

Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Anderson José Paulo

**PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E PRÉ-PURIFICAÇÃO DE LOVASTATINA POR
LINHAGEM DE *Aspergillus terreus* UTILIZANDO RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS COMO MEIO DE CULTIVO**

Recife, 2013

Anderson José Paulo

**Produção, Extração e Pré-purificação de Lovastatina por Linhagem de
Aspergillus terreus Utilizando Resíduos
Agroindustriais como Meio de Cultivo**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, órgão suplementar da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientadora

Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE.
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA

Co-orientadora

Prof^a Dr^a Polyanna Nunes Herculano
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE.

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

P324p Paulo, Anderson José

Produção, extração e pré-purificação de lovastatina por linhagem de *Aspergillus terreus* utilizando resíduos agroindustriais como meio de cultivo / Anderson José Paulo.
– Recife: O Autor, 2013.

51. f. : fig., tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientadora: Polyanna Nunes Herculano

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2013.
Inclui bibliografia e anexos

1. Fungos 2. Fermentação 3. Milho – Indústria I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (orientadora) II. Herculano, Polyanna Nunes (coorientadora) III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-199

Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde
Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami

Reitor

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-reitor

Prof. Dr. Sílvio Romero Marques

Pró-reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-graduação

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Paulo, Anderson José

Título: Produção, Extração e Pré-purificação de Lovastatina por Linhagem de *Aspergillus terreus* Utilizando Resíduos Agroindustriais como Meio de Cultivo.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde

Aprovada em 28 de fevereiro de 2013

Banca examinadora

Profa. Dra. Polyanna Nunes Herculano

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de

Pernambuco

(Presidente)

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco

(1º Examinador)

Profa. Dra. Janete Magali de Araújo

Departamento de Antibióticos - Universidade Federal de Pernambuco

(2º Examinador)

Dedico

*aos meus pais por tudo que fizeram por mim e a Deus pela proteção, amparo e
oportunidade de estar aqui, continuando esta história.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha vida, bem como a grande Espiritualidade amiga que me ajuda e dá forças nos momentos de angústia e felicidade, para que eu continue forte e possa prosseguir nesta caminhada.

Aos meus pais, em especial ao meu **pai**, por todo empenho, suor, garra, perseverança e amor por mim, não medindo esforços para me possibilitar o possível. Esta, e muitas outras conquistas, germinaram por parte da sua vontade. Obrigado.

Aos amigos do Centro Espirita A Caminho da Luz, em especial a dona Claudecy, pelas palavras edificantes que tanto foram e são significativas. Lisiane, Selma, Lisandre, André... a todos, obrigado!

A minha Orientadora, “Profe” Dra. Ana Porto, uma das pessoas mais íntegras e éticas que já conheci e que me deu suporte durante estes 2 anos de trabalho, mesmo não estando presente fisicamente. Nunca tive respostas de e-mail tão rápidas! Agradeço-lhe pelos momentos de “puxão de orelha” e de parabenizações. De tudo, fica o aprendizado! Muito obrigado!

A minha Co-orientadora, Profa. Dra. Polyanna Nunes Herculano, pela grande ajuda e suporte durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao diretor do LIKA, Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, pela infraestrutura disponibilizada, pela força com que conduz o LIKA e pelas boas conversas sobre política nas horas vagas.

Ao Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior, Coordenador da PPGBAS (Programa de Pós Graduação em Biologia Aplicada à Saúde), pela sabedoria, humildade e alegria que contagia a todos. Ao entrar no Laboratório de Biotecnologia-BT, por mais silêncio que houvesse, todos em minutos estavam envolvidos em risadas por suas histórias sempre divertidas.

A Profa. Dra. Janete Magali de Araújo, pela grande contribuição científica em minha carreira. Minha eterna avó científica!

A Profa. Dra. Maria do Carmo Pimentel, Coordenadora Administrativa do LIKA, pelas conversas sempre descontraídas e dicas valiosas.

Aos colegas da administração do LIKA, Paulina, Ilma e Conceição. A nossa secretária da Pós, Eliete, pelas conversas divertidas e o bom humor de sempre. A seu otaviano pelas ajudas e resoluções instantâneas dos problemas com equipamentos e matérias no LIKA. A Felipe pela ajuda nas esterilizações. Verinha, pela ajuda de sempre. A Fatima Diniz, pela sementes milagrosas da auricoloterapia que tiraram as dores do meu ciático no momento mais corrido dos experimentos. Obrigado a todos!

A Kilma, pela grande ajuda e disponibilidade que teve em executar parte dos meus experimentos no HPLC. Obrigado!

A Pabyton pela disposição em ajudar nos experimentos relacionados ao HPLC.

A Roberto Afonso pelo apoio e animação sempre contagiantes.

A Marcella Oliveira pelo apoio nos experimentos e companhia no dia a dia de laboratório.

Aos colegas da BT e outros setores do LIKA e colegas PPGBAS, Sula, Natália, Keilla Vieira, Debora, Dani, Gustavo, Carol, Thiago Veras, Daianna, Rafaela, Catarina Michele, Marília, Adriana, Rafa Padilha, Arthur, Marcos Duque (lugar no peito!), Roberta Ventura, Mareck, Renata, Rose, Thiers, Tiago, Camilla, Carolina,... entre outros, pelos momentos de descontração.

Aos amigos Roberta Godone e José Manoel, com quem dividi momentos únicos e que nunca saíram da memória e coração... amigos que carregarei.

Aos colegas do LABTECBIO e CENAPESQ, Juanize (companheira de longas datas!), Thiago, Amanda, Meire, Páblo (grande amigo!), Priscila, Mitaliene, Milena, Diego.

As Profa. Dra. Camila Souza Porto, Profa. Dra. Cinthia Oliveira, Profa. Dra. Maria Tacina Cavalcanti Vieira Soares da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, meu obrigado pela colaboração em alguma etapa deste trabalho.

A Profa. Dra. Daniela de Araújo Viana Marques, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, pela disponibilidade em ajudar na estatística do trabalho.

Ao Prof. Dr. Clécio S. Ramos, do Departamento de Ciências Moleculares da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela valiosa ajuda na interpretação dos resultados dos experimentos e ideias futuras.

A Patrícia, técnica do CENAPESQ, pela disposição em ajudar nas análises do FT-IR.

A Raquel, do Laboratório de Enzimologia, do Departamento de Bioquímica-UFPE por disponibilizar equipamento para processamento dos meus substratos.

A Carina Helena do CCB-UFPE pela intermediação para conseguir parte dos meus substratos.

Ao Prof. Dr. Amilcar Bezerra, do Departamento de Desing, da UFPE-Caruaru, pela ajuda na análise inicial, do inglês do trabalho.

A FACEPE pelo suporte financeiro para execução deste projeto.

Se esqueci de você, que está lendo agora estas páginas e ficou triste por seu nome não constar, sinta-se citada(o) posso realmente ter esquecido. Sem aborrecimentos!

Obrigado a todos pelas contribuições diretas e indiretas!

“Tudo na vida passa, isso também passará”

Emmanuel-Chico Xavier

Resumo

A lovastatina é um inibidor enzimático comumente chamado de estatina e são de grande importância na medicina para redução dos altos níveis de colesterol. É uma potente droga, produzida através do metabolismo secundário de alguns micro-organismos, e atua inibindo a ação da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), que tem papel limitante na biossíntese do colesterol. Este estudo avaliou a produção de lovastatina pela linhagem de *Aspergillus terreus* URM 4317 através de fermentação em estado sólido (FES) utilizando resíduos agroindustriais como meio de produção, bem como otimização de alguns parâmetros de produção (umidade, temperatura e pH) por planejamento fatorial. Os resultados (619,5 µg/g de substrato seco) indicaram que o sabugo de milho foi o melhor substrato para produção de lovastatina, nas condições de umidade 80%, temperatura 30°C, pH 5,5 e 10 dias de fermentação. As variáveis estudadas indicaram que todas apresentaram efeitos significativos, enquanto o pH mostrou efeito negativo, e temperatura e umidade com efeitos positivos. Os resultados mostraram, portanto, que o sabugo de milho pode ser usado como uma fonte alternativa e econômica para produção de lovastatina por *A. terreus* URM 4317.

Palavras-chave: lovastatina, *Aspergillus terreus*, fermentação em estado sólido, sabugo de milho, planejamento fatorial.

Abstract

Lovastatin is a potent drug, produced by the secondary metabolism of microorganisms, which acts by inhibiting HMG-CoA reductase limiting enzyme in cholesterol biosynthesis. This study evaluated the production of lovastatin by strain of *Aspergillus terreus* URM 4317 through Solid State Fermentation (SSF) using agro waste optimizing parameters (temperature, initial moisture and pH) by factorial design. The results show the best corn cob as substrate (619.5 µg per gram dry substrate) in the production of lovastatin with 80% humidity, 30°C temperature, pH 5.5 and 10 days of fermentation. The effects of the variables indicate that all were significant, with pH being the negative effect and temperature and initial moisture with positive effects. The results show that the corn cob can be used as an alternative and economical source to produce lovastatin by *A. terreus* URM 4317.

Keywords: Lovastatin, *Aspergillus terreus*, Solid State Fermentation, corn cob, Factorial design.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- Figura 1** - Estrutura química de estatinas naturais e seus derivados (Barrios-Gonzales, 2010). 5
- Figura 2** - Estrutura química das diversas estatinas (Nirogi et al., 2007). 6
- Figura 3** - Comparação da estrutura química da HMG-CoA e da lovastatina. 8
- Figura 4** - Esquema simplificado das etapas de biossíntese da lovastatina por *Aspergillus terreus* (Kennedy et al., 1999; Sutherland et al., 2001). 9
- Figura 5** - Esquema simplificado da biossíntese do colesterol. A seta em vermelho indica a ligação da lovastatina a enzima HMG-CoA redutase, bloqueando a formação de mevalonato (Delvin, 2002). 10

Artigo

- Figure 1** - Chemical profiles obtained by LC-MS/MS for samples of coffee husk, corn cob and standard lovastatin. 45
- Figure 2** - Mass spectra (MS/MS; ionization "electrospray" - ESI) lovastatin standard mode positive ion, $M + = [404 + 1]$; $C_{24}H_{36}O_5$. 46
- Figure 3** - Mass spectrum (MS / MS; ionization "electrospray" - ESI) peak with retention time 33 min detected in the chromatogram of the extract of corncobs in positive ion mode, $M + = [404 + 1]$. 47
- Figure 4** - Cubic plot of the average concentration of lovastatin at different levels of pH. temperature. and moisture according to the 2^3 full experimental design. 48

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Independent variables levels of 2^3 full experimental design for lovastatin production.	40
Table 2 - Effect of substrates on lovastatin production in SSF process.	40
Table 3 - Matrix of the full factorial design (2^3) with conditions and results of the lovastatin production.	41
Table 4 - Estimates effects of independent variables and their interactions on the lovastatin concentration.	42
Table 5 - Physico-chemical characterization of corn cob.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS - Organização Mundial da Saúde

HMG-CoA - Hidroximetilglutaril Coenzima A

Acetil-CoA - Acetilcoenzima A

LDL - Low Density Lipoprotein

HDL - High Density Lipoprotein

FDA - Food and Drug Administration

NDA - New Drug Administration

PKS - Polyketide Synthase

VLDL - Very Low Density Lipoprotein

AVC - Acidente Vascular Cerebral

AFCAPS/TexCAPS - Air Force Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study

DA - Doença de Alzheimer

EM - Esclerose Múltipla

AR - Artrite Reumatóide

DRC - Doença Renal Crônica

pH - Potencial Hidrogeniônico

ATCC - American Type Culture Collection

FES - Fermentação em Estado Sólido

FSm - Fermentação em Estado Submerso

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	4
3. Estatinas	4
3.1 Aspectos Históricos	4
3.2 Lovastatina	7
3.3 Mecanismo de ação das estatinas	9
3.4 Novas tendências terapêuticas para estatinas	10
4. Micro-organismos produtores de lovastatina	13
5. Fermentação em Estado Sólido (FES)	14
5.1 Produção de lovastatina por (FES)	15
6. Objetivos	18
6.1 Objetivo Geral	18
6.2 Objetivos Específicos	18
7. Referências Bibliográficas	19
8. Artigo	26
Abstract	27
Introduction	28
Materials and Methods	29
Results and Discussion	32
Conclusion	36
Acknowledgements	37
References	38
List of tables	40
List of figure legends	44
List of figure	45
9. Anexos	49

1. Introdução

Nos últimos anos, as doenças cardíacas são as principais causas de morte em muitos países. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 17,3 milhões de pessoas morreram vítimas de doenças cardiovasculares em 2008, e existe uma projeção de que o número de mortes chegue a 23,6 milhões no ano de 2030. Cerca de 80% das mortes registradas foram notificadas em países de renda média a baixa (Who, 2011).

A hipercolesterolemia é considerada um importante fator de risco de doenças coronárias em seres humanos (Lai, 2005). Diversos estudos epidemiológicos têm mostrado uma relação direta entre o risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana e lesões ateroscleróticas a altos níveis de lipídeos sanguíneos, geralmente na forma de lipoproteínas (Campo & Carvalho, 2007). Além dos fatores de risco comportamentais como o sedentarismo, a alimentação inadequada e o tabagismo, são responsáveis por 80% das causas de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (OMS, 2009).

