

9

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Tesis.

- PROCESO DE SEPARACION DEL ACIDO 6-AMINO
PENICILÁMICO PRODUCIDO POR HIDROLISIS
ENZIMÁTICA DE E. coli ATCC 11105*

CARRANCO ROSAS JOSE DANIEL

Q U Í M I C O

1 9 8 1



DEPTO. DE PATENTES Y
DISEÑOS PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E G E N E R A L

Cap.		Pag.
	RESUMEN	
1 -	INTRODUCCION	1
2.-	OBJETIVO	5
3.-	ANTECEDENTES	6
4.-	GENERALIDADES	
	4.1 Estructura y estabilidad de la penicilina	10
	4.2 Características fisicoquímicas del 6-APA.	17
	4.3 Preparación vía química del 6-APA.	19
	4.4 Transformación enzimática de penicilina a ácido 6-aminopenicilánico (6-APA).	22
	4.5 Descripción general del proceso desarrollado para producir 6-APA por vía enzimática.	26
	4.6 Métodos de separación reportados.	28
5.-	PROCESO DE SEPARACION PARA 6-APA DESARROLLADO	33
	5.1 Consideraciones teóricas para el proceso	35
	5.2 Materiales y Métodos	40
	5.3 Diseño del proceso	46
	5.4 Resultados	50
	5.5 Discusión	65
	5.6 Conclusiones	70
6.-	BIBLIOGRAFIA	75

R E S U M E N

La recuperación del 6-APA producido por hidrólisis de Benzilpen cilina mediante el uso de la enzima denominada penicilina amidasa de Saccharichia coli ATCC 11105 es influenciada por varios factores que comprenden, principalmente el tipo de impurezas presentes, las condiciones operacionales para evitar degradación del producto, concentración adecuada para cristalizar, así como el tamaño de los cristales, para obtener una eficiente recuperación del producto.

El proceso desarrollado es sencillo, fácil de escalar, habiendose aplicado a nivel de laboratorio y planta piloto, permitiendo recuperaciones de producto con alto grado de pureza lo cual fue confirmado con ensayos fisico-químicos del producto (vg. IR, RMN, etc.) y rendimientos de 80% a 95%.

1 Introducción

Actualmente el campo de los antibióticos ocupa una posición prominente por su impacto en la terapéutica médica en contra de enfermedades infecciosas, ya que además la producción y demanda de los antibióticos ha alcanzado niveles problemáticos, generados en su mayor parte por el gradual aumento de la población y la aparición de cepas resistentes a los antibióticos naturales.

Con los recientes avances en la tecnología de las transformaciones microbiológicas, es factible "mejorar" algunos antibióticos, incrementando su actividad, disminuyendo su toxicidad etc., mediante cambios en su estructura química.

La mayoría de las transformaciones microbianas conocidas, han permanecido sin uso práctico en este campo debido a que producen una parcial o completa inactivación del antibiótico.

La aplicación práctica más importante de las transformaciones microbianas en el campo de los antibióticos, es la hidrólisis selectiva del grupo amida de la "cadena lateral" de las penicilinas efectuada por la enzima penicilina amidasa, la cual se encuentra principalmente en algunas cepas de Escherichia coli, otras bacterias y en hongos:

La Benzilpenicilina o penicilina G, que es actualmente la más empleada como materia prima para la obtención de otras penicilinas, da como productos de hidrólisis ácido - fenilacetico y ácido 6-aminopenicilánico. este último tanto por el método químico como por el método enzimático. El ácido

6-aminopenicilánico (6-APA) es un sistema de anillos (lactama tiosolidina) Para que una penicilina presente actividad terapéutica debe presentar la estructura mencionada, o sea el llamado ácido 6-aminopenicilánico (6-APA).

A partir del ácido 6-aminopenicilánico se puede obtener una extensa serie de "penicilinas semisintéticas" mediante acilación con el cloruro de ácido deseado, por lo que el 6-APA, constituye una materia prima estratégicamente importante para producir antibióticos lactámicos semisintéticos.

Es posible producir el 6 APA mediante fermentación, proceso con rendimientos muy bajos, sin embargo este no es económicamente rentable para proceso industrial, por lo que el 6-APA se produce a partir de la penicilina-G, la cual se obtiene con altos rendimientos por fermentación empleando cepas industriales de hongos Penicillium notatum o Penicillium chrysogenum con altos rendimientos

Aunque actualmente se lleva a cabo la conversión química de bencil-penicilina a 6-APA; el proceso de transformación enzimática, es favorecido por una producción a gran escala del 6-APA ya que ésta garantiza una hidrólisis selectiva del grupo amida de la cadena lateral, bajo condiciones suaves, sin destruir la actividad del antibiótico

En general la preparación de "nuevos antibióticos se procesa, como se ilustra en el siguiente diagrama.

6-aminopenicilánico en las condiciones más adecuadas para nuestro país. Realizado el estudio de mercado en el proyecto COMACTT - I.I.B.M. de la U.N.A.M. (60), se encontraron perspectivas para el consumo de las penicilinas semisintéticas por lo que se procedió a desarrollar el proceso ensimático.

2. Objetivos:
 Objetivo General.

- Describir las metodologías existentes para producir el ácido 6-aminopenicilínico (6-APA), compuesto estratégico para fabricar cualquier penicilina semisintética, con el fin de conocer las dificultades y diferencias de estos métodos, tanto por el proceso químico usado actualmente por la industria como por el proceso enzimático desarrollado en el I.I.B.M. de la U.N.A.M., del cual el presente trabajo es una contribución.

Objetivos específicos.

- Presentar la metodología general para producir el 6-APA por el sistema enzimático.

- Desarrollar un proceso de separación para el 6-APA con alto grado de pureza y rendimiento a partir de la mezcla resultante de la acción hidrolítica de la enzima penicilina amidasa de Escherichia coli --- ATCC 11105, ya sea parcialmente purificada e inmovilizada en un polímero llamado amberlita, o por la célula completa inmovilizada en un soporte gelante, formado por el biopolímero carragenina. Señalar las dificultades encontradas por algunos investigadores para realizar la separación del 6-APA preparado por métodos similares, e ilustrar algunos de estos métodos de separación.

3. Antecedentes

El primer descubrimiento del fenómeno de antagonismo microbiano fue logrado por Pasteur y Joubert en 1867, quienes encontraron que una bacteria aislada del aire tenía la propiedad de inhibir el crecimiento del bacilo antrax. De esta forma se inició el reconocimiento de las potencialidades terapéuticas de este fenómeno de antagonismo, así se describieron numerosos ejemplos de bacteria contra bacteria, bacteria contra levadura y hongos, hongos contra bacterias, etc., en gran número de estos casos, la acción antagónica se debía a la producción de metabolitos antimicrobiales, a los que se les bautizó como "antibióticos".

Fleming fue el primero en detectar la penicilina, años después Chain et al (2) reportaron la primera preparación de penicilina relativamente pura. En 1943 se dió a conocer la estructura de la penicilina -- (1). Posteriormente Moyer y Coghill, informaron que en los medios de fermentación de Penicillium Chrysogenum, no se obtenía una sola penicilina sino varias en concentraciones relativamente bajas (2) y (4) a las que se les denominó como penicilinas naturales (tabla 1).

Para el año de 1940 Abraham y Chain habían descubierto que las penicilinas naturales eran inactivas por una enzima bacteriana denominada como penicilinasasa δ β -lactamasa (5).

La penicilina fué introducida al campo de la medicina durante la Segunda Guerra Mundial, el éxito de este empresa fué debido en gran parte al rápido desarrollo de un proceso de fermentación para la producción del antibiótico a gran escala, y de la selección de ce-

pas Penicillium chrysogenum hiperproductoras de antibiótico (1).

Los antibióticos β -lactámicos están disponibles para su aplicación en el campo de la medicina en virtud de la síntesis microbiana.

Biológicamente es raro encontrar el sistema de anillos lactama-tioazolidina, sin embargo existe prominentemente en productos naturales, difíciles de sintetizar químicamente, por lo que la mejor forma de obtenerlos es por biosíntesis, empleando microorganismos.

El año de 1950 Sakaguchi y Murao reportaron la conversión microbiana de la bencilpenicilina a el ácido fenil-acético y otra sustancia descrita como "Pencin" (6). La caracterización de este compuesto como el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), fué en el año 1955. Sin embargo, hasta 1959 se pudo obtener por primera vez 6-APA en forma cristalina a partir de un medio de fermentación de Penicillium chrysogenum (7) y (8).

Sakaguchi y Murao fueron los primeros en establecer que la parte estructural esencial de las penicilinas (6-APA), podía obtenerse mediante la acción hidrolítica de la enzima penicilina amidasa sobre la función amida.

El descubrimiento del 6-APA hizo posible la síntesis de nuevas penicilinas no disponibles anteriormente por procedimientos de fermentación. El 6-APA

producido por fermentación es un proceso obsoleto por su complejidad de separación y purificación. Como mencionamos anteriormente fue hasta el año 1959 en que por primera vez se obtuvo el 6-APA en forma cristalina por Batchelor et al (9) a partir del caldo de un proceso de fermentación de Penicillium chrysogenum, este grupo de investigadores comprobó indirectamente la estructura del 6-APA haciendo reaccionar ésta con el cloruro del ácido fenil-acético para formar la bencil penicilina, que detectaron analíticamente por bioensayos comprobándose la presencia de la penicilina por la actividad antimicrobiana.

Más importante que la comprobación de la estructura del 6-APA por acilación, fué el método mismo - ya que presentó la posibilidad de preparar otras "PENICILINAS SEMISINTÉTICAS" procedimiento que actualmente es funcional tanto a nivel químico como económico.

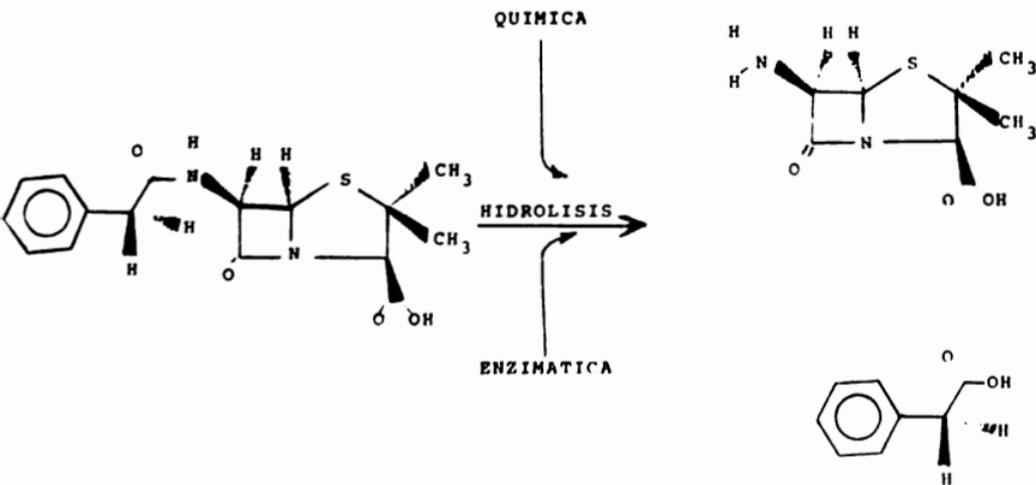
La síntesis química de las penicilinas fue realizada con éxito después del descubrimiento de las carbodiimidas como reactivos intermediarios para la formación de enlaces peptídicos (10); pero esta metodología no es competitiva con la síntesis microbiana, ni a nivel técnico, ni de selectividad, rendimiento, etc.

Dada la selectividad, rendimientos y preponderantemente los costos, la producción industrial de todos los antibióticos β -lactámicos dependen actualmente de la fermentación microbiana.

En la figura 1 se ilustra el proceso de hidrólisis de la bencilpenicilina para obtener el 6-APA.

Fig. 1

PREPARACION DEL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO.
(6-APA)



4.1 Estructura y estabilidad de la penicilina

Un punto que hay que considerar importante cuando se trabaja con antibióticos β -lactama, es la estructura y la estabilidad de la misma. La estructura de las penicilinas fué deducida mediante el empleo de métodos de difracción de rayos X, espectroscopía infrarrojo y ultravioleta (11)

En el siguiente diagrama se muestra la disposición estereoquímica de la bencilpenicilina (11).

