

Nueva tecnología para la obtención de un preparado de bromelina de tallo de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr)

Martha Hernández,¹ María de los Ángeles Chávez,² Roxana Báez,³ Carol Carvajal,¹ Margarita Márquez,² Humberto Morris,⁴ Ramón Santos,¹ Justo L González,¹ Vivian Quesada,⁵ Claudio Rodríguez⁵

¹Laboratorio de Ing. Metabólica. Centro de Bioplantas, Carretera a Morón Km 9, Universidad de Ciego de Ávila (UNICA), CP 69450, Ciego de Ávila, Cuba. E-mail: mhernandez@bioplantat.com

²Centro de Estudio de Proteínas. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. ³Facultad de Ciencias Médicas de Ciego de Ávila. ⁴Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Universidad de Oriente. ⁵Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR).

⁶Centro Nacional de Biopreparados, BioCen, La Habana, Cuba.

RESUMEN

La bromelina (EC 3.4.22.32) es una proteasa aislada de órganos de plantas de piña con un amplio espectro de acciones farmacológicas y alimenticias. Entre las primeras se destaca su actividad antitumoral que la han convertido en una de las cisteino proteasas más estudiadas. Se diseñó y patentó un procedimiento de extracción de bromelina (patente C 12N 9/50. 1997) en el que se utilizaron protectores del centro activo de la enzima a un pH cercano al fisiológico de la planta y alejado del óptimo. El perfeccionamiento de la tecnología demostró que se alcanzan rendimientos de 20,8 g de producto/kg. de tallos y 3,9 g de proteínas/kg de tallos, con una actividad específica de 1,36 U/mg. El procedimiento de extracción se puede escalar y tanto en planta piloto como a escala industrial se logran rendimientos en términos de actividad superiores al 72% de los obtenidos en el laboratorio. El producto aislado es muy activo y estable, con una fracción proteolítica mayoritaria de masa molar de 24 500 Da, pH óptimo cercano a 7 frente a hemoglobina y buena estabilidad en un rango de pH de 3 a 9 y temperaturas de hasta 50 °C. La utilización del extracto crudo de bromelina en la industria biotecnológica permitió obtener un hidrolizado proteico de *Clorella vulgaris*. La purificación mediante la combinación de métodos cromatográficos hizo factible el aislamiento, a partir del preparado crudo de tallo, de una proteína mayoritaria que caracterizada sobre la base del tiempo de retención en RP-HPLC, masa molar, pH isoeléctrico y secuencia de amino ácidos de la región amino terminal se demostró que era bromelina de tallo. Se utilizó un preparado de bromelina semipurificado por cromatografía de intercambio iónico en carboximetil celulosa-52, para realizar un estudio toxicológico y farmacológico del producto como antitumoral. La dosis letal media del producto a dosis única fue 216,35 mg/kg y a dosis repetida 105,91 mg/kg. La evaluación de la actividad antitumoral en 6 tumores trasplantables de ratón: leucemia p-388, carcinoma pulmonar de Lewis, adenocarcinoma-755, melanoma B-16, sarcoma-37 y tumor ascítico de Ehrlich, permitió concluir que es tan activa como el citostático 5-fluoracilo frente a todas las líneas tumorales excepto en el melanoma B-16. Frente al adenocarcinoma mamario-755 se demostró por primera vez en el mundo la actividad antitumoral de la bromelina.

Descripción del resultado

La bromelina (EC3.4.22.32) es una cisteino proteasa aislada y purificada de órganos de plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr). Sus aplicaciones con fines alimenticios y terapéuticos son muy variadas. Se utiliza en la obtención de hidrolizados de proteínas, en la alimentación animal y humana, el ablandamiento de carnes y la fabricación de cervezas [1]. Como medicamento se emplea con éxito como antiinflamatorio, digestivo, en la formulación de vacunas y el tratamiento de tumores. Está incluida en el grupo de fármacos inmunomoduladores [2].

Datos actuales revelan que la producción de proteasas, representa el 38% del total de enzimas mundialmente comercializadas [3]. Sin embargo, para estas producciones existen frecuentemente problemas relacionados con la factibilidad de la fuente, rendimientos en términos de proteínas y actividad específica, altos precios y estabilidad. En el presente resultado se resumen los trabajos multidisciplinarios realizados durante varios años para la obtención, caracterización, purificación, escalado, producción y usos actuales de un preparado de bromelina de tallo de piña.

