

# OBTENCION, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DEL ACIDO 6-AMINO PENICILANICO (6-APA) A PARTIR DE PENICILINA G POTASICA.

*Ma. Teresa Reguero<sup>1</sup>  
Dolly Montoya<sup>1</sup>  
Sonia Ospina<sup>1</sup>  
Rosa Luz González<sup>2</sup>  
Agustín López Munguía<sup>3</sup>  
Rodolfo Quintero<sup>3</sup>.*

## RESUMEN

En el presente trabajo se estableció la metodología más adecuada para la separación y purificación de 6-APA y AFA producidos enzimáticamente a partir de bencilpenicilina. Se caracterizaron los productos a través de sus propiedades físicas, cromatográficas y espectroscópicas. El rendimiento global alcanzado por el proceso de separación establecido fué del 90% y se escaló a nivel de 1.5 litros.

## SUMMARY

The methodology of isolation and purification of 6-aminopenicillanic acid and phenylacetic acid, obtained by enzymatic hydrolysis of bencilpenicillin were established. These compounds were characterized by physics, spectroscopic and chromatographic means. The total yield in the separation process was of 90% and this process was scaled at 1,5 L.

## INTRODUCCION

El ácido 6-amino penicilánico es un importante intermediario para la producción de antibióticos semisintéticos, especialmente ampicilina y amoxicilina. La demanda anual de penicilinas en 1985 (1), fué de 15 000 toneladas y se espera un incremento para el año 2000 de 22 700 toneladas, debido principalmente al aumento en el consumo de ampicilina por la aparición de inhibidores de Blactamasas que son enzimas presentes en los microorganismos causantes de infecciones en el hombre y animales, las cuales producen el rompimiento del anillo  $\beta$ -lactámico, ocasionando su resistencia al antibiótico - y la aparición de nuevas entidades químicas desarrolladas a partir del 6-APA, con características mejoradas en cuanto a su espectro de actividad y absorción.

El valor de los antibióticos producidos a partir del 6-APA y 7-ADCA (Acido deacetoxicefalosporánico) en 1985 fué de aproximadamente 800 millones de dólares, de los cuales los más importantes en volumen fueron: la ampicilina de la cual se produjeron 3600 toneladas (utilizando 2350 toneladas de 6-APA) y la amoxicilina con una producción de 1800 toneladas (utilizando 600 toneladas de 6-APA) (1)

El 6-APA se puede obtener por dos vías: la química y la enzimática (2). Las desventajas que presenta su producción a través del método químico son la utilización de condiciones

<sup>1</sup> Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Apto. Aéreo 14-490. Santafé de Bogotá, Colombia.

<sup>2</sup> Genin S.A. Cuernava Mor. México.

<sup>3</sup> Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 510-3. Cuernavaca, Mor. México.

criogénicas y anhidras lo que eleva sustancialmente el costo del producto. Para el caso de su fabricación por vía enzimática es importante anotar como desventaja el elevado costo del biocatalizador de penicilino amidasa por lo que se debe propender por su reutilización. El costo de producción del 6-APA por vía química es de 10 -12 dólares/Kg; mientras que por el método enzimático este costo es de sólo 3-4 dólares /Kg. (3).

Uno de los programas de ONUDI es el Programa Regional de Biotecnología para América Latina y el Caribe, el cual apoya actualmente varios proyectos que se desarrollan conjuntamente por varios países, uno de ellos es el proyecto "Producción Industrial de Penicilino amidasa y su uso para la obtención de ácido 6-aminopenicilánico" en el cual participan México, Cuba y Colombia.

En el presente trabajo se desarrolló el método de separación y purificación de 6-APA y del ácido fenilacético (AFA) y se caracterizaron por sus propiedades físicas, cromatográficas y espectroscópicas, los compuestos obtenidos por este proceso.

## METODOLOGIA

### *Materiales y Métodos*

1) Las determinaciones de punto de fusión se realizaron en un fusiómetro Fisher-Johns. Los puntos de fusión se reportan sin corregir. Los espectros de infrarrojo se corrieron en un aparato Perkin Elmer modelo 298. Los espectros de IR se obtuvieron en pastilla de KBr (5 mg de muestra por 300 mg de KBr). La cromatografía en capa delgada se efectuó utilizando cromatoplacas preparadas de Kieselgel GF<sub>254</sub> de Merck. La cromatografía líquida de alta eficiencia se realizó en un cromatógrafo Waters equipado con: a) Power Line 600E, bomba 600, detector UV-Vis modelo 484, controlador de

gradiente 600E; b) Wisp 700 satélite (inyector automático); c) Simbox (intercomunicador entre la computadora y el cromatógrafo); d) Computadora NEC cargada con el programa MAXIMA 820 versión 3.2; e) Impresora NEC.

