Acta Farm. Bonaerense **18** (3): 165-70 (1999)
Recibido el 28 de octubre de 1998
Aceptado el 22 de abril de 1999

Estudio del Proceso de Extracción de Esterasa a partir de *Plexaura homomalla* y Evaluación de su Actividad Enzimática

Yaelis RIVAS DE LA VEGA *, José A. GONZÁLEZ LAVAUT, Rizette AVILA GONZÁLEZ, Ritsie RUIZ CABALLERO, Lisette SORDO MARTÍNEZ & Mayra CASTRO NODAL

Departamento de Síntesis Química, Centro de Química Farmacéutica, Calle 200 y 21, Atabey, Playa; P.O. Box. 16 042, Ciudad de la Habana, C.P. 11 600, Cuba.

RESUMEN. La aplicación de procesos enzimáticos en la química fina con empleo de disolventes orgánicos y acuosos constituye un campo de atractivo potencial para la obtención de compuestos biológicamente activos, entre ellos las prostaglandinas. En este trabajo se reportan los resultados del proceso de extracción del complejo prostaglandina-esterasa, enzima que resulta importante en la síntesis de diferentes prostaglandinas. Se realizaron diferentes procesos variando el volumen de disolvente utilizado y el producto obtenido fue tamizado. Se realizó la hidrólisis del éster metílico de prostaglandina A_2 con cada uno de los diferentes lotes obtenidos para determinar posible pérdida de actividad enzimática. Los mejores resultados se obtuvieron para el proceso que emplea menor cantidad de disolvente y mayor tamaño de partícula, ocurriendo la hidrólisis total del éster en 6 horas.

SUMMARY. "A Study of the Extraction Process of Esterase Starting from *Plexaura homomalla* and Assessment of its Enzimatic Activity". The application of enzymatic process in fine chemistry with the employment of aqueous and organic solvents constitutes an attractive field to obtain biologically active compounds, being prostaglandins one of them. The results of the extraction process of the enzymatic complex prostaglandin-esterase was reported. This enzyme plays an important role in prostaglandins synthesis. Different processes were carried out changing the solvent volume. The final product was sieved. In order to determine possible loss of enzymatic activity , the hydrolysis of the methyl ester of prostaglandin A_2 was made. The best results were obtained for the process that used the lowest solvent volume and the largest-size particle, the total hydrolysis ending in 6 hours.

INTRODUCCIÓN

La aplicación de enzimas en la obtención de principios activos para medicamentos, así como para cualquier otra rama de la industria, toma cada día más auge debido a la simplicidad del método, la menor contaminación ambiental y a la alta rentabilidad de los procesos por disminución de los costos [1].

En el presente trabajo se utilizó la gorgonia *Plexaura homomalla,* que constituye una fuente natural para la obtención del complejo enzimático prostaglandina-esterasa, que resulta ser altamente eficiente en los procesos de hidrólisis de los ésteres de prostaglandinas, cuando los procesos químicos no pueden ser empleados por la gran labilidad de los grupos funcionales presentes en la molécula [2].

La purificación parcial de este sistema esterásico demostró la presencia de dos fracciones proteicas, estando localizada la actividad hidrolítica en la fracción de mayor peso molecular, cuyo valor estimado es de aproximadamente 140 a 160 kDa [3].

El descubrimiento de que los enzimas poseen actividad catalítica en un medio con bajo contenido de agua ha hecho posible desarrollar reacciones enzimáticas en mezclas conteniendo un disolvente orgánico. La disponibilidad de los enzimas como catalizadores en medio orgánico ofrece varias ventajas importantes para la biotransformación, que incluyen: aumento de la solubilidad del sustrato, facilidad de reacción y fácil recuperación del producto final y del enzima[4].

Se han encontrado reportes en la literatura

PALABRAS CLAVE: Esterasa, Hidrólisis enzimática, *Plexaura homomalla,* Prostaglandina.
KEY WORDS: Enzymatic hydrolysis, Esterase, *Plexaura homomalla,* Prostaglandin.

