

SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ANTIINFECCIOSOS

Espinosa Kominami P.

Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid.

Tutor: Hernáiz Gómez-Dégano MJ.

Resumen

Desde el descubrimiento de la penicilina, se han venido produciendo numerosos antibióticos para el tratamiento de distintas enfermedades infecciosas, y gracias a ello se ha modificado favorablemente el panorama de la morbilidad y mortalidad ya que estas afecciones ocupan el primer lugar entre las causas de muerte.

En estos últimos años, el uso de las enzimas en las industrias farmacéuticas se ha incrementado por la excelente selectividad (regio- quimio- y estereoselectividad) que presentan los biocatalizadores y la buena sostenibilidad que nos proporciona su empleo, permitiéndonos obtener productos semisintéticos difícilmente alcanzables por los métodos químicos clásicos.

El presente artículo se divide en 3 partes. En primer lugar, se describen los mecanismos de acción de las principales familias de fármacos con actividad antibacteriana. En segundo lugar, se indican varias de las ventajas que posee el uso de la biocatálisis para la síntesis de compuestos con fines terapéuticos. Por último, se detalla la semisíntesis de los β -lactámicos, describiendo como se obtienen los productos intermediarios como 6-APA, 7-ADCA y 7-ACA y comparando su obtención a través de reacciones químicas o por vías enzimáticas, utilizando como principal biocatalizador la penicilin G acilasa.

Abstract

Since the discovery of penicillium, it has been producing so many antibiotics for the treatment of different infectious diseases, and thanks to that, it let change outlook of morbidity and mortality for better, where this illness occupy the first place among the causes of death.

In the last years, the use of enzymes in the pharmaceutical industry has increased because of the excellent chemoselectivity (regio and stereoselectivity) of biocatalyst, and the good sustainability that provide us its employment, allowing us to get semisynthetic products hardly achievable by classics chemical methods.

In this article, it divides in three parts. First of all, it describes the mechanism of action of the principles groups of drugs with antibacterial activity. In second place, it explains and formulates several advantages that the employment of biocatalyst has for the synthesis of compounds for therapeutic aims. Finally, it details the semisynthesis of β -lactams, describing how to obtain the intermediates products like 6-APA, 7-ADCA and 7-ACA, and comparing their obtaining through chemicals reactions or enzymatically, using the principal biocatalyst penicillin G acylase.

I – INTRODUCCIÓN

El uso de los agentes antimicrobianos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas ha constituido un acontecimiento sin precedentes, porque la curación y control de las infecciones ha permitido modificar favorablemente el panorama de la morbilidad y mortalidad, en el que estas afecciones ocupan el primer lugar entre las causas de muerte¹.

Técnicamente los antibióticos son compuestos producidos por células capaces de inhibir (en bajas concentraciones) el crecimiento de los microorganismos. En la práctica, el término antibiótico se utiliza para designar a todos los fármacos utilizados en el tratamiento de infecciones bacterianas. Si bien inicialmente fueron aislados de tejidos de plantas superiores y animales, este término por lo general se utiliza para designar sustancias inhibitorias de origen microbiano².

En la práctica, los antibióticos se pueden distinguir según el efecto que ejerzan sobre la bacteria, que son:

- a) Bacteriostático: aquél fármaco que inhibe el crecimiento de los microorganismos dentro de un individuo, pero no los elimina y reanudan su crecimiento una vez que se suspende el tratamiento.
- b) Bactericida: aquellos que poseen la propiedad de destruir los microorganismos, siendo su acción irreversible¹.

Esta clasificación es bastante inexacta, ya que estos términos varían en función del tipo de germen y de la concentración del antibiótico, como el cloranfenicol, que se comporta como bacteriostático frente a *E. Coli* y como bactericida frente a ciertas cepas de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae*³.

II – OBJETIVOS

- Conocer las ventajas que nos brindan el uso de la síntesis quimioenzimática, así como los tipos de enzimas existentes para dichos procesos.
- Estudiar la síntesis quimioenzimática para la obtención de antibióticos β -lactámicos, en comparación con la utilización del sistema convencional de la síntesis química.

III – TIPOS DE ANTIBIÓTICOS

La clasificación que más se utiliza se basa principalmente en el mecanismo de acción de los antibióticos, como viene detallado en la Figura 1. Dentro de esta clasificación, destacamos:

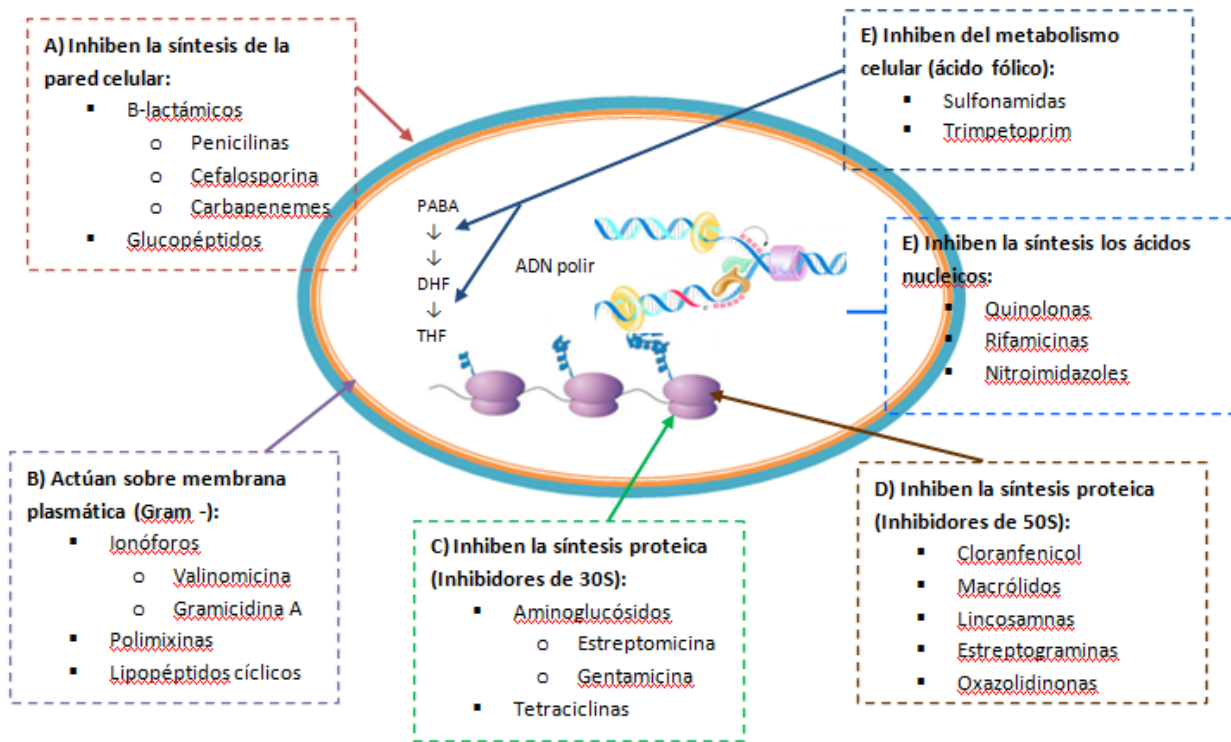


Figura 1. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción

A) Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular:

La pared celular de las bacterias, sirve para mantener su integridad cuando infectan al hombre, protegiéndoles de factores externos como cambios de pH, de temperatura o de presión osmótica. Las células animales no poseen dicha pared celular, lo que se convierte en una diana perfecta para la búsqueda de agentes antibacterianos¹. La estructura de la pared celular está formada por un copolímero denominado peptidoglucano que a su vez está formado por una secuencia alternante de *N*-acetil-glucosamina y ácido *N*-acetil-murámico, en donde éste último va enlazado con un pentapéptido, cuyos aminoácidos terminales son D-Ala-D-Ala. Esta clase de antibióticos actúa en distintas etapas de la síntesis de la pared celular y las dos principales clases son los **β -lactámicos** y los **glucopeptidos**⁴.

