



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO  
BIOCATÁLISIS COMO HERRAMIENTA EN  
EL DESARROLLO SOSTENIBLE DE  
FÁRMACOS (2)**

**Autor:** Iñigo de Pablo Carreras

**Tutor:** María Pilar Hoyos Vidal

**Convocatoria:** Junio 2018

## ÍNDICE

Resumen .....	3
Introducción .....	3
Objetivos .....	9
Materiales y Métodos .....	9
Resultados y Discusión .....	10
Conclusiones .....	17
Bibliografía .....	19

## RESUMEN

El presente estudio trata de mostrar, mediante una revisión bibliográfica, los avances y mejoras que ha traído consigo el desarrollo de la biocatálisis y de la química verde. Trataremos además de abordar, aunque sea brevemente, el futuro que se augura a la biocatálisis como una herramienta fundamental en la Industria Farmacéutica para la síntesis sostenible de fármacos. Desarrollado el concepto de biocatálisis, nos centraremos en las acilasas, concretamente en la penicilina G acilasa, y su empleo en la síntesis de penicilinas y cefalosporinas. Esta acilasa permite obtener 6-APA y 7-ADCA a partir de la penicilina G y cefalosporina G y así conseguir por semisíntesis de penicilinas y cefalosporinas respectivamente. Este hecho permite conseguir una gran variedad de antibióticos  $\beta$ -lactámicos de forma simplificada.

**Palabras clave:** biocatálisis; química verde; acilasas; antibióticos  $\beta$ -lactámicos

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la biocatálisis ha marcado diferentes industrias del siglo XX, principalmente la industria química y farmacéutica. Este novedoso término refiere al mero hecho del uso de enzimas en la síntesis de productos químicos. Este gran avance se ha unido a la aparición de otro concepto a desarrollar: la química verde. Ambos conceptos van directamente de la mano ya que hacen referencia a la aparición de una química sostenible y respetuosa con el medioambiente.

Centrando el interés brevemente en la Industria Farmacéutica en la actualidad, esta tiene dos retos, a saber, disminuir al menos en un orden de magnitud la producción de residuos por kilogramo de producto y desarrollar terapias donde las dosis sean menores (pasar del orden de miligramos a microgramos) y que sean más selectivas y menos tóxicas.

Antes de entrar en materia y comenzar a definir qué es la biocatálisis, cabe mencionar algunos conceptos y así poder entender el concepto a definir. Pues bien, el principio en que se basa la biocatálisis es la alta especificidad de las enzimas, como veremos de forma repetida más adelante. Esta especificidad se refiere al lugar de acción de la enzima sobre el sustrato, es decir, la transformación se produce específicamente sobre un lugar del sustrato.

Las enzimas tienen una serie de sustratos sobre los que actúan de forma natural, como puede ser la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa cuyo sustrato natural es la glucosa-6-fosfato y la transforma en 6-fosfoglucuronolactona. Sin embargo, las enzimas también pueden actuar sobre otros sustratos que no son los naturales dentro del organismo. Esta característica es la que denominamos **promiscuidad catalítica**, pilar básico para la realización de la biocatálisis. Este concepto de promiscuidad catalítica está muy ligado al término de **biotransformación**: transformación de una sustancia en otra actuando como actores las enzimas y cuando los sustratos no son los naturales para esta. Como podemos ver el concepto de biotransformación es clave para poder entender qué es la biocatálisis [1].

En cuanto a las definiciones de biocatálisis pueden oscilar desde largas y complejas a simples y escuetas. En mi caso me decantaré por una definición breve y, a mi entender, simple para poder comprender este nuevo término. La biocatálisis es el proceso por el que se aumenta la velocidad de una reacción metabólica debido a la acción enzimática [2]. Para tratar de entender este concepto algo mejor, la biocatálisis puede resumirse como el empleo de enzimas en la transformación de reactivos a productos (síntesis química).

No obstante, para poder comprender qué es la biocatálisis necesitamos exponer cuál es su utilidad. Pues bien, el empleo de enzimas *in vitro* ofrece una alternativa al proceso químico en unas condiciones más sostenibles y menos contaminantes.

Como puntos importantes de la biocatálisis podemos destacar:

- Las enzimas presentan una elevada quimio, regio y estereoselectividad.
- Las enzimas consumen menos productos de partida y menos energía que los mismos procesos catalizados por métodos convencionales.
- El impacto medioambiental es menor, obteniéndose productos más puros y a menor coste.
- La naturaleza altamente específica de las enzimas hace que los procesos biocatalíticos requieran menor número de pasos de protección y desprotección, lo cual repercute en menores aportaciones de productos químicos y produce también menores flujos de residuos y más manejables [3].

Debido a la preocupación creciente por el medioambiente y los esfuerzos realizados para tratar de llevar a cabo una química más sostenible apareció el término de química verde, la cual está muy ligada a la biocatálisis. Esta nueva rama de la química se caracteriza por:

- Ser respetuosa con el medioambiente.
- Minimizar la generación de residuos.
- Minimizar el riesgo de producción de sustancias peligrosas.
- Minimizar la utilización de energía
- Utilizar preferiblemente materiales de partida que sean renovables
- Disminuir el coste de la producción [4].