* Autora a quien dirigir la correspondencia. E-mail: cqf@infomed.sld.cu

de un método eficiente en la hidrólisis enzimática de ésteres de prostaglandina A_2 contenidos en gorgonia *Plexaura homomalla* y la subsiguiente transformación de prostaglandina A_2 (PGA_2) a prostaglandina E_2 (PGE_2) El proceso de hidrólisis forma parte de esta ruta sintética y ha sido un método alternativo, teniendo en cuenta las ventajas que ofrecen las esterasas naturales de *Plexaura homomalla* para hidrolizar inicialmente la forma acetilada y metilada en PGA_2 y luego, por transformaciones químicas, pasar a PGE sin necesidad de purificación de los estados intermedios [5]. La prostaglandina E_1, cuya forma exógena es el alprostadil, se utiliza en neonatos con enfermedades congénitas. Además, ha sido aplicada a pacientes con enfermedades vasculares periféricas y para el tratamiento de la disfunción sexual masculina.

Por lo anteriormente expuesto el objetivo de este trabajo fue el de optimizar el proceso de extracción de la esterasa de *Plexaura homomalla* y evaluar su actividad enzimática, así como establecer la influencia del tamaño de partícula sobre el proceso de hidrólisis del éster metílico de la prostaglandina A_2 ($MePGA_2$).

MATERIALES Y MÉTODOS

Como sustrato para determinar la actividad enzimática se utilizó $MePGA_2$, obtenido en el laboratorio, cuyas características espectroscópicas concuerdan con lo reportado [6].

Los diferentes procesos de hidrólisis desarrollados fueron controlados por cromatografía de capa delgada (CCD), empleando como fase estacionaria cromatoplacas Merck de vidrio de 10x10 cm, cubiertas con gel de sílice GF- 254 de 0,25 mm de espesor. Como fase móvil para el desarrollo de la CCD se usó fundamentalmente una mezcla de disolventes formada por: acetato de etilo-isooctano-ácido acético- agua (90:50:20: 100). Como revelador de las placas cromatográficas se utilizó ácido fosfomolíbdico al 10% en etanol en forma sumergida y se calentó posteriormente a 110 °C, hasta observar desarrollo de color en las zonas resueltas por el sistema de separación empleado.

El análisis de los resultados de los procesos de hidrólisis se realizó en un densitómetro CAMAG TLC Scanner II, utilizando la opción Calibration

Obtención del éster metílico de PGA_2

Para la formación del $MePGA_2$ se empleó el método vía diazometano (Figura 1). El diazometano se obtiene al gotear una solución de hidróxido de potasio concentrada sobre una solución etérea de Diazald (N-metil-N-nitroso-p-toluen sulfonamida).

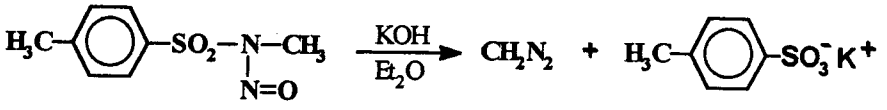

Figura 1. Esquema de obtención de diazometano

La esterificación (Figura 2) se efectúa añadiendo la solución de diazometano sobre la solución etérea de PGA_2.

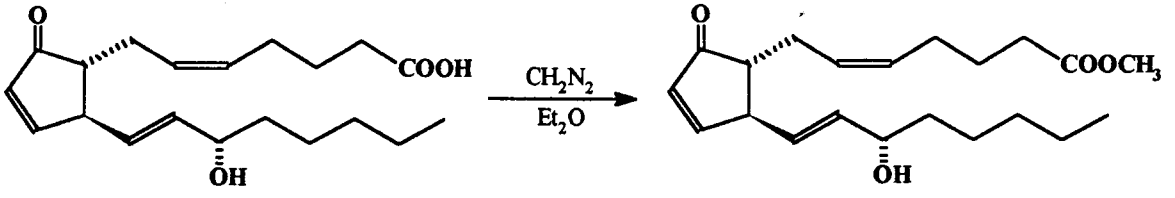

Figura 2. Esquema de la esterificación de PGA_2 (vía diazometano)