Los **antibióticos β -lactámicos** son un amplio grupo de antibacterianos que tienen en común un anillo β -lactámico, que es fundamental para su actividad terapéutica, y generalmente poseen otro anillo fusionado a éste, como se puede observar en la Figura 2, que a su vez varía en función de la familia. Todos los antibióticos β -lactámicos actúan en el último paso de la síntesis del peptidoglucano, e inhiben las reacciones de transpeptidación, teniendo como diana las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP), al tener una similitud estructural con la conformación adoptada por el fragmento D-Ala-D-Ala⁵.

Un primer grupo de β -lactámicos son las penicilinas, compuestos derivados del ácido 6-aminopenicilánico y en función de la cadena lateral que tenga unida a su grupo amino existen varios derivados (Figura 2a).

Otro grupo importante son las cefalosporinas que son una familia de antibióticos procedentes del hongo *Cephalosporium*. Derivan del ácido 7-aminocefalosporánico, teniendo en su estructura un anillo β -lactámico que también es fundamental para su actividad (Figura 2b). Existen hasta 5 generaciones en función de su espectro de acción⁵. Nuestro trabajo se centrará principalmente en la síntesis quimioenzimática de los antibióticos β -lactámicos.

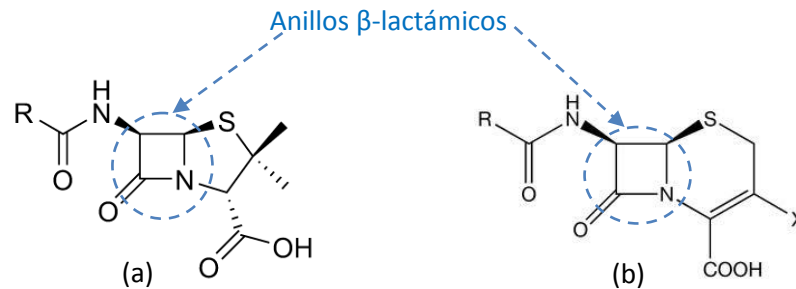


Figura 2. Estructura química de Penicilina (a) y Cefalosporina (b)

Un tercer grupo son los **carbapenemes** que están formados por un anillo β -lactámico unido a un anillo insaturado de cinco miembros donde el átomo de azufre se sustituye por uno de carbono⁵.

Los **glucopéptidos** son una clase de antibióticos que contienen un heptapéptido como estructura central, y entre los más utilizados se encuentra la **Vancomicina**⁶.

B) Antibióticos que actúan sobre la membrana plasmática o en la membrana externa de las Gramnegativas, alterando su permeabilidad

La mayoría son derivados lipopeptídicos procedentes de la fermentación de ciertos hongos y de bacterias. Tienen la capacidad de insertarse en las membranas lipídicas, afectando a los canales de iones, alterando así el equilibrio iónico del medio interno celular⁷. Son también llamados ionóforos.

La **valinomicina** es específica para los iones potasio, al poseer una estructura cíclica, actuando como un canal iónico. De forma similar actúan las **polimixinas**, que en su estado policatiónico desplazan los puentes de calcio y magnesio, aumentando así la permeabilidad de la membrana externa. El más utilizado es la **Polimixina B**⁴. Otros antibióticos más recientes son los **lipopéptidos cíclicos**, como la **Daptomicina**, que son lipopéptidos aniónicos procedentes de *Streptomyces roseoporus*⁷.

C) Antibióticos que inhiben la síntesis proteica

Se sabe que el ribosoma bacteriano es más pequeño que el de los mamíferos, y éstos están formados por dos subunidades llamados 30S (la subunidad pequeña) y 50S (la

subunidad grande). Existen distintos tipos de antibióticos que van a actuar en distintos puntos del ribosoma.

En primer lugar, se pueden mencionar a los **aminoglucósidos**, que contienen en su estructura un anillo de ciclohexano y aminoazúcares. Se unen a la subunidad 30S, a un lugar próximo al sitio catalítico del centro de decodificación, haciendo que los anticodones del ARNt no se unan con las parejas apropiadas de los codones del ARNm⁸. De forma similar, actúan las **tetraciclinas**, pero en este caso impide la incorporación del ARNt. Están formados por cuatro anillos a la que se unen diversas cadenas laterales⁶.

Por otro lado, existen antibióticos que se unen a la subunidad 50S del ribosoma, como por ejemplo el **cloranfenicol** que impide la fijación del aminoacil ARNt, inhibiendo así el movimiento del ribosoma sobre el ARNm⁴. Contiene una fracción de nitrobenzeno, y es un derivado del ácido dicloroacético. Otro antibiótico dentro de este grupo son los **macrólidos**, que llevan en su estructura química anillos de lactona de 12 a 22 átomos de carbono unidos por enlaces glucosídicos con uno o más azúcares⁸ e inhiben la transpeptidación y la translocación al bloquear el desprendimiento del peptidil-ARNt. También las **lincosaminas** actúan de forma similar a los macrólidos, inhibiendo la peptidiltransferasa. Además existen en este grupo unos antibióticos naturales que son las **estreptograminas** que tienen una estructura peptídica cíclica⁵. Y por otro lado, existe una nueva familia de antibióticos sintéticos que son las **oxazolidinonas**, que se utilizan contra bacterias resistentes. Se unen a la subunidad 50S antes de haberse unido a la subunidad 30S, impidiendo el proceso de traducción. El más utilizado es el **Linezolid**⁷.

D) Antibióticos que inhiben la síntesis de los ácidos nucleicos

Actúan inhibiendo la DNA polimerasa y la DNA helicasa o la RNA polimerasa, bloqueando así los procesos de replicación o transcripción, respectivamente.

En este grupo, nos encontramos con las **quinolonas**, que son fármacos sintéticos cuyo núcleo central es el anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína. Inhiben la actividad de las topoisomerasas bacterianas tras unirse al ADN. Los más utilizados son las quinolonas fluoradas como **Norfloxacin**⁹. Otra familia de antibióticos semisintéticos son las **rifamicinas**, que se fijan a la subunidad β de la ARN polimerasa, bloqueando la elongación del ARNm¹⁰. Y por último están los **nitroimidazoles**, compuestos heterocíclicos sintéticos que generan productos intermedios reactivos como aniones superóxidos, provocando daño celular en macromoléculas como el ADN y proteínas⁷.

E) Inhibición del metabolismo celular, antimetabolitos

Estos antibióticos son análogos estructurales a los metabolitos intermedios naturales, y por ello compiten con estos agentes en los distintos procesos metabólicos.

Por un lado, tenemos unos análogos estructurales del ácido *p*-aminobenzoico (PABA), las **sulfonamidas**, que compiten con la unión a la enzima dihidropteroato-sintetasa, el primer paso para la síntesis de los folatos, necesaria para la síntesis de los precursores de los ácidos nucleicos⁵. Y **trimetoprim** es un agente quimioterápico sintético que se une a la dihidrofolato reductasa, impidiendo así la síntesis de ácido fólico⁶.

IV – EMPLEO DE ENZIMAS EN LA SÍNTESIS DE COMPUESTOS CON INTERÉS TERAPÉUTICO

Biocatálisis

La biocatálisis se puede definir como la utilización de enzimas como biocatalizadores para obtener un producto a nivel industrial. Actualmente existe un gran interés en las industrias farmacéuticas por el empleo de dichos biocatalizadores en uno o varios pasos de la síntesis de un fármaco, ya que al tener una alta especificidad, no es necesaria la utilización de grupos protectores como ocurre con la síntesis química convencional, disminuyendo así las reacciones y aumentando el rendimiento del proceso y por otro lado se reduce la producción de residuos contaminantes. En este apartado, desarrollamos con más detalle las ventajas que nos brinda el empleo de la biocatálisis¹¹.

Existen dos maneras de trabajar con enzimas como biocatalizadores: utilizando enzimas aisladas o células enteras. El empleo de una u otra dependerá del tipo de reacción que queramos llevar a cabo y si la enzima precisa de un cofactor para llevar a cabo la reacción.