En Ciego de Ávila existen más de 1500 ha dedicadas al cultivo de la piña lo que conlleva a contar con un alto potencial de residuos de cosechas, cada año se

demuelen 300 ha de resoco. Se diseñó y perfeccionó una tecnología original, eficiente y económica en la que mediante la protección de los grupos -SH del centro activo de la enzima y la manipulación adecuada de factores del medio como su naturaleza, pH y fuerza iónica, se lograron rendimientos altos en términos de proteína y actividad específica al tiempo que se logró evitar la proteólisis durante el proceso de obtención. La tecnología desarrollada se aplicó a diferentes desechos de la planta (tallos, coronas, hojas), se evaluaron los rendimientos obtenidos y se comprobó que de los tallos se obtuvo el preparado más activo. La tecnología fue patentada [4].

El perfeccionamiento del procedimiento demostró que se alcanzaron rendimientos de hasta 20,8 g de extracto crudo/kg de tallos, 4,85 mg de proteínas/mL de extracto y una actividad enzimática de 6,6 U/mL de extracto (6 000 U/kg de tallos), resultados superiores a los obtenidos en diferentes países con otras tecnologías publicadas y/o patentadas [5]. El escalado se realizó en el Centro Nacional de Biopreparados de La Habana, Cuba. (BioCen) debido, por una parte a que sus instalaciones se ajustaban a la tecnología, sin requerir inversiones, y por otro lado, a la necesidad actual de ese Centro de sustituir importaciones

1. Headon D, Walsh G. The industrial production of enzymes. *Biotechnology Advance* 1994;12 (4):635-46.

2. Leipner J, Saller R. Systemic enzyme therapy in oncology. Effect and mode of action. *Drugs* 2000; 59 (4):769-80.

3. FAO "Pineapple production" [on-line] [visitado en Diciembre, 2002]. Disponible en URL: <http://www.pineappleinn.com/reviews.html>

4. Hernández M, Chávez M, Márquez M, Rodríguez G, Santos R, González J, et al. Proceso de obtención de bromelina a partir de tallos de piña. Patente Cubana C12N 9/50, dic 23. 1997.

5. Hernández M. Nueva tecnología de obtención de bromelina. *Boletín de Información del MES* 1998; (3).

de papaina para la producción de medios de cultivos de alta demanda biomédica y biotecnológica en el país, así como su exportación. Los resultados del escalado fueron muy satisfactorios (Figura), con la reproducción de los valores de actividad específica del preparado enzimático. Se lograron rendimientos de 17,07 g/kg de tallos, superiores al 80% de los obtenidos en el laboratorio.

La caracterización funcional del extracto crudo permitió evaluar los parámetros cinéticos óptimos, así como demostrar su estabilidad operacional y de conservación. El preparado es muy activo y estable, con una fracción proteolítica mayoritaria de masa molar de 24 900 Da, un valor de pH óptimo cercano a 7 frente a hemoglobina, buena estabilidad en un rango de pH de 3 a 9 y temperaturas de hasta 50 °C. La utilización del producto crudo en la industria biotecnológica permitió obtener un hidrolizado proteico de múltiples usos [6, 7] a partir de *Clorella vulgaris*, alga que tiene elevado valor nutritivo, pero baja digestibilidad [8].

El trabajo se completó con la purificación de la enzima mediante la combinación de diferentes métodos cromatográficos que permitieron su identificación y caracterización molecular [9]. La purificación de bromelina por cromatografía de exclusión en geles de Sephadex G-100 rindió un preparado tres veces más activo que el extracto original, pero mejores resultados se lograron al purificar por cromatografía de intercambio iónico en carboximetil celulosa-52. La combinación de la cromatografía de intercambio iónico, exclusión en gel y RP-HPLC permitió purificar, a partir del extracto crudo de tallo, una proteína que caracterizada en términos de masa molar y secuencia de amino ácidos de la región amino terminal, coincidió con la bromelina de tallo.