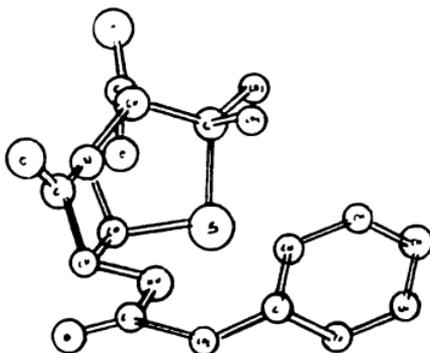
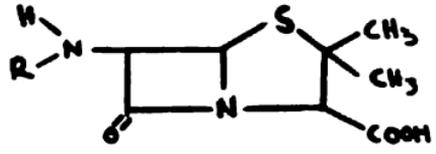


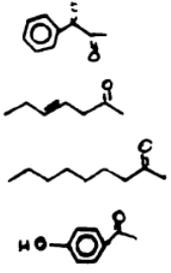
TABLA 1 Diferentes tipos de penicilinas



RADICAL

H

ACILO



NOMBRE

Acido 6-aminopenicilánico

PENICILINAS NATURALES

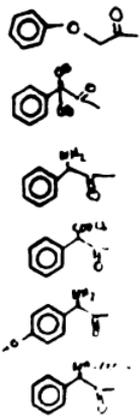
Penicilina G (Bencilpenicilina)

Penicilina F

Penicilina X

Penicilina X

PENICILINAS SEMI-SINTETICAS



Penicilina V

Meticilina

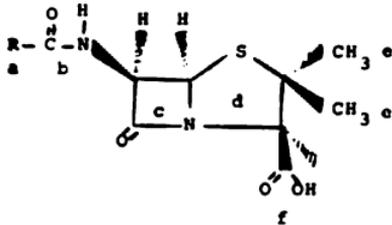
Ampicilina

Carbenicilina

Amoxilina

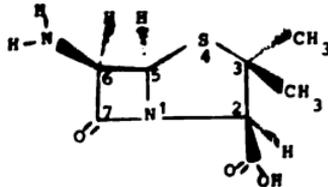
Etacilina

Los grupos funcionales presentes en las penicilinas se ilustran en el siguiente diagrama.



- a) cadena lateral
- b) Unión amida o peptídica
- c) Anillo de lactama
- d) Anillo de tioazolidina
- e) Grupo metilo
- f) Grupo ácido

Para el caso del 6-APA:



Nomenclatura

Acido 6-aminopenicilánico (6-APA)

Acido 6-AMINO 3,3-dimetil-7-oxo-4-tio-1-azobicyclo-heptan-2-carboxílico.

Bencilpenicilina Esta es muy estable en estado sólido, resiste calentamiento a 100°C por varias horas sin pérdida de actividad y a temperatura ambiente cuando se protege de la humedad, retiene su potencia por periodos de un año o más, lo cual está relacionado con el hecho de que la sustancia cristalina está anhidra. La bencilpenicilina sódica presenta tendencia a formar un trihidrato a 20°C hasta alcanzar una humedad relativa de 65%, el agua fijada cerca de ese punto causa una parcial inactivación. Lo anterior no puede ser el único -- factor responsable de la lenta descomposición, ya que también puede atribuirse a trazas de impurezas higroscópicas (11).

Las β -lactamas típicas presentan dos estructuras resonantes características:



Esta resonancia permite la estabilidad de las lactamas monocíclicas, dándoles más estabilidad a la hidrólisis alcalina (11) y (12).

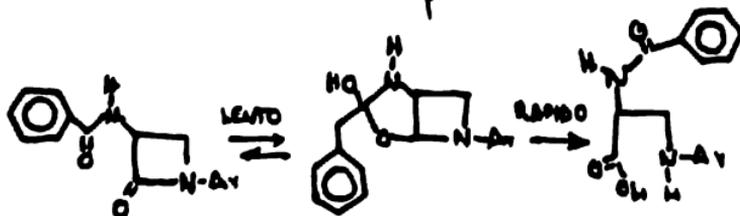
La penicilina G muestra un comportamiento diferente en solución puesto que sí es susceptible de

hidrólisis en condiciones alcalinas, dependiendo de la temperatura de la solución, para dar ácido peniciloico. La diferente reactividad a la hidrólisis entre una lactama típica y la penicilina G, se atribuye a dos características de esta última:

- Primera: No es posible la existencia de dos formas resonantes.
- Segunda: La tensión existente en el anillo de la lactama ocasionada por la vecindad del anillo de tioazolidina.

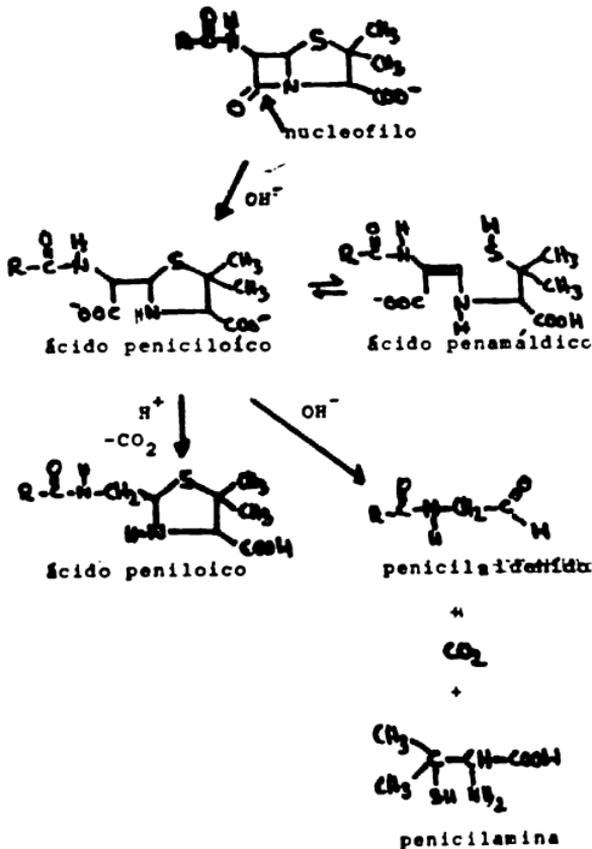
La reactividad del anillo de β -lactama de las penicilinas es indudablemente uno de los factores responsables de la alta actividad biológica de estos antibióticos y también es uno de los problemas que se presentan cuando se lleva a cabo la síntesis química de estos compuestos.

Es posible que el grupo carbonilo adyacente al grupo 6-amino pueda presentar un efecto de inducción a la hidrólisis del anillo β -lactámico.

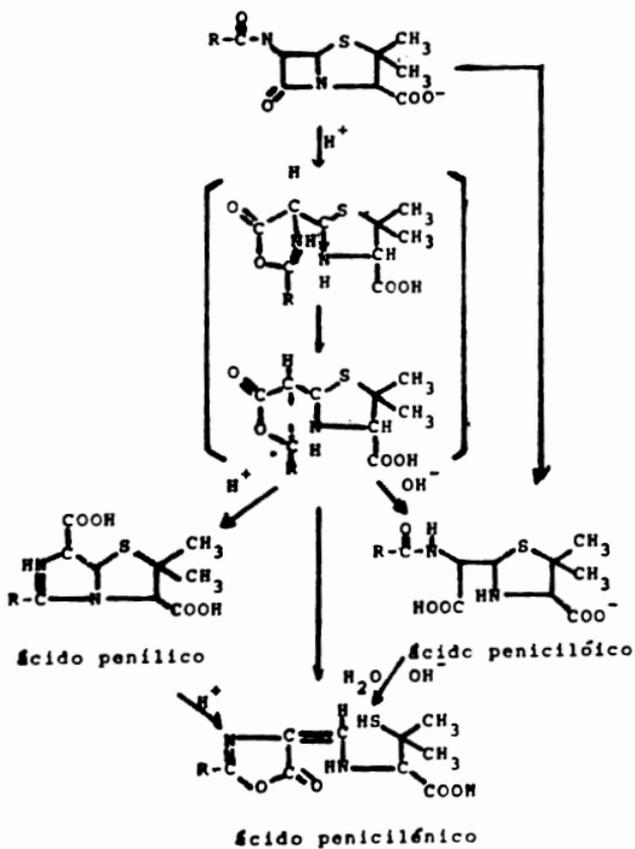


En los siguientes esquemas se presenta la extensa serie de degradaciones de la penicilina, ilustrando así su labilidad química

CATALISIS ALCALINA

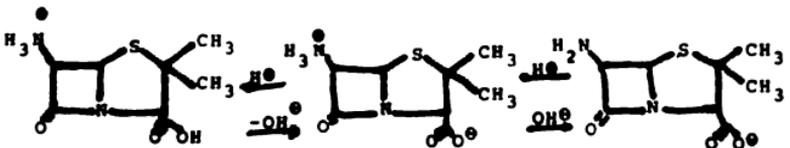


CATALISIS ACIDA



4.2 CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DEL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO (6-APA).

El 6-APA es un amino-ácido que tiene un peso molecular de 216.28, y cuya fórmula mínima es $C_8H_{12}O_3N_2S$. Como cualquier aminoácido presenta propiedades anfotéricas a causa de la disociación de los grupos amino y carboxilo presentes en la molécula del 6-APA por lo que en solución acuosa se puede presentar en los siguientes estados iónicos, dependiendo de la concentración de protones:



Para el 6-APA, se han reportado:

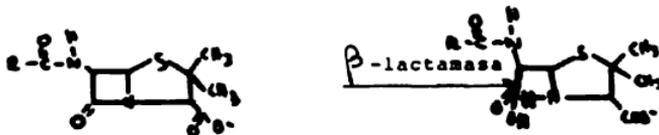
$pK_1 = 2.3$	$pI = 4.3$	$pK_2 = 4.91$	Ref (15)
$pK_1 = 2.3$	$pI = 4.3$	$pK_2 = 5.91$	Ref (16)

La rotación óptica del 6-APA en solución acuosa es dependiente del pH. Entre pH 7 y 10.5 la rotación específica es constante con un valor de $[\alpha]_D^{20} = +284$, el

punto de fusión reportado por el 6-APA es de 209°C-210°C con descomposición, también se reporta que cristaliza de H₂O-HCl.

El 6-APA es relativamente estable a los ácidos, es fácilmente degradable por bases fuertes, y presenta su máxima estabilidad en solución acuosa a pH 8.

La degradación del 6-APA también se puede llevar a cabo por el rompimiento del anillo de β-lactama mediante la acción de la enzima β-lactamasa, dando origen a el ácido penicilbóico.



Dada la naturaleza de la estabilidad del 6-APA, éste debe tratarse a su óptimo pH o en condiciones alcalinas y en ausencia de la enzima β-lactamasa, para evitar su degradación.

4.3 Preparación vía química del 6-APA.

La metodología usada actualmente a nivel industrial para producir el 6-APA, a partir de bencilpenicilina, es poco accesible, ya que existe muy poca información al respecto. El proceso químico principia por mantener el sistema anhidro desde la primera etapa, hasta el paso de hidrólisis. La primera etapa consiste en la protección del grupo carboxilo presente en la molécula de la penicilina con grupos que son rápidamente hidrolizados en presencia de agua, tales grupos comprenden: cloro-silanos (17), anhídridos y fosfoésteres de benzilo, estos últimos requieren para su separación hidrogenolisis, por lo que no son usados, ya que la hidrogenolisis abriría el anillo β -lactama, y disminuiría el rendimiento de 6-APA.

RELACIÓN MOLAR REQUERIDA PARA LA HIDROLISIS QUÍMICA DE LA BENCILPENICILINA:

<u>MATERIA PRIMA</u>	<u>MOLES</u>
Bencilpenicilina potásica	1.0
Dimetil-dicloro-silano	1.0
Dicloro-metano	29.0
Dimetil-anilina	2.5
Pentacloruro de fósforo	1.0
R-OH (MeOH ó BuOH)	13.8
Amoníaco al 28%	21.0
N ₂ líquido	----
Acetona	----

Descripción del proceso químico

La reacción se inicia a 4°C. A la bencilpanilina emulsionada en cloruro de metileno, se le agrega el dimetildiclorosilano permitiendo que la temperatura suba hasta 20°C. La sililación se lleva a cabo durante 20 minutos, transcurridos estos, se desciende la temperatura hasta -60°C utilizando nitrógeno líquido a través de los serpentines del reactor

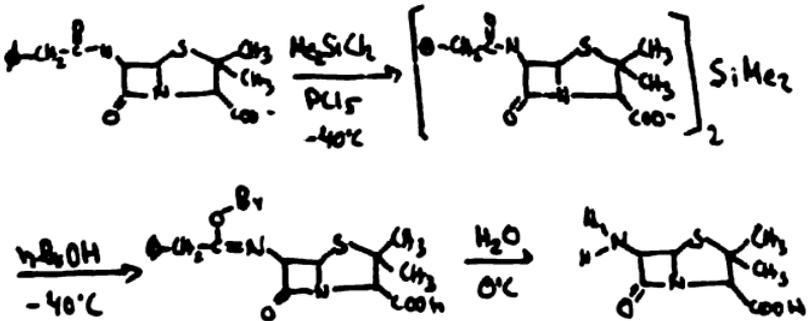
Alcanzada la temperatura, se agrega el pentacloruro de fósforo, permitiendo que la temperatura se eleve hasta -35°C., posteriormente se adiciona la dimetil anilina, en otro tanque, se enfría metanol a -80°C., el cual se agrega al reactor. La reacción exotérmica provoca que la temperatura suba hasta -60°C. y se mantiene esta temperatura por 1.5 horas. Luego se adiciona agua, la temperatura se eleva hasta -17°C., en este paso se obtiene el 6-APA; el pH en el reactor es de cero. El tiempo de hidrólisis es de 13 minutos, este tiempo es importante ya que podría existir degradación del 6-APA. Efectuada la hidrólisis el pH se va elevando hasta 1.6 con NH_4OH , se efectúa separación de fases. La fase acuosa contiene el 6-APA, esta se lleva a un pH 4.2 con NH_4OH y se controla la temperatura a 0°C.

