma vez que a produção dos pigmentos e da citrinina possui vias metabólicas diferentes (DUFOSSÉ et al., 2005). *Monascus ruber* em meio de cultura líquido contendo glicose, etanol ou acetato como fonte de carbono (WANG, LU and ZHOU, 2004) ou histidina como fonte de nitrogênio pode ter sua produção de citrinina diminuída (DUFOSSÉ et al., 2005).

A monacolina K, uma substância hipocolesterolêmica tem sido também isolada do *Monascus*, aumentando ainda mais o interesse pelos seus metabólitos. Este policetídio foi primeiramente isolado de culturas de *Penicillium citrinin* e pode inibir enzimas específicas e com isso reduzir o nível de colesterol sérico (DUFOSSÉ et al., 2005).

2.2 - Atividades hipocolesterolêmica do *Monascus*

Na década de 1970, Endo encontrou monacolina-k, Figura 5, nos metabólitos do *Monascus sp.* Este composto tem demonstrado reduzir significativamente os níveis de colesterol sérico (ENDO et. al., 1979). A monacolina-k atua inibindo a enzima β -hidroxi- β -metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), que catalisa a conversão da β -hidroxi- β -metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) em mevalonato, etapa limitante na biossíntese do colesterol. Inibidores da enzima β -hidroxi- β -metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) são conhecidos como estatinas. A primeira estatina introduzida nos Estados Unidos é conhecida como Lovastatina (CHANG et. al., 2002; OLIVEIRA, 2002).

Figura 5 – Estrutura química da monacolina – K (lovastatina).

A lovastatina foi originalmente isolada de derivados de *Monascus ruber*, e foi primeiramente conhecida como monacolina-K. Esta compete com o substrato da enzima HMG-CoA redutase, impedindo a transformação da HMG-CoA em ácido mevalônico (Figura 6). Sua atividade não só inibe a síntese de colesterol mas também reduz os níveis de colesterol plasmáticos (CHANG et al., 2002). A Figura 7 mostra o esquema da síntese de colesterol.

Figura 6 – Esquema da transformação da HMG-CoA em mevalonato, pela enzima HMG-CoA redutase. (GONÇALVES, 2000).

Figura 7 – Esquema simplificado da síntese de colesterol (DEVLIN, 2002).

Ao ocorrer redução intracelular de colesterol há estímulo à formação de receptores LDL na membrana da célula. A presença de maior número de receptores LDL determina maior captação das LDL em circulação, com diminuição de seu nível plasmático. Existem também elementos que demonstram que a diminuição da síntese do colesterol leva à menor produção hepática das VLDL, pois esse esteróide é usado na formação dessas partículas. Portanto, seu efeito hipocolesterolêmico pode também ser devido ao maior catabolismo das LDL e da menor síntese endógena das VLDL. O resultado mais marcante é o de redução das LDL plasmáticas, com menor repercussão sobre a concentração sanguínea das VLDL (GOODMAN, 1996). A Figura 8 mostra um esquema da biossíntese e distribuição do colesterol.

Figura 8 – Biossíntese e distribuição do colesterol (GONÇALVES, 2000)

A monacolina-K, também denominada lovastatina, assim como todas as estatinas são absorvidas no intestino e extraídas do sangue na primeira passagem pelo fígado. Nas células hepáticas, são metabolizadas pelo citocromo P450 (3A4) e transformadas em metabólitos ativos e inativos (RANG et al., 2001).

Estudos mostram que o extrato de *Monascus* previne o aumento de colesterol total e triglicérides no soro de coelhos alimentados com dieta aterogênica. Além disto, lesões na aorta e

lipidose nos fígados de coelhos tratados com extrato de *Monascus* são menos severas do que as do controle. Outro estudo feito com coelhos da raça Nova Zelândia, também mostrou redução nos níveis de colesterol total (OLIVEIRA, 2002).

Estudos clínicos também comprovam sua ação, mostrando que houve redução de 17% no colesterol e 19,8% no de triglicérides em um grupo de pacientes tratados com a substância por 4 semanas. Redução nos níveis de LDL colesterol e elevação nos níveis de HDL colesterol também foram observadas (ENDO 1979; GREMMELS; LEISTNER, 1991). As estatinas ainda reduzem mortalidade por doenças do coração e trazem benefícios em doenças dos ossos e câncer (CHEN, JU, ZHOU, 2005).

Muitos estudos clínicos também foram feitos, e mostraram o efeito do extrato de *Monascus* em baixar o colesterol. Um destes testes envolveu 446 pacientes hiperlipidêmicos na China e mostrou que o extrato de *Monascus* reduziu os níveis de lipídios do soro. Um outro estudo realizado nos Estados Unidos com 152 pacientes mostrou uma redução do colesterol de 19,2% do grupo tratado com extrato de *Monascus* comparado a 1,5% do grupo placebo. Também nos Estados Unidos, um outro estudo de 12 semanas mostrou uma redução significativa de 16% no grupo tratado (CHANG, 2000).

2.2.1 - Estatinas

As estatinas são substâncias originárias de culturas de fungos, sendo a primeira substância dessa família isolada em 1976, de uma cultura de *Penicillium citrinum* sendo chamada compactina. Esta se revelou excelente inibidora da síntese do colesterol, mas, por sua toxicidade, não reunia condições de uso clínico. Posteriormente, foi isolada a lovastatina da cultura do *Aspergillus terreus* e do *Monascus ruber* com igual propriedade da substância anterior, mas com mínima toxicidade. Desde então foram produzidas várias outras substâncias com fórmulas

estruturais semelhantes às acima referidas, todas mostrando efeito inibidor da síntese do colesterol, que recebeu a denominação genérica de estatinas. Todas as estatinas têm em comum um anel hidronaftaleno. A lovastatina e a sinvastatina são pró-fármacos, apenas sendo ativas, "in vivo", após metabolizadas para a forma de anel aberto. Esses fármacos têm efeitos metabólicos muito semelhantes, ainda que haja entre eles várias diferenças farmacológicas (MANZONI et al., 1999).

A lovastatina foi introduzida no uso comercial pela Merck Sharp and Dohme, cujo medicamento ficou conhecido como MEVACOR[®] que é utilizado no mundo todo no tratamento da hipercolesterolemia. Recentemente, a lovastatina foi indicada como agente terapêutico potencial de vários tipos de tumores, graças à sua capacidade de suprimir o crescimento tumoral através da inibição da síntese de compostos isoprenóides (CHANG et al., 2002). As estatinas existem na forma de hidroxí ácidos e de lactonas. A maioria da lovastatina produzida na fermentação é a forma hidroxí ácido (ácido mevinolínico), porém nas formas farmacêuticas, encontra-se na forma de lactona (mevinolina). A lactona converte-se à cadeia de hidróxi ácido aberta, forma biologicamente ativa, devido à sua semelhança estrutural com a HMG-CoA (ALBERTS et. al., 1980).

2.3 – Fermentação

2.3.1 - Histórico

A produção de bebidas alcoólicas pela fermentação de grãos de cereais já era conhecida pelos Sumérios e Babilônios antes do ano 6.000 a.C. Outras aplicações como a produção de vinagre, iogurte e queijos são, de há muito, utilizadas pelo ser humano. Entretanto, não eram conhecidos os agentes causadores das fermentações que ficaram ocultos por seis milênios.

Somente no século XVII, o pesquisador Antom Van Leeuwenhock, através da visualização em microscópio, descreveu a existência de seres tão minúsculos que eram invisíveis a olho nu. Foi somente 200 anos depois que Louis Pasteur, em 1876, provou que a causa das fermentações era a ação desses seres minúsculos, os microrganismos, caindo por terra a teoria, até então vigente, que a fermentação era um processo puramente químico (STANBURY; WHITAKER, 1984).

Foi também Pasteur que provou que cada tipo de fermentação era realizado por um microrganismo específico e que estes podiam viver e se reproduzir na ausência de ar (STANBURY; WHITAKER, 1984).

Posteriormente, em 1897, Eduard Buchner, demonstrou ser possível a conversão de açúcar em álcool, utilizando células de levedura maceradas, ou seja, na ausência de organismos vivos (LIMA et al., 2001).

A partir da primeira guerra, a Alemanha, que necessitava de grandes quantidades de glicerol para a fabricação de explosivos, desenvolveu através de Neuberg, um processo microbiológico de obtenção desse álcool, tendo chegado a produzir 1.000 toneladas do produto por mês. Por outro lado, a Inglaterra produziu em grande quantidade a acetona para o fabrico de munições, tendo essa fermentação contribuído para o desenvolvimento dos fermentadores industriais e técnicas de controle de infecções (LIMA et al., 2001).

Foi, todavia, a produção de antibióticos o grande marco de referência na fermentação industrial. A partir de 1928, com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, muitos tipos de antibióticos foram desenvolvidos no mundo (LIMA et al., 2001; ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997)

Na década de 40, durante a segunda guerra mundial, os antibióticos passaram a integrar os processos industriais fermentativos, principalmente nos Estados Unidos, baseando-se inicialmente na síntese da penicilina e, posteriormente, da estreptomicina. (STANBURY; WHITAKER, 1984).

A fermentação como processo industrial tem hoje uma importância crescente em setores-chaves da economia. Atualmente, empresas de todo o mundo produzem e comercializam produtos obtidos através de processos fermentativos, tendo sido a produção em escala industrial de bens, através de processos microbiológicos. Atualmente, existem mais de uma centena de produtos viáveis de serem obtidos através da via fermentativa. Como exemplos podem-se citar enzimas (amilase, catalase, invertase, lipase, protease, entre outras), ácidos orgânicos (ácido acético, o ácido cítrico e o ácido láctico, entre outros), aminoácidos (ácido glutâmico, ácido aspártico, triptofano, lisina, entre outros), solventes (etanol, butanol, acetona, entre outros), bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, saquê, entre outros), alimentos (pão, pickles, entre outros), antibióticos (penicilina, cefalosporina C, entre outros), entre outros (LIMA et al., 2001).

2.3.2 – Processo de fermentação

Existem quatro pilares de um processo fermentativo, que podem influenciar no seu sucesso: o microrganismo, o meio de cultura, a forma de condução do processo fermentativo e as etapas de recuperação do produto (SCHMIDELL, 2001).

A seleção do meio de cultura é de suma importância, uma vez que além de fornecer os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo, não deve provocar problemas na recuperação do produto, deve ter composição razoavelmente fixa e por fim não deve ser oneroso. As características desejáveis de um meio de cultura estão muito relacionadas com o tipo de microrganismo que será usado (SCHMIDELL, 2001).

As fontes de carbono e de energia comumente utilizadas são glicose, sacarose, frutose, amido e a celulose. Como fontes de nitrogênio podem destacar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (o que pode reduzir o pH), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, ou aminoácidos e uréia. Como fontes de fósforo são utilizados fosfatos solúveis, como monoamônio fosfato, ou o diamônio fosfato produto (SCHMIDELL, 2001).

Meios de culturas definidos são aqueles constituídos apenas pelas substâncias descritas acima, já meio sintético são aqueles que possuem composição química definida e reproduzível. Entretanto, existem microrganismos que necessitam de fatores de crescimento, ou seja, algumas vitaminas ou aminoácidos específicos. É preciso ressaltar que algumas linhagens necessitam de meios de cultura complexos, por possuírem características nutricionais pouco conhecidas, para tanto, é necessário adicionar extrato de carne, extrato de levedura, extrato de malte, peptona, entre outros produtos (SCHMIDELL, 2001).

Portanto, é necessário adequar o meio de cultura com o microrganismo a ser empregado, no entanto, definir o tipo de processo fermentativo é de suma importância (SCHMIDELL, 2001).

O processo fermentativo pode ser realizado de diversas formas dependendo das características do microrganismo, meio de cultura e por fim, da finalidade do processo (SCHMIDELL, 2001).

A fermentação pode ser realizada em meio de cultivo submerso e em meio de cultivo sólido ou semi-sólido. As fermentações em meio de cultivo submerso podem ser realizadas em processo descontínuo, descontínuo com recirculação de células, contínuo, descontínuo alimentado e semi-contínuo produto (SCHMIDELL, FACCIOTTI, 2001).

As fermentações descontínuas clássicas vêm sendo utilizadas desde a Antiguidade e ainda são empregadas, principalmente quando se quer estudar a cinética da fermentação, ou melhoramento do meio de cultura (SCHMIDELL, FACCIOTTI, 2001).

Consiste em inocular o microrganismo na solução nutriente esterilizada e incubá-la de modo a permitir que a fermentação ocorra em condições ótimas. Este tipo de fermentação pode levar a rendimentos baixos, porém apresenta menor risco de contaminação e flexibilidade (CARVALHO, SATO, 2001).

Denomina-se inóculo, um volume de suspensão de microrganismos capaz de realizar a fermentação de um dado volume de mosto ou meio de cultura. Mosto ou meio de fermentação é o nome dado na área de fermentação para o meio de cultura (área de microbiologia) (CARVALHO, SATO, 2001).

Por outro lado, quando se conhece toda a cinética da fermentação e o meio de cultura mais adequado, existem outras formas de fermentação mais adequadas onde a fermentação descontínua será sempre a base para comparações de eficiência atingida. Dentre esses processos mais evoluídos tem-se o processo descontínuo com recirculação de células, onde após a batelada faz-se uma centrifugação ou sedimentação, e somente o líquido fermentado vai para a recuperação do produto, evitando assim, o preparo de um novo inóculo para cada batelada (CARVALHO, SATO, 2001).

É preciso ressaltar também o processo contínuo, realizado em um sistema aberto. Neste processo procura-se estabelecer um fluxo contínuo de líquido, necessitando com isso, de condições assépticas nas operações de alimentação e retirada do produto. Para tanto, são necessários vários bioreatores (locais onde ocorrem reações químicas catalisadas por microrganismos) dispostos em séries, no qual a alimentação de um dado reator é o efluente do reator anterior (FACCIOTTI, 2001).

O processo descontínuo alimentado é aquele no qual se introduz primeiramente o inóculo e depois se inicia a alimentação com meio de cultura, empregando uma vazão adequada até que se atinja o volume útil do reator, quando então inicia-se a retirada do caldo fermentado para a recuperação do produto. Pode-se ainda separar o microrganismo e retorná-lo ao volume de reação, a fim de se iniciar um novo período de alimentação, evitando assim um novo preparo do inóculo (CARVALHO, SATO, 2001).