El preparado semipurificado por cromatografía de intercambio iónico es 2,34 veces más activo que el extracto original. Tiene pH óptimo de 6,8 y una estabilidad en función del pH y la temperatura inferior a la del preparado crudo. Si se conserva liofilizado a -20 °C mantiene el 80% de la actividad durante un año.

La bromelina purificada mostró una marcada actividad antitumoral en 5 de los 6 tumores escogidos para el pesquisaje farmacológico. Es tan activa como el citostático 5-fluorouracilo frente a la leucemia P-388, el carcinoma pulmonar de Lewis y el sarcoma-37 y más eficiente que el referido producto frente al tumor ascítico de Ehrlich y al adenocarcinoma mamario-755 [10]. Frente a este último se demostró por primera vez en el país la actividad antitumoral de la bromelina (Tabla) y dicha actividad se relaciona con su influencia sobre el sistema inmune ya que:

- A pesar de tener alta actividad antitumoral en modelos de rápida proliferación, no mostró citotoxicidad para leucocitos y produjo leucocitosis fundamentalmente de linfocitos.

- Demostró una notable actividad antitumoral en sistemas no isogénicos como el sarcoma-37 y el tumor ascítico de Ehrlich, para los cuales está comprobado la influencia de la respuesta inmunológica en el rechazo de los mismos.

- Produjo disminución del número de metástasis en animales portadores de carcinoma pulmonar de Lewis, la actividad antimetastazante de la enzima no fue di-

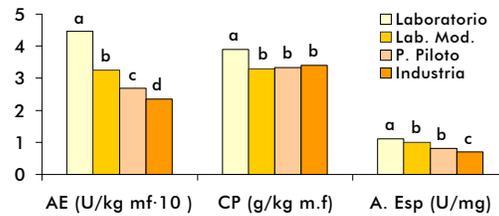


Figura. Comportamiento de la actividad proteolítica (AE)(U/kg de tallos·103), la concentración de proteínas(CP) (g/kg de tallos) y la actividad específica (A. Esp)(U/mg de proteína) del extracto crudo de bromelina obtenido a diferentes escalas. Medias con letras iguales para cada indicador no difieren (Kruskal-Wallis, Student-Neuman-Keuls, $p < 0.05$)

recta sobre las células circulantes sino por la acción en uno o varios de los procesos implicados en la cascada de metastización.

- "In vitro" no es mitógena *per se*, sin embargo es capaz de aumentar la respuesta de los linfocitos a la fitohemaglutinina. Los animales tratados durante 15 y 30 días con bromelina por vía intraperitoneal mostraron una respuesta mayor que los controles a los mitógenos de linfocitos T pero no ocurrió igual para el mitógeno de linfocitos B.

Teniendo en cuenta la actividad antitumoral mostrada por el preparado semipurificado de bromelina la profundización en estos estudios permitiría proponer el uso clínico de la proteasa. Este trabajo es una contribución importante en la explicación de la actividad antitumoral de la bromelina y las implicaciones para el uso de las cisteino proteasas exógenas de plantas como tratamiento complementario de enfermedades tumorales.

Novedad científica

El uso por primera vez de protectores de los grupos -SH del centro activo de la enzima y de condiciones de extracción a valores de pH ácido que minimizan la autoprotólisis, permitieron desarrollar una nueva tecnología sencilla, eficiente y económica para la producción de bromelina a partir de tallos de piña (Patente C12N 9/50, 1997). Se informa por primera vez en el mundo la actividad antitumoral de un preparado semipurificado de bromelina frente al adenocarcinoma mamario (ADC-755). Se escaló a nivel industrial por primera vez en Cuba un proceso tecnológico de extracción de proteasas. Se informa por primera vez un procedimiento para la obtención de un preparado semipurificado de bromelina mediante el empleo de un sistema "semibatch" de cromatografía de intercambio iónico, sencillo, económico y que se puede escalar.

Importancia práctica y valor socioeconómico del resultado

Debido a lo sencillo y económico del método de aislamiento y purificación propuesto el resultado además de valor práctico tiene ventajas económicas. La disponibilidad de materia prima es de 2.210 t de tallos/año. Si se procesan el 70% de estos y se tienen en cuenta los rendimientos de la tecnología de extracción (a escala industrial) se pueden obtener 26.41 t de extracto crudo/año. Según precio de catálogo (SIGMA 2000),

6. Morris H. Composición bioquímica y propiedades bioestimulantes de un hidrolizado proteico de *Chlorella vulgaris* en la formulación de medios de cultivo de *Bacillus subtilis*. Revista Cubana de Química 2001; 13(3):28-36.