La cristalización del 6-APA se lleva a cabo durante la noche. Posteriormente se centrifuga para tener el 6-APA en estado sólido, este producto es secado en una estufa y a vacío.

Las aguas madres se tratan con acetona, con el fin de separar y recuperar la dimetilanilina.

Tanto la dimetilanilina como el cloruro de metileno se recuperan por destilación para su posterior recirculación al proceso, esta operación reduce los costos de producción del 6-APA . Ref: (18,19,20,21 y22).

REACCION DE LA HIDROLISIS QUIMICA DE BENCIL-PENICILINA PARA PRODUCIR 6-APA (36).



4.4 Transformación enzimática de penicilina a 6- APA

La explotación, a nivel industrial, de enzimas y microorganismos tradicionalmente ha sido realizada mediante el uso del microorganismo intacto o de preparaciones de enzimas en solución. Estos procesos, por su eficiencia, solo pueden ser usados una ocasión en una reacción o fermentación por lote. Otros usos adicionales no son posibles en esta forma debido a que:

- a) Las enzimas o células son relativamente inestables y pueden perder actividad durante una reacción o fermentación.
- b) Los métodos de recuperación convencionales son costosos o causan la desnaturalización y en consecuencia la pérdida de la actividad catalítica.

La inmovilización es una técnica que se ha desarrollado en los últimos años, con el objeto de reusar los catalizadores biológicos siendo estos la célula completa o la enzima parcialmente purificada.

Inmovilización. Consiste en fijar una enzima o célula a una matriz insoluble, lo cual permite su recuperación, y además evita su destrucción por filtración o centrifugación. La estabilidad de la enzima fijada es atribuible a factores como disminución de la libre rotación de la enzima unida. Otra ventaja conferida por la inmovilización, es que la enzima unida a un soporte puede ser usada continuamente, en un tanque o reactor en

columna y la purificación de los productos se facilita, por la ausencia de material orgánico soluble. Entre las desventajas que presenta están los pasos adicionales requeridos para la inmovilización, el costo de la inmovilización y la pérdua de actividad durante la fijación. Estos problemas son característicos de los métodos de inmovilización, sin embargo esto no significa que no constituyan una tecnología rentable.

Los métodos de inmovilización pueden ser clasificados en cuatro categorías básicas:

- 1) Método de unión covalente.- En este se une la enzima a un soporte insoluble en agua mediante una unión covalente.
- 2) Método de entrecruzamiento.- Se logra unir endo intermolecularmente las enzimas mediante un reactivo bifuncional o multifuncional.
- 3) Método de atrapamiento.- Las enzimas o células se incorporan a un gel o se ocluyen en una membrana constituida por un polímero semipermeable.
- 4) Método de microencapsulación.- consiste en encapsular las enzimas en pequeñas esferas permeables.

DIAGRAMAS DE ENZIMAS INMOVILIZADAS



COVALENTE



ENTRECruzAMIENTO



ATRAPAMIENTO



ENCAPSULACION

Los procesos comerciales desarrollados a la fecha basados tanto en métodos químicos como en métodos microbianos para obtener el compuesto 6-APA, usan como materia prima la bencilpenicilina. (ver fig.1 pag 9).

En el proceso enzimático para la producción del 6-APA, es necesario disponer de :

- a) fuentes de la enzima (microorganismos)
- b) medio para hacer crecer al microorganismo.
- c) medio para sobreproducir la enzima.
- d) técnica para recuperar las células o la enzima.
- e) método de inmovilización.
- f) condiciones de reacción de la hidrólisis.
- g) proceso de recuperación del producto.

Las fuentes de la enzima para efectuar la hidrólisis de la bencilpenicilina, pueden ser muy variadas, y aunque las que se emplean en la industria no son conocidas, tanto las fuentes como los procedimientos empleados, pueden en general detectarse a partir de las patentes y en menor proporción de las publicaciones en revistas especializadas. Existen una gran variedad de fuentes de la enzima denominada: penicilino acilasa; penicilino amidohidrolasa; penicilina amidasa, etc., - siendo las principales las de origen fúngico y bacteriano (23,24,25 y 26).

Las cepas más estudiadas son: Bacillus megatherium y la de Escherichia coli, de esta última ha sido posible utilizar cepas "mejoradas" (mutadas ya sea por genética clásica o ingeniería genética) (27,28,59) Patentes recientes y numerosas publicaciones sobre acilasas de bacterias, sugieren que algunas empresas, particularmente en Japón, Estados Unidos de Norte América

y Alemania, usan industrialmente fuentes biológicas, entre las que están E. coli, B megaterium, Kluyvera citrophila y Pseudomonas meanogenum, para producir el 6-APA, a partir de bencilpenicilina (29,30,31).

El desarrollo industrial de cepas que producen la "acilasa" y los detalles de los procesos de fermentación para las especies mencionadas y otras, son propiedad de las compañías que las han producido; sin embargo, se han publicado estudios del medio de cultivo (28), reacción (32) y regulación (33,34,28), estudios que sugieren los requerimientos más importantes para la preparación eficiente de las penicilino acilasas.

Existen básicamente cuatro sistemas para efectuar la transformación enzimática de la bencilpenicilina a 6-APA y son las siguientes:

- a) Células "solubles"
- b) Enzima soluble
- c) Células inmovilizadas
- d) Enzimas inmovilizadas

Los sistemas c) y d) son los usados en las transformaciones biotecnológicas industriales. Para el caso de E. coli, existe una información extensa sobre las metodologías de inmovilización de la enzima penicilina - amidasa, como ejemplo podemos citar la inmovilización en acetato de celulosa y en una resina llamada Amberlita XAD 7 (36 y 40), la versatilidad de los métodos de inmovilización consiste principalmente en el tipo de soporte usado; otros soportes empleados son bentonita (38), acríloilamida (37), etc.

4.5 Descripción general del proceso desarrollado para producir 6-APA por vía enzimática.

De acuerdo a este método, el microorganismo empleado como fuente del catalizador biológico es la bacteria Escherichia coli ATCC 11105. El cultivo de este microorganismo se realiza en un medio apropiado de nutrientes en presencia de aire. El medio de nutrientes consiste esencialmente de una fuente de nitrógeno como NH_4Cl , una fuente de carbono y energía adecuados como lo es para éste caso el ácido fenilacético. Las condiciones del cultivo se controlan a 28°C y 24°C para el crecimiento como la inducción respectivamente de la formación de la enzima. Las células se recuperan mediante centrifugación (60).

Preparación del Biocatalizador:

Con el objeto de que la enzima que cataliza la hidrólisis de la bencilpenicilina sea más estable, y se pueda reusar en varias ocasiones, las células completas de E. coli ATCC 11105, las cuales contienen la enzima, se inmovilizan, a un soporte insoluble en el medio de reacción, en forma covalente. En este proceso se emplea un gel de carragenina. La carragenina es un biopolímero de polisacáridos sulfatados formados por unidades de galactosa; El procedimiento de inmovilización consiste básicamente en:

- Una suspensión de células, se mezclan en una solución de carragenina en las proporciones adecuadas, a una temperatura de 50°C, la solución gelifica al disminuir la temperatura y se le da la forma deseada a

la preparación resultante. Este gel es tra
tado con glutaraldehído para unir mediante
enlaces covalentes las células al gel, lo-
grándose así la inmovilización química (64,
65).

- Preparado el biocatalizador se procede a
empacar el reactor seleccionado para efect
tuar la hidrólisis.

Hidrólisis.- La bencilpenicilina potásica en -
solución acuosa es puesta en contacto con el biocatali-
zador, manteniendo la reacción óptimamente a una tempe-
ratura entre 37°C y 40° C, y a un pH de 7 a 8 (66). Desp
pués del tiempo adecuado para permitir la máxima conver-
sión de la penicilina a 6-APA y ácido fenilacético se
procede a la separación del producto deseado que es el
6-APA.

4.6 Métodos de separación reportados.

Para el caso particular de separación del ácido 6-aminopenicilínico (6-APA) producido por hidrólisis enzimática se han reportado 5 procesos, de los cuales 4 son patentes norteamericanas de los años 1964, 1969, - 1973 y 1976, el 5^o. está reportado en un artículo publicado por japoneses en 1972, el cual fue empleado por un grupo de coreanos en el año 1979 aunque estos últimos obtuvieron un rendimiento de recuperación de 6-APA de - 54% en vez del 85% reportado en el artículo original de los coreanos.

En el año de 1964 se establece que la hidrólisis enzimática de penicilinas presenta desventajas para obtener el 6-APA en forma pura a partir de penicilinas (29). De acuerdo con este método el 6-APA puede ser recuperado, mediante adsorción en carbón activado o resinas de intercambio iónico ácidas, tal como la resina IR-120(H+); posteriormente el 6-APA se eluye con una base (NH_4OH) a pH 7, y se concentra a vacío cristalizando el 6-APA a pH 4.4. Reportaron rendimientos de 65% a 70%, e identificaron el producto tan solo por una prueba indirecta: fenilación del 6-APA para producir bencilpenicilina y detectar esta última por su actividad bactericida. Para cristalizar ajustan el pH con H_2SO_4 .

En el año 1969 Squibb & Sons (38) patentaron su proceso de hidrólisis enzimática para la producción del 6-APA, el cual comprende el uso de una serie de penicilinas como materia prima; la técnica de inmovilización de la enzima penicilina amidasa consiste funda-

mentalmente en adsorberla en bentonita. En la descripción del proceso de separación, mencionan las dificultades que se presentan para este tipo de sistema y especialmente para el caso de la hidrólisis enzimática de la penicilina, afirman que este proceso presenta muchas dificultades, entre las cuales se encuentra el escalamiento industrial, ya que en esta etapa en general se obtienen bajos rendimientos en la recuperación del producto de hidrólisis deseado (6-APA). Más aún, la separación del producto 6-APA a partir de la solución en que están presentes otros residuos, presenta muchas dificultades. En la descripción de su proceso de separación, se procede de la siguiente manera: se enfría y acidula con HNO_3 , se extrae con un disolvente orgánico las "impurezas", se agita y se centrifuga, se neutraliza con NaOH al 50% o con NH_4OH al 10%, posteriormente se concentra a una temperatura menor de 40°C , finalmente cristaliza el 6-APA acidulando con HNO_3 a un pH 3.8-4.0. Los cristales formados son lavados con agua y posteriormente con acetona. El producto es secado a vacío y a una temperatura de 40°C . En esta patente trabajan con cantidades de hasta 15 g/l de penicilina G potásica, pero no dan referencia de los rendimientos de recuperación del 6-APA ni de la calidad del producto.

En el año de 1973 se registró "Un mejor método" (61), para la producción, separación y purificación de 6-APA mediante preparación enzimática con la bacteria E. coli. En este trabajo postulan las desventajas de usar las células completas de la bacteria completa, siendo las siguientes:

- a) incluyen una gran cantidad de material inactivo
- b) pérdida de 6-APA por adsorción en las células
- c) posibles pérdidas por inactivación enzimática
- d) pérdidas por degradación por álcali
- e) reacción muy lenta (ya que la enzima es intracelular).
- f) la separación del 6-APA. a partir de los productos de escisión llevada a cabo así, como - los factores anteriormente señalados la hacen sumamente difícil.

De acuerdo a su método de separación la solución acuosa obtenida después de efectuada la hidrólisis enzimática es tratada en la siguiente forma:

La solución es acidulada con un ácido mineral, posteriormente se efectúa una extracción con un disolvente orgánico inmiscible en agua como por ejemplo metil-isobutil-cetona, éter - etílico, acetato de n-butilo o acetato de isoamilo a pH 1.5-4. La capa orgánica es separada y la fase acuosa neutralizada a pH 7 -8 mediante un álcali después la solución es concentrada a vacío. La solución concentrada es acidulada a pH 4-4.6, causando la formación de un precipitado cristalino de 6-APA el cual es separado y secado. Se obtuvieron rendimientos con respecto a la bencilpenicilina de 72 %. Las concentraciones a las que trabajaron son de 5 g/l de bencilpenicilina potásica.

En el año de 1976 Chibata et al. (37) registraron un proceso para la producción enzimática del 6-APA, en esta metodología cuando la hidrólisis se ha efectuado totalmente, la solución de reacción se hierve y/o se acidula para destruir la enzima o microorganismo, y el precipitado se separa por filtración. En este trabajo reportan haber experimentado con concentraciones de

bencilpenicilina y penicilina V al 2% y al 10%, habiendo obtenido rendimientos de recuperación de 6-APA con respecto a la penicilina usada de 76.8 %. La diferencia con respecto a los anteriores procesos es el disolvente usado para efectuar la extracción, el cual en este caso fué la metil-isobutil-cetona, disolvente que - además de caro es tóxico y altamente flamable.