Neste contexto, o colesterol se configura como grande precursor de distúrbios relacionados à hipercolesterolemia, sendo um constituinte essencial das membranas celulares e precursor dos hormônios esteroides e dos ácidos biliares. A sua biossíntese ocorre a partir de unidades de Acetil-CoA, envolvendo mais de 25 enzimas, no entanto, a etapa de conversão do 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) em mevalonato pela enzima HMG-CoA redutase (EC. 1.1.1.34) é o fator limitante desta via (Manzoni & Rollini, 2002; Voet, 2006).

Do total de colesterol do corpo humano, um terço é proveniente da dieta e quase dois terços são sintetizados no organismo, demonstrando que o controle da biossíntese do colesterol é de extrema importância para a redução dos altos níveis plasmáticos (Valera *et al.*, 2005).

As estatinas são os fármacos mais utilizados no tratamento das hiperlipidemias com o propósito de diminuir os níveis de lipoproteínas de baixa

densidade (LDL) ricas em colesterol e reduzir os riscos de doenças cardiovasculares. Estes efeitos são resultantes da atividade inibidora das estatinas sobre a enzima HMG-CoA redutase, impedindo a formação do mevalonato, bloqueando a síntese do colesterol nas primeiras etapas (Campo & Carvalho, 2007). Isso explica o enorme sucesso da aplicação das estatinas no campo médico e comercial. Em 2006, duas estatinas conduziram a lista da revista norte-americana *Forbes* dentre as 20 drogas mais vendidas atingindo US\$ 4,4 a 8,4 bilhões de dólares anuais, com previsão de aumento da utilização das estatinas no mundo (Barros-Gonzales & Miranda, 2010).

Diferentes tipos de estatinas estão disponíveis no mercado comercial atualmente, podendo ser produzidas de fontes naturais como lovastatina e pravastatina que são obtidas diretamente por fermentação; semi-sintéticas a sinvastatina e as sintéticas atorvastatina, fluvastatina, rosuvastatina e pitavastatina que são obtidas através de modificações da estrutura química (Manzoni & Rollini, 2002; Davignon, 2005).

As estatinas são produzidas como metabólitos secundários por vários micro-organismos, como *Penicillium* sp. (Endo *et al.*, 1976a), *Monascus ruber* (Endo *et al.*, 1976b; Juzlova *et al.*, 1996) e *Aspergillus terreus* (Alberts *et al.*, 1980), sendo a lovastatina a primeira estatina a ser aprovada pelo FDA - Food and Drug Administration para uso terapêutico (Barrios-Gonzalez & Miranda, 2009).

Lovastatina é produzida, principalmente, pelo processo de fermentação submersa por *A. terreus* em meios de cultura complexos, sendo este processo o mais utilizado para a produção industrial em larga escala (Casas López *et al.* 2003; Wei *et al.*, 2007; Valera *et al.*, 2005). Na fermentação submersa, o rendimento é proporcional a quantidade de biomassa produzida pelo micro-organismo, no entanto, a alta densidade celular, proporciona um aumento na viscosidade do caldo fermentado, tornando a agitação e a transferência de oxigênio deficiente. Desta forma, uma alternativa para a produção da lovastatina é a fermentação semi-sólida (Wei *et al.*, 2007).

O processo de fermentação semi-sólida apresenta vantagens quando comparado à fermentação submersa, entre elas, estão a utilização de substratos de baixo custo em volume amplamente disponível no meio

ambiente, baixo consumo de água e energia além de apresentar alto rendimento do produto (Wei *et al.*, 2007). A fermentação semi-sólida para a produção de lovastatina tem sido estudada por Valera *et al.* (2005) utilizando *A. flavipes* e por Xu *et al.*, (2005) com *Monascus rubber*.

O Ministério da Saúde prioriza as estatinas como um dos produtos estratégicos que precisam ser produzidos a nível nacional, a fim de aperfeiçoar o desenvolvimento do complexo industrial da saúde. Desta forma, este trabalho vem abordar a utilização de resíduos agroindustriais como fonte alternativa e econômica para produção de lovastatina por *A. terreus*, visto que a lovastatina é uma das estatinas naturalmente produzidas por fungos filamentosos e, precursora da sinvastatina, considerada a segunda maior líder de vendas no mundo.

Diante do exposto novas pesquisas neste campo tornam-se fundamentais, uma vez que estas moléculas também podem apresentar uma série de efeitos benéficos ao organismo relacionados com o combate de outras patologias que estão sendo investigadas por vários estudiosos.

2. Revisão de Literatura

3 - Estatinas

3.1 Aspectos Históricos

Cientistas japoneses da empresa Sankyo Co. LTDA realizaram um screening entre fungos objetivando encontrar compostos que atuassem na inibição da biossíntese do colesterol agindo sobre a enzima HMG-CoA redutase, que é responsável por uma etapa limitante na via biossintética do colesterol. Foi nestes estudos que a primeira estatina foi descoberta. Estes pesquisadores encontraram um composto denominado inicialmente de MLB236B, produzido por fermentação pela linhagem de *Penicillium citrinum*, que mais tarde foi denominado de mevastatina (compactina), apresentando alto poder de inibição da enzima hidroximetilglutaril CoA redutase (Endo *et al.*, 1976b).

Assim que o potencial deste novo composto foi elucidado, pesquisadores da Merck® começaram a buscar novas linhagens fúngicas em busca de compostos com atividade semelhante. Fizeram um isolamento de fungos a partir do solo, e conseguiram isolar uma linhagem de *A. terreus*, que demonstrou produzir uma estatina com eficiência bastante superior à mevastatina. A lovastatina foi assim, descoberta. Após o sucesso em ensaios clínicos que demonstraram o potencial de redução dos níveis da lipoproteína LDL colesterol sem consequentemente, causar muitos efeitos colaterais. Em novembro de 1986, a Merck® enviou o (NDA) New Drug Application para o FDA (Food and Drug Administration) dos EUA e, a lovastatina foi aprovada por este órgão para se tornar a primeira estatina vendida comercialmente, em setembro de 1987, com o nome de Mevacor® (Merck & Co. 1987; Alberts *et al.*, 1980; Ginter & Simko, 2009).

Mais pesquisas foram sendo realizadas e Endo *et al.*, (1979), conseguiram isolar lovastatina a partir da fermentação submersa de *Monascus ruber*, muito embora, esta cepa não seja a utilizada industrialmente para produção de lovastatina. A estrutura química da lovastatina apresenta grande semelhança com a da mevastatina, com exceção de um grupo metil presente na lovastatina, como pode ser visto na (fig. 1).

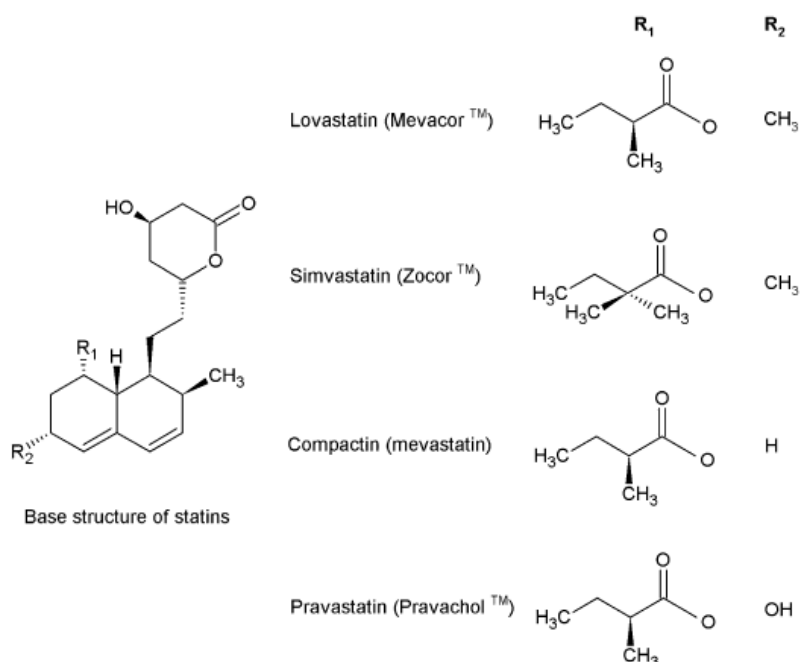


Figura 1: Estrutura química de estatinas naturais e seus derivados (Barrios-Gonzales & Miranda, 2010).

Posteriormente os estudos avançaram e, a empresa Sankyo® em parceria com a Bristol-Myers Squibb® passaram a desenvolver e comercializar o Pravachol® (pravastatina), um derivado mais eficiente da compactina. Em contra partida, a Merck® passou a desenvolver a sinvastatina uma nova geração de semi-sintéticos produzidos a partir da lovastatina, que ocupa o posto de segunda estatina mais vendida no mercado. Em meados de 1994, a Merck® realizou um estudo com cerca de 2.221 pacientes diagnosticados com hipercolesterolemia moderada (200-300 mg/dL) utilizando a sinvastatina como medicamento controle. Os resultados deste estudo apontaram que, não só houve uma redução nos níveis de colesterol total (25%) e LDL colesterol (35%)

mas também, uma queda aproximada de 42% no número de óbitos do grupo estudado (Barrios-Gonzales, 2010).

Estes e outros resultados significativos despertaram o interesse de outras empresas farmacêuticas pelo estudo e desenvolvimento de estatinas sintéticas. Logo, a fluvastatina (Sandoz AG, Lescol®) foi a primeira estatina totalmente sintética produzida, seguida da atorvastatina (Pfizer, Liptor®), rosuvastatina (Crestor®) e a pitavastatina, que é comercializada em alguns países orientais e a mais recente estatina sintética. A estrutura destas estatinas sintéticas são bem diferentes das estatinas naturais (fig. 2), apresentando apenas em comum, a fração HMG-CoA, responsável pela inibição da enzima HMG-CoA redutase, responsável pela etapa limite da biossíntese do colesterol (Manzoni & Rolini, 2002; Kidd, 2006).

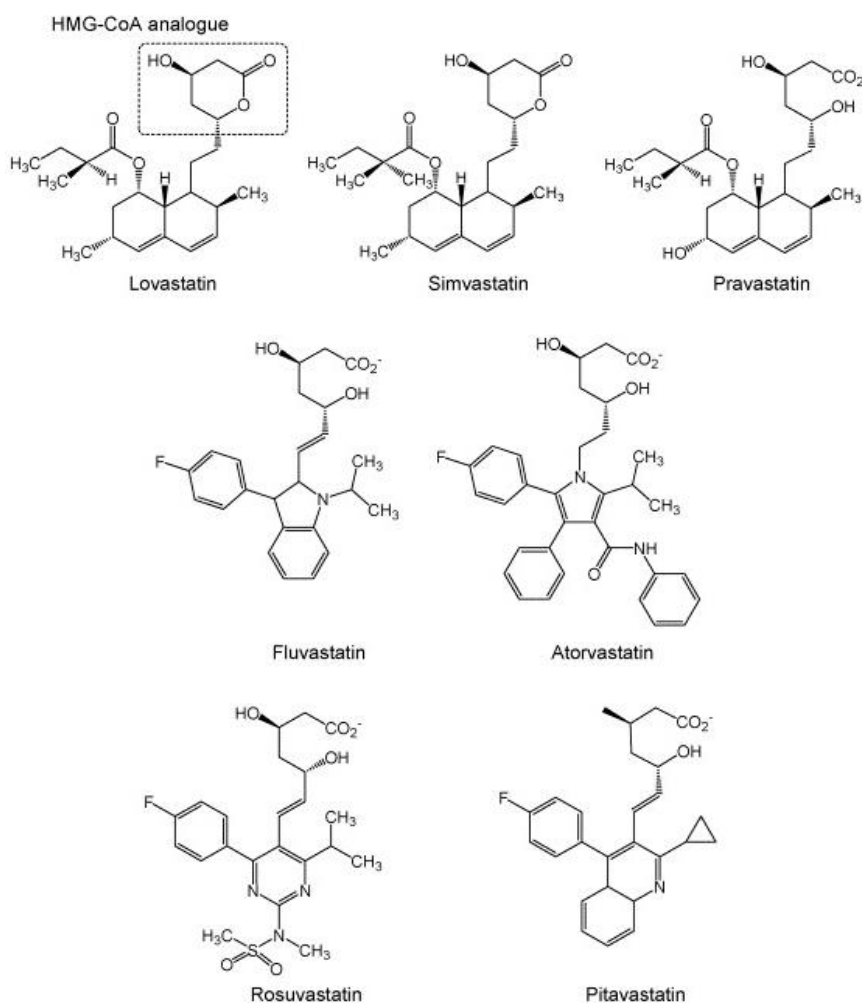


Figura 2: Estrutura química das diversas estatinas (Nirogi *et al.*, 2007)

Pelo exposto, as estatinas emplacam o segundo lugar em vendas no mercado farmacêutico, ficando atrás apenas dos fármacos utilizados em neoplasias. As estatinas consumidas mundialmente por cerca de 50 milhões de pessoas geram uma receita em torno de US\$ 30 bilhões/ano. No Brasil, são cerca de um milhão de caixas de estatinas vendidas mensalmente, tornando assim o comércio das estatinas bastante lucrativo e uma das grandes histórias de sucesso da indústria farmacêutica mundial (Campos e Carvalho, 2007; Ginter e Simko, 2009; FDA, 2012).

