

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACULTAD DE FARMACIA Y BIO QUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Biotransformación del Naproxeno con *Aspergillus Niger*  
y evaluación de la actividad antiinflamatoria de los  
compuestos formados**

TESIS

para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Maribel Montoya Ayala

Janneth Tataje Mego

ASESOR

Antonio Osorio Lozada

**Lima – Perú**

**2004**



..	1
<b>AGRADECIMIENTOS .</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN .</b>	<b>5</b>
<b>SUMMARY . .</b>	<b>7</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN . .</b>	<b>9</b>
<b>II. GENERALIDADES .</b>	<b>11</b>
<b>2.1. BIOTECNOLOGÍA MODERNA . .</b>	<b>11</b>
<b>2.2. BIOTRANSFORMACIONES MICROBIANAS . .</b>	<b>12</b>
<b>2.2.1. Biotransformaciones Industriales .</b>	<b>14</b>
<b>2.3. MODELOS MICROBIANOS DEL METABOLISMO DE MAMÍFEROS . .</b>	<b>17</b>
<b>2.4. IMPORTANCIA DEL CITOCROMO P450 MONOOXIGENASA EN MAMÍFEROS .</b>	<b>18</b>
<b>2.5. HIDROXILACIONES AROMÁTICAS CON MICROORGANISMOS . .</b>	<b>21</b>
<b>2.6. HONGOS: IMPORTANCIA INDUSTRIAL . .</b>	<b>22</b>
<b>2.7. DROGAS ANTIINFLAMATORIAS .</b>	<b>23</b>
<b>2.7.1. Naproxeno .</b>	<b>24</b>
<b>2.8. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN . .</b>	<b>26</b>
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL . .</b>	<b>27</b>
<b>3.1. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS .</b>	<b>27</b>
<b>3.1.1. Materiales . .</b>	<b>27</b>
<b>3.1.2. Equipos . .</b>	<b>27</b>
<b>3.1.3. Reactivos .</b>	<b>28</b>
<b>3.2. MÉTODOS DE TRABAJO . .</b>	<b>29</b>
<b>3.2.1. Métodos Microbiológicos .</b>	<b>29</b>
<b>3.2.2. Métodos Físicoquímicos . .</b>	<b>30</b>
<b>3.2.3. Ensayos Farmacológicos (Método Edema Pedal Inducido por Carragenina) . .</b>	<b>32</b>
<b>IV. RESULTADOS .</b>	<b>35</b>

<b>1. Proceso de biotransformación .</b>	<b>35</b>
<b>2. Aislamiento de Metabolitos .</b>	<b>38</b>
<b>3. Elucidación de Metabolitos .</b>	<b>41</b>
<b>4. Metilación del 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno . .</b>	<b>42</b>
<b>5. Actividad Antiinflamatoria .</b>	<b>43</b>
<b>V. DISCUSIÓN . .</b>	<b>49</b>
<b>CONCLUSIONES . .</b>	<b>53</b>
<b>RECOMENDACIONES .</b>	<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .</b>	<b>57</b>

---

*DEDICATORIA A Dios por ser mi guía y acompañarme día a día A mi Mami Rosa por su gran amor y dedicación, por estar a mi lado en los momentos más difíciles. A mi mamá por todo su apoyo, amor y respaldo. A mi César por brindarme su amor, apoyarme y comprenderme. A mis amigos Antonio Osorio y Janneth por su gran amistad y comprensión. A Martha y Sole por contar con su amistad en todo momento. **Maribel Montoya Ayala.***

*DEDICATORIA A Dios por la fuerza y energía que nos brinda para vivir cada día. A mi madre, padre y hermanas por el apoyo incondicional, la comprensión y la paciencia para el logro del gran objetivo. A mi padrino por el apoyo espiritual y la fortaleza. A mis amigos Antonio Osorio y Maribel Montoya por su gran amistad y comprensión. **Janneth M. Tataje Mego***



## AGRADECIMIENTOS

A Nuestra Directora de Tesis:

Mg. Q. F. ELENA BENAVIDES RIVERA

Por su orientación y colaboración en el procedimiento.

A Nuestro Asesor:

Q. F. ANTONIO OSORIO LOZADA

Por su valioso apoyo y su constante ayuda en la realización del presente trabajo.

A nuestra profesora Rosario Carreño, por el apoyo y la orientación brindada para la evaluación de la actividad farmacológica.

A los Miembros del Jurado Examinador y Calificador:

Presidente: Mg. César M. Fuertes Ruitón

Miembros:

Dr. Pablo Bonilla

Mg. Luis Miguel Félix Veliz

Dr. Hugo Milla Flores

Por la evaluación y aportes brindados para la culminación del presente trabajo.



## RESUMEN

La Biotransformación del Naproxeno, [(S)-6-metoxi-#-metil-2-ácido naftalenacético], fue realizada utilizando el *Aspergillus niger*, microorganismo que se caracteriza por su capacidad para hidroxilar sistemas aromáticos. Dicho proceso biotecnológico fue llevado a cabo en un medio líquido bajo condiciones óptimas para el desarrollo del *Aspergillus niger*. Se obtuvieron 2 metabolitos mayoritarios demetilnaproxeno y 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno; los cuales fueron aislados mediante técnicas cromatográficas, e identificados mediante espectroscopia de RMN (H+) y espectrometría de Masas. El 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno fue metilado mediante reacciones químicas a 7-metoxi-6-metilnaproxeno; y sometido al ensayo del Modelo Experimental del Edema Pedal Inducido por Carragenina para evaluar la actividad farmacológica, se utilizó como patrón de comparación al Naproxeno Base, y Naproxeno Sódico, donde se determinó que el metabolito metilado no presentaba efecto anti-inflamatorio.

**Palabras Clave:** Biotransformaciones, Naproxeno, *Aspergillus niger*, Actividad Anti-inflamatoria, 6-demetilnaproxeno, 7-hidroxi-6-metilnaproxeno, 7-metoxi-6-metilnaproxeno.



## SUMMARY

The Biotransformation of Naproxen [(S)-6-methoxy-#-methyl-2- naphthaleneacetic acid], was performed using a microorganism *Aspergillus niger*, wich has knowed ability of hydroxylate aromatic rings. This biotechnological process was conduced in a liquid culture in optimum conditions for development of the microorganism. Two main metabolites was gotten: 6-desmethylnaproxen and 7-hydroxy-6 desmethylnaproxen, these were isolated by chromatographic techniques and identified by RMN ( $H^+$ ) Spectroscopy and Mass Spectrometry. The 7-hydroxy-6-desmethylnaproxen was methylated by chemical reaction to 7-metoxhy-6-methylnaproxen and was used the model Carrageenin-induced paw edema to evaluated the pharmacological activity, was used such as standard naproxen, and naproxen sodium. It was determinated that the methylated metabolite has not showed anti-inflammatory activity.

**Keywords:** Biotransformation, Naproxen, *Aspergillus niger*, Anti-inflammatory activity, 6-desmethylnaproxen, 7-hydroxy-6 desmethylnaproxen, 7-metoxhy-6-methylnaproxen.



# I. INTRODUCCIÓN

En la Industria Farmacéutica, la innovación y productividad en el desarrollo de drogas es uno de los procesos económicamente más importantes; llevándose a cabo por Síntesis Química, Semi-síntesis y de acuerdo a los estudios reportados existen técnicas biotecnológicas inocuas conocidas como Biotransformación que involucran la utilización de microorganismos.

Las Biotransformaciones se producen debido a la capacidad que tienen los microorganismos de modificar químicamente los compuestos orgánicos convirtiéndolos en productos estructuralmente relacionados. Utilizan la catálisis enzimática con la ventaja especial sobre las reacciones químicas en la estéreo-selectividad y la regio-especificidad, además de causar menos daños ambientales.

Los hongos filamentosos son utilizados para transformar y modificar compuestos de utilidad médica. El *Aspergillus niger* es un microorganismo ampliamente utilizado debido al conjunto de enzimas que posee, pues tiene la habilidad de utilizar una gran variedad de sustratos para obtener sustancias conocidas.

El objetivo del presente trabajo es la obtención de una molécula biotransformada con *Aspergillus niger* y la evaluación de su actividad antiinflamatoria.

Se realizó la Biotransformación del Naproxeno Sódico con *Aspergillus niger* en un medio de cultivo favorable para el adecuado desarrollo del microorganismo, aprovechando así a las enzimas monooxigenasas propias de su metabolismo.

Se aislaron dos metabolitos principales: 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno y

demetilnaproxeno, mediante técnicas cromatográficas, y la elucidación de los metabolitos se realizó por espectroscopia de RMN ( $H^+$ ) y espectrometría de Masas.

El metabolito 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno fue metilado obteniéndose 7-metoxi-6-metilnaproxeno, siendo este último sometido a ensayos farmacológicos de acuerdo al Modelo Experimental de Edema Pedal Inducido por Carragenina para la evaluación de la actividad antiinflamatoria, utilizando como patrones de comparación Naproxeno base y Naproxeno Sódico.