- **Enzimas aisladas:** se utilizan fundamentalmente cuando la enzima no requiere cofactores¹². En estos casos se logra también una mayor productividad debido a la mayor tolerancia a la concentración de sustrato que en un medio celular¹³.
- **Células enteras:** cuando la enzima sí que requiere el uso de uno o varios cofactores se utilizan células enteras donde se puede aprovechar la maquinaria enzimática celular para la recuperación del cofactor¹⁴.

Los tipos de enzimas más importantes que se pueden emplear para la biocatálisis a nivel industrial son:

- **Hidrolasas:** son las enzimas más ampliamente utilizadas. Catalizan la ruptura hidrolítica de enlaces principalmente del tipo C-O, C-N, C-C y en algunos casos P-O, constituyendo aproximadamente un 80% de todas las enzimas utilizadas en los

procesos industriales¹⁵. Dentro de este grupo de enzimas, a su vez existen varios tipos, de los cuales los más utilizados son:

- Lipasas: son enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis de grasas. Además, en sistemas no acuosos pueden catalizar las reacciones de esterificación y transesterificación, que están siendo ampliamente utilizadas para la síntesis de compuestos con actividad terapéutica¹⁶.
 - Proteasas: son enzimas que hidrolizan las cadenas polipeptídicas de las proteínas. Son también enzimas hidrolíticas importantes y muy estudiadas, no solo por su interés en los procesos metabólicos celulares, sino también a nivel industrial¹⁷.
 - Penicilin G acilasas: enzima que hidroliza penicilinas y cefalosporinas naturales y por otro lado, sintetiza otros derivados β -lactámicos. Al final de este apartado, describimos con detalle las condiciones de utilización de esta enzima.
- Oxidoreductasas: es una enzima que cataliza la oxidación o reducción del sustrato utilizando para ello un cofactor.

El empleo de todas estas enzimas aporta una serie de ventajas inherentes a su utilización:

- 1) Las enzimas son eficientes catalizadores: normalmente la velocidad de reacción de los procesos mediados por enzimas está incrementada 10^8 - 10^{10} veces (incluso en algunos casos 10^{17} veces) en comparación con las reacciones no catalizadas por enzimas. Por ello, las concentraciones empleadas en las biocatalizaciones suelen ser cantidades pequeñas.
- 2) Las reacciones enzimáticas son altamente compatibles con el medio ambiente: las enzimas, a diferencia de los metales pesados, son agentes benignos para el medio ambiente, ya que son biodegradables.
- 3) Se puede trabajar en condiciones suaves: las enzimas actúan en un rango de pH entre 5-8, a una temperatura entre 20 – 40°C (preferiblemente a 30°). De esta manera se puede minimizar los efectos indeseados típicos de las reacciones tradicionales como la descomposición, isomerización, racemización y la reestructuración de los productos¹⁸.
- 4) Se puede conseguir una alta selectividad: quimio, regio y y enantioselectividad. Esta es una de las características más deseables de las enzimas, ya que al ser catalizadores quirales, pueden reconocer cualquier tipo de quiralidad presente en el sustrato una vez que se forma el complejo sustrato-enzima¹².
- 5) Las enzimas pueden realizar reacciones multienzimáticas en un mismo medio: puesto que las enzimas funcionan generalmente en las mismas o en unas condiciones

similares, varias reacciones biocatalíticas pueden llevarse a cabo a través de una reacción en cascada, todo ello en el interior de un mismo matraz. Por lo tanto, las reacciones secuenciales son viables mediante el uso de sistemas multienzimáticos, con el fin de simplificar los procesos catalíticos, especialmente si se puede omitir el aislamiento de algún intermediario inestable. Por otro lado, en una reacción con un equilibrio desfavorable, puede ser desplazado hacia el producto deseado, conectando todos esos pasos enzimáticos consecutivos.

- 6) Las enzimas poseen una gran versatilidad: no están restringidas únicamente a su actividad fisiológica en el interior de las células, sino que también se pueden utilizar con una gran variedad de sustratos no naturales, y no es necesario trabajar en medios acuosos, también puede realizar su actividad en medios orgánicos¹⁸.

Química Verde

Por otro lado, en varios estudios se ha demostrado que la biocatálisis se puede marcar dentro de lo que se denomina "química verde" o "sostenible". Es un campo de estudio que emergió a inicios de 1990, el cual pretende implementar procesos ecológicos dentro de la industria química. Se define como "el diseño de productos y procesos químicos que reducen o eliminan la generación de residuos y sustancias tóxicas". La química verde está basada en 12 principios que en general pretenden dar un diseño ambientalmente benigno de productos y procesos^{19,20}. En la Figura 3, se puede observar un esquema de estos 12 principios que rigen la química verde.

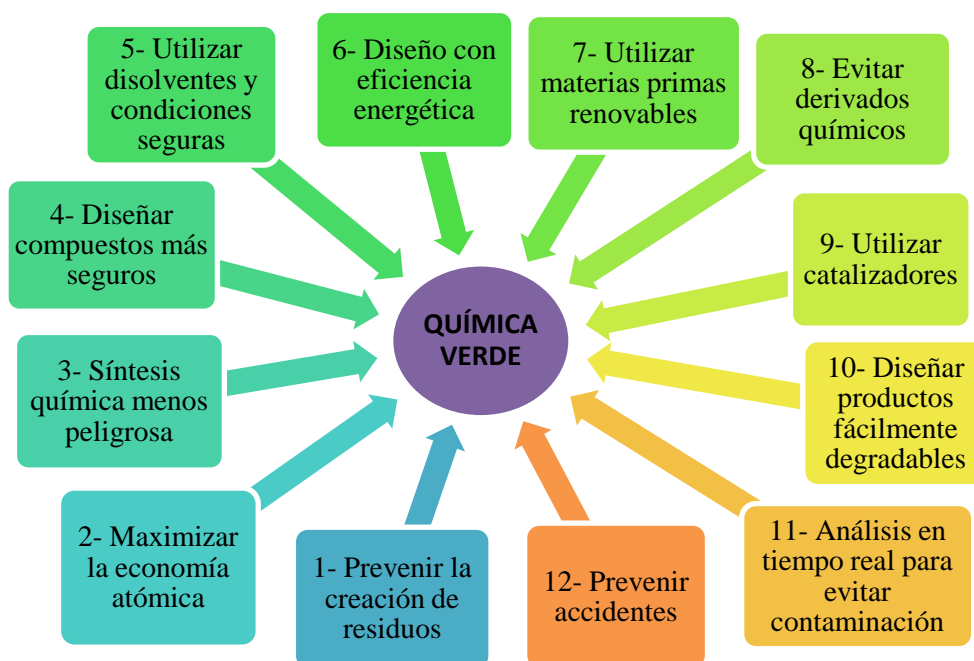


Figura 3. Los 12 principios que rigen la química verde

Penicilin G acilasa

Penicilin G acilasa (PGA) es una de las enzimas más importantes en la biocatálisis, tanto por su uso a nivel industrial como por la cantidad de estudios académicos que se han llevado a cabo²¹. Es una proteína heterodimérica que consiste en una pequeña subunidad α y otra subunidad grande β y está formada a partir del procesamiento de un simple precursor polipeptídico. La PGA pertenece a la familia de hidrolasas con un residuo nucleofílico en la región *N*-terminal y estos residuos catalíticos pueden ser serina, cisteína o treonina. Inicialmente la enzima reconocerá la zona donde se encuentran los residuos hidrofóbicos del sustrato (fenil-, piridil-, tetrazolil-, CN-, etc)¹³. La actividad principal de la enzima PGA por excelencia es la hidrólisis de las penicilinas y cefalosporinas naturales (penicilina G y cefalosporina G) para obtener los sintones (Ácido 6-aminopenicilánico, 6-APA; Ácido 7-amino-3-desacetoxicefalosporánico, 7-ADCA) necesarios para llevar a cabo la síntesis de nuevos antibióticos empleando esta misma enzima²².

