

Las estatinas: Actividad biológica y producción biotecnológica

Statins: Biological activity and biotechnological production

*Carolina Chegwin-Angarita**, *Ivonne J. Nieto-Ramírez***,
*Lucía Atehortúa****, *Liuda J. Sepúlveda A.*****

Resumen

Las estatinas de tipo I son metabolitos fúngicos de gran interés no sólo por su efecto hipocolesterolemia sino por el número de efectos pleiotrópicos que presentan. El papel de las estatinas en la reducción de lípidos en la sangre está ampliamente documentado. En la actualidad, los estudios clínicos han puesto en evidencia que las estatinas impactan positivamente en varios órganos y en diferentes estados de algunas enfermedades, independientemente de la reducción en los niveles de colesterol. Exhiben efecto antiinflamatorio, antioxidante y acción inmunomoduladora, lo que les confiere potencial impacto terapéutico en el tratamiento de varias enfermedades. Estudios recientes las posicionan como antirretrovirales, impidiendo la replicación del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH). El hecho de que generan pro-apoptosis, inhibición en el crecimiento y respuesta a favor de la diferenciación de las células neoplásicas de diversos orígenes, las hace útiles en el tratamiento de leucemia, cáncer de mama, cáncer colo-rectal, de pulmón, de próstata y de páncreas. No se deben dejar de lado los efectos benéficos sobre el metabolismo óseo, gracias a su asociación con el aumento en la densidad mineral ósea y el efecto protector contra el Alzheimer y otros tipos de demencia, posiblemente debido a su participación en la relación entre el β -amiloide y los niveles de colesterol.

La necesidad de su producción en cantidades apreciables, ha llevado a los biotecnólogos a la optimización de los procesos biotecnológicos en busca de un mejor rendimiento y de tiempos más cortos de obtención, encontrando resultados tan valiosos como que si se obtienen a partir de basidiomicetos, se eliminan los problemas que se generan con las toxinas de los micromicetos. Estos procesos corresponden a fermentaciones, bien sea en estado líquido (FEL) o en estado sólido (FES), siendo la FEL la más utilizada. Si bien la biosíntesis de las estatinas está íntimamente ligada tanto al hongo como a la cepa del mismo, la composición de los medios de cultivo, la aireación, la morfología del pellet, la agitación, el tipo del proceso fermentativo, el pH, la temperatura, el uso de luz, el tipo de inóculo y del proceso, son variables determinantes para la optimización de la producción biotecnológica de estos bioactivos.

Estudios comparativos ponen de manifiesto que en algunas ocasiones la FEL presenta ventajas sobre la FES, incluyendo mayor y más rápida obtención del producto. Sin embargo, la producción de lovastatina mediante FEL presenta dificultades y limitaciones ya que son muchas las variables del proceso que se requieren controlar.

En esta revisión se presentan los resultados más relevantes reportados en los últimos 12 años, relacionados con los dos campos, las bioactividades y la biotecnología de la producción de las estatinas tipo I.

Palabras clave: Inhibidores de HMG-CoA reductasa, cultivo de hongos, bioactividad.

* Magister en Ciencias – Química. Estudiante de Doctorado en Ciencias Química. Docente Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. A.A. 14490. Bogotá Colombia. E-mail: cchegwina@unal.edu.co.

** Doctor en Ciencias. Docente Departamento de Química Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. . A.A. 14490. Bogotá Colombia. E-mail: ijnietor@unal.edu.co

*** Magister en Ciencia. Doctor en Ciencias Biológicas y Naturales. Postdoctor en Biodiversidad, Biotecnología y Bioindustria Docente Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Antioquia. A.A. 1226. Medellín Colombia. E-mail: latehor@gmail.com.

**** Química Farmacéutica. Estudiante de Maestría en Biología. Universidad de Antioquia. A.A. 1226. Medellín Colombia. E-mail: liudayohana@gmail.com.

Abstract

Statins of type I are fungic metabolites of great importance not only by its hypocholesterolemic but also by its number pleiotropic effects that they show. The role of statins in the reduction of lipids in the blood is broadly reported. Currently, clinic surveys have put into evidence that statins both impact in a positive manner on several organs and in different stages of some diseases, regardless of the cholesterol reduction levels. They show an anti-inflammatory effect, anti-oxidant, and immune modulator action, which give them a therapeutic potential in the treatment of several diseases. Recent studies place them as anti-retrovirus avoiding the replication of the human immunodeficiency virus (HIV). The fact that they generate pro-apoptosis, inhibition on growing, and an favorable effect of the neo-plastic cell differentiation of diverse origins make them useful in the leukemia treatment, breast-cancer, colorectal, lung cancer, prostate cancer, and pancreas cancer. The beneficial side effects on bone metabolism should not be left aside due to its association with the increase of bone mineral density, the protector effect against Alzheimer and other types of dementia, possibly due to its participation in the relationship between β -amyloid and the cholesterol levels.

The need of its production at large amounts has led biotechnologists to the optimization of biotechnology processes seeking for a better performance on short-time processing; finding results as worth as those obtained from basidiomycetes, eliminating the problems generated by the toxins in the micromycetes. These processes correspond to fermentations whether in liquid state or in solid state solid being the former the most used. Even though biosynthesis of statins is deeply linked as much to the fungus as to the strain of the same, the composition of the culture, aeration, pellet's morphology, agitation, fermentation processing type, pH, temperature, light, inoculation type, are determinant variables to the optimization of biotechnological production of these bio-actives.

Comparative studies show that sometimes, solid state fermentation (SSF), present some advantages over liquid state fermentation (LSF) with both a greater amount and fast processing of the product. However, the lovastatin production through SSF present difficulties and limitations as much as there many variables of the process that required to be controlled.

In this review are presented the most relevant results in the latest 12 years, related with both fields, bio-actions, and the biotechnology of the production of statins type I.

Keywords: HMG-CoA reductase inhibitors, *fungi* growing, bioactions.

Recibido: abril 24 de 2012

Aprobado: noviembre 28 de 2012

Introducción

Las estatinas son un grupo de compuestos bioactivos inhibidores de la HMG-CoA reductasa, utilizados para disminuir el colesterol en pacientes que padecen de hipercolesterolemia y que presentan, por tanto, un mayor riesgo de desarrollar arteriosclerosis y de sufrir episodios de patología cardiovascular.

De reciente aparición, fueron en un principio aislados de hongos micromicetos del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Monascus* (Chan *et al.*, 1983), pero actualmente se sabe que también algunos macromicetos las producen. En términos generales, su procedencia ha llevado a su clasificación en dos grupos: las naturales ó generadas desde procesos fermentativos conocidas como las estatinas tipo I (figura 1), y las sintéticas ó de tipo II (figura 2) (Istvan, 2003).

Actividad biológica de las estatinas

Cerca de 25 millones de personas alrededor del mundo son tratadas con estatinas, y se estima que 5 años de tratamiento han evitado 35 eventos coronarios serios por cada 1000 pacientes en prevención secun-

daria, y 24 de cada 1000 pacientes en prevención primaria. El papel de las estatinas en la reducción de lípidos en la sangre está ampliamente documentado (Almuti *et al.*, 2006). Sin embargo, los estudios clínicos han puesto en evidencia que las estatinas además pueden impactar positivamente en varios órganos y en diferentes estados de algunas enfermedades, independientemente de la reducción en los niveles de colesterol (Soubrier, 2006). Este comportamiento permitió introducir el concepto de "efecto pleiotrópico". Las estatinas no inhiben solamente la síntesis de colesterol sino también un número importante de intermediarios isoprenoides como es el caso del farnesilpirofosfato y el geranilgeranilpirofosfato, los cuales son intermediarios importantes de los lípidos para la producción de moléculas de señalización intramolecular (Barrios-González y Miranda, 2010). Estas moléculas tienen un significativo efecto biológico y pueden estar relacionadas con los usos de las estatinas en el tratamiento de pacientes con cardiopatías y cardiomiopatías crónicas, en la reducción de la incidencia de accidentes cerebrovasculares, siendo la acción en este último caso debida posiblemente a un efecto directo en el aumento de las funciones endoteliales y a la reducción en mar-

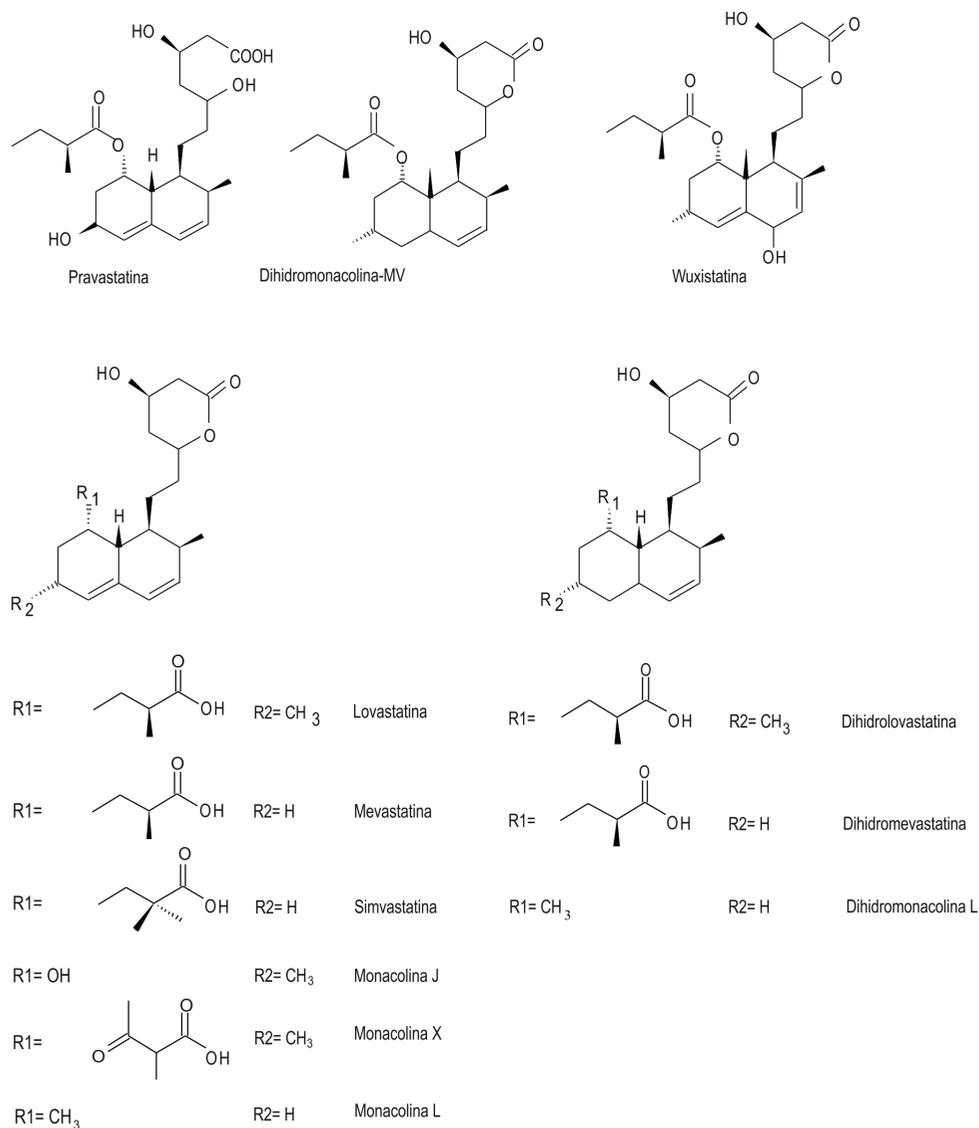


Figura 1. Estructuras de las diferentes estatinas tipo I.

cadres inflamatorios asociados con el aumento del riesgo de accidentes cerebrovasculares (Endres, 2006; Rohilla *et al.*, 2011).

Los efectos pleiotrópicos de las estatinas pueden explicarse también con base en los pasos metabólicos de L-mevalonato: mientras que algunos de los metabolitos están directamente involucrados en la síntesis de colesterol, otros impactan numerosos sistemas biológicos como se puede observar claramente en la figura 3 (Barrios-González y Miranda, 2010).

Si bien Barrios-González y Miranda, como lo indican en la figura 3, mencionan una disminución de la apoptosis, en estudios recientes (Cafforio *et al.*, 2005; Goc *et al.*, 2012) se confirmó la acción pro-apoptótica de

las estatinas, determinando que inducen apoptosis en cáncer de próstata en células (PC3 y LNCaP), coincidiendo con lo obtenido por Roy *et al.* en 2011, quienes reportan que investigaciones bioquímicas en ensayos *in vitro* corroboran el efecto positivo de las estatinas en la inhibición de la proliferación celular, inducción de la apoptosis y decrecimiento en la migración celular (Roy *et al.*, 2011).