El producto se caracterizó por las técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN-^{13}C), Espectroscopía Infrarroja (IR) y Espectrofotometría de Masa (EM). RMN-^{13}C (ppm): 173.8, 33.5, 24. 8, 27, 31.5, 126.7, 27, 49.4, 210.4, 133, 165.2, 52.11, 130.2, 135.2, 72.5, 37.3, 25.1, 31.8, 22.6, 14.0, 51.5 (C21). IR (ν, cm^{-1}): 3400 (OH C15), 1740 - 1710 (C=O), 1590, 970. EM (m/e): 348 (M^+), 330 ($M-H_2O$), 190 (330-$C_8H_{12}O_2$), 107 (190-C_6H_{11}), 133 (190-C_4H_9), 119

(190-C_5H_{11}), 317 (M-OCH_3), 299 (317-H_2O), 316 (M-CH_3OH), 298 (316-H_2O), 277 (M-C_5H_{11}), 245 (277-CH_3OH), 249 (M-$C_6H_{11}O$), 217 (249-CH_3OH).

Estudio del proceso de obtención del complejo enzimático prostaglandina-esterasa.

Obtención de la esterasa [7]

Para la obtención del complejo enzimático prostaglandina esterasa se utilizó cenénquima de *Plexaura homomalla,* secado al aire bajo techo y pulverizado. En un matraz de fondo redondo de 6 L de capacidad se pesaron 250 g de *Plexaura homomalla* seca y pulverizada al que se añadieron 750 mL de acetona y se agitó durante una hora. Luego se filtró y el residuo sólido se lavó repetidas veces con 100 mL de acetona. Se dejó secar al aire a temperatura ambiente hasta peso constante y se obtuvo 240 g de un polvo carmelita. A continuación se transfirió a un balón de fondo redondo de 20 L de capacidad al que se añadió agua desionizada en una proporción de 10:1 (mL de agua : gramo de producto) y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Al finalizar este tiempo se adicionaron 6,6 L de acetona y se agitó por una hora. Se filtró a vacío, a través de un embudo de porcelana (buchner) y se lavó el sólido con 100 mL de acetona. El volumen total de acetona utilizado en la técnica fue de 7,35 L. El residuo sólido se dejó secar hasta peso constante en corriente de aire a temperatura entre 25 y 30 °C. Se obtuvo un polvo fino de color carmelita. Se realizaron tres réplicas y como promedio se obtuvieron 233,2 g (rendimiento: 93,3%). Este se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Este método de obtención constituye la Variante 1. Dos nuevas Variantes (2 y 3) se ensayaron utilizando el mismo procedimiento pero reduciendo la cantidad de acetona a la mitad y a la cuarta parte, respectivamente. Para ambas experiencias se emplearon siempre 250 g de *Plexaura homomalla* seca y pulverizada.

Los productos obtenidos en base a las tres experiencias realizadas para la obtención de la enzima se denominaron Lotes I, II, III. Estos fueron tamizados con el fin de estudiar si el tamaño de partícula influía en la actividad enzimática, obteniéndose cinco fracciones correspondientes a diferentes tamaños de partículas para cada lote. Los tamaños de partícula estudiados fueron los siguientes: 315, 450, 620, 710 y 1000 µm.

Evaluación de la actividad enzimática del complejo prostaglandina-esterasa

Se procedió a realizar la hidrólisis enzimática del $MePGA_2$ con tres réplicas para cada una de las fracciones tamizadas de los tres lotes obtenidos. El $MePGA_2$ se sometió a hidrólisis enzimática para obtener la forma ácido libre utilizando el complejo prostaglandina-esterasa en una proporción 10:1 de enzima a prostaglandina. Para este proceso se empleó una mezcla agua:acetona como medio de reacción [8].