En general las Penicilin G acilasas se pueden aislar a partir de una gran variedad de microorganismos, principalmente en bacterias pertenecientes a las familias *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, etc²³. Su función natural en las bacterias no está muy definida, se ha sugerido que podría participar en la hidrólisis de compuestos fenilacetilados para generar ácido fenilacético, el cual sería utilizado como fuente de carbono²¹.

Esta enzima se pueden emplear de forma libre o inmovilizada, siendo más ventajosa ésta última. La inmovilización es una técnica que fija una enzima en un material insoluble en un sistema de reacción, permitiendo su reutilización y obteniendo así una productividad mayor a menor coste²⁴. Este tipo de derivados inmovilizados han sido utilizados para la obtención de distintos antibióticos β -lactámicos, mejorando así la productividad del proceso, como por ejemplo la producción de 6-APA, cuya productividad es de 600Kg por cada Kg de enzima¹⁹.

Una de las estrategias que se han utilizado para la inmovilización de este tipo de enzimas ha sido su cristalización sobre un material soporte seguido de un posterior entrecruzamiento con glutaraldehído (Cross-linked enzyme Crystals o CLECs). Con esta estrategia las enzimas presentan una alta tolerancia a las soluciones orgánicas y ha sido utilizada tanto para la hidrólisis como para la síntesis de los antibióticos β -lactámicos²⁵. Otra estrategia de inmovilización de la penicilin G acilasa obtenida de *E. coli*, que surgió más tarde, es el agregado enzimático entrecruzado (Cross-linked enzyme aggregates o CLEAs) que se obtiene por adhesión física con un posterior entrecruzamiento con glutaraldehído. Se ha visto que con este tipo de inmovilización, se obtiene una productividad más eficiente en la síntesis enzimática de ampicilina en medio acuoso siendo controlada cinéticamente, tanto en disolventes polares como apolares²⁶.

V – SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE COMPUESTOS ANTIINFECCIOSOS

Los antibióticos β -lactámicos, especialmente las penicilinas y las cefalosporinas, representan una gran parte dentro del mercado biotecnológico, constituyendo hasta un 65% de todos los antibióticos producidos a nivel industrial. Además, la consumición anual de la enzima PGA se estima que comprende en un intervalo entre 10-30 millones de toneladas. Las industrias que producen antibióticos β -lactámicos empezaron a introducir la biocatálisis con PGA en las últimas dos décadas, reemplazando los múltiples pasos que había que realizar en la forma convencional obteniendo así productos mucho más económicos, con una eficiencia del 80-90%¹³.

Existen dos diferentes estrategias para realizar una síntesis enzimática de antibióticos β -lactámicos: por una reacción termodinámica a través de una condensación directa, o una síntesis controlada cinéticamente, siendo catalizada por la enzima PGA, y activada por un grupo donador (éster o amida)²⁵.

- 1) Síntesis controlada termodinámicamente: cuando se usa la PGA en esta síntesis, el grupo carboxilo y el grupo amino del anillo β -lactámico del síntón, deben ser neutros, para que puedan reaccionar con la enzima. En este caso, el rendimiento está determinado por el equilibrio termodinámico, y por lo tanto, es independiente de las propiedades enzimáticas. Sin embargo, siguiendo esta estrategia, se debe utilizar derivados enzimáticos muy estables, ya que la reacción se llevará a cabo en condiciones muy drásticas, que pueden deteriorar las propiedades de la enzima. Además, la pérdida de la actividad enzimática en presencia de cosolventes orgánicos, supone otro gran inconveniente en esta síntesis²⁷.
- 2) Síntesis controlada cinéticamente: un precursor con un grupo ácido activado (como éster o amida) reacciona con el núcleo β -lactámico del síntón a través de una reacción catalizada por PGA obteniéndose como producto el antibiótico deseado, tras la adición de alcohol o amonio. En este caso, sí que depende de las propiedades enzimáticas y el rendimiento de este tipo de síntesis depende del equilibrio de tres diferentes procesos cinéticos que son catalizados por la misma enzima, que son representados en la figura 4.

- 1) La síntesis de compuestos β -lactámicos
- 2) La hidrólisis de donadores acilo
- 3) La hidrólisis de antibióticos sintetizados

Evidentemente, los resultados obtenidos dependen de las propiedades catalíticas de la enzima empleada. Sin embargo, las condiciones experimentales para este

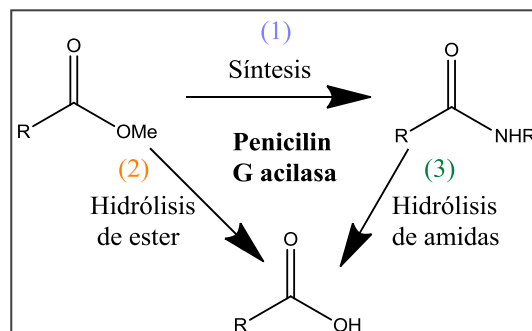


Figura 4. Síntesis controlada cinéticamente por PGA

enfoque han hecho que esta última estrategia sea la más popular, ya que es posible el uso de derivados enzimáticos no estabilizados o incluso enzimas solubles²⁸.

En este apartado, analizamos los procesos industriales con los que se lleva a cabo la síntesis de distintos productos intermediarios como 6-APA, 7-ADCA y 7-ACA, y como se pueden obtener los distintos derivados penicilánicos y cefalosporánicos a partir de estos intermedios.

1) Obtención de 6-APA y 7-ADCA

Para empezar, hay que realizar una hidrólisis partiendo de penicilinas naturales como la Penicilina V o Penicilina G utilizando la enzima PGA donde se elimina su radical arilo, obteniendo así un compuesto intermedio que es 6-APA, como se representa en la Figura 5.

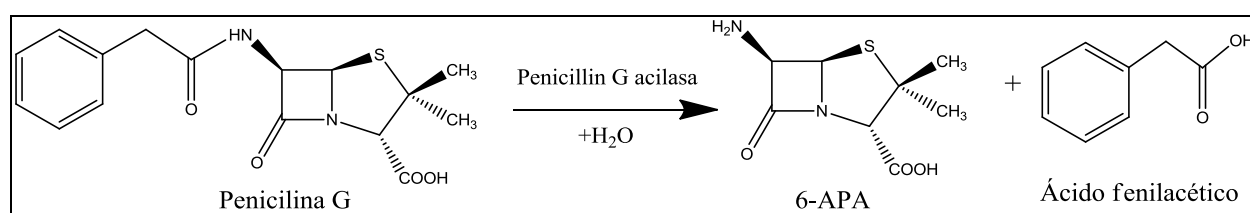


Figura 5. Síntesis enzimática de 6-APA

Para la obtención de 6-APA la compañía Unifar (Turkia) ha puesto a punto una estrategia biocatalítica donde utiliza la PGA de *E. coli* inmovilizada en un polímero funcionalizado por grupos epóxidos, el Eupergit C. El proceso enzimático se lleva a cabo a un pH de 8 a una temperatura entre 30-35°C, y como productos de reacción se obtiene el ácido fenilacético que puede ser eliminado por extracción y 6-APA que se purifica por cristalización²⁹, como se representa en la Figura 6.