Efecto hipocolesterolémico

El colesterol es un componente esencial de las membranas celulares y un precursor de varias hormonas, sales biliares y vitaminas, sin embargo, su presencia en altos niveles repercute en mayores riesgos del pade-

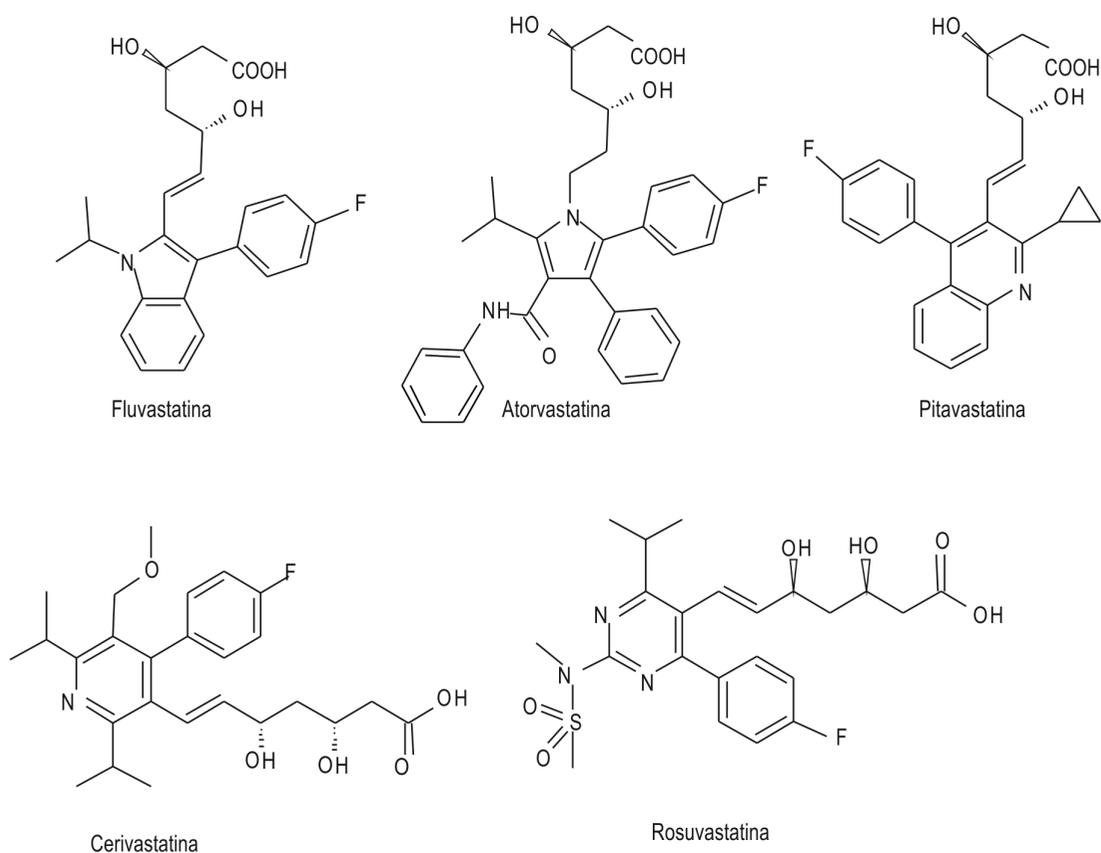


Figura 2. Estructuras de las diferentes estatinas tipo II.

cimiento de enfermedad coronaria. Niveles elevados de colesterol resultan en el depósito del mismo en el endotelio.

Las estatinas, desde su introducción hacia 1980, son los más efectivos de todos los agentes hipocolesterolémicos y tienen pocos efectos adversos comparados con los producidos por otras fármacos (Erturk *et al.*, 2003), como es el caso del ácido nicotínico del cual el efecto más prominente es la vasodilatación cutánea acompañada de alteraciones gastrointestinales, hiperuricemia, hiperglicemia y disfunciones hepáticas. La Colestiramina, una resina intercambiadora de aniones, actúa por enlazamiento de los ácidos biliares con el lumen intestinal, interfiriendo así en su reabsorción, promoviendo su excreción fecal y por tanto estimulando la síntesis de ácidos biliares, lo que conlleva a un aumento en los requerimientos de colesterol en el hígado, causando una elevación de la actividad de la HMG-CoA reductasa hepática. La Neomicina es un agente efectivo para disminuir los niveles de colesterol en pacientes con hipercolesterolemia familiar, actúa por precipitación del colesterol dentro del tracto intestinal inhibiendo así su absorción. Dentro de los

efectos colaterales se presentan náuseas y diarrea, lo que limita su administración durante largos periodos de tiempo. De esta forma, ninguno de los fármacos disponibles hasta 1970 podía ser considerado como el agente ideal para disminuir los niveles de colesterol (Endo, 1992). Las estatinas disminuyen considerablemente los niveles de colesterol LDL en animales y humanos, sin producir mayores efectos colaterales, por lo que a estos metabolitos fúngicos se les ha considerado como efectivos y seguros agentes reductores de los niveles de colesterol en un rango que varía desde el 15 al 40% y que, en combinación con secuestrantes de ácidos biliares, pueden alcanzar una reducción hasta del 60% (Endo, 1992).

Actividad Antiinflamatoria

El reconocimiento de la importancia de los procesos inflamatorios en la patogénesis de la aterogénesis ha cobrado gran relevancia y al parecer las estatinas exhiben un efecto antiinflamatorio, demostrado por ensayos clínicos. Después de 5 años de tratamiento con pravastatina en pacientes que habían sufrido infarto

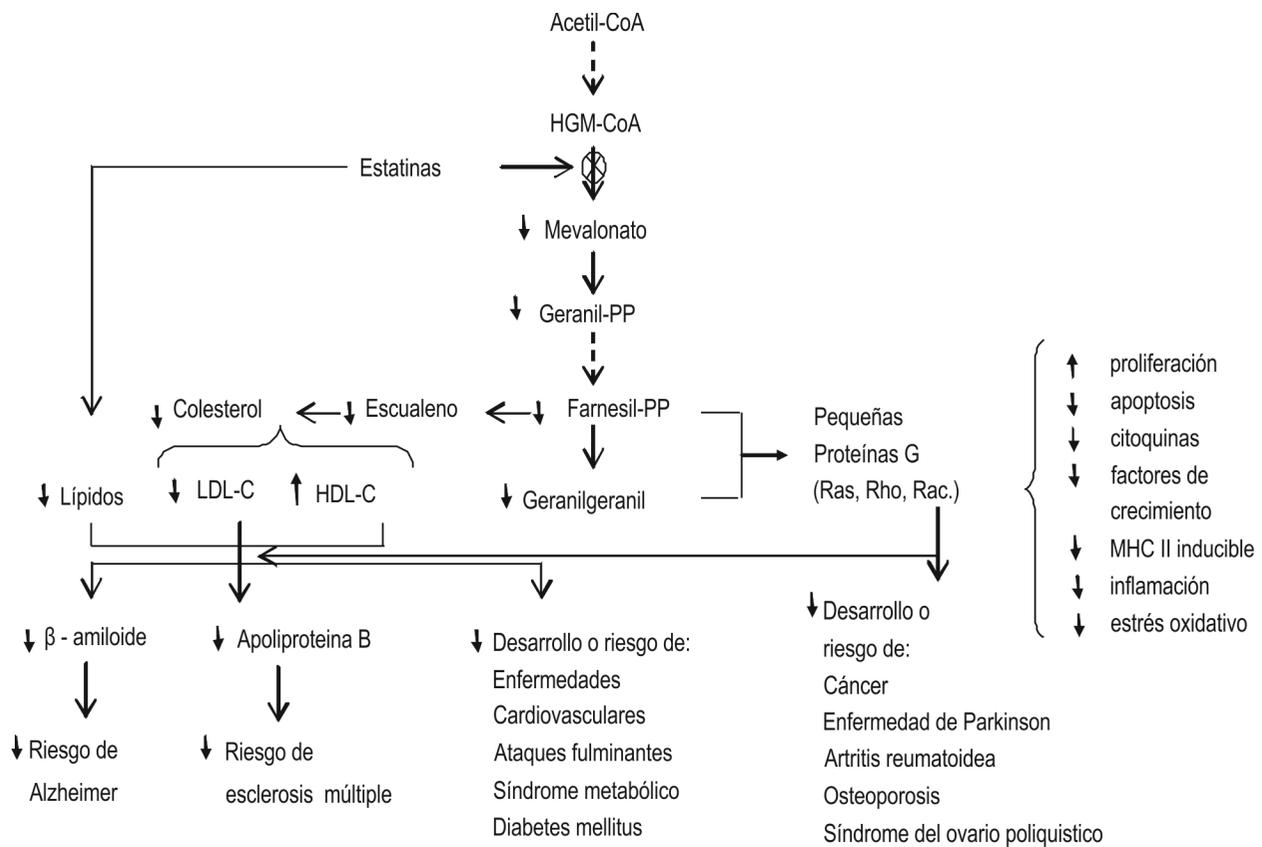


Figura 3. Modelo explicativo de la variedad de efectos biológicos de las estatinas: sus usos actuales y potenciales. La inhibición de la HMG-CoA reductasa no reduce únicamente los niveles de colesterol, sino también los intermediarios isoprenoides, afectando las prenilación de proteínas G. Esto puede resultar en la modulación de señales de transducción desde receptores a la expresión del gen, afectando directamente el balance proliferación/apoptosis, las quimioquinas inflamatorias y los mensajes citogénicos mediados por las proteínas G (Barrios-González y Miranda, 2010).

al miocardio, se observó la reducción en sangre de la proteína C-reactiva altamente sensible (hs-CRP), un importante marcador de inflamación, efecto que se produce independientemente de los niveles de lípidos (Almuti *et al.*, 2006).

Estudios *in vivo* han demostrado que las estatinas pueden reducir la secreción de las interleuquinas proinflamatorias IL-6 e IL-1 β pero no la TF- α , las quimioquinas IL-8, IP-10 y MCP-1, así como el importante regulador CD40, observaciones que soportan los estudios recientes en humanos que sugieren que las estatinas reducen el número de células inflamatorias en las placas de ateroma (Veillard y Mach, 2002).

Efecto Inmunomodulador

Existe un importante número de enfermedades autoinmunes mediadas por Th1, dentro de las que se incluyen esclerosis múltiple, artritis reumatoidea, lupus eritema-

toso sistémico, psoriasis y diabetes mellitus tipo 1, sobre las cuales las estatinas tienen un potencial impacto terapéutico (Endres, 2006). Francois Mach (2002) fue el primero en describir los efectos inmunomoduladores de las estatinas. Una serie extensa de datos *in vivo* en varios modelos inflamatorios, permiten visualizar la participación de las estatinas en la modificación de las funciones endoteliales, sugiriendo que el efecto puede deberse a un potencial inmunomodulador, lo que soporta la hipótesis de que las estatinas pueden ser protectoras contra el desarrollo de artritis reumatoidea. Una respuesta buena a moderada se observó en el 31% de los pacientes tratados con atorvastatina comparados con el 10% en el grupo de placebo. La evidencia sugiere que las estatinas pueden ser consideradas para el tratamiento en pacientes con artritis reumatoidea severa y un perfil de riesgo cardiovascular poco favorable. Sin embargo, se requieren mayores estudios para confirmar definitivamente la seguridad

de las estatinas en estos pacientes (Barrios-González y Miranda, 2010).

Con respecto a la esclerosis múltiple, ésta es una enfermedad crónica inflamatoria desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) que causa un deterioro neurológico recurrente y progresivo. Está considerada como una enfermedad autoinmune y la mayoría de los medicamentos que en la actualidad se emplean para su tratamiento tienen algunas limitaciones ya que algunos son parenterales y solo parcialmente efectivos con significativos efectos colaterales. En la actualidad existen modelos que han permitido conocer información importante acerca del mecanismo de las estatinas en enfermedades autoinmunes del SNC, encontrando evidencia sobre la posible afectación en los pasos de la cascada patogénica de la esclerosis múltiple: activación de las células T, entrada de leucocitos en el SNC y supresión de varios mediadores de inflamación (Stüve *et al.*, 2003).

Actividad Antioxidante

Rikitake *et al.*, mencionado por Almuti *et al.*, (2006), estudiaron los efectos antioxidantes de la fluvastatina *in vitro* y en modelos animales. La fluvastatina decrece la susceptibilidad de LDL a la oxidación y previene el aumento en la producción de superóxido, un radical libre en parte responsable de la alteración de la relajación derivada del endotelio en pacientes hipercolesterolémicos. La evidencia de este efecto antioxidante se ha demostrado únicamente con la fluvastatina y parece ser característica de este fármaco.

Las estatinas desempeñan un papel importante en la arteriosclerosis, actuando como un antioxidante para prevenir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad durante condiciones de estrés oxidativo. Korantzopoulos, citado por Dhale *et al.*, (2007) reportó que el efecto antioxidante de las estatinas podría extenderse más allá de la arterioesclerosis, con un potencial beneficio para la fibrilación auricular y la falla coronaria. Con base en esta hipótesis, los autores realizaron una extracción bio-guiada, específicamente hacia la actividad antioxidante por la eliminación de radicales libres, de un extracto metanólico de *Monascus purpureus*, identificando en el extracto previamente purificado la dihidrolovastatina-MV como el responsable de la bio-actividad. Más recientemente, se evaluó el efecto antioxidante de rosuvastatina, pravastatina, lovastatina, simvastatina y atorvastatina sobre los niveles de peroxidación lipídica y las especies de radicales libres, encontrando que la lovastatina (93%) y la simvastatina (96%) tienen una acción significativa comparada

con las otras estatinas estudiadas (Puttananjaiyah *et al.*, 2011).