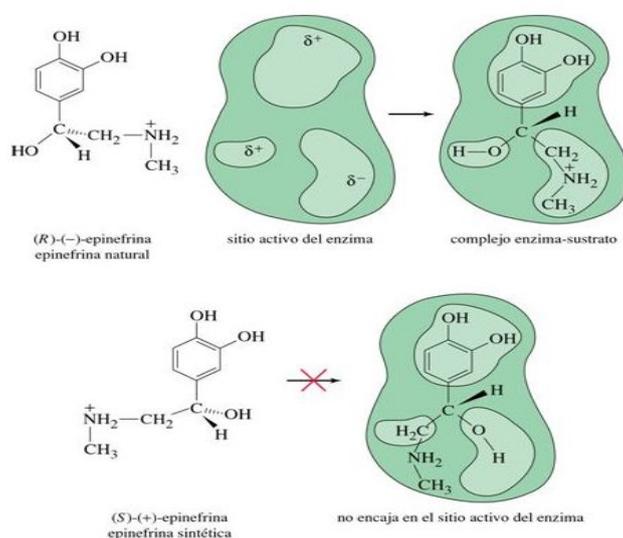
Al surgir el concepto de química sostenible, se establecieron los doce principios que marcan los requisitos sostenibles ideales de los procesos:

- 1) Prevenir los residuos: es mejor prevenir la formación de los residuos que tratarlos o eliminarlos. Esta es la diferencia y la mejora con respecto a la química medioambiental.
- 2) Maximizar la economía atómica: maximizar la incorporación en el producto final de todas las materias usadas.
- 3) Procedimientos menos peligrosos: generar y usar sustancias de escasa toxicidad humana y ambiental.
- 4) Productos químicos seguros: deben diseñarse productos químicos de escasa toxicidad.
- 5) Medios de reacción seguros: las sustancias auxiliares deben resultar innecesarias o, en la medida de lo posible, inocuas.
- 6) Incrementar la eficiencia energética.
- 7) Usar fuentes de partida renovables.
- 8) Evitar la formación de productos derivados.
- 9) Usar procesos catalíticos.
- 10) Diseñar productos químicos que se degraden después del uso: de tal forma que no persistan en el medioambiente.
- 11) Analizar en tiempo real para prevenir la contaminación.
- 12) Minimizar los potenciales accidentes [5].

Para poder continuar con dicha revisión es importante hacer un paréntesis y comentar brevemente algunas características importantes de los actores principales en nuestra obra, esto es, las enzimas.

Las enzimas producen de un modo específico y selectivo únicamente uno de los isómeros posibles, obteniéndose este de forma enantiopura. Esta separación de los enantiómeros es de crucial importancia en el ámbito de la industria farmacéutica ya que las propiedades de estos productos sintetizados pueden ser muy diferentes y pasar de ser beneficiosos a perjudiciales para el organismo. Este hecho nos recuerda al caso de la talidomida en la segunda mitad del siglo XX, lo cual potenció también la importancia de la quiralidad de los fármacos.

Es también importante conocer el reconocimiento quiral que realizan las enzimas, es decir, cada enzima tiene unas dimensiones geométricas determinadas, por lo que solo el sustrato que entre de forma correcta (“encaje”) en el centro activo será sobre el que se realice la transformación. Todo esto se traduce en lo que es una de las propiedades más importantes de las enzimas, son capaces de diferenciar el enantiómero apropiado por su diferente forma de reconocer los sustratos (resuelven mezclas racémicas) [6].



**Figura 1.** Reconocimiento quiral de las enzimas por el que diferencia enantiómeros gracias a que estas están diseñadas para solo poder alojar uno de los enantiómeros, el otro no encajará. Es la capacidad de las enzimas de resolver mezclas racémicas [7].

Pues bien, contextualizado el tema a tratar y conociendo un poco más a los actores principales, esto es, las enzimas; podemos indagar un poco más en las utilidades de la biocatálisis. La biocatálisis presenta la ventaja de poseer una elevada especificidad, cualidad especialmente útil en la síntesis de fármacos debido a la importancia de la quiralidad y selectividad de los fármacos hacia sus receptores. Esta especificidad que presenta resulta especialmente interesante ya que permite no tener que emplear grupos protectores, lo cual disminuye los pasos de la síntesis, aumenta el rendimiento y disminuye la producción de residuos contaminantes.

Para continuar, la alta especificidad de la biocatálisis de la que hemos hablado es gracias a la actuación de las enzimas, al igual que su habilidad de resolver mezclas racémicas. En la biocatálisis se podrá emplear células enteras o enzimas aisladas. Este hecho depende de si se necesita la regeneración de cofactores, en cuyo caso se optará por células enteras, o si se trata de reacciones de isomerización o hidrolíticas, en dicho caso lo idóneo serán las enzimas aisladas puesto que será económicamente más rentable.

Ahondando mínimamente en el empleo de enzimas aisladas o células enteras observamos que ambas presentan tanto ventajas como inconvenientes y suele optarse por una u otra en función de lo que es más económicamente rentable para la industria. Por un lado, las enzimas aisladas son más solubles en agua, lo cual conduce a que son sensibles a los cambios del medio, por lo cual pueden sufrir inhibiciones por sustratos y productos.

Por otro lado, las células enteras se emplean, como quedó expuesto anteriormente, porque las enzimas que se encuentran en estas células enteras dependen de cofactores como son el NADPH, ... y si no fuese por la regeneración de la enzima, llevada a cabo por la coenzima, sería un proceso económicamente inviable. En definitiva, las células enteras presentan un sistema de regeneración de coenzimas que hace que el proceso sea rentable. No obstante, el empleo de células enteras también presenta ciertos inconvenientes como es el bajo rendimiento debido a que dentro de las células puede haber más de una enzima que catalice el proceso y de esta forma obtendríamos mezcla de productos y no únicamente el producto deseado [6].