Tem-se ainda o processo semicontínuo que se difere do descontínuo alimentado, pelo fato de se retirar o líquido fermentado e se proceder ao preenchimento do reator com uma vazão muito elevada, de forma que pareça uma alimentação instantânea. Ao final do novo período de fermentação, procede-se novamente a retirada de uma dada fração do volume e se preenche o reator instantaneamente (BORZANI, 2001).

É preciso ressaltar também a fermentação sólida que envolve o crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos úmidos na ausência de água livre. A ausência de água livre torna o sistema completamente diferente da fermentação submersa, tornando a fermentação sólida superior no que diz respeito à produção de alguns metabólitos, porém com menor flexibilidade e menor controle do processo (ROSSI, 2006).

2.3.3 – Fermentação - *Monascus ruber*

O fungo *Monascus* realiza fermentação tanto em meio sólido quanto em meio de cultivo submerso (CARVALHO et al., 2003).

2.3.3.1 - Meio sólido

O clássico método Chinês consiste em inocular o *Monascus* em grãos de arroz cozidos e incubar sob temperatura e aeração controladas por 20 dias. Neste método, o teor de umidade, de oxigênio e o nível de dióxido carbônico são os parâmetros mais importantes (CARLILE; WATKINSON, 1997)

O teor de umidade é um parâmetro muito importante, pesquisas indicam que a maior produção de pigmentos ocorre com teor de umidade inicial baixo, alto teor de umidade aumenta a atividade da enzima glicoamilase, assim, glicose é liberada rapidamente em quantidades altas, o que pode inibir a produção de pigmentos (DUFOSSÉ et al., 2005).

Nível de oxigênio e dióxido de carbono influencia de modo significativo a produção de pigmentos pois diminui o crescimento em meio sólido. No arroz, o máximo de pigmentos foi observado em 0,5xPa de pressão parcial de oxigênio. Entretanto alto nível de dióxido de carbono (10^5 Pa) inibe a produção de pigmentos (DUFOSSÉ et al., 2005).

A composição do meio de cultura também é de suma importância, tradicionalmente é realizada em pão ou arroz, contendo portando amido (DUFOSSÉ et al., 2005).

A grande desvantagem do meio sólido é a necessidade de um meio complexo, uma menor flexibilidade e, portanto, uma dificuldade em se controlar o processo. (HAJJAJ, 2000).

2.3.3.2 - Meio de cultura submerso

A fermentação em meio de cultura submerso pode ser realizada com glicose, frutose, dextrina e maltose como fonte de carbono e energia, porém altas concentrações de pigmentos foram obtidas com glicose ou maltose. A fonte de nitrogênio parece ser mais importante que a fonte de carbono. Amônio e peptona são descritos como melhor fonte de nitrogênio do que nitrato, já a glicose é descrita como a melhor fonte de carbono (DUFOSSÉ et al., 2005).

Como já foi dito, a produtividade é menor, mas é mais fácil trabalhar com este tipo de meio. Nesta situação, além da temperatura e condições de inoculação, também se leva em conta a composição do meio, o seu pH e o grau de agitação e aeração (HAJJAJ, 2000).

2.4 - Spray - dryer

A secagem de extratos consiste na eliminação da fase líquida até valores residuais, com uma eficiência que depende das características do líquido extrator, do princípio da técnica e do tipo de evaporador utilizado (SONAGLIO et. al., 2000).

Os extratos secos apresentam várias vantagens frente às formas fluidas, tais como, maior estabilidade química, proporcionam maior precisão de dosagem e facilidade de armazenamento e transporte, podendo ser utilizados tanto como produto intermediário quanto produto final (SHARAPIN, 2000).

Spray-drying, Figura 9, é um processo de secagem de extratos que consiste na transformação de um material fluido em partículas secas através da atomização deste fluido em uma corrente de ar de secagem de temperatura elevada. Este processo é contínuo, de uma única etapa, e é capaz de produzir pós finos, sem poeiras ou aglomerados para especificações precisas (MASTERS, 1996). Os pós obtidos por spray - dryer geralmente são esféricos com uma estreita distribuição de tamanho. Mantendo-se as condições de operação constante, as características do extrato também permanecem constantes (NEWTON, 1966).

Figura 9 – Spray dryer

A primeira menção da técnica de spray dryer foi feita em 1865 para a secagem de ovos. Ainda neste mesmo ano, surgiu o primeiro documento a detalhar os princípios destas técnicas,

com o título “Aperfeiçoamento em secagem e concentração de substâncias líquidas por atomização” (MASTERS, 1985).

Em 1888, houve a citação do conceito de “concentração por spray”, que envolvia a atomização de um fluido em uma corrente de ar quente (MASTERS, 1985).

No ano de 1901 surgiram duas patentes: um processo de secagem de componentes sangüíneos e uma variação desta técnica para os mesmos tipos de substâncias. Devido às dificuldades práticas relacionadas às técnicas, existem poucos registros da aplicação comercial destas patentes (MASTERS, 1985). Em 1905, foi desenvolvido, por um fabricante especializado em equipamentos para a indústria do leite, um dos primeiros equipamentos que foi comercializado nos Estados Unidos (MASTERS, 1985).

A partir dos anos 20, as aplicações comerciais foram iniciadas e com as publicações que surgiam, a técnica de spray drying estava se estabelecendo como uma operação de sucesso (MASTERS, 1985).

Nos anos 30, avanços no design e equipamentos, aliados às publicações, demonstravam a sofisticação da técnica. Já havia grande utilização desta técnica e a secagem de produtos termossensíveis teve seu início nesta época (MASTERS, 1985).

Na Segunda Guerra Mundial ocorreu um grande aumento da utilização desta técnica, devido à necessidade de produtos e alimentos secos. Este fato colaborou para a consolidação da técnica de spray drying, pois houve a produção de equipamentos maiores e melhores, tornando a técnica econômica e mais viável (MASTERS, 1985).

Desde a década de 40 vem sendo utilizada com sucesso em várias indústrias, como a alimentícia, química, cerâmica, entre outras. Na indústria farmacêutica seu uso data desta época também (MASTERS, 1985).

O processo de spray-drying abrange os seguintes estágios (MASTERS, 1996):

- 1 - atomização da substância em spray;
- 2 - contato do spray - ar;
- 3 - secagem do spray;
- 4 - separação do produto seco do gás de secagem;

Há vários parâmetros que influenciam o resultado da secagem como descrito na Figura 10 (LIST; SCHMIDT, 1989).

Figura 10 – Fatores que afetam o resultado da secagem (LIST; SCHMIDT, 1989).

Por ser um processo altamente produtivo, pode-se chegar até a trinta toneladas por hora, é o processo de secagem de extratos mais utilizado em escala industrial. Quando se compara à liofilização, esta técnica se torna economicamente mais vantajosa, pois além de ser mais produtiva, elimina a necessidade de outras etapas (SHARAPIN, 2000).

Spray - drying já vem sendo utilizado há algum tempo na indústria farmacêutica, pois oferece meios de obter pós com características e propriedades pré-determinadas. Um exemplo desta aplicação é na produção de excipientes farmacêuticos, por exemplo, a lactose. Lactose produzida por spray - dryer tem algumas vantagens comparadas com a produzida convencionalmente, por exemplo, redução da friabilidade (CASTELLO; MATTOCKS, 1962).

2.5 – Planejamento experimental

Utilizando os planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos pode-se obter o máximo de informações úteis através de um mínimo de experimentos (BARROS NETO, 1996).

Analisando uma variável de cada vez e mantendo-se as demais fixas, temos o método univariado de experimentação. Comparando-se este método com as técnicas multivariadas (modifica-se todas as variáveis ao mesmo tempo), pode-se perceber uma clara desvantagem, uma vez que esta metodologia requer mais tempo e impossibilita o estudo da interação entre as variáveis. Tal estudo é de extrema importância, pois, o valor ideal de uma delas pode depender do valor das outras, fato que é muito freqüente (NEVES; SCHVARTZMAN, 2002).

Para um aprimoramento de processos, redução de variabilidade de resultados, redução de tempo de análise e de custos, um planejamento adequado se faz necessário, pois é uma ferramenta essencial (PEIXOTO, 2005).

O objetivo de um planejamento de experimentos é identificar os parâmetros mais importantes para o seu resultado e definir o menor número de experimentos possível. Um parâmetro é considerado importante quando a sua variação causa diferenças significativas no resultado (PEIXOTO, 2005).

O primeiro passo do planejamento é construir uma tabela (*screening design*) com algumas combinações dos parâmetros envolvidos. A calibração dos resultados com valores observados é importante para verificar a possibilidade da redução da faixa de variação dos parâmetros e até mesmo excluir os eventos não calibrados. O segundo passo é ajustar uma superfície de resposta aos experimentos selecionados, esta superfície geralmente é linear e com interação entre os parâmetros e serve para verificar quais os termos que realmente estão contribuindo para a resposta (BARROS NETO, 1996).

A geração dos experimentos pode ser feita por meio de várias técnicas, dentre elas pode-se citar: Fatoração Completa, Fatoração Fracionada, Planejamento Composto Central (CCD – *Central Composed Designs*), Planejamento *Box Behnken*, (PEREIRA, 2002).

Vale ressaltar que a escolha do tipo de planejamento a ser utilizado, deve levar em conta os objetivos do processo e do experimento, uma vez que planejamentos fracionados são realizados para se obter uma triagem das variáveis, os completos para avaliar a influência de variáveis, modelagem por mínimos quadrados para construção de modelos empíricos e a superfície de resposta para aprimoramento (BARROS NETO, 1996).

Indica-se o planejamento fatorial quando se quer detectar e estudar os possíveis efeitos de duas ou mais variáveis. No fatorial completo testa-se cada combinação possível dos níveis dos fatores, isto é feito para se determinar quanto o processo ou o experimento é afetado por cada variável. Portanto, quanto maior o número de variáveis, maior o número de experimentos, aumentando de maneira geométrica, o que torna o seu uso pouco prático quando se utiliza um

número maior que quatro para as variáveis. Caso o efeito de uma variável dependa do nível de outras, pode-se dizer que há interação entre elas. Um modo de representar as relações é b^k , no qual b mostra os diferentes níveis para cada fator e k o número de fatores (BARROS NETO, 1996). O mais simples dos casos é quando temos cada fator com apenas dois níveis, neste caso é possível fazer 2^k observações da variável resposta e este planejamento denomina-se experimento fatorial 2^k e se representa os níveis como máximo (+) e mínimo (-) (NEVES, SCHVARTZMAN, JORDÃO, 2002).

No planejamento fatorial fracionado, tenta-se eliminar os termos cruzados de alta ordem que influenciam pouco no resultado. Para o caso de 3 variáveis x^1 e x^2 , x^3 com 2 níveis (mínimo, máximo) gera-se combinações entre as variáveis sem interação entre elas. A tabela 1 mostra estas combinações sem interação entre as variáveis, ou seja, considerado apenas os efeitos principais (PEREIRA, 2002).

Tabela 1 – Exemplo de planejamento fatorial fracionado

Combinações	X1	X2	X3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

As variáveis x^1 e x^2 , x^3 são mapeadas nos eixos z , x e y , respectivamente, as setas indicam o sentido do maior valor. O valor mínimo da variável é representado por -1 e o máximo por 1 ; os nós de 1 a 8 representam as linhas da tabela 2. As representações (mínimo, máximo), $(-1,1)$ e $(-,+)$ são equivalentes (PEREIRA, 2002). A figura 11 também representa estes experimentos em forma de um cubo.

Figura 11- Cubo de experimentos com três variáveis e dois níveis

A técnica é chamada fracionária porque busca uma fração, devido à subtração do número 1 (uma variável) no expoente. O primeiro passo é realizar a faturação completa com apenas duas variáveis, por exemplo, x^1 e x^2 , conforme está apresentado na tabela 2 (PEREIRA, 2002).

Tabela 2 - Faturação completa com apenas duas variáveis, por exemplo, x^1 e x^2

Combinações	x^1	x^2
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+

O planejamento possui 4 experimentos, metade da faturação completa original para 3 variáveis, mas não está considerando a variável x^3 . A técnica consiste em considerar x^3 com uma interação (produto) de x^1 e x^2 , ou seja, $x^3 = x^1 * x^2$ conforme a tabela 3 (PEREIRA, 2002).

Tabela 3- Faturação fracionada, considerando x^3 com uma interação (produto) de x^1 e x^2

Combinações	x^1	x^2	$x^3 = x^1 * x^2$
1	-	-	+
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	+

Concluindo, caso se deseje não se consegue estimar o coeficiente da interação $x^1 * x^2$, uma vez que esta interação foi utilizada para definir a variável principal x^3 (PEREIRA, 2002).

Além da técnica descrita acima para diminuir o número de experimentos foi criado por Box and Wilson (1951), o planejamento composto central para estudo de funções polinomiais de resposta na indústria, onde o erro experimental, em geral, é bem pequeno, e as condições do experimento são mais facilmente controláveis. Nessas condições, é comum repetir apenas um tratamento, no caso, o relativo ao ponto central. Este tipo de planejamento é muito eficiente uma vez que reduz o número de experimentos em relação ao planejamento fatorial completo e permite que o experimento seja realizado sequencialmente, de forma a caminhar no sentido da otimização do sistema, isto é, através da execução de uma parte do experimento, aplicando experimentos fatoriais através da “técnica do caminhar ascendente ótimo”. Portanto, consiste em obter o valor máximo e comparar com o delineamento, parte axial, com o objetivo de avaliar a parte curvilínea, de forma a maximizar o sistema (PEREIRA, 2002).

Existe ainda o planejamento Box-Behnken, que é um planejamento quadrático. Neste planejamento os pontos dos experimentos são os pontos médios das extremidades de um cubo, como ilustrado na Figura 12 (PEREIRA, 2002).

Figura 12 - Planejamento Box-Behnken para 3 variáveis

Observe que este planejamento requer três níveis para cada variável e gera um número menor de experimentos que o composto central para até três parâmetros de análise, a partir de quatro parâmetros, esta vantagem desaparece. A tabela 4 ilustra um modelo de experimento gerado pela técnica Box-Behnken (PEREIRA, 2002).

Tabela 4 - Modelo de experimento gerado pela técnica Box-Behnken

Combinações	x^1	x^2	x^3
1	-	-	0
2	+	-	0
3	-	+	0
4	+	+	0
5	-	0	-
6	+	0	-
7	-	0	+
8	+	0	+

2.6 –Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A Cromatografia, entre os métodos de análise, ocupa um lugar privilegiado uma vez que permite efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas em conjunto com a espectrofotometria ou espectrometria de massa (COLLINS, 2006).