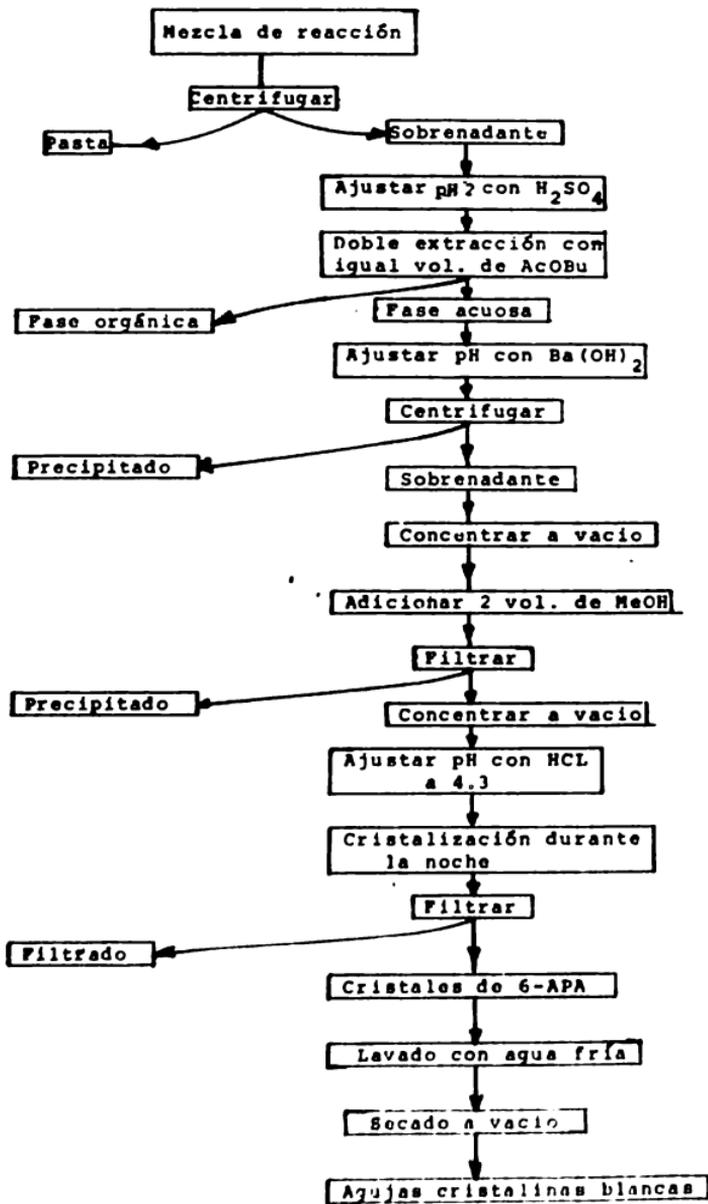
En el año de 1979 Nam et al. reportaron una metodología para preparar el 6-APA haciendo uso de la célula completa de Micrococcus luteus en forma soluble. La separación y purificación del 6-APA, la efectuaron de acuerdo al método de Okachi et al. (63), del cual se presenta el diagrama en la siguiente página, este método lo modificó Nam et al. sustituyendo cloruro de bario por -- cloruro de calcio.

En el trabajo de Okachi se presenta por primera vez un espectro de análisis del 6-APA al infrarrojo.

En el trabajo de Nam se presenta además de un espectro de infrarrojo, reportan las bandas de un espectro de R.M.N. efectuado al 6-APA que obtubieron, así como el punto de descomposición del mismo (62).

Separación del ACIDO 6-AMINOPENICILANICO

Por Okachi et al. (32)



5. PROCESO DE SEPARACION DE 6-APA DESARROLLADO.

Los procesos de separación y purificación en general consisten de los siguientes elementos:

- I. Remoción de insolubles
 - a) Filtración
 - b) Centrifugación
 - c) Decantación
- II Concentración del producto. No selectiva.
 - a) Evaporación
 - b) Adsorción - carbón
- resinas de intercambio iónico
 - c) Extracción por disolventes
 - d) Precipitación
 - e) Ultrafiltración
- III Purificación - selectiva
 - a) Extracción fraccionada líquido-líquido
 - b) Extracción por disociación
 - c) Cromatografía
 - d) Decoloración
- IV Aislamiento del producto final
 - a) Cristalización
 - b) Recuperación del producto
 - c) Secado

La mayoría de las técnicas de recuperación, como: extracción por disolventes, evaporación a presión reducida, precipitación fraccionada, filtración, centrifugación, etc. son usadas para la re-

cuperación de variadas sustancias.

Para seleccionar y aplicar alguna técnica de separación o recuperación, hay que tener presente las diferencias fisicoquímicas que manifiesten la naturalidad química de cada sustancia; acidez, estabilidad térmica y al pH, estado físico; así como de las impurezas presentes ya sean de naturaleza orgánica o inorgánica.

En la producción industrial, cada etapa de un proceso de separación debe ser seleccionada - desde un punto de vista práctico y económico, por lo que se deben considerar los siguientes puntos:

- a) El proceso debe ser lo más simple posible.
- b) El rendimiento de cada etapa del proceso debe ser alto.
- c) Evitar etapas prolongadas
- d) Evitar técnicas que sean difíciles para su escalamiento industrial.
- e) Evitar etapas que disminuyan la concentración de la sustancia requerida.
- f) Las materias primas deben ser razonablemente baratas y las cantidades consumidas mínimas.

5.1 Consideraciones teóricas para el proceso.

Uno de los puntos claves en un proceso de esta naturaleza es la operación de cristalización del 6-APA que tiene como finalidad provocar la separación del cuerpo sólido formado a partir de la disolución que le contiene.

La operación de cristalización se prefirió puesto que es fácil de escalar del laboratorio a planta industrial, en ambos casos se pretende obtener los rendimientos y pureza más altos posibles.

La teoría de la cristalización comprende, no solamente el estudio de las relaciones de equilibrio existentes entre un cristal y la solución que le da origen, sino además otros factores que afectan a la formación del cristal, como efectos térmicos, y nucleación. Hay que tener presente que en el caso de compuestos que serán empleados posteriormente como materias primas en medicamentos, resulta muy importante cerciorarse de la pureza.

Desde un punto de vista general se puede afirmar que en la formación de sólidos inorgánicos, en la mayoría de los casos, es suficiente la formación de un precipitado, mientras que en la separación y purificación de sustancias orgánicas generalmente con el objeto de elevar la pureza se desea obtener el producto cristalino.

Cuando se tienen sustancias orgánicas, al precipitarlas, generalmente, se logra una formación relativamente lenta de sólido en un proceso en

el que se obtiene un material cristalino que es desde el punto de vista químico el compuesto deseado, y esto es porque se trata de un proceso físico o cuando más, fisicoquímico, el cual está directamente asociado al cambio de estado físico y al equilibrio sólido-solución.

La purificación de sólidos por cristalización trae generalmente como inconveniente una pérdida considerable del material deseado, ya que éste permanece en la solución de la cual se han formado los cristales, pero tiene en general la gran ventaja de que el grado de pureza que se alcanza es muy superior al que proporcionan algunos otros métodos de separación clásicos. Un punto más a favor de la cristalización es que la determinación del punto de fusión de cada cosecha individual de cristales es directamente indicativa de la pureza del compuesto que se está obteniendo.

En ninguna de las técnicas de separación del 6-APA, se menciona algún factor que afecte la cristalización del mismo; y al llevar a la práctica algunas técnicas de separación reportadas, se obtuvieron bajos rendimientos de recuperación y un producto amorfo e impuro, estos experimentos preliminares permitieron conocer que los factores importantes para recuperar el 6-APA son:

- a) Conocer el comportamiento del 6-APA en solución acuosa alcalina, puesto que son las condiciones de reacción.

- b) Las concentraciones más adecuadas de 6-APA para efectuar la cristalización lo anterior con el objetivo principal lograr un producto cristalino más puro y obtener altos rendimientos.

Las consideraciones generales con respecto a los productos en la mezcla de reacción son las siguientes:

1.- En la reacción resultante tenemos el ácido 6-aminopenicilánico, residuos de bencilpenicilina, ácido fenilacético, fosfatos inorgánicos, productos de descomposición de 6-APA y bencilpenicilina (ácidos penicilínicos) así como sólidos en suspensión del soporte.

2.- Propiedades de cada elemento:

- i) El 6-APA, bencilpenicilina, y fenilacético ya se han tratado anteriormente. (ver Cap. 4).
- ii) Productos de descomposición de 6-APA y bencilpenicilina:
Los posibles productos de descomposición tanto para el 6-APA como para la bencilpenicilina son los productos de hidrólisis alcalina, llamados ácidos penicilínicos, los cuales se pueden obtener en forma sólida como monoácidos y a pH no menor de 5, ya que sufren descarboxilación dando origen a

ácidos penflicos; ambos productos de descomposición pueden ser extraídos con disolventes orgánicos insolubles en agua.

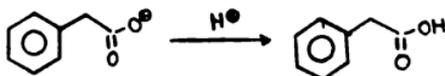
- iii) Si existieran carbohidratos en la solución que contenga 6-APA, éste reaccionaría dando origen a derivados -- glucosídicos, pero a pH ácido se vuelven a regenerar ambos compuestos ().
- iiii) Proteínas.- la posibilidad de la presencia de estos compuestos hacen necesario un tratamiento para separarlas, su comportamiento anfotérico similar al que presentan los aminoácidos o la desnaturalización y precipitación de las proteínas pueden ser empleadas para su remoción o en última instancia efectuando cambios de pH y temperatura para , finalmente, separar por centrifugación o adsorción.
- iiii) Los lípidos que puedan estar presentes se pueden extraer a pH ácido y con disolventes no polares.

4.- Se han realizado consideraciones de los procesos de separación reportados para algunos compuestos, obtenidos por otros métodos.

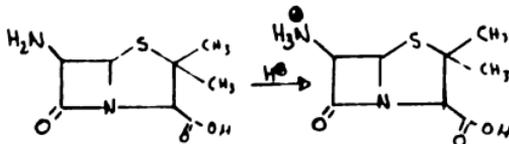
- 1) Separación de bencilpenicilina.- en la literatura se han reportado procesos -

para recuperar bencilpenicilina a partir de soluciones que contienen este compuesto producido por fermentación, en las cuales están presentes impurezas proteicas, azúcares, aminoácidos, etc. Todos de origen microbiano o del medio de cultivo. Normalmente la bencilpenicilina, se separa de este tipo de soluciones acuosas, mediante una técnica de extracción y usando disolventes como: éter sulfúrico, acetato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de n-butilo, etc., a un pH de 2 a 3.5 y una temperatura de 0°C a 10°C.

- ii) El ácido fenilacético es un compuesto que puede ser extraído a un pH ácido alrededor de 2.



- iii) El ácido 6-aminopenicilánico no puede extraerse a pH ácido ya que forma un compuesto iónico:



Considerando los anteriores puntos se procede a particularizar las operaciones que deben ejecutarse, partiendo de un método de separación y purificación en general, para determinar los parámetros óptimos del proceso.

5.2 Materiales y Métodos.

1) Materiales:

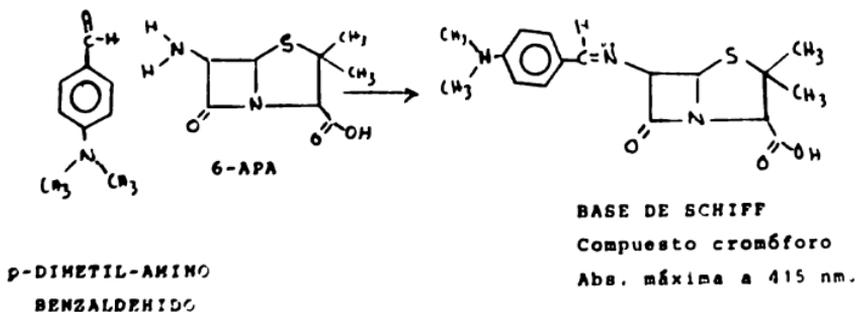
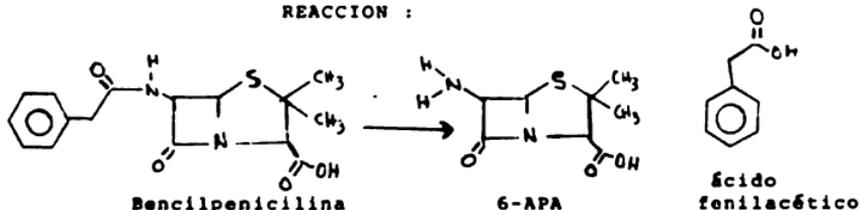
<u>Producto.</u>	<u>Procedencia.</u>
Ac. clorhídrico R.A.	J.T. Baker.
Hidróxido de sodio R.A.	J.T. Baker.
Acetato de n-butilo R.A.	J.T. Baker.
Acetato de isobutilo	Fermic S.A.
Bencilpenicilina	Fermic S.A.
Ac. 6-aminopenicilánico	Quinonas S.A.
Ac. 6-aminopenicilánico	Sigma.
Ac. 6-aminopenicilánico	Fermic S.A.
Metanol R.A.	J.T. Baker.
Metanol Tec.	Fermic S.A.
Etanol R.A.	J.T. Baker.
Fosfato monosódico R.A	J T. Baker.
Fosfato disódico R.A.	J T. Baker.
Amortiguador de ref.	Sigma.
Papel indicador de pH	pHydrion.
Papel filtro No 1	Whatman.
Papel filtro No 3	Whatman.
Iodo R.A.	Merck.
Carbón activado	Sigma.