Esta última característica, el hecho de que sea económicamente rentable, es fundamental para que dicho proceso sea empleado. Para que un proceso biocatalítico sea económicamente factible depende de varios factores, como son el tipo de biocatalizador,

esto es, el tipo de enzima, el reactor específico empleado y la configuración del hardware de dicho reactor.

El tipo de enzima empleado es un factor limitante de la síntesis química de fármacos ya que determinará el medio que deba usarse, a saber, orgánico o acuoso. Actualmente se conoce que las enzimas también pueden actuar en medios orgánicos, lo cual implica numerosas ventajas como son la mayor solubilidad del sustrato, las reacciones hidrolíticas son reversibles y la especificidad modificada de las enzimas. Otros factores influyen indirectamente en el tipo de enzima a seleccionar como son el pH del medio, la fuerza iónica, etc. Condiciones que deben mantenerse muy controladas para conseguir un rendimiento óptimo de la reacción.

Para terminar con esta breve contextualización de la biocatálisis cabe recalcar la importancia y avances que ha repercutido el uso de la inmovilización de enzimas en este campo. La inmovilización enzimática se puede definir como el confinamiento de la enzima en un soporte, lo cual limita su movimiento pero conserva su poder catalítico. Este desarrollo aumenta la estabilidad de la enzima y hace posible su reutilización al mantenerla en forma insoluble. No obstante, también presenta inconvenientes como son la alteración de la conformación de la enzima, la pérdida de actividad o el incremento en el costo de la enzima inmovilizada [8].

Sabiendo en qué consiste la biocatálisis y las características esenciales de sus actores principales, a saber, las enzimas, estas pueden ser de diferente naturaleza y con una función diferente. Los biocatalizadores –entiéndase biocatalizador como sinónimo de enzima- utilizados tanto a escala industrial como de laboratorio se pueden dividir en seis tipos:

- 1) Lipasas (hidrolasas): son las más utilizadas
- 2) Esterasas (hidrolasas)
- 3) Proteasas (hidrolasas)
- 4) Nitrilasas (hidrolasas)
- 5) Otras hidrolasas
- 6) Óxido reductasas [9]

En nuestro caso, dado el elevado interés que ha generado en las últimas décadas, nos centraremos en un tipo de hidrolasa que es la penicilina G acilasa (PGA) para la síntesis

de antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Este tipo de antibióticos actúa en distintas etapas de la síntesis de la pared celular y actualmente son de gran utilidad en la práctica clínica. La mayoría de las bacterias presentan una capa de peptidoglucano que les confiere resistencia frente al estrés osmótico del exterior. Pues bien, el anillo  $\beta$ -lactámico de estos antibióticos imita los dos últimos residuos de D-alanina de la transpeptidasa, enzima encargada de la remodelación constante de la capa de peptidoglucano evitando la permanencia de dicha bacteria [10].

Estas enzimas están presentes en una gran variedad de microorganismos que incluyen bacterias gram positivas y negativas, hongos filamentosos y levaduras. Esta enzima puede ser secretada al medio o ser intracelular, bacterias gram positivas, o pueden ser periplásmicas, como en el caso de bacterias gram negativas. Dicho tema será desarrollado en la parte de resultados y discusión.

## **OBJETIVOS**

El objetivo de esta revisión bibliográfica es recalcar la importancia que está cobrando la biocatálisis especialmente en la Industria Farmacéutica de modo que simplifica la síntesis y obtención de productos químicos de utilidad terapéutica. Esta simplificación repercute en un ahorro económico importante para la Industria Farmacéutica. Por ello, e incluyendo su sostenibilidad y respeto por el medio ambiente, nuestro primer objetivo es demostrar que la empleabilidad de la biocatálisis como herramienta en el desarrollo sostenible de fármacos.

Como ejemplo más representativo, al simplificarse los pasos en la síntesis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y obteniendo un mayor rendimiento gracias a la especificidad de las enzimas, al igual que un menor impacto medioambiental, nuestros objetivos son demostrar la sencillez y mejores resultados en la obtención de intermediarios sintéticos en la semisíntesis de penicilinas y cefalosporinas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Al tratarse dicho tema de una revisión bibliográfica he empleado diferentes materiales de la literatura científica, esto es, artículos publicados en revistas y en sociedades científicas.

Gracias al estudio de las diversas publicaciones he podido comprender de una manera más detallada qué es la biocatálisis, de forma general, su futuro y posibles aplicaciones.

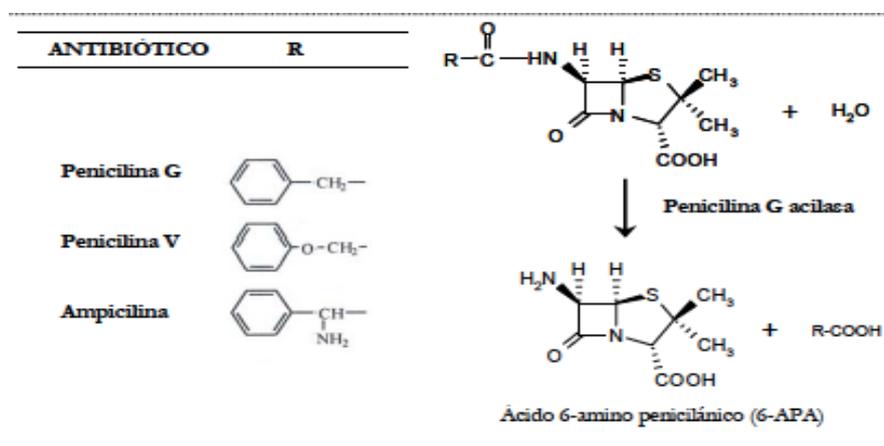
Por otro lado, gracias a la bibliografía, los distintos buscadores como PubMed y artículos más concretos, la presente revisión bibliográfica se centra, dentro del tema de la biocatálisis, en la síntesis de penicilinas y cefalosporinas (antibióticos  $\beta$ -lactámicos, muy empleados actualmente). Los artículos estudiados muestran la gran importancia que la penicilina G acilasa presenta al transformar la penicilina G y la cefalosporina G en los intermediarios 6-APA y 7-ADCA respectivamente. Además de su importancia se muestra, sobre todo en diferentes tesis doctorales, la forma de optimizar su rendimiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como hemos comentado anteriormente, en nuestro trabajo nos centraremos en la semisíntesis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas) usando como herramienta la biocatálisis. En nuestro caso, el instrumento del que se vale la biocatálisis es la penicilina G acilasa (PGA), un tipo de penicilina acilasa.