3.2 – Lovastatina

O inibidor enzimático lovastatina pertence ao grupo dos compostos orgânicos comumente chamados de estatinas. São substâncias importantes para a medicina, pois tem como principal papel, a redução dos níveis de colesterol endógeno no organismo humano. Esta propriedade de redução dos níveis de colesterol está relacionada com o potencial da lovastatina, de inibir a enzima 3-hidroxiacetilglutaril-CoA redutase, que catalisa a conversão do substrato HMG-CoA em mevalonato durante a síntese do colesterol. Esta ação inibitória está relacionada com a grande similaridade que a lovastatina apresenta se comparada ao substrato HMG-CoA (fig. 3). Uma característica atrativa destes inibidores deve-se a redução dos níveis de LDL colesterol (lipoproteínas de densidade baixa) responsável pelo “mau colesterol”, sem interferir de forma negativa na HDL colesterol (lipoproteína de densidade alta) responsável pelo “bom colesterol”, chegando em alguns casos, a aumentar sutilmente os níveis desta última molécula (Singer *et al.*, 1988; Manzoni e Rollini, 2002; Endo, 2004).

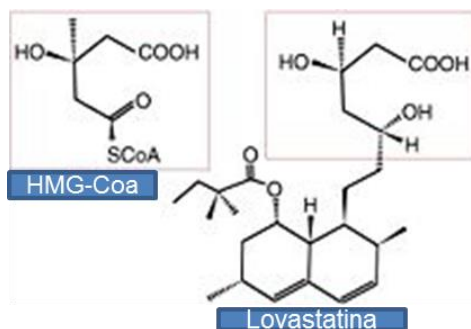


Figura 3 - Comparação da estrutura química da HMG-Coa e da lovastatina.

A lovastatina analisada através do metabolismo microbiano, pertence ao conjunto de metabólitos secundários chamados policetídeos. A biossíntese destes metabólitos geralmente consiste em pelo menos duas fases. A primeira fase catalisada por uma Policetídeo Sintase (PKS) é sempre obrigatória (Gokhale e Tuteja, 2001).

As PKS que participam desta primeira fase podem ser divididas em interativa e sintase modular. A PKS interativa é uma única enzima, contendo entre cinco e sete sítios ativos com várias atividades catalíticas. Estes locais ativos podem ser usados repetidamente na reação para formar um único produto; por outro lado, a PKS modular é um complexo enzimático, que cumpre as mesmas funções, como destacado acima, mas cada local ativo da enzima é utilizado apenas uma vez para a formação de um produto individual (Gokhale e Tuteja, 2001). Um resumo do mecanismo de biossíntese da lovastatina por *A. terreus* pode ser analisado na figura 4.

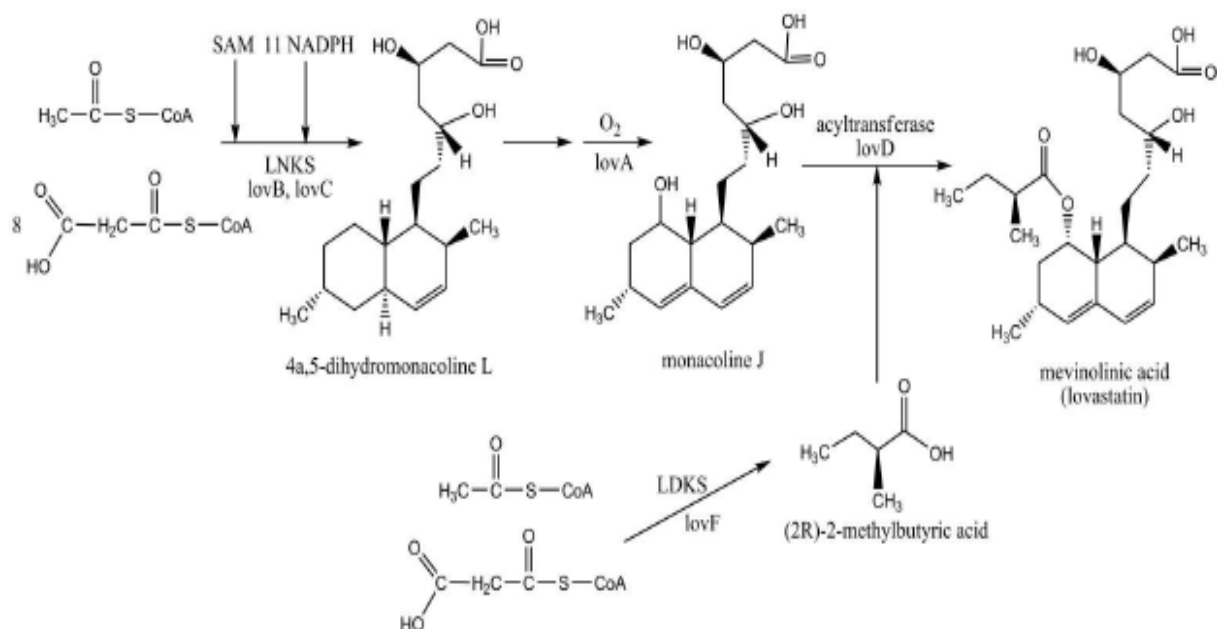


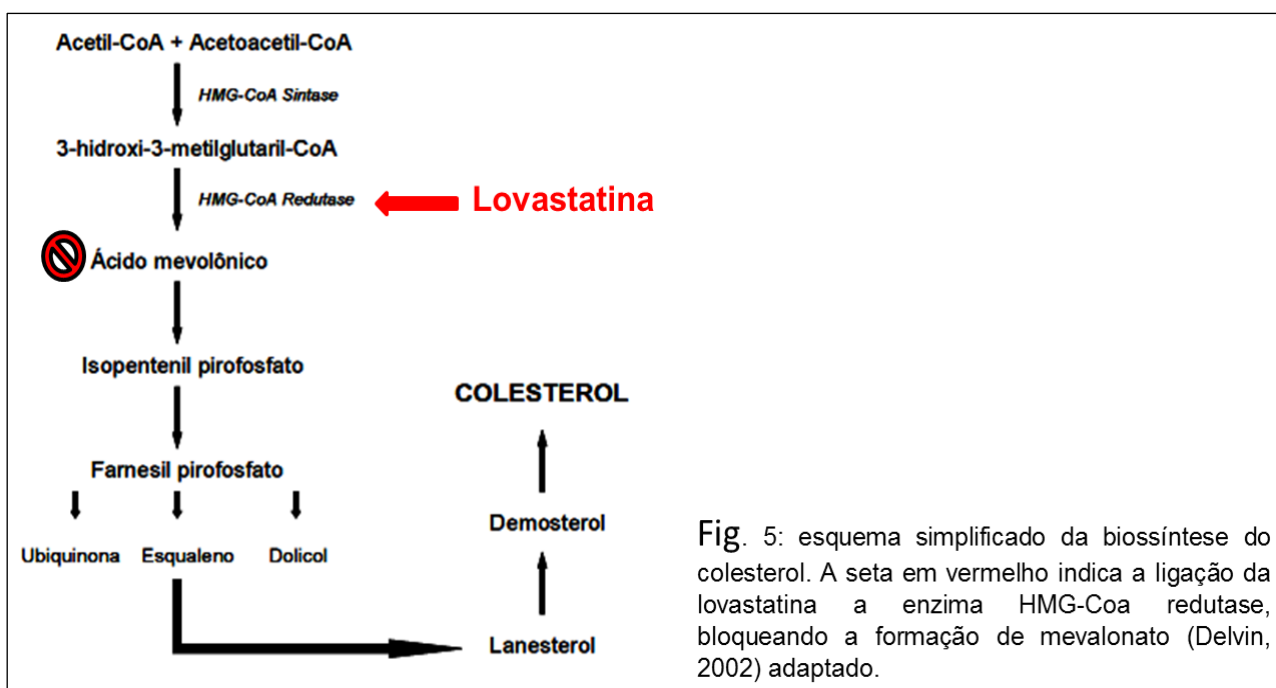
Figura 4 - Esquema simplificado das etapas de biossíntese da lovastatina por *Aspergillus terreus* (Kennedy *et al.*, 1999; Sutherland *et al.*, 2001).

Comercialmente, a lovastatina é apresentada como um pó branco cristalino com ponto de fusão de 174,5°C, insolúvel em água ($0,4 \times 10^{-3}$ g/L), solúvel em acetona, acetonitrila, metanol (28 g/L), etanol (16 g/L) e isopropanol (20 g/L). Esta estatina possui coeficiente de partição (octanol:água), log P, igual a 4,26 na forma de lactona e máximos de absorção na região do ultravioleta (UV_{máx}, acetonitrila) em λ 231, 238 e 247 nm (Moffat *et al.*, 2004; Budavari, 2006).

3.3 - Mecanismos de Ação das Estatinas

Em nível terapêutico, as estatinas classificam-se como inibidores competitivos da enzima HMG-CoA redutase, caracterizando-se como um grupo de fármacos com ação efetiva e boa tolerância no combate de quadros de dislipidemia. As estatinas atuam inibindo uma etapa considerada limitante para a biossíntese do colesterol, que consiste na conversão do HMG-CoA em mevalonato (Brunton *et al.*, 2007; Most *et al.*, 2012).

A ação inibidora da HMG-CoA redutase ocasionada pelas estatinas, ocorre por haver uma similaridade na sua estrutura (grupo lateral) com o substrato HMG-CoA. Desta forma, as estatinas ligam-se de maneira reversível, competitiva e mais potente do que o substrato natural à enzima HMG-CoA redutase, provocando um bloqueio na biossíntese do colesterol (Fig. 5) (Endo, 2009; Solomon & Freeman, 2007). Esta ação inibitória por parte das estatinas resulta no aumento do número de receptores de LDL, principalmente, nas células hepáticas, acelerando a diminuição das concentrações sanguíneas de LDL, podendo ocorrer redução de até 40% nos níveis plasmáticos destas moléculas.



Mesmo sendo este o efeito mais significativo das estatinas, também é constatada uma leve eficácia no aumento das concentrações de HDL colesterol e, redução dos níveis de triglicerídeos, atuando desta forma em todo o perfil lipídico. Como o efeito promovido pelas estatinas provoca a diminuição da síntese de colesterol, e como este é necessário para a produção hepática de VLDL, possivelmente este deve ser o mecanismo pelo qual a sua concentração diminui, sendo, provavelmente, também o mecanismo de redução dos triglicerídeos (Grahame-Smith, 2004; Brunton *et al.*, 2007).

2.4 - Novas Tendências Terapêuticas para Estatinas

Os efeitos pleiotrópicos das estatinas têm recebido crescente atenção e podem ter aplicabilidade clínica em uma vasta gama de doenças cardiovasculares e não cardiovasculares (Davignon, 2004). Estes efeitos podem estar relacionados com o fato de que as estatinas podem também inibir a síntese de isoprenóides, que são importantes anexos lipídicos para moléculas sinalizadoras intracelulares (Farnesil pirofosfato e Geranil-geranil pirofosfato), visto que proteínas isoprenóides controlam diversas funções celulares, e não é surpreendente que as estatinas podem ter efeitos adicionais além da redução dos lipídeos (Wang *et al.*, 2008).

Os efeitos hipolipêmicos evidentes das estatinas têm levado a uma redução significativa de eventos coronários, como relatado pelos estudos clínicos, epidemiológicos e patológicos (Farnier & Davignon 1998; Galán *et al.*, 2004; Nash 2005; Moride *et al.*, 2008; Seenivasan *et al.*, 2008). Estes compostos também podem prevenir o AVC e reduzir o desenvolvimento da doença vascular periférica (Maron *et al.*, 2000). A terapia com uso de estatinas apresenta efeitos biológicos além dos relacionados com a redução dos níveis de LDL colesterol, que incluem a estabilização da placa de ateroma, modificação na progressão da aterosclerose, melhora nas funções endoteliais, modulação da resposta inflamatória e impedir a formação de trombos (Wang *et al.*, 2008; Seenivasan *et al.*, 2008).

Alguns estudos na área oncológica indicam que as taxas de incidência de câncer foram menores em pacientes que receberam estatinas. Dados do AFCAPS/TexCAPS apontam uma incidência significativamente menor de novos melanomas ao avaliar a eficácia da lovastatina na prevenção de doenças cardiovasculares. Foi verificado que ocorreu um reduzido número de mortes por câncer entre pacientes envolvidos em grandes ensaios com uso de estatinas para prevenção de eventos cardiovasculares (Dulak & Józkwicz 2005). Além disso, recentes estudos observacionais têm encontrado grandes reduções no risco (20-55%) de tumores cancerígenos específicos (colo-retal,

mama, próstata, pulmão e pâncreas), com o uso da terapia de estatina (Bonovas *et al.*, 2006; Glynn *et al.*, 2008).

As estatinas também estão sendo aplicadas como fármacos promissores para várias doenças ósseas, principalmente a osteoporose (Pahan 2006). Uma das perspectivas recentes é de que a lovastatina pode ser usada para o tratamento de fraturas ósseas. A atuação das estatinas na formação do osso foi demonstrado pela primeira vez por Mundy *et al.*, (1999). Posteriormente, estudos epidemiológicos mostraram que as estatinas têm efeitos benéficos sobre a densidade mineral do osso, reduzindo o risco de fraturas, como relatado por Edwards & Spector (2002) e Pahan (2006). A sinvastatina, mevastatina, fluvastatina e lovastatina foram utilizadas para estimular a formação óssea, no entanto, o mecanismo que comanda o efeito das estatinas sobre os ossos permanece desconhecido (Cummings & Bauer, 2000; Edwards e Spector, 2002).