Estatinas y Cáncer

Investigaciones sobre el cáncer indican que la incidencia de aparición de la enfermedad se ha reducido en pacientes que toman estatinas. El Air Force Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS) encontró un decrecimiento significativo en la incidencia de nuevos melanomas al evaluar la eficacia de la lovastatina en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Una reducción en el número de muertes por cáncer se presentó en pacientes sometidos a largos tratamientos con estatinas para la prevención de eventos cardiovasculares. Adicionalmente, estudios observacionales recientes han puesto de manifiesto grandes reducciones en el riesgo de cáncer (20-55%) en sitios específicos (colo-rectal, mamas, próstata, pulmones y páncreas) con el uso de terapias con estatinas (Barrios-González y Miranda, 2010). Específicamente, en relación al cáncer de próstata, su uso está asociado con un menor riesgo de padecerlo, incluso el clasificado de alto grado, lo que sugiere un efecto protector contra este tipo de enfermedad (Tan *et al.*, 2011). Las estatinas han mostrado supresión tumoral *in vivo* por inhibición de la síntesis de compuestos isoprenoides no esteroideos (Sayyad *et al.*, 2007).

Sassano y Platania (2008) publicaron una mini revisión en donde detallan el papel de las estatinas en la supresión tumoral, destacando los numerosos estudios que en los últimos años han demostrado que las estatinas generan pro-apoptosis, inhibición en el crecimiento y respuesta a favor de la diferenciación de las células neoplásicas de diversos orígenes. Adicionalmente se han identificado varias vías celulares que son activadas por las estatinas, caracterizándose los mecanismos claves en la generación de sus efectos antitumorales. Los autores mencionan ampliamente el papel de las estatinas en leucemia, en cáncer de mama, cáncer colorectal, de pulmón, de próstata y de páncreas, resaltando igualmente las recientes pruebas que conllevan a determinar que las estatinas presentan efectos antitumorales *in vivo* e *in vitro* contra otros tipos de tumores malignos, suprimiendo el crecimiento de las células del mieloma múltiple, potenciando la actividad de los diferentes agentes antimieloma y reversión de la multiresistencia a fármacos de células de mieloma *in vitro*. Así mismo, han demostrado tener actividad *in vitro* contra células de melanomas malignos, cáncer de tiroides, osteosarcoma, glioma, meduloblastoma y cáncer oral (HsuPan, 2012).

Reumatología y estatinas

La evidencia sugiere que las estatinas pueden tener efectos benéficos sobre el metabolismo óseo. Von Stechow *et al.*, (2003) mencionan que el protagonismo de las estatinas en la formación de los huesos fue demostrado por primera vez por Mundy en 1999. Existen cinco estudios en humanos sobre el riesgo de padecer fracturas, pero sus resultados son conflictivos con decrecimientos del 32%, del 45% y del 50%. Si sólo se consideran fracturas de cadera, el decrecimiento es impresionante (88%), pero otros autores encontraron que no hay reducción. Las estatinas están asociadas con un aumento en la densidad mineral ósea, aunque esta tendencia no se ha conservado en otras investigaciones. Los autores concluyen, que si bien algunos estudios experimentales han demostrado que las estatinas ejercen efectos favorables sobre el metabolismo óseo, los estudios clínicos arrojan resultados ambiguos que no proporcionan una base sólida para recomendar el uso de las estatinas en el tratamiento de la osteoporosis (Von Stechow *et al.*, 2003). La simvastatina, mevastatina, fluvastatina y lovastatina han exhibido estimulación en la formación de huesos. Sin embargo, hasta el presente no se ha establecido su mecanismo de acción (Barrios-González y Miranda, 2010). Con respecto a pacientes que refieran dolor muscular o dolor difuso, los reumatólogos pueden considerar la terapia con estatinas como posible causante (Von Stechow *et al.*, 2003).

Proteinuria y estatinas

La reputación de las estatinas se ha visto empañada como consecuencia de algunos reportes de miotoxicidad y más recientemente observaciones de proteinuria. El aumento de la incidencia de esta patología con el empleo de rosuvastatina, despertó la preocupación en la comunidad médica y planteó varias preguntas sobre el papel de las estatinas en los riñones. Se han propuesto diversas hipótesis sobre el mecanismo de la proteinuria inducida por estatinas, en relación con los múltiples efectos que tienen en sí estos medicamentos y que son independientes de la reducción del colesterol. Sin embargo, la proteinuria asociada a la rosuvastatina es transitoria y reversible, e incluso a dosis altas no afecta la función renal después de un tratamiento prolongado. Los autores concluyen que la asociación rosuvastatina - proteinuria es un efecto de menor importancia que tiene una incidencia baja, pero esta afirmación debe ser confirmada por la realización de pruebas más rigurosas (Tiwari, 2006).

Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y estatinas

La sepsis ocurre cuando el sistema inmune responde a una infección localizada a nivel sistémico provocando daños en los tejidos y disfunción orgánica. Los datos más recientes, provenientes de estudios en animales, sugieren que la administración de estatinas antes de una sepsis inducida reduce la morbilidad y mejora la supervivencia. Datos limitados en humanos, apuntan a la reducción de mortalidad en pacientes con bacteremia y un menor riesgo de sepsis en pacientes con infecciones bacterianas simultáneas cuando toman estatinas. Los autores mencionan que el escenario está listo para los ensayos clínicos (Terblanche *et al.*, 2006; Kouroumichakis *et al.*, 2011).

Estatinas y Alzheimer

Recientes reportes epidemiológicos sugieren que las estatinas ejercen un efecto protector contra el Alzheimer y otros tipos de demencia. La demencia es un síndrome de naturaleza progresiva y crónica que causa múltiples disturbios en las funciones corticales superiores. El Alzheimer está relacionado con el efecto del β -amiloide, un péptido que se acumula en el cerebro, causando neurotoxicidad y neurodegeneración. Estudios clínicos y experimentales sugieren que hay una relación patofisiológica entre β -amiloide y los niveles de colesterol. Los autores mencionan un estudio en el que se encontró que la prevalencia de padecer Alzheimer en pacientes que toman estatinas para reducir sus niveles de colesterol, es 60% menor que el de los pacientes que toman otros medicamentos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Liao y Laufs, 2005).

En el 2009, un reporte describe el papel del colesterol en la patogénesis del Alzheimer y explora cómo las estatinas pueden influenciar su balance, presentando una revisión de los tratamientos epidemiológicos y clínicos con estatinas en demencia y Alzheimer, pero haciendo énfasis en que no se ha establecido un efecto similar en estudios prospectivos de cohorte ó en tratamientos clínicos (Kandiah y Feldman, 2009).

Las estatinas en pacientes quirúrgicos

Este tema es analizado concienzudamente por Gajendragadkar *et al.*, (2009) en donde los autores introducen la relevancia quirúrgica de las estatinas en cuatro puntos específicos: el efecto vasomotor, el efecto coagulante, la modulación de la respuesta inflamatoria y la estabilización de la placa aterosclerótica. Con respecto al efecto vasomotor, las estatinas prolongan la

actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) produciendo vasodilatación. Los animales exhiben mejor relajación coronaria si son tratados con estatinas, a pesar de que no hay diferencia en el colesterol versus el placebo. También, se ha encontrado que la vacunación contra *Salmonella typhi* y a corto plazo la administración de pravastatina, aumentan el flujo sanguíneo cerebral medido por Doppler transcraneal en adultos sanos.

Las estatinas decrecen la agregación plaquetaria independientemente de los niveles de las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C). Las estatinas incrementan el activador tisular del plasminógeno (tPA) e inhiben el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI)-1, favoreciendo así la fibrinólisis.

En términos generales, los autores concluyen que las estatinas son seguras, bien toleradas y que tienen una variedad de efectos útiles en cirugía además de reducir los niveles del colesterol. El avance en la investigación sobre el uso perioperatorio de estatinas en muchos tipos de cirugía vascular, muestra sus bondades pero se recomienda que los pacientes inicien la toma de estatinas antes de la cirugía, principalmente por ser una población en alto riesgo de eventos cardiovasculares. Sin embargo, se hace énfasis en la necesidad de realizar más estudios para aclarar los regímenes de dosis exactas y los horarios de la administración de estatinas

en los pacientes perioperatorios (Gajendragadkar et al., 2009).

En lo referente a la reconstrucción en cirugía oncológica de cabeza y cuello, la transferencia de tejido microvascular libre es el procedimiento estándar. Varios agentes farmacológicos se emplean para aumentar las proporciones de éxito de esta cirugía, pero no hay un consenso del medicamento ideal. Las estatinas por sus efectos pleiotrópicos como son la preservación del tono vascular, las propiedades anticoagulatorias y antiinflamatorias, son muy útiles en las cirugías de colgajos libres. El estudio de Karsenti et al., (2010) da luces de los beneficios de las estatinas para aumentar las proporciones de éxito de este tipo de cirugías. Ellas deben ser incluidas en las estrategias perioperatorias especialmente en pacientes con factores de riesgo cardiovasculares. Los autores presentan un protocolo para el tratamiento de los pacientes que van a ser sometidos a procedimientos quirúrgicos, definiendo como tiempo óptimo de inicio dos semanas antes de la cirugía, con una dosis de 40 mg de atorvastatina por un periodo que debe ser establecido dependiendo de la evolución del paciente.

Tratamiento contra el SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida)

Del Real et al., (2004) demostraron que las estatinas son capaces de actuar como antirretrovirales, impi-

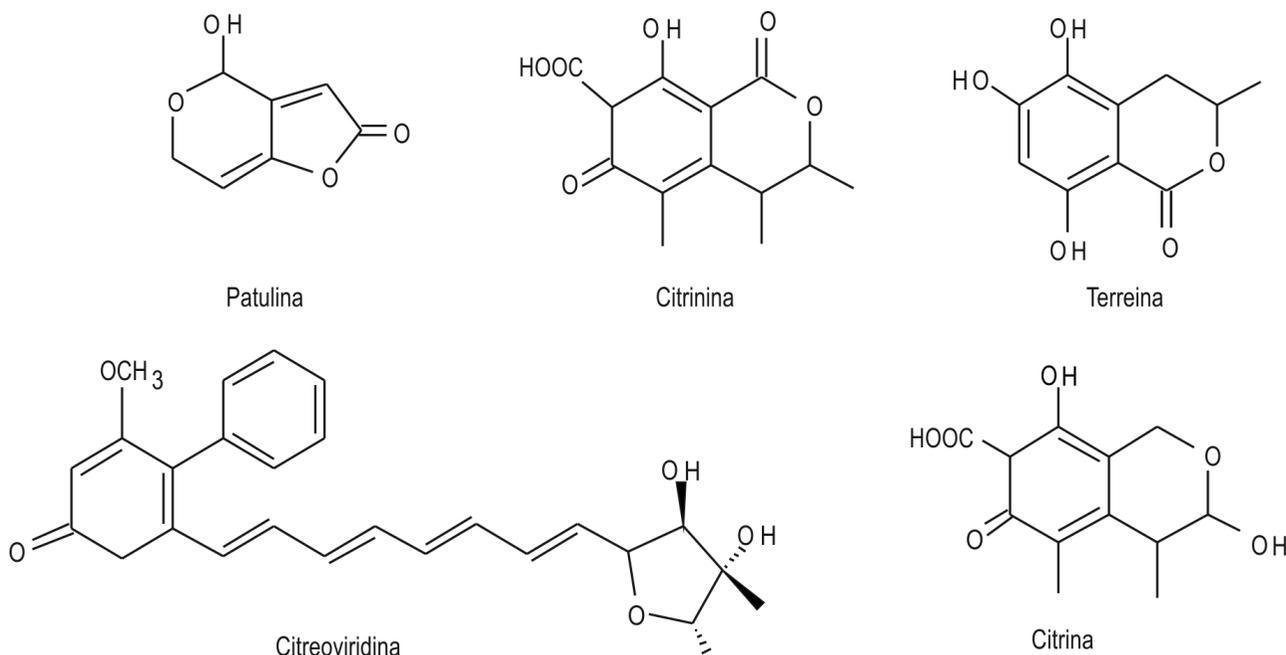


Figura 4. Compuestos tóxicos generados por *Aspergillus terreus* y *Monascus* spp.

diendo la replicación del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) en la célula. Lo más significativo de su estudio es que un mes de tratamiento con estatinas es suficiente para disminuir la carga viral del VIH en pacientes seropositivos (portadores del VIH). Desde el punto de vista clínico, este hallazgo supone un avance muy importante para el establecimiento de nuevas terapias contra el SIDA que sean más económicas, sencillas, menos tóxicas y que además no produzcan fármaco-resistencia. La identificación del mecanismo preciso mediante el cual las estatinas impiden que el VIH infecte las células humanas abre una novedosa vía de investigación para futuras terapias contra el virus del VIH basadas en la regulación del citoesqueleto.

Procesos biotecnológicos

Las estatinas de tipo I fueron descubiertas como producto del interés de un joven estudiante japonés llamado Akira Endo, quien desde su estancia en la Universidad Albert Einstein de Nueva York en 1965, se inclinó por la opción de intervenir en la vía biosintética del colesterol para reducir su concentración plasmática. A su regreso, hacia 1968 a Japón, Endo conjeturaba que determinados hongos, como mecanismo defensivo, producirían ciertas sustancias capaces de inhibir la síntesis bacteriana de esteroides y otros isoprenoides, lo que reduciría su capacidad de multiplicación y alteraría su funcionamiento al inhibir la síntesis de isoprenoides. En los laboratorios de Sankyo en donde se encontraba para esa época, desarrollaron un sistema experimental que permitió evaluar 6000 hongos en dos años hasta finalmente encontrar el *Penicillium citrinum* que contenía la mevastatina, un inhibidor competitivo de la biosíntesis del colesterol (Prieto, 2008). A partir de su descubrimiento, han aumentado de forma exponencial el número de publicaciones relacionadas con el aislamiento desde otras especies fúngicas de compuestos estructuralmente similares y con la optimización de las condiciones para la obtención biotecnológica de estos compuestos a partir de la fermentación de los microorganismos productores.