Esta técnica consiste na separação dos componentes da mistura através da distribuição destes em duas fases, que estão em contato. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se movimenta através dela. Durante essa passagem, os componentes da mistura são distribuídos entre as fases de maneira que cada componente é seletivamente retido pela fase estacionária (COLLINS, 2006).

O termo cromatografia deriva da palavra grega, “chrom” que significa cor e “graphe” que significa escrever, embora o processo não dependa da cor, exceto para auxiliar na identificação dos componentes (COLLINS, 2006). Este termo é atribuído ao botânico Mikhael Semenovitch

Tswett, que em 1906, utilizou esses termos o descrever suas experiências na separação de componentes da gema e ovo e extratos de folhas (COLLINS, 2006).

Nesta época este processo já estava sendo utilizado para a separação de sais orgânicos e amostra de petróleo por Tsweet e Reed na Inglaterra e Day nos Estados Unidos. Apesar destas experiências foi na década de 30 que houve o aperfeiçoamento desta técnica dando origem a moderna técnica de cromatografia por Huhn and Lederer (COLLINS, 2006).

O primeiro relato da técnica de cromatografia por partição ocorreu em 1941 por Martin e Synge, em 1952, Martin juntamente com Consden e Gordon reintroduziram a Cromatografia em Camada Delgada, juntamente com Howard desenvolveu a Cromatografia Líquida aplicando fases reversas e juntamente com James, atualizou a Cromatografia gás-líquido (COLLINS, 2006).

Portanto, atualmente existem várias formas de Cromatografia, dentre elas destaca-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência que utiliza coluna contendo a fase estacionária e um líquido como fase móvel. Com o auxílio de bombas de alta pressão obtêm-se pressão de fase móvel elevada que permite uma alta vazão de fase móvel. Essa técnica recebe esse nome devido à alta eficiência de separação dos componentes (COLLINS, 2006).

Porém a utilização desta técnica para quantificação de compostos exige alguns procedimentos para comprovar sua confiabilidade. Estes procedimentos incluem desde o controle do funcionamento do aparelho até métodos de preparação de amostras. Para tanto é necessário obter parâmetros como linearidade, recuperação, precisão, exatidão e sensibilidade para assim, comprovar sua eficiência e reprodutibilidade (TEIXEIRA, 2006).

A capacidade do método em promover resultados diretamente proporcional à concentração da substância em exame, dentro da faixa de aplicação, dá-se o nome de linearidade. Recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse presente ou adicionado na amostra, que é extraída e possível de ser quantificada (RIBANI et al.; CASS, DEGANI, 2001).

A precisão refere-se à habilidade do método em reproduzir o mesmo resultado sempre que executado, não necessariamente correto. Este procedimento pode ser realizado medindo a variação de replicatas de injeções num curto espaço de tempo (repetibilidade ou precisão intradia) ou em dias diferentes (precisão intermediária ou precisão interensaio), ou ainda em laboratórios diferentes (reprodutibilidade) (RIBANI et al.; CASS, DEGANI, 2001).

A exatidão representa o grau de concordância do valor encontrado no ensaio com o valor verdadeiro (RIBANI et al.; CASS, DEGANI, 2001).

A sensibilidade é a capacidade em distinguir, com confiança, duas concentrações próximas. Esta avaliação compreende a determinação do limite de detecção e quantificação, o primeiro refere-se a menor concentração que é detectável pelo aparelho, porém não necessariamente quantificada, enquanto a segunda é a menor concentração que é medida com precisão e exatidão (RIBANI et al.; CASS, DEGANI, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Otimizar a fermentação e a secagem do extrato de *Monascus ruber*.

3.2 - Objetivos específicos

- Otimizar processos fermentativos do *Monascus ruber* para maior produção de monacolina K.
 - Validar metodologia para quantificação de monacolina em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
 - Avaliar os parâmetros relativos à secagem do fermentado pela técnica de spray drying.
 - Quantificar monacolina do fermentado fluido e seco
 - Avaliar a atividade antioxidante do fermentado fluido e seco.
-

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Obtenção do *Monascus ruber*

O microrganismo *Monascus ruber* van Tiegham (alt. *Basipetospora rubra* Cole & Kendrick), Tax (79, 373), foi adquirido da Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia, inoculado em sílica e armazenado em geladeira a 4°C.

4.2 – Recuperação do inóculo

As esferas de sílica, contendo o fungo, foram colocadas em placa com PDA (Agar, dextrose Batata) por 21 dias para a verificação da pureza e isolamento das colônias de *Monascus ruber*. As colônias isoladas foram inoculadas semeando-as em PDA.

4.3 – Fermentação

4.3.1 – Fermentação utilizando dois diferentes meios de cultura

Os experimentos visando à determinação de características do processo e dos efeitos de alguns fatores selecionados sobre a produção de monacolina por *Monascus ruber* em dois diferentes meios foram realizados segundo um planejamento fatorial completo com dois fatores em dois níveis (2^2) (BOX, HUNTER, HUNTER, 1979), conforme pode ser visto na Tabela 6 e 7. Os dados foram tratados por análise de variância usando a técnica de superfície de resposta, com o auxílio do módulo “Visual General Linear Model (VGLM) do software Statistica 99 (Statsoft, Inc USA).

Os fatores estudados, bem como os níveis selecionados, alto e baixo, usando a nomenclatura + 1 e - 1 em sua forma codificada, estão demonstrados na Tabela 5. O planejamento experimental com os fatores codificados, estão na Tabela 6.

Tabela 5– Fatores estudados e seus níveis no planejamento fatorial 2²

Fatores	Níveis	
	+1	-1
Meio	Arrozina - glicose	Arroz e água
Agitação	10 rpm	0 rpm

Para a análise de superfície de resposta as variáveis estudadas precisaram ser decodificadas. A decodificação é dada pela fórmula da Equação 1:

$$\text{Variável codificada} = \frac{\text{nível não codificado} - 0,5 \times (\text{alto nível} + \text{baixo nível})}{0,5 \times (\text{alto nível} - \text{baixo nível})} \quad (1)$$

Tabela 6– Planejamento fatorial e seus fatores codificados (BOX, HUNTER, HUNTER, 1979)

Experimento	Meio	Agitação
1	+	+
2	+	-
3	-	+
4	-	-

A montagem utilizada para a realização da fermentação consistia de uma mesa agitador de quinze pontos (MAG-15, Marte) sobre a qual foi montada uma câmara climatizada com circulação de ar, a qual está ilustrada na Figura 13. Esta montagem permitiu que a temperatura e a agitação pudessem ser devidamente controladas. Os experimentos foram realizados em duplicata. Foram inoculados em 50 mL de meio 3 mL de suspensão de inóculo e após 21 dias foi realizada a extração da monacolina-K utilizando-se os micélios. A suspensão de inóculo foi preparada utilizando-se aproximadamente 16,8 g

de massa micelial úmida em 10 mL de água destilada esterilizada. Esta suspensão foi filtrada em gaze esterilizada, pegando-se então 3 mL ($5,84 \times 10^4$ esporos/mL). A escolha do meio fermentativo foi feita utilizando-se uma triagem de meios realizada anteriormente pela acadêmica Lilian Patricia Bento Sabeh (PIBIC/CNPq), sob orientação do Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas, na FCFRP/USP, e o meio arroz e água por ser o meio tradicionalmente utilizado no oriente.

Figura 13 – Equipamento utilizado para realização da fermentação

A composição dos dois meios de culturas encontra-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Composição do meio arrozina - glicose e meio arroz e água

Meio arrozina - glicose (g/L)		Arroz e água (g/L)	
Arrozina (amido, farinha de arroz)	30	Arroz	30
Peptona	9	-	
Glicerina	30	-	
Glicose	110	-	
Sulfato de magnésio	1	-	
Nitrato de potássio	2	-	
Sulfato de amônio	1	-	
Zinco	0,1	-	

4.3.2 – Fermentação utilizando meio arrozina - glicose com diferentes aditivos

Os experimentos visando à determinação de características do processo e dos efeitos de alguns fatores selecionados sobre a produção de monacolina por *Monascus ruber* em meio fermentativo com diferentes aditivos foram realizados segundo um planejamento Box-Behnken conforme pode ser visto na Tabela 9 e 10. Este experimento foi realizado em duplicata. Os dados foram tratados por análise de variância usando a técnica de superfície de resposta, com o auxílio do módulo “Visual General Linear Model” (VGLM) do software Statistica 99 (Statsoft, Inc USA).

Os fatores estudados, bem como os níveis selecionados, alto, médio e baixo, usando a nomenclatura + 1, 0 e – 1 em sua forma codificada, estão demonstrados na Tabela 8. O planejamento experimental com os fatores codificados estão na Tabela 9.

Tabela 8 – Fatores estudados e seus níveis.

Fatores	Níveis		
	+1	0	-1
Zinco, Zn	0,8 g L	0,4	0g
Glutamato monossódico (GMS)	10 g L	5	0g
Amônio, NH_4^+	2 g L	1	0g

Tabela 9 – Planejamento Box – Benkhin e seus fatores codificados.

Experimento	Zn	GMS	NH_4^+
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Para a análise de superfície de resposta as variáveis estudadas precisaram ser decodificadas. A decodificação é dada pela fórmula da Equação 1:

$$\text{Variável codificada} = \frac{\text{nível não codificado} - 0,5 \times (\text{alto nível} + \text{baixo nível})}{0,5 \times (\text{alto nível} - \text{baixo nível})} \quad (1)$$

A composição do meio mantida constante em todos os experimentos está ilustrada na Tabela 10.

Tabela 10– Composição mantida constante do meio arrozina - glicose

Meio	g/L
Arrozina	30
Peptona	9
Glicerina	30
Glicose	110
MgSO ₄	1
KNO ₃	2
Ágar	18

Os experimentos foram realizados em duplicata, a 30°C, agitação 10rpm, sem aeração, pH entre 6,0 e 6,3. Foram inoculados em 50 mL de meio 2 mL de suspensão de inoculo e após 21 dias foi realizada a extração utilizando-se os micélios. A suspensão de inóculo foi preparada utilizando-se aproximadamente 16,8 g de massa micelial úmida em 10 mL de água destilada esterilizada. Esta suspensão foi filtrada em gaze esterilizada, pegando-se então os 2 mL ($5,84 \times 10^6$ esporos/mL). O equipamento utilizado para a realização da fermentação foi o mesmo do experimento anterior, Figura 12.

4.4 - Extração

Após os 21 dias de fermentação, filtrou-se o fermentado por filtração à vácuo separando a massa micelial do caldo de fermentação. Em seguida, com o auxílio de uma espátula, triturou-se

esta massa. À massa micelial triturada adicionaram 100 mL de etanol absoluto e deixou-se em agitação por 48 horas, filtrando à vácuo após este período. O extrato da massa micelial foi caracterizado e usado para o estudo de secagem.

4.5 - Caracterização do extrato da massa micelial

4.5.1 - Validação da metodologia para quantificação de monacolina K em Cromatografia Líquida de Alta eficiência

4.5.1.1 – Linearidade e curva analítica

A linearidade foi avaliada, em triplicata para cada concentração através da construção de uma curva analítica, com valores expressos em $\mu\text{g/mL}$, a partir de uma solução do padrão de lovastatina, monacolina K, (Natural Pharma) em 13 concentrações de 1140 $\mu\text{g/mL}$ a 0,11 $\mu\text{g/mL}$.

A faixa linear foi calculada através das respostas relativas, ou seja, dados do sinal do detector divididos pelas respectivas concentrações. Um gráfico foi construído com as respostas relativas no eixo das ordenadas e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo da abscissa. Foram desenhadas outras linhas paralelas no gráfico, para 95% e 105% da linha da faixa linear (RIBANI et al., 2004).

A partir dos resultados encontrados foi construída a curva analítica, dentro da faixa linear, relacionando as alturas dos picos (eixo das abcissas) em função de suas respectivas concentrações (eixo das ordenadas). A análise estatística dos dados foi obtida pelo método de regressão linear por mínimos quadrados e expressa pela equação de primeira ordem $y = ax + b$, no qual, (a) corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta, e (b) corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de interseção da reta com o eixo das ordenadas. O coeficiente de

correlação, r^2 , também foi calculado. Uma nova curva analítica foi realizada a cada dia de análise, utilizando cinco concentrações, em duplicata, dentro da faixa linear e compreendendo 50% a 150% do valor esperado (RIBANI et al., 2004; Resolução-RE no 475, Anvisa, 2002).

4.5.1.2– Precisão

Para a avaliação da precisão foram realizados seis “clean-ups” da mesma amostra, como descrito no item, no mesmo dia. (precisão intra-ensaio), e em dias diferentes (precisão inter ensaio). O cálculo da precisão normalmente é expresso em função do coeficiente de variação ou estimativa do desvio padrão relativo (CV %) (RIBANI et al., 2004; Resolução-RE no 475, Anvisa, 2002).

A precisão é dada pela equação 2:

$$CV(\%) = \frac{S}{X} \times 100 \quad (2)$$

No qual, CV % corresponde ao coeficiente de variação; S é a estimativa do desvio padrão e X é a média das medidas em replicata para cada concentração.

4.5.1.3 – Exatidão

Para a avaliação da exatidão foram realizados, em triplicata, “clean-up” do extrato fortificado com três concentrações diferentes do padrão de monacolina K (lovastatina), 25%, 50% e 100% da concentração esperada de lovastatina no extrato. O cálculo da exatidão normalmente é expresso em função da porcentagem do erro relativo, através da equação 3 (RIBANI et al., 2004; Resolução-RE no 475, Anvisa, 2002).

$$E (\% \text{ erro}) = \frac{\text{Valor obtido} - \text{Valor real}}{\text{Valor real}} \times 100 \quad (3)$$

4.5.1.4 – Limite de quantificação e limite de detecção

Foi realizada uma curva analítica com concentrações próximas ao limite de detecção (4,45 µg/mL a 0,11 µg/mL). Calcula-se a equação da reta através da regressão linear dos mínimos quadrados (RIBANI et al., 2004).