Estudos epidemiológicos sugerem que as estatinas reduzem o risco de desenvolver a Doença de Alzheimer (DA) (Pedrini *et al.*, 2005; Höglund *et al.*, 2004). A DA é caracterizada pelo acúmulo extracelular e vascular de β -amilóide ($A\beta$) no cérebro, que é tóxica para muitos neurônios (Pedrini *et al.* 2005). Dois grandes estudos de 2002, sugerem que pacientes que tomaram lovastatina ou pravastatina tiveram uma redução aproximada de 70% no risco de desenvolvimento de DA (Wolozin, 2002). Estudos com ratos selvagens e ratos transgênicos demonstraram que o tratamento crônico com estatinas, pode atenuar a amiloidose cerebral, sugerindo que as estatinas podem exercer o seu efeito de redução dos riscos de DA desta maneira (Fassbender *et al.*, 2001; Pedrini *et al.*, 2005). Outros estudos têm sugerido uma associação entre a DA e o metabolismo do colesterol, embora os mecanismos subjacentes a esta associação ainda sejam mal compreendidos (Höglund *et al.*, 2004; Wolozin 2002).

Estudos clínicos de Esclerose Múltipla (EM) têm demonstrado que as estatinas podem reduzir a morbidade em pacientes com esta doença. Informações de um estudo clínico que avaliou a ação da sinvastatina em EM, revelou uma diminuição significativa no número e volume de novas lesões com

um perfil de segurança favorável (Wang *et al.*, 2008). Outros estudos demonstraram que a lovastatina pode prevenir e reverter doenças crônicas recidivantes de encefalomielite autoimune experimental, que é um modelo animal de EM (Pahan *et al.*, 1997;. Neuhaus & Hartung 2007). Este fato foi atribuído às propriedades imunomoduladoras das estatinas e à sua indução à produção de citocinas Th2 de células anti-inflamatórias (Davignon, 2005).

Um ensaio clínico recente demonstrou o efeito imunomodulador e anti-inflamatório das estatinas em doentes com Artrite Reumatóide (AR). McCarey *et al.*, (2005) relatam dados *in vivo* em vários modelos inflamatórios e sugerem que tais efeitos podem ter potencial imunomodulatório, apoiando a hipótese de que as estatinas podem proteger contra o desenvolvimento de AR (Jick *et al.*, 2009). Foi observada uma resposta clínica de boa a moderada em 31% dos pacientes tratados com atorvastatina em comparação com 10% no grupo de placebo (Turesson *et al.*, 2008). Esta evidência sugere que as estatinas devem ser consideradas em pacientes com AR grave e um perfil de risco cardiovascular desfavorável (Leung *et al.*, 2003; Turesson *et al.*, 2008). De acordo com McCarey *et al.*, (2005), estudos mais aprofundados devem ser realizados para certificar a administração de estatinas a doentes com AR.

No tratamento de pacientes com Doença Renal Crônica (DRC), as estatinas podem proporcionar proteção contra doenças renais caracterizadas por inflamação e/ou proliferação aumentada de células epiteliais, tais como a glomerulonefrite. Além disso, a terapia com lovastatina demonstrou prevenir a queda da depuração de creatinina e de retardar a perda da função renal, especialmente em casos de proteinúria (Seenivasan *et al.*, 2008).

4 - Micro-organismos Produtores de Lovastatina

Estatinas naturais, em especial a lovastatina, podem ser obtidas através de diferentes gêneros e espécies de fungos filamentosos. Vários destes gêneros incluindo *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monascus*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Scopulariopsis*, *Doratomyces*, *Phoma*, *Phythium*, *Gymnoascus*, *Hypomyces* e *Pleurotus* são mencionados na literatura como produtores de

lovastatina (Bizukojc & Stanislaw, 2009; Cabral *et al.*, 2010; Srinu *et al.*, 2010).

Além destes, os fungos macroscópicos pertencentes ao grupo dos Basidiomycetos foram recentemente relatados como produtores de lovastatina, sendo *Pleurotus* sp o gênero mais apontado como produtor de altas concentrações de lovastatina (Alarcon *et al.*, 2003). Outro grupo de micro-organismos estudados recentemente para produção de lovastatina são as actinobactérias marinhas, onde verificou-se produção considerável desta molécula (Srinu *et al.*, 2010).

No entanto, apesar da utilização de outros grupos microbianos para produção de lovastatina a nível comercial, sua produção é baseada em bioprocessos utilizando *A. terreus* (Novak *et al.*, 1997; Manzonei *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2000; Casas-López *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2007; Bizukojc e Ledakowicz, 2008; Jahromi *et al.*, 2012). As fermentações utilizando *A. terreus* são realizadas tipicamente em 28°C e pHs de 5,8 e 6,3, nível de oxigênio dissolvido controlado em $\geq 40\%$ de saturação do ar e a fermentação conduzida por até 10 dias (Kumar *et al.*, 2000).

O processo de produção industrial para a produção de lovastatina teve início em 1980 utilizando *A. terreus* ATCC 20542 (Mevacor, Merk). O desenvolvimento do processo envolve a análise de vários parâmetros de fermentação, no entanto, *A. terreus* ATCC 20542, também é capaz de biossintetizar outros compostos que dificultam as etapas de purificação na produção em escala industrial. Um co-metabólito predominante é a benzofenona sulochrin, que surgiu a partir de um precursor de policetídeo. Este composto foi alvo de supressão por triagem e mutagênese clássica, facilitando um aumento na produção de lovastatina (Vinci *et al.*, 1999; Couch & Gaucher 2004). Outro importante co-metabólito é o (+)-geodin, que também é um produto da via dos policetídeos. Alguns investigadores exploraram a estratégia de diminuir a formação de geodin durante a fermentação por meio da manipulação de alguns parâmetros como aeração e controle do pH (Bizukojc & Ledakowicz, 2008; Bizukojc & Ledakowics, 2009).

5 - Fermentação em Estado Sólido (FES)

A FES adquiriu credibilidade nos últimos anos nas indústrias de biotecnologia, devido às suas potenciais aplicações na produção de metabólitos secundários biologicamente ativos com ampla aplicação nas áreas de alimentos, cosméticos, biorremediação, produtos farmacêuticos etc. surgindo assim como uma alternativa atrativa à substituição da FSm (Fermentação Submersa). Uma crescente característica nos bioprocessos que envolvem FES é a utilização de resíduos agroindustriais como substrato, permitindo criar uma via alternativa de aproveitamento destes resíduos além de agregar-lhes valor econômico (Singhania *et al.*, 2009).

A FES tem sido definida como um bioprocessos que envolve uma matriz sólida que é conduzida com a ausência de água livre, contudo, o substrato deve possuir umidade suficiente para proporcionar o crescimento e o metabolismo do micro-organismo. A matriz sólida pode ser um suporte inerte, um suporte impregnado com os nutrientes adequados que permitam o desenvolvimento do micro-organismo ou uma matriz degradável, como os resíduos agroindustriais que tenham nutrientes adequados ao crescimento microbiano (Pandey, 2003).

O potencial de aplicação da FES reside no fato de que o micro-organismo é cultivado em um substrato que oferece os nutrientes presentes em seu habitat natural, portanto, facilita a reprodução do seu metabolismo como se estivesse *in situ*, agregando desta forma, valor ao produto. Já a FSm pode ser considerada como uma violação ao seu habitat natural, especialmente de fungos. Nem mesmo os micro-organismos marinhos apresentam facilidade em desenvolver-se na FSm, pois, mais de 98% dos isolados de ambiente marinho foram obtidos a partir das superfícies subaquáticas de substratos sólidos, encontrados em habitats marinhos (A. Kelecom, 2002; U. Hölker *et al.*, 2004).

Existem vários fatores importantes que influenciam no sucesso de uma FES, tais como: a escolha do micro-organismo e do substrato, parâmetros do processo (temperatura, pH, aeração e umidade) bem como a purificação do

produto final, que tem sido um desafio para esta tecnologia. Dentre estes fatores, a seleção do substrato e umidade são condições fundamentais para o sucesso de uma FES (Singhania *et al.*, 2009).

5.1 Produção de Lovastatina por (FES)

Embora a produção industrial de lovastatina e outros metabólitos secundários seja convencionalmente realizada por FSm, a FES está rapidamente se tornando uma alternativa ao sistema de produção industrial. Nos últimos 20 anos, diferentes sistemas de FES foram desenvolvidos para produção de diferentes moléculas (Barrios-González, 2007). Vários estudos comparativos têm demonstrado que a FES vem ganhando prestígio por apresentar vantagens em relação a FSm, incluindo maior rendimento do produto, baixo consumo de água e custo consideravelmente menor (Balakrishna & Pandey 1996; Robinson *et al.*, 2001; Holker e Lenz 2005; Pandey *et al.*, 2007; Parvatham, *et al.*, 2012).

A utilização da FES para produção de lovastatina vem sendo bastante estudada e vem apresentando resultados promissores. Os substratos utilizados neste bioprocesso incluem farelo de trigo, farelo de arroz, cascas de laranja, cascas de grãos diversos, bagaço de cana tec. (Reddy *et al.*, 2011;. Jaivel e Marimuthu, 2010a; Chankya *et al.*, 2011). O farelo de trigo normalmente é considerado o melhor substrato para produção de lovastatina. Estudos de Panasuriya e Singhal (2010) relatam uma produção máxima de 3,2734 mg/g de lovastatina e uma faixa de rendimento aproximada de 806 mg/L a 982,3 mg/L utilizando farelo de trigo na fermentação (Jaivel e Marimuthu, 2010a). De acordo com Panasuriya & Singhal (2010) alterações drásticas no teor de umidade afetam o equilíbrio de oxigênio e água no processo fermentativo, ocasionando uma diminuição na produção de lovastatina. Rendimentos de lovastatina em torno de 730 mg g⁻¹ tendo como substrato seco o farelo de trigo, em um nível de umidade de 65% e temperatura de 30°C utilizando linhagens de *A. terreus* que sofreram processos de mutação, foram obtidos nos estudos de Prabhakar *et al.*, (2011).

A razão para um comportamento fisiológico diferenciado do fungo, quando submetido à bioprocessos por FES não é totalmente compreendido, mas é muitas vezes chamado de "fisiologia do meio sólido". Alguns anos atrás, Biocon India LTDA. começou, o que posteriormente tornar-se-ia um grande sucesso na produção em escala industrial de lovastatina (e outros metabólitos secundários) utilizando FES. Algum tempo depois, o órgão norte-americano FDA aprovou FES como forma para obtenção de drogas de origem fúngica para aplicação na área clínica (Suryanarayan, 2003).

Existem basicamente dois tipos de sistemas de FES que são diferenciados de acordo com a natureza da fase sólida utilizada: (a) FES que utilizam substratos sólidos naturais, que é o sistema mais comum, e (b) FES que fazem uso de suportes inertes impregnados com nutrientes. A Biocon produz lovastatina usando o sistema tradicional comum, cultivando *A. terreus* em farelo de trigo. Aparentemente, a tecnologia é baseada na utilização do PlaFractor, um biorreator de FES em larga escala, embora estas fermentações também possam ser realizadas em outros tipos de reatores (Durand 2003; Giovannozzi-Shermanni & Tiso, 2007), ou mesmo em fermentador de bandeja, onde a cultura sólida é depositada sobre bandejas em camadas finas e colocada uma por cima da outra com um espaçamento de alguns centímetros em uma sala termostatizada.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Produzir, extrair e pré-purificar lovastatina produzida pela linhagem de *Aspergillus terreus* URM 4317 utilizando resíduos agroindustriais como meio de cultivo.

6.2 Objetivos Específicos

1. Selecionar entre os resíduos agroindustriais, farelo de trigo, bagaço de cana de açúcar, fibra de coco, serragem e sabugo de milho, o melhor substrato para a produção de lovastatina;
2. Avaliar o efeito das variáveis umidade, pH e temperatura na produção de lovastatina, com o melhor substrato, previamente selecionado, utilizando planejamento estatístico;
3. Extrair, identificar e quantificar lovastatina;

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Alarcon J, Aguila S, Arancibia-Avila P, Fuentes O, Zomorano-Ponce E, Hernandez M (2003). Production and purification of statins from *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycete) strains. **Z Naturforsch.** 58, 62-64.
- Alberts AW, Chen J, Kurov G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Albers-Schonberg G, Hensens O, Hirschfield J, Hoofsteen KJ, Liesch J, Springer J (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. **Proc Natl Acad Sci USA.** 77, 3957–3961.
- A. Kelecom (2002). Secondary metabolites from marine microorganisms. **An. Acad. Bras. Cienc.** 74, 151–170.
- A. Pandey (2003). Solid-state fermentation, **Biochem. Eng. J.** 13, 81–84.
- Balakrishna K, Pandey A (1996). Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation. **J. Sci. Ind. Res.** 55, 365–372.
- Barrios-Gonzales, J.; Miranda, R.U. (2009). Biotechnological production and applications of statins. **Appl. Microbiol. and Biotech.** DOI 10.1007/s00253-009-2239-6.
- Barrios-González J, Mejía A, Larroche C (2007). Production of antibiotics and other commercially valuable secondary metabolites. In: Pandey A, Soccol C (eds) *Current Developments in Solid-State Fermentation*. **Asiatech. Publishers, Inc**, New Delhi, 262–296.
- Bizukojc M, Ledakowicz S (2008) Biosynthesis of lovastatin and (+)-geodin by *Aspergillus terreus* in batch and fed-batch culture in the stirred tank bioreactor. **Biochem. Eng. J.** 42:198–207.
- Bizukojc M, Ledakowicz S (2009) Physiological, morphological and kinetic aspects of lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*. **Biotechnol. J.** 4, 647–664.
- Bonovas S, Filioussi K, Tsavaris N, Sitaras NM (2006) Statins and cancer risk: a literature-based meta-analysis and meta-regression analysis of 35 randomized controlled trials. **J Clin Oncol.** 24, 4808–4817.
- Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. (2007). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11th ed. Rio de Janeiro: **Mc Graw Hill**. pp. 837-838 e 851 855.
- Budavari, S (2006). *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and*

biologicals. 14a ed. New Jersey: **Merck Resea. Laborat.**, 2006. p. 143, 722, 968, 1325, 1471.