Para la realización de la hidrólisis (Figura 3) se disolvieron 0,1 g de $MePGA_2$ en 200 µL de etanol espectroscópico y se añadió a una emulsión de 1,0 g de complejo prostaglandina-esterasa cuya composición fue de 80:20 agua destilada: acetona, respectivamente, para un volumen total de 5 mL. La emulsión debía ajustarse a pH 6,5 (pH óptimo) con ácido fosfórico (0,4 mol/L) pero no fue necesario porque se comprobó que este era el pH del medio. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación magnética de 300 rpm y a una temperatura controlada de 25 °C.

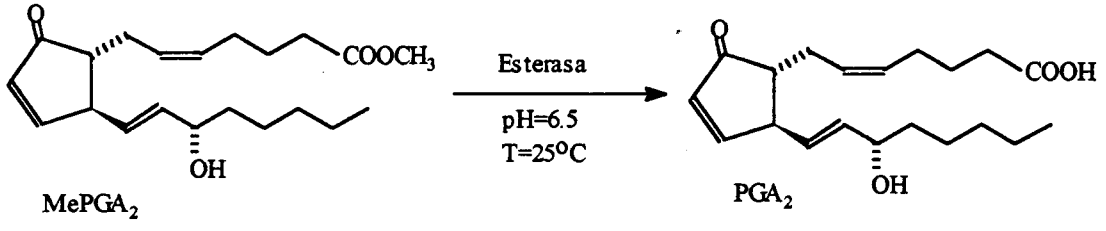

Figura 3. Esquema dela hidrólisis del $MePGA_2$.

Para seguir el curso de la reacción por CCD se tomaron muestras cada hora hasta completarse la transformación. Para la preparación de la muestra a aplicar se extrajeron 40 µL de la mezcla de reacción y se añadieron sobre 120 µL de acetato de etilo; se agitó y luego sedejó reposar hasta la separación de las fases. Se tomaron 2 µL de la fase de acetato de etilo resultante en

cada experiencia y se aplicaron sobre el punto de siembra.

Para los tamaños de partícula 450, 620 y 710 µm se obtuvieron porcentajes de conversión similares, por lo que se decidió realizar la bioconversión del $MePGA_2$ utilizando el mayor (1000 µ) y menor (315 µ) tamaño de partícula de cada lote, siguiendo la técnica descrita anteriormente. El curso de la reacción se siguió por CCD a los diez minutos de iniciada la reacción y luego cada hora. La intensidad de la señal se midió por lecturas densitométricas evaluando por área y altura de picos. La actividad enzimática se evaluó por la siguiente ecuación:

$$AE = \frac{(c_2 - c_1) \cdot V_{reacc}}{(t_2 - t_1) \cdot mg_{(extracto)}} = \frac{mL}{seg \cdot mg_{(extracto)}} = \frac{U}{mg_{(extracto)}}$$

En la cual AE = Actividad enzimática, c = % de conversión en PGA_2, t = tiempo en que transcurre la hidrólisis, V_{reacc}= volumen total de la reacción y $mg_{(extracto)}$ = mg de extracto enzimático utilizados para llevar a cabo la reacción.

El tratamiento estadístico se realizó mediante el programa Statgraphics Version 3.78. Los valores de actividad enzimática se compararon por la prueba de Duncan utilizando el estadígrafo q (α, p, f_2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la obtención de los diferentes lotes no hubo diferencias en cuanto al proceso de extracción y se lograron rendimientos buenos para cada uno de ellos. En el caso del lote I se empleó un volumen total de acetona de 7,35 L y el rendimiento final fue de 93,3%; para el Lote II el volumen total fue de 3,675 L con un 92% de rendimiento; para el lote III el volumen total de disolvente fue de 2,025 L porque en la primera adición de acetona se añadieron 375 mL para facilitar el proceso de agitación y el rendimiento fue de 95,3%.