## II. GENERALIDADES

### 2.1. BIOTECNOLOGÍA MODERNA

La Biotecnología puede ser definida como la aplicación de principios científicos para el procesamiento de materiales por agentes biológicos y proporcionar así productos y servicios. Es decir el uso controlado y deliberado de agentes biológicos sencillos, células vivas o componentes celulares en operaciones técnicamente beneficiosas para la fabricación de productos.<sup>(1) (2)</sup>

La Biotecnología puede ser dividida en tecnología tradicional y nueva tecnología. La tecnología tradicional comprende alimentos, ingredientes, saborizantes, alcohol industrial, antibióticos y ácidos orgánicos. La nueva tecnología usa técnicas de ingeniería genética, fusión celular e ingeniería metabólica para obtener organismos capaces de formar productos útiles<sup>(3)</sup>. En algunos casos en la biotecnología se busca la formación de biomasa, mientras que en otros, la formación de metabolitos secundarios; los cuales no parecen ser esenciales para el crecimiento y la reproducción de los microorganismos, siendo su formación altamente dependiente de las condiciones ambientales.<sup>(1) (4) (5)</sup>

La aplicación de enzimas como “reactivos” es una de las áreas de mayor crecimiento en el ancestral campo de la química orgánica. La capacidad de las enzimas para llevar a cabo reacciones de una manera estereo-específica y regio-específica, funcionan bajo

condiciones adecuadas de temperatura y pH, ofrecen un gran potencial para la producción de moléculas quirales con aplicaciones diversas, tal como la síntesis de productos naturales, química médica y la biosíntesis de metabolitos de Fármacos. <sup>(6)</sup>

Actualmente la Biotecnología se aplica en varias áreas. El área Farmacéutica con la búsqueda del biocatalizador ideal y usando nuevas tecnologías para mantenerse competitivos e innovadores obtiene drogas activas de interés económico, así los intermediarios quirales constituyen una parte significativa del mercado de químicos finos, lo cual se demuestra por el incremento en la demanda de estos productos (1997: \$87 billones, 1998: \$96 billones). <sup>(7) (8) (9) (10) (11)</sup>

Un proceso para utilizar la actividad de las enzimas es la bioconversión o biotransformación, proceso por el cual un microorganismo intacto, usualmente en crecimiento o células de un cultivo bacterial o fúngico, llevan a cabo una reacción orgánica sobre un sustrato seleccionado que ha sido puesto en contacto con su biomasa. <sup>(4)</sup>

## **2.2. BIOTRANSFORMACIONES MICROBIANAS**

La biotransformación es un proceso biotecnológico que utiliza el crecimiento de biomasa o formación de productos, para lo cual los microorganismos deben contar con las condiciones ambientales óptimas de desarrollo. Siendo necesario controlar las variables más importantes del medio de cultivo, a través de controladores que permitan que las condiciones se mantengan estables. Las variables que comúnmente se controlan son: el pH, la temperatura, la velocidad de agitación, entre otras. <sup>(12)</sup>

Los cultivos para los estudios de transformación microbiana pueden ser obtenidos de ambientes naturales, tales como las aguas estancadas, la tierra misma o cultivos estandarizados. En estos cultivos los microorganismos tienen la capacidad de modificar químicamente una amplia variedad de componentes orgánicos convirtiéndoles en productos estructuralmente relacionados. <sup>(13)</sup>

Las reacciones orgánicas catalizadas por microorganismos son llamadas transformaciones microbianas, biotransformaciones o bioconversiones, las cuales representan un soporte o algunas veces reemplazan a las reacciones químicas, debido a:

- Vía de síntesis corta.
- Obtención de compuestos más puros.
- Obtención de compuestos ópticamente activos.
- Condiciones de reacción suaves.
- Uso de nutrientes naturales y soluciones buffers económicas.
- Empleo de bajas temperaturas (excepto para la esterilización)
- Se desarrolla en medio acuoso (excepto para la extracción del producto)

- Producción reducida de residuos químicos y reciclaje de los solventes de extracción.(12) (14) (15)

Entre los propósitos de la biotransformación se encuentran:

- Disminuir la contaminación del ambiente por procesos químicos.
- Incrementar la eficiencia de la síntesis enzimática de aminoácidos y péptidos, de carbohidratos y oligosacáridos nuevos, nucleótidos y polinucleótidos, glicolípidos y peptidoglicanos.
- Hallar productos novedosos con propiedades biológicas modificadas o incrementadas o con efectos colaterales disminuidos.
- Preparación de metabolitos de drogas para el ensayo en Modelos Microbianos del Metabolismo de Mamíferos entre otras.<sup>(14)</sup>

El éxito de las biotransformaciones microbianas ha estado basado en el screening de enzimas microbianas para catalizar nuevas reacciones o el screening de enzimas conocidas para realizar una actividad desconocida con sustratos sintéticos.<sup>(16)</sup>

En su función natural las enzimas catalizan y controlan reacciones anabólicas y catabólicas necesarias para procesos de ensamblaje, polimerización, biosíntesis y energéticos. Las enzimas anabólicas involucradas en rutas biosintéticas requieren usualmente sustratos específicos, mientras muchas enzimas catabólicas involucradas en digestión, defensa y roles similares de degradación en organismos vivos parecen haber desarrollado rangos mas amplios de especificidad.<sup>(3) (12)</sup>

Dependiendo del proceso usado puede ser microorganismo vivo, una espora libre o inmovilizada en un soporte o simplemente un extracto de enzimas. Las biotransformaciones involucran reacciones enzimáticas y de fermentación:

- Reacciones enzimáticas: en las cuales la enzima activa requiere del ambiente celular y su maquinaria para realizar la función.
- Las fermentaciones limitadas: en las cuales las reacciones son reducidas a la transformación del sustrato a productos cercanamente relacionados, aunque normalmente permitan la síntesis de moléculas complejas (tales como anticuerpos, vitaminas) y de moléculas simples (glucosa, oxígeno, amonio, entre otras).

En los microorganismos se hallan enzimas constitutivas las cuales son producidas con el crecimiento celular. Si las enzimas no son constitutivas su formación en microorganismos puede ser algunas veces inducidas por sustrato de interés o por compuestos relacionados. Las enzimas inducidas pueden catalizar una variedad de reacciones sobre los inductores, sustratos y aun componentes no relacionados.

Las enzimas de biotransformación pueden estar presentes dentro o fuera de las células que las producen. Las bacterias frecuentemente contienen enzimas solubles dentro del citosol y enzimas particulares unidas a la membrana.<sup>(12)</sup>

La biotransformación es un ejemplo impresionante de la capacidad de los microorganismos para alterar solo uno de muchos grupos funcionales con propiedades

de reacción muy similares. Utilizándose la capacidad de los microorganismos para alterar solamente ciertos grupos funcionales, mediante reacciones enzimáticas las cuales pueden ser superiores a los métodos de conversión tradicionales por las siguientes características:

- Reacciones de selectividad: cada enzima realiza una reacción de modo que no hay reacciones laterales.
- Reacciones de regio-especificidad: la enzima conduce una única reacción de tal manera que lo realiza en un lugar determinado de la molécula
- Reacciones de estéreo-selectividad: las enzimas pueden distinguir entre los enantiómeros de un racemato en que ellas convierten exclusivamente o de preferencia, solo una de las dos formas enantioméricas.
- Condiciones de reacción: las reacciones enzimáticas se realizan en un medio a pH y temperatura adecuados cerca de soluciones neutrales, por debajo de 40°C, además de requerir de poca energía, por esta razón aún los compuestos más sensibles son convertidos sin sufrir daños. <sup>(15) (17) (18) (19)</sup>

## **2.2.1. Biotransformaciones Industriales**

---

La biotransformación ha sido conocida por muchos años principalmente en la producción de precursores farmacéuticos y agroquímicos, realizándose estudios con sustratos específicos tales como esteroides, alcaloides y componentes bioactivos y se han empleado microorganismos específicos como hongos, levaduras y bacterias en general, así la producción de alcoholes tiene una historia ancestral <sup>(6) (20)</sup>, así como la transformación del vino a vinagre por las bacterias del género *Acetobacter* y *Gluconobacter*. <sup>(17) (20)</sup>

### **2.2.1.1. Biotransformaciones de Esteroides**

Una de las biotransformaciones más conocidas es la de esteroides, al respecto se han reportado numerosas investigaciones <sup>(22)</sup>, las que han permitido un progreso espectacular, donde las reacciones clásicas son difíciles o inadecuadas <sup>(12)</sup>

Las hormonas esteroidales de la glándula adrenal y sus análogos estructurales (cortisona, hidrocortisona, prednisona, prednisolona y triamcinolona) exhiben actividad antiinflamatoria.

La Cortisona es una hormona esteroide de gran demanda. El proceso químico para su síntesis implicaba 31 etapas. Se descubrió que un hongo que crece en el pan, *Rhizopus arrhizus*, puede hidroxilar la progesterona (un intermediario en la síntesis de la cortisona) en el C-11, reduciendo la síntesis de 31 a 11 pasos. <sup>(17)</sup> (Fig. N° 1).

Entre otras biotransformaciones de esteroides se tiene la biotransformación de progesterona y testosterona, por *Mucor griseoceanus* ATCC 1207a, obteniéndose derivados 14- $\alpha$ -hidroxilados, los cuales muestran una interacción con los receptores del músculo cardíaco <sup>(22)</sup>

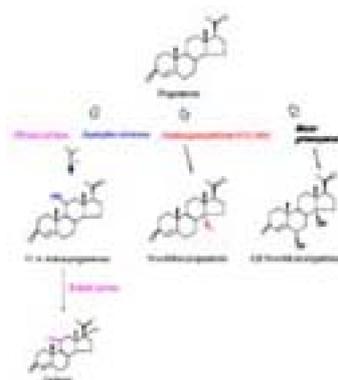


Fig. N° 1: Biotransformación de Progesterona por distintos microorganismos.