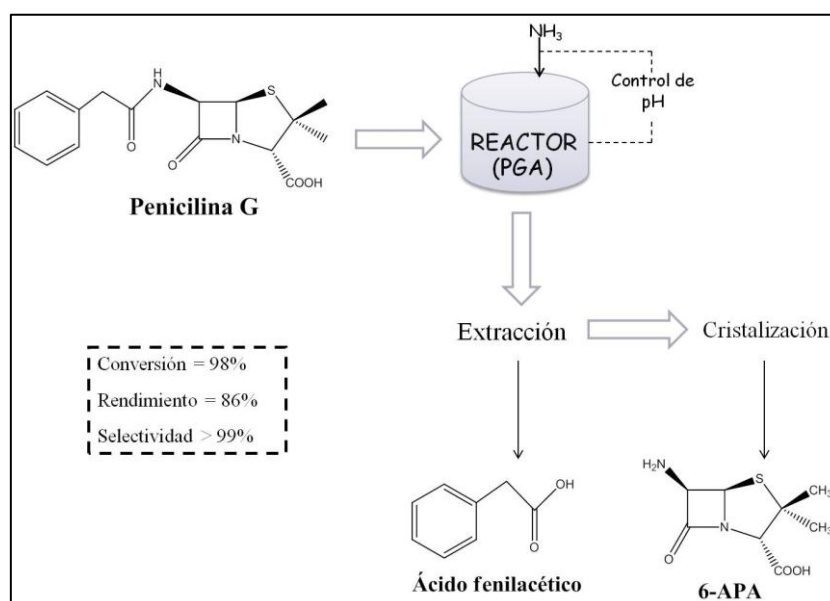


Figura 6. Proceso de una síntesis enzimática de 6-APA, realizado en Unifar

La enzima inmovilizada se puede recuperar mediante la utilización de un filtro de tamaño molecular específico. La actividad residual del biocatalizador después de 800 ciclos disminuye hasta un 50% respecto a la actividad inicial. El tiempo de reacción es de 1 hora y media (promedio de 800 ciclos, aunque inicialmente es de 1 hora). Este proceso se consiguió por primera vez en 1973. La producción se lleva a cabo durante 300 días por año con una producción media de 12,8 lotes por día.

Otra compañía a tener en cuenta para la obtención de 6-APA es Asahi Kasei Chemicals Corporation (Japón), que en este caso se obtiene la PGA de *Bacillus megatarium*, inmovilizada con soporte sólido de fibras de poliacrilonitrilo (PAN). La producción, como se puede observar en la Figura 7, se lleva a cabo en un reactor en recirculación con un pH de 8,4 entre 30-36°C en medio acuoso, formado por 18 columnas paralelas donde se encuentra la enzima inmovilizada. Cada columna tiene un volumen de 30 L y en ellas se trabaja a una velocidad de flujo de 6000L/h. Cada ciclo dura 3 horas y el tiempo de vida media de cada columna es de 360 ciclos. La purificación de 6-APA se realiza por precipitación isoeléctrica, a un pH de 4,2 con la subsiguiente filtración y lavado con metanol.

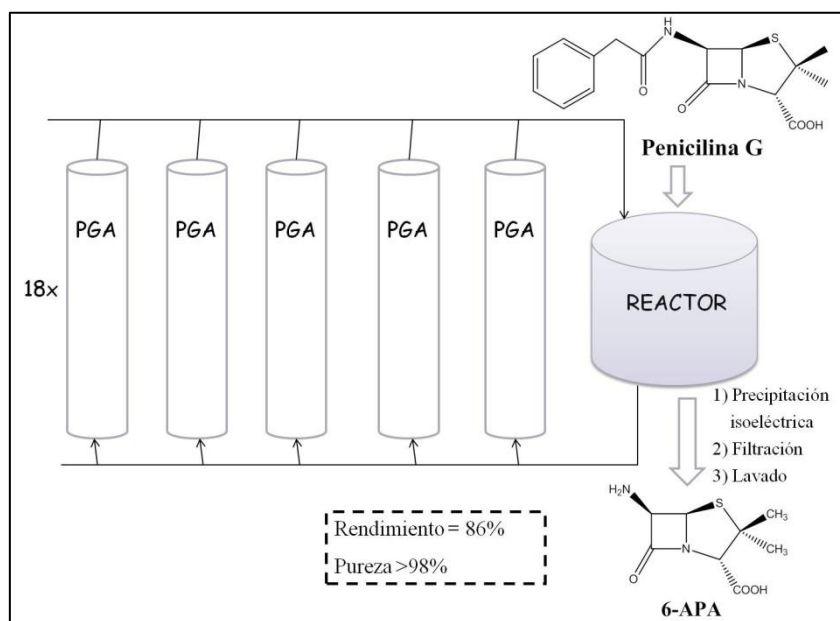


Figura 7. Proceso de una síntesis enzimática de 6-APA, realizado por Asahi Kasei Co.

También cabe mencionar a la compañía Dr. Vig Medicaments (India), que utiliza para obtener el intermedio 6-APA la PGA de *E. coli* o de *Arthrobacter viscosus* inmovilizada en un soporte sólido y con unas condiciones de reacción a pH=8 a 37°C en medio acuoso. Este proceso se lleva a cabo en un reactor de tanque agitado de 2000L de capacidad, y está equipado con un tamiz en la parte inferior, para retener esa enzima inmovilizada. Utilizan también este mismo proceso para la obtención del intermediario 7-ADCA, pero en este caso, en vez de partir con Penicilina G, se parte de Cefalosporina G, como se representa en la Figura 8²⁹.

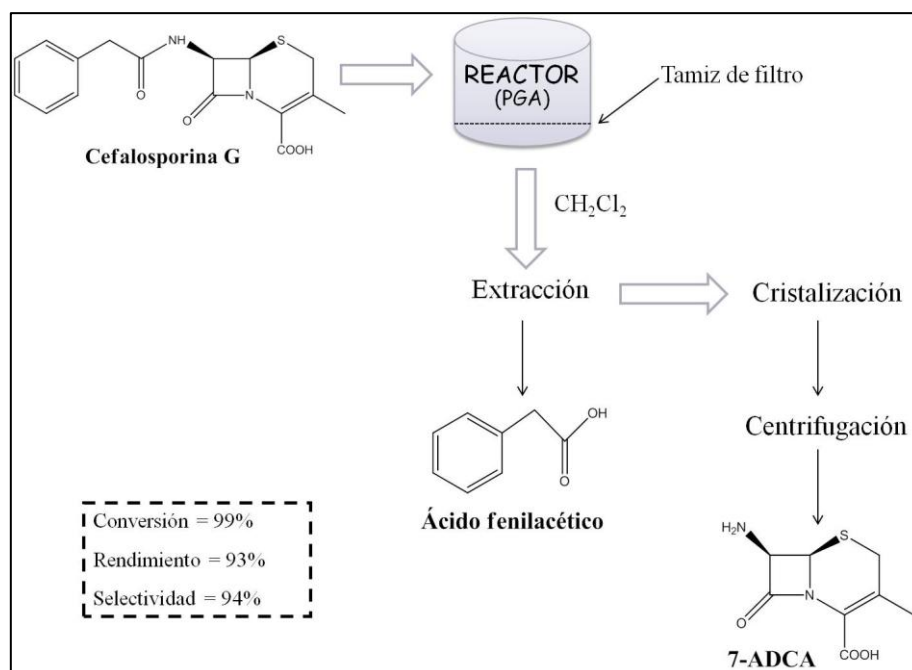


Figura 8. Proceso de una síntesis enzimática de 7-ADCA, realizado en Dr. Vig Medicaments

2) Obtención de 7-ACA

Para el caso de la obtención del producto intermedio 7-ACA por síntesis enzimática, anteriormente se creía que era un proceso imposible de realizar, hasta que en 1973 una empresa japonesa llamada Toyo Jozo, con la colaboración de Asahi Kasei Chemicals, lograron desarrollar de forma exitosa la producción de 7-ACA en dos pasos enzimáticos, a partir de la Cefalosporina C. El proceso químico, requiere una alta purificación de la cefalosporina C como materia bruta, sin contar con el gran número de reacciones que se deben llevar a cabo en unas condiciones de -40 a -60°C , siendo un proceso largo. Además, se deben utilizar reactivos contaminantes como PCl_5 , NCl_3 y piridina, lo que pueden causar problemas medioambientales. Para llevar a cabo el proceso, la compañía Sandoz AG (Alemania) llevó a cabo un primer paso de desaminación oxidativa a partir de la Cefalosporina C. Esta compañía realiza dicho proceso desde 1996, utilizando como primera enzima D-aminoácido oxidasa procedente de *Trijonopsis variabilis*, en unas condiciones de pH de 7,3 a una temperatura de 25°C . El volumen del reactor puede llegar a 10000 L, y el tiempo de reacción es de 1,5 horas. Posteriormente tiene lugar una descarboxilación en presencia de H_2O_2 , obteniendo como producto glutaril 7-ACA como se puede observar en la Figura 9.