Las penicilinas acilasas pueden presentar diferentes especificidades del sustrato, según ello se puede clasificar en tres tipos:

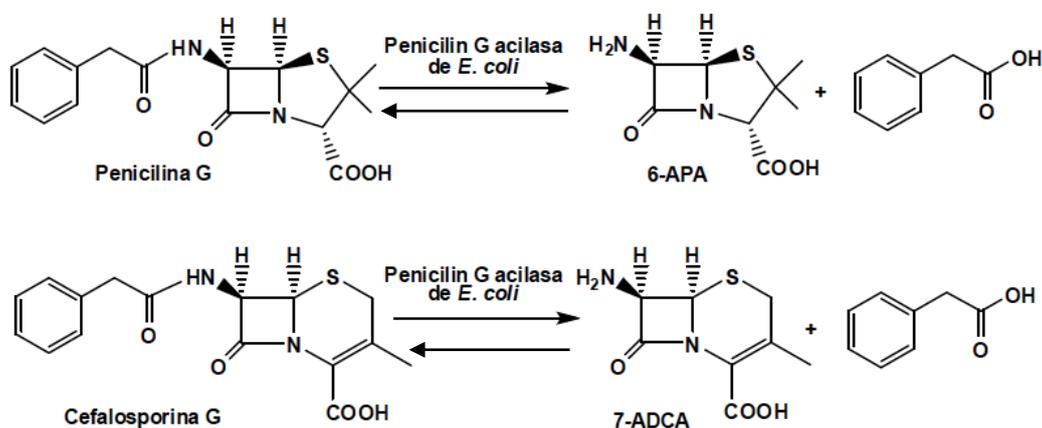
- i) Tipo I: hidrolizan preferentemente fenoximetilpenicilina (penicilina V)
- ii) Tipo II: actúan preferentemente sobre la benzilpenicilina (penicilina G) aunque tiene un espectro de acción más amplio
- iii) Tipo III: hidrolizan la ampicilina



**Figura 2.** Clasificación de las penicilinas acilasas según su preferencia de sustrato [11].

La PGA más utilizada en la Industria Farmacéutica es la aislada de la cepa ATTC 11105 de *Escherichia coli* (*E. coli*) y pertenece dentro de la clasificación anterior al tipo II, esto es, hidroliza penicilina V. Para la hidrólisis de penicilina G y cefalosporina G por la enzima PGA es llevada a cabo en medios acuosos, a un pH de 7-8 y a una temperatura de 30-37°C, debido a la estabilidad y solubilidad de los antibióticos. Estas características casan muy bien con la actividad y estabilidad de la mayoría de PGAs de *E. coli* [11].

La PGA fue descubierta en 1960 y aún se desconoce su función en la naturaleza, se cree que puede participar en el metabolismo de derivados de fenilacético como fuente de carbono. Entre sus aplicaciones más importantes está la obtención del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) y del ácido 7-aminodesacetoxicefalosporínico (7-ADCA) mediante la hidrólisis de la penicilina G y cefalosporina G respectivamente. Tanto el 6-APA como el 7-ADCA son intermediarios clave para la producción de antibióticos  $\beta$ -lactámicos ya que sirven como punto de partida para la síntesis de gran cantidad de antibióticos  $\beta$ -lactámicos. En definitiva, la función de la PGA es la hidrólisis de penicilinas naturales, pero también pueden emplearse de manera reversa [11].



**Figura 3.** Obtención de los intermedios 6-APA y 7-ADCA a partir de penicilina G y cefalosporina G, respectivamente, por medio de la hidrólisis de la PGA. De este modo obtenemos los intermedios necesarios para la semisíntesis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, simplificando así el proceso. Debería haber flechas que marcasen la reacción en el sentido opuesto ya que la PGA es capaz de revertir la reacción [11].