Así también en la biotransformación de 18-corticoesteroides, 18-hidroxi-11-deoxicortisosterona (con actividad mineralo-corticoide) se obtuvieron los metabolitos 3- $\alpha$ -hidroxi-5 $\beta$  con *Clostridium paraputrificum* <sup>(13)</sup> (Fig. N° 2).

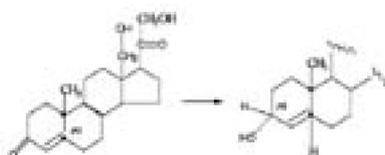


Fig. N° 2: Biotransformación del 18-hidroxi-11-deoxicortisosterona por *Clostridium paraputrificum*

### 2.2.1.2. Biotransformaciones de Vitaminas

La Vitamina C ha sido obtenida hace 50 años de acuerdo con la síntesis clásica de Reichstein y Grusner, en la cual la D-glucosa es reducida a D-Sorbitol, el segundo paso la conversión de D-Sorbitol a L-Sorbosa es muy difícil químicamente; por lo que se empleó una conversión enzimática, llevándose a cabo una oxidación mediante el *Acetobacter suboxydans*. Posteriormente se utilizaron microorganismos de los géneros de *Erwinia* y *Corynebacterium* para la síntesis de la Vitamina C <sup>(15)</sup> <sup>(17)</sup> (Fig. N° 3).

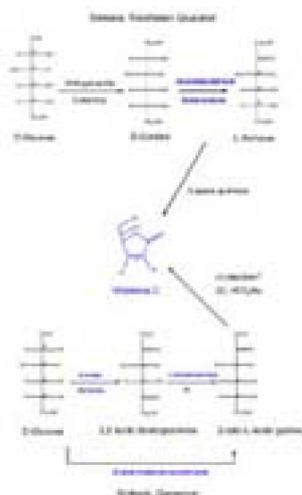


Fig. N° 3: Obtención de Vitamina C mediante síntesis química y biotransformaciones

realizadas por *Erwinia herbicola* y *Corynebacterium sp.*

### 2.2.1.3. Biotransformaciones de Terpenos

Los terpenoides son sustratos conocidos para realizar biotransformaciones, se utilizan como sustratos iniciales, los cuales son ideales para la producción biotecnológica de aromas químicos naturales <sup>(22) (23)</sup>

- En los terpenos las hidroxilaciones se realizan en sitios alíclicos o potencialmente enólicos como por ejemplo con la alenrona, el linalool y el citronelol (o sus esteres) son hidroxilados por *A. niger* <sup>(6) (24) (25) (26) (27)</sup>

- Asimismo con las lactonas sesquiterpénicas como la  $\alpha$ -santonina, luego de la acción con *A. niger* se obtienen varios metabolitos monohidroxilados en posiciones C-8, C-11 y C-13 <sup>(28)</sup>

- En la biotransformación del Geraniol, Nerol entre otros por cultivos de *Penicillium digitatum*, se obtienen terpenos considerados como saborizantes "naturales" <sup>(29)</sup>

- *Aspergillus niger* y *Aspergillus cellulosa* son hongos conocidos por su capacidad para introducir grupos funcionales oxigenados a los sustratos terpénicos como el dehidropinguisenol, dando lugar a metabolitos tales como 10-oxo-lejeunepinguisenol y lejeunepinguisenol, los cuales presentan una posible actividad antimicrobiana <sup>(30)</sup>

- El (-) Mentol es transformado a los siguientes productos por *Aspergillus spp.* <sup>(31)</sup> (32) (Fig. N° 4).

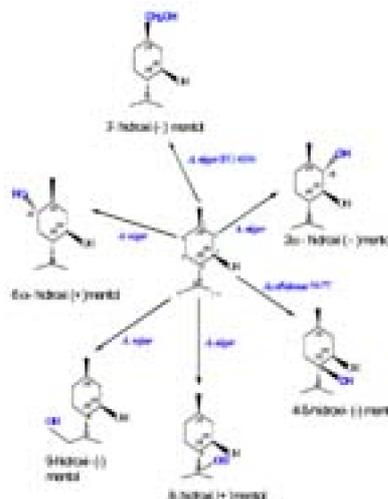


Fig. N° 4: Biotransformación de Mentol con *Aspergillus spp.*

- Mediante la biotransformación de eugenol con cepas recombinantes de *E.coli* se produce ácido ferúlico, el cual es biotransformado con *Rhodotorula rubra* para obtener vainillina. <sup>(33) (34) (35)</sup>

- En la hidroxilación microbiológica de los 6-substituidos-2-isopropil-naftalenos, todos los procesos son caracterizados por el tratamiento del 6-substituido-2 isopropil- naftaleno en presencia de un organismo. Los metabolitos resultantes de las transformaciones por *Aspergillus niger* exhiben actividad analgésica, antiinflamatoria, y actividad antipirética en

mamíferos <sup>(36)</sup>

## 2.3. MODELOS MICROBIANOS DEL METABOLISMO DE MAMÍFEROS

Antes que una droga sea aprobada para el uso en humanos requiere de estudios para establecer su eficacia y seguridad. La elucidación del metabolismo de drogas constituye un paso necesario en esta evaluación.

La biotransformación de drogas es considerada como una reacción de detoxificación, guiando a que sustancias más polares sean eliminadas fácilmente del organismo. Sin embargo en algunos casos este metabolismo puede llevar a una activación, produciendo sustancias más activas farmacológicamente o metabolitos tóxicos, justificándose así la necesidad de estudios farmacológicos y toxicológicos de los metabolitos de las drogas.

Los modelos microbianos pueden constituir una alternativa o al menos un complemento para el uso de sistemas animales debido a que ellos pueden imitar cualitativamente el metabolismo de mamíferos <sup>(21)</sup> y pueden brindar información acerca del destino de los metabolitos de las drogas <sup>(37)</sup>

Muchas drogas y otros Xenobióticos que son introducidos a organismos superiores son químicamente alterados por la acción de enzimas.

El metabolismo de drogas envuelve dos tipos de transformaciones, clasificadas en Fase I (funcionalización) y Fase II (conjugación). (Fig N° 5)

Las reacciones de la Fase I consisten en reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis. Las reacciones de hidrólisis son catalizadas por esterasas, las de reducción involucran al NADPH dependiente de dehidrogenasa y las de oxidación envuelven varios tipos de reacciones catalizadas por monoamino-oxidasas y flavinas del Citocromo P450 monooxigenasa.

Algunas de las reacciones de la Fase I pueden dar como consecuencia la "activación" de metabolitos responsables de una elevada actividad <sup>(37)</sup> (por ejemplo la hidrólisis de prodrogas), mientras otras pueden incrementar la toxicidad <sup>(38)</sup>

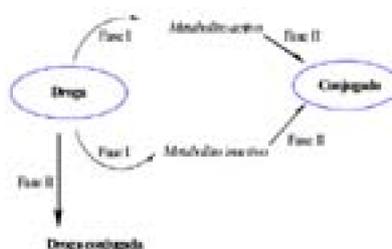


Fig. N° 5: Posibles destinos metabólicos de las drogas cuando estas pasan través del organismo humano

Los sistemas microbianos consisten de uno o varios microorganismos que pueden

ser usados para imitar la transformación metabólica de los mamíferos. Bajo condiciones ideales los estudios del metabolismo microbiano y mamífero pueden ser conducidos en paralelo y los metabolitos comunes pueden ser producidos por métodos de fermentación escalonada simple usando el sistema microbiano, el cual tiene la capacidad de asemejarse al sistema metabólico de los mamíferos en la producción de metabolitos de fármacos, tales métodos son conocidos como "Modelos Microbianos del Metabolismo de Mamíferos" (MMMM)<sup>(13)</sup>

Basados en estos modelos en la investigación realizada sobre la transformación microbiana del Naproxeno por *Cunninghamella* sp, se evidenciaron los metabolitos: demetilnaproxeno y demetilnaproxeno-6-o-sulfato, los cuales también se obtienen de la biotransformación del Naproxeno en el metabolismo de mamíferos<sup>(39)</sup>

Las transformaciones microbianas son complementos para el estudio de MMMM y se enfocan principalmente en un control considerable de las condiciones de fermentación, en la búsqueda de situaciones óptimas, lo cual es requerido para favorecer la formación de cantidades significativas de metabolitos microbianos simples a partir de drogas<sup>(21)</sup>  
(40)

De las reacciones químicas de la fase I en mamíferos, la biotransformación oxidativa es cuantitativamente de mayor importancia. Muchas de estas son catalizadas por el Citocromo P450 ligado a monooxigenasas localizadas principalmente en el hígado de los mamíferos pero que ocurren en alguna magnitud en el riñón, pulmón, tracto gastrointestinal, bazo y otros órganos tales como la corteza adrenal, testículos, ovarios y placenta<sup>(41)</sup>

## **2.4. IMPORTANCIA DEL CITOCROMO P450 MONOOXIGENASA EN MAMÍFEROS**

El Citocromo P450 (CYP450) es una familia de hemoproteínas, localizadas en la membrana del retículo endoplásmico de los hepatocitos y de otras células corporales, estas consisten de una parte proteica (apoproteína) y un grupo heme prostético<sup>(41)</sup>. El CYP450 contiene una clase especial de multicomponentes enzimáticos que son ampliamente distribuidos en mamíferos, plantas y sistemas microbianos. El CYP450 es el componente final de una cadena transportadora de electrones que cataliza la oxidación de sustratos<sup>(2) (13) (21)</sup>

Entre sus funciones se hallan:

- Funciones detoxificadoras, eliminando sustancias exógenas (drogas, sustancias carcinogénicas, pesticidas, etc)<sup>(42)</sup>. Esto se logra agregando grupos funcionales, hidrosolubles a compuestos de carácter lipofílico.
- Funciones del metabolismo endógeno, es decir, la degradación de sustancias del propio organismo, ejemplo: esteroides, sales biliares, vitaminas liposolubles, etc.