### *Métodos:*

La hidrólisis de la bencilpenicilina se realizó por el método enzimático (4) utilizando el biocatalizador de penicilino amidasa desarrollado dentro del proyecto. Las condiciones de hidrólisis fueron las siguientes:

- a) Volumen de reacción 1 litro
- b) pH = 7.5 ajustado con NH<sub>4</sub>OH 3 M
- c) Temperatura 37°C
- d) Tiempo de reacción 2 horas
- e) Relación enzima/penicilina 120 U/g
- f) Concentración de sustrato 10% de PGK

El porcentaje de conversión obtenido fué mayor de 90%.

Una vez concluido el proceso hidrolítico se procedió a filtrar el producto de la reacción. El filtrado se concentró utilizando un sistema a presión reducida, controlando los siguientes factores: presión, temperatura del baño de agua, temperatura del sistema de refrigeración, agitación, volumen inicial y final. Al producto en estas condiciones se le determinó la concentración de 6-APA a través de la técnica del p-dimetilaminobenzaldehído (5). Se procedió a realizar la precipitación del 6-APA y se evaluaron los siguientes parámetros: temperatura inicial, conductividad de la solución, pH inicial, agitación, tiempo de adición del HCl, temperatura final, pH final, volumen final. Posteriormente se adicionó etanol. En este paso del proceso se controlaron las siguientes variables: calidad del etanol, temperatura inicial, tiempo de adición y velocidad de agitación. Finalmente

TABLA No. 1

## PROPIEDADES FISICAS CROMATOGRAFICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL 6-APA

Muestra	Punto de Fusión (°C)	Pureza ABC (%)	Pureza CLAE conc. (%)	Recuperación (%)	Rf C.C.D.	LR cm <sup>-1</sup>
H-2	212*	97.24	90.25	91.3	0.12	1775
H-4	210*	83.57	73.56	89.1	0.13	1774
H-8	210*	74.57	71.52	89.3	0.12	1776
H-10	210*	81.31	78.21	92.7	0.13	1775
A-1	210*	85.68	88.14	93.6	0.13	1775
A-2	210*	84.73	87.58	94.9	0.12	1776
A-3	212*	84.95	81.69	92.7	0.12	1776
A-4	212*	97.01	100	87.4	0.13	1775
A-5	211*	82.05	90.58	92.7	0.12	1776
A-6	212*	99.87	100	89.3	0.13	1775

\*Funde con descomposición

el producto obtenido se filtró y se secó.

La caracterización del producto obtenido se realizó por medio de sus constantes físicas, cromatográficas y espectroscópicas, (6) las cuales se consignan en la **Tabla I**.

El otro producto que se obtiene del proceso de hidrólisis es el ácido fenil acético. El proceso de aislamiento y purificación de este compuesto se efectuó de la siguiente forma: Al filtrado obteni-

TABLA 2

## CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS DE LOS PATRONES

Compuesto	t <sub>r</sub> (min.)	Pureza % (ABC)
PGK	14.2	99.65
6-APA	2.0	100
AFA	7.3	99.89

do después de separar el 6 - APA, se le ajustó el pH con HCl al 50%, se extrajo con cloroformo y la fase clorofórmica se extrajo nuevamente con una solución de KOH 3 N. La fase acuosa se acidificó con HCl, el precipitado que se obtuvo se filtró, secó y caracterizó. Las condiciones que se tomaron en consideración para optimizar el proceso fueron: temperatura y pH iniciales, velocidad de agitación, pH y temperatura finales. Los parámetros del producto obtenido se consignan en la **Tabla 3**.

Con el propósito de purificar el ácido fenilacético se procedió a realizar la recristalización del mismo, analizando la pureza y rendimiento del producto obtenido.