Luego de haber obtenido el producto procedimos a verificar, mediante la reacción de hidrólisis del $MePGA_2$, si la variación en el volumen de acetona y en el tamaño de partícula afectaba la actividad del complejo enzimático.

Durante el estudio de la hidrólisis por inspección visual de la placa cromatográfica pudo observarse el curso de la reacción, donde el $MePGA_2$ presentó un mayor valor de Rf que la PGA_2. Se observó que a las 6 horas la transformación fue total en todos los casos estudiados.

Se analizaron los resultados obtenidos para el proceso empleando las fracciones correspondientes a 1000 y 315 µm de tamaño de partícula de cada lote. Los resultados obtenidos por densitometría evidencian que en los tres lotes la hidrólisis del $MePGA_2$ fue efectiva y que la variación en el proceso de extracción de la esterasa no influyó en su actividad enzimática. Pueden observarse los mejores % de conversión para el mayor tamaño de partícula de los tres lotes, lo que podría asociarse a que ocurra una rápida difusión de la molécula dentro del cristal de la proteína [9] y además a que durante el proceso de trituración en el caso de las partículas menores se puede desnaturalizar la enzima. Los resultados de los % de conversión obtenidos por densitometría se muestran en la Tabla 1, donde se observa que para el lote III con un tamaño de 1000 µm a las 3 horas la hidrólisis ocurre completamente, reduciendo el tiempo de trabajo a la mitad.

En la Figura 4 puede observarse el comportamiento de la hidrólisis por el % de conversión promedio de cada lote en función del tiempo.

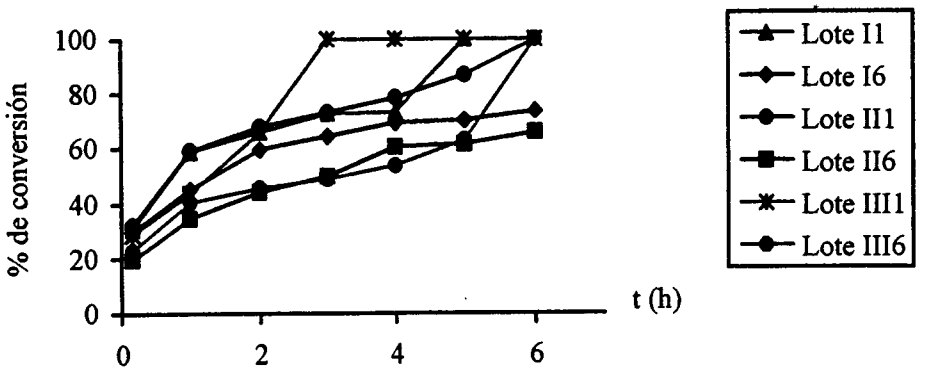

Figura 4. Comportamiento de la hidrólisis para cada lote.