- Síntesis de óxido nítrico gaseoso simple.
- Sirve como mecanismo de defensa ante el ataque de alcaloides tóxicos, en algunos organismos <sup>(21)</sup>.

**Mecanismo de acción:**

El método de acción principal de las enzimas CYP450 es la de introducir un grupo funcional al componente lipofílico para hacerlo más hidrosoluble, y por tanto fácilmente excretable. (Fig. N° 6).

1. El citocromo férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) atrapa al sustrato.
2. Un electrón es transferido al átomo de Fe, pasando este a su estado ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ )
3. La forma ferrosa se une a una molécula de Oxígeno.
4. Se produce una segunda reducción agregándose un electrón y un protón.
5. Se pierde una molécula de agua dejando un complejo ( $\text{FeO}^{+3}$ ) que oxida el sustrato.

Los electrones involucrados en la oxidación de los sustratos por el CYP450 pueden provenir del NADPH <sup>(41)</sup>

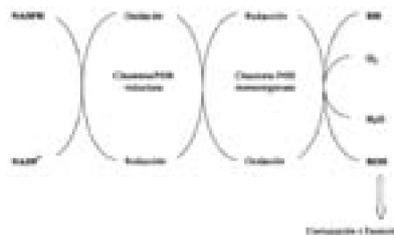
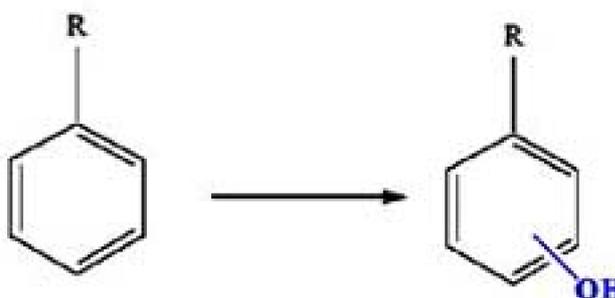


Fig. N° 6: Hidroxilación de un sustrato por la acción de monooxigenasa del CYP450

Dentro de la variedad de enzimas que forman parte del CYP450 existen las oxigenasas, las cuales se dividen en di y monooxigenasas según las reacciones que realicen. <sup>(41)</sup> <sup>(43)</sup> (Fig. N° 7).

### Monooxigenasa



### Dioxigenasa

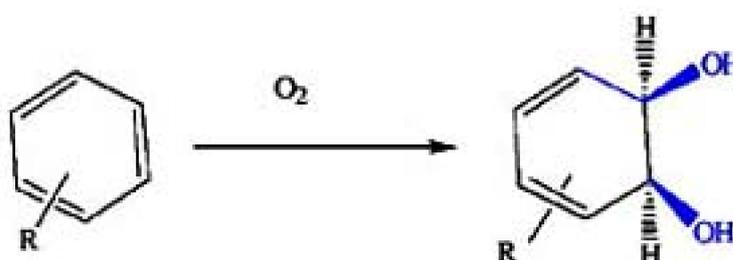


Fig. N° 7: Reacciones catalizadas por oxigenasas (Monooxigenasas y Dioxigenasas)

#### **CYP dependiente de monooxigenasas**

Las monooxigenasas que contiene el CYP450 son enzimas relacionadas con la fase inicial del metabolismo Xenobiótico. Generalmente oxidan los Xenobióticos mediante la formación del complejo ternario CYP450-Xenobiotico-O<sub>2</sub>, produciéndose hidroxilaciones que con frecuencia dan sustratos para reacciones de conjugación con sustancias hidrófilos <sup>(41) (42)</sup> (Fig N° 8).

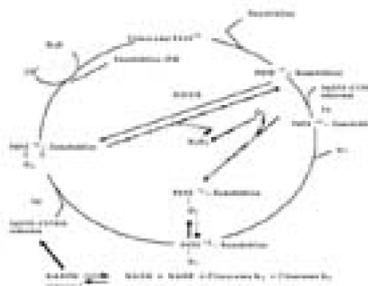


Fig. N° 8: Oxidación de Xenobióticos vía CYP450 ligado a monooxigenasas

Las monooxigenasas del CYP450 son activas frente a sustratos de hidrocarburos lineales, ramificados, alicíclicos o aromáticos y sus derivados, esteroides y proteínas. Entre estas enzimas podemos citar a: 11- $\beta$ -aminooxigenasa, esteroide 21-monooxigenasa, alcanomonooxigenasa, entre otras.

Las reacciones de monooxigenasas de Baeyer–Villiger usando enzimas de *P. putida* NCIMB10007 son una gran promesa para la síntesis de derivados de lactona ópticamente activos<sup>(44)</sup> así como la hidroxilación de arenos por *Beuveria basujiana*<sup>(45)</sup>

La mayoría de hidroxilaciones estereoselectivas catalizadas por enzimas son llevadas a cabo por las monooxigenasas dependientes del CYP450. Las cuales actúan mediante hidroxilaciones alifáticas y aromáticas, N-, O-, S-dealquilación y ciertamente S- y N-oxidaciones en modelos mamíferos<sup>(12)</sup><sup>(40)</sup>

## 2.5. HIDROXILACIONES AROMÁTICAS CON MICROORGANISMOS

Las hidroxilaciones aromáticas involucran un mecanismo oxenoide con intermediarios arenos oxidados los cuales se reacomodan no enzimáticamente a compuestos fenólicos y este es acompañado usualmente por el proceso general llamado “NIH Shift”, el cual involucra la migración de un sustituyente al lado de la hidroxilación o a un carbono adyacente y luego de este formar los compuestos hidroxilados.<sup>(13)</sup><sup>(46)</sup> (Fig N° 9)

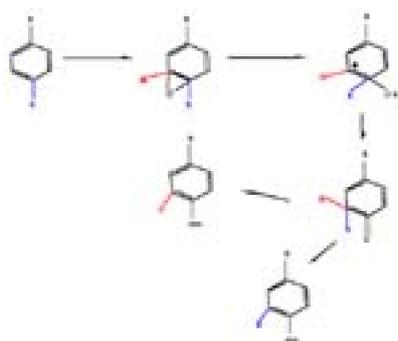


Fig. N° 9: NIH-Shift: Migración del sustituyente al sitio de hidroxilación

Varios tipos de enzimas provenientes de microorganismos son capaces de oxidar anillos aromáticos regioselectivamente a productos fenólicos.<sup>(12)</sup>

Esto puede alcanzarse por el uso de células enteras, por ejemplo: el ácido 6-hidroxinicotínico es producido a partir del ácido nicotínico por *Pseudomonas* o por *Bacillus sp.* a escala industrial. El Prenalterol racémico, un componente con actividad farmacológica importante como  $\beta$ -bloqueador fue obtenido por p-hidroxilación regioselectiva de un precursor aromático simple usando *Cunninghamella echinulata*<sup>(43)</sup>, asimismo el Indol fue obtenido por el mismo proceso.<sup>(47)</sup>

Un ejemplo importante de hidroxilación de compuestos aromáticos es la de la biotransformación de naftalenos sustituidos a sus correspondiente dihidroxi-derivados por cadenas recombinantes de *E. coli*, obteniendo metabolitos con efecto emético y antiparkinsoniano de los metabolitos.<sup>(48)</sup><sup>(49)</sup><sup>(50)</sup> (Fig N° 10)

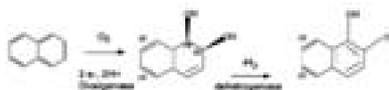


Fig. N° 10: Dos pasos de oxidación del naftaleno: dioxigenación y dehidrogenación.

Las enzimas hidroxilasas como uno de los factores importantes en el proceso de hidroxilación nos permite predecir y razonar la posición de la hidroxilación, sin embargo se cuentan ya con datos disponibles para un número limitado de enzimas hidroxilasas. (51)

Entre otras hidroxilaciones conocidas se tiene la realizada por *Aspergillus ochraceus* TS el cual hidroxila al benzo[ $\alpha$ ]pireno en el C-3. En reacciones posteriores con *Saccharomyces cerevisiae*, se consiguió una reacción adicional en la posición del C-9. (5)

## 2.6. HONGOS: IMPORTANCIA INDUSTRIAL

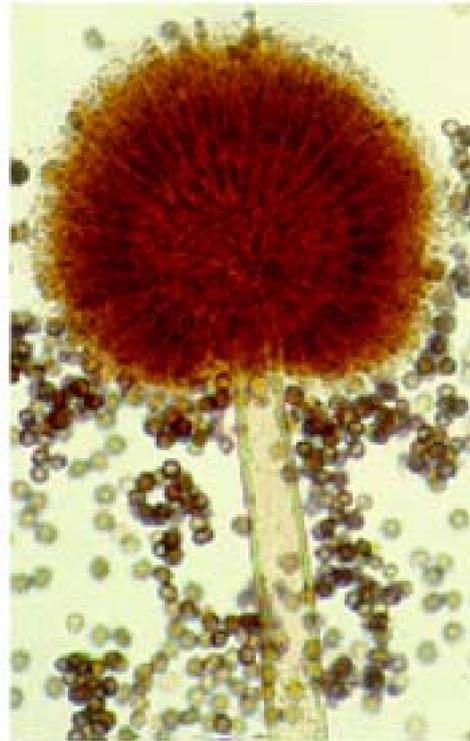
El uso de los microorganismos como herramientas metabólicas se ha vuelto cada vez más importante. Esto es conocido en los casos de hidroxilaciones aromáticas, O y N dealquilaciones, hidroxilación de esteroides e hidrólisis de éster o amidas. (46) (52)