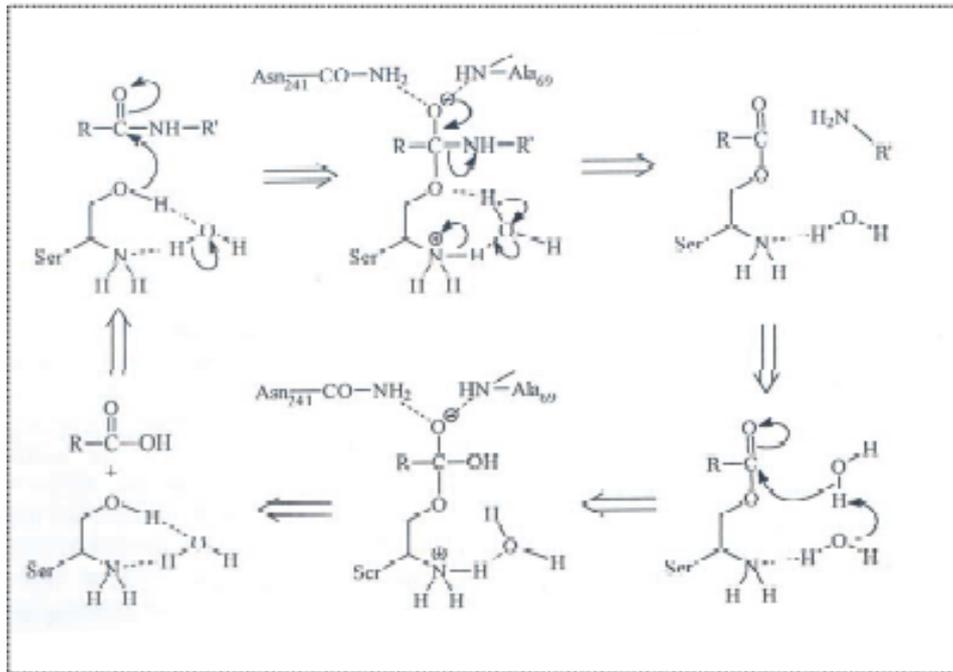
En cuanto al mecanismo de acción propuesto para la hidrólisis de penicilina G, y extrapolable a la cefalosporina G, de la PGA de *E. coli* es muy similar al mecanismo de

acción de otras serín proteasas (Figura 5). El grupo hidroxilo de la serina del extremo amino de la subunidad  $\beta$  es activado, mediante un puente de hidrógeno, por su propio grupo  $\alpha$ -amino. El oxígeno de la serina reacciona con el átomo de carbono del grupo acilo del sustrato, formando un intermediario tetraédrico que se estabiliza a través de puentes de hidrógeno con los residuos Asn241 y Ala69. El reagrupamiento electrónico provoca el colapso del intermediario dando lugar a la liberación del grupo saliente (6-APA o 7-ADCA) y al complejo acil-enzima. Seguidamente la enzima es desacilada por un nucleófilo dejando libre a la enzima y al producto de acilación del nucleófilo.



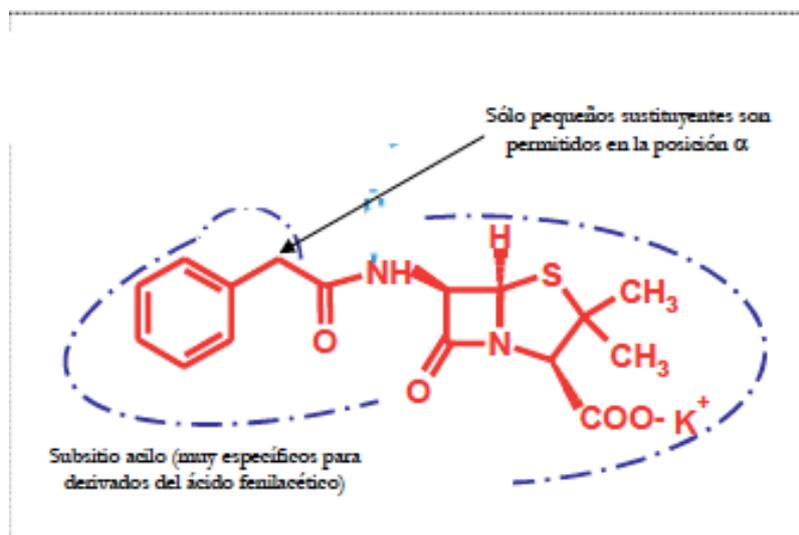
**Figura 4.** Esquema general de la enzima PGA ya sintetizada y madurada secretada ya en el periplasma. Observamos las dos partes de dicha enzima, la parte  $\alpha$  y  $\beta$  [11].

Con la salida del residuo amino, lo que será el intermedio 6-APA o 7-ADCA dependiendo de si el producto de partida es penicilina G o cefalosporina G respectivamente, quedará unido el resto acilo del producto a la enzima, formando el complejo acil-enzima. Este complejo será atacado por un nucleófilo, en el caso de que dicho nucleófilo sea el agua (como muestra la figura siguiente) obtendremos como productos el intermedio correspondiente según sea el elemento de partida, 6-APA o 7-ADCA, la enzima regenerada y el ácido carboxílico. No obstante, si el nucleófilo no es una molécula de agua sino un donador de acilo (ésteres, amidas, etc.) el ataque nucleofílico originará un antibiótico semisintético [11].