Especies de hongos y la producción de estatinas

En un principio, la producción de estatinas en el reino Fungi estuvo relacionada principalmente con hongos micromicetos filamentosos del género *Penicillium*, *Aspergillus* y *Monascus*, entre los cuales *Aspergillus terreus* y *Monascus ruber* son los mayores productores. En cuanto a los basidiomicetos Gunde-Cimerman *et al.*, (1993), luego de evaluar 380 cepas fúngicas de 50 géneros diferentes y 143 especies, cultivados por FEL,

encontraron que los basidiomicetos del género *Pleurotus*, especialmente las especies *P. ostreatus*, *P. saca* y *P. sapidus*, son fuentes promisorias de este tipo de compuestos. De igual forma, se ha reportado la presencia de los compuestos ML-236B (Mevastatina, Compactina) y/o de Monacolina K (Mevinolina, Lovastatina) en el extracto de los cultivos sumergidos de otros hongos como: *Pythium ultimum*, *Hypomyces chrysospermus*, *Paecilomyces sp*, *Eupenicillium sp*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Phoma sp*, *Doratomyces nanus* y *Gymnoascus umbrinus* (Endo *et al.*, 1986), *Acremonium chrysogenum*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma viridae* (Siamak *et al.*, 2003), *Biospora sp*, *Cylindrocarpon radícicola* (Osman *et al.*, 2011a).

Las especies del género *Aspergillus* han sido la fuente empleada por excelencia para la producción a nivel industrial de las estatinas, con los mayores rendimientos asociados a cepas mutadas, que pueden alcanzar títulos de lovastatina ≥ 2200 mg/L a los 12 días en fermentaciones tipo batch (Kumar *et al.*, 2000). Sin embargo, el producto obtenido no se puede usar directamente de su caldo de cultivo debido a la gran variedad de compuestos tóxicos generados por el microorganismo que incluyen terreína, patulina, citrinina y citreoviridina (Wasser y Reshetnikov, 2002) (figura 4), haciendo necesarios tediosos procesos de extracción y purificación (Chang *et al.*, 2002). Como alternativa, se han realizado procesos fermentativos en otras especies como el *Monascus ruber*, hongo no patogénico y frecuentemente utilizado en procesos alimentarios para generar aromas, color y mejorar la calidad nutricional de los productos de fermentación (Lin *et al.*, 2008). Una de las desventajas del proceso con *Monascus* es la producción concomitante de la citrinina, comúnmente asociada a una mayor producción de lovastatina, según el medio de cultivo utilizado y las condiciones de fermentación (Lee *et al.*, 2007), pero esta restricción ya está normalizada y los cultivos estandarizados, para lograr niveles de la toxina incluso inferiores a los permitidos. Durante los procesos de extracción y cuantificación de las estatinas producidas, es importante tener en cuenta que estas están asociadas en diferente grado tanto al micelio como al medio extracelular (caldo de cultivo) y que éste grado de asociación depende de la cepa y del tipo de estatina a recuperar. Manzoni *et al.*, (1998) determinaron para una cepa de *A. terreus* que el 83% de la lovastatina recuperada se asocia al micelio y un 17% se encuentra libre en el caldo, mientras para *Monascus paxii* estos valores son del 64% y 33%, respectivamente (Manzoni *et al.*, 1998). La pravastatina para las dos especies se asocia en proporciones muy similares tanto al micelio como al medio extracelular.

La producción de estatinas a partir de basidiomicetos elimina los problemas que se generan con las toxinas de los micromicetos, más aun si se tiene en cuenta que los productores por excelencia, las especies pertenecientes al género *Pleurotus*, son hongos comestibles. Con respecto a la acumulación del metabolito en el caldo o en el micelio, no se puede generalizar sobre su comportamiento. Gunde-Cimermann (1993) no separa el producto biotecnológico para hacer el estudio; Wasser y Reshetnikov (2002) mencionan que el metabolito no fue detectado en los filtrados del caldo de fermentación luego de la separación del micelio; El-Shami y Hamed (2007) reportan la presencia de lovastatina en el caldo de cultivo y Alarcón *et al.*, (2003) hicieron la determinación en los caldos filtrados pero no en el micelio obtenido por FEL. En este punto, es importante tener en cuenta que la acumulación de lovastatina en el micelio del hongos basidiomicetos como *Pleurotus ostreatus* está relacionada con el final de la fase exponencial del crecimiento, siendo menor en la fase estacionaria, mientras que en hongos filamentosos como *Aspergillus terreus* se ha asociado a la fase estacionaria, cuando las condiciones nutricionales no son favorables para el hongo (Manzoni *et al.*, 1998).

Factores que afectan la producción por FEL

En una fermentación de interés económico o científico, se deben controlar una serie de variables para lograr un efectivo conocimiento y por consiguiente una buena observación y manipulación del proceso, afectando estas condiciones tanto cualitativa como cuantitativamente los productos obtenidos. Estas fermentaciones se pueden realizar bien sea en estado líquido (FEL) o en estado sólido (FES), siendo las FEL o cultivos sumergidos las más utilizadas. Entre las variables evaluadas para la optimización de estos procesos, además de las cepas seleccionadas, están la composición de los medios de cultivo, la aireación, la morfología del pellet, la agitación, el tipo del proceso fermentativo, el pH y la temperatura, que son las variables que se han considerado más determinantes para la optimización de la producción de estatinas biotecnológicamente. La tabla 1 ilustra las diferentes variables de los bioprocesos investigados:

A. Medios de cultivo

Independientemente de la clase de fermentación empleada, un factor de gran relevancia que afecta la productividad del metabolito de interés, es la composición y el diseño del medio de cultivo utilizado (Lai *et al.*, 2003). Es así como, de la mayoría de los nutrientes presentes, son las fuentes de carbono y nitrógeno las que juegan un rol predominante en la productividad

de la fermentación debido a que están directamente relacionados con la formación de biomasa y metabolitos; además, la naturaleza y concentración de la fuente de carbono pueden regular el metabolismo secundario a través de fenómenos como la represión catabólica (López *et al.*, 2004a).

Los primeros medios de cultivo utilizados para la obtención de estatinas fueron medios complejos (sin una composición química definida), básicamente compuestos por una o dos fuentes de carbono, una o dos fuentes de nitrógeno y una solución de sales como fuente de macro y microelementos. Los componentes más comunes del medio de cultivo como fuente de carbono son glucosa (Endo, 1979), lactosa (Hajjaj *et al.*, 2001; López *et al.*, 2003) y glicerol (López *et al.*, 2003). Como fuentes de nitrógeno se prefieren las fuentes orgánicas como la peptona, el licor de maíz (Endo, 1979; López *et al.*, 2003), la harina de soya (Manzoni *et al.*, 1998; López *et al.*, 2003) y el extracto de levadura (López *et al.*, 2003). Otras fuentes de nitrógeno, como aminoácidos y sales que contienen iones amonio, pueden acidificar el medio y no son recomendables. Para la glucosa y el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de carbono y nitrógeno inorgánico respectivamente, se ha reportado un efecto represor sobre la producción de lovastatina (Hajjaj *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2003). Dentro de la solución salina es común encontrar KH_2PO_4 y K_2HPO_4 como reguladores del pH (Endo, 1979; Hajjaj *et al.*, 2001), además de otras sales inorgánicas que poseen cationes como amonio y magnesio, y los principales microelementos que incluyen Fe, Mn, Zn y Cu (Wasser y Reshetnikov, 2002).

Como la mejor fuente de carbono para la producción de lovastatina por *A. terreus* en FEL varios autores han propuesto la lactosa, frente a fuentes como glucosa, glicerol o sacarosa.

Con respecto a las fuentes de nitrógeno para las cepas de *Monascus ruber* han sido utilizadas principalmente fuentes de origen vegetal como la harina de soya (Endo *et al.*, 1985) y el licor de maíz (Endo, 1979), sin embargo, para la cepa *Monascus ruber* ATCC 18199 se encontró que sustituyéndolas por harina de arroz se alcanza una mayor productividad de lovastatina (131 mg/L) (Chang *et al.*, 2002).

Se ha establecido que condiciones de inanición en el medio favorecen la biosíntesis de lovastatina en *A. terreus* (López *et al.*, 2003; Osman *et al.*, 2011b) y en *Monascus pilosus* (Miyake *et al.*, 2006); particularmente cuando hay limitaciones en la asimilación de la fuente de carbono (Hajjaj *et al.*, 2001) o cuando la fuente de nitrógeno limita el crecimiento del hongo

Tabla 1. Variables estudiadas en los procesos fermentativos para optimizar la obtención de estatinas.

Variable estudiada	Especie	Referencia
Suplementación del medio de cultivo.	<i>Aspergillus terreus</i>	Bizukojc <i>et al.</i> , 2007; Jia <i>et al.</i> , 2010; Sorrentino <i>et al.</i> , 2010; Manzoni <i>et al.</i> , 1999
Composición del sustrato.	<i>Monascus ruber</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus flavipes</i> <i>Monascus ruber</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Penicillium patulum</i> <i>Penicillium brevicompactum</i> <i>Monascus purpureus</i>	Chang <i>et al.</i> , 2002 Lai <i>et al.</i> , 2002; Porcel <i>et al.</i> , 2008; PansuriyaSinghal, 2010; Valera <i>et al.</i> , 2005 Xu <i>et al.</i> , 2005 El-ShamiHamed, 2007 Atalla <i>et al.</i> , 2008 Shaligram <i>et al.</i> , 2008 Sayyad <i>et al.</i> , 2007
Cepas mejoradas, estabilización del inóculo, optimización de medios de cultivo, fermentación por lotes alimentados y por lotes, fuentes de carbono y nitrógeno.	<i>Aspergillus terreus</i>	Kumar <i>et al.</i> , 2000
Fuentes de carbono y nitrógeno.	<i>Aspergillus terreus</i>	Hajjaj <i>et al.</i> , 2001
Especímenes nativos y cultivados, diferentes cepas.	<i>Pleurotus</i>	Alarcón <i>et al.</i> , 2003
Composición del medio, características del pellet.	<i>Aspergillus terreus</i>	Lai <i>et al.</i> , 2003
Fuentes de carbono y nitrógeno (relación C:N) y método de inoculación.	<i>Aspergillus terreus</i>	López <i>et al.</i> , 2003
Contenido de oxígeno, concentraciones de C, N y P, tiempo de fermentación.	<i>Aspergillus terreus</i>	López <i>et al.</i> , 2004a
Adición de lovastatina.	<i>Aspergillus terreus</i>	López <i>et al.</i> , 2004b
Concentración de oxígeno disuelto, uso de fermentador o frascos agitados, diámetro del pellet, pH, temperatura,	<i>Aspergillus terreus</i>	Lai <i>et al.</i> , 2005
Regímenes de aireación y agitación sobre la morfología del pellet y la reología del caldo.	<i>Aspergillus terreus</i>	López <i>et al.</i> , 2005
Relación C:N.	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Alarcón y Águila, 2006
Fuentes de C y N.	<i>Monascus pilosus</i>	Miyake <i>et al.</i> , 2006
Condiciones de esporulación.	<i>Aspergillus terreus</i>	Porcel <i>et al.</i> , 2006
pH, composición del medio de cultivo.	<i>Monascus purpureus</i>	Lee <i>et al.</i> , 2007
Velocidad de agitación aireación, tamaño, cantidad y morfología del pellet.	<i>Penicillium citrinum</i>	Gomaa y Bialy, 2009
Temperatura, tiempo de fermentación, volumen del inóculo y pH.	<i>Monascus purpureus</i>	Panda <i>et al.</i> , 2009
Agitación, periodo de incubación, temperatura, pH inicial, composición del medio y aireación.	<i>Aspergillus terreus</i>	Osman <i>et al.</i> , 2011b

en el medio de cultivo y la fuente de carbono se encuentra en exceso durante la fase estacionaria. La relación C:N también desempeña un papel importante en la producción de este tipo de metabolitos. Con una relación C:N ~40 se obtiene una producción óptima de lovastatina, empleando fuentes de carbono complejas y lentamente metabolizables como la lactosa, que proporcionan un crecimiento lento, en combinación con una fuente de nitrógeno orgánica limitada en el medio, como harina de soya o extracto de levadura (López *et al.*, 2003). Cuando en el medio de cultivo la fuente de nitrógeno no es un factor limitante o se encuentra en exceso, se producen altas cantidades de biomasa pero bajos títulos de lovastatina (López *et al.*, 2004b). Para la cepa *Monascus pilosus* la mejor relación C:N es de 7-9, utilizando como fuente de nitrógeno peptona y como fuentes de carbono la combinación de maltosa (lentamente metabolizada para favorecer el metabolismo secundario) y glicerol (rápidamente metabolizada para favorecer el crecimiento celular) (Miyake *et al.*, 2006).