Aunque los hongos son predominantemente quimioheterótrofos existe una evidencia limitada que sugiere que exhiben un metabolismo más diverso de lo que es normalmente conocido. Por ejemplo, muchas especies filamentosas pueden oxidar formas reducidas de nitrógeno (nitrificar), oxidar azufre, hierro y manganeso, y pueden incluso participar, en un grado limitado, en el proceso de desnitrificación. (17)

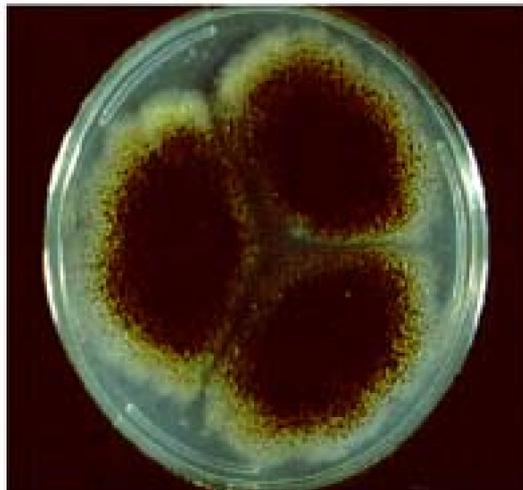
Las tecnologías tradicionales que emplean hongos incluyen la producción de agentes saborizantes, colorantes y la utilización de estos como suplementos proteicos, así como también la producción de productos químicos como el ácido cítrico y de antibióticos como la penicilina. (52) (53)

El *Aspergillus*, es un hongo que pertenece a los Eumicetos, Pleuromicetos, Euroteiales y Eurotiacea. Estos son microorganismos multicelulares que tienen un micelio y esporas y se reproducen asexualmente. (31) (Foto N° 1 y N° 2). Tienen importancia económica porque se les usa en muchas industrias de fermentación incluyendo la producción del ácido cítrico y glucónico, que son elaborados en abundancia por *Aspergillus niger*. (54)

Agentes farmacológicamente activos tales como los agentes antitumorales o inmunomoduladores como la ciclosporina, son productos fúngicos que han adquirido importancia recientemente. Los hongos filamentosos y las levaduras pueden también ser utilizadas para transformar o modificar de otro modo compuestos de utilidad médica como la cortisona. (52)



*Foto N° 1: Aspergillus Níger*



*Foto N° 2: Cultivo en placa de Aspergillus Níger*

## 2.7. DROGAS ANTIINFLAMATORIAS

Ante un estímulo inflamatorio, se libera en el organismo ácido araquidónico, llevando posteriormente a la producción de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos los cuales se constituyen en mediadores de la inflamación<sup>(55)</sup>

La inflamación es una reacción local del organismo y constituye uno de los procesos

más comunes de la enfermedad, es una reacción elemental para frenar una agresión, pero muchas veces puede ser excesiva y es capaz de producir daño, por lo que es necesario frenar el proceso inflamatorio, lo que puede lograrse mediante las drogas antiinflamatorias. (56)

Los antiinflamatorios se pueden clasificar en:

- Antiinflamatorios No Esteroideos (AINES) y
- Antiinflamatorios Esteroideos.

Los AINES constituyen un grupo de medicamentos que se encuentran entre los de mayor oferta por parte de la industria farmacéutica y con un patrón de prescripción muy frecuente por los profesionales de salud. A nivel mundial, más de 30 millones de personas toman analgésicos, y conforman el tercer lugar entre los de mayor consumo. (57)

Los AINES inhiben la biosíntesis de las Prostaglandinas. La inhibición de la vía ciclooxigenasa ha sido la explicación aceptada para las propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas de los AINES.

Dentro de los fármacos para la inflamación hoy se cuenta, con estructuras químicas diferentes con mecanismos de acción similares, como el Paracetamol, Indometacina, Ketorolaco, Diclofenaco, derivados del ácido propiónico, derivados de la Pirazolona, Fenamatos entre otros. (58)

Dentro de los derivados del ácido propiónico se encuentra el Naproxeno [(S)-6-metoxi- $\alpha$ -metil-2-ácido naftalenacético] (59), droga antiinflamatoria de amplio uso para los procesos antiinflamatorios.

### **2.7.1. Naproxeno**

---

El Naproxeno es un polvo cristalino blanco a ligeramente blanco que posee un ligero sabor amargo, insoluble en agua. La mezcla racémica es sintetizada del 2-metoxinaftaleno y del isómero (+) obtenido por resolución con la cinconida. El naproxeno es una de las drogas enantiómericas puras crecientes vendido como S (+)-enantiómero dextrorrotatorio ( $[\alpha]_D +66^\circ$ ), el cual es seguro para el uso (Fig. N° 11) al de sodio también es distribuida comercialmente, este es levorrotatorio ( $[\alpha]_D -11^\circ$ ). Esto muestra un notable ejemplo de que no existe de relación entre la estructura y la relación óptica, desde que ambos ácido y sal tienen la misma configuración cerca del centro quiral. (60)

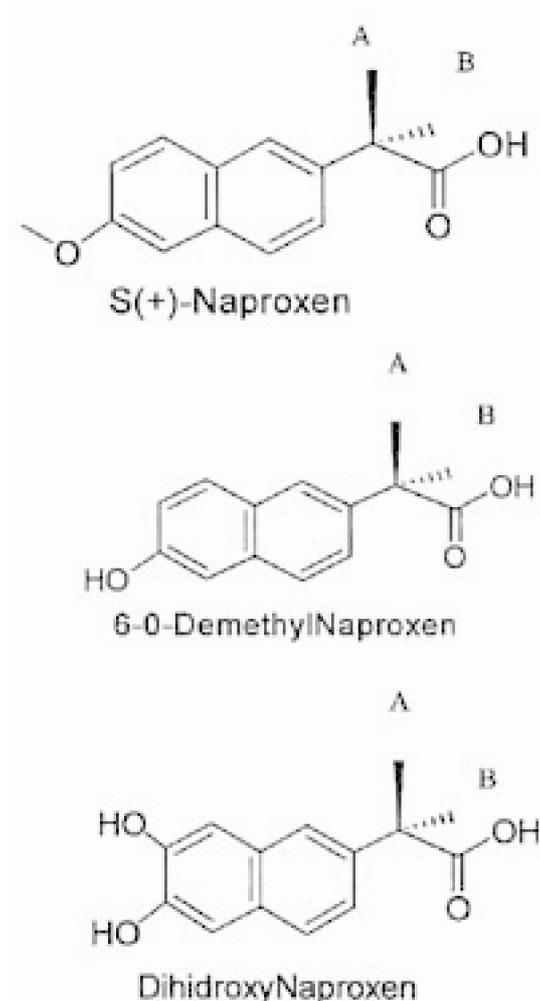


Fig. N° 11: Estructura química del naproxeno.

Las relaciones de estructura actividad en los ácidos 2-naftalenacéticos sustituidos, esta dada en la posición 6 se donde se da la máxima actividad antiinflamatoria. Pequeños grupos lipofílicos como el Cl, CH<sub>3</sub>S Y CHF<sub>2</sub>O fueron análogos activos a CH<sub>3</sub>O siendo este el más potente. Los grupos más largos fueron menos activos. Los derivados de los ácidos 2-naftilpropiónicos son más potentes que los correspondientes ácido acético análogos. Al reemplazar el grupo carboxilo con grupos funcionales capaces de ser metabolizados a la función carboxil (ej. -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CHO O CH<sub>2</sub>OH) se observa que permiten la retención de la actividad. (61) Como con otros derivados del ácido propiónico, el (S)(+)isómero es el enantiómero más potente.

Como fármaco ampliamente usado en los procesos antiinflamatorios (especialmente para el tratamiento de la artritis y para el alivio del dolor medio a moderado), es un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas (inhibidor no selectivo de la COX). (39) (62) (63)

El naproxeno se absorbe completamente cuando se administra por vía oral (biodisponibilidad del 99 %). (64) El pico en los niveles de plasma se alcanza dentro de 2 a 4 horas de esta administración y para la sal sódica de 1-2 horas, como con otros AINES este se halla altamente ligado a las proteínas del plasma en un (99.6 %).

Aproximadamente del 70 % de la dosis administrada: el 60% es eliminado como droga sin cambio y el 10 % es eliminado como conjugado de la droga sin cambio. El restante es convertido a 6-demetilnaproxeno (5%) y en conjugados glucurónidos del 6-demetilnaproxeno (22%) (ambos son farmacológicamente inertes).<sup>(39)(43) (61)</sup> El 6-demetilnaproxeno carece de actividad antiinflamatoria.<sup>(39)</sup>

## **2.8. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Siendo la biotransformación una herramienta biotecnológica que se basa en la utilización de microorganismos que actúan sobre un sustrato específico, es empleada para la obtención de metabolitos.

Los metabolitos obtenidos pueden presentar una actividad farmacológica, buscando de esta manera potenciar la acción de las drogas, así como también disminuir sus efectos adversos o secundarios.