**Figura 5.** Mecanismo catalítico de la PGA [11].

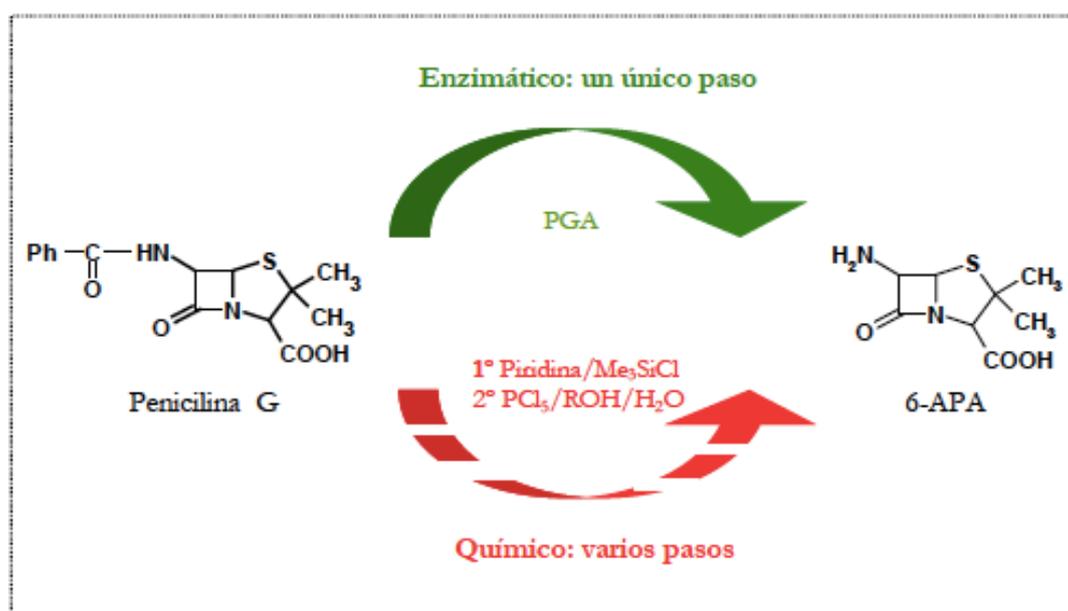
*E. coli*, bacteria gram negativa, sintetiza la enzima PGA como un pre-propéptido en el citoplasma y tras la transcripción, traducción, translocación y procesamiento se obtiene la enzima final activada con dos cadenas, una  $\alpha$  y otra  $\beta$ . La enzima activada se libera al periplasma, compartimento que rodea a algunas células procariontas, donde ejerce su acción. La especificidad del sustrato de la PGA es compleja pues el subsitio de unión del radical acilo es altamente específico para ácido fenilacético. La posición  $\alpha$  solo acoge pequeños grupos como hidroxilo o grupos amino, mientras que el sitio de reconocimiento de la penicilina es muy específico para L-aminoácidos [11].



**Figura 6.** Especificidad de sustrato de la PGA [11].

Por todo lo comentado anteriormente resulta de gran interés la biocatálisis y la PGA, especialmente para la Industria Farmacéutica, como desarrollaremos más adelante [11].

La utilización de la PGA en la síntesis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos es una práctica que se está constantemente optimizando, ya que reduciría tanto el impacto ambiental como los costes. Para añadir, también simplificaría enormemente la producción de dichos fármacos. Pues bien, gracias a técnicas de biología molecular y *screening* se ha logrado una mayor estabilidad de las PGAs, lo que trajo consigo una mejora de la producción. Estos avances junto con la inmovilización de la enzima que permitía el reciclado del biocatalizador, permitió que a mediados de los años 80 comenzase a utilizarse el proceso enzimático de hidrólisis de penicilina G ya que presentaba grandes ventajas económicas, medioambientales y operacionales frente al proceso químico [11].



**Figura 7.** Comparación de la hidrólisis de penicilina G para la obtención de 6-APA por método químico y enzimático [11].

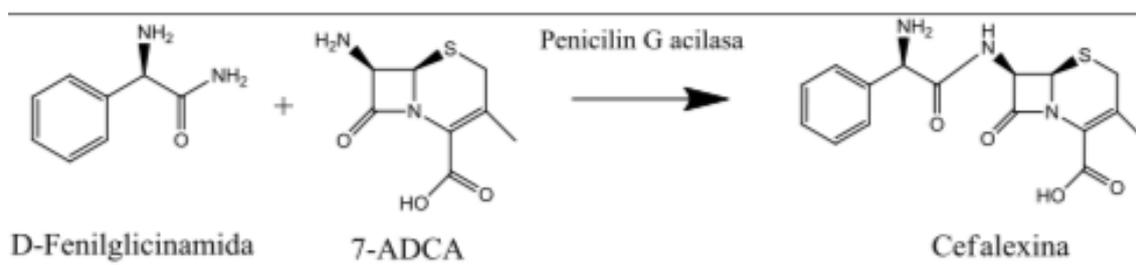
La PGA es una enzima notablemente versátil que, además de en la hidrólisis de penicilina G, puede utilizarse en numerosas reacciones de interés en química orgánica:

- Resolución de mezclas racémicas de alcoholes, ésteres y aminas mediante reacciones enantioselectivas de hidrólisis o síntesis.
- Acilación inespecífica de nucleófilos.
- Protección de grupos en síntesis de péptidos.
- Síntesis de derivados de penicilinas y cefalosporinas [11].

Además de la hidrólisis de la penicilina G, la PGA cataliza la reacción inversa permitiendo la síntesis de antibióticos. Este hecho que puede presentarse como una ventaja es también el principal obstáculo. Pues bien, una vez la PGA ha hidrolizado la penicilina G o cefalosporina G dando 6-APA o 7-ADCA respectivamente junto con ácido fenilacético, la enzima puede actuar sobre los productos y transformarlos en el material de partida, lo cual afecta notablemente a la eficiencia del proceso. Esta desventaja es un problema del equilibrio de reacción que dificulta la síntesis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos por vía únicamente enzimática. No obstante, dicho inconveniente ha sido solventado por algunas empresas como es el caso de DSM que veremos más adelante.[12].

Para finalizar, la importancia que la biocatálisis está tomando, especialmente en la síntesis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos por la PGA, queda demostrada gracias a los procesos diseñados por la compañía holandesa DSM para la síntesis de cefalexina, ampicilina y amoxicilina a partir de de 6-APA y 7-ADCA.