<u>Equipo</u>	<u>Marca</u>
Potenci6metro	Corning 3D.
Bomba de vacfo Mod.FE-1400	Feli-Welch.
Ba6o de agua de temp. reg.	Colora ET 5.
Colorimeto (Spectronic 20)	Bausch & Lomb
C6mara p/cromatografifa	Pyrex.
Aparato para puntos de f.	Fisher-Jhons.
Agitador magnetico	Corning PC-353
Barras magneticas	Curtin M.S. Inc.
Rotavapor -R	Binknam Inst.
Quickfit 24/40	Corning.
Quickfit 14/23	Corning.
Cubre objetos	Profesional
Buchner de 15 cm. diam	P.I.M.S.A.
Kitasatos de 1 y 4 l.	Pyrex.
Embudos de separaci6n 1 l.	Pyrex.
Pipetas graduadas 10 ml.	Pyrex.
Trampa para agua	Crista-Lab,
Vasos de pp. de 1 l.	Pyrex.

Analisis del 6-APA por el método del
p-dimetil-aminobenzaldehído.

El método del p-dimetil-aminobenzaldehído depende fundamentalmente de la reacción de éste con el grupo amino del 6-APA, para dar lugar a la formación de una base de Schiff colorida, la cual se puede estimar - cuantitativamente empleando un espectrofotómetro a 415 nm. El método puede ser aplicado directamente a la -- mezcla de la reacción sin un previo paso de extracción.

REACCION :



Limitaciones del método p-dimetil-amino-benzaldehído:

Si existen otras aminas primarias, además de la presente en el 6-APA? estas interferirán en la de terminación, ya que también dan reacción positiva.

Otros problemas se evitan tomando un tiempo adecuado para hacer la lectura, de acuerdo a la curva de calibración. (49).

Procedimiento:

Realizar una curva patrón de 6-APA cada vez que se preparen reactivos de la siguiente manera

1. Pesar exactamente 58.378 mg de 6-APA al 100% de pureza y pasarlo cuantitativamente a un matraz aforado de 10 ml. con poca agua, añadir NaOH 0.1 N hasta efectuar la disolución del 6-APA y aforar a 10 ml.
2. Hacer diluciones progresivas de esta solución, tomando 1 ml. de solución de 6-APA y agregando 1 ml. de buffer, agitar.
3. Pipetear 0,2 ml. de cada solución de 6-APA en tubos de ensayo, y marcarlos. Para el blanco usar 0.2 ml. de buffer.
4. Pipetear 4,8 ml. de alcohol en cada tubo y agitar.
5. Pipetear 2.5 ml. de reactivo p-dimetil-amino-benzaldehído en cada tubo y agitar.
6. Dejar en reposo 10' y leer en el colorímetro a 415 nm.
7. Realizar la curva por duplicado, y graficar los valores.

Método para determinar la estabilidad de
6-APA.

En este método, se hace uso para medir el 6-APA del método colorimétrico del p-dimetil-amino-benzaldehído (anteriormente descrito).

Las condiciones de Estabilidad del 6-APA probadas son las empleadas en el proceso de separación desarrollado, tanto para las condiciones de concentración como para las de cristalización.

Procedimiento:

1. Se prepara una solución de 6-APA a una concentración de 0.5 mg/ml., en un buffer de fosfatos 0.3 M.
2. La solución de 6-APA se ajusta a pH 7 para el caso de condiciones de concentración - (45°C, pH 7), y para el caso de condiciones de cristalización (pH 2 , 4°C)
3. Se toman muestras de 0.2 ml. de la solución de 6-APA, cada hora.
4. Se mide el 6-APA por el método del p-dimetil amino-benzaldehído.
5. Se grafican los valores .

Pruebas de solubilidad de 6-APA.

Solubilidad en agua destilada:

1. Se pesa un gramo de 6-APA al 100% y se agrega cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml.
2. Se afora a 100 ml con agua destilada.
3. Se agita por 20 minutos.
4. Se filtra la solución
5. Se mide la concentración de 6-APA soluble, por el método p-dimetil-amino benzaldehído.
6. Se mide el pH de la solución de 6-APA.
7. El 6-APA sólido que se separa en la filtración también puede secarse en una estufa a 50°C. y pesarse, con el fin de corroborar los datos obtenidos anteriormente.

El procedimiento anterior se aplicó en forma similar, usando metanol así como butanol. En ambos disolventes el 6-APA fué insoluble.

Comentarios: el valor de pH de una solución de 6-APA (1g/100 ml.), es un parámetro que puede correlacionarse, con la calidad del 6-APA y de hecho se hace. (ver tabla).

5.3 DISEÑO DEL PROCESO.

EN BASE A LOS RESULTADOS ANTERIORES EL PROCESO EFECTUADO PARA SEPAR EL 6-APA CONSISTE DE LOS SIGUIENTES PUNTOS.

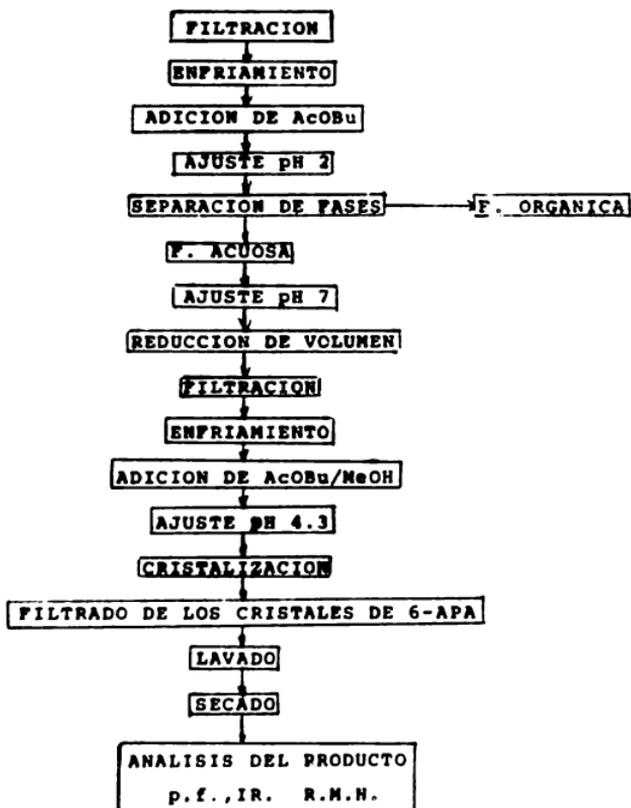
- 1) **FILTRACION.-** En esta operación se eliminan los sólidos o partículas desprendidas del soporte.
- 2) **ENFRIAMIENTO.-** Su objeto es evitar descomposición de cualquier compuesto β -lactama presente al acidular la solución
- 3) **ADISION DE ACETATO DE BUTILO.-** Evita la formación de una pasta viscosa de los productos de descomposición de la bencilpenicilina si están presentes. además - también sirve para extraer ácido penicilínico y ácido fenilacético, este último siendo un subproducto importante.
- 4) **AJUSTE A pH 2.-** A este pH se hace más eficiente la extracción tanto de la bencilpenicilina residual, como del ácido fenilacético y de algunas otras impurezas.

- 5) **SEPARACION DE FASES.-** Con esta operación se separa el 6-APA que no fué extraído de la fase acuosa a pH 2.
- 6) **AJUSTE A pH 7 .-** Su objeto es evitar la --descomposición del 6-APA en fase acuosa, por la siguiente operación.
- 7) **REDUCCION DE VOLUMEN. _** Se hace a vacío y a bajas temperaturas, para evitar descomposición .
- 8) **FILTRACION.-** En esta se separan algunas impurezas sólidas que no se pueden extraer como sales o proteínas desnaturalizadas.
- 9) **ENFRIAMIENTO** Para evitar degradación del 6-APA, en las siguientes etapas.
- 10) **ADICION DE AcOBu/MeOH.-** Su objeto inducir lentamente la cristalización - del 6-APA en forma adecuada, al realizar la siguiente etapa.
- 11) **Ajuste a pH 4.3.-** En esta operación empleamos una solución de MeOH/HCl, esta y la anterior - operación permiten la formación de cristales de 6-APA bien definidos y además se desplaza el equili

- brío de 6-APA soluble a -
6-APA sólido.
- 12) CRISTALIZACIÓN.- Reposo para dar tiempo a la completa formación de los cristales.
- 13) FILTRADO. De esta manera se recuperan los cristales.
- 14) LAVADO.- El producto se trata con agua para arrastrar posibles impurezas cristalinas mucho mas solubles en agua que el 6-APA, y acetona para arrastrar el agua.
- 15) SECADO.- Se efectúa en condiciones de vacío y temperatura de 50°C para lograr una húmedad final máxima de 0.2%.

A continuación se presenta el diagrama del proceso de separación para el 6-APA en forma de bloques.

**PROCESO DE SEPARACION DEL ACIDO
6-AMINOPENICILANICO
(6-APA)**



5.4 Resultados y Discusión.

Curva patrón para la determinación de
6-APA por el método del p-dimetilaminobenzaldehído

concentración de 6-APA		D.O.
0.01	mol	1.92
0.005	mol	1.133
0.025	mol	0.568
0.00125	mol	0.294
0.000625	mol	0.148
0.0003215	mol	0.070
0.0000000	mol	0.000

Prueba de solubilidad para el 6-APA.

I.- En H₂O, 20°C (g/100 ml. H₂O)

<u>Procedencia</u>	<u>pH</u>	<u>6-APA</u>
Prov. Ind. 1	3,4	0,52
Prov. Ind. 2	3,6	0,4782
Reactivo Anal.	3,5	0,4544
I.I.B.M.	3,58	0,4361

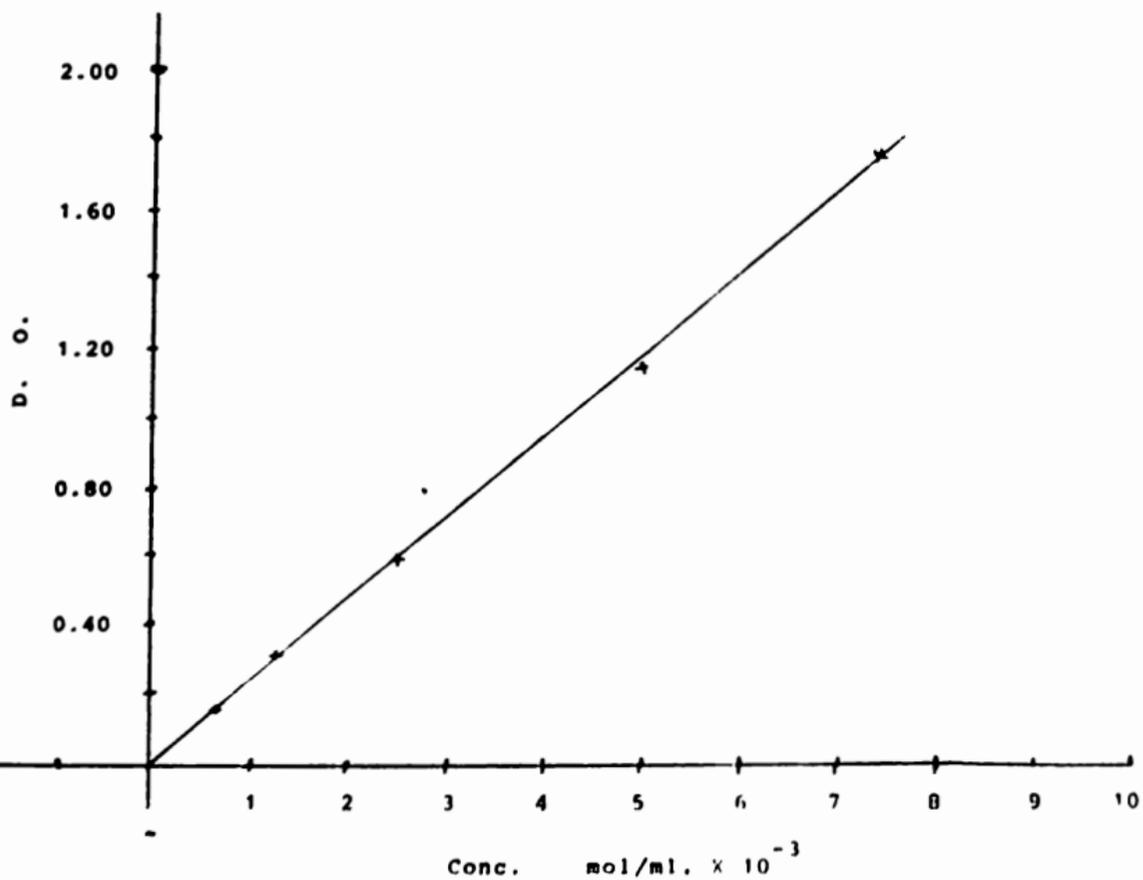
II.- En MeOH, 20°C

Insoluble.