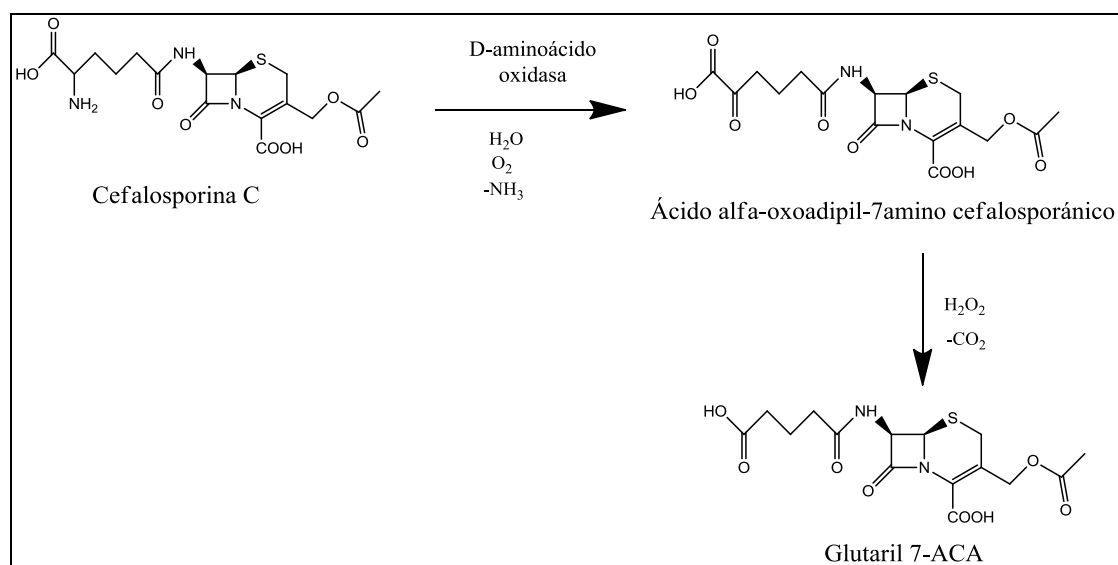


Figura 9. Síntesis enzimática de Glutaril 7-ACA

Después, se realiza el 2º paso, que se trata de una reacción de hidrólisis de la amida de glutaril 7-ACA, utilizando para ello la enzima glutaril amidasa. Como productos de reacción se obtiene 7-ACA y ácido glutárico. Este proceso se lleva a cabo en Sanofi Aventis (Francia) desde 1996. La glutaril amidasa se obtiene de *E.coli* y se inmoviliza en un soporte de partículas sólidas para poder reutilizarse, en unas condiciones de pH 8,3 a una temperatura de 30°C (Figura 10). El volumen del reactor puede llegar a 10000 L, y el tiempo de reacción es de 1,5 horas.

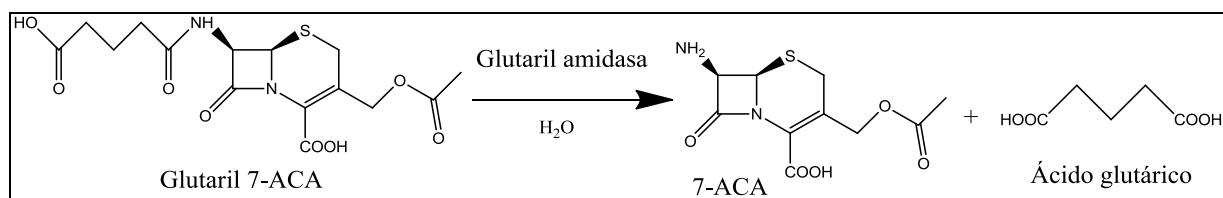


Figura 10. Síntesis enzimática de 7-ACA

Esta segunda etapa también lo ha puesto a punto de forma distinta la compañía Toyo Jozo y Asahi Kasei Co. (Figura 11). La glutaril amidasa se obtiene a partir de las *Pseudomonas*, y es inmovilizada por adsorción en una resina de intercambio iónico de estireno poroso con un posterior entrecruzamiento con 1% de glutaraldehído.

El ácido glutárico liberado es un inhibidor de la glutaril amidasa y adicionalmente disminuye el pH. Por ello el pH debe estar controlado por un titulador automático (autotitrador). El proceso, como se representa en la Figura 15, se realiza a un pH entre 7,5 y 8,5 y comienza a una temperatura de 15°C. Para compensar la desactivación de la enzima durante el proceso, se aumenta gradualmente la temperatura hasta 25°C. Después de 70 ciclos, la enzima es reemplazada. El sistema de reacción se mantiene con una velocidad de flujo de 10000L/h y tiene una duración de 4 horas por ciclo, consiguiendo un rendimiento del 95%²⁹.

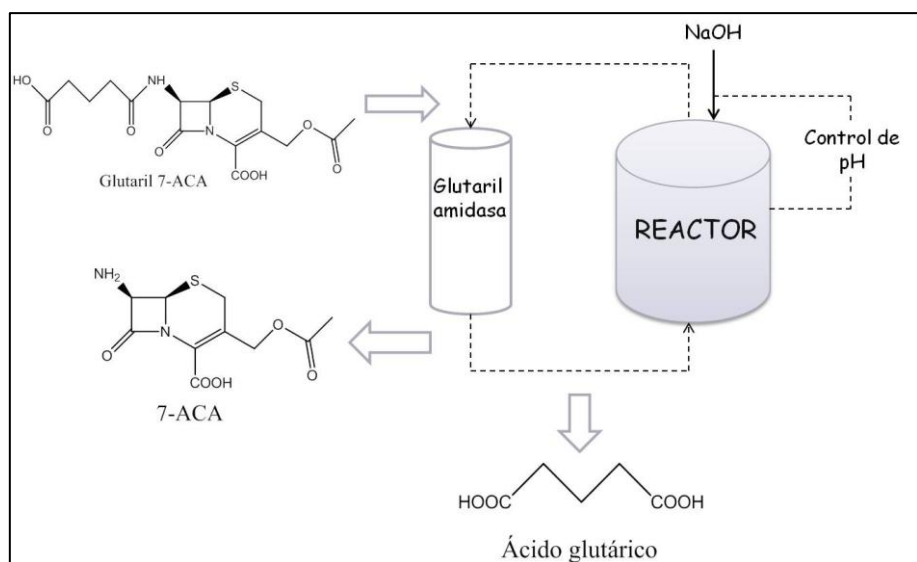


Figura 11. Proceso de una síntesis enzimática de 7-ACA, realizado por Toyo Jozo y Asahi Kasei Co.

Con la síntesis enzimática de 7-ACA conseguimos obtener varias ventajas respecto a la vía química:

- 1) Se reduce el número de pasos o reacciones.
- 2) Se evita tanto el uso de metales ($ZnCl_2$) como de hidruros clorados.
- 3) Menos problemas de inflamabilidad.
- 4) La emisión de gases se reduce de 7,5 a 1 Kg.
- 5) Los líquidos residuales también se reducen de 29 toneladas a 300 kg.
- 6) El Zn residual recuperado como $Zn(NH_4)PO_4$ disminuye de 1,8 toneladas a 0.
- 7) Los costes de protección medioambiental se reducen en un 90% por cada tonelada de 7-ACA.

Pero a pesar de resolver los problemas respecto a la seguridad medioambiental, la síntesis enzimática de 7-ACA sigue siendo un proceso muy costoso y además no se obtiene una producción industrial tan efectiva. Más tarde, se consiguió disminuir las 2 reacciones enzimáticas para la síntesis de 7-ACA en una sola reacción a través de una mutagénesis que se realiza sobre la enzima Penicilin G acilasa procedente de las *Pseudomonas*, para modificar la especificidad del sustrato. Esto se consideró un gran logro en la productividad a nivel industrial del producto intermedio 7-ACA, pero todavía está lejos de aplicarse dicho proceso, ya que no es rentable económicamente³⁰.