A modo más concreto nos centraremos en uno de ellos, en la síntesis de cefalexina cuyo material de partida es el intermediario 7-ADCA. Partiendo de dicho intermediario, el 7-ADCA, pues se observaron mejores resultados, se inmovilizó mediante unión covalente a un material de soporte, como puede ser una gelatina. El proceso presentó ligeras complicaciones que debían ser solventada, ya que la PGA no acepta aminoácidos cargados, y el pH al que se encuentra protonado el grupo carboxilo de la D-fenilglicina hace que esté también protonado el grupo amino. Cabe recordar que el grupo amida es muy poco reactivo, por lo que deberá protonarse el grupo carboxilo de la D-fenilglicinamida para que así el oxígeno atraiga la carga del carbono al que está unido y el nitrógeno del grupo amino del 7-ADCA pueda atacar a dicho carbono. Es por esto que habrá que emplear derivados con grupos amida o éster para que así el grupo amino del 7-ADCA reaccione con el carbono del grupo carboxilo y no con el carbono del grupo amino contiguo a él [13].



**Figura 8.** Síntesis enzimática de cefalexina diseñada por el grupo DSM [13].

Centrándonos un poco en el marco legislativo, la biocatálisis es una aplicación química que se encuentra en auge y se considera como una alternativa muy a tener en cuenta gracias a su sostenibilidad y rendimiento. La biocatálisis se está expandiendo cada vez más entre las distintas industrias y esto es gracias a sus ventajas pero también es debido al marco legal que se está desarrollando en torno al objetivo de una industria sostenible hacia el medioambiente. Estas normas son de índole europea, establecidas en toda la Unión Europea (U.E.), y entre ellas destacamos las normas REACH, VOC y SEVESO. Por indagar mínimamente en alguna de ellas, para poder cumplir con las disposiciones del REACH las empresas deben identificar y gestionar los riesgos asociados a las sustancias que fabrican y comercializan en la U.E. Deben demostrar cómo usar dichas sustancias de manera segura y comunicar toda aquella información relativa a las medidas de gestión de riesgos a las partes implicadas [14].

Dichas normas europeas influyen enormemente en la Industria Farmacéutica, ya que esta produce 200 kilogramos de residuo potencialmente contaminante por cada kilogramo de producto acabado. Esto trae consigo el empleo de un alto porcentaje de disolventes. Para poder cumplir con las normativas legales de la U.E. deberá llevar a cabo una serie de medidas como pueden ser:

- Cesar el empleo de catalizadores tradicionales basados en metales de transición. Sustituirlos por biocatalizadores (enzimas o células enteras), más selectivos, eficaces y menos contaminantes.
- Abandonar el uso de disolvente como el diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), de elevado uso, por ser hepatotóxico y poco biodegradable. Sustituir dichos disolventes por disolventes no contaminantes o derivados de fuentes renovables [15].

Viendo la biocatálisis como el futuro en diferentes industrias, muy especialmente en la síntesis de fármacos, no debemos olvidar que la biocatálisis no puede sustituir a la química orgánica en ningún momento. La química orgánica es quien nos identifica la ruta a llevar a cabo y la biocatálisis quien la efectúa. La biocatálisis trata de mejorar la síntesis de fármacos al hacerla más sostenible que si solo empleamos la química orgánica, pero jamás podrá sustituir a esta.

Por otro lado, la industria de antibióticos es uno de los grandes nichos de la biocatálisis, esto se debe en gran medida a la PGA. Las PGAs presentan un gran potencial para su uso industrial, esto se debe a su robustez en términos de temperatura y estabilidad de pH, una

amplia especificidad de sustrato y estereoselectividad (cualidad especialmente útil en la Industria Farmacéutica). Si la PGA es inmovilizada tiene como ventaja que puede recuperarse y volver a usarse, reduciendo así los residuos y costes. Pero tiene como inconveniente que pierde enantioselectividad en comparación con la enzima libre.

Por todo ello, el futuro en la síntesis de penicilinas se basa en la optimización de la PGA, la cual pasa por mejorar la estabilidad térmica, ya que al aumentar la temperatura aumenta la velocidad de reacción. Y por optimizar la estabilidad de la PGA frente a codisolventes orgánicos, los cuales inactivan a la enzima, pero favorecen el desplazamiento del equilibrio de la reacción en sentido hacia la síntesis.

En cuanto a las cefalosporinas, el futuro es algo más incierto ya que a pesar de que a partir de la cefalosporina G se puede obtener el intermediario de síntesis 7-ADCA gracias a la PGA, los estudios en la actualidad van orientados a la obtención del intermediario ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) a partir de la cefalosporina C. Este hecho se ha logrado gracias al empleo de dos enzimas: la ácido D-amino oxidas (DAAO) y la glutaril acilasa (GA). No obstante, al formarse como intermediario peróxido de hidrógeno, el cual presenta efectos muy negativos en la estabilidad de ambas enzimas. Para tratar de resolver se añade una tercera enzima, una catalasa, lo cual complica el diseño del proceso [16].

## **CONCLUSIONES**

La biocatálisis se presenta como una de las herramientas del futuro tanto por su sostenibilidad como por su rendimiento y eficacia. Además, la alta especificidad y selectividad de las enzimas hace que un proceso catalizado por estas apenas produzca residuos tóxicos. Pues bien, los estudios en la actualidad se están centrando en mejorar las propiedades de las enzimas como son el rango de sustratos sobre los que actúan, la especificidad, su función en medios no naturales para la enzima y su estabilidad.

A modo general, queda resaltado que la biocatálisis es una herramienta realmente útil para cualquier industria gracias a su sostenibilidad con el medio ambiente al reducir desechos y reutilizar las enzimas, aisladas o células enteras, lo cual se traduce en un mayor rendimiento y menor coste. Para la Industria Farmacéutica resulta especialmente de interés ya que además de las ventajas anteriormente comentadas, las enzimas presentan

las cualidades de especificidad y resolver mezclas racémicas esenciales para la síntesis de fármacos.