O limite de detecção é dado pela equação 4:

$$LD = 3,3x \frac{s}{S} \quad (4)$$

O limite de quantificação é dado pela equação 5:

$$LQ = 10x \frac{s}{S} \quad (5)$$

No qual, s é a estimativa do desvio padrão da curva de regressão linear e S é o coeficiente angular da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

4.5.2 – Quantificação de monacolina K nos extratos

Para a quantificação de monacolina procederam-se análises em CLAE, para tanto, as amostras foram filtradas em papel Millipore de 0,45 µm e as análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu, modelo SPD-10A, equipado com uma bomba Shimadzu, modelo SPD-10A, injetor manual e um cromatopac, modelo C-R6A. Foram utilizadas coluna de fase reversa C18 e fase móvel acetonitrila água 65:35. A vazão foi de 1 mL por minuto para um tempo de eluição de 15 minutos. O cromatograma foi monitorado em 240 nm (CHANG et al., 2002).

4.5.2.1 – Curva analítica de monacolina

Foram preparadas as soluções do padrão com as seguintes concentrações: 5, 10, 20, 50, 100 e 200 µg/mL.

Para a preparação das soluções, pesaram-se 40 mg do padrão de Lovastatina e dissolveu-se em acetonitrila em quantidade suficiente para 20 mL de solução. Desta solução mãe, utilizando a fase móvel, prepararam-se as diluições, as quais foram injetadas em duplicata.

4.5.3 – Determinação de pigmentos de *Monascus ruber*

4.5.3.1- Análise por espectrofotometria

A análise da produção de pigmentos de *Monascus* foi feita pela medida da absorvância, em espectrofotômetro (Camspec M330), do pigmento nas faixas próximas a 400 e 500 nm para pigmentos amarelos, e vermelhos respectivamente (JOHNS, STUART, 1991). A relação absorvância a 500 nm /absorbância a 400 nm dá, supostamente, a relação entre pigmento vermelho e amarelo (WONG, KOEHLER, 1981). O fato de que os pigmentos amarelos, alaranjados e vermelhos de *Monascus* são produzidos como uma mistura provavelmente afeta a análise por simples medida de absorvância. No entanto, a grande maioria dos pesquisadores estima a produção de pigmentos de *Monascus* por esse método.

4.5.3.2 – Análise por colorimetria

A análise da produção de pigmentos de *Monascus* foi feita usando o “Cromameter” Mininolta CR 200. A coloração é dada colocando o canhão do aparelho sobre a superfície a ser analisada, disparando-o, o que ocasionará uma emissão de um feixe luminoso proveniente de uma lâmpada de arco voltaico de xenônio. A intensidade da luz refletida será captada pelo

aparelho que transformará esses impulsos luminosos e, coordenadas numéricas L, a, b que compõem uma cor. Quanto maior o valor de a, maior a tonalidade vermelha, quanto maior o valor de b, maior a tonalidade amarela, L indica a porcentagem de reflexão e cores mais claras refletem mais. Portanto, maior o valor de L (CALVO, SALVADOR, 2002 ; PASTRANA et. al., 1995)

4.5.4 – Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi realizada utilizando um radical estável, DPPH – 2,2-difenilpicrilhidrazil. Em tubo de ensaio, foi adicionado 1 mL de tampão acetato pH 5,5, 1 mL de etanol, 100 µL da amostra e, por último 500 µL de DPPH (250 mM). Os tubos de ensaio foram agitados e deixados reagindo por 10 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Camspec M330) a 510 nm. A reação foi feita em triplicata. Para o preparo do branco foram adicionados 1 mL de etanol, 1 mL de tampão, 600 µL etanol e para o preparo do controle, C+, foram adicionados 1 mL de etanol, 1 mL de tampão, 100 µL de etanol e 500 µL de DPPH 250 mM (GEORGETTI, 2004).

A porcentagem de inibição foi determinada pela equação 6.

$$\%inibição = \frac{100 - (A * 100)}{C+}$$

Para a análise da atividade antioxidante bem como do estudo da secagem todos os extratos obtidos foram unidos.

4.6 - Secagem e caracterização do extrato seco pela técnica de spray drying

Foi realizado um estudo utilizando-se um planejamento Box-Behnken (Tabela 12 e 13), a fim de se avaliar a influência da proporção do excipiente (Maltodextrina, MOR REX 1920 Corn

Products): droga, do tempo de incorporação do excipiente e da temperatura sobre características do extrato seco como: densidade aparente, densidade de compactação, fator de Hausner, umidade residual, atividade de água, atividade antioxidante e teor de monacolina.

Os fatores estudados, bem como os níveis selecionados, alto e baixo, usando a nomenclatura + 1 e - 1 em sua forma codificada, estão demonstrados na Tabela 11. O planejamento experimental com os fatores codificados estão na Tabela 12.

Tabela 11 – Fatores estudados e seus níveis no planejamento Box-Behnken

Fatores	Níveis		
	+1	0	-1
Temperatura (°C) (Temp)	110	80	50
Proporção teor adjuvante : teor sólidos extrato (TA:TS)	10:1	7,5:1	5:1
Tempo de incorporação do adjuvante (min) (T)	9	5	1

Tabela 12 – Planejamento Box – Benkhin e seus fatores codificados

Experimento	Temp	TA:TS	T
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

As variáveis estudadas precisam ser decodificadas para a análise de superfície de resposta. A decodificação é dada pela fórmula da Equação 1:

$$\text{Variável codificada} = \frac{\text{nível não codificado} - 0,5 \times (\text{alto nível} + \text{baixo nível})}{0,5 \times (\text{alto nível} - \text{baixo nível})} \quad (1)$$

Utilizou-se equipamento (LM modelo MSD 1.0) constituído de bico atomizador do tipo duplo fluido e câmara de secagem de 50 cm de altura e 15 cm de diâmetro interno. Os parâmetros utilizados para secagem estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13 - Condições operacionais utilizadas para secagem por spray drying.

Parâmetro	Valor
Pressão do ar de atomização	2 kgf/cm ²
Vazão do ar de atomização	50 litros/min
Fluxo de alimentação	5 mL/min

As metodologias utilizadas para caracterização do extrato seco serão descritas a seguir.

4.6 .1– Caracterização do extrato seco

4.6.1.1 -Densidade aparente

A uma proveta de 5 mL, previamente pesada, foi adicionada uma amostra de 1 grama do pó. A densidade aparente constitui-se na relação entre o volume e a massa de pó adicionada à proveta (WANCZINSKI et al.,2002).

4.6.1.2 -Densidade de compactação

Um massa de 1 g do pó foi adicionado a uma proveta de 5 mL. A proveta, acoplada à um

sistema de agitação de peneiras (Bertel) foi submetida à vibração intermediária (nível 4) por 1 minuto e em agitação máxima por 1 minuto. A densidade de compactação é dada pela relação entre o volume ocupado pelo pó após a compactação e a massa de pó adicionada à proveta (WANCZINSKI et al.,2002).

4.6.1.3 -Fator de Hausner e Índice de compressibilidade

O fator de Hausner (FH) consiste no quociente entre as densidades de compactação e aparente do material avaliado. Os materiais cujo FH for inferior á 1,25 são facilmente compressíveis. O índice de compressibilidade (IC) consiste na diferença da densidade de compactação e densidade aparente sobre a densidade compactação. Em regra, os materiais cujo IC for inferior a 15%, apresentam boas características de compressão, ao contrário dos produtos em que aquele valor é superior a 25% (WANCZINSKI et al.,2002).

4.6.1.4 -Umidade residual

A umidade dos extratos secos foi realizada utilizando-se balança analisadora de umidade com lâmpada de halogênio (Ohaus MB 45).

4.6.1.5 - Atividade de água, aw

O valor aw indica o nível de água em sua forma livre nos materiais. Em um espaço fechado contendo um material e uma parcela pequena de ar, pode-se relacionar a umidade deste ar com a quantidade de água presente no material. A atividade de água nada mais é do que o equilíbrio de umidade neste espaço fechado, mas não é indicado de 0 a 100% de umidade relativa, mas de 0 a 1 aw. Consideram-se 0 para materiais livres de água e 1 para a água em sua forma líquida. A medida da atividade de água foi realizada utilizando-se o equipamento Testo 650 (Texto), Figura 14.

Figura 14- Equipamento para medida de atividade de água.

4.6.1.6- Determinação de pigmentos de *Monascus ruber*

A análise da produção de pigmentos de *Monascus* foi feita pela medida da absorvância, em espectrofotômetro (Camspec M330), do pigmento nas faixas próximas a 400 e 500 nm para pigmentos amarelos, e vermelhos respectivamente (JOHNS, STUART, 1991). A relação absorvância a 500 nm /absorbância a 400nm dá uma estimativa da relação entre pigmentos vermelhos e amarelos (WONG, KOEHLER, 1981).

4.6.1.7-Quantificação de monacolina no extrato seco

Pesaram-se 3 g de extrato seco, adicionaram-se 3 mL de água destilada. Após a dissolução total, adicionaram-se 3mL de acetonitrila, agitou-se e centrifugou-se a 1800 rpm por 5 minutos ocorrendo a precipitação do adjuvante. Quantificou-se o sobrenadante como descrito no item 4.5.2. O fator de recuperação, calculado no item 4.5.1.2 foi usado nos cálculos do teor de monacolina.

4.6.1.7.1 – Recuperação da etapa do “clean-up”

A recuperação da etapa do “clean-up” do extrato seco foi avaliada adicionando o padrão lovastatina no extrato, antes do “clean-up” em quintuplicata de três diferentes concentrações,

25%, 50% e 100% da concentração esperada de lovastatina no extrato. Essa recuperação foi realizada nas três condições diferentes de adjuvante utilizada na secagem. A amostra sem adição do padrão e cada uma das amostras com o padrão adicionado foram analisadas e as quantidades medidas relacionadas com a quantidade adicionada (RIBANI et al., 2004).

4.6.1.8– Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi realizada utilizando um radical estável, DPPH – 2,2-difenilpicrilhidrazil, como descrito no item 4.5.4 para a atividade antioxidante do extrato fluido.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1- Cromatografia líquida de alta eficiência

O cromatograma obtido pelo padrão Lovastatina e pelo extrato micelial de *Monascus ruber* estão ilustrados na Figura 15.

Figura 15 – Cromatograma do padrão lovastatina (A) e do extrato de *Monascus ruber* (B)

5.2 – Validação da metodologia para quantificação de lovastatina em Cromatografia Líquida de Alta eficiência

5.2.1 – Linearidade

A curva analítica das soluções do padrão de lovastatina em 13 concentrações diferentes (1140 µg/mL, 570 µg/mL, 285 µg/mL, 142,5 µg/mL, 71,25 µg/mL, 35,62 µg/mL, 17,8 µg/mL, 8,9 µg/mL, 4,45 µg/mL, 2,2 µg/mL, 0,44 µg/mL, 0,22 µg/mL, 0,11 µg/mL) está ilustrada na Figura 16. Nenhuma

concentração foi omitida, pois o objetivo desta curva analítica foi verificar quais concentrações estão dentro da faixa linear. A área de cada concentração representa a média de três leituras.

Figura 16 - Curva analítica das 13 concentrações do padrão lovastatina.

O cálculo da faixa linear foi dado pelo gráfico das respostas relativas no eixo y e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo x. O gráfico está apresentado na Figura 17.

Figura 17 – Gráficos das respostas relativas *versus* log da concentração

Através da análise do gráfico da Figura 16, pode-se concluir que a faixa linear é de 285 µg/mL a 2,2 µg/mL. Depois de calculado a faixa linear, refez-se novamente a curva analítica tirando as concentrações acima e abaixo da faixa linear, a curva analítica, a equação de primeira ordem e o coeficiente de correlação estão ilustrados na Figura 18.

Figura 18 – Curva analítica com concentrações dentro da faixa linear.

O coeficiente de correlação R^2 permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual ou maior a 0,99. O coeficiente de correlação de todas as 13 concentrações foi de 0,9819 estando inferior ao preconizado pela ANVISA, porém retirando os pontos fora da faixa linear obtêm-se um R^2 de 0,9999, indicando ótima linearidade.

5.2.2 - Recuperação e exatidão do “clean up” da amostra

A concentração média de monacolina K presente no extrato foi de 10 µg/mL. Adicionaram-se, portanto 2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL, e cada uma destas concentrações foi preparada em

quintuplicata. Para o cálculo da recuperação e da exatidão usou-se a diferença da concentração obtida em cada extrato fortificado com a concentração do extrato sem adição de padrão. A Tabela 15 mostra os resultados obtidos com extrato seco preparado com proporção 7,5:1 de TA/TS, a recuperação das demais condições foram omitidas por não ter tido diferença. Observa-se na Tabela 14 que foi possível recuperar a monacolina K com valores entre 96,12% a 97,7%, CV(%) menores que 2% e erro relativo menor que 10%. Os intervalos aceitáveis de recuperação geralmente estão entre 70 a 120%, com precisão e exatidão de até $\pm 15\%$ (ANVISA, 2002). Portanto pode-se concluir que o método é adequado para a extração de monacolina K nos extratos secos.

Tabela 14 – Recuperação e Erro relativo (exatidão).

Concentração verdadeira $\mu\text{g/mL}$	Concentração obtida	Recuperação %	Erro relativo %	CV %
2,5	2,35	97,04%	-3,12	1,80
	2,43			
	2,46			
	2,44			
	2,45			
5,0	4,70	96,12%	-3,88	1,76
	4,90			
	4,80			
	4,75			
	4,90			
10,0	9,80	97,70%	-2,32	0,6
	9,70			
	9,85			
	9,73			
	9,76			

Os procedimentos de preparação das amostras levam à perda do analito devido à extração incompleta, adsorção, perda de volume ou co-precipitação, por isso, o parâmetro recuperação é de fundamental importância (CAUSON, 1997).

A precisão e a exatidão estão diretamente relacionadas com a recuperação. Em muitos casos, baixas recuperações refletem baixas precisões. Mas, às vezes, boa precisão e exatidão podem ser obtidas por métodos com moderada recuperação, desde que o limite de quantificação necessário possa ser obtido. Algumas vezes é necessário sacrificar a recuperação para conseguir uma melhor seletividade com alguns procedimentos de extração (CAUSON, 1997).

5.2. 3 - Precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio

A precisão foi dada pelo coeficiente de variação de seis amostras preparadas no mesmo dia e em dias diferentes, cujos resultados estão expressos na Tabela 15. Pode-se observar que tanto o coeficiente de correlação inter-ensaio quanto o intra-ensaio esteve muito menor que 15%, indicando assim boa precisão da metodologia empregada (ANVISA, 2002).

