

## EXTRAÇÃO DE ESTERASE DE FÍGADO SUÍNO (PLE)

Henrique Celso Trevisan\*, João Batista de Medeiros e Helen Cristina Fávero Lisboa

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rua Prof. Francisco Degni, s/n, 14800-900 Araraquara - SP, Brasil

Recebido em 1/7/05; aceito em 9/9/05; publicado na web em 6/3/06

PIG LIVER ESTERASE (PLE) EXTRACTION. A simple, fast and low-cost methodology was optimized, seeking preparation of a crude pig liver esterase (PLE) concentrate. Basically, the method consisted of the following steps: liver homogenization, acetone washing, enzyme extraction and purification/concentration. Starting from 1 kg of fresh liver more than 200 kU of PLE suspension were obtained after 8 hours, at an estimated cost of US\$0.21/kU. The PLE concentrate thus obtained was stable, showing 96-100% of the initial activity after 7 months in refrigerator at 4°C.

Keywords: porcine liver esterase; PLE; biocatalysis

### INTRODUÇÃO

A síntese de compostos enantiomericamente puros é um seguimento da síntese orgânica em franco desenvolvimento, sobretudo com aplicação na indústria farmacêutica. Em grande parte dos casos a rota sintética passa por etapas que podem ser biocatalisadas por microrganismos ou enzimas isoladas, como as esterases, que catalisam a hidrólise de ésteres. Entre as esterases, a de fígado de porco (PLE) é uma das mais importantes em síntese orgânica<sup>1</sup>, aplicada em hidrólises em condições brandas e regioselectiva, separação de isômeros *E/Z*, assimetriação de diésteres pró-quirais e resolução de ésteres racêmicos. As aplicações da PLE envolvem um número expressivo de substratos, sendo assunto constante nas publicações atuais em biocatálise<sup>1-6</sup>. Comercialmente, a PLE pode ser adquirida na forma bruta (~15U/mg, R\$8,88/kU) ou purificada (~150U/mg, R\$64,95/kU)<sup>7</sup>. Em razão da importância, do alto custo e da necessidade de importação da PLE, o domínio da metodologia para sua extração permite viabilizar seu emprego em maior escala, visando principalmente a síntese de compostos enantiomericamente puros.

A extração e purificação da PLE já foram descritas, tendo sido objeto de estudo entre 1919<sup>8</sup> e 1969<sup>9</sup>. O principal método foi estabelecido e publicado em 1969<sup>10</sup>, tendo depois recebido pouca atenção. Com o interesse na aplicação de PLE em síntese orgânica, três publicações mais recentes consideraram a extração da enzima, usando-a diretamente<sup>11,12</sup> ou após imobilização<sup>13</sup>. Seebach e Eberle<sup>12</sup>, em 1986, usaram o método de Horgan *et al.*<sup>10</sup>, por ser o mais conveniente para a preparação do concentrado bruto de esterase. A primeira etapa envolvida foi a preparação do pó acetônico, a partir da secagem do fígado homogeneizado, após lavagem com acetona. Em seguida foi feita a extração da PLE e purificação até o grau desejado. O concentrado bruto foi obtido por fracionamento com sulfato de amônio. Cada uma das etapas foi objeto de estudo neste trabalho, buscando-se facilidade de execução, redução de custo e de tempo, com o objetivo de viabilizar o uso da PLE, principalmente em maior escala de preparação.

### PARTE EXPERIMENTAL

Para desenvolvimento do método de extração o fígado suíno foi coletado em um abatedouro local, transportado em gelo, limpo

do excesso de membranas, picado em cubos de ~ 2cm e lavado com mistura de água e gelo. Em seguida o excesso de água foi drenado e os cubos foram homogeneizados com ou sem acetona, em liquidificador com copo em aço inox ou multiprocessador doméstico com copo plástico. No caso em que não se usou acetona durante a homogeneização, procedeu-se depois à lavagem com acetona, sob agitação mecânica. Variou-se a proporção entre acetona e fígado e o método de separação do sólido: filtração ou centrifugação. Após lavagens com acetona o sólido foi previamente seco<sup>10</sup> ou submetido diretamente à extração da enzima. A extração foi feita com solução tampão citrato de sódio 0,05 mol L<sup>-1</sup><sup>10</sup> ou NH<sub>4</sub>OH 0,025 mol L<sup>-1</sup><sup>9</sup>. A PLE foi então purificada parcialmente a partir do extrato, primeiramente por ajuste do pH para 6,0, o que forçou a precipitação de proteína inativa, que foi eliminada por centrifugação. Em seguida aplicou-se precipitação fracionada com sulfato de amônio, coletando-se a enzima entre 45 e 70% de saturação, como uma suspensão. A suspensão de PLE foi mantida em geladeira ou dialisada, podendo posteriormente ser submetida a etapas adicionais de purificação<sup>10</sup>. Na diálise foi utilizado 1,0 g de suspensão, diluído em 10 mL de água destilada, contra 2 L de solução tampão fosfato de sódio 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 8,0.