**Caracterización del 6-APA y AFA.**

A los productos obtenidos y previamente purificados se les tomó su punto de fusión. Los datos obtenidos se informan en la **Tabla I**. La determinación de sus propiedades espectroscópicas se realizó a través de sus espectros de infrarrojo los cuales se corrieron en pastilla de KBr (5 mg de muestra por 300 mg de KBr) y se utilizaron

TABLA 3

## PROPIEDADES FISICAS CROMATOGRAFICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL AFA

Muestra	Punto de Fusión (°C)	Pureza ABC (%)	Pureza CLAE conc.(%)	Recuperación (%)	Rf C.C.D.	I.R cm <sup>-1</sup>
A-1	76	98.35	95.87	41.37	0.38	cumple
A-1a	77	99.89	94.71	41.37	0.40	cumple
A-2	75	95.90	93.58	70.34	0.39	cumple
A-3	75	95.91	80.05	84.55	0.40	cumple
A-4a	75	94.56	84.26	50.28	0.40	cumple
A-4b	76	95.00	82.48	50.28	0.40	cumple
A-4c	75	95.62	81.31	78.85	0.40	cumple
A-5a	76	96.13	92.89	78.85	0.40	cumple
A-5b	75	95.07	86.84	56.85	0.40	cumple
A-6a	76	97.90	93.67	56.85	0.41	cumple
A-6b	77	96.89	87.99	56.85	0.41	cumple

patrones de 6-APA y AFA para corroborar la idoneidad de las muestras. Los resultados obtenidos para cada una de las muestras se consignan en la **Tablas 1 y 2**.

Con el propósito de caracterizar cromatográficamente los compuestos, se recurrió a la cromatografía en capa delgada utilizando cromatoplasmas preparadas de Kieselgel GF<sub>254</sub>. Las condiciones de elución se indican en la **Tabla 4**

Para la cuantificación de los productos procedentes de la hidrólisis se utilizó la cromatografía líquida de alta eficiencia. Las condiciones en las que se realizó la experimentación fueron las siguientes: Fase estacionaria  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub>; largo de columna 15 cm. volumen de inyección 20  $\mu$  L; sistema de elución A) 90% de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, metanol 10% y B) 50% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, metanol 50%; longitud de onda del detector 220 nm; sensibilidad 0.5 UA. En todos los casos se utilizaron patrones de PGK, AFA y 6-APA al iniciar el ensayo. Los tiempos de retención de los patrones se muestra en la **Tabla 2**.

El diagrama completo de separación y purificación de 6-APA y AFA se muestra en la **Figura No. 1**

## DISCUSION DE RESULTADOS

De acuerdo con los datos obtenidos de los diferentes ensayos se pudo establecer la metodología

más adecuada para la purificación del 6-APA y del AFA. De manera general este proceso debe contemplar una filtración previa con el objetivo de eliminar impurezas presentes.

Durante la etapa de concentración del hidrolizado bajar la temperatura del agua de enfriamiento con el propósito de que la destilación se lleve a cabo sin necesidad de incrementar la temperatura del baño de agua, ya que esto ocasiona pérdidas en el rendimiento global del proceso. En este sentido es importante mantener la presión del sistema en 23 pulgadas de vacío.

Se precisó que se requiere, en el proceso de precipitación del 6-APA con HCl que el pH se encuentre alrededor de 4 para evitar la redisolución del producto.

La adición del etanol debe realizarse cuando la mezcla se encuentre a temperaturas bajas cercanas a 5°C. Debe ser controlada la velocidad de adición para evitar que la temperatura del sistema se eleve y con ello se redisuelva el 6-APA.

La estabilidad del 6-APA se mejora si el producto perfectamente seco, se guarda en contenedores de vidrio ámbar, herméticamente cerrados y a bajas temperaturas, para evitar que la hidrólisis se lleve a cabo.

Las características físicas, químicas y espectroscópicas encontradas para el 6-APA obtenido por este proceso corresponden a las