Tabela 15 – Precisão intra-ensaio e inter-ensaio

Concentração	CV %	Concentração	CV %
Intra-ensaio µg/mL	Intra-ensaio	Inter-ensaio µg/mL	Inter-ensaio
10,02		9,77	
9,40		9,39	
9,63	2,31	10,30	3,21
9,66		9,55	
9,72		9,59	
9,45		9,74	

5.2. 4 - Sensibilidade

Os limites de quantificação e de detecção são muito importantes no caso de quantificação de substâncias com concentrações muito baixas. Os limites de quantificação e de detecção (calculados como descrito no item 4.5.1.4, equação 4 e 5) foram respectivamente, 0,66 µg/mL e 0,22 µg/mL.

5.3 – Estudo da produção de Monacolina k por dois diferentes meios de cultura

Os fatores usados para a caracterização do extrato foram o teor de monacolina K. Os resultados obtidos do planejamento Box-Behnken estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados obtidos nos experimentos de fermentação por dois diferentes meios de cultura.

Meio	Agitação (rpm)	Monacolina-K (µg/mL)
Meio arrozina - glicose	10	77,4
Meio arrozina - glicose	0	65,1
Arroz e água	10	3,8
Arroz e água	0	3,0

Observando os dados descritos na Tabela 16 pode-se afirmar que o meio arrozina - glicose foi melhor para a produção de monacolina-K e que a agitação promove um leve aumento na produção desta substância. O maior teor de monacolina k foi de 77,4 µg/mL, maior ao encontrado por Yang et. al. (2004), 7,36 µg/mL, próximo ao encontrado por Chang et. al, (2002) 77 a 93 µg/ml e abaixo do encontrado por Manzoni (1999), 127 µg/mL. A Tabela 17 mostra os resultados da análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao teor de monacolina k.

Tabela 17 – Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao teor de monacolina

Variável	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	F	Probabilidade teor de Monacolina
Meio	5307,123	1	54,89776	0,093269*
Agitação	133,403	1	45,92426	0,477171
Erro	115,562	1	1,15438	
Total	556,088	3	101,9764	

* variável significativa a 10%

A Tabela 17 mostra que somente o meio influencia o teor de monacolina com 10% de significância. A agitação não mostrou significância, isto não quer dizer que não exista efeito desta variável no processo, mas sim que o efeito da agitação não seja importante perante o erro do experimento. Por isso, o meio arrozina - glicose foi o escolhido para a realização dos experimentos seguintes.

5.4 – Estudo da produção de Monacolina por meio arrozina – glicose com diferentes aditivos

Os fatores usados para a caracterização do extrato foram o teor de monacolina K e produção de pigmentos. Os resultados obtidos do planejamento Box – Benkhin estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18 - Resultados obtidos no experimento de fermentação por meio arrozina-glicose

Exp.	Zn	GMS	NH ₄ ⁺	Monacolina K %	Abs _{500/400}	a/b	L
1	0	0	1	3,72	0,62	0,35	69,74
2	0,8	0	1	13,32	0,82	0,70	62,69
3	0	10	1	5,95	0,77	0,43	66,30
4	0,8	10	1	7,42	0,91	0,66	65,08
5	0	5	0	4,81	0,75	0,47	75,70
6	0,8	5	0	6,49	0,72	0,43	70,30
7	0	5	2	12,77	0,72	0,44	61,99
8	0,8	5	2	10,01	0,86	0,72	64,95
9	0,4	0	0	31,86	0,83	0,76	58,66
10	0,4	10	0	14,96	0,90	0,70	58,24
11	0,4	0	2	66,58	0,88	1,29	46,29
12	0,4	10	2	27,30	0,81	0,67	61,39
13	0,4	5	1	17,82	0,92	1,02	61,60
14	0,4	5	1	23,30	0,80	0,91	56,04
15	0,4	5	1	15,90	0,68	0,76	68,78

Observando os dados descritos na Tabela 18 pode-se observar que o meio 11 foi o qual possibilitou ao *Monascus ruber* produzir mais monacolina k e pigmentos vermelhos de acordo com a análise por “Cromameter”, com correlação de 1,29. O maior teor de monacolina k foi de 66,58 µg/mL, maior ao encontrado por Yang et. al. (2004), 7,36µg/mL, próximo ao encontrado por Chang et. al. (2002), 77 a 93 µg/ml e abaixo do encontrado por Manzoni (1999), 127 µg/mL.

Os gráficos de superfície de resposta e os resultados da análise de variância (ANOVA) dos dados de teor de monacolina K, $ABS^{500/400}$, a/b e L, estão descritos a seguir.

5.4.1 – Teor de monacolina K nos extratos

A análise de variância dos dados de teor de monacolina K está ilustrada na Tabela 19.

Tabela 19 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao teor de monacolina K nos extratos fluidos.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
Zn	0,992	1	0,992	0,01470	0,905359
Zn ²	1861,357	1	1861,357	27,58992	0,000156*
GMS	730,430	1	730,430	10,82679	0,005855**
GMS ²	245,433	1	245,433	3,63793	0,078815***
NH ₄	620,083	1	620,083	9,19117	0,009633**
NH ₄	295,690	1	295,690	4,38285	0,056472***
Zn* GMS	0,38	1	0,380	0,00563	0,941345
Zn * NH ₄	8,487	1	8,487	0,12580	0,728512
GMS *NH ₄	100,627	1	100,627	1,49154	0,243664
Erro	877,046	13	67,465		

* variável significativa a 0,1%, ** variável significativa a 1%, variável significativa a 10%.

Com base nos dados da Tabela 19 pode-se afirmar que o teor de monacolina K é influenciado pelo termo quadrático de Zinco, ou seja, um efeito não linear, com 0,1% de significancia, pela concentração de glutamato com 1%, pelo termo quadrático de glutamato com 10% de significancia, pela concentração de amônio com 1% e pelo termo quadrático de glutamato com 10% de significancia.

5.4.2 – Avaliação de pigmentos por espectrofotometria

A análise de variância dos dados da razão da absorvância no comprimento de onda de 500 nm pela absorvância no comprimento de onde de 400 nm está ilustrada na Tabela 20.

Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes a $ABS^{500/400}$

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
Zn	0,025313	1	0,025313	2,7862	0,155950
Zn ²	0,011683	1	0,011683	1,2859	0,308223
GMS	0,007200	1	0,007200	0,7925	0,414119
GMS ²	0,004852	1	0,004852	0,5341	0,497697
NH ₄	0,000613	1	0,000613	0,0674	0,805485
NH ₄	0,001298	1	0,001298	0,1429	0,720949
Zn* GMS	0,000900	1	0,000900	0,0991	0,076566*
Zn * NH ₄	0,007225	1	0,007225	0,7953	0,413365
GMS *NH ₄	0,004900	1	0,004900	0,5394	0,495677
Erro	0,045425	5	0,009085		

* variável significante a 10%

Verifica-se pela visualização da Tabela 20 que somente a interação glutamato / zinco afeta a $ABS^{500/400}$ com 10% de significancia, nesta faixa de estudo.

Nesta faixa de estudo, as demais variáveis estudadas não influenciaram de forma significativa a $ABS^{500/400}$. Isto não quer dizer que não exista efeito destas variáveis no processo e sim que a variância dos fatores estudados com o erro do experimento não foi significativo

sugerindo, portanto, que o efeito destas variáveis não seja importante. Porém, há que se lembrar que, como já comentado anteriormente, embora este parâmetro de cor seja amplamente utilizado por outros autores, é pouco preciso por utilizar o método espectrofotométrico sem padrões analíticos dos pigmentos.

5.4.3 – Produção de pigmentos por colorimetria, a/b

A análise de variância dos dados da razão da intensidade de coloração vermelho pelo amarelo está ilustrada na Tabela 21.

Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes a a/b

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
Zn	0,084050	1	0,084050	3,4871	0,120821
Zn ²	0,454464	1	0,454464	18,8548	0,007413*
GMS	0,051200	1	0,051200	2,1242	0,204781
GMS ²	0,000433	1	0,000433	0,0180	0,898567
NH ₄	0,072200	1	0,072200	2,9954	0,144055
NH ₄	0,003510	1	0,003510	0,1456	0,718423
Zn*GMS	0,003600	1	0,003600	0,1494	0,715050
Zn * NH ₄	0,025600	1	0,025600	1,0621	0,349987
GMS *NH ₄	0,078400	1	0,078400	3,2527	0,131163
Erro	0,120517	5	0,024103		

*variável significativa a 1%

Verifica-se pela visualização da Tabela 21 que somente o termo quadrático de zinco afeta a a/b com 1% de significância, isto não quer dizer que não exista efeito destas variáveis no processo e sim que a variância dos fatores estudados com o erro do experimento não foi significativo sugerindo, portanto que o efeito das demais variáveis não seja importante.

5.4.4 – Produção de pigmentos por colorimetria, índice de reflexão, L

A análise de variância dos dados referentes ao índice de reflexão está ilustrada na Tabela 22.

Tabela 22 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes a L

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
Zn	14,34	1	14,34	0,5563	0,489318
Zn ²	233,44	1	233,44	9,0569	0,029774*
GMS	23,22	1	23,22	0,9010	0,386108
GMS ²	63,25	1	63,25	2,4538	0,178017
NH ₄	99,97	1	99,97	3,8786	0,106002
NH ₄	12,72	1	12,72	0,4936	0,513675
Zn* GMS	8,50	1	8,50	0,3297	0,590713
Zn * NH ₄	17,47	1	17,47	0,6779	0,447788
GMS *NH ₄	60,22	1	60,22	2,3363	0,186929
Erro	128,87	5	25,77		

* variável significativa a 5%

Verifica-se pela visualização da Tabela 22 que somente o termo quadrático de zinco interfere de forma significativa a 5% a intensidade de reflexão, L, nesta faixa de estudo.

A seguir estão apresentados os gráficos dos resultados obtidos pela fermentação com meio arrozina - glicose.

5.4.5 – Gráficos das respostas estudadas

5.4.5.1 – Gráficos do teor de monacolina k no extrato fluido

Nas Figuras 19, 20, 21 estão ilustrados os gráficos do teor de monacolina K em função dos fatores estudados.

Figura 19 - Gráfico de superfície de resposta do teor de monacolina K em função do teor de amônio (NH₄) e glutamato (GMS).

Figura 20 - Gráfico de superfície de resposta do teor de monacolina K em função do teor de zinco (Zn) e amônio (NH₄).

Figura 21 - Gráfico de superfície de resposta do teor de monacolina K em função do teor de zinco (Zn) e glutamato (GMS).

Analisando-se as Figuras 19, 20, 21 pode-se observar que a produção de monacolina k é maior no meio com concentrações intermediárias de glutamato e zinco e com concentrações maiores de amônio. Não foram encontrados estudos sobre a influencia da concentração destas substâncias sobre a produção de monacolina K pelo *Monascus Ruber*.

5.4.5.2 - Gráficos da razão $ABS^{500}/_{400}$

Nas Figuras 22, 23, 24 estão ilustrados os gráficos da razão $ABS^{500}/_{400}$ em função dos fatores estudados.

Figura 22 - Gráfico de superfície de resposta da razão $ABS^{500/400}$ em função do teor de amônio (NH_4) e glutamato (GMS).

Figura 23 - Gráfico de superfície de resposta do teor da razão $ABS^{500/400}$ em função do teor de zinco (Zn) e amônio (NH_4).

Figura 24 - Gráfico de superfície de resposta da razão $ABS^{500/400}$ em função do teor de zinco (Zn) e glutamato (GMS).

Uma maior produção de pigmentos vermelhos é requerida, então quanto maior a relação, melhor é a composição do meio para a produção de pigmentos vermelhos. Analisando-se as Figuras 22, 23, 24 pode-se observar que a razão $ABS^{500/400}$, ou seja a relação entre pigmento vermelho e amarelo é maior no meio com concentrações intermediárias de zinco e concentrações maiores de amônio e de glutamato, ou seja, 0,4 g/L de zinco, 2 g/L amônio e 10 g/L de glutamato, diferindo da literatura. Hajjaj et. al., 2000 e Pastrana et. al., 1995 descrevem como melhor meio para a produção de pigmentos é aquele contendo 5 g/L de glutamato, 0,01 g/L de zinco, ambos os trabalhos não utilizaram amônio.

5.4.5.3 - Gráficos da razão a/b

Nas Figuras 25, 26, 27 estão ilustrados os gráficos da razão a/b em função dos fatores estudados.

Figura 25 - Gráfico de superfície de resposta da razão a/b em função do teor de zinco (Zn) e glutamato (GMS).

Figura 26 - Gráfico de superfície de resposta do teor da razão a/b em função do teor de zinco (Zn) e amônio (NH_4).

Figura 27 - Gráfico de superfície de resposta da razão $ABS^{500}/400$ em função do teor de amônio (NH_4) e glutamato (GMS).

Analisando-se as Figuras 25 e 26 pode-se observar que a razão a/b , ou seja a relação entre a intensidade de pigmento vermelho e amarelo é maior no meio com concentrações intermediárias de zinco. A Figura 27 mostra que a razão a/b é maior em concentrações maiores de amônio e de glutamato. ou seja, 0,4g/L de zinco, 2g/L amônio e 10g/L de glutamato, diferindo da literatura. Hajjaj et. al., 2000 e Pastrana et. al., 1995 descrevem como melhor meio para a produção de pigmentos é aquele contendo 5g/L de glutamato, 0,01g/L de zinco, ambos os trabalhos não utilizaram amônio, como dito anteriormente.

Os corantes são essenciais na indústria de alimentos e podem ser obtidos através de fontes naturais porém os corantes produzidos por microrganismos ainda não são muito explorados. Embora o custo para produzir os corantes naturais seja mais elevado em relação aos sintéticos, o interesse por esses produtos está crescendo no Brasil e no mundo. Segundo a “Biotropical” empresa de corantes naturais, Belém do Pará (PA), citado por MAIMON (2000), o mercado

internacional de corantes naturais movimenta US\$ 5 bilhões. Em termos da distribuição geográfica, estimou-se que esta acompanha o mercado de alimentos, aumentando-se a participação do Japão, pelo fato deste país registrar um consumo privilegiado de corantes naturais. Sendo assim, pesquisadores nacionais (Grupo GENAMAZ) citaram, em seu último relatório, a seguinte participação no mercado: EUA (30%), Europa (30%), Japão e Ásia (30%), resto do mundo (10%) (MAIMOM, 2000).