III - En BuOH, 20°C

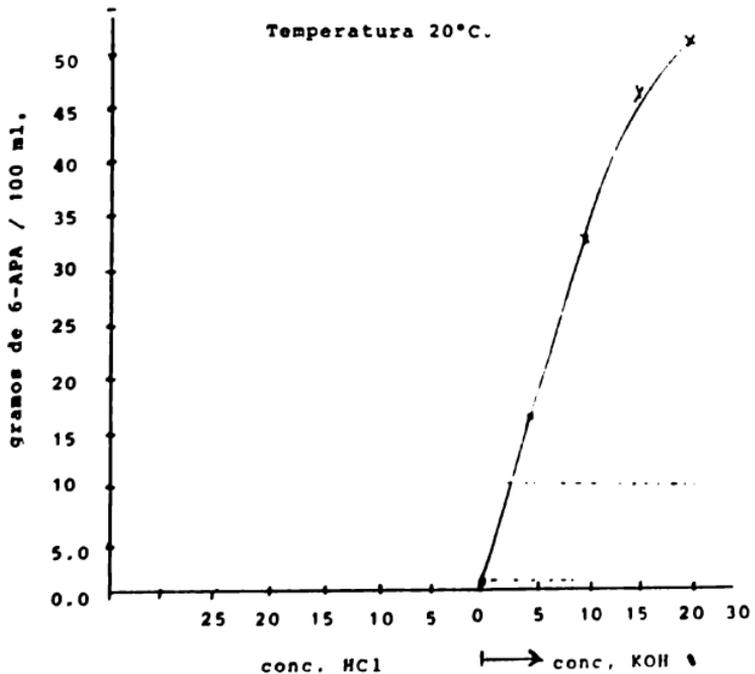
Insoluble.

Curva patrón para la determinación del 6-APA
por el método del p-dimetil-amino-benzaldehído.



SOLUBILIDAD DEL 6-APA.

La solubilidad de este compuesto al igual que para los aminoácidos es, casi totalmente, función de su estado iónico, ya sea como sal ó ácido, por lo tanto es dependiente del pH. A continuación se presenta el comportamiento encontrado para este compuesto.



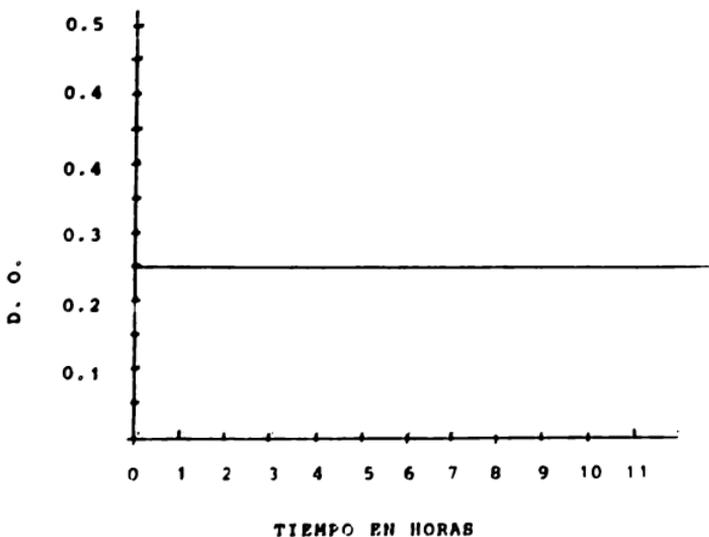
ESTABILIDAD DEL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO
(6-APA)

El objetivo de este experimento es conocer si hay pérdida del producto en condiciones ácidas a 4°C (temperatura de cristalización). Empleando el método del p-dimetil-amino-benzaldehído.

pH 2

T 4°C

Buffer de fosfatos 0.03 M.



ESTABILIDAD DEL ACIDO 6-AMINOPENCILANICO

(6-APA)

El objeto de esta curva de estabilidad, es dar bases fundamentales, para justificar las condiciones de operación cuando se requiere concentrar soluciones - acuosas de 6-APA, por lo que las condiciones para vacío son las mismas que para la máxima estabilidad de este - producto.

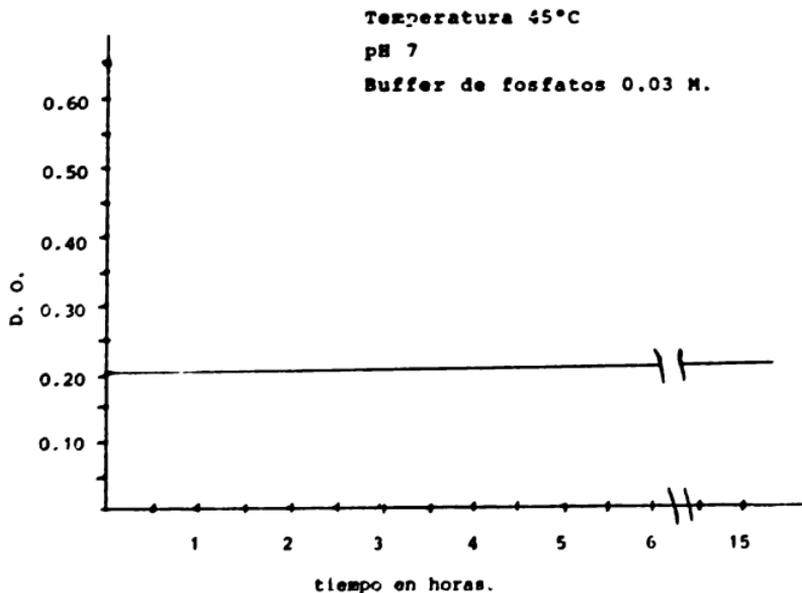


TABLA DE RESULTADOS DE
PROCESO DE SEPARACION.

- Tratamiento exclusivamente ajustndo pH a 4.3 con HCl (16).
- ** Tratamiento propuesto por Chibata et al en el año 1976 (37).
- *** Proceso desarrollado a nivel laboratorio.
- ****Proceso desarrollado aplicado a nivel de planta piloto.

Penicilina % de Vol.			Acido 6-aminopenicilánico(6-APA)				
G.	g/l	Conv.	τ	g/soln.	g/ recup.	%de recup.	% pureza
-	50	73.18	0.45	9.5374	1.77	13.00	78
**	50	72.07	0.50	10.4519	2.09	20.00	46
**	50	62.03	0.50	9.0046	3.98	36.24	62
**	50	38.03	0.45	5.5200	8.00	70.00	48.3
***	25	83.00	1.00	12.047	11.673	95.00	98.0
***	25	83.00	1.00	12.047	11.187	91.93	99.0
***	25	83.00	1.00	12.047	12.34	92.00	89.0
***	25	83.00	1.00	12.047	11.42	94.00	100.0
***	25	83.00	0.50	6.024	4.73	78.00	100.0
****	40	69.00	100.	1603.0	1290	80.47	99.0

MÉTODOS DE ANÁLISIS.

Se efectuaron una serie de determinaciones de los productos obtenidos del ácido 6-aminopenicilánico, y se hacían comparaciones con el 6-APA proporcionado por dos empresas que fabrican este producto en México y con un reactivo analítico comercial (Sigma).

6-APA
REACTIVO ANALITICO
p. dec = 210

6-APA
I.I.B.M. U.N.A.M.
p. dec. 210

6-APA
MEZCLA
p. dec. 210

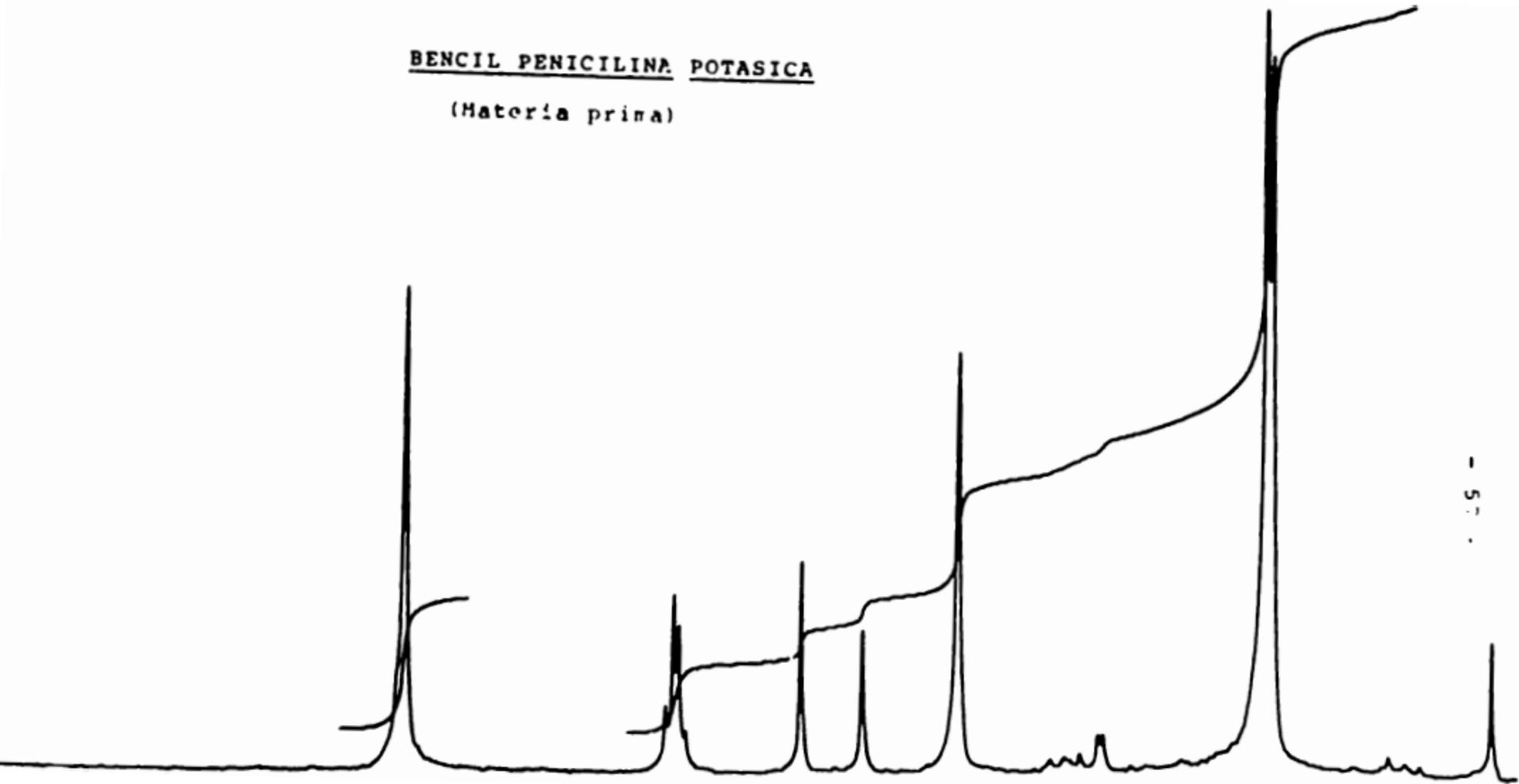
Cromatografía en papel

Sistema de eluyente : n-Butanol-EtOH-H₂O
(5:4:1) v/v
Revelador : vapores de I₂
Condiciones : Temperatura ambiente
Tiempo : aprox. 1.5 Horas

R_f 6-APA = 0.4
R_f Fenilacético = 0.6
R_f Bencilpenicilina = 0.2

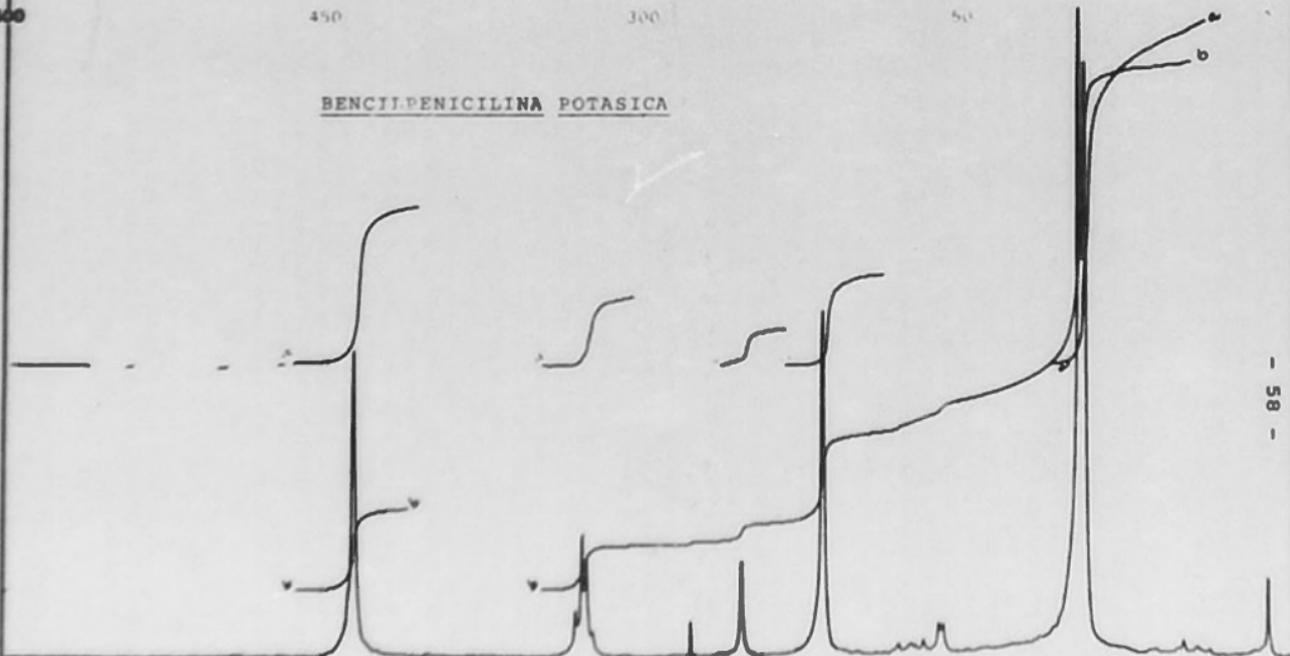
BENCIL PENICILINA POTASICA

(Materia prima)