**TABLA 4**

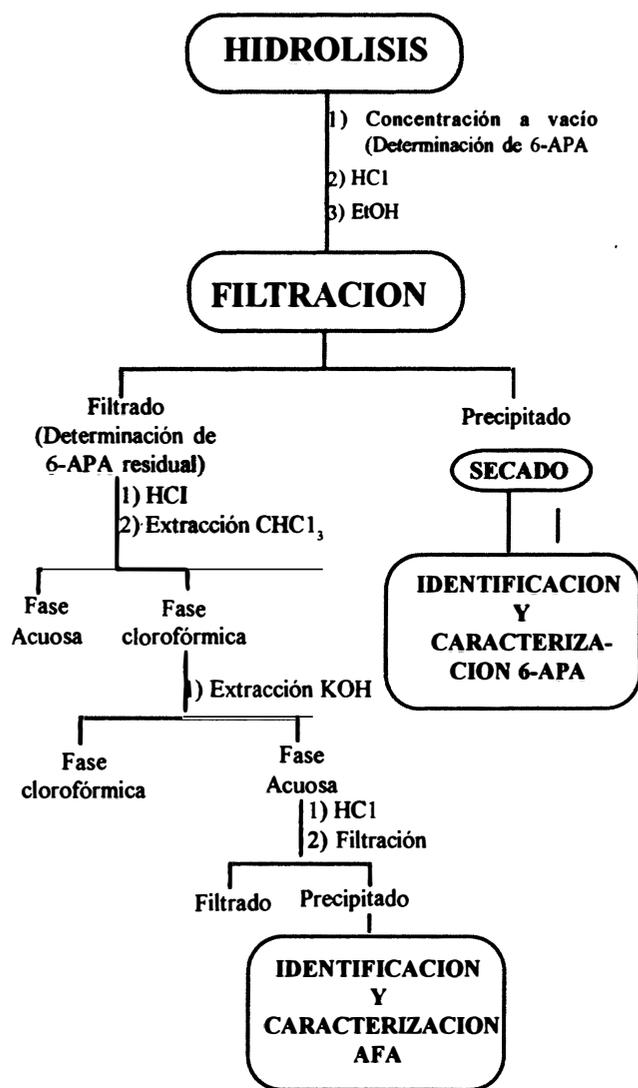
Condiciones empleadas para la caracterización cromatográfica de los productos procedentes de la hidrólisis

Fase estacionaria	Eluyente	Agente cromogénico
Gel de sílice GF <sub>254</sub>	Acetona/HCOOH (95:5)	FeCl <sub>3</sub> +K <sub>3</sub> <Fe (CN) <sub>6</sub> >+HCl
Gel de sílice GF <sub>254</sub>	CH <sub>3</sub> COOH/acetato de butilo/buffer de fosfatos 0.1 M (pH=5.6)/ BuOH/MeOH (20:40:12:5:7.5)	KI+H <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub> +HCl+Acetona

Los Rf's obtenidos de la cromatografía en capa delgada, se consignan en las **Tablas 1 y 2**.

**FIGURA No. 1**

Diagrama de obtención y purificación del 6-APA y AFA



que presenta un patrón de 6-APA.

En cuanto a la purificación y caracterización del AFA se puede señalar que en este proceso es importante controlar el pH de la reacción de precipitación ya que al no hacerlo se observó un bajo rendimiento.

Otro parámetro importante a controlar es la temperatura durante la adición de HCl la cual debe permanecer lo más cercana a 0°C. Asimismo es importante almacenar el AFA obtenido en envases herméticamente cerrados.

Una vez realizado este proceso con volúmenes de 100 mL se procedió a escalarlo a nivel de 1.5L, tomando en consideración las condiciones antes expuestas para la separación, purificación y caracterización de los productos obtenidos del proceso de hidrólisis.

**CONCLUSIONES**

1) Se estableció la metodología más adecuada para la separación y purificación del 6-APA y AFA producidos enzimáticamente a partir de bencilpenicilina.

2) Se caracterizaron a través de sus propiedades físicas, cromatográficas y espectroscópicas los productos obtenidos.

3) El rendimiento global alcanzado por proceso de separación establecido fue del 90% y se escaló a nivel de 1.5 litros.

**Bibliografía:**

1. Barber, M. and Ass. *Chemica. Medicinal Chemical Monographs. Monograph # 2. "6-APA, 7-ADCA and other penicillin transformation products"* PJB Publications. England.(1987)
2. Shewale, J.G. and Sivaraman, H. (1989). "Penicillin acylase: enzyme production and its applications in the manufacture of 6-APA". *Proc. Biochem.* 146-154. (1989)
3. Poulsen, J.B. "Current applications of immobilized enzymes for manufacturing purposes". *Biotechnol. and Gen. Eng. Rev.*, 1, 121-140. (1984).
4. Balasingham, K., Warburton, D., Dunnill, P. and Lilly, M.D. "The isolation and kinetics of penicillin amidase from *E. coli*". *Biochim Biophys Acta.* 276, 250-256. (1972).
5. Shewale, J.G. et al. "Evaluation of 6-aminopenicillanic acid by p-dimethylaminobenzaldehyde". *Biotech. Tech.*, 1, 1:69-72 (1987).
6. *Clarke's Isolation and Identification of Drugs.*(1986)Second edition, The Pharmaceutical Press. London . pag. 351.