5.4.5.4 - Gráficos intensidade de reflexão. L

Nas Figuras 28, 29, 30 estão ilustrados os gráficos da intensidade de reflexão, L em função dos fatores estudados.

Figura 28 - Gráfico de superfície de resposta de L em função do teor de zinco (Zn) e amônio (NH_4).

Figura 29 - Gráfico de superfície de resposta de L em função do teor de amônio (NH_4) e glutamato (GMS).

Figura 30 - Gráfico de superfície de resposta do de L em função do teor de zinco (Zn) e amônio (NH_4).

A intensidade de reflexão é maior quanto mais clara for a solução, portanto menor produção de pigmentos totais, por isso, analisando a Figura 28 a 30 pode-se afirmar que a maior produção de pigmentos ocorre com valores intermediários de Zn, menor ou maiores valores de glutamato e maior concentração de amônio, ou seja, 0,4g/L de zinco, 2g/L amônio e 0g/L ou 10g/L de glutamato, diferindo da literatura. Hajjaj et. al., 2000 e Pastrana et. al., 1995 descrevem como melhor meio para a produção de pigmentos é aquele contendo 5g/L de glutamato, 0,01g/L de zinco, como já descrito nos resultados de $ABS^{500/400}$. Antes de proceder ao estudo da secagem, todos os extratos obtidos foram reunidos. O teor de monacolina k obtido nesta mistura foi de 53µg/mL, a atividade antioxidante demonstrou uma inibição de 40% e a razão $ABS^{500/400}$ foi de 0,60.

5.5 - Estudo da secagem e caracterização do extrato seco pela técnica de spray drying

Os fatores usados para a caracterização do extrato seco foram o teor de monacolina K, produção de pigmentos, atividade antioxidante, rendimento de secagem, umidade, densidade aparente e compactada, índice de compressibilidade, fator de Hausner, atividade de água. Os resultados obtidos do planejamento Box – Benkhin estão descritos na Tabela 23.

Tabela 23 - Resultados obtidos no experimento de secagem

Exp	X ₁	X ₂	X ₃	Rend %	Umid %	Monac K µg/g pó	da	dc	IC	FH	AW	ABS ^{500/400}	% INIB
1	50	5:1	5	22,12	5,10	23,5	0,29	0,35	17,14	1,21	0,407	0,64	51,43
2	110	5:1	5	50,34	1,37	23,00	0,092	0,12	23,33	1,30	0,359	0,69	43,85
3	50	10:1	5	56,74	6,29	52,4	0,137	0,215	36,27	1,57	0,466	0,63	43,03
4	110	10:1	5	69,00	1,47	55,2	0,086	0,102	15,68	1,19	0,289	0,59	49,28
5	50	7,5:1	1	6,96	6,00	29,85	0,230	0,25	8,00	1,09	0,460	0,70	45,70
6	110	7,5:1	1	34,32	2,66	23,4	0,094	0,117	19,65	1,24	0,497	0,67	46,52
7	50	7,5:1	9	7,52	3,78	27,10	0,25	0,33	24,24	1,32	0,407	0,65	40,78
8	110	7,5:1	9	38,88	1,89	40,36	0,089	0,099	10,10	1,11	0,533	0,83	37,29
9	80	5:1	1	50,87	3,22	23,77	0,294	0,377	22,01	1,28	0,314	0,77	21,11
10	80	10:1	1	57,52	3,27	46,0	0,114	0,142	19,71	1,25	0,339	0,70	33,71
11	80	5:1	9	52,99	2,99	23,40	0,326	0,418	22,00	1,28	0,318	0,80	38,42
12	80	10:1	9	65,40	2,19	36,00	0,098	0,145	32,41	1,48	0,326	0,71	28,79
13	80	7,5:1	5	40,20	2,61	47,10	0,153	0,178	14,04	1,16	0,541	0,73	29,71
14	80	7,5:1	5	41,00	2,38	46,35	0,158	0,175	9,714	1,11	0,574	0,66	25,41
15	80	7,5:1	5	45,00	2,82	46,50	0,155	0,179	13,40	1,15	0,584	0,65	27,50

Os gráficos de superfície de resposta e os resultados da análise de variância (ANOVA) dos dados de o teor de monacolina K, produção de pigmentos, atividade antioxidante, rendimento de secagem, umidade, densidade aparente e compactada, índice de compressibilidade, fator de Hausner, atividade de água estão descritos a seguir.

5.5.1 – Rendimento da secagem

A análise de variância dos dados referentes ao rendimento de secagem está ilustrada na Tabela 24.

Tabela 24 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao rendimento de secagem.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
TEMP	1230,080	1	1230,080	30,1244	0,002740 *
TEMP ²	687,540	1	687,540	16,8377	0,009324**
TA:TS	654,134	1	654,134	16,0196	0,010298***
TA:TS ²	1648,400	1	1648,400	40,3690	0,001427*
TEMPO	28,577	1	28,577	0,6998	0,440974
TEMPO ²	156,040	1	156,040	3,8214	0,107999
TEMP *TA:TS	63,680	1	63,680	1,5595	0,267017
TEMP *TEMPO	4,000	1	4,000	0,0980	0,766927
TA:TS*TEMPO	8,294	1	8,294	0,2031	0,671079
Erro	204,167	5	40,833		

*variável significativa a 0,5 %, ** variável significativa a 1 %, *** variável significativa a 5%

Com a análise dos dados da Tabela 24 pode-se verificar que a temperatura e a proporção de teor de adjuvante pelo teor de sólidos no extrato (TA:TS) influenciam o rendimento de secagem com 0,5% de significancia. O termo quadrático da temperatura influencia com 1% de significancia e o termo quadrático de TA:TS influencia com 5% de significancia.

5.5.2 – Teor de umidade

A análise de variância dos dados referentes ao teor de umidade está ilustrada na Tabela 25.

Tabela 25 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao teor de umidade.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
TEMP	23,73605	1	23,73605	50,55243	0,000853*
TEMP ²	2,42003	1	2,42003	5,15412	0,0072414**
TA:TS	0,03645	1	0,03645	0,07763	0,791691
TA:TS ²	0,07719	1	0,07719	0,16439	0,701915
TEMPO	2,31125	1	2,31125	4,92244	0,077259***
TEMPO ²	0,10619	1	0,10619	0,22615	0,654443
TEMP *TA:TS	0,29702	1	0,29702	0,63260	0,462474
TEMP *TEMPO	0,52562	1	0,52562	1,11946	0,338449
TA:TS*TEMPO	0,18062	1	0,18062	0,38469	0,562275
Erro	2,34767	5	0,46953		

* variável significativa a 0,01%, **variável significativa a 0,1%, *** variável significativa a 10%

Com a análise dos dados da Tabela 25 pode-se verificar que a temperatura influencia o teor de umidade com 0,01% de significancia, o termo quadrático da temperatura também influencia o teor de umidade com 0,1% de significancia, já o tempo de mistura do adjuvante com o extrato influencia com 10% de significancia.

5.5.3 – Teor de monacolina K do extrato seco

A análise de variância dos dados referentes ao teor de monacolina K está ilustrada na Tabela 26.

Tabela 26 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao teor de monacolina K.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
TEMP	10,374	1	10,374	0,3150	0,598825
TEMP ²	96,792	1	96,792	2,9394	0,147106
TA:TS	1150,321	1	1150,321	34,9336	0,001974*
TA:TS ²	33,342	1	33,342	1,0125	0,360480
TEMPO	1,843	1	1,843	0,0560	0,822361
TEMPO ²	475,862	1	475,862	14,4513	0,012609**
TEMP *TA:TS	2,723	1	2,723	0,0827	0,785236
TEMP *TEMPO	97,121	1	97,121	2,9494	0,146554
TA:TS*TEMPO	23,184	1	23,184	0,7041	0,439681
Erro	164,644	5	32,929		

* variável significativa a 0,5%, variável significativa a 5%

Com a análise dos dados da Tabela 26 pode-se observar que a proporção TA:TS influencia o teor de lovastatina com 0,5% de significancia e o termo quadrático do tempo com 5% de significancia.

5.5.4 – Densidade aparente, da

A análise de variância dos dados referentes à densidade aparente do pó está ilustrada na Tabela 27.

Tabela 27 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes a densidade aparente do pó.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
TEMP	,037265	1	,037265	23,14302	0,004838 *
TEMP ²	,001982	1	,001982	1,23069	0,317758
TA:TS	,040186	1	,040186	24,95748	0,004120*
TA:TS ²	,001345	1	,001345	,83509	0,402722
TEMPO	,000120	1	,000120	,07460	0,795671
TEMPO ²	,004164	1	,004164	2,58625	0,168708
TEMP *TA:TS	,005402	1	,005402	3,35505	0,126494
TEMP *TEMPO	,000156	1	,000156	,09704	0,767983
TA:TS*TEMPO	,000576	1	,000576	,35772	0,575832
Erro	,008051	5	,001610		

* variável significativa a 0,5%.

Através da análise da Tabela 27 pode-se observar que a temperatura e a proporção TA:TS afetam a densidade aparente com 0,5% de significancia.

5.5.5 – Índice de compressibilidade (IC)

A análise de variância dos dados referentes ao índice de compressibilidade está ilustrada na Tabela 28.

Tabela 28 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao índice de compressibilidade.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
TEMP	35,6590	1	35,6590	5,15988	0,072300*
TEMP ²	4,4083	1	4,4083	0,63789	0,460714
TA:TS	47,9710	1	47,9710	6,94143	0,046273**
TA:TS ²	342,2473	1	342,2473	49,52337	0,000895***
TEMPO	46,9480	1	46,9480	6,79341	0,047877**
TEMPO ²	15,0686	1	15,0686	2,18043	0,199809
TEMP *TA:TS	179,2921	1	179,2921	25,94367	0,003791****
TEMP *TEMPO	166,2810	1	166,2810	24,06096	0,004454****
TA:TS*TEMPO	40,3860	1	40,3860	5,84388	0,060310*
Erro	34,5541	5	6,9108		

* variável significativa a 10%, ** variável significativa a 5%, *** variável significativa 0,1%, **** variável significativa a 0,5%.

Com base nos dados apresentados na Tabela 28 pode-se afirmar que vários fatores influenciam de forma significativa o índice de compressibilidade, a temperatura influencia com 5% de significancia, a proporção TA:TS e seu termo quadrático com 5% e 0,1% respectivamente, o tempo com 5%, a interação temperatura e TA:TS e a interação temperatura tempo com 0,5% e a interação TA:TS tempo com 5%. As interações citadas anteriormente estão influenciando de forma negativa ou seja, a temperatura diminui a influencia do TA:TS no IC e o TA:TS também diminui a influência da temperatura no IC.

5.5.6 – Fator de Hausner, FH

A análise de variância dos dados referentes ao fator de Hausner está ilustrada na Tabela 29.

Tabela 29 - Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao fator de Hausner

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
TEMP	0,015313	1	0,015313	7,008	0,045576*
TEMP ²	0,001869	1	0,001869	0,855	0,397451
TA:TS	0,022050	1	0,022050	10,092	0,024629*
TA:TS ²	0,088708	1	0,088708	40,598	0,001408**
TEMPO	0,013613	1	0,013613	6,230	0,054758***
TEMPO ²	0,002792	1	0,002792	1,278	0,309574
TEMP *TA:TS	0,055225	1	0,055225	25,275	0,004010**
TEMP *TEMPO	0,032400	1	0,032400	14,828	0,011992**
TA:TS*TEMPO	0,013225	1	0,013225	6,053	0,057214***
Erro	0,010925	5	0,002185		

* variável significante a 5%, ** variável significante a 0,5%, *** variável significante a 10%.

Com base nos dados apresentados na Tabela 29 pode-se afirmar que vários fatores influenciam de forma significativa o Fator de Hausner, a temperatura e a proporção TA:TS influenciam com 5% de significancia, o termo quadrático da proporção TA:TS com 0,5, o tempo com 10%, a interação temperatura e TA:TS e a interação temperatura tempo influencia de forma negativa com 0,5% e a interação TA:TS tempo influencia de forma positiva com 10%.

5.5.7 – Atividade de água AW

A análise de variância dos dados referentes a atividade de água está ilustrada na Tabela 30.

Tabela 30- Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes a atividade de água.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
TEMP	0,000481	1	0,000481	0,1196	0,743501
TEMP ²	0,001202	1	0,001202	0,2993	0,607869
TA:TS	0,000060	1	0,000060	0,0151	0,907097
TA:TS ²	0,104263	1	0,104263	25,9611	0,003785*
TEMPO	0,000084	1	0,000084	0,0210	0,890336
TEMPO ²	0,020242	1	0,020242	5,0401	0,074742**
TEMP *TA:TS	0,004160	1	0,004160	1,0359	0,355473
TEMP *TEMPO	0,001980	1	0,001980	0,4931	0,513893
TA:TS*TEMPO	0,000072	1	0,000072	0,0180	0,898534
Erro	0,020081	5	0,004016		

* variável significativa a 0,5%, ** variável significativa a 10%

Analizando a Tabela 30 pode-se afirmar que somente os termos quadráticos da proporção TA:TS e do tempo influenciam de forma significativa a atividade de água, com 0,5% e 10% de significância, respectivamente.

5.5.8 – Pigmentos, ABS⁵⁰⁰/₄₀₀

A análise de variância dos dados referentes a ABS⁵⁰⁰/₄₀₀ está ilustrada na Tabela 31.

Tabela 31- Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes a ABS⁵⁰⁰/₄₀₀

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
TEMP	0,003200	1	0,003200	2,2300	0,195577
TEMP ²	0,005192	1	0,005192	3,6183	0,115538
TA:TS	0,009113	1	0,009113	6,3502	0,053178*
TA:TS ²	0,000092	1	0,000092	0,0643	0,809884
TEMPO	0,002813	1	0,002813	1,9599	0,220411
TEMPO ²	0,018092	1	0,018092	12,6079	0,016374*
TEMP *TA:TS	0,002025	1	0,002025	1,4111	0,288213
TEMP *TEMPO	0,011025	1	0,011025	7,6829	0,039281*
TA:TS*TEMPO	0,000100	1	0,000100	0,0697	0,802329
Erro	0,007175	5	0,001435		

* variável significativa a 5%

Analisando a Tabela 31 pode-se afirmar que a proporção TA:TS, o tempo e a interação temperatura tempo influenciam com 5 % de significancia a cor do pó. A interação temperatura tempo influenciam de forma positiva.

5.5.9 – Atividade antioxidante, % de inibição

A análise de variância dos dados referentes a atividade antioxidante está ilustrada na Tabela 32.