As etapas de extração e purificação foram acompanhadas por análise de atividade em todas as frações coletadas. A atividade enzimática foi calculada pela medida da velocidade inicial de hidrólise do butirato de etila (Sigma Chemical Co., produto B-2391), a 25 °C, em pH 7,96-8,01 (mantido por controlador de pH ChemCadet, da Coler Parmer C.). Utilizou-se como meio reacional 50 µL de butirato de etila em 30 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,01 mol L<sup>-1</sup>, ao qual foi adicionado, sob agitação, a amostra da enzima. A atividade foi calculada em µmol min<sup>-1</sup> (U). Dividindo-se este valor pelo volume (ou massa) da amostra, expressou-se a atividade em U mL<sup>-1</sup> ou U g<sup>-1</sup>.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Tratamento do fígado

Nos ensaios empregando as metodologias mais recentes<sup>11,13</sup>, e 500 mL da acetona por kg de fígado, obteve-se uma pasta de fígado, de difícil filtração e lavagem. O processo para preparar o pó acetônico levou 2-3 dias e o produto apresentou coloração hetero-

\*e-mail: trevisan@iq.unesp.br

gênea. A atividade no pó foi de 200 U/g, comparável à obtida por Seebach e Eberle<sup>12</sup>, mas inferior à esperada, 420-720 U g<sup>-1</sup><sup>10</sup>.

A homogeneização do fígado sem acetona, em multi-processador, com posterior lavagem em outro recipiente, mostrou-se mais prática que com acetona, em liquidificador. Além da maior facilidade no manuseio do material, o uso de um equipamento convencional de processamento de alimentos permite imediato aumento de escala. A lavagem com acetona em outra etapa também possibilita o uso de um tanque agitado, reduzindo o risco de explosão por vazamento de acetona.

Com relação à separação do sólido, optou-se por centrifugação a 4000G, uma vez que a filtração é dificultada pela resistência da torta ao fluxo de solvente. Aumentou-se a quantidade de acetona para 2000 mL por kg de fígado, resultando numa suspensão mais fácil de ser processada. Nestas condições foram necessárias três lavagens para que o sobrenadante ficasse límpido e incolor. A atividade do pó obtido foi de 432 U g<sup>-1</sup>, dentro da faixa esperada<sup>10</sup>. O rendimento foi de 232 g de pó por kg de fígado, correspondendo a 100 kU kg<sup>-1</sup> de fígado.

Em razão do tempo de secagem relativamente longo, e da proposta de se preparar um concentrado de PLE e não um pó, optou-se por suprimir esta etapa, avaliando-se a extração direta da torta de fígado lavada com acetona (Figura 1).

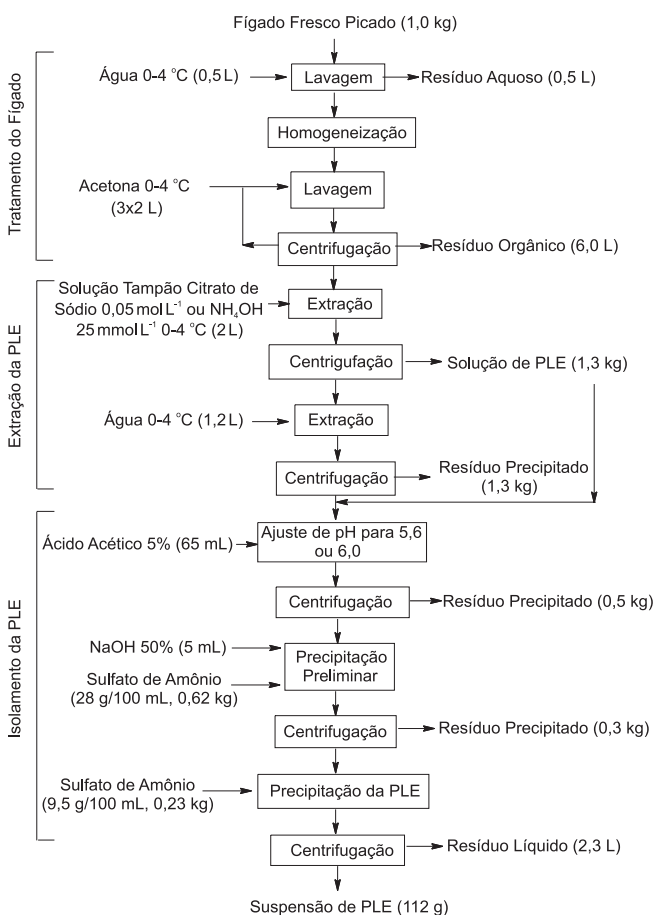


Figura 1. Preparação da suspensão de PLE, balanço com base em média dos dados experimentais

### Extração da PLE

Comparando-se a extração da PLE do pó acetônico com solução tampão citrato de sódio<sup>10</sup> ou hidróxido de amônio 0,025 mol L<sup>-1</sup><sup>9</sup>, a 0-4 °C, verificou-se que no segundo caso a atividade ex-

traída era 25% maior que no primeiro. Com relação à quantidade, conseguiu-se 160 kU a partir do pó acetônico e 300 kU a partir da torta lavada, para cada kg de fígado. Horgan *et al.*<sup>10</sup> relataram a extração de 143-245 kU kg<sup>-1</sup>, dosando atividade a 38 °C.