Cabral ME, Delgado OD, Sampietro DA, Catalan, Figueroa LIC, Farina JI (2010). Antifungal activity and the potential correlation with statin producing ability: An optimised screening applied to filamentous fungi from Las Yungas subtropical rainforest. **Res. J. Microbiol.** 5, 833-848.

Campos, V. L.; carvalho, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas (2007). **Quím. Nov.**, v. 30, no. 2, 425-430.

Casas-Lopez, J.L.; Sanchez Perez, J. A.; Fernandez Sevilla, J. M.; Acien Fernandez, F.G.; Molina Grima, E.; Chisti, Y. (2003). Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. **Enz. and Microb. Tech.** 33, 270-277.

Casas-López JL, Sánchez-Pérez JA, Fernández-Sevilla JM, Acién-Fernández FG, Molina-Grima E, Chisti Y (2004). Fermentation optimization for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: use of response surface methodology. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 79, 1119–1126.

Chanakya P, Latha PM, Srikanth M (2011). Solid state fermentation for the production of lovastatin by *Aspergillus fischerii*. **Res. J. Pharma. Sci. Biotechnol.** 1, 9-13.

Couch RD, Gaucher GM (2004). Rational elimination of *Aspergillus terreus* sulochrin production. **J. Biotechnol.** 108, 171–177.

Cummings SR, Bauer DC (2000). Do statins prevent both cardiovascular disease and fracture? **JAMA.** 283, 3255–3257.

Davignon J, Leiter LA (2005). Ongoing clinical trials of the pleiotropic effects of statins. **Vasc Health Risk Manag.** 1, 29–40.

Dulak J, Józkowicz A (2005). Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of statins: relevance to anti-cancer therapy. **Curr. Canc. Dru. Targ.** 5, 579–594.

Durand, A (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 13, 113–125.

Edwards CJ, Spector TD (2002). Statins as modulators of bone formation. **Arthritis. Res.** 4, 151–153.

Endo A, Kuroda M, Tanzawa K (1976a). Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-562 236A and ML-236B fungal metabolites having hypocholesterolemic activity. **FEBS. Lett.** 72, 323–326.

- Endo A, Kuroda M, Tsujita Y (1976b). ML-236A, ML-236B and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. **J. Antibiot.** (Tokyo). 29, 1346–1348.
- Endo A, Terahara A, kitano N, Ogiso A, Mitsui S (1979). ML236B carboxylic acid derivatives and their use as antihyperlipidemic agents. **U.S. Patent** 4,137-322.
- Endo, A. (2004). The origin of statins. **Int. Congr. Ser.** 1262, 3-8.
- Endo, A. (2009). The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **Jour. of Lip. Reser.** 33, 1570-1571.
- Farnier M, Davignon J. (1998). Current and future treatment of hyperlipidemia: the role of statins. **Am. J. Cardiol.** 82, 3J–10.
- FDA (2012). Disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/InformationbyDrugClass/ucm294358.htm>. Acessado em 23 de Janeiro de 2013.
- Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D. (2001). Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 98, 5856–5861.
- Galán M, Taix F, Carrascosa F. (2004). Estatinas: eficacia, seguridad e indicaciones. **Inf. Ter. Sist. Nac. Salud.** 28, 89–100.
- Ginter, E. Simko, V. (2009). Statins: The drugs for the 21st century?. **Bratisl. Lek. Listy.** 110, 664-666.
- Giovannozzi S, Tiso N. (2007). Aspects of design of bioreactors in SSF. **Asiatech. Publishers. Inc.** New Delhi, 117–144.
- Glynn SA, O'Sullivan D, Eustace AJ, Clynes M, O'Donovan N. (2008). The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors, simvastatin, lovastatin and mevastatin inhibit proliferation and invasion of melanoma cells. **BMC Cancer.** 8, doi:10.1186/1471-2407-8-9.
- Gokhale R.S. Tuteja D. (2001). Biochemistry of Polyketide Synthases. Vol. 10. **Specil. Proc.**.. Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- Höglund K, Wiklund O, Vanderstichele H et al. (2004). Plasma levels of β -amyloid (1–40), β -amyloid (1–42), and total β -amyloid remain unaffected in adult patients with hypercholesterolemia after treatment with statins. **Arch. Neurol.** 61, 333–337.
- Hölker U, Lenz J. (2005). Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages? **Curren. Opin. in Microbiol.** 8, 301–306.

- Javier Barrios-González & Roxana U. Miranda. (2010) Biotechnological production and applications of statins. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 85, 869–883.
- Jaivel N, Marimuthu P (2010a). Optimization of lovastatin production in solid state fermentation by *Aspergillus terreus*. **Intl. J. Eng. Sci. Technol.** 2, 2730-2733.
- Jick SS, Choi H, Li L, McInnes IB, Sattar N (2009). Hyperlipidaemia, statin use and the risk of developing rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.** 68, 546–551.
- Juzlova, P., Martinkova, L. & Kren, V. (1996). Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review.. **Jour. of Indus. Microbiol.** 16, 163– 170.
- Kumar MS, Jana SK, Senthil V, Shashanka V, Kumar SV, Sadhukhan. (2000). Repeated fed-batch process for improving lovastatin production. **Process. Biochem.** 36, 363–368.
- Lai, L-S. T.; Tsai, T-H; Wang, T.C.; Cheng, T-Y. (2005). The influence of culturing environments on lovastatin production by *Aspergillus terreus* in submerged cultures. **Enz. and Microb. Tech.**, 36, 737-748, 2005.
- Manzoni, M.; Rollini, M. (2002). Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. **Appli. Microbi. and Biotechnol.**, 58, 555-564.
- Manzoni M, Rollini M, Bergomi S, Cavazzoni V. (1998). Production and purification of statins from *Aspergillus terreus* strains. **Biotechnol. Techniques.** 12, 529–532.
- Maron DJ, Fazio S, Linton MF. (2000). Current perspective on statins. **Circulat.** 101, 207–213.
- McCarey DW, Sattar N, McInnes IB. (2005). Do the pleiotropic effects of statins in the vasculature predict a role in inflammatory diseases? **Arth. Res. Ther.** 7, 55–61.
- Moffat, A. C.; Osselton, M. D.; Widdap, B. (2004). Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3a ed. London: **Pharmaceuti. Press.** 2, 654,1059, 1191,1469,1561.
- Mohammad Faseleh Jahromi; Juan Boo Liang; Yin Wan Ho; Rosfarizan Mohamad; Yong Meng Goh and Parisa Shokryazdan.(2012). Lovastatin Production by *Aspergillus terreus* Using Agro-Biomass as Substrate in Solid State Fermentation. **Jour. of Biomed. and Biotechnol.** doi:10.1155/2012/196264.

- Moride Y, Hegele RA, Langer A, McPherson R, Miller DB, Rinfret S. (2008). Clinical and public health assessment of benefits and risks of statins in primary prevention of coronary events: Resolved and unresolved issues. **Can J Cardiol.** 24, 293–300.
- Most, P.J., *et al.* (2009). Statins: Mechanisms of neuroprotection. **Progres. in Neurobiol.** 88 (1), pp. 64-72. Disponível em <<http://www.elsevier.com/locate/pneurobio>>. Acessado em 03 de Dezembro de 2012.
- Mundy G, Garrett R, Harris S. (1999). Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Scienc.** 286, 1946–1949.
- Nash DT. (2005). Relationship of C-reactive protein, metabolic syndrome and diabetes mellitus: potential role of statins. **J. Natl. Med. Assoc.** 97, 1600–1607.
- Neuhaus O, Hartung HP. (2007). Evaluation of atorvastatin and simvastatin for treatment of multiple sclerosis. **Expert. Ver. Neurother.** 7, 547–56.
- Novak N, Gerdin S, Berovic M (1997). Increased lovastatin formation by *Aspergillus terreus* using repeated fed-batch process. **Biotechnol. Lett.** 19, 947–948.
- OMS - Organização Mundial de Saúde (2009). **Cardiov. Diseases (CVDs)**. Factsheet N° 317 - September 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>> Acesso em: 05 de Novembro de 2012.
- Pahan K (2006). Lipid-lowering drugs. **Cell. Mol. Life. Sci.** 63, 1165–1178.
- Panasuriya CR, Singhal RS. (2010). Response surface methodology for optimisation of lovastatin production by solid state fermentation. **Braz. J. Microbiol.** 41, 164-172.
- Pandey A, Larroche C, Soccol C. (2007). General considerations about solid-state fermentation processes. New Delhi, **Asiatech. Publi. Inc.** 13–25.
- Parvatham Madhu Latha, Pallem Chanakya, Manipati Srikanth. (2012) Lovastatin production by *Aspergillus fischeri* under solid state fermentation from Coconut oil cake. **Nep. Jour. of Biotechnol.** 2, 26–36.
- Pedrini S, Carter TL, Prendergast G et al. (2005). Modulation of statinactivated shedding of Alzheimer APP ectodomain by **ROCK**. **Plos. Med.** doi:10.1371/journal.pmed.0020018.
- Prabhakar M, Lingappa K, Vivek B, Amena S, Vishalakshi N, Mahesh D (2011). Characterization of physical factors for optimum lovas-tatin production by

Aspergillus terreus klvb28mu21 under solid state fermentation. **J. Rec. Adv. Appl. Sci.** 27, 1-5.

Ramakrishna Nirogi, Koteswara Mudigonda, Vishwottam Kandikere. (2007). Chromatography–mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples. **Jour. of Pharma. and Biomed. Analysis.** 28, 379–387.

Reddy DSR, Latha DP, Latha KPJ. (2011). Production of lovastatin by solid state fermentation by *Penicillium funiculosum* NCIM 1174. **Drug. Invent. Tod.** 3, 75-77.

Reeta Rani Singhaniaa,; Anil Kumar Patelb; Carlos R. Soccolc , Ashok Pandey. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemi. Enginer. Jour..** 44, 13–18.

Robinson T, Singh D, Nigam P. (2001). Solid-state fermentation a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 55, 284–289.

Rodríguez-Porcel EM, Casas-López JL, Sánchez-Pérez JA, Chisti Y. (2007). Enhanced production of lovastatin in a bubble column by *Aspergillus terreus* using two-stage feeding strategy. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 82, 58–64.

Seenivasan A, Subhagar S, Aravindan R, Viruthagiri T (2008). Microbial production and biomedical applications of lovastatin. Indian **J. Pharm. Sci.** 70, 701–709.

Singer II, Scott S, Kazazis DM, Hufft JW. (1988). Lovastatin, an inhibitor of cholesterol synthesis, induces hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase directly on membranes of expanded smooth endoplasmic reticulum in rat hepatocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 85, 5264-8.

Solomon, K.R., Freeman, M.R. (2007). Do the cholesterol-lowering properties of statins affect cancer risk?. **Trend. in Endocrinol. and Metabol.** 19, 113 - 115.

Srinu M, Bhushan GVP, Moges F, Srilakshmi J, Sankar G, Prabhakar T, Lakshminarayana K (2010). Screening of HMG CoA reductase inhibitor producing marine actinomycetes. **J. Pharm. Sci. Health.** 2, 66-74.

Suryanarayan S. (2003). Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience. **Biochem. Eng. J.** 13, 189–195.

Turesson C, Jacobsson LTH, Matteson EL. (2008). Cardiovascular comorbidity in rheumatic diseases. **Vasc. Heal. Risk. Manag.** 4, 605–614.

- U. Hölker, M. Höfer, J. Lenz. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 64, 175–186.
- Vinci VA, Hoerner TD, Coffman AD, Schimmel TG, Dabora RL, Kirpekar AC, Ruby CL, Stieber RW. (2010). Mutants of a lovastatin-hyperproducing *Aspergillus terreus* deficient in the production of sulochrin. **Appl Microbiol Biotechnol.** 85, 869–883.
- Wang CY, Liu PY, Liao JK. (2008). Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. **Trends Mol Med.** 14, 37–44.
- Wei, P.; Xu, Z.; Cen, P. (2007). Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation. **J. Zhejiang Univ Sci A.** 9, 1521-1526.
- Wolozin B. (2002). Cholesterol and Alzheimer's disease. **Biochem. Soc. Trans.** 30, 525–529.
- Xu, B.J., Wang, Q.J., Jia, X.Q., Sung, C.K. (2005). Enhanced lovastatin production by solid state fermentation of *Monascus ruber*. **Biotechnol. Bioproc. Eng.** 10, 78-84.