Tabela 32- Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes a atividade antioxidante

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Probabilidade
TEMP	1,996	1	1,996	0,0979	0,766986
TEMP ²	912,312	1	912,312	44,7528	0,001129*
TA:TS	0,000	1	0,000	0,0000	1,000000
TA:TS ²	49,309	1	49,309	2,4188	0,180608
TEMPO	0,379	1	0,379	0,0186	0,896832
TEMPO ²	1,680	1	1,680	0,0824	0,785577
TEMP *TA:TS	47,831	1	47,831	2,3463	0,186147
TEMP *TEMPO	4,630	1	4,630	0,2271	0,653781
TA:TS*TEMPO	123,583	1	123,583	6,0623	0,057076**
Erro	101,928	5	20,386		

* variável significante a 0,5 %, variável significante a 10%

Com base na Tabela 32 pode-se afirmar que o termo quadrático da temperatura influencia a atividade antioxidante dos pós com 0,5% de significância e a interação TA:TS tempo influencia de forma negativa a atividade antioxidante. Isto não quer dizer que não exista efeito das demais variáveis na atividade antioxidante e sim que a variância dos fatores com o erro do experimento não foi significativo, sugerindo que o efeito não seja importante.

5.5.10 – Gráficos das respostas estudadas

5.5.10.1 – Gráficos do rendimento de secagem

Nas Figuras 31, 32 e 33 estão ilustrados os gráficos do rendimento de secagem em função dos fatores estudados

Figura 31- Gráfico de superfície de resposta do rendimento em função do teor de TA:TS e tempo.

Figura 32- Gráfico de superfície de resposta do rendimento em função do tempo e da temperatura.

Figura 33- Gráfico de superfície de resposta do rendimento em função da temperatura e de TA:TS.

Através da análise das Figuras 31, 32 e 33 pode-se afirmar que com proporções intermediárias de TA:TS e temperaturas e tempo intermediários obtêm-se maior rendimento de secagem, entende-se rendimento de secagem a massa de pó obtido dividido pela massa de antes da secagem (retirando a umidade). Portanto maiores rendimentos de secagem pela técnica de “spray dryer” utilizando maltodextrina como adjuvante pode ser obtido utilizando 7,5:1 de adjuvante: teor de sólidos, tempo de mistura de 5 minutos e temperatura de 80°C.

5.5.10.2 – Gráficos do teor de umidade dos extratos secos

Nas Figuras 34, 35 e 36 estão ilustrados os gráficos do teor de umidade em função dos fatores estudados

Figura 34- Gráfico de superfície de resposta de umidade em função da temperatura e de TA:TS.

Figura 35- Gráfico de superfície de resposta de umidade em função da temperatura e do tempo

Figura 36- Gráfico de superfície de resposta de umidade em função do tempo e de TA:TS

Através da análise das Figuras 34, 35 e 36 pode-se afirmar que a medida que aumenta a temperatura obtêm-se menor teor de umidade, já o tempo de mistura podemos observar que quando aumenta-se o tempo de mistura a umidade diminui muito pouco, já a medida que aumenta-se a proporção TA:TS, aumenta-se também, levemente, a umidade. Menor teor de umidade é requerido pois pós muito úmido podem ser propício para o desenvolvimento de microorganismos por isso, a melhor condição de secagem, onde obtêm-se menor teor de umidade, pela técnica de “spray dryer” utilizando maltodextrina como adjuvante pode ser obtido utilizando 5:1 de adjuvante: teor de sólidos, tempo de mistura de 10 minutos e temperatura de 110°C.

Quando o material é armazenado de forma não - hermética, são aceitáveis valores entre 6 e 7% de umidade (LIST; SCHMIDT, 1989). Alterações físicas raramente ocorrem sob estas porcentagens de umidade. As alterações químicas geralmente detectáveis em materiais com umidade residual inferior à 10% como oxidações e hidrólises acontecem de maneira

extremamente lenta se os extratos secos foram armazenados em locais com temperaturas amenas, protegidos da luz (LIST;SCHMIDT, 1989). Todos os pós obtidos tiveram teores de umidade abaixo de 7%.

5.5.10.3 – Gráficos do teor de monacolina k no extrato seco

Nas Figuras 37, 38 e 39 estão ilustrados os gráficos do teor de monacolina K em função dos fatores estudados.

Figura 37 - Gráfico de superfície de resposta do teor de monacolina K em função do teor de TA:TS e temperatura.

Figura 38 - Gráfico de superfície de resposta do teor de monacolina K em função do tempo e temperatura.

Figura 39 - Gráfico de superfície de resposta do teor de monacolina K em função do tempo e de TA:TS.

Através da análise das Figuras 37, 38 e 39 pode-se afirmar que utilizando tempo e temperatura intermediárias obtêm-se pó com maior teor de monacolina K, já a medida que aumenta a proporção TA:TS obtêm-se maior teor de monacolina K. Portanto, a melhor condição de secagem, onde obtêm-se maior teor de monacolina K no pó, pela técnica de “spray dryer” utilizando maltodextrina como adjuvante pode ser obtido utilizando 10:1 de adjuvante: teor de sólidos, tempo de mistura de 5 minutos e temperatura de 80°C. A temperatura não influenciou de forma significativa o teor de monacolina K, além disso os teores de monacolina K encontrado nos pós (23 –55,253 µg/mL) estavam muito próximos ao encontrado no extrato (53 µg/mL) antes da secagem sugerindo portanto, que a monacolina K não se degradou com a temperatura, fato este confirmado pela literatura.

5.5.10.4 - Gráficos de densidade aparente

Nas Figuras 40, 41 e 42 estão ilustrados os gráficos da densidade aparente em função dos fatores estudados.

Figura 40- Gráfico de superfície de resposta da densidade aparente em função da temperatura e de TA:TS.

Figura 41- Gráfico de superfície de resposta da densidade aparente em função da temperatura e do tempo.

Figura 42- Gráfico de superfície de resposta da densidade aparente em função do tempo e de TA:TS.

Através da análise das Figuras 40 , 41 e 42 pode-se afirmar que quanto menor a temperatura e menor a proporção TA:TS, menor a densidade aparente. Em geral os extratos secos apresentam baixa densidade, o que dificulta a formulação de cápsulas e mesmo a obtenção de comprimidos com quantidade de extrato suficiente para que se obtenha a dose desejada. Tal problema pode ser suplantado através da granulação do extrato seco (SHARAPIN, 2000). A determinação da densidade aparente e de compactação foi usada para a previsão das características de compressibilidade dos materiais utilizados. Esse método tem sido amplamente aceito como auxiliar para a determinação do fator de Hausner e do índice de compressibilidade (WANCZINSKI et al.,2002)

5.5.10.5 - Gráficos de índice de compressibilidade

Nas Figuras 43, 44 e 45 estão ilustrados os gráficos do índice de compressibilidade em função dos fatores estudados.

Figura 43- Gráfico de superfície de IC em função de TA:TS e temperatura.

Figura 44- Gráfico de superfície de resposta de IC em função do tempo e temperatura.

Figura 45- Gráfico de superfície de IC em função de TA:TS e tempo.

Através da análise das Figuras 43, 44 e 45 pode-se afirmar que quanto menor a temperatura, menor o tempo e proporção intermediárias de TA:TS, menor o índice de compressibilidade. Em regra, os materiais cujo índice de compressibilidade (IC) for inferior a 15%, apresentam boas características de compressão, ao contrário dos produtos em que aquele valor é superior a 25% (WANCZINSKI et al.,2002). Portanto, a melhor condição de secagem baseado no índice de compressibilidade é a realizada com menor temperatura, menor tempo de mistura e o proporções intermediárias de adjuvante e teor de sólidos, ou seja, 50°C. 1 min e 7,5:1.

5.5.10.6 - Gráficos de Fator de Hausner

Nas Figuras 46, 47 e 48 estão ilustrados os gráficos do fator de hausner em função dos fatores estudados.

Figura 46- Gráfico de superfície de FH em função de TA:TS e temperatura.

Figura 47- Gráfico de superfície de FH em função de tempo e temperatura.

Figura 48- Gráfico de superfície de IC em função de TA:TS e tempo.

Observando os gráficos das Figuras, 46, 47 e 48 pode-se afirmar que quanto menor a temperatura, menor o tempo e proporção intermediárias de TA:TS, menor o fator de Hausner. O Índice de Hausner é uma característica do material que está diretamente relacionada à processo de desenvolvimento e manipulação das formas farmacêuticas. A habilidade de se ajustar e controlar as propriedades de fluxos dos pós durante o processamento e formulação é de extrema importância no desenvolvimento de produtos (THALBERG; LINDHOLM, AXELSSON, 2004).

O índice de hausner, calculado a partir das densidades aparente e de compactação, está relacionado à característica de compressibilidade do pó, sendo que, materiais com índice inferior à 1,25 são considerados facilmente compressíveis (WANCZINSKI et al., 2002). Portanto, a melhor condição de secagem baseado no fator de Hausner é a realizada com menor temperatura, menor tempo de mistura e o proporções intermediárias de adjuvante e teor de sólidos, ou seja, 50°C. 1 min e 7,5:1.

5.5.10.7- Gráficos de atividade de água

Nas Figuras 49, 50 e 51 estão ilustrados os gráficos de atividade de água em função dos fatores estudados.

Figura 49- Gráfico de superfície de AW em função de TA:TS e temperatura.

Figura 50- Gráfico de superfície de AW em função de tempo e temperatura.

Figura 51- Gráfico de superfície de AW em função de TA:TS e tempo.

Analisando as Figuras 49 a 51 pode-se observar a pouca influencia da temperatura na atividade de água. Pode-se afirmar também que pós com maiores atividades de água são obtidos com proporções intermediárias de TA:TS e de tempo. O valor de água livre, expresso como atividade de água, é muito importante para o crescimento de microrganismos, atividade de água abaixo de 0,5 não é possível o crescimento de microrganismos (BOBBIO, BOBBIO, 2001), como observada nos gráficos das Figuras 47, 48 e 49 a maioria dos pós obtidos teve aw menor que 0,5.

5.5.10.8- Gráficos da razão $ABS^{500}/_{400}$

Nas Figuras 52 a 54 estão ilustrados os gráficos da razão $ABS^{500}/_{400}$ em função dos fatores estudados.

Figura 52- Gráfico de superfície de resposta da razão $ABS^{500}/_{400}$ em função de TA:TS e temperatura

Figura 53 - Gráfico de superfície de resposta da razão $ABS^{500}/_{400}$ em função do tempo e temperatura

Figura 54 - Gráfico de superfície de resposta da razão $ABS^{500}/_{400}$ em função do tempo e TA:TS

Analisando as Figuras 52, 53 e 54 pode-se observar a pouca influencia da proporção TA:TS na razão $ABS^{500}/_{400}$. Pode-se afirmar também que a razão $ABS^{500}/_{400}$ diminui com proporções intermediárias de tempo de mistura e menor temperatura. Portanto para se obter pós com maior teor de corante vermelho (maior proporção) a melhor condição é aquela com maior temperatura, 110°C e maior ou menor tempo de mistura, 9 ou 1 minuto.

O teor de pigmentos não foi afetado pela secagem, uma vez que a razão $ABS^{500}/_{400}$ encontrado nos pós (0,59-0,83) estavam muito próximos ao encontrado no extrato (0,60) antes da secagem sugerindo portanto, que os pigmentos produzidos não se degradaram. Os corantes produzidos pelo fungo *Monascus ruber* são degradados em solução aquosa, em poucos dias, e não resiste a altas temperaturas ($> 150^{\circ}C$) (FABRE,GOMA e BLANC, 1998), porém neste trabalho foram usadas temperaturas abaixo de 150°C.

5.5.10.9- Gráficos de atividade antioxidante, % inibição

Nas Figuras 55, 56 e 57 estão ilustrados os gráficos de atividade antioxidante em função dos fatores estudados.

Figura 55 - Gráfico de superfície de resposta da %inibição em função de TA:TS e temperatura

Figura 56 - Gráfico de superfície de resposta da %inibição em função do tempo e temperatura

Figura 57 - Gráfico de superfície da %inibição em função do tempo e TA:TS

Analisando as Figuras 55, 56 e 57 pode-se observar que quanto maior o tempo e a proporção TA:TS, maior a atividade antioxidante, já em relação a temperatura, com valores intermediários de temperatura obtêm-se pós com menor atividade antioxidante. Portanto, para se obter pós com maior atividade antioxidante a melhor condição é aquela com maior TA:TS, 10:1, maior tempo de mistura, 9 minuto e maior ou menor temperatura, 110°C ou 50°C .

A atividade antioxidante não foi afetada pela secagem, uma vez que a porcentagem de inibição encontrada nos pós (21 a 51.4%) estava muito próximo ao encontrado no extrato (40%) antes da secagem.

6- CONCLUSÕES

Sobre o estudo de fermentação:

✓ O meio arrozina-glicose (30 g/L arrozina, 9 g/L peptona, 30 g/L glicerina, 110 g/L de glicose, 1 g/L de sulfato de amônio, 2 g/L nitrato de potássio, 0,1 g/L de zinco, 1 g/L de sulfato de amônio) é melhor para a produção de monacolina-K do que o meio de arroz e água (30 g/L);

✓ A produção de monacolina k e de pigmentos vermelhos é maior no meio com concentrações intermediárias de glutamato e zinco e com concentrações maiores de amônio.

Sobre o processo de secagem:

✓ Em relação a proporção TA:TS pode-se afirmar que a proporção 5:1 de maltodextrina: teor de sólidos produz pós com menor atividade de água e teor de umidade, porém todos os pós obtidos tiveram seu teor de umidade e atividade de água dentro do ideal e a análise estatística mostrou que a proporção TA:TS não influenciou de forma significativa a atividade de água e o teor de umidade, a proporção 7,5:1 produz melhor rendimento e pós com melhores propriedades de fluxo por possuírem menores valores de IC e FH, já com a proporção 10:1 obtêm-se pós com maior teor de monacolina e maior atividade antioxidante.

✓ Em relação a temperatura pode-se afirmar que utilizando temperatura de 50°C obtiveram-se pós com melhores propriedades de fluxo, ou seja, menor IC e menor FH, utilizando temperatura de 80°C obteve-se menor atividade antioxidante e maior rendimento e maior teor de monacolina K. Contudo, a análise estatística mostrou que a temperatura não influenciou de forma significativa o teor de monacolina K, já com uma temperatura maior, 110°C obteve-se menor teor de umidade e maior teor de pigmentos vermelhos.