En el presente trabajo de investigación se ha llevado a cabo la biotransformación del Naproxeno utilizando al *Aspergillus niger* por su conocida capacidad de hidroxilar compuestos aromáticos, generando así metabolitos susceptibles a una consiguiente modificación química y obteniendo un producto con un posible efecto antiinflamatorio superior al Naproxeno.

## III. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

#### 3.1.1. Materiales

---

- Cámara de Neubauer Marienfeld (0,1 mm x 0,0025 mm<sup>2</sup>): Para el conteo de los conidios del *A. niger*.
- Cromatofolios AL de Silicagel G60-Merck: Para cromatografía en Capa Fina (CCF)
- Columna cromatográfica (50 cm x 2,2 cm): para la separación y purificación del metabolito de interés.
- Ratas albinas machos Holtzmann provenientes del Bioterio de Instituto Nacional de Salud: Para los ensayos de actividad antiinflamatoria.

#### 3.1.2. Equipos

---

- Cabina microbiológica

- Equipo de Resonancia Magnética Nuclear Advance 300. Bruker 400 MHz: Para la elucidación de los metabolitos de interés.
- Equipo Espectro de Masas LC-MS Hewlett Packard 1100 MSD con Electrionizador de Spray: Para determinación de las masas moleculares.
- Agitador giratorio
- Pletismómetro.

### **3.1.3. Reactivos**

---

Entre los más importantes:

- Silicagel para columna cromatográfica Kieselgel 60, de 0,2-0,5 mm (35-70 mesh), Merck.
- Silicagel G-60 TLC-Kieselgel 60 HF 254, Merck.
- Cepa: *Aspergillus niger* ATCC 9142, proporcionada por Dr. John Rosazza, University of Iowa-USA
- Sustratos: Naproxeno Sódico, pureza 100,07 %, y Naproxeno Base, pureza 98,43%, Suan Farma S.A- China; ambos proporcionados por Laboratorios Cifarma S.A.
- Estándares: S(+)-Naproxeno, R(-)-Naproxeno y Demetilnaproxeno; proporcionados por el Laboratorio Syntex Corporation – México.
- Reveladores:
  - Pauly: Para la identificación de compuestos fenólicos. Está conformado por: Solución A: 0,5% de Acido Sulfanílico en 2% de HCl dil. Solución B: 0,5% de Nitrito de Sodio en agua. Solución C: KOH en solución al 50% de etanol. Para revelar se pulverizó la mezcla de la Solución A y B, se deja evaporar, luego se pulverizó con la Solución C.
  - Vainillina: Para la identificación de compuestos aromáticos. Preparación: 0,5 g de Vainillina en 50 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Q.P.
- Medios de Cultivo:
  - Caldo Czapek Peptona modificado: Utilizado para la biotransformación a realizar (1.5% de Sucrosa, 1.5 % de Glucosa, 0.5 % Polipeptona, 0.1 % Fosfato Ácido de Potasio, 0.05 % de Cloruro de Potasio, 0.05 % Sulfato de Magnesio Heptahidratado, 0.001 % de Sulfato de Hierro Heptahidratado, disolver en Agua Destilada pH final 7,2)
  - Agar OGA Base (Agar Oxitetraciclina Glucosa sin antibiótico): Para el mantenimiento del *A. niger*.
  - Carragenina: Viscarin GP 209F λ Carrageenan – 1254, proporcionadas por FMC BioPolymer – México.

- Carboximetilcelulosa Sódica USP, proporcionada por Laboratorios Cifarma S.A.
- Acetona  $d_6$ , 99% de pureza, Iowa Laboratorios.

## 3.2. MÉTODOS DE TRABAJO

### 3.2.1. Métodos Microbiológicos

#### 3.2.1.1. Crecimiento del Microorganismo *A. niger*

La colonia de *A. niger* utilizada fue sembrada periódicamente en un medio sólido (OGA base), a un pH de 6,5, incubada durante 7 días y a una temperatura entre 25° C a 30° C.

Las replicaciones se realizaban cada 7 días manteniendo la colonia bajo las mismas condiciones.

#### 3.2.1.2. Tolerancia del *A. niger*

Las colonias de *A. niger* fueron expuestas a concentraciones de 0,1 %, 0,3 % y 0,6 % del Naproxeno Sódico, evaluando de esta forma la tolerancia del hongo al sustrato de interés. La tolerancia al sustrato se observó con el crecimiento del hongo.

#### 3.2.1.3. Conteo de Conidios

Se preparó una solución de Tween 80 J.T. Baker al 0,1% en agua, 8mL de esta solución fue esparcida en las placas con *A. niger*, para recolectar el líquido sobrenadante.

Luego se realizó el conteo de los conidios en la Cámara de Neubauer (conteo similar al de glóbulos blancos).

$$\# \text{ Conidios/mm}^3 = n \times h \times d$$

Donde:

n: # de conidios por 1 mm<sup>2</sup>

h: Valor constante igual a 10.

d: Dilución

#### 3.2.1.4. Preparación del Medio de Biotransformación

En matraces de 2 Litros se prepararon 800 mL de Caldo Czapek, los cuales fueron debidamente autoclavados y empleados para inocular el microorganismo e incluir posteriormente el sustrato (Fig. N° 12).

#### 3.2.1.5. Inoculación

En los matraces respectivos se inoculó  $10^6$  conidios de *A. niger*/mL de caldo que luego fue incubado entre 22° C a 25° C por 3 días bajo condiciones de agitación diaria (una vez al día).

Después del crecimiento del *A. niger*, se adicionó Naproxeno Sódico a una concentración de 0,5 mg /mL de caldo. Luego se incubó durante 7 días. (Fig. N° 12).

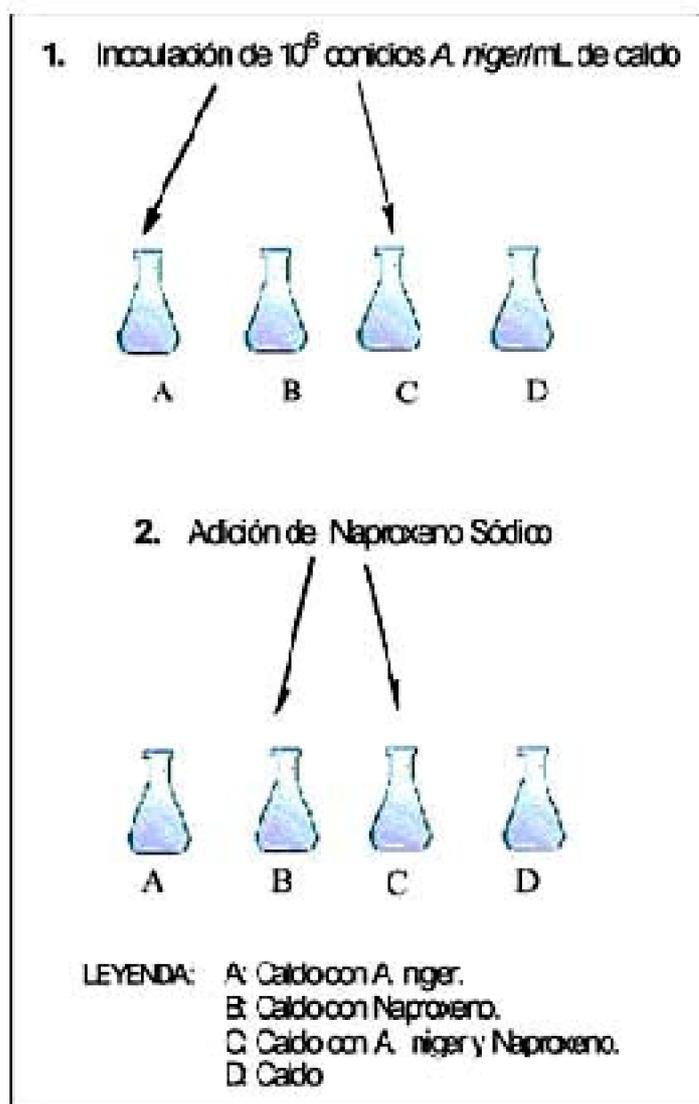


Fig. N° 12: Inoculación de microorganismo y adición del sustrato al Caldo de la Biotransformación

## 3.2.2. Métodos Físicoquímicos

---

### 3.2.2.1. Aislamiento de Metabolitos

Luego de 7 días de fermentaciones se recolectaron los caldos se filtraron, se lavo el micelio con aproximadamente 300 mL de agua caliente, obteniéndose soluciones

límpidas de color naranja oscuro.

Las cuatro soluciones obtenidas fueron sometidas al siguiente tratamiento:

- Se agregó Ácido Clorhídrico hasta llegar a un pH igual a 2, luego se agregó 96g Cloruro de Sodio hasta saturar las soluciones.
- Se procedió a realizar la extracción de los metabolitos utilizando Acetato de Etilo, 3 porciones de 150 mL cada una.
- Se colectó la fase orgánica de cada una de las soluciones, se adicionó 5g de Sulfato de Sodio Anhidro. El líquido filtrado fue evaporado a presión reducida.
- Los extractos obtenidos fueron analizados por Cromatografía en Capa Fina (CCF) de cada uno de los extractos, utilizándose como estándar al Naproxeno Base solubilizado en metanol, y como fase móvil: Tetrahidrofurano – Tolueno- Acido Acético Glacial 3: 30: 1 v/v, el revelador utilizado fue el Reactivo de Pauly.

Luego se procedió al aislamiento de los metabolitos formados.