8. Artigo



Artigo a ser submetido no periódico Applied Biochemistry and Biotechnology
Fator de impacto 1,943 (2011) e classificação Qualis B2.

Production of lovastatin by *Aspergillus terreus* URM 4317 using agroindustrial residues for Solid State Fermentation

Anderson José Paulo¹; Marcella Cardoso Lemos de Oliveira^{1,2}; Daniela Araújo Viana Marques³; Kilma Coelho Paz¹; Clécio S. Ramos²; Polyanna Nunes Herculano³; José Luiz de Lima Filho¹; Ana Lúcia Figueiredo Porto³.

¹Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil; ²Department of Molecular Sciences, Rural Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil; ³Department of Morphology and Physiology Animal, Rural Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil;

Abstract Lovastatin is a potent drug, produced by the secondary metabolism of microorganisms, which acts by inhibiting HMG-CoA reductase limiting enzyme in cholesterol biosynthesis. This study evaluated the production of lovastatin by strain of *Aspergillus terreus* URM 4317 through Solid State Fermentation (SSF) using agro waste optimizing parameters (temperature, initial moisture and pH) by factorial design. The results show the best corn cob as substrate (619.5 µg per gram dry substrate) in the production of lovastatin with 80% humidity, 30°C temperature, pH 5.5 and 10 days of fermentation. The effects of the variables indicate that all were significant, with pH being the negative effect and temperature and initial moisture with positive effects. The results show that the corn cob can be used as an alternative and economical source to produce lovastatin by *A. terreus* URM 4317.

Keywords: Lovastatin, *Aspergillus terreus*, Solid State Fermentation, Factorial design, corn cob.

1. INTRODUCTION

Hypercholesterolemia is the accumulation of cholesterol in blood plasma that causes atherosclerosis (blockage of the artery), leading to the coronary heart disease and heart attack. Out of total body cholesterol, one-third comes from diet and nearly two-third is synthesised in the body [1]. Lovastatin is a potent drug for lowering the blood cholesterol and it was the first statin accepted by United States Food and Drug Administration (USFDA) in 1987 as a hypercholesterolemic drug [2]. It is a competitive inhibitor of HMG-CoA reductase, which is a key enzyme in the cholesterol production pathway [3]. Lovastatin is a product of metabolism of cultures of *Penicillium* sp. [4], *Aspergillus terreus* [5–7], *Monascus* sp. [8, 9], *Hypomyces*, *Doratomyces*, *Phoma*, *Eupenicillium*, *Gymnoascus* and *Trichoderma* [10]. Although the ability of different groups of fungi for production of lovastatin was reported in many studies, only production of this compound by *A. terreus* was commercialized (for manufacture of high quantity of lovastatin for used as anticholesterol drug) [11].

Microorganisms are able to produce lovastatin in solid state fermentation or submerged culture [5, 7, 12–15], nevertheless in recent years, reseacher have shown an increasing interest in SSF as potential alternative of submerged fermentation, because it uses economical substrate, requires fewer processing and downstream stages, utilizes lesser power and generates

lesser effluent [16]. Moreover, SSF has higher product yield and offers better product stability.

Except the low substrate cost and low energy consumption, the SSF process can offer a good environment for fungi to grow, therefore high mycelia density and high lovastatin production can be expected [17,18].

Different substrates were used for lovastatin production in SSF, including sorghum grain, wheat bran, rice and corn [5, 7]. These substrate materials are normally expensive and are competing with food or feed ingredients for human and livestock. On the other hand, large quantity of agro-industrial biomass such as corn cob, coffee husk, sugar cane bagasse and sawdust are produced globally particularly in the tropical countries. This biomass are often burned away for disposal, causing huge environmental concerns, with only some remaining being used as roughage feed for ruminant livestock. These biomasses are, however, potential substrates for growth of microorganisms and production of biomaterials [19].

Thus, the objective of this study was to investigate the efficacy of strain *A. terreus* URM 4317 for production of lovastatin using corn cob, coffee husk, sugar cane bagasse, sawdust and coconut fiber as substrates and in addition, the effects of pH, initial moisture and temperature were analyzed using a factorial design.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Microorganism and inoculum preparation

The culture *Aspergillus terreus* URM 4317 was obtained from URM Culture Collection of the Federal University of Pernambuco, Recife – Brazil. The strain was maintained on potato dextrose agar (PDA), stored at 30°C and sub-cultured after every four weeks. For preparing a spore suspension, the microorganism was cultured in petri plates containing potato dextrose agar at 30°C for 7 days. Then, 10mL of 0,9% (w/v) NaCl and 2% Tween 20 previously sterilized was added. The surface was scrapped with an inoculating loop to suspend the spores and the spore suspension was taken as inoculum [7].

2.2 Substrates

Sugarcane bagasse was gently provided by Usina São José, Araçoiaba/PE Brazil. The sawdust, coconut fiber, corn cob and coffee husk were acquired in a rural location of Pernambuco and wheat bran was bought in a supermarket.

2.3 Physico-chemical characterization of the substrate

The best substrate for production of lovastatin will be characterized by the Laboratory of Food Analysis and Experimentation (LEAAL) to obtain the values of moisture and volatile substances, proteins, lipids, ash, carbohydrates, TCV (total caloric value), crude fiber, iron (Fe) and phosphorus (P) [30].

2.4 Solid State Fermentation

Assays for further selection of the substrate inductor in the production of lovastatin, be carried out in 250 mL Erlenmeyer flask containing 5g of substrate. The substrates have established the moisture content to 60% with mineral

nutrient solution ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.11 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L) at pH 6.0. The substrates are then autoclaved for 40 minutes at 121°C . After exit from the autoclave, the flasks are cooled to room temperature and inoculum made from standardized spore suspension (10^7 - 10^8 spores/mL) are homogenized and incubated at 28°C for 10 days [7].

2.5 Extraction of lovastatin

The fermented substrate was dried at 60°C for 24 h. After this period, the material was macerated until it becomes a powder, and this will be taken which 3 g are added to 250 mL Erlenmeyer in a mixture of 100 mL methanol:water (1:1, v/v) at pH 7.7. The flasks are placed in a shaker at 30°C and 200 rpm for 2 h. The mixture was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, and the supernatant was filtered through a membrane of $0.22\ \mu\text{m}$ [1].

2.6 Assay of Lovastatin by Spectrophotometer UV

The assay of lovastatin by UV spectrophotometer was performing according to Osman et al. [20] in which $0.20\ \mu\text{L}$ from each sample was added to $1.98\ \text{mL}$ of methanol to complete $2\ \text{mL}$ of final volume. The absorbance was measured by UV spectrophotometer (Ultrospec® 3000 Pro) at 247nm . The concentration of lovastatin was calculated in $\mu\text{g/mL}$ of final methanol solution using corresponding calibrated curve.

2.7 Liquid Chromatography-Mass Spectrometer (LC-MS/MS)

The production of lovastatin was determined using Liquid Chromatography-Mass Spectrometer (Esquire 3000 Plus - Bruker Daltonics) system ESI (Electrospray Ionization), positive ion mode, using Phenomenex Luna C-18 column (250x4.6mm i.d, 5 μ m) the mobile phases consisted of acetonitrile and water (60:40 v/v contained 0,1% formic acid and the flow rate was 0,6 mL/min. Lovastatin is detected at 238nm in the lactone form.

2.8 Experimental design

A 2³ full factorial design was utilized to analyze the influence of the three independent variables, namely moisture (x_1), temperature (x_2), and pH (x_3) on the selected response: Lovastatin concentration in μ g per gram dry substrate (μ g.gds⁻¹). The experimental design was composed of 8 runs and 3 repetitions of the central point, needed to calculate the pure error (Table 1). A linear regression model was employed to predict the response according eq. (1):

$$R = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_j x_j + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

where b_0 is the interception coefficient, b_i and b_j are the linear coefficients, b_{ij} are the interaction coefficients and the independent variables are x_i and x_j . The goodness of fit of the model was evaluated by the coefficient of determination (R^2) and the analysis of variance (ANOVA); the first-order model equation was determined by Fischer's test. The experimental and predicted values were

compared in order to determine the validity of the developed model by the *Statistica* 8.0, statistical program package [23].

3. RESULTS AND DISCUSSION

The use of inexpensive substrates for lovastatin production has combined benefit of utilizing a low-grade substrate while producing a commercially valuable product. In order to select the best substrate for growth of *A. terreus* URM 4317 and lovastatin production, the substrates used were corn cobs, coffee husks, sawdust, coconut fiber, sugarcane bagasse and wheat bran (standard).

The results of the best substrate for lovastatin production are shown in Table 2. It is clear that the corn cob ($73,12 \mu\text{g.gds}^{-1}$) and wheat bran ($102,75 \mu\text{g.gds}^{-1}$) were the major producers of lovastatin. Coffee husk produced $35.69 \mu\text{g.gds}^{-1}$ of lovastatin and sawdust had lower production with $9.05 \mu\text{g.gds}^{-1}$. In this study, the wheat bran was used only to compare performance with other substrates as wheat bran is the main substrate reported in the literature for lovastatin production in industrial and laboratory scale, with higher yields [5, 15, 24].

The coconut fiber and sugarcane bagasse, do not allow fungal growth. In analyzes of Pansuriya, [15] *A. terreus* obtained a very low growth and lower production of lovastatin using sugarcane bagasse ($66 \mu\text{g.gds}^{-1}$) relative to the wheat bran that provided maximum production ($1458 \mu\text{g.gds}^{-1}$). One factor that may have influenced growth in the absence of these substrates is the presence of lignin and tannin, which can block growth of the microorganism.

The experiments are conducted using corn cob as a substrate, since this residue, compared to wheat bran, is more economical and has good quantities of necessary nutrients for fungal growth and biosynthesis of lovastatin, such as iron, phosphorus, carbohydrates, fibers and protein (Table 5) [25, 26].

Extracts of coffee husk and corn cob were analyzed for Liquid Chromatography-Mass Spectrometer (LC-MS/MS). The chromatographic profiles obtained for these LC-MS/MS extracts were qualitatively identical, differing only one peak appears at a retention time (t_r) of 28 min in the extract of coffee husk, already in the corn cob extract, the peak appeared at a retention time of 33 min (Fig. 1).

The interpretation of the mass spectra of the peaks of the sample indicates that when compared to the standard mass spectrum of the lovastatin peak corresponding to extract corn cob detected at t_r 33 min corresponds to lovastatin (Fig. 2 and 3). Thus, it is possible affirm that lovastatin was produced by *A. terreus* URM 4317 when fermented corn cob.

Lovastatin can be produced by the fungus simultaneously in the form of lactone and/or hydroxy acid [23], however this study verified the presence of only lovastatin in lactone form, contrary to the reports of some studies, which report the predominance of lovastatin as hydroxy acid (active form) in fermented extracts of microorganisms [5,25] .

Results of the full experimental design for lovastatin production are presented in Table 3. To identify optimal levels with different process parameters which influence production of lovastatin, a solid state fermentation was performed. Three variables (initial moisture, temperature and pH) were chosen for this study because they influence the growth of different fungi and

production of secondary metabolites, such as lovastatin, in solid-state fermentation.

The main interactive effects of these variables (initial moisture, temperature and pH) were studied and executed in different levels (Table 1). The response was measured by production of lovastatin using corn cob, estimated in $\mu\text{g.gds}^{-1}$.

According results presented in the factorial design, all variables were significant on the production of lovastatin. Initial moisture and temperature showed positive effects, indicating that the increase in these variables values, increase the response value. Indeed otherwise occur with the influence of pH which proved to be negative, suggesting that the lower values of pH, increase lovastatin concentration (Table 4).

Similar results were obtained by Ruchir and Rekha [15] using SSF with wheat bran and *A. terreus*. In their studies, which showed that moisture content in the range between 60 to 80% yielded a high rate of lovastatin $2969 \mu\text{g.gds}^{-1}$, indicating that with increasing initial moisture, air voids present in the substrate is replaced by water, creating a balance between moisture content and oxygen, supporting the growth of fungus and reduces the heat generated by the metabolism of the microorganism. On the other hand, Panda et al. [28] and Parvatham et al. [29] reported maximum production of lovastatin ($10.88 \text{ mg.gds}^{-1}$) in SSF using coconut oil cake and rice at 30°C with pH ranging from 5.0 to 6.0 using *A. fischeri*, *Monascus purpureus* and *M. ruber*. In submerged fermentation (SmF), Sayyad et al. [8] reported the production of 2.99 - 3.42

mg.gds⁻¹ of lovastatin as the higher concentrations produced at temperature of 30 °C and pH between 5.0 to 6.0 with *M. purpureus*.

Regarding the second order interactions $x_1 x_3$ and $x_2 x_3$ showed that the negative effect prevailed, probably the main negative influence of pH in these interactions. The opposite effect was observed in the interaction $x_1 x_2$, where the positive effect prevailed, due to the positive main effects of temperature and moisture (Table 4).