### Isolamento da PLE

A primeira etapa foi o ajuste do pH do extrato para 6,0 com ácido acético 5%, coletando-se o sobrenadante por centrifugação a 12000 G e descartando-se o precipitado. No método descrito<sup>10</sup> o pH era ajustado para 5,6, mas verificou-se perda de 30% da PLE nestas condições. Em pH 6,0 a perda foi menor que 10%.

Em seguida o pH foi ajustado para 8,0 com NaOH 50%, seguindo-se adição de 28 g de sulfato de amônio para cada 100 mL de solução, a 4 °C, centrifugação a 15000G e descarte do precipitado. Ao sobrenadante foram adicionados 9,5 g de sulfato de amônio para cada 100 mL, seguindo-se centrifugação a 15000 G e descarte do sobrenadante, coletando-se a enzima na forma de suspensão, que foi estocada em geladeira a 4 °C. Ensaios durante a estocagem confirmaram a estabilidade da suspensão de PLE, apresentando 94-100% da atividade inicial após 7 meses.

Considerando a produtividade, a partir de 1 kg de fígado fresco, consumindo-se basicamente 6 L de acetona e 850 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (custo de ~R\$65,00), pôde-se preparar 112 g de suspensão com 2000 U g<sup>-1</sup>, o que correspondeu a 224 kU (custo total estimado de R\$0,58 kU<sup>-1</sup>, dobrando-se o dos insumos).

### Diálise da PLE

Com objetivo de eliminar o sulfato de amônio e purificar a enzima, a suspensão foi submetida à diálise, testando-se membranas com diferentes pesos moleculares de corte (MWCO). Avaliou-se o nível de purificação através da atividade específica, definida como uma relação entre a atividade enzimática (U) e a absorvância em 280 nm (UA)<sup>10</sup>. Partindo-se de uma suspensão com atividade específica de 12 U UA<sup>-1</sup> obteve-se, após diálise, 16, 20 e 23 U UA<sup>-1</sup>, com membranas de MWCO de 13-14, 30 e 100 kDa, respectivamente. Ocorreu então purificação parcial da enzima, sendo mais significativa com membrana de 100 kDa. A atividade específica com membrana de 13-14 kDa é equivalente à publicada anteriormente<sup>10</sup>. A solução de PLE dialisada é relativamente estável quando estocada em geladeira a 4 °C, tendo apresentado 86% da atividade inicial após 5 meses.

### CONCLUSÕES

Com este trabalho otimizou-se uma metodologia relativamente simples, rápida e de baixo custo para isolamento de PLE, como alternativa à importação. A PLE preparada foi avaliada quanto à estabilidade na estocagem, tanto na forma de suspensão como dialisada. Embora a suspensão seja mais adequada para estocagem, a solução dialisada pode também ser preparada em lotes e guardada para uso até 5 meses, sem perda significativa de atividade.

### AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pelo suporte financeiro e ao CNPq-PIBIC, pela bolsa de IC de J.B. de Medeiros.

### REFERÊNCIAS

- Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4<sup>th</sup> ed., Springer-Verlag: Berlin, 2000.

2. Heilmann, S. M.; Drtina, G. J.; Haddad, L. C.; Rasmussen, J. K.; Gaddam, B. N.; Liu, J. J.; Fitzsimons, R. T.; Fansler, D. D.; Vyvyan, J. R.; Yang, Y. N.; Beauchamp, T. J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *30*, 33.
3. Bhuniya, D.; Narayanan, S.; Lamba, T. S.; Reddy, K. V. S. R.; *Synth. Commun.* **2003**, *33*, 3717.
4. Bornscheuer, U. T.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 543.
5. Davis, B. G.; Borer, V.; *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 618.
6. Lee, S. Y.; Min, B. H.; Hwang, S. H.; Koo, Y. M.; Lee, C. K.; Song, S. W.; Oh, S. Y.; Lim, S. M.; Kim, S. L.; Kim, D. I.; *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 1033.
7. <http://www.sigma-aldrich.com.br>, acessada em Fevereiro 2005.
8. Falconer, J. S.; Taylor, D. B.; *Biochem. J.* **1946**, *40*, 831.
9. Barker, D. L.; Jencks, W. P.; *Biochemistry* **1969**, *8*, 3879.
10. Horgan, D. J.; Stoops, J. K.; Webb, E. C.; Zerner, B.; *Biochemistry* **1969**, *8*, 2000.
11. Basak, A.; Nag, A.; Panchal, S. C.; Bhattacharya, G.; *Biotechnol. Lett.* **1993**, *15*, 19.
12. Seebach, D.; Eberle, M.; *Chimia* **1986**, *40*, 315.
13. Herdan, J. M.; Balulescu, M.; Cira, O.; *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1996**, *107*, 409.