En los cultivos sumergidos de macromicetos, para las especies del género *Pleurotus* las fuentes de carbono empleadas incluyen una gran variedad de carbohidratos como pentosas, hexosas y polisacáridos, en una proporción que varía entre el 3 y 5% para proporcionar una alta cantidad de biomasa. Como fuente de nitrógeno se prefieren las fuentes orgánicas, que incluyen hidrolizado o extractos de levadura, peptona y licor de maíz, en un rango del 0.5-4% por peso dependiendo del contenido de nitrógeno en la fuente (Wasser y Reshetnikov, 2002).

Según la composición del medio de cultivo también se puede favorecer la síntesis de un tipo particular de estatina. Cuando el medio utilizado por Manzoni *et al.*, (1998) es suplementado con harina de soya hasta completar 30 g/L, y en el día 7 con 50 g/L de glicerol, se producen 244 mg de lovastatina por litro de medio de cultivo y bajo estas condiciones no hubo producción de mevastatina. Sin embargo, cuando la suplementación se realiza con harina de soya desgrasada, pero sin adición de glicerol como fuente de carbono extra, la biosíntesis se dirigió a la producción de mevastatina. Estos resultados sugieren que dependiendo de la composición del medio de cultivo la biosíntesis puede direccionarse a la producción preferente de la estatina de interés. El efecto de la fracción lipídica en el medio de cultivo, representada por la adición de harina de soya completa o desgrasada (la harina de soya completa contiene 22-24% de lípidos, mientras que la harina de soya desgrasada contiene sólo 0.5 - 1.5% de contenido lipídico), indica que la biosíntesis de estatinas como la lovastatina y pravastatina, se ve favorecida cuando el contenido de lípidos en el medio

de cultivo es bajo. Por el contrario, cuando la fracción lipídica en el medio de cultivo es significativa, la biosíntesis de estos dos metabolitos se ve disminuida y se acumulan otros intermediarios de la síntesis como mevastatina y monacolina. (Manzoni *et al.*, 1999).

Otros compuestos adicionados al medio de cultivo con la intención de aumentar la producción de estatinas, son los aminoácidos como la metionina (Lai *et al.*, 2003; Osman *et al.*, 2011b), cuya adición en proporción de 0,1 g/L del isómero D puro o en mezcla racémica, incrementa en un 20% la producción de lovastatina en *A. terreus* cuando se adiciona explícitamente a las 72 horas del cultivo (Lai *et al.*, 2003). Al parecer la metionina juega un papel fundamental como precursor en la síntesis de lovastatina, considerando el paso de metilación durante su biosíntesis. El efecto de la adición de vitaminas del complejo B ha sido también objeto de estudio, teniendo en cuenta que desde el punto de vista bioquímico son necesarios los co-factores de las enzimas nonácido sintetasas: la coenzima A y NADP reducido para la síntesis de la 4a,5-dihidromonacolina L, precursor de la lovastatina. Un medio deficiente de nitrógeno enriquecido con D-pantotenato de calcio, piridoxina o nicotinamida, ejerce un significativo efecto positivo sobre la síntesis de ácido mevinolínico a concentraciones que no exceden 1 mg/L (5 mg/L para piridoxina). Un efecto similar fue observado cuando se utilizó una mezcla comercial de vitaminas del complejo B compuesta por tiamina, rivoftavina, piridoxina, D-pantotenato de calcio y nicotinamida (Bizukojc *et al.*, 2007). Por otra parte, al suplementar el medio con lovastatina (100 mg/L) disminuyó en un 76.4% la producción de este metabolito, mientras que la adición de antibióticos policétídicos como tilosina, eritromicina, tetraciclina, daunorobina y rifamicina, incrementó entre el 20-25% su producción, destacándose particularmente la adición de tilosina en una concentración de 50 mg/L al inicio de la fermentación que conduce a un incremento del 42% en la producción de la lovastatina (Jia *et al.*, 2010). En un estudio del 2010 se utilizó la oxilipina, un precursor del ácido linoleico, con la hipótesis de que al ser una molécula de señalización y estar potencialmente implicada en la comunicación celular de hongos, se podría incrementar la producción de la lovastatina. Los resultados mostraron un aumento de 1,8 veces la producción de la estatina, lo que convierte a la oxilipina en un compuesto potencial para enriquecer la producción de metabolitos fúngicos con un impacto positivo en la industria (Sorrentino *et al.*, 2010). En la tabla 2 se encuentran resumidos los resultados de otras investigaciones relevantes relacionadas con los medios de cultivo empleados para producir estatinas por medio de FEL.

B. Técnicas de inoculación

Es común utilizar, previo a la etapa de producción del metabolito de interés, un medio de propagación celular, el cual tiene la función de proporcionar un inóculo más homogéneo y estable para la fase de producción.

Se parte, usualmente, de esporas para la obtención de un inóculo vegetativo con pellets esféricos de aproximadamente 1 mm de diámetro, con células desarrolladas y adaptadas al medio de cultivo que es rico en nutrientes. El medio de propagación celular más utili-

Tabla 2. Medios de cultivo utilizados para la producción de lovastatina por FEL.

Composición del medio	Hongo	Rendimiento	Bibliografía
(g/L): Glucosa (45), leche peptonizada (24), extracto de levadura (2.5), polietilenglicol (2.5mL).	<i>A. terreus</i> ATCC 74135	304 mg/L ^a	Hajjaj <i>et al.</i> , 2001
(g/L): Harina de arroz (34.4), peptona (10.8), glucosa (129.2), glicerol (26.4 mL/L), MgSO ₄ ·7H ₂ O 1 %p/v, KNO ₃ 0.2 %p/v.	<i>Monascus ruber</i> ATCC 18199	131 mg/L ^b	Chang <i>et al.</i> , 2002
(g/L): Dextrosa (50), peptona (0.5), extracto de levadura (1), (NH ₄) ₂ SO ₄ (2), K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (2), K ₂ HPO ₄ (2.5) y solución de elementos traza (10 mL).	<i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>ferulae</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	0.52 mg/g ^b 0.44 mg/g ^b	Wasser y Reshetnikov, 2002
(g/L): Lactosa (89.5), glicerol (30.2), peptona (6), glucosa (20), licor de maíz (10), harina de soya (4.2).	<i>Aspergillus terreus</i> cepa mutada	1050 mg/L ^c	Lai <i>et al.</i> , 2002; Lai <i>et al.</i> , 2003
(g/L): Lactosa (40), extracto de levadura (1.33), KH ₂ PO ₄ (1), MgSO ₄ ·7H ₂ O (1), NaCl (1) y solución de microelementos (1 ml).	<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542	250 mg/L ^a	López <i>et al.</i> , 2003
(g/L): Lactosa (114,26), harina de soya (5.41), KH ₂ PO ₄ (0.8), MgSO ₄ ·7H ₂ O (0.52 g), NaCl (0.4), Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O (2 mg), ZnSO ₄ ·H ₂ O (1 mg), biotina (0.04 mg) y solución de elementos traza (1 mL).	<i>Aspergillus terreus</i>	~ 230 mg/L ^a	López <i>et al.</i> , 2004a; López <i>et al.</i> , 2005
Peptona 3.8 %p/v, maltosa 1 %p/v, glicerol 7 %v/v, MgSO ₄ ·7H ₂ O (0.1 %p/v), NaNO ₃ (0.2 %p/v).	<i>Monascus pilosus</i> IFO5420 <i>Monascus pilosus</i> MK1	444 mg/L ^a 725 mg/L ^a	Miyake <i>et al.</i> , 2006
Arroz fermentado con raíces de <i>Dioscorea</i> (1 %p/p), etanol (0.5% v/v).	<i>Monascus purpureus</i> NTU 568	27.9 mg/g ^c	Lee <i>et al.</i> , 2007
(g/L) Glucosa (52.61), peptona (16.65), NH ₄ Cl (1), KH ₂ PO ₄ (1), extracto levadura (3), K ₂ HPO ₄ (1), KNO ₃ (0.5), MgSO ₄ ·7H ₂ O (0.2), MnSO ₄ ·H ₂ O (0.418), NaCl (0.5), CaCl ₂ ·2H ₂ O (0.1) FeSO ₄ ·7H ₂ O (0.001).	<i>Monascus purpureus</i> MTCC 369	97,5 mg/L ^c	Seraman <i>et al.</i> , 2010
(g/L): Almidón soluble (67.56), extracto de levadura (10), polietilenglicol (2.5), KH ₂ PO ₄ (2), (NH ₄) ₂ SO ₄ (1), tilosina (0.050).	<i>Aspergillus terreus</i> LA414	952.7 ± 24.3 mg/L ^a	Jia <i>et al.</i> , 2010
(g/L): Harina de avena (20), CH ₃ COONa (20), (NH ₄) ₂ SO ₄ (5), KH ₂ PO ₄ (2), urea (4.5), metionina (2.5), solución de elementos traza (10 mL).	<i>Aspergillus terreus</i>	188.3 mg/L ^c	Osman <i>et al.</i> , 2011b
Medio Czapek Dox	<i>Aspergillus sp.</i> cepa de colección	9,9 mg/l - 85,8 g/L ^c	Mangunwardoyo <i>et al.</i> , 2012

^a Medio agotado

^b Micelio

^c Mezcla de micelio y medio agotado.

zado es el de Alberts *et al.*, (1980) consistente básicamente de (g/L): pasta de tomate 40, glucosa 12, harina de avena 10, glucosa 10, licor de maíz 5 y 10 ml/L de una solución de elementos traza como fuente de macro y microelementos (Chen *et al.*, 1980; Gunde-Cimerman *et al.*, 1993; Novak *et al.*, 1997; Hajjaj *et al.*, 2001). Posterior a la obtención del inóculo vegetativo, se utiliza un medio para la formación del producto, compuesto básicamente por una o dos fuentes de carbono, una o dos fuentes orgánicas de nitrógeno y es común el acompañamiento de una solución de elementos traza; este medio de producción es siempre más pobre en nutrientes que el medio de propagación celular, debido a que su función principal es dirigir el metabolismo secundario del hongo hacia la biosíntesis de estatinas o sus precursores. Otros autores prefieren inocular directamente con hifas o esporas el medio de producción sin utilizar previamente un medio de propagación celular. Se ha reportado que el comportamiento de la fermentación no es afectado por el método de inoculación (hifas o esporas), sin embargo, se prefiere el uso de esporas que proporcionan un inóculo más consistente y cuantificable (López *et al.*, 2003). Además, debe tenerse en cuenta que al utilizar como inóculo esporas provenientes de cultivos viejos de no menos de 16 días de inoculación, se obtienen mayores títulos de lovastatina (Porcel *et al.*, 2006).

C. Tipo del proceso fermentativo

Para los procesos fermentativos se prefiere el uso de reactores sobre el cultivo convencional en matraces, debido a que en los primeros se pueden controlar las condiciones de aireación y agitación, siendo más comunes las fermentaciones tipo lote y las de tipo lote alimentado. Para estas últimas, se han obtenido mejoras hasta del 37% en la producción de estatinas respecto a la fermentación tipo lote, pero no así la productividad total del proceso. Correlacionado con lo anterior, no son recomendables más de dos alimentaciones debido a que se produce la autólisis de las células del cultivo microbiano, que se hace evidente cuando los pellets son improductivos, huecos y esféricos (Novak *et al.*, 1997). En las fermentaciones tipo lote alimentado discontinuas es ventajosa la combinación de dos fuentes de carbono para la producción de lovastatina comparado con fermentaciones en las cuales se utiliza un solo sustrato (Pecyna y Bizukojc, 2011). Se ha reportado además, que la acumulación durante la fermentación o adición de lovastatina al medio de cultivo, suprime su biosíntesis (López *et al.*, 2004b). Una estrategia para incrementar la producción consiste en diluir la lovastatina presente en el caldo de fermentación implementando un proceso de fermentación de

dos fases que consisten en una fase inicial por lote/lote alimentado y una fase de cultivo semi-continua en la cual los pellets son retenidos al interior del reactor y el medio de alimentación utilizado consiste en una solución de sales y biotina (Porcel *et al.*, 2008).

D. Aireación

Todas las fermentaciones ocurren de forma aeróbica requiriéndose la agitación y/o la aireación del medio de cultivo. La concentración de oxígeno es uno de los principales factores que afecta la producción, siendo común que la cantidad producida del metabolito aumente a medida que aumenta la concentración del elemento (máximo 80% v/v) en los gases de aireación. La tensión de oxígeno disuelto (DOT) recomendada para los cultivos en reactores es del 70%, tensión con la cual la morfología del cultivo, en el caso de *A. terreus*, es consistente con hifas periféricas ramificadas, gruesas y cortas. Cuando la DOT es mantenida en el 80% de saturación, la alta velocidad de agitación necesaria para alcanzar la DOT causa una disrupción del micelio y se obtiene un crecimiento pobre y una baja producción de lovastatina. En el caso que la DOT sea demasiado baja (35%), el suministro de oxígeno es pobre y no permite alcanzar altas tasas de biosíntesis (Novak *et al.*, 1997). Dado que el oxígeno molecular es requerido en la síntesis, la tensión de oxígeno probablemente afecta algún paso importante en la ruta biosintética, mejorando la concentración final de lovastatina (López *et al.*, 2004a). En los estudios realizados por Lai *et al.*, (2005) sobre el efecto del oxígeno disuelto (DO) a diferentes niveles de saturación del aire, en lo concerniente a la morfología del pellet y la producción del metabolito, se establece que con un nivel de DO de un 20% en la saturación del aire, se logran pellets esféricos, compactos, con un tamaño de distribución uniforme de 0,95 mm, apropiados para la producción de lovastatina.