In this study, a maximum of 619.5 µg.gds⁻¹ of lovastatin was produced. This concentration can be located at the base of diagram (Fig. 3) corresponding to pH 5.5 (level -1), temperature and moisture at 30°C and 80% (level +1), respectively. The lovastatin concentration obtained in the present work is higher than the one reported by Osman et al. [20] using *Aspergillus terreus* (15.2 µg/mL), *A. niger* (13.5 µg/mL) *A. oryzae* (37.6 µg/mL); Szakacs et al. [21] using *A. terreus* (0.40 mg/L) and Sayyad et al. [22] using *Monascus purpureus* (0.318 mg/L) in submerged fermentation SmF process.

The validity of the experimental design was verified by analysis of variance presented in Table 4. In addition, the value of the determination coefficient, $R^2 = 0.88$, indicates that the models explained 88% of the variability data ($p < 0.05$) at 95% confidence level. Coefficient of determination (R^2), a value close to 1, showed agreement between experimental and theoretical values predicted by the model. The estimated effects and the corresponding p-values implied that all independent variables generate significant effects on the response studied.

4. CONCLUSION

In this work, the corn cob was selected as the best substrate for lovastatin production using a factorial design indicated that the temperature 30°C, 80% moisture and pH 5.5 as being the conditions that produced the highest lovastatin concentration (619.15 $\mu\text{g.gds}^{-1}$) using SSF. Adjustments in order to optimize the production process will be studied to enhance the production of lovastatin, once the corn cob have a promising potential and a lower cost compared to wheat bran for the production of this molecule for *A. terreus* URM 4317.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the financial support of the Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE.

6. REFERENCES

- [1] H.R. Valera, J. Gomes, S. Lakshmi, R. Gururaja, S. Suryanarayan, D. Kumar (2005) *Enzyme and Microbial Technology*. 37, 521–526.
- [2] J. A. Tobert. (2003) *Nature Reviews Drug Discovery*. 7, 517-526.
- [3] A. W. Alberts, J. Chen, and G. Kuron. (1980) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 77, 3957–3961.
- [4] A. Endo, M. Kuroda, and Y. Tsujita. (1976) *Journal of Antibiotics*. 29, 1346–1348.
- [5] N. Jaivel and P. Marimuthu. (2010). *Intl J. Engg. Sci. Technol*. 2, 2730–2733.
- [6] M. Bizukojc and S. Ledakowicz. (2008) *Biochemical Engineering Journal*. 42, 198–207.
- [7] P. L. Wei, Z. N. Xu, and P. L. Cen. (2007) *Journal of Zhejiang University* 8, 1521–1526.
- [8] S. A. Sayyad, B. P. Panda, S. Javed, and M. Ali. (2007) *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73, 1054–1058.
- [9] T. Miyake, K. Uchitomi, M. Y. Zhang et al. (2006) *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 70, 1154–1159.
- [10] A. Endo, K. Hasumi, and A. Yamada. (1986) *Journal of Antibiotics*. 39, 1609–1610.
- [11] A. L. Demain. (1989) *Novel Microbial Products For Medicine and Agriculture*. 1^a ed., Elsevier Science.
- [12] L. S. T. Lai, C. C. Pan, and B. K. Tzeng. (2003) *Process Biochemistry*. 38, 1317–1326.
- [13] W. F. Ruddiman and J. S. Thomson (2001) *Quaternary Science Reviews*. 20, 1769–1777.
- [14] S. Suryanarayan. (2003) *Biochemical Engineering Journal*. 13, 189–195.
- [15] R. C. Pansuriya and R. S. Singhal. (2010) *Brazilian Journal of Microbiology*. 41, 164–172.

- [16] D. Kumar, V.K. Jain, G. Shanker, A. Srivastava. (2003) *Process Biochemistry*. 38, 1725.
- [17] Rizna Triana Dewi, Nina Artanti, Hani Mulyani, Puspa Dewi Narrij Lotulung, and Minarti. (2011) *TEKNOLOGI*. 15, 1-4.
- [18] B.J. Xu, Q.J. Wang, X.Q. Jia, C.K. Sung. (2005) *Biotechnology. Bioprocess Eng.* 78, 1-10.
- [19] Mohammad Faseleh Jahromi, Juan Boo Liang, Yin Wan Ho, Rosfarizan Mohamad, Yong Meng Goh and Parisa Shokryazdan. (2012) *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012, 2-11.
- [20] Osman, M.E., Khattab, O.H., Zaghlol, G.M., Abd El-Hameed, R.M. (2011) *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5, 698-703.
- [21] Szakacs G, Morovjan G, Tengrendy PR. (1998) *Biotechnol. let.* 20, 411-415.
- [22] Sayyad SA, Panda BP, Javed A and Ali M. (2007) *Biotechnol. Prod. Proc. Engg.*, 73, 1054-1058.
- [23] Statsoft Inc. (2008) *STATISTICA (Data Analysis Software Systems) Version 8.0*.
- [24] Praveen VK, Savitha J. (2012) *Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*. 3, 15-21.
- [25] J.L. Casas López, J.A. Sánchez Pérez, J.M. Fernández Sevilla, F.G. Acién Fernández, E. Molina Grima, Y. Chisti. (2003) *Enzyme and Microbial Technology*. 33, 270–277.
- [26] Zhihua Jia, Xiaoli Zhang, Yaling Zhao, Xuejun Cao. (2009) *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25, 1235-1241.
- [27] Siamak M. Samiee, Nasrin Moazami, Saeid Haghighi, Farzaneh Aziz Mohseni Saeid Mirdamadi and Mohammad Reza Bakhtiari. (2003) *Iranian Biomedical Journal*. 7, 29-33.
- [28] Panda BP, Javed S, Ali M. (2008) *Food Bioprocess Technol.* 53, 342-346.
- [29] Parvatham Madhu Latha, Pallem Chanakya, Manipati Srikanth. (2012). *Biotechnology Society of Nepal*. 2, 26-36.
- [30] Zenebon, O. (2005) *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 5ª ed., O Instituto, São Paulo, SP.

List of Tables

Table 1: Independent variables levels of 2^3 full experimental design for Lovastatin production.

Variables	Levels		
	Low (-1)	Central (0)	High (+1)
Moisture (%)	60	70	80
Temperature (°C)	22	26	30
pH	6.0	7.0	8.0

x_1 -moisture (%)

x_2 -temperature (°C)

x_3 -pH

Table 2: Effect of substrates on lovastatin production in SSF process.

Substrates	Lovastatin production ($\mu\text{g.gds}^{-1}$)
Corn cobs	73,12
coffee husks	35,69
sawdust	9,01
wheat bran (standard)	102,75
sugarcane bagasse	-
coconut fiber	-

Table 3: Matrix of the full factorial design (2^3) with conditions and results of the lovastatin production.

Run	Moisture (%)	Temperatura (°C)	pH	Lovastatina ($\mu\text{g.gds}^{-1}$)
1	60	30	7.5	103.66
2	60	22	7.5	72.92
3	60	22	5.5	85.00
4	60	30	5.5	293.61
5	80	22	5.5	45.24
6	80	30	5.5	687.10
7	80	30	7.5	302.58
8	80	22	7.5	46.88
9 (C)	70	26	6.5	52.11
10 (C)	70	26	6.5	52.11
11 (C)	70	26	6.5	52.64

Table 4: Estimates effects of independent variables and their interactions on the lovastatin concentration.

Independent variable/ interaction	Estimates effect	p value
Mean/intercept	163.07	< 0.05
x_1 (Moisture)	131.65	< 0.05
x_2 (Temperature)	284.23	< 0.05
x_3 (pH)	-146.23	< 0.05
$x_1 x_2$	164.55	< 0.05
$x_1 x_3$	-45.21	< 0.05
$x_2 x_3$	-141.00	< 0.05

All estimates effects were statistically significant at 95% confidence level

Table 5: Physico-chemical characterization of corn cob

ASSAY	RESULTS (in g/100g)
Moisture and volatiles substances	5,74
Protein	1,47
Lipids	0,73
Embers	0,95
Carbohydrates	91,11
V.C.T. (Kcal)	251,81
Crude fiber	31,26
Iron (Fe)	$4,32 \times 10^{-3}$
Phosphate (P)	0,03

List of figure legends

Figure 1: Chemical profiles obtained by LC-MS/MS for samples of coffee husk, corn cob and standard lovastatin.

Figure 2: Mass spectra (MS/MS; ionization "electrospray" - ESI) lovastatin standard mode positive ion, $M + = [404 + 1]$; $C_{24}H_{36}O_5$.

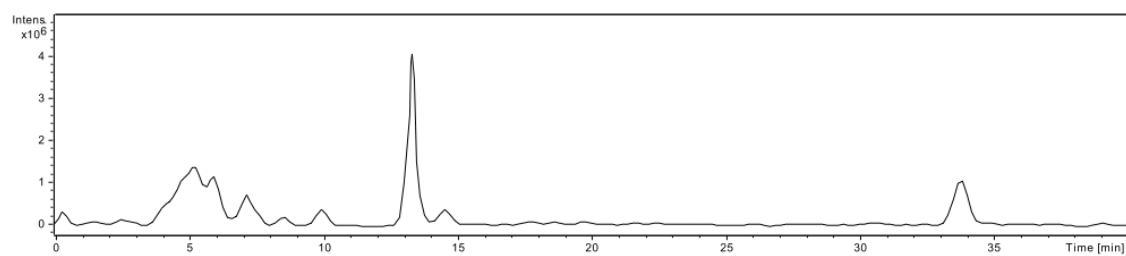
Figure 3: Mass spectrum (MS / MS; ionization "electrospray" - ESI) peak with retention time 33 min detected in the chromatogram of the extract of corn cob in positive ion mode, $M + = [404 + 1]$.

Figure 4: Cubic plot of the average concentration of lovastatin at different levels of pH, temperature, and moisture according to the 2^3 full experimental design.

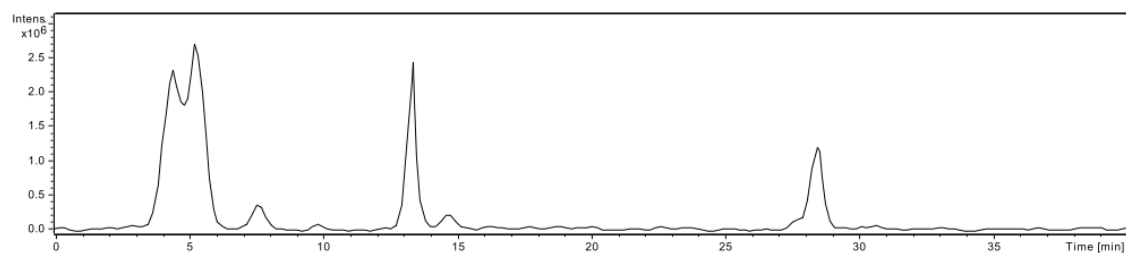
List of figures

Figure 1:

Corn cob



Coffe huskc



Standard of Lovastatin

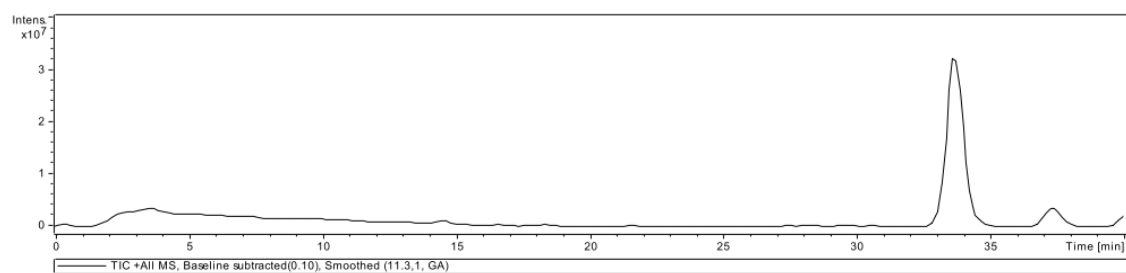


Figure 2:

Standard of Lovastatin

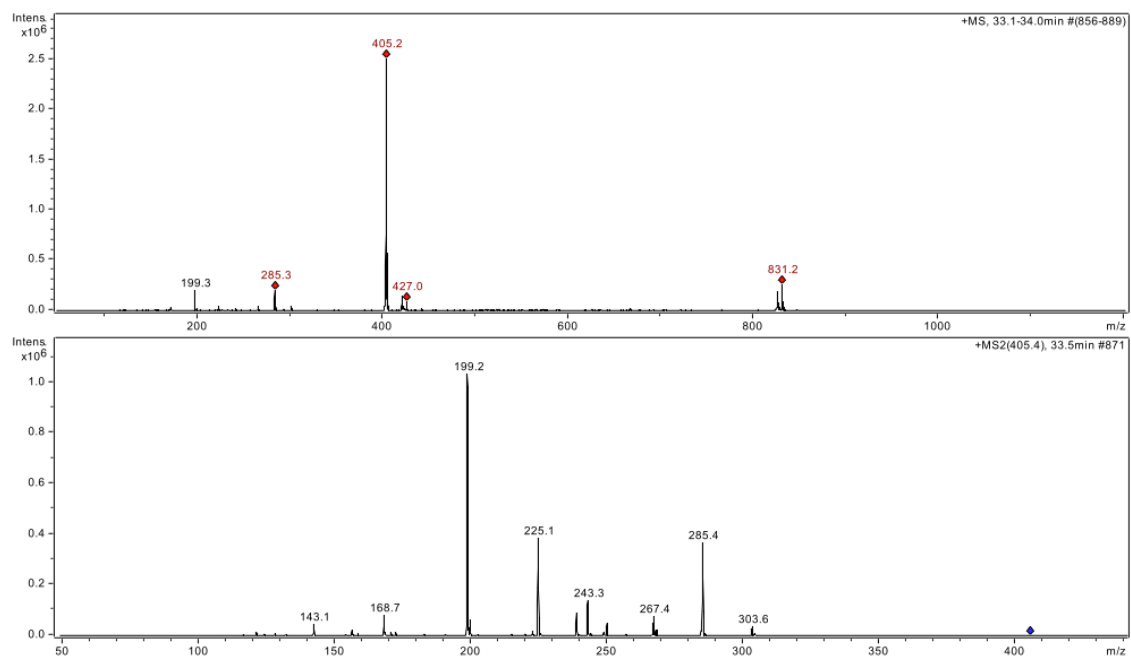


Figure 3:

Corn cob

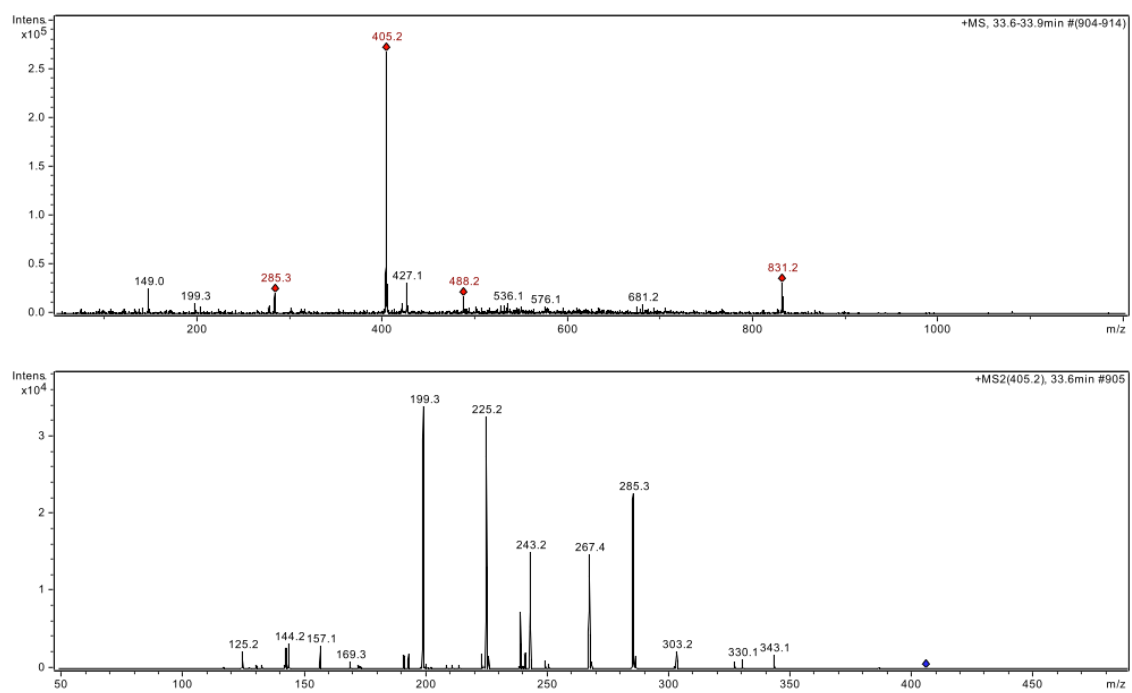
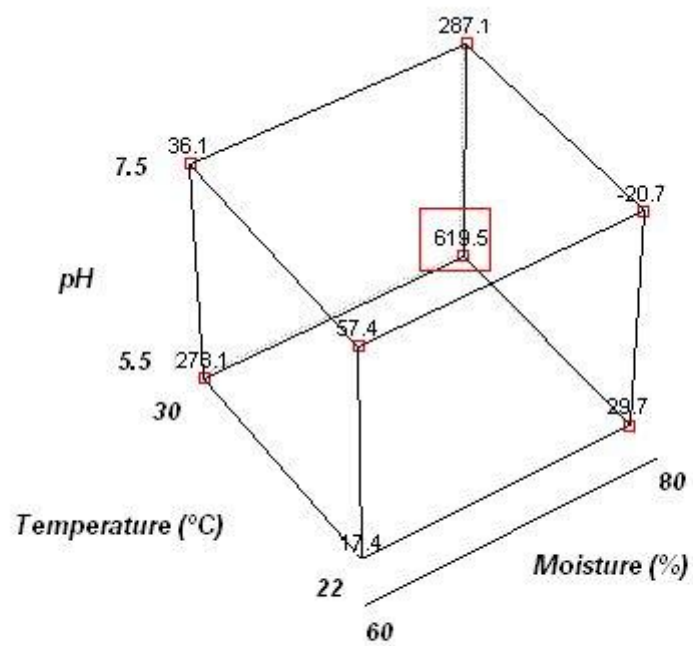


Figure 4:



9. ANEXOS

ANEXO I

Resumo Apresentando no XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia

XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM)

ResumoID: 86-1

Pôster (Painel)

Evento Submissao: III Congresso Latino Americano de Microbiologia de Medicamentos e III Simpósio Latinoamericano de Microbiologia de Cosméticos - CLAMME

AREA: Microbiologia de Medicamentos - Divisão M

SUB-AREA: Microbiologia de Medicamentos

PRODUCTION OF LOVASTATIN BY STRAINS OF *Aspergillus terreus* FROM URM CULTURE COLLECTION

Autores Oliveira, M.C.L. ^{1,2}, Paulo, A.J. ², Lima-Filho, J.L. ², Souza-Motta, C.M. ², Herculano, P.N. ¹, Porto, A.L.F. ^{1,2}

E-mail do primeiro autor: marcella.oliveira@yahoo.com.br

Instituição ¹ UFRPE - Federal Rural University of Pernambuco (Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE), ² UFPE - Federal University of Pernambuco (Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901)

Resumo:

Lovastatin is a statin of natural origin biosynthesized as secondary metabolites of several filamentous fungi. Widely used for reducing the cholesterol level and acts as inhibiting hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA), limiting step in cholesterol production in the liver. Lovastatin is produced commercially by fermentation of various filamentous fungi, species of the genera including *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monascus*, *Pleurotus* has been cited as producers of this statin. Therefore, the objective was to select the largest producer among the strains of *Aspergillus terreus* available in the URM Culture Collection of the Federal University of Pernambuco. For this study were used thirty-seven strains of *A. terreus* to test for their ability of producing lovastatin. Fungi were cultivated in submerged fermentation using the culture medium composed of lactose and soybean meal, as carbon sources and nitrogen. The flasks were inoculated with a spore suspension standardized to contain 1×10^6 spores/ml. Cultures were maintained at 28 °C and 150 rpm for 7 days. The fungal extracts were analyzed by UV spectrometry for quantitation of lovastatin, using a calibration curve commercial lovastatin (4 to 40 mg/ml). Nineteen fungal cultures were capable of producing lovastatin. The strain *A. terreus* URM 5579 showed a value of higher concentration lovastatin (13.96 mg/ml), followed by *A. terreus* URM 4317 (8.63 mg/ml) and *A. terreus* URM 5468 (7.63 mg/ml), whereas the highest yield of fungal biomass was recorded by strains *A. terreus* URM 5650 (20.52 mg/ml) followed by *A. terreus* URM 5254 (19.32 mg/ml) and *A. terreus* URM 4362 (18.85 mg/ml). Thereby, strains of *Aspergillus terreus* present at URM Culture Collection show an interesting biotechnological potential for production of lovastatin.

Palavras-chaves: Lovastatin, *Aspergillus terreus*, Submerged Fermentation, Statin

Agência Fomento: CAPES; FACEPE

ANEXO II**Resumo Apresentando no XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia**

XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM)

ResumoID: 86-2

Pôster (Painel)

Evento Submissao: XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia - ALAM

AREA: Microbiologia Industrial e Biotecnologia - Divisão J

SUB-AREA: Processos de obtenção de produtos de origem microbiana: antibióticos, anticorpos, pigmentos, ácidos, enzimas, vacinas, lipídios, biomoléculas em geral, etc.

Potencial Proteolítico de Linhagens de *Aspergillus terreus***Autores** Paulo, A.J. ¹, Duarte-Neto, J.M.W. ¹, Oliveira, M.C.L. ^{2,1}, Lima-Filho, J.L. ¹, Souza-Motta, C.M. ¹, Herculano, P.N. ², Porto, A.L.F. ^{2,1}**E-mail do primeiro autor:** anderson_jpaulo@hotmail.com**Instituição** ¹ UFPE - Universidade Federal de Pernambuco (Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901), ²UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco (Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos - Recife-PE, Cep: 52171-270)**Resumo:**

Enzimas microbianas proteolíticas são largamente utilizadas em vários processos industriais, devido a sua alta atividade em baixas concentrações ou ausência de toxicidade. Estas enzimas podem ser isoladas de várias fontes microbianas, sendo as proteases fúngicas amplamente utilizadas em processos industriais. Devido a grande utilização do gênero *Aspergillus* para produção dessas enzimas, esta pesquisa teve o objetivo de selecionar, dentre 19 culturas de *Aspergillus terreus* obtidos da Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, o fungo de maior potencial para produção de proteases por fermentação submersa. Para o inóculo os fungos foram cultivados em meio Ágar Extrato de Malte (pH 5,4), por 7 dias a 30°C, em seguida foi preparada uma solução de esporos com concentração final de 10⁶ esporos/mL utilizando câmara de Neubauer. O inóculo padronizado foi adicionado ao meio de Lactose (114,26 g/L de Lactose; 5,41 g/L de Farelo de Soja; 0,8 g/L de KH₂PO₄; 0,52 g/L de MgSO₄•7H₂O; 0,4 g/L de NaCl; 1,0 mg/L de ZnSO₄•7H₂O; 2,0 mg/L de Fe(NO₃)₃•9H₂O; 0,04 mg/L de Biotina; 1,0 mL de Solução de elementos-traço) incubado sob agitação de 150 rpm e mantido à 28°C, por 7 dias. Posteriormente os líquidos metabólicos foram filtrados e os extratos utilizados para determinação da atividade proteásica utilizando azocaseína (1% em tampão Tris-HCL 0,1M, pH 7,2) como substrato, em espectrofotômetro no comprimento de onda 440nm. A concentração proteica dos extratos foi determinada utilizando o kit comercial da Thermo Scientific. Foi verificado que *A. terreus* URM 3571 apresentou maior potencial para atividade proteolítica, com atividade 1,47 vezes maior (116 U/mL) do que a média das outras amostras estudadas. O *A. terreus* URM 3571 apresentou também elevada concentração de proteínas totais (0,372 mg/mL) o que propiciou uma atividade específica de (311,82 U/mg). De acordo com os resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que *A. terreus* URM 3571 apresentou maior potencial para produção de proteases, indicando ser promissor para uso em processos industriais.

Palavras-chaves: Proteases, *Aspergillus terreus*, Fermentação submersa, Seleção**Agência Fomento:** CAPES; FACEPE

ANEXO III

Resumo Apresentado na XI Reunião Nordeste da SBBq

XI Reunião Regional Nordeste da SBBq

4th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology

Partitioning Study of a Commercial Lovastatin in Aqueous Two Phase System PEG/Phosphate

Oliveira, M.C.L. de^{1,2}; Paulo, A.J.²; Oliveira, C.M.F.²; Lima, C.A.^{2,3}; Lima-Filho, J.L.²; Porto, A.L.F.^{2,4}

¹Departament of Molecular Sciences, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), PE – Brazil; ²Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), PE – Brazil; ³University of Pernambuco; ⁴Departament of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), PE – Brazil.

Lovastatin is a fungal secondary metabolite produced by several filamentous fungi via the polypeptide synthase pathway. It is a pharmaceutically important compound in treating hypercholesterolemia because of its potent inhibitory activity toward 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, which catalyses the rate-limiting step in cholesterol biosynthesis. Thus, the objective of this study was to evaluate the variables that affecting the partitioning of a commercial lovastatin in PEG/phosphate aqueous two-phase system using statistical design. To plan the experimental tests and evaluate the corresponding results, a 2⁴ full factorial design was employed, for which PEG molar mass (M_{PEG}), PEG concentration (C_{PEG}), phosphate concentration (C_{PHOS}) and the pH were selected as independent variables, while the partition coefficient (K_p) was selected as response. The analysis of the 2⁴ full factorial design data showed that M_{PEG} had a significant positive main effect on K_p , suggesting that an increase in this parameter values would improve the lovastatin partition to the top phase. A significant negative interaction between M_{PEG} and C_{PHOS} was also observed, suggesting that an increase in the M_{PEG} levels with a simultaneous decrease in the C_{PHOS} levels led to an improvement in K_p . The partition coefficient was >1 in almost all the runs, which indicates that the lovastatin preferentially partitioned to the top phase. The results of this preliminary study demonstrate that the selected ATPS is satisfactorily selective for the extraction of such a lovastatin.

Wordkeys: Lovastatin, Partition, Fungal Metabolite

Acknowledgements: Farmácias Roval

Supported by: CAPES, FACEPE