3) Síntesis de antibióticos β -lactámicos a partir de 6-APA y 7-ADCA

Para la obtención tanto de los derivados penicilánicos como cefalosporánicos, la compañía DSM (Países Bajos) diseñó unos procesos para la síntesis de Cefalexina, Ampicilina y

Amoxicilina. En primer lugar, describiremos el proceso para sintetizar enzimáticamente el antibiótico β -lactámico **Cefalexina**.

En la Figura 12, se puede observar la síntesis de **Cefalexina**, que fue la primera síntesis lograda con éxito, partiendo del intermedio 7-ADCA y haciéndolo reaccionar con D-Fenilglicinamida, empleando como biocatalizador la penicilin G acilasa obtenida de *E. coli*, inmovilizada con células enteras o enzimas aisladas. También se puede obtener la enzima a partir de las cepas *Klyveromyces citrophila* y *Bacillus megaterium*.

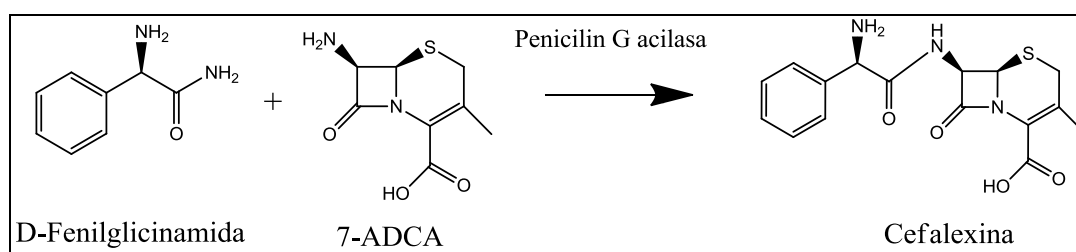


Figura 12. Síntesis enzimática de Cefalexina

El proceso se lleva a cabo con una extracción en continuo del producto, para aumentar el rendimiento del proceso, como se puede observar en la Figura 13. La enzima se inmoviliza por unión covalente a un material soporte (gelatina).

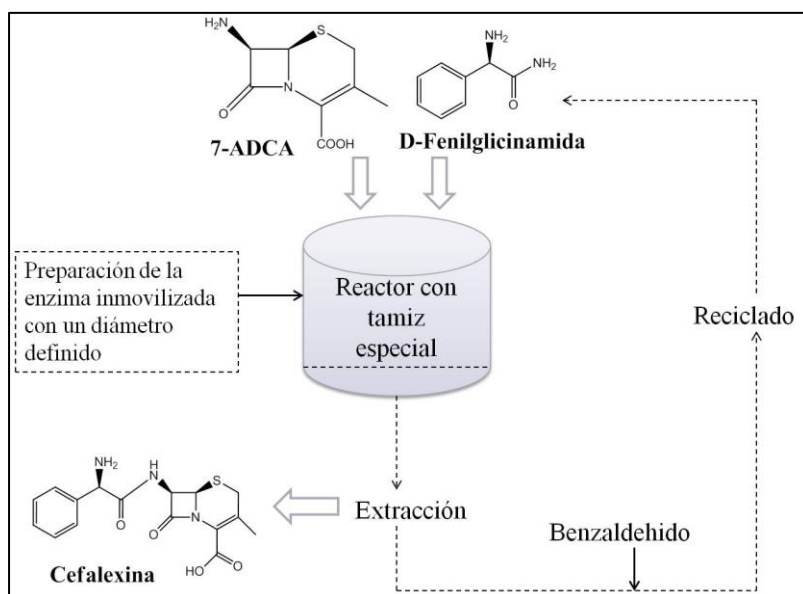


Figura 13. Proceso de una síntesis enzimática de Cefalexina, realizado por DSM

Como consecuencia, el catalizador se vuelve insoluble y se puede recuperar fácilmente utilizando un tamiz especial colocado al fondo del reactor, que es impermeable a la enzima inmovilizada. La PGA no acepta aminoácidos cargados, por lo que no se puede usar la D-fenilglicina directamente, ya que al pH en el cual el grupo carboxilo está

protonado también lo estará el grupo amino. Por ello es necesario emplear derivados con grupos amida o ester. Para conseguir una alta cantidad de producción y un alto rendimiento, debe añadirse un exceso de concentración de D-fenilglicinamida. La parte que no ha reaccionado puede ser separada y reciclada para utilizarse de nuevo. Para ello se añade benzaldehído que con D-fenilglicinamida forma una base de Schiff muy poco soluble que

puede ser filtrada y posteriormente separada de la enzima. Una estrategia para estabilizar la cefalexina obtenida es añadir un agente (β -naftol) que forma un complejo que se cristaliza, llegando a alcanzar un rendimiento mayor del 90%.

Se puede realizar el mismo proceso para obtener derivados penicilánicos como la **Ampicilina**. Pero en comparación con la cefalexina, al tener la ampicilina una mayor solubilidad, hay que cambiar la estrategia de separación para no perder tanto producto. (Figura 14).

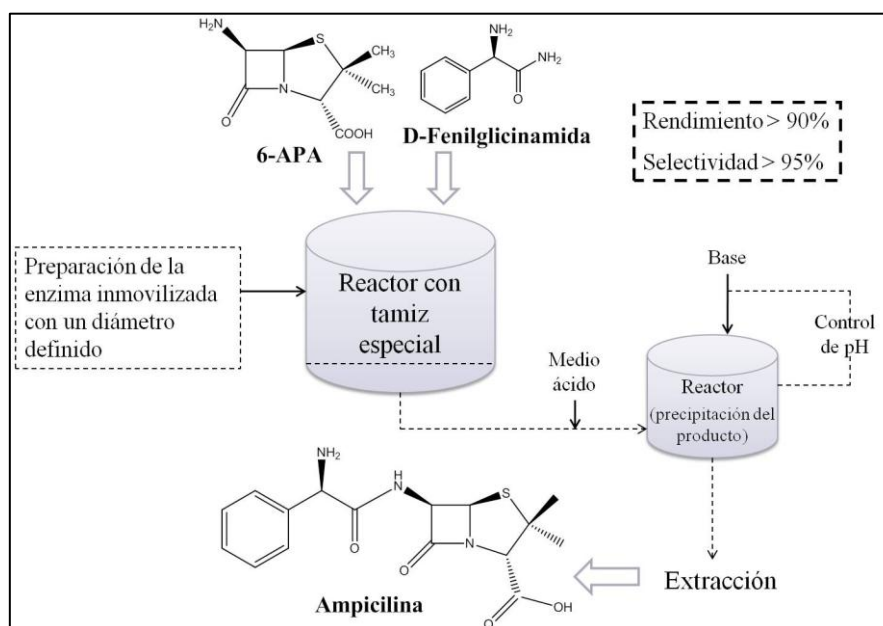


Figura 14. Proceso de una síntesis enzimática de Ampicilina, realizado por DSM

Un inconveniente es que los derivados del ácido penicilánico son más sensibles a la degradación respecto a los derivados del ácido cefalosporánico en casi todos los valores de pH, y por ello la conversión de 6-APA ha de ser completa y el producto debe ser recuperado lo más rápido posible por cristalización. La ampicilina precipitada y los cristales de D-fenilglicinamida son disueltos en un medio con un pH ácido. La ampicilina pura se precipita mediante el ajuste del pH a su punto isoeléctrico y posteriormente se procede a su extracción. La biocatálisis puede ser retenida en un reactor con un tamiz con un tamaño de poro específico, de forma similar al método de obtención de cefalexina.

De una manera similar se puede obtener la **amoxicilina**, pero en este caso se parte de D-hidroxifenilglicinamida (D-HPGA) como se representa en la Figura 15. La ventaja en este caso es la baja solubilidad del producto en las condiciones de reacción, de modo que no se produce la hidrólisis del producto, ya que antes se precipita. Gracias a esta particularidad, el exceso de D-HPGA a través de un sistema semicontinuo puede ser enviado de nuevo al reactor con tamiz²⁹.