4000Hz	200 cm ⁻¹	3000	2000	1000	0
2000	100	1500	1000	500	0
1000		750	500	250	0
800		600	400	200	0
600		450	300	50	0

BENZILPENICILINA POTASICA



Acido Fenil-acetico

$C_6H_5^-$

$-CH_2^-$

Espectro I.R. del Acido 6-aminopenicilánico

R. OZACHI, M. MIYAWA and T. NARA

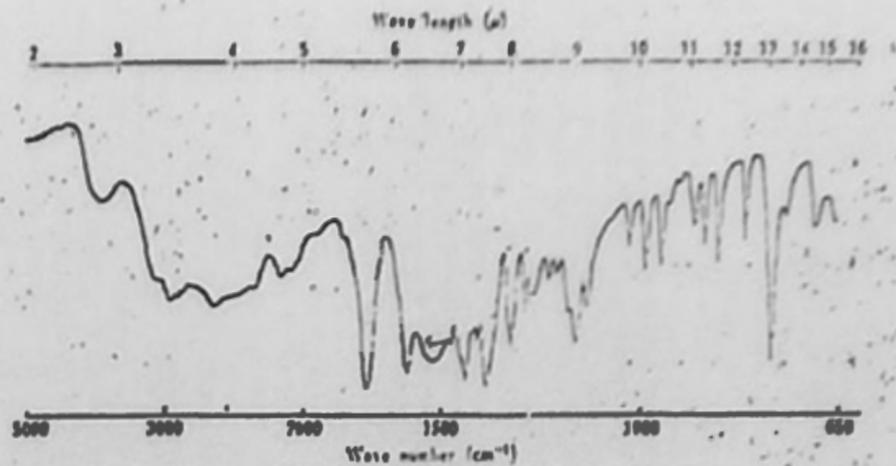
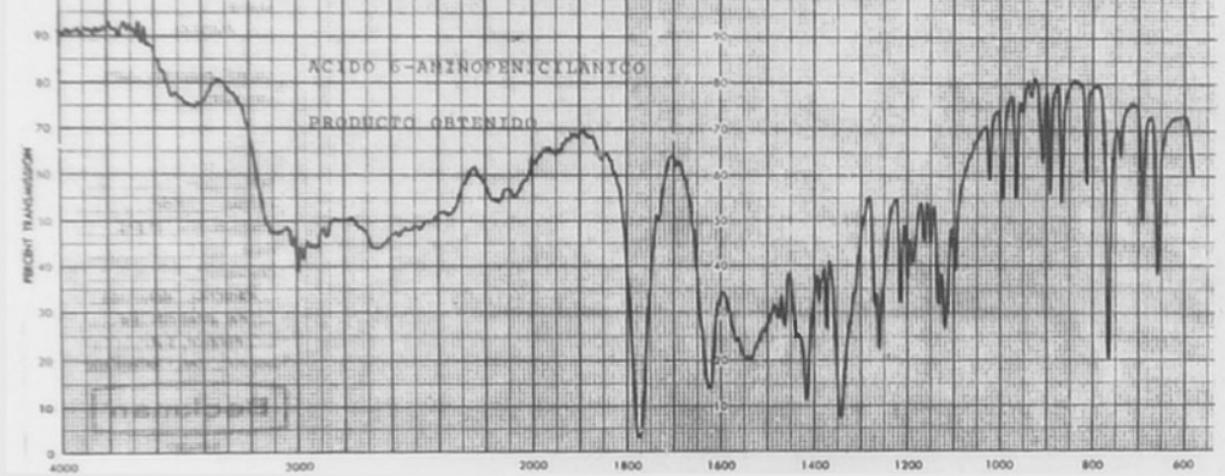
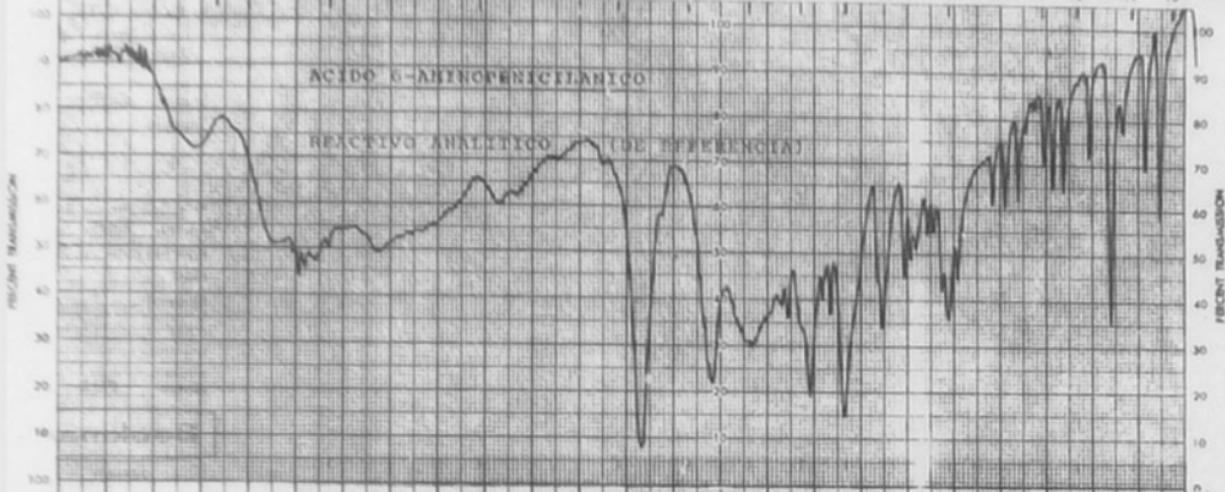
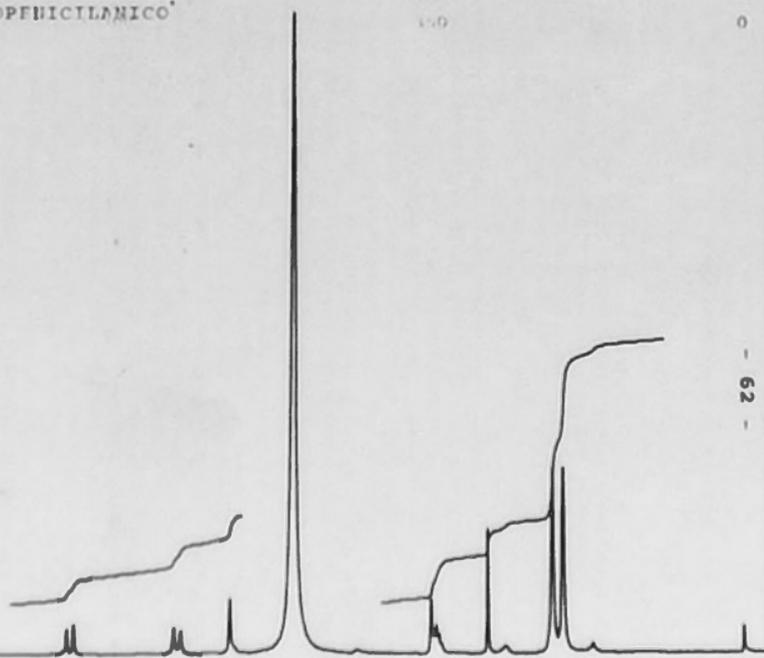


FIG. 3. IR Spectrum (KBr).



4000Hz	200%	3000	2000	1000	0
2000	10%	1500	1000	500	0
1000		750	500	250	0
800		600	300	150	0
600		450		100	0

ACIDO 6-AMINOPHENILAMICO

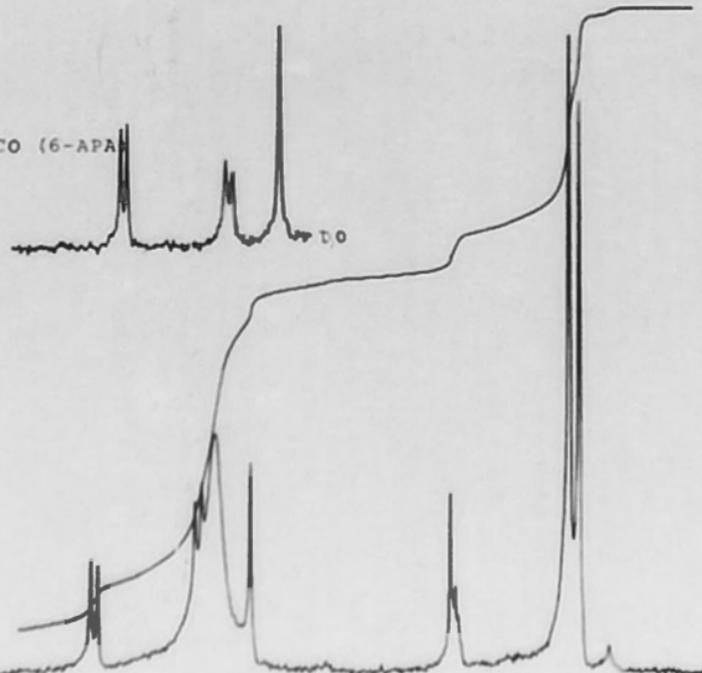


4000Hz
2000
1000
800
600

1000 1000 1000
1000 1000 1000
1000 1000 1000
1000 1000 1000
1000 1000 1000

←H

ACIDO 6-AMINOPENICILANICO (6-APA)



A continuación se enuncian las bandas más significativas, presentes en los espectros del producto obtenido:

Compuesto : Acido 6-aminopenicilánico

Espectro Infrarrojo.

<u>Bandas</u>	<u>Grupo Funcional</u>
1770 cm^{-1}	carbonilo de la lactama
1620 cm^{-1}	amida de la -lactama
1520 cm^{-1}	6-amino

Espectro R.M.N.

1.4	singlete grupo -metilo	(a)
1.6	singlete grupo -metilo	(b)
2.5	singlete grupo -6-amino	(c)
4.1	singlete de protón 3	(d)
4.5	singlete de protón 5	(e)
5.35	dobleto de protón 6	(f)

Discusión.

Existen varios procesos de separación para 6-APA, sin embargo, estos han sido aplicados a soluciones de 6-APA, formado a partir de la hidrólisis de bencilpenicilina, mediante diferentes sistemas de catálisis enzimática, por ejemplo los microorganismos empleados como fuente de la enzima son diversos, así también son variados los soportes usados tanto para inmovilizar el microorganismo completo o la enzima.

La dificultad para separar en forma pura el 6-APA, depende de las impurezas presentes y por ende del sistema enzimático utilizado ya que modifican o requieren de diferentes operaciones a realizar en el proceso de separación.

En ningún método de separación reportado en la literatura, se justifica cada etapa u operación efectuada, tampoco se señala ni especifica problemas técnicos o mencionan el comportamiento del 6-APA en solución acuosa a las diferentes condiciones a que se somete el 6-APA durante el proceso tanto de hidrólisis, como de separación.

En casi todos los anteriores trabajos la parte analítica carece de exactitud, ya que en sí es difícil determinar mezclas de compuestos tipo β -lactámicos. En general el 6-APA lo determinan por métodos colorimétricos indirectos como el ensayo con hidroxilamina y el método iodométrico, que no son específicos; también se ha aplicado la cromatografía en papel, la cual consiste en eluir una muestra del 6-APA en papel, posteriormente aplicar una solución de cloruro de ácido fenilacético para formar la bencilpenicilina y finalmente esta última medirla por bioensayo. La medida puede tener errores debido a que también puede haber cloruro de áci

do fenilacético residual, o un exceso de ácido fenilacético; los cuales también pueden inhibir el crecimiento del microorganismo empleado para la prueba. En nuestro caso el método del p-dimetil-amino-benzaldehído es específico para la determinación cuantitativa del 6-APA.

Es de hacer notar que algunos compuestos empleados en algunos métodos de separación reportados, provocan pérdidas de 6-APA por descomposición, entre estos están el HNO_3 , el H_2SO_4 , y el ácido acético.

En los procesos reportados para separar el 6-APA, existen algunos otros inconvenientes además del anteriormente mencionado, ya que algunos diluyen la concentración del producto deseado, o emplean disolventes como metil-isobutil-cetona que además de tóxico es difícil de manejar y tiene un alto costo, lo cual restringe su uso únicamente a nivel laboratorio.

De entre los puntos más importantes del proceso de separación diseñado, se encuentran la concentración adecuada del 6-APA para cristalizar, y las condiciones de operación para concentrar si el caso lo requiera.

Un punto del cual no se menciona en ningún trabajo es la solubilidad del 6-APA, y menos aún, que esta puede ser influenciada por la adición de metanol, disolvente que es soluble en agua y puede desplazar el equilibrio 6-APA soluble a 6-APA sólido.