### **3.2.2.2. Aislamiento de los metabolitos mediante cromatografía en columna**

En una columna cromatográfica se colocó lana de vidrio, esta fue enjuagada con acetato de etilo, la columna se cargo con silicagel, y se lavó el silicagel con Acetato de Etilo.

El extracto obtenido con los metabolitos, se disolvió en Acetato de Etilo, y se le agregó silicagel hasta formar una pasta.

Se procedió a agregar la pasta obtenida, y se incorporo solvente para asegurar el arrastre de los metabolitos.

La fase móvil empleada en la cromatografía en columna fue n-hexano, acetato de etilo, ácido fórmico 70: 30: 0,01 v/v.

Se obtuvieron fracciones de 10 mL cada una, las cuales fueron sometidas a CCF, empleando Tetrahidrofurano, Tolueno, Acido Acético Glacial 3: 30: 1 v/v como fase móvil, el revelador utilizado fue el Reactivo de Pauly usado como revelador.

### **3.2.2.3. Cromatografía Preparativa**

Se realizó la cromatografía preparativa de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna, la fase móvil empleada fue Tetrahidrofurano, Tolueno, Acido Acético Glacial 3: 30: 1 (v/v), el revelador utilizado fue el Reactivo de Pauly.

Las bandas obtenidas fueron eluidas en acetato de etilo, luego estas fueron filtradas a vacío, el solvente se evaporó a presión reducida.

Se realizó nuevamente la Cromatografía en columna para purificar el extracto obtenido en el paso (3.2.5.1).

### **3.2.2.4. Elucidación estructural**

Se realizaron los siguientes análisis:

- Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear ( $H^+$ ).

El análisis espectroscópico por Resonancia Magnética Nuclear (RMN –  $H^+$ ) fue usado para la elucidación de los metabolitos aislados, se disolvieron las sustancias en Acetona  $d_6$  hasta obtener una concentración aproximada de 0.5mg/mL, se realizó lectura en tubo de cuarzo, y luego se colocó en el equipo de Resonancia Magnética Nuclear  $H^+$ , 400 MHz a 32 scan.

- Espectrometría de Masas

Para la identificación de los metabolitos, y los espectros fueron analizados y comparados con el Naproxeno estándar

### **3.2.2.5. Metilación química del Metabolito**

Se realizó la metilación en un balón de tres cuellos, al cual se adaptó un embudo y un condensador.

En el balón se colocó el extracto disuelto en Acetona, se añadió 0,80 mL de Hidróxido de Sodio y se agitó. Se enfrió la mezcla a 10° C aproximadamente.

Se agregó 1,5 mL de dimetilsulfato gota a gota durante 30 minutos, agitando vigorosamente la mezcla, se calentó bajo reflujo por 30 minutos con agitación constante, se dejó enfriar, se agregó 50 mL de agua destilada y se trasvaso a una pera de separación.

Se separó la fase orgánica con 3 porciones de 10 mL de éter, se lavó con agua destilada y luego con ácido sulfúrico diluido (1:3) hasta que el agua de lavado alcance el pH neutro, luego se lava con agua destilada nuevamente. Se agregó sulfato de magnesio anhidro y se decantó. El éter fue removido por destilación.

## **3.2.3. Ensayos Farmacológicos (Método Edema Pedal Inducido por Carragenina)**

---

### **3.2.3.1. Adaptación**

Se utilizaron 78 ratas macho raza Holtzmann, con un peso de 180g a 240 g, los cuales tuvieron una etapa de adaptación de 7 días, manteniéndolos con alimento pelletizado.

Transcurridos los 7 días los animales fueron pesados y clasificados según uniformidad de pesos (para el estudio a realizar se formaron grupos de 6 animales por dosis), luego se midió el volumen de cada una de las patas traseras derecha de las ratas (medidas basales o medida inicial de la pata a la cual no se le ha aplicado droga).

### **3.2.3.2. Administración de la Droga**

Se realizaron ensayos preliminares, las drogas (Naproxeno, Naproxeno Sódico y el 7 metoxi-6 metilnaproxeno) fueron suspendidas en Carboximetilcelulosa al 0,25%, y se

administraron en diferentes concentraciones vía oral (Tabla N° 1). Posteriormente en base a estos resultados se realizaron ensayos confirmatorios (Tabla N° 2).

Tabla N° 1. A. Ensayos Preliminares

ENSAYO	CONCENTRACIÓN	GRUPOS DE ANIMALES PARA EL ESTUDIO (n)
Naproxeno Base	3,30 mg/kg	6
	10,00 mg/kg	6
	30,00 mg/kg	6
Naproxeno Sódico	3,60 mg/kg	6
	11,00 mg/kg	6
	33,39 mg/kg	6
Muestra	3,73 mg/kg	6
	11,30 mg/kg	6
Blanco	-----	6
	Total	54

Tabla N° 2. B. Ensayos Confirmatorios

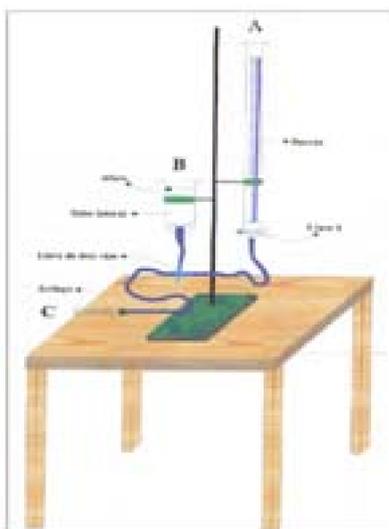
ENSAYO	CONCENTRACIÓN	GRUPOS DE ANIMALES PARA EL ESTUDIO (n)
Naproxeno Básico	10 mg/kg	6
Naproxeno Sódico	11 mg/kg	6
Muestra	11,30 mg/kg	6
Blanco	-----	6
	Total	24

### 3.2.3.3. Edema Inducido por Carragenina

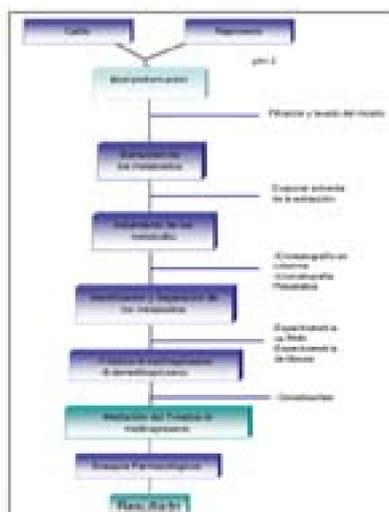
Trascurrido 30 minutos de la administración de las drogas, el edema fue inducido mediante la administración de 0,1 mL de Carragenina al 1% en solución salina, vía subcutánea en la pata derecha.

### 3.2.3.4. Medición de la Inflamación

La inflamación fue medida cada hora durante 6 horas, empleando el pletismómetro para realizar la medición.(Fig N° 13)



*Fig. N° 13: Pletismometro*



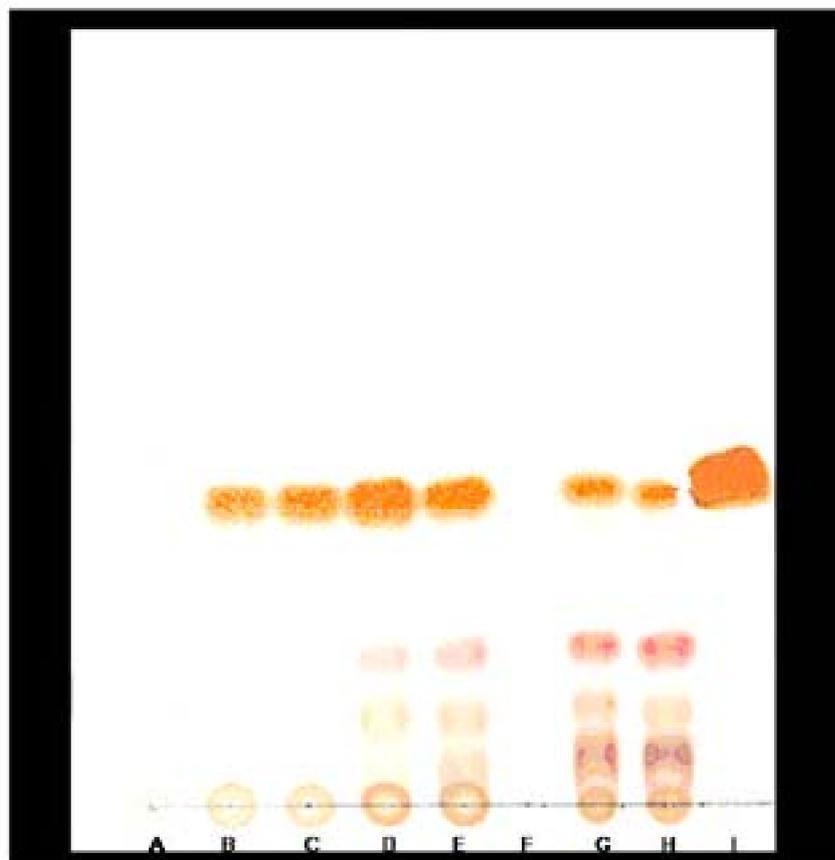
*Esquema N° 1: Procedimiento General de la Biotransformación del Naproxeno con *Aspergillus niger**

## IV. RESULTADOS

El *Aspergillus niger* demostró tener resistencia para crecer medio OGA con una concentración de hasta 0,3 % de Naproxeno Base

El extracto obtenido de la biotransformación del Naproxeno Sódico por *A. niger* durante 7 días a una temperatura entre 22° C a 25° C condujo a la formación de dos metabolitos que se evidenciaron en la cromatografía en capa fina (CCF), por la presencia de dos manchas con Rf distintos; inicialmente se formó demetilnaproxeno (mancha color naranja) (Cromatograma N° 1 y N° 3) coincidente con el Rf del estándar, y la otra mancha de color violeta fue elucidada posteriormente (Cromatograma N° 2).