E. Morfología del pellet y agitación

El crecimiento en pellet del micelio se ha relacionado con una mayor producción de las estatinas comparado con el crecimiento filamentoso (Kumar *et al.*, 2000), que en caso de ser descontrolado, se asocia con sustratos metabolizados rápidamente, donde el medio aumenta su viscosidad en corto tiempo y el crecimiento filamentoso impide la transferencia de oxígeno (López *et al.*, 2003; López *et al.*, 2004a). Para la producción de lovastatina por *A. terreus* se ha establecido que al día 7 del proceso fermentativo, se requiere la formación de pellets lisos, de tamaño uniforme con un diámetro óptimo comprendido entre

0.85 y 1.05 mm (Lai *et al.*, 2003). Uno de los factores que más afecta la morfología del pellet, su diámetro y la producción de lovastatina es la velocidad de agitación. Velocidades > 600 rpm dañan los pellets, mientras que a bajas velocidades los pellets alcanzan diámetros de ~2500 µm, que para *A. terreus* producen altos títulos de lovastatina (López *et al.*, 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos por Lai *et al.*, (2005) indican que es inadecuado aplicar una agitación constante a lo largo del proceso fermentativo, debido al efecto que la misma ejerce sobre la fragmentación del micelio, según las diferentes etapas fisiológicas del hongo.

F. Efecto del pH

Con respecto al pH, se ha establecido que la actividad de enzimas policétido sintetasas importantes en la síntesis (*pksM*), expresan actividad durante el crecimiento del hongo, por lo tanto, la acidificación del medio a las 48 horas puede servir como una respuesta importante en los procesos de optimización del medio de cultivo para la producción de lovastatina. El ajuste manual del pH en el medio de cultivo a diferentes niveles (5.5, 6.5 o 7.5) durante el proceso fermentativo, luego de 48 horas de iniciada la fase de producción, no tuvo ningún efecto sobre la biosíntesis de los bioactivos (Lai *et al.*, 2005). Como pH inicial comúnmente se han utilizado valores en el rango 5.5 a 6.5, sin embargo, la lovastatina es producida en un amplio rango de pH (7-9). Osman *et al.*, (2011) obtuvieron el pico máximo de producción cuando el pH inicial fue ajustado a 8.5 (66.69 µg/mL).

G. Efecto de la temperatura

Se ha reportado que los procesos fermentativos para la obtención de estatinas generalmente se realizan a 28 °C. Cuando se aplicaron cambios en la temperatura de 28 a 23 °C, a las 96 h, la producción de lovastatina se incrementó en un 25% alcanzando 572 mg/L, comparado con una fermentación homogénea a 28 °C (Lai *et al.*, 2005). Recientemente Osman *et al.*, (2011) reportaron que la máxima producción de lovastatina se da cuando la temperatura de incubación es de 30°C (50.9 µg/mL después de 8 días de incubación).

H. Efecto de la luz

En la naturaleza la luz es uno de los factores ambientales más cruciales. Se ha encontrado que tanto la luz roja como la azul, afectan el desarrollo de *Monascus*, influenciando los procesos de formación del micelio y de las esporas, así como la producción de metaboli-

tos secundarios. La luz roja estimula la producción de lovastatina mientras que la luz azul no (Miyake *et al.*, 2005). Estos resultados indican que el efecto de la luz roja sobre la biosíntesis de metabolitos es diferente, sugiriendo que afecta más la regulación en la síntesis de los policétidos que su productividad. Los autores proponen que *Monascus*, *Neurospora*, *Aspergillus* y muchos otros hongos, poseen mecanismos para detectar la calidad de la luz en una variedad de vías, destacando esos sistemas luz - sensibles por su importante valor para aplicaciones comerciales.

Fermentación en Estado Sólido

La fermentación en estado sólido (FES), es definida como cualquier proceso de fermentación desarrollado en materiales no solubles que actúan como soporte físico y fuente de nutrientes en ausencia de líquido sobrenadante, también puede darse en un sustrato inerte como soporte sólido (Pandey, 2003; Couto y Sanromán, 2006). Genéricamente, corresponde a un sistema de cultivo microbiano que los países orientales han empleado desde hace centurias para la preparación de diversos alimentos fermentados (Wei *et al.*, 2007), empleando como sustrato cereales (soya y arroz) y hongos pertenecientes al género *Monascus*, entre ellos *M. purpureus* (Su *et al.*, 2003), *M. pilosus* (Chen y Hu, 2005) y *M. ruber* (Xu *et al.*, 2005). En los últimos 20 años se han desarrollado diferentes sistemas no tradicionales de FES con potencial aplicación industrial. Estudios comparativos ponen de manifiesto que en algunas ocasiones la FES presenta ventajas sobre la FEL, incluyendo mayor y más rápida obtención del producto. La producción de lovastatina a escala industrial empleando FES está aprobada por la United States Food and Drug Administration-USFDA. Estas fermentaciones son realizadas en biorreactores o en fermentadores de bandejas incubadas en cuartos con regulación de temperatura (Barrios-González y Miranda, 2010). Los sustratos naturales más utilizados incluyen cereales como el salvado de trigo, la cebada, la harina de soya y residuos de frutas o mezclas de éstos (Valera *et al.*, 2005). La cantidad de lovastatina biosintetizada está íntimamente ligada a la clase de sustrato empleado y a la cepa del hongo. Es así como Baños *et al.* (citado por Barrios-González y Miranda, 2010) desarrollaron un método empleando espuma de poliuretano como sustrato inerte para producir lovastatina, utilizando una cepa silvestre de *A. terreus* TUB F-514 y un sistema con la espuma impregnada del medio de cultivo. Al comparar los resultados obtenidos con los arrojados por FEL realizada en condiciones análogas, se encontró una producción de lovastatina 14 veces mayor en FES. Los autores encontraron que el pará-

metro de mayor incidencia es la aireación y que por lo tanto el procedimiento con la espuma impregnada facilita el contacto directo con el flujo de aire favoreciendo la producción de lovastatina. El empleo de FES en soportes inertes impregnados con un medio líquido constituye una herramienta de gran potencial para estudios científicos y podría convertirse en un sistema comercial de alta producción (Baños *et al.*, 2009). En otros estudios comparativos Barrios-González *et al.*, (2008) citado por Barrios-González y Miranda (2010) indican que la diferencia en la producción del metabolito es atribuible a la expresión de los genes *LovE* y *LovF*, la cual se ve afectada por el estado físico del medio de cultivo.

Los estudios realizados por Valera *et al.*, (2005) con *Aspergillus flavipes* ponen de manifiesto que la producción de lovastatina mediante FES presenta muchas dificultades y limitaciones ya que son muchas las variables del proceso que se requieren controlar. Los investigadores evaluaron el uso de diferentes sustra-

tos sólidos, encontrando que el salvado de trigo fue el más adecuado para la producción de lovastatina, estableciendo además que la adición de fuentes de carbono externas como sacarosa y lactosa, o fuentes de nitrógeno como urea, sulfato de amonio y nitrato de amonio, inhiben la producción del metabolito. Dos años después Wei *et al.*, (2007) realizaron un trabajo similar con *Aspergillus terreus* estableciendo que tanto el arroz como la harina de trigo son los sustratos ideales. En la tabla 3 se citan los medios de cultivo utilizados para la producción de estatinas por FES.

Aparte de la producción de lovastatina por hongos micromicetos se ha reportado su presencia en los cuerpos fructíferos de los macromicetos del género *Pleurotus*, específicamente en las especies *ostreatus*, *saca* y *sapidus* obtenidos por FES (Gunde-Cimerman *et al.*, 1993). En 1995, los mismos autores determinaron el contenido de lovastatina en los extractos preparados a partir de los esporocarpos y su distribución durante el ciclo de vida. Los resultados encontrados indican que

Tabla 3. Medios de cultivo utilizados para la producción de estatinas por fermentación en estado sólido (FES)

Composición del medio de cultivo	Hongo	Rendimiento	Bibliografía
Harina de trigo	<i>Aspergillus flavipes</i> BICC 5174	16.65 mg/g LOV	Valera <i>et al.</i> , 2005
100g de arroz, harina de soya 20%, glicerol 3%, NaNO ₃ 0.2 %, ácido acético 0.4 %	<i>Monascus ruber</i> MG001	4-6 mg/g LOV	Xu <i>et al.</i> , 2005
Arroz o salvado de trigo, glucosa 5%, peptona 0.5%	<i>A. terreus</i> ATCC 20542	2.9 mg/g LOV	Wei <i>et al.</i> , 2007
Salvado de trigo y torta de aceite de cacahuete (1:1), (%p/v) glucosa (11), maltosa (5), glicerol (16), (NH ₄) ₂ HPO ₄ (2.3), MgSO ₄ (0.75), KH ₂ PO ₄ (2.0)	<i>Penicillium brevicompactum</i> WA2315	0,815 mg/g COM	Shaligram <i>et al.</i> , 2008
Soporte de poliuretano, impregnado con medio de cultivo 2.5X: (%) lactosa (4), harina de soya (0.3), KNO ₃ (0.2%), KH ₂ PO ₄ (0.3), % MgSO ₄ .7H ₂ O (0.05, NaCl (0.05) y de una solución de elementos traza (0.125)	<i>A. terreus</i> TUB F-514	15 mg/g LOV	Baños <i>et al.</i> , 2009
Salvado de trigo con 30% p/v de K ₂ HPO ₄ , y 30% p/v de una solución iónica hasta una humedad de 66,8%.	<i>A. terreus</i> UV 1718	3,004 ± 25 mg/g LOV	Pansuriya y Singhal, 2010

LOV Lovastatina
COM Compactina

la lovastatina está uniformemente distribuida en los esporocarpos pequeños y no se encuentran diferencias significativas cuando se compara su contenido en el píleo y en el estípite. Cuando el esporocarpo está completamente maduro (diámetro aproximado del píleo de 15 cm), el contenido de lovastatina en las lamelas disminuye en comparación con los esporocarpos más pequeños e inmaduros (figura 5) (Gunde-Cimerman y Cimerman, 1995).

El interés en la obtención de estatinas a partir de *Pleurotus* spp. se ha fundamentado principalmente en las propiedades nutricionales y medicinales de este hongo basidiomicete comestible (Kalac, 2009; Lavi et al., 2010; Kanagasabapathy et al., 2011). La obtención de cuerpos fructíferos es un proceso de largo tiempo que incluso puede llegar a necesitar de meses, motivo por el cual se ha preferido para la producción de estatinas el cultivo sumergido, permitiendo la obtención de un producto con una composición constante, en un corto período de tiempo, mediante la implementación de condiciones controladas como es un medio de cultivo ecológicamente puro y de composición definida. En hongos basidiomicetes del género *Pleurotus* productores de lovastatina la cantidad del metabolito obtenido varía según el tipo de fermentación (cultivo sumergido o fermentación en superficie) y de la especie. Para el caso de la fermentaciones en estado sólido es necesario tener en cuenta que el contenido de lovastatina

en los cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* no es constante incluso en la misma cepa y depende principalmente de la variabilidad del sustrato (Wasser y Reshetnikov, 2002).

Productos comerciales

Las propiedades de las estatinas y la relativa facilidad de su obtención por procesos fermentativos, han contribuido a la obtención de productos de uso comercial con las características mencionadas anteriormente propias de estos bioactivos. Tal es el caso de los derivados fermentados con especies de *Monascus* que incluyen *M. ruber*, *M. vitreus*, *M. pilosus*, *M. anka*, *M. purpureus*, entre otras, siendo *M. anka* y *M. purpureus* las especies tradicionalmente más empleadas en los países asiáticos para la preparación de alimentos fermentados y de bebidas (Manzoni y Rollini, 2002).