✓ Em relação ao tempo de mistura adjuvante extrato pode-se afirmar que com 1 minuto obtiveram-se maior teor de pigmentos e pós com melhores propriedades de fluxo, com 5 minutos obtiveram-se menor teor de pigmentos, maior rendimento, maior teor de monacolina K e menor atividade de água, já com 10 minutos obtiveram-se menor teor de umidade, maior porcentagem de inibição. Contudo, a análise estatística demonstrou que o tempo de mistura não influencia de forma significativa a atividade antioxidante.

✓ Portanto, a escolha da melhor condição de secagem deve-se levar em conta as propriedades farmacotécnicas do pó, bem como o teor de monacolina k, de pigmentos e de atividade antioxidante. Porém, nem sempre a condição que produz pós com melhor característica farmacotécnica, produz pós com maior teor de ativos. É preciso ressaltar também que de nada adianta obter pó com alto teor de monacolina, alto teor de pigmentos e de alta atividade antioxidante, porém com péssimas características de fluidez e compressão.

7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Estudo da fermentação em uma escala maior, de dois litros;
 - ✓ Estudo da secagem por spray - dryer com outros adjuvantes;
 - ✓ Estudo da atividade biológica do extrato alcoólico e seco.
-

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, A. W.; et., al., Mevinolin, a highly potent competitive inhibitor of HMG CoA reductase and cholesterol lowering agent. **Proceedings of the National Academic of the Science**, v.77, p.3957-3961, 1980.

ALEXOUPoulos, C. J., C. W. MIMS e M. BLACKWELL. **Introductory Mycology**. New York. EUA: John Wiley and Sons. 868 p., 1996.

ANVISA - **Resolução – RE nº 475**, 19 março de 2002. Guia para validação de métodos cromatográficos.

ANVISA , **Resolução-RE nº 89**, de 16 de março de 2004, "lista de registro simplificado de fitoterápicos.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**, 2 ed. Campinas: Unicamp, 1996.

BLANC, P. J. Les Pigments Rouges de *Monascus*. **Biofutur**, v.184, p.13-17. 1998.

BOBBIO, P. A. e F. O. BOBBIO. **Química do Processamento de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela Ltda. 151 p., 2001.

BORZANI, W. Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U.; AQUARONE, E., BORZANI, W., **Biotecnologia Industrial**. v 2, 1ªed. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.

BOX, M., HUNTER, W.G., HUNTER, J.S. **Statistics for Experimenters**, John Wiley & Sons, N. York, 1978.

BROOKS, G. F., J. S. BUTEL e S. A. MORSE. **Jawetz, Melnick e Adelberg Microbiologia Médica**. McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 611 p., 2000.

CALVO, C.; SALVADOR, A., Comparative study os the colorants monascus and cochineal used in the preparation of the gels made with various gelling agents. **Food hidrocolloids**, v. 23, p.523-526, 2002.

CARDENAS, F., et. al. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.14, p.4-6. 2001.

CARLILE, M., J; WATKINSON, S. C. **The fungi**, 4º ed., Great Britain: Academic Press, 1997.

-
- CARVALHO, J., C., M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U.; AQUARONE, E., BORZANI, W.,. **Biotecnologia Industrial**. v 2, 1ºed. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.
- CARVALHO, J.C., **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de pigmentos a partir de *monascus* por fermentação em substrato sólido**. 2004. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná, 2004.
- CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos para HPLC. Fundamentos estratégicos e validação**. São Carlos: EdUFSCar., 2001.
- CASTELLO, R.A., MATTOCKS, A. M. **Journal Pharmaceutical Science**, 51, (2), 106-108, 1962
- CAUSON, R. Validation of chromatography methods in biochemical analysis viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography A**, v. 775, p 11-17, 1997.
- CHANG, J. (2000) Medicinal Herbs: Drugs or Dietary Supplements?. **Biochemical Pharmacology**, Vol. 59, p. 211-219, 2000.
- CHANG, Y.N., HUANG, J.C., LEE, C.C., SHIH, I.L. and TZENG, Y.M. (2002) Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p 889-894, 2002.
- CHEN, F.; HU, X. Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, p.331-337, 2005.
- COLLINS, C.H., Princípios básicos de cromatografia. In:, COLLINS, C.H; BRAGA, G., L.; BONATO, P.S., **Fundamentos de cromatografia**, Campinas: Editora Unicamp, 2006.
- DEVLIN, T., M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 5º ed., São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 2002.
- DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P; YARON, A.; ARAD, S., M.; BLANC, P.; MURTHY, K., N., C.; RAVISHANKAR, G., A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science & Technology**, v.16, p. 389–406, 2005.
- EL-KADY, I., S. EL-MARAGHY e A. N. ZOHRI. Mycotoxin producing potential of some isolates of *Aspergillus flavus* and *Eurotium* groups from meat products. **Microbiological research**, v.149, n.3, p.297-307. 1994.
-

ENDO, A., Monacolin K, A new hypcholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. **Journal Antibiotic**, v.32 (8), p. 852-854, 1979.

FABRE, C. E., G. GOMA e P. J. BLANC. Production and Food Applications of the red pigment material. **Symposia of *Monascus*-cultures and applications organized by "Institut National des Sciences Appliqués "**. Toulouse. July 8-10, 1998.

FACCIOTTI, M., C., R., Fermentação contínua. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U.; AQUARONE, E., BORZANI, W., **Biotecnologia Industrial**. v 2, 1ªed. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.

GEORGETTI, S. R. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo isoflavonóides (Isoflavin Beta): estabilidade física, química e permeação cutânea**. Ribeirão Preto, 2004. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2004.

GONÇALVES, M. C. R, MOURA L. S. A., 1, RABELO, L. A., BARBOSA, J. M., CRUZ, H. M. M. & CRUZ, J., Produtos naturais inibidores da enzima HMG CoA redutase Natural products inhibitors of HMG CoA reductase. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 81, n. ¾, p. 63-71, 2000.

GOODMAN, S., L.; GILMAN., A., G.; GOODMAN & GILMAN. **As bases Farmacológicas da Terapêutica**, 9º ed., Rio de Janeiro: MacGraw-Hill Interamericana editores, S. A, 1996.

GREMMELS, F., J., J.; LEISTNER, L. Use of *Monascus* extracts as an alternative to nitrite in meat products. **Fleischwirtschaft**, v.7, p.1184-1186, 1991.

GUNNARD, J., J. WASILESKI e G. ALAN. Production of Food Colorants by Fermentation. **Bioprocess Production of Fragrance and Color Ingredients**. v. 7, p. 205-233, 1994.

GUNSEL, W.C. and LACHMAN, L. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 52, (2), p. 178-182, 1963.

HAJJAJ, H. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation, **Enzyme and Microbial Technology**, Toulouse, v.27, p. 619-625, July 2000.

HAJJAJ, H., BLANC, P.J., GOMA, G., FRANÇOIS, J., Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra and extracellular metabolites in filamentous fungi. **Applied Environment Microbiology**. v. 63, p.2671-2678, 2000b.

HAJJAJ, H., P. J. BLANC, E. GROUSSAC, et al. Improvement of red pigment citrinin production ratio as a function of environmental conditions by *Monascus ruber*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.64, n.4, p.497-501, 1999a.

JACOBSEN, G. e J. WASILESKI. Production of Food Colorants by Fermentation. In: WILEY, J., **Production of Food Colorants by Fermentation**, Gabelman, p.205-234, 1994.

JOHNS M. R., STUART D. M. Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture **Journal Industrial Microbiology**, v. 8, p. 23-38, 1991.

KREJCI, M. E., N. S. BRETZ e D. A. KOECHEL. Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in [potassium]plasma. **Toxicology**, v.106, n.1-3, p.167-177. 1996.

LACAZ, C. S., E. PORTO, J.E.C.MARTINS, et al. **Tratado de Micologia Médica** LACAZ. São Paulo. 1104 p, 2002.

LIMA, U.; AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. v 3, 1ªed. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.

LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical Technology**. Boca Raton: CRC Press, p.374, 1989.

LOTONG, N. and SUWANARIT, P. (1989) Fermentation of ang-kak in plastic bags and regulation of pigmentation by initial moisture content. **Journal of Applied Bacteriology**, v.68, p. 565-570.

MACARIO, A., L. V. A. PALO e L. M. M. MACEDA. A study on ang-kak and its production. **The Philippine Journal of Science**, v.89, n.1, p.1-19. 1960.

MAIMOM, D.; **Estudo de mercado de matéria-prima: Corantes naturais (cosméticos, indústria de alimentos), conservantes e aromatizantes, bioinseticidas e óleos vegetais e essenciais (cosméticos e oleoquímica): PROJETO BRA/96/025 - Acordo SUDAM/PNUD, Rede Para Conservação e Uso Dos Recursos Genéticos – GENAMAZ, 2000.**

MANZONI, M.; BERGOMI, S.; ROLLINI, M.; CAVAZZONI,V., prodiction of statins by filamentous fungi. **Biotechnology letters**, v 21, P. 253-257, 1999.

MARTINKOVA, L., P. PATAKOVA-JUZLOVA, V. KRENT, et al. Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. **Food additives and contaminants**, v.16, n.1, p.15-24. 1999.

MASTERS, K. **Powder and Bulk Engineering**, 36-44, April 1996.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**. 4. ed. New York: Jonh Miley, 1985. 696 p.

MORITZ, D., E., **Produção do pigmento monascus por *Monascus Ruber* cct 3802 em cultivo submerso**. 2005. 150f. Tese (Doutor em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

NEVES, C. F. C; SCHVARTZMAN, M. M. A. M.; JORDÃO, E. Variables search technique applied to gas separation. **Química Nova**, v. 25 (2) , p.327-329, 2002

NEWTON, J.M. **Chemistry Aerosol News**, 33-36 & 55, April 1966

OLIVEIRA, T.T., NAGEM, T.J., LOPES, R.M., MORAES, G.H.K., da SILVA, R.R. and COSTA M.R. (2002) *Monascus* effects in rabbit's blood serum constituents. **Revista Brasileira de Análises Clínicas, RBAC**, vol. 34, pp. 213-219, 2002.

PANAGOU, E. Z., P. N. SKANDAMIS e G. J. NYCHAS. Modelling the combined effect of temperature, pH and aw on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. **Journal of applied microbiology**, v.94, n.1, p.146-156. 2003.

PASTRANA, L., BLANC, P.J., SANTERRE, ^aL., LORETM.O. AND GOMA, G. Production of Red Pigments by *Monascus ruber* in Synthetic Media with a Strictly Controlled Nitrogen Source. **Process Biochemistry**, v.30, pp. 333-341, 1995.

PEIXOTO, M.P.G. **Obtenção do extrato seco de *Syzygium cumini* e avaliação da atividade hipoglicemiante**. 2005. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas na Universidade do Estado de São Paulo, USP, 2005.

PEREIRA, S., C. A, **Tratamento de incertezas em modelagem de bacias**, 2002. 327f. Tese (Doutor em ciências em engenharia civil). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, 2002.

RANG, H., DALE, M.M.; RITTER, J., M, **Farmacologia**. 4 °ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G, COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27 (5), p.771-780, 2004.

ROBBERS, J., E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V.; E. **Farmacobiologia e Farmacobiotechnologia**. 1° ed. São Paulo: Editora Premeier, 1997.

ROSSI, M. J., **Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator *airlift***. 2006. 188f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

SCHMIDELL, W., FACCIOTTI, M., C., R. Bioreatores e processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U.; AQUARONE, E., BORZANI, W., **Biotecnologia Industrial**. v 2, 1ºed. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.

SCHMIDELL, W., Microorganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U.; AQUARONE, E., BORZANI, W., **Biotecnologia Industrial**. v 2, 1ºed. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.

SCHNEWEIS, I., K. MEYER, S. HORMANSDORFER, et al. Metabolites of *Monascus ruber* in silages. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v.85, n.1-2, Feb, p.38-44. 2001.

SCUDAMORE, K. A. e M. T. HETMANSKI. Natural occurrence of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in cereals in the United Kingdom. **Food additives and contaminants**, v.12, n.3, May-Jun, p.377-382. 1995.

SHARAPIN, N.; ROCHA, L. M.; CARVALHO, E. S.; SANTOS, E. W. M., ALBURQUERQUE, E. M. R. **Fundamentos de tecnologia de fitoterápicos**. Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Bello (CAB) e Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento (CYTED), 248 p, 2000.

SONAGLIO et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: Simões et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Rio Grande do Sul: Ed. da UFSC, 2000.cap.13, p.221-258.

STANBURY, P., F.; WIHITAKER, A. **Principles of fermentation technology**, 1ºed. Great Britain: Pergamon press, 1984.

TEIXEIRA, C., C., C. **Padronização e otimização das condições de extração de *Peumus boldus***. 2006. 159f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas na Universidade do Estado de São Paulo, USP, 2006.

TENG, S. S. e W. FELDHEIM. Anka and anka pigment production. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v.26, n.5, May, p.280-282. 2001.

THALBERG, K.; LINDHOLM, D.; AXELSSON, A. Comparison of different flowability tests for powders for inhalation. **Powder Technology**, v.146, p.206-13, 2004.

VIEGAS, C.;BOLZAN, V., S.; BARREIRO, E., J. , Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química. Nova**, Vol. 29, No. 2, p.326-337, 2006.

WANCZINSKI, B., J.; FELIPE, D., F.; CARDOSO, M.; L., C; E CAVALCANTI, O.,A., Desenvolvimento de comprimidos de AAS 500 mg: influência do Amido 1500® na compressão direta. **Acta Scientiarum, Maringá**, v. 24, n.3, p. 649-655, 2002.

WANG, Y.; Z.; JU, X., L.; ZHOU, Y., G.; The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures. **Food Microbiology**, v. 22, p. 145-148, 2005.

WONG, H. C., KOEHLER, P. Production and isolation of an antibiotic from 90 *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. **Journal Food Science**, v. 46, p.589-592, 1981.

Yang, J.,-H.; Tseng, Y., H.; Chang, H., L.; Lee, Y., L.; Mau J.; L., Storage stability of monascall adlay. **Food Chemistry**, v. 90 p.303–309, 2004.

YU, C., C.; LEE, C., L.; PAN, T., M. A novel ;Formulation Approach for preparation of nanoparticulate red mold rice. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 54, p. 6845-6851. 2006.