Tiempo	Lote PGA2	I1 Me PGA2	Lote PGA2	I5 Me PGA2	Lote PGA2	II1 Me PGA2	Lote PGA2	II5 Me PGA2	Lote PGA2	III1 Me PGA2	Lote PGA2	III5 Me PGA2
	30.68	69.32	29.74	70.26	32.01	67.99	19.42	80.58	28.47	71.53	22.92	77.08
10 min	31.03	68.97	29.98	70.02	31.89	68.11	19.78	80.22	28.85	71.15	21.87	78.13
	30.85	69.15	29.55	70.45	32.18	67.82	20.0	79.98	27.52	72.48	23.35	76.65
	58.97	41.03	44.91	55.09	52.15	40.84	34.70	65.33	43.70	56.30	40.38	59.62
1 h	59.15	40.85	45.50	54.50	53.06	46.94	33.92	66.08	44.25	55.75	39.96	60.04
	58.77	41.23	43.89	56.11	52.05	47.95	34.87	65.13	43.18	56.82	41.22	58.78
	66.02	33.98	59.56	40.44	60.37	39.63	44.14	55.86	66.14	33.86	45.52	54.48
2 h	65.28	34.72	58.29	41.71	61.17	38.83	45.35	54.65	65.86	34.14	45.29	54.71
	66.35	33.65	59.97	40.03	59.88	40.12	44.03	55.97	66.39	33.61	45.87	54.13
	73.14	27.26	69.56	35.43	76.32	23.68	46.11	53.89	100	0	49.17	50.83
3 h	74.25	25.75	70.07	29.93	75.28	24.72	45.27	54.73	100	0	48.37	51.63
	73.84	26.16	68.99	31.01	76.59	23.41	46.80	53.20	100	0	49.55	50.45
	72.74	26.86	64.57	35.43	78.66	21.34	60.86	39.14			52.07	47.93
4 h	71.89	28.11	63.94	36.06	78.53	21.47	59.67	40.33			51.76	48.24
	73.1	26.88	64.79	35.21	79.01	20.99	61.00	39.00			52.26	47.74
5 h	100	0	70.48	29.52	86.88	13.12	61.83	38.17			63.28	36.72
	100	0	70.67	29.33	86.95	13.05	61.75	38.25			62.59	37.41
	100	0	69.88	30.12	87.01	12.99	62.06	37.94			63.47	36.53
			73.60	26.40	100	0	66.02	33.98			100	0
6 h			72.28	27.72	100	0	65.84	34.16			100	0
			73.50	26.50	100	0	66.29	33.71			100	0

Tabla 1. Resultados de la la hidrólisis del $MePGA_2$ medidos por densitometría, evaluando por altura del pico. **L**: lote. **I**, **II** y **III**: primer, segundo y tercer proceso de extracción, respectivamente. **1**: tamaño de partícula de 1000 µm. **5**: tamaño de partícula de 315 µm.

Los valores de actividad enzimática del complejo prostaglandina esterasa calculados para cada lote y los tamaños de partícula correspondientes a 1000 y 315 µm se reportan en la Tabla 2.

Lote I 1	Lote I 6	Lote II 1	Lote II 6	Lote III 1	Lote III 6
0.51 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.48 ± 0.03	0.31 ± 0.03	1.41 ± 0.02	0.59 ± 0.01

Tabla 2. Valores de actividad enzimática de la esterasa.

En la comparación de los valores de actividad enzimática mediante la prueba de Duncan se obtuvieron diferencias significativas ($q_{exp} > q_{tab}$) entre todos los lotes, lo que indica que hay influencia del tamaño de partícula y del volumen de disolvente que se utilizó.

CONCLUSIONES

Se demostró que al optimizar el proceso de obtención de la esterasa no se afecta su actividad enzimática, siendo los mejores resultados los que se obtienen con el método que emplea la menor cantidad de reactivo y el mayor tamaño de partícula.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Wescott, C.R. & A.M. Klibanov (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1206:1-9
2. Henriques R.D. & E. Moreda (1974) Patente de invención N° 34172, Cuba

3. Henriques, R.D. (1982) "Empleo del complejo enzimático endógeno presente en *Plexaura homomalla* en la biosíntesis de PG y compuestos relacionados", Informe Técnico de la Academia de Ciencias de Cuba, págs. 1-15
4. Gupta, M.N. (1992) *Eur. J. Biochem.* **203**: 25-32
5. Daniels, E.G. (1973). U.S. Patent N° 3 761 356
6. Bindra J.S & R. Bindra (1977) "Prostaglandin Synthesis", Ed. Academic Press, New York, págs. 23-32
7. Schneider W. & G. Bundy (1974) *J. Am. Chem. Soc.* **99**: 1222-32
8. Rivas Y. & J.A. González (1997) Taller Internacional: La bioquímica en la biotecnología marina, La Habana, Cuba
9. Lalonde, J. & Ch. Govardhan (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 6845-52