Dentro de los productos comerciales con buen contenido de estatinas es el más común el arroz rojo fermentado por FES, mediante el empleo de *Monascus*, siendo poseedor de una larga tradición en países de Asia del este (Erdogrul y Azirak, 2004). Su actividad hipocolesterolémica está asociada a la presencia de una mezcla de estatinas que incluyen monacolina K, J, L, M, X y sus formas hidroxiladas, compactina y dihidromonacolininas (Li et al., 2004). Una de las desventajas de estos productos es el contenido de la micotoxina

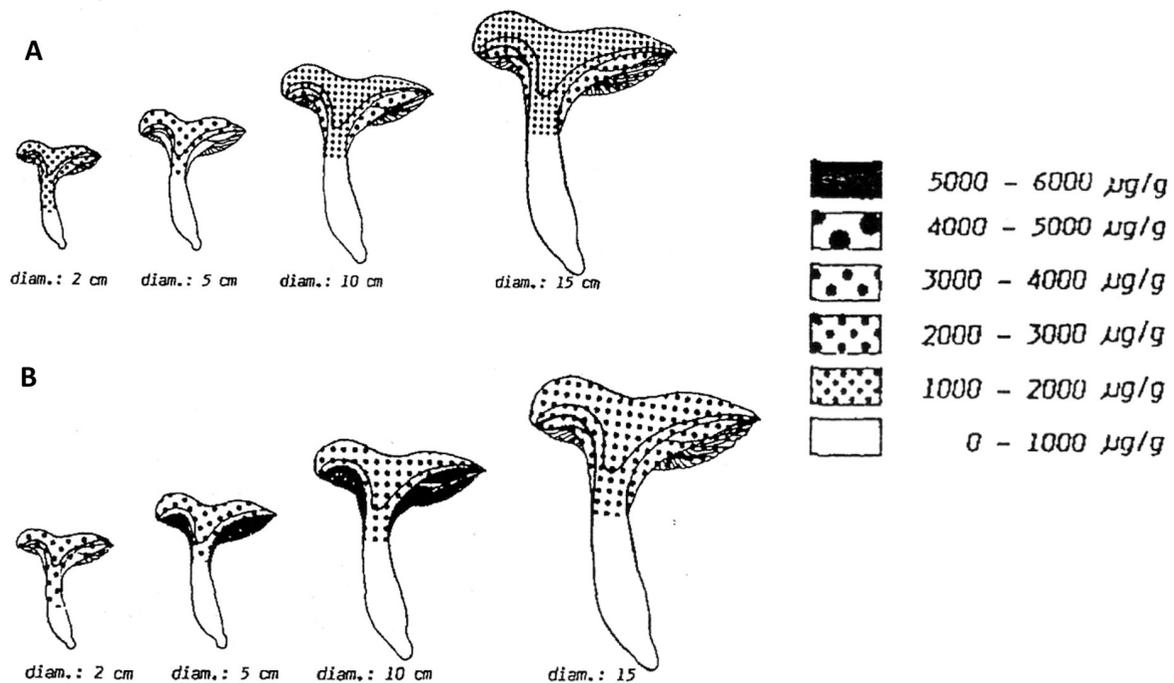


Figura 5. Contenido de lovastatina en las diferentes partes de los esporocarpos de *Pleurotus ostreatus* de diferentes medidas. La extracción fue realizada con **A.** MeOH:H₂O y **B.** N₂ + MeOH:H₂O (Gunde-Cimerman y Cimerman, 1995).

citrinina (Lee *et al.*, 2007), pero debe tenerse en cuenta que su producción se encuentra condicionada por la cepa, el sustrato, el tipo y las condiciones de fermentación (Li *et al.*, 2003). La tabla 4 resume las variables estudiadas en la optimización de producción de estatinas en el arroz rojo fermentado.

Otro de los productos comerciales que contienen lovastatina, es el té Pu-Erh conocido también como té rojo, nombre que proviene de la región Pu-Erh de Yunnan China, de donde procede. Al igual que otros alimentos y bebidas tradicionales, se prepara por procedimientos empíricos e inicia con el secado en crudo de hojas de té verde y un posterior proceso de fermentación que puede tardar entre 2 y 60 años (Yang y Hwang, 2006). Su composición, en términos de los microorganismos que participan en la segunda fermentación, está mayoritariamente representada por *Aspergillus niger* pero con la presencia de otros hongos como el *Blastobotrys adenivorans* (Abe *et al.*, 2008), *Actinoplanes aurantiacus*, *Actinoplanes pallidoaurantiacus*, *Actinoplanes purpeobrunneus*, *Streptomyces bacillaris*, *Streptomyces cavourensis* subsp. *cavourensis* y *Streptomyces cinereus* (Lu y Hwang, 2008; Hou *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010). El producto final exhibe actividad antioxidante, anticancerígena, hipocolesterolémica, hipotensora e hipoglicémica. Jeng *et al.*, (2007) determinaron que las cepas de *Streptomyces cinereus* y *Streptomyces bacillaris* en un

té con pocos días de fermentación son las que generan el mayor contenido de estatinas, ácido γ -aminobutírico y polifenoles. Con respecto a la toxicidad del té, según reporte del 2011 no presentaron muertes ni señales de toxicidad durante los 14 días que duró el estudio ni se observaron cambios de peso de los órganos ni alteraciones histopatológicas durante los 91 días de administración (Wang *et al.*, 2011).

La nata, postre gelatinoso y traslúcido, es un snack popular en Filipinas y corresponde a un alimento fermentado por la acción de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* y se caracteriza por tener alto contenido de fibra y una textura suave. Recientemente, se desarrolló un complejo *Monascus*-nata, un nuevo producto alimenticio obtenido por la fermentación de dos cepas del hongo (*M. ruber* y *M. pilosus*) dentro de celulosa bacteriana, denominada por los autores como nata de coco, obtenida desde jugo de coco fermentado con *Acetobacter*, en un medio condicionado. Combina la función de las estatinas producidas por el hongo filamentoso y la fibra dietaria bacteriana. En el 2004 se efectuó un estudio que determinó que un medio compuesto por 5% glucosa y 1,5% de $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ a pH 6,0-7,0 produce la mayor cantidad de lovastatina (157mg/l), observándose que la lovastatina en el alimento es resistente al lavado y a cambios de pH pero no a procesos térmicos y de enfriamiento (Shu y Lung, 2004).

Tabla 4. Variables analizadas para optimizar el proceso de obtención de estatinas en el arroz rojo fermentado.

Cepa empleada	Variable estudiada	Metabolito	Referencia
<i>Monascus purpureus</i> MTCC 369 <i>Monascus ruber</i> MTCC 1880	Temperatura, tiempo de fermentación, volumen del inóculo y pH	LOV	Panda <i>et al.</i> , 2010
<i>Monascus purpureus</i> CMU001	Tipo de arroz glutinoso	LOVA, COM, MMA, LOV, MM, DLOV	Chairote <i>et al.</i> , 2008; Chairote <i>et al.</i> , 2010
<i>Monascus purpureus</i> NTU 601	Fuentes de carbón y nitrógeno, ácidos grasos o aceites	LOV	Wang <i>et al.</i> , 2003
<i>Monascus</i>	Especies, cepas y cambios temperatura durante el proceso	LOV	Tsukahara <i>et al.</i> , 2009

LOV: Lovastatina
 LOVA: Hidroxiácido lovastatina
 COM: Compactina
 MMA: Hidroxiácido Monacolina M
 MM: Monacolina M
 DLOV: Dihidrolovastatina

La soya fermentada es un producto de reciente aparición, data del 2007 y se produce por la fermentación de una clase de soya con *Monascus*. Lim *et al.*, (2010) caracterizaron las propiedades fisicoquímicas de leche de soya fermentada con *Monascus* (MFS) preparada por FES, encontrando que presenta una mayor solubilidad que el control sin fermentación. La MFS contiene lovastatina (475 µg/g) y está enriquecida en agliconas de isoflavonas con ausencia de citrina. Como conclusión, la MFS tiene un gran potencial en el desarrollo de productos basados en soya, que además dado su contenido de estatinas pueden ayudar a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Lim *et al.*, 2010).

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad de Antioquia- Estrategia de Sostenibilidad, por el apoyo financiero y logístico, al Grupo de Biotecnología, que han permitido el desarrollo de parte de esta investigación.

Conclusiones

En lo referente a las estatinas, la biotecnología se ha constituido en una de las herramientas más poderosas para mejorar los actuales sistemas de producción e incrementar los rendimientos obtenidos a la fecha. La exploración de la aplicabilidad de las condiciones de los bioprocesos consignadas en esta revisión permitirán, mediante aplicación directa o modificaciones de las mismas, realizar la búsqueda más exhaustiva de nuevas especies de hongos tropicales que conforman nuestra biodiversidad y que podrían ampliar el rango de especies productoras de estos valiosos bioactivos, que por sus diferentes efectos pleiotrópicos exhibidos, se han constituido en un hallazgo valioso para la humanidad. Sin embargo, es importante tener en cuenta que en el momento de comenzar la búsqueda de las estatinas, bien sea en un género, especie e incluso una cepa que no se ha estudiado, es necesario evaluar la forma en que cada una de las variables en esta revisión descritas, afecta el proceso de obtención de los bioactivos.

Bibliografía

- Abe M., Takaoka N., Idemoto Y., Takagi C., Imai T., Nakasaki K. 2008. Characteristic fungi observed in the fermentation process for Puer tea. *International Journal of Food Microbiology*. 124 (2): 199-203.
- Alarcón J., Águila S. 2006. Lovastatin production by *pleurotus ostreatus*: Effects of the C:N ratio. *Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences*. 61c: 95-98.
- Alarcón J., Águila S., Arancibia-Avila P., Fuentes O., Zamorano-Ponce E., Hernández M. 2003. Production and purification

of statins from *Pleurotus ostreatus* (basidiomycetes) strains. *Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences*. 58c: 62-64

- Almuti K., Rimawi R., Spevack D., Ostfeld R.J. 2006. Effects of statins beyond lipid lowering: Potential for clinical benefits. *International Journal of Cardiology*. 109 (1): 7-15.
- Atalla M.M., Hamed E.R., El-Shami A.R. 2008. Optimization of a culture medium for increased mevinolin production by *aspergillus terreus* strain. *Malaysian Journal of Microbiology*. 4 (2): 6- 10.
- Baños J., Tomasini A., Szakács G., Barrios-González J. 2009. High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: An artificial inert support. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 108 (2): 105-110.
- Barrios-González J., Miranda R.U. 2010. Biotechnological production and applications of statins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 85 (4): 869-883.
- Bizukojc M., Pawlowska B., Ledakowicz S. 2007. Supplementation of the cultivation media with b-group vitamins enhances lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*. *Journal of Biotechnology*. 127 (2): 258-268.
- Cafforio P., Dammacco F., Gernone A., Silvestris F. 2005. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis*. 26 (5): 883-891.
- Couto S.R., Sanromán M.A. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry—a review. *Journal of Food Engineering*. 76: 291-302.
- Chairote E., Chairote G., Niamsup H., Lumyong S. 2008 The presence and the content of Monacolins in Red Yeast rice prepared from Thai glutinous rice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 3039-3047.
- Chairote E., Lumyong S., Chairote G. 2010. Study on cholesterol lowering compounds in Red Yeast rice prepared from thai glutinous rice. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*. 3 (2): 217-228.
- Chan J.K., Moore R.N., Nakashima T.T., Vederas J.C. 1983. Biosynthesis of mevinolin. Spectral assignment by double-quantum coherence NMR after high carbon-13 incorporation. *Journal of the American Chemical Society*. 105(10): 3334-3336. DOI: 10.1021/ja00348a062
- Chang Y., Huang J., Lee C., Shih I., Tzeng Y. 2002. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*. *Enzyme and Microbial Technology*. 30 (7): 889-894.
- Chen A., Kuron G., Hunt V., Huff J., Hoffman C., Rothrock J., López M., Joshua H., Harris E., Patchett A., Monaghan R., Currie S., Stapley E., Albers-Schonberg G., Hensens O., Hirshfield J., Hoogsteen K., Liesch J., Springer J. 1980. Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme a reductase and a cholesterol-lowering agent. The Proceedings of the *National Academy of Sciences of the United States of America*. 77 (7): 3957-3961.