7. Morris H, Borges L, Martínez C, Carrillo O. Aspectos bioquímicos de la intervención con un hidrolizado enzimático de *Chlorella vulgaris* durante la recuperación de la malnutrición proteico-energética en ratones Balb/c. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición 2002; 16(1):5-12.

8. Morris H, Sanz A, Almarales A. Utilización de un hidrolizado enzimático de *Chlorella vulgaris* en la formulación de medios de cultivo de *Bacillus subtilis*. Tecnología Química 1999; 19(3): 32-7.

9. Hernández M, Carvajal C, Santos R, Márquez M, Blanco M, González J, et al. Purification alternatives of obtained bromelain from different sources. Pineapple News 1999; 6: 6-9.

10. Báez R, Bello J, Hernández M. Toxicidad aguda a dosis repetidas de bromelina obtenida de tallos de piña. Revista Medicuba 1999;5: 8-13.

Tabla. Actividad antitumoral de bromelina frente a líneas de tumores murinos

| Tumor | Bromelina Mejor dosis ensayada | Sobrevida (días) | | | Índice de Sobrevida (%) | |
|-----------------------------|--------------------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | Control Positivo 5-Fu | Control negativo | Mejor dosis Bromelina | Control Positivo 5-Fu | Mejor dosis Bromelina |
| Leucemia P-388 | 5,0 | 19,30 a | 11,12 b | 18,0 a | 73,56 a | 69,06 b |
| Carcinoma pulmonar de Lewis | 12,5 | 35,70 a | 27,90 b | 35,50 a | 27,95 a | 27,24 a |
| Adenocarcinoma mamario -755 | 5,0 | 23,50 a | 16,00 b | 24,40 a | 46,87 b | 52,50 a |
| Tumor ascítico de Ehrlich | 12, | 29,40 b | 10,60 c | 34,50 a | 177,35 b | 225,47 a |
| Sarcoma-37 | 25,0 | 39,30 a | 14,20 c | 35,31 b | 176,75 a | 153,60 b |
| Melanoma B-16 F10 | 12,5 | 23,20 a | 19,80 b | 21,11 b | 17,17 a | 6,61 b |

*Dentro de cada tumor, medias con letras iguales no difieren para sobrevivida (Kruskal-Wallis, Student-Neuman-Keuls, $p < 0.05$) y (Mann-Whitney, $p < 0.05$) para Índice de Sobrevida.

un producto similar (Bromelina B 4882) se comercializa a \$ 0.96 USD/g, valor a tener en cuenta en el caso de sustitución de importaciones (23 350 USD/año). Si se analizan los gastos de producción, materia prima y comercialización, el precio probable de nuestro producto sería \$ 0.65 USD/g, lo que equivale a recuperar \$ 15,278,185.00 USD/año. El preparado semipurificado por intercambio iónico se puede comercializar a \$ 20.50 USD/100 U. La comercialización del producto obtenido permite recuperar \$ 17,923,504.00 USD/año. Un producto purificado similar al obtenido por la combinación de métodos cromatográficos (Bromelina B 5144) se comercializa a \$ 53.10 USD/100 U. Al purificar bromelina mediante el uso de filtración en gel e intercambio iónico se pueden obtener \$ 7,920, 810.70 USD/año.

Finalmente se puede concluir que los preparados de bromelina obtenidos tienen un amplio espectro de uso en la biotecnología y la medicina. La evaluación del preparado crudo de bromelina en la obtención de hidrolizados proteicos de microalgas permite sustituir importaciones de proteasas similares y obtener un nuevo producto de múltiples usos. Se corroboraron las potencialidades de uso de la bromelina como antitumoral. La extensión de los resultados alcanzados en la actividad antitumoral de la enzima semipurificada a otros sistemas experimentales permitiría formular nuevos fármacos cubanos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a María Blanco, Evelio Báez, Alberto del Monte y Joaquín Díaz su colaboración en la realización de este trabajo.