En la actualidad se está trabajando en la optimización y desarrollo de una cefalosporina acilasa, referenciada y patentada por el grupo del Profesor Pilone en la Universidad de Insubria, en Italia. Esta enzima presenta buen actividad frente a la cefalosporina C, aunque actualmente se busca su optimización ya que actúo en un rango de magnitud inferior a la PGA [17].

Para concluir, los avances actuales se basan en la optimización y mejor estabilidad de la PGA y en cuanto a las cefalosporinas se busca mejorar la acción de la cefalosporina acilasa descubierta por el Profesor Pilone y su equipo para obtener el intermediario 7-ACA, para lo cual se necesitará, posteriormente, otra enzima que reconozca el 7-ACA de modo que obtengamos distintos antibióticos. Pues bien, para obtener avances significativos se precisa de una colaboración interdisciplinar entre la microbiología, la ingeniería de proteínas, la química orgánica, la mejora de protocolos de inmovilización, optimizar el diseño de la reacción y obtener mejores reactores.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Sánchez-Montero, J. M., y Sinisterra Gago, J. V. (2007). Biocatálisis aplicada a la Química Farmacéutica. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 73 (4), 1199-1236.
2. Agrega, Junta de Andalucía: [http://agrega.juntadeandalucia.es/repositorio/13092012/66/es-an\\_2012091313\\_9102912/ODE-ade188b8-07f1-3707-a771-2464666ce2d1/21\\_concepto\\_de\\_biocatlisis.html](http://agrega.juntadeandalucia.es/repositorio/13092012/66/es-an_2012091313_9102912/ODE-ade188b8-07f1-3707-a771-2464666ce2d1/21_concepto_de_biocatlisis.html), consultado el 18 de mayo de 2018.
3. Arroyo, M., Acebal, C., y de la Mata, I. (2014). Biocatálisis y biotecnología. CSIC. *Arbor* 190 (768).
4. Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., y Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409, 258-268.
5. Sierra, A., Meléndez, L., Ramírez-Monroy, A., y Arroyo, M. (2014). La química verde y el desarrollo sustentable. *Ride. Sierra*, 5 (9).
6. Roger, S. A. (2016). Biocatalysis and Green Chemistry. *John Wiley and Sons, chapter 1*, 1-13.
7. Blázquez Velázquez, J. F. (2017). Docplayer, Química orgánica I. Clase teórica: <http://docplayer.es/60460304-Quimica-organica-i-clase-teorica-n-6-estereoisomeria.html>, consultado el 19 de mayo de 2018.
8. Aviles Cabral, H., Dorantes Adame, J. J., Calva Neria, G., Lucho Constantino, C. A., y Beltrán Hernández, R. I. (2018). Inmovilización de enzimas. *Boletín Científico del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Padi* 10 (2018), 7-8
9. Hernáiz, M. J. (2012). Capítulo VI: Biocatálisis aplicada a la síntesis de fármacos (I) enzimas hidrolíticas. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XXXV*, 194-237.
10. Lobanovska, M., y Pilla, G. (2017). Penicillin's Discovery and Antibiotics Resistance: Lessons for the future? *Yale Journal of Biology and Medicine*, 90 (1), 135-145.
11. Montes Fernández, T. (2006). Ingeniería de la superficie de la penicilina G acilasa para el desarrollo de nuevos métodos de inmovilización y estabilización (tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

12. Volpato, G., Rodrigues, R. C., y Fernández-Lafuente, R. (2010). Use of Enzymes in the Production of Semi-Synthetic Penicillins and Cephalosporins: Drawbacks and Perspectives. *Current Medicinal Chemistry*, 17, 3855-3873.
13. Giordano, R. C., Ribeiro, M. P., y Giordano, R. L. (2016). Kinetics of  $\beta$ -lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. *Biotechnology advances*, 24 (1), 27-41.
14. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medioambiente: <http://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/reglamento-reach/>, consultado el 28 de marzo de 2018.
15. Pájaro Castro, N. P., y Olivero Verbel, J. T. (2011). Química verde: un nuevo reto. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 21 (2), 169-182.
16. Sunder Avinash, V., Vishnu Pundle, A., Ramasamy, S., y Gopalan Suresh, C. (2014). Penicillin acylases revisited: importance beyond their industrial utility. *Critical Reviews of Biotechnology*, 36 (2), 303-316.
17. Grulich, M., Stepánek, V., y Kyslík, P. (2013). Perspectives and industrial potential of PGA selectivity and promiscuity. *Biotechnology Advances*, 31, 1458-1472.
18. Wenda, S., Illner, S., Mell, A., y Kragl, U. (2011). Industrial biotechnology-the future of Green Chemistry? *The Royal Society of Chemistry*.
19. Bruggink, A., Roos, E. C., y de Vroom, E. (1998). Penicillin Acylase in the Industrial Production of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Organic, Process, Research and Development*, 2 (2), 128-133.
20. Pan, X., Wang, L., Ye, J., Qin, S., y He, B. (2018). Efficient synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics with very low product hydrolysis by a mutant *Providencia rettgeri* penicillin G acylase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102 (4), 1749-1758.
21. Janssen, D.B. (2014). Biocatalyst engineering for the production of semi-synthetic antibiotics. Biotransformation an Biocatalysis Group. Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute. University of Groningen. <https://www.rug.nl/research/biotransformation-biocatalysis/research/biocatalystengineering>, consultado el 1 de mayo de 2018.