- Chen F., Hu X. 2005. Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin. *International Journal of Food Microbiology*. 103 (3): 331- 337.
- Chen Y., Liu B., Chang, Y. 2010. Bioactivities and sensory evaluation of Pu-erh teas made from three tea leaves in an improved pile fermentation process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 109 (6): 557-563.
- Del Real G., Jiménez-Baranda S., Mira E., Lacalle, R.A., Lucas P., Gómez-Moutón C., Alegret M., Peña J.M., Rodríguez-Zapata M., Alvarez-Mon M., Martínez-A C., Mañes S. 2004. Statins inhibit hiv-1 infection by down-regulating rho activity. *The Journal of Experimental Medicine*. 200 (4): 541-547. doi: 10.1084/jem.20040061
- Dhale M.A., Divakar S., Kumar S.U., Vijayalakshmi G. 2007. Isolation and characterization of dihydromonacolin-mv from *monascus purpureus* for antioxidant properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73: 1197-1202.
- El-Shami A.R., Hamed E.R. 2007. Production of lovastatin by *Pleurotus ostreatus*. *Egyptian Journal of Biotechnology*. 25: 102-110.
- Endo A. 1979. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *The Journal of Antibiotics*. 32 (8): 852-854.
- Endo A. 1992. The discovery special article and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *Journal of Lipid Research*. 33 (11): 1569-1582.
- Endo A., Hasumi K., Yamada A., Shimoda R., Takeshima A.H. 1986. The synthesis of compactin (ML-236B) and monacolin K in fungi. *The Journal of Antibiotics*. 30 (11): 1609-1610.
- Endo A., Negishi Y., Iwashita T., Mizukawa K., Hiram M. 1985. Biosynthesis of ML-236B (compactin) and monacolin k. *The Journal of Antibiotics*. 38 (3): 444-448.
- Endres M. 2006. Statins: Potential new indications in inflammatory conditions. *Atherosclerosis Supplements*. 7: 31-35.
- Erdogru Ö., Azirak S. 2004. Review of the studies on the red yeast rice (*Monascus purpureus*). *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*, 2: 37-49.
- Ertürk S., Önal A., Cetin S.M. 2003. Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. *Journal of Chromatography B*. 793 (2): 193-205.
- Gajendragadkar P.R., Cooper D.G., Walsh S.R., Tang T.Y., Boyle J.R., Hayes P.D. 2009. Novel uses for statins in surgical patients. *International Journal of Surgery*. 7 (4): 285-290.
- Goc A., Kochuparambil S.T., Al-Husein B., Al-Azayzih A., Mohammad S., Somanath P.R. 2012. Simultaneous modulation of the intrinsic and extrinsic pathways by simvastatin in mediating prostate cancer cell apoptosis. *BMC Cancer*. 12: 409.
- Gomaa M.O., Bialy A.H.E. 2009. Pellet morphology, broth rheology and statin production in submerged fermentation of *P. citrinum*. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 4 (2): 75-83.
- Gunde-Cimerman N., Cimerman, A. 1995. *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-lovastatin. *Experimental Mycology*. 19 (1): 1-6.
- Gunde-Cimerman N., Friedrich J., Cimerman A., Benicki N. 1993. Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG-CoA reductase: Production of mevinoлин by the fungi of the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiology Letters*. 111(2-3): 203-206.
- Hajjaj H., Niederberger P., Duboc P. 2001. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2596-2602.
- Hou Y., Shao W., Xiao R., Xu K., Ma, Z., Johnstone, B.H., Du, Y. 2009. Pu-erh tea aqueous extracts lower atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model. *Experimental Gerontology*. 44: 434-439.
- Hsu W, Pan T. 2012. *Monascus purpureus*-fermented products and oral cancer: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93: 1831-1842.
- Istvan E. 2003. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: A 3-dimensional view. *Atherosclerosis Supplements*. 4: 3-8.
- Jeng K., Chen C., Fang Y., Hou R.C., Chen, Y. 2007. Effect of microbial fermentation on content of statin, gaba, and polyphenols in Pu-erh tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 8787-8792.
- Jia Z., Zhang X., Zhao Y., Cao X. 2010. Enhancement of lovastatin production by supplementing polyketide antibiotics to the submerged culture of *Aspergillus terreus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160: 2014-2025.
- Kalac P. 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*. 113 (1): 9-16.
- Kanagasabapathy G., Malek S.N.A., Kuppasamy U.R., Vikineswary S. 2011. Chemical composition and antioxidant properties of extracts of fresh fruiting bodies of *Pleurotus sajor-caju* (fr.) singer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (6): 2618-2626.
- Kandiah N., Feldman H.H. 2009. Therapeutic potential of statins in Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*. 283: 230-234.
- Karsenti G., Manach Y.L., Bouvier S., Chaine A., Bertolus C. 2010. Statins: A new pharmacological agent for free flap surgery?. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*. 63: 870-874.
- Kouroumichakis I., Papanas N., Proikaki S., Zarogoulidis P., Maltezos E. 2011. Statins in prevention and treatment of severe sepsis and septic shock. *European Journal of Internal Medicine*. 22: 125-133.
- Kumar M.S., Jana S.K., Senthil V., Shashanka V., Kumar S.V., Sadhukhan A.K. 2000. Repeated fed-batch process for improving lovastatin production. *Process Biochemistry*. 36: 363-368.
- Lai L.T., Pan C., Tzeng, B. 2002. Medium optimization for lovastatin production by *Aspergillus terreus* in submerged cultures. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*. 33 (5): 517-527.
- Lai L., Pan C., Tzeng B. 2003. The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high-producing

- mutant of *Aspergillus terreus* in submerged cultures. *Process Biochemistry*. 38: 1317-1326.
- Lai L., Tsai T., Wang T.C., Cheng, T. 2005. The influence of culturing environments on lovastatin production by *Aspergillus terreus* in submerged cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 36: 737-748.
- Lavi I., Levinson D., Peri I., Tekoah Y., Hadar Y., Schwartz B. 2010. Chemical characterization, antiproliferative and antiadhesive properties of polysaccharides extracted from *Pleurotus pulmonarius* mycelium and fruiting bodies. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85: 1977-1990.
- Lee C., Hung H., Wang J., Pan T. 2007. Improving the ratio of monacolin K to citrinin production of *Monascus purpureus* ntu 568 under dioscorea medium through the mediation of pH value and ethanol addition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(16): 6493-6502.
- Li F., Xu G., Li Y., Chen Y. 2003. Study on the production of citrinin by *Monascus* strains used in food industry. *Journal of Hygiene Research*. 32 (6): 602-605.
- Li Y., Zhang F., Wang Z., Hu Z. 2004. Identification and chemical profiling of monacolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 35: 1101-1112.
- Liao J.K., Laufs U. 2005. Pleiotropic effects of statins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 45: 89-118.
- Lim J.Y., Kim J.J., Lee D.S., Kim G.H., Shim J., Lee I., Imm J.Y. 2010. Physicochemical characteristics and production of whole soy-milk from *Monascus* fermented soybeans. *Food Chemistry*. 120 (1): 255-260.
- Lin Y.L., Wang T.H., Lee M.H., Su N.W. 2008. Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 77: 965-973.
- López J.C., Pérez J.S., Sevilla J.F., Fernández F.A., Grima E.M., Chisti Y. 2004a. Fermentation optimization for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: Use of response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 79: 1119-1126.
- López J.L.C., Pérez J.A.S., Sevilla J.M.F., Fernández F.G.A., Grima E.M., Chisti Y. 2003. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: Effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 270-277.
- López J.L.C., Pérez J.A.S., Sevilla J.M.F., Porcela E.M.R., Chisti Y. 2005. Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. *Journal of Biotechnology*. 116 61-77.
- López J.L.C., Porcel E.M.R., Ferrón M.A.V., Pérez J.A.S., Sevilla J.M.F., Chisti Y. 2004b. Lovastatin inhibits its own synthesis in *Aspergillus terreus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 31: 48-50.
- Lu C.H., Hwang L.S. 2008. Polyphenol contents of Pu-Erh teas and their abilities to inhibit cholesterol biosynthesis in Hep G2 cell line. *Food Chemistry*. 111: 67-71.
- Mach F. 2002. Statins as immunomodulators. *Transplant Immunology*. 9: 197-200.
- Mangunwardoyo W., Rafliyanti Y., Kusmana D. 2012. Bioprospection of lovastatin in *Aspergillus spp.* from University of Indonesia Culture Collection (UICC). *World Applied Sciences Journal*. 16 (2): 183-188.
- Manzoni M., Bergomi S., Rollini M., Cavazzoni V. 1999. Production of statins by filamentous fungi. *Biotechnology Letters*. 21: 253-257.
- Manzoni M., Rollini M. 2002. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58: 555-564.
- Manzoni M., Rollini M., Bergomi S., Cavazzoni V. 1998. Production and purification of statins from *Aspergillus terreus* strains. *Biotechnology Techniques*. 12 (7): 529-532.
- Miyake T., Mori A., Kii T., Okuno T., Usui Y., Sato F., Sammoto H., Watanabe A., Kariyama M. 2005. Light effects on cell development and secondary metabolism in *Monascus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32: 103-108.
- Miyake T., Uchitomi K., Zhang M., Kono I., Nozaki N., Sammoto H., Inagaki K. 2006. Effects of the principal nutrients on lovastatin production by *Monascus pilosus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 70 (5): 1154-1159.
- Novak N., Gerdin S., Berovic M. 1997. Increased lovastatin formation by *Aspergillus terreus* using repeated fed-batch process. *Biotechnology Letters*. 19 (10): 947-948.
- Osman M.E., Khattab O.H., Zaghlool G.M., Abd El-Hameed R.M. 2011a. Screening for the production of cholesterol lowering drugs (lovastatin) by some fungi. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5 (6): 698-703.
- Osman M.E., Khattab O.H., Zaghlool G.M., El-Hameed, R.M.A. 2011b. Optimization of some physical and chemical factors for lovastatin productivity by local strain of *Aspergillus terreus*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5 (6): 718-732.
- Panda B.P., Javed S., Ali M. 2009. Statistical analysis and validation of process parameters influencing lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14: 123-127.
- Panda B.P., Javed S., Ali M. 2010. Optimization of fermentation parameters for higher lovastatin production in red mold rice through co-culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*. *Food and Bioprocess Technology*. 3: 373-378.
- Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 81-84.
- Pansuriya R.C., Singhal R.S. 2010. Response surface methodology for optimization of production of lovastatin by solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 164-172.
- Pecyna M., Bizukojc M. 2011. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* with the simultaneous use of lactose and glycerol in a discontinuous fed-batch culture. *Journal of Biotechnology*. 151 (1): 77-86.

- Porcel E.M.R., López J.L.C., Pérez J.A.S., Chisti Y. 2008. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in a two-staged feeding operation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 83: 1236-1243.
- Porcel E.R., López J.L.C., Ferro M.A.V., Pérez J.A.S., Sánchez J.L.G., Chisti Y. 2006. Effects of the sporulation conditions on the lovastatin production by *aspergillus terreus*. *Biochemical Engineering Journal*. 29: 1-5.
- Prieto J.M.M. 2008. Sobre el descubrimiento de los fármacos hipolipemiantes. *Medicina Clínica*. 130 (18): 698-703.
- Puttananjaiah M.K.H., Dhale M.A., Gaonkar V., Keni S. 2011. Statins: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors demonstrate anti-atherosclerotic character due to their antioxidant capacity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 163: 215-222.
- Rohilla A., Rohilla S., Kumar A., Khan M.U., Deep A. 2011. Pleiotropic effects of statins: A boulevard to cardioprotection. *Arabian Journal of Chemistry*. doi:10.1016/j.arabjc.2011.06.025
- Roy M., Kung H.J., Ghosh P.M. 2011. Statins and prostate cancer: Role of cholesterol inhibition vs. Prevention of small GTP-binding proteins. *American Journal of Cancer Research*. 1 (4): 542-561.
- Sassano A., Platanius L.C. 2008. Statins in tumor suppression. *Cancer Letters*. 260: 11-19.
- Sayyad S.A., Panda B.P., Javed S., Ali M. 2007. Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under submerged fermentation using response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73: 1054-1058.
- Seraman S., Rajendran A., Thangavelu V. 2010. Statistical optimization of anticholesterolemic drug lovastatin production by the red mold *Monascus purpureus*. *Food and Bioprocess Processing*. 88 (2-3): 266-276.
- Shaligram N.S., Singh S.K., Singhal R.S., Szakacs G., Pandey A. 2008. Compactin production in solid-state fermentation using orthogonal array method by *P. brevicompactum*. *Biochemical Engineering Journal*. 41(3): 295-300.
- Shu C.H., Lung M.Y. 2004. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. *Process Biochemistry*. 39: 931-937.
- Siamak M., Moazami N., Haghighi S., Mohseni F., Mirdamadi S., Bakhtiari, M. 2003. Screening of lovastatin production by filamentous fungi. *Iranian Biomedical Journal*. 7: 29-33.
- Sorrentino F., Roy I., Keshavarz T. 2010. Impact of linoleic acid supplementation on lovastatin production in *Aspergillus terreus* cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 88: 65-73.
- Soubrier M., Christian R. 2006. Statins in rheumatology. *Joint BoneS-pine*. 73(2): 159-168.
- Stüve O., Youssef S., Dunn S., Slavin A.J., Steinman L., Zamvil S.S. 2003. The potential therapeutic role of statins in central nervous system autoimmune disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60 (11): 2483-2491.
- Su Y.C., Wang J.J., Lin T.T., Pan T.M. 2003. Production of the secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30 (1): 41-46.
- Tan N., Klein E.A., Li J., Moussa A.S., Jones J.S. 2011. Statin use and risk of prostate cancer in a population of men who underwent biopsy. *The Journal of Urology*. 186: 86-90.
- Terblanche M., Almog Y., Rosenson R.S., Smith T.S., Hackam D.G. 2006. Statins: Panacea for sepsis? *The Lancet Infectious Diseases*. 6: 242-248.
- Tiwari A. 2006. An overview of statin-associated proteinuria. *Drug Discovery Today*. 11 (9-10): 458-464.
- Tsukahara M., Shinzato N., Tamaki Y., Namihira T., Matsui T. 2009. Red yeast rice fermentation by selected *Monascus sp.* With deep-red color, lovastatin production but no citrinin, and effect of temperature-shift cultivation on lovastatin production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 158 (2): 476-482.
- Valera H.R., Gomes J., Lakshmi S., Gururaj R., Suryanarayan S., Kumar D. 2005. Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*. *Enzyme and Microbial Technology*. 37 (5): 521-526.
- Veillard N.R., Mach F. 2002. Review statins: The new aspirin? *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59: 1771-1786.
- Von Stechow D., Fish S., Yahalom D., Bab I., Chorev M., Müller R., Alexander J.M. 2003. Does simvastatin stimulate bone formation in vivo? *BMC Musculoskeletal Disorders* 4(1):1-10.
- Wang D., Xu K., Zhong Y., Luo X., Xiao R., Hou Y., Bao W., Yang W., Yan H., Yao P., Liu L. 2011. Acute and subchronic oral toxicities of Pu-erh black tea extract in sprague-dawley rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 134: 156-164.
- Wang J.J., Lee C.L., Pan T.M. 2003. Improvement of monacolin K, γ -aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of *Monascus purpureus* NTU 601. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30: 669-676.
- Wasser S.P., Reshetnikov S.V. 2002. Patente: "Process for producing, methods and compositions of glucuronoxylomannan as a nutraceutical agent from higher basidiomycetes mushroom". United States Patent No. US 6,383,799 B1.
- Wei P.L., Xu Z.N., Cen P.L. 2007. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation. *Journal of Zhejiang University - Science A*. 8 (9): 1521-1526.
- Xu B.J., Wang Q.J., Jia X.Q., Sung C.K. 2005. Enhanced lovastatin production by solid state fermentation of *Monascus ruber*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 10: 78-84.
- Yang D.J., Hwang L.S. 2006. Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in Pu-erh tea. *Journal of Chromatography A*. 1119: 277-284.