En este trabajo se encontró que el 6-APA es insoluble en metanol y butanol. La prueba de solubilidad del 6-APA en estos alcoholes se hizo pensando en que estos disolventes podían solubilizarse en agua y así buscar disminuir la solubilidad del 6-APA, siendo además importante que estos eviten la cristalización de otros alcoholes ó grasas posiblemente presentes, ya que pueden provenir de las células inmovilizadas usadas para la hidrólisis de la bencilpenicilina.

En la solubilidad del 6-APA en agua se aprecia la marcada dependencia de la cantidad de álcali, ya que da lugar a la formación de 6-APA en forma de sal. En este experimento de solubilidad se uso potasa, ya que es el álcali empleado para regular el pH desde la formación del 6-APA a partir de la bencilpenicilina.

Es importante resaltar que la solubilidad máxima del 6-APA en agua destilada es de 0.5g/100 ml. o sea 5 g/l. Sin embargo cuando se ha solubilizado una cantidad mayor de 6-APA con un álcali, y luego se efectúa la cristalización del 6-APA a pH 4.3 se esperaría recuperar la cantidad de 6-APA disuelto menos la cantidad de 6-APA soluble a saturación. Como ejemplo se puede citar a la tabla (pag.55) en que se presentan resultados de los procesos aplicados para separar el 6-APA.

En el método * se tiene en solución 9.5374 g/ 0.451 ó sea un equivalente a 21.19 g/l. Al efectuar la cristalización al pH 4.3 (punto isoeléctrico), solo se recuperan 1.77 g de 6-APA cristalino, por lo que en solución quedan 7.7674 g ; ó sea un equivalente a 17.26 g/l. Estos resultados indican que se forman soluciones

de 6-APA sobresaturadas, de las cuales se encontró que son muy estables.

En el laboratorio se observó que la temperatura no tenía mucha influencia para desequilibrar la solución sobresaturada.

La recuperación del 6-APA con las características deseadas (altos rendimientos y pureza) se logró usando acetato de n-butilo, el cual presentó una influencia en la formación de los cristales de 6-APA a partir de una solución sobresaturada; los cristales al microscopio se observaron muy geométricos y uniformes. Así mediante el uso de metanol y acetato de n-butilo, se logró desplazar el equilibrio 6-APA soluble a 6-APA sólido factor que influye para lograr altos rendimientos de recuperación y pureza.

En el proceso de separación también son importantes las condiciones de cristalización las cuales se probaron a pH 2 y 4°C, no apreciándose pérdidas de 6-APA después de más de 11 horas. La estabilidad del 6-APA a pH 7 y 45°C fue muy buena, en la curva anteriormente presentada, se observa un ligero aumento en la D.O. esto se debe a que hubo pérdida de agua por evaporación por lo tanto se concentró el 6-APA, más no se descompuso, se corroboró este experimento acidulando la solución a pH 2 esperando en caso de haberse efectuado descomposición del 6-APA, la presencia de ácido penicilínico el cual a pH ácido se descarboxila, y se observa una efervescencia, la cual no se observó.

La tabla en que se presentan los resultados de los procesos de separación reportados y de el desarrollado, aplicados a soluciones de 6-APA similares, muestra que por el método desarrollado se obtiene tanto mejores rendimientos de recuperación como una mayor pureza del producto.

El análisis del 6-APA obtenido por el método desarrollado, se efectuó comparandole con 6-APA reactivo analítico. En el punto de fusión no se observo abatimiento.

Se utilizarón tambien métodos instrumentales. Se presenta el espectro de infrarrojo (I.R.) del producto obtenido por el método de hidrólisis enzimática y el del 6-APA reactivo analítico. Se efectuó tambien un análisis por resonancia magnética nuclear (R.M.N) al producto obtenido, disolviéndolo en dimetilsulfóxido. Los espectros resultantes así como el análisis comparativo con espectros de R.M.N del cloruro de ácido fenilacético, permitiendo establecer que el sistema de producción enzimático de 6-APA a partir de penicilina era un hecho.

Se presenta asimismo una copia del espectro de I.R. de 6-APA reportado por Okachi et al (30) que es idéntico al obtenido por nosotros ya que comprueba al ácido 6-aminopenicilánico (6-APA).

Conclusiones.

Se ha desarrollado un método satisfactorio de separación para el 6-APA, producido por el sistema -enzimático, del cual se han considerado los componentes presentes en la solución, se ha evaluado la estabilidad del 6-APA en las diferentes condiciones a que es cometido, como son las condiciones de cristalización o concentración. Se encontró un factor muy importante para la transformación del 6-APA soluble a 6-APA cristalino mediante algunos disolventes, los cuales además influyen en la formación del cristal, además de elevar los porcentajes de recuperación del producto.

El proceso desarrollado es sencillo, fácil de escalar, habiéndose aplicado a nivel de laboratorio y planta piloto, permitiendo recuperaciones de 80% a 95%.

Finalmente mediante diversos métodos de análisis se demuestra que el producto de la hidrólisis enzimática de bencilpenicilina es realmente el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), el cual se ha logrado recuperar en forma eficiente.

BIBLIOGRAFIA.

- 1) Macdonald K. d. Nature 204, 404 (1964)
- 2) Chain. E., Florey, H.W., Gaedner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Orr-Ewing J., and Saunders, A.G. - Lancet 2, 226 (1940).
- 3) Moyer, A.J., and Coghill, R.D. J. Bacteriol 51, 57 (1964).
- 4) Moyer, A.J., and Coghill, R.D. J. Bacteriol 53, 329 (1947).
- 5) Abraham, E.P., Chain, E.B., Fletcher, C.M., Florey, H.W. Gardner, A.D., Heatley, N.G., and Jennings, M.A. - Lancet 2, 177 (1941)
- 6) Sakaguchi, K., and Murao, S. J. Agr. Chem. Soc. Jap. - 23, 311 (1950).
- 7) Batchelor, F.R. Doyle, F.P., Nayer, J.H.C., and Rolinson G.N. Nature (London) 183, 257 (1959).
- 8) Ballio, A., Chain, E.B., Dentice di Accadia, F.M., Raver K., Schleringer K.J. and Schlesinger, S. Nature (London) 161, 909 (1961).
- 9) Batchelor, F.R., Doyle, F.P., Nayer, J.C. and Rolinson, G.N. Nature (London) 183, 257 (1959).
- 10) Sheehan J.C. and Kenneth A. H. Logan J. Am. Chem. Soc. 84, 2983 (1962).
- 11) Woodward R.B. The Chemistry of Penicillin, Princeton University Press (1949).
- 12) Butler A.R., Freeman K.A. and Write D. E.
- 13) Connors Y.A. Amidon G.L. and Kennon L. Chemical Stability of Pharmaceuticals. ed. John Wiley & Sons, Inc. (1979).
- 14) Batchelor F.R. and Cameron Wood J. Nature (London) 195, 1000 (1962).

- 15) Rapson H.D.C. and Bird A.E.J. Pharm Pharmacol. 25,222 (1963).
- 16) Journal of Chromatography library Vol15, Elsevier Scientific Publishing company, New York 1978'
- 17) Weissenburger, H.W.O. and Van der Hoeven, M.G. Patente 3,499,909 USA (1970).
- 18) Carrington T.R. Proceeding of The Royal Society of London B. 179, 321 (1970).
- 19) Chauvette, R.R., Hayes, H.B., Huff, G.L. and Penington, P.A. Journal of Antibiotics 25,248 (1972).
- 20) Huber F.M., Chauvette R.R. and Jackson B.G. in "Cephalosporin and Penicillin Compound : Their Chemistry and Biology"- E.H. Flynn ed. Academic Press New York 1973.
- 21) Chauvette, R.R. Patente 3,839.328 U.S.A. (1974).
- 22) Marconi W., Morisi F. and Mosti R. DECHMA, monographs Biotechnology vol 82 New York 1978.
- 23) Moss, M.O. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology 1, 111 (1977).
- 24) Rolinson G.N., Batchelor F.R. Butterworth D. Cameron-Wood J. Cole M. Eustace G.C., Hart, Marian V. Richards M. and Chain E.B. Nature (London) - 187, 236 (1960).
- 25) Hamilton-Miller J.M.T Bacteriol Rev. 30, 760 (1966)
- 26) Vandamme E.J. and Volts J.P.Z. Allg Microbiol- 11, 155 (1971).
- 27) Cole M. Biochem. J. 115, 757 (1969).
- 28) Savidge, T.A. and Cole M. Methods in Enzymology 43, 705 (1976).
- 29) Patente U.S.A. 3, 144, 395 (1964).
- 30) Ryo Okachi, Masanaru Misawa and Takashi Nara Agr. Biol. Chem., 36, No 6, 925 (1972).

- 31) Nam D.H and Dewey D. Y. Ryo J. Fermentation - Technology 57, No 2, 141 (1979).
- 32) Kleiner, G. and Lopatnev, S.V. Biotechnology and -- Bioengineering Symposium 4, 241 (1973).
- 33) Thadani S.B., Borker, P.S. and Remachandran, S. -- Biochemical Journal 128, 49 (1972).
- 34) Acevedo, F. and Cooney, C.L. Biotechnology and Bio engineering 15, 493 (1973).
- 35) Patente 3, 905, 868 U.S.A.
- 36) Marconi, W., Bartoli, F., Cerere, F. Gallí, G., and Morisi F. Agr. and Biological Chemistry 39, 277 (1975)
- 37) Patente 3, 953, 291 U.S.A. (1976).
- 38) Patente 3, 446, 705 U.S.A? (1969)
- 39) Carleysmith S. W. Dunnill P. and Lilly M.D. Bio- technology and Bioengineering 22, 735 (1980).
- 40) Carleysmith S.W. and Lilly M.D. 21, 1057 (1979).
- 41) Batechelor F. R. Cameron-Wood J. Chain E. B. and Rolinson G.N. Proc. Roy. Soc. Ser. B 159, 514 (1961).
- 42) Alicino J. P. Analytical Chemistry 33, 648 (1961).
- 43) Karnovsky M.L. and Johnson M.J. Anal. Chem. 21, 1125 (1949).
- 44) Evrard E. Claesen M. and Vanderhaeghe H. Nature - (London) 201 1124 (1964).
- 45) Bishta C., Mays D.L. and Carofalo M. analytical - Chem. 43, 1530 (1971).
- 46) Dixon M. Biochem J. 54, 458 (1953).
- 47) Selt D.A. et al. Biotechnology and Bioengineering 11, 337 (1969).
- 48) Oostendorp J. G. Antonie Von Leeuwenbock J. Micro- biol. Serol. 38, 201 (1972).
- 49) Nys P.S. Savitskaya E.M. and Kolygua T.S. Antibio- tiki (Moscow) 18, 270 (1973).
- 50) Thomas R. Nature (London) 191, 1161 (1961).
- 51) Sneath P.H.A. and Collins J.P. Biochem J. 79, 512 (1961).

- 52) Alicino J.F. Industrial and Engineering Chemistry 18, No. 10, 619 (1964).
- 53) Borer G.E. and Evertt P.M. Anal. Chem. 21, 670 (1949).
- 54) Koy dré Holm. Anal. Chem 44, 795 (1972).
- 55) Uri J. Nature (London) 161, 1223 (1961).
- 56) Oostendorp J.G. Antonie Von Leeuwonbock J. Microbiol. Serol. 38, 201 (1972).
- 57) Raychowdhury M. and Chakrabarti P. Analytical Biochem. 95, 413 (1979).
- 58) Kornfeld J.M. Analytical Biochem 86, 118 (1978).
- 59) Mayer H., Collins J and Wagner. Enzyme Engineering 5, 61 (1980) ed Howard H. Wetall and Garfield P. Plenum Press.
- 60) Quintero R., Bastarrachea F., Bolivar F. y Rubio J. Proyecto Ampicilina Riesgo compartido LABs. Zapata CONACYT & I.I.B.M. de la U.d.A.M. (1979).
- 61) Patente 3, 736, 230 U.S.A. (1973).
- 62) Nam D. H. and Dewey D. Y. Ryu J. Fermentation Technol. 57, 141 (1979)
- 63) Okachi R. Misawa M. and Nara T. Agr. Biol. Chem, 36, 925 (1972).
- 64) Casas T.L., Carranco R.D., Bastarrachea A.F., bolivar Z.F., and Quintero R.R. Production of 6-APA by whole cells immobilized, presented at V Enzyme Engineering Conference, Henniker, New Hampshire, July 29 - August 3, 1979.
- 65) Rubio L.J., Casas T.L., Sandoval H.M. and Quintero R.R. Production of 6-Aminopenicillanic Acid from Penicillin by gel-entrapped whole cells. presented at II Chemical Congress of the North American Continent, Las Vegas, Nevada, August 24-29 (1980).

- 66) Ouintero R.R., Casas T.L., Sandoval H.H., Carranco R.D., and Giral B.C. Application of enzyme technology to the production of pharmaceuticals. presented at the Sixth International Conference of Global Impacts of Applied Microbiology, GIAM VI, Lagos, Nigeria, August 30 to September 7 1980.
- 67) Casas T.L. Tesis de Maestría I.I.B.M. de la U.N. A.M. en preparación (1981).
- 68) Comunicación personal con el Ing. Rodriguez.