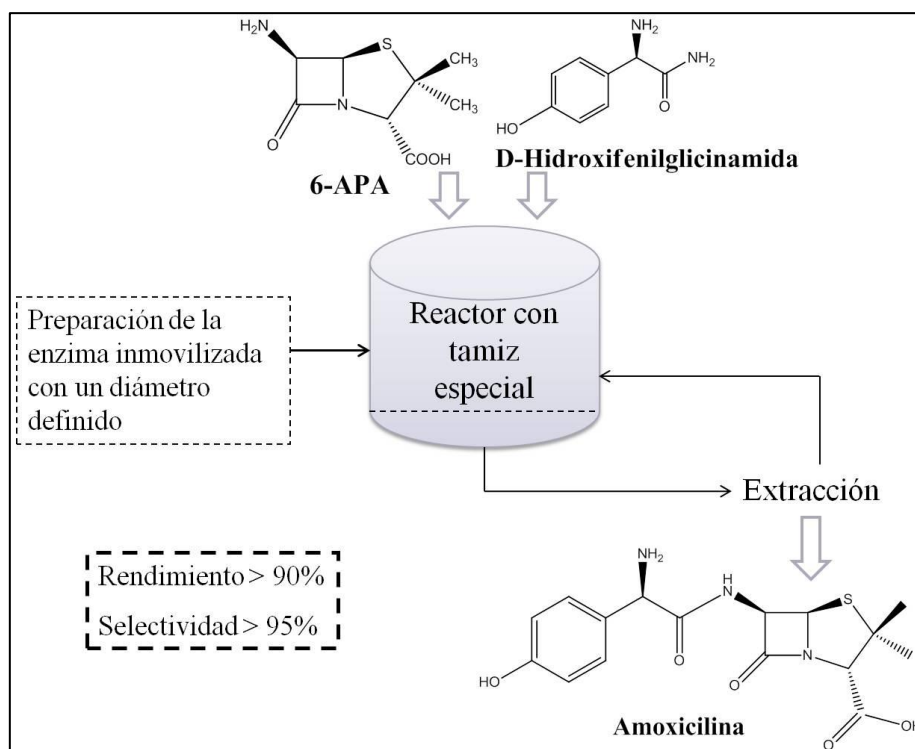


Figura 15. Proceso de una síntesis enzimática de Amoxicilina, realizado por DSM

VI- CONCLUSIÓN

Con todos los ejemplos mostrados en el presente trabajo, queda demostrado la gran utilidad de los biocatalizadores para la obtención de antibióticos β -lactámicos, en comparación con la síntesis química tradicional, no solo por las ventajas medioambientales que nos aporta la síntesis enzimática, sino también por la alta productividad que se obtiene utilizando dichos procesos. Como hemos descrito, puede llevarse a cabo la preparación de los 3 sintones importantes en los anillos β -lactámicos (6-APA, 7-ADCA, 7-ACA) y la posterior síntesis de los principales antibióticos β -lactámicos (Cefalexina, Ampicilina, Amoxicilina) mediante estrategias biocatalíticas.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 – Cordiés, L.; Looney, A.M.; Principios generales de la terapéutica antimicrobiana; *Acta Médica*, 8(1), 13-27, **1998**
2. Gennaro, A.; Remington Farmacia. Vol 2. 20th ed. Buenos Aires: *Médica Panamericana*, **2003**
3. Cué Brugueras, M.; Morejón García, M.; Antibacterianos de acción sistémica. Parte I. Antibióticos β -lactámicos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 14(4), 347-61, **1998**
4. Graham, P.; Introduction to Medicinal Chemistry. 3th ed. Unites States: Oxford, **1995**
5. Ruiz, V.A.; Guillén, S.M.; Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y Microbiología clínica. Vol 1. 2th ed. Buenos Aires: *Médica Panamericana*, **2006**
6. Prescott, L.M.; Harley, J.P.; Klein, D.A.; Microbiología. 7th ed. Madrid: *McGraw Hill*, **2008**
7. Martínez, J. A.; Sánchez, F. Mecanismo de acción de los antibióticos. *Jano*, (1660), 28-34, **2007**
8. Hernández, E.B.; Estructura y mecanismo de acción. *Acta Médica*, 8(1), 48-53, **1998**
9. Waxman, S.; Nitroimidazoles en medicina veterinaria. *Panorama Actual del Medicamento*, 28 (272), 315-318, **2004**
10. Flórez, J.; Armijo, A.J.; Mediavilla, A.; Farmacología Humana. 5th ed. Barcelona: Elsevier, **2008**
11. Montero, J.M.S.; Gago, J.V.S.; Biocatálisis aplicada a la química Farmacéutica. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 73(4), 1199-1236, **2007**
12. Seoane, G.; Gonzalez, D.; Schapiro, V.; Biotransformaciones - Una alternativa sustentable en síntesis orgánica. *Chemistry*, (11), **2004**
13. Chandel, A.K.; Rao, L.V.; Narasu, M.L.; Singh, O.V.; The realm of Penicillin G acylase in β -lactam antibiotics. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(3), 199-207, **2008**
14. Labora, M.; Aproximación quimioenzimática a la síntesis total de epoxienonas quirales naturales. Repositorio institucional de la Facultad de química, **2010**
15. León, A.R.A.; Montero, J.M.S.; Utilización de hidrolasas en la preparación de fármacos e intermedios homoquirales. *Real Academia Nacional de Medicina*, 76 (2), 259-305, **2010**
16. Gómez, G.I.G.; Ramos, M.D.; Pre-tratamiento de aguas residuales de la industria láctea con una lipasa inmovilizada. *Producción Más Limpia*, 8(2): 51-59, **2013**
17. Gupta, R.; Beg, Q.; Lorenz, P.; Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(1), 15-32, **2002**

18. Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*. 6th ed. Heidelberg: Springer; **2011**
19. Sandoval Barrantes, M.A.; Nuevas estrategias sostenibles para la síntesis enzimática de oligosacáridos y glycoconjugados de interés biológico, Tesis doctoral, **2013**
20. Castro, N.P.P.; Verbel, J.T.O.; *Química verde: Un nuevo reto – Green chemistry: A new challenge*. *Scielo*, **2011**
21. Hernáiz, M.J.; *Biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos (I) Enzimas hidrolíticas. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, **2012**
22. Maresova, H.; Plackova, M.; Grulich, M; Kyslik, P.; Current state and perspectives of penicillin G acylase-based biocatalyses. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(7), 2867-2879, **2014**
23. Grulich, M.; Stepanek, V.; Kyslik, P.: Perspectives and industrial potential of PGA selectivity and promiscuity. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1458-1472, **2013**
24. Gacesa, P.; Hubble, J.; *Tecnología de las enzimas*. Zaragoza: Acribia, S.A; **1990**
25. Arroyo, M.; De la Mata, I.; Acebal, C.; Castillon, M.P.; Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art. *Applied microbiology and biotechnological*, 60(5), 507-514, **2003**
26. Cao, L.; Van Rantwijk, F.; Sheldon, R.A.; Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Organic Letters*, 2(1), 1361-1364, **2000**
27. Giordano, R.C.; Ribeiro, M.P.; Giordano, R.L.; Kinetics of β -lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. *Biotechnology advances*, 24(1), 27-41, **2006**
28. Fernandez-Lafuente, R.; Rossel, C.M.; piatkowska, B.; Guisan, J.M.; Synthesis of antibiotics (cephaloglycin) catalyzed by penicillin G acylase: evaluation and optimization of different synthetic approaches. *Enzyme and microbial technology*, 19(1), 9-14, **1996**
29. Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C.; *Industrial Biotransformations*. 2th ed, Weinheim: Wiley-VCH; **2006**
30. Pollegioni, L.; Lorenzi, S.; Rosini, E.; Marcone, G.L.; Molla, G.; Verga, R.; Evolution of an acylase active on cephalosporin C. *Protein science*, 14(12), 3064-3076, **2005**