### 1. Proceso de biotransformación



*Cromatograma N° 1. Proceso de biotransformación el día 1, 3 y 6.*

A: Blanco

**B: Primera muestra: día 1**

**C: Segunda muestra: día 2**

**D: Primera muestra: día 3**

**E: Segunda muestra: día 3**

F: Naproxeno estándar

**G: Primera muestra: día 6**

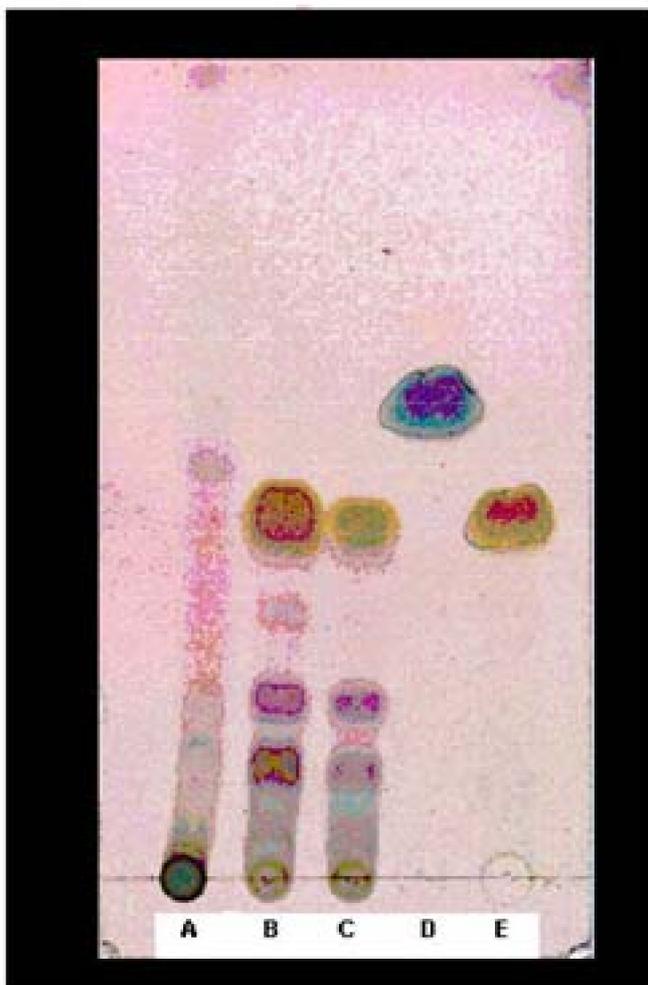
**H: Segunda muestra: día 6**

I: Demetilnaproxeno estándar

**Soporte:** Silicagel G60

**Sistema de Solvente:** Tetrahidrofurano, Tolueno, Acido Acético Glacial 3: 30: 1 (v/v)

**Revelador:** Pauly



*Cromatograma N° 2. Extractos de Cromatografía en Columna: revelador Vainillina.*

**A:** Blanco

**B:** Muestra 1

**C:** Muestra 2

**D:** Naproxeno estándar

**E:** Demetilnaproxeno estándar

**Soporte:** Silicagel G60

**Sistema de Solvente:** Tetrahidrofurano, Tolueno, Acido Acético Glacial 3: 30: 1 (v/v)

**Revelador:** Vainillina



*Cromatograma N° 3. Extracto obtenido luego de 7 días*

**A:** Muestra

**B:** Naproxeno Estándar

**C:** Demetilnaproxeno Estándar

**Soporte:** Silicagel G60

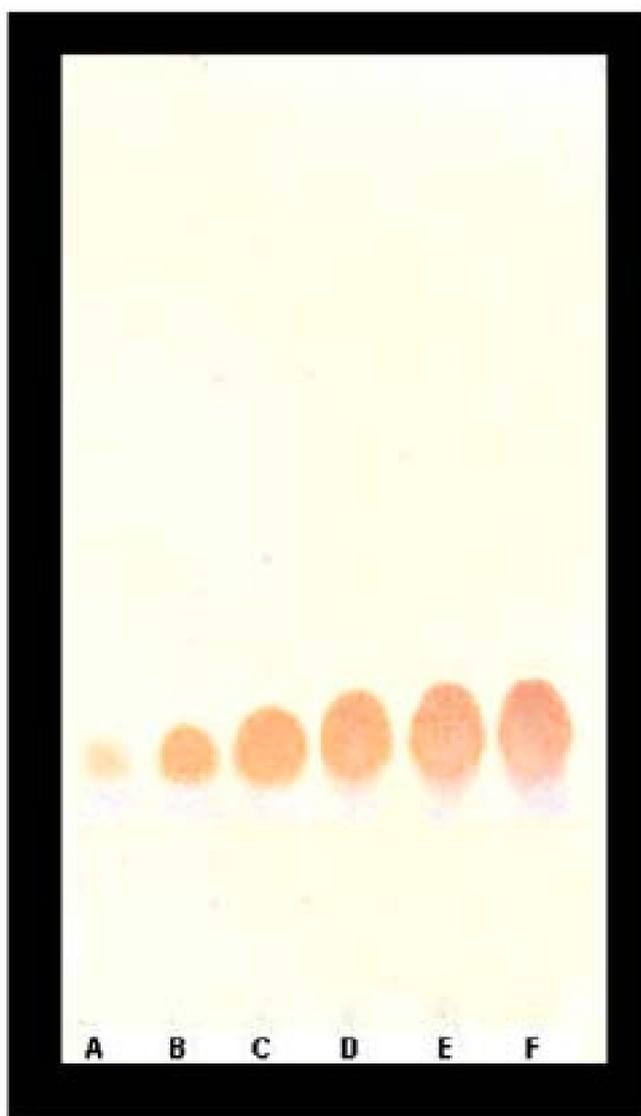
**Sistema de Solvente:** Tetrahidrofurano, Tolueno,

Acido Acético Glacial 3: 30: 1 (v/v)

**Revelador:** Pauly

## **2. Aislamiento de Metabolitos**

Mediante cromatografía en columna y cromatografía preparativa se logró el aislamiento de los metabolitos, analizado por cromatografía (Cromatograma N° 4 y N° 5).



*Cromatograma N° 4. Aislamiento de Cromatografía en Columna para el primer metabolito*

**A:** Extracto 5

**B:** Extracto 6

**C:** Extracto 7

**D:** Extracto 8

**E:** Extracto 9

**F:** Extracto 10

Soporte: Silicagel G60

**Sistema de Solvente:** Tetrahidrofurano, Tolueno,

Acido Acético Glacial 3: 30: 1 (v/v)

**Revelador:** Pauly



*Cromatograma N° 5. Aislamiento de Cromatografía en Columna para el primer y segundo metabolito*

**A:** Extracto 10

**B:** Extracto 11

**C:** Extracto 12

**D:** Extracto 13

**E:** Extracto 14

**F:** Extracto 15

**Soporte:** Silicagel G60

**Sistema de Solvente:** Tetrahidrofurano, Tolueno,

Acido Acético

o Glacial 3: 30: 1 (v/v)

Revelador: Pauly

### 3. Elucidación de Metabolitos

El análisis espectroscópico por Resonancia Magnética Nuclear (RMN – H<sup>+</sup>) se determino tomando las bandas del Naproxeno y Demetilnaproxeno como referenciales (Espectro 1 y 2) en comparación con el metabolito 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno (Espectro 3).

Se observa que las interacciones de los protones en las moléculas (Tabla N°3) son las siguientes:

Tabla N° 3 Interacciones de los protones

<b>Naproxeno</b>	<b>6-demetilnaproxeno</b>	<b>7-hidroxi-6-demetilnaproxeno:</b>
<i>(Espectro 1).</i>	<i>(Espectro 2)</i>	<i>(Espectro 3)</i>
(a1): 7.8 ppm	(a2): 7.7 ppm	(a3): 7.55 ppm
(b1): aprox 7.5 ppm	(b2): aprox 7.4 ppm	(b3): 7.15 ppm
(c1): 7.3 ppm	(c2): 7.15 ppm	(c3): 7.1 ppm
(d1): 7.1 ppm	(d2): 3.85 ppm	(d3): 6.85 ppm
(e1): 3.8 ppm	(e2): 3.3 ppm	(e3): 3.75 ppm
(f1): 2.05 ppm	(f2): 2.6 ppm	(f3): 2.6 ppm
(g1): 1.5 ppm	(g2): 2.1 ppm	(g3): 2.25 ppm
	(h2): 1.5 ppm	(h3): 1.45 ppm
	(i2): 1.2 ppm	(i3): 1.3 ppm
		(j3): 1.2 ppm

#### Espectro 1. Espectro RMN (H<sup>+</sup>) para Naproxeno

Consultar el formato impreso.

#### Espectro 2. Espectro RMN (H<sup>+</sup>) para 6-Demetilnaproxeno

Consultar el formato impreso.

#### Espectro.3. Espectro RMN (H<sup>+</sup>) del 7- hidroxi-6-demetilnaproxeno

Consultar el formato impreso.

Tabla N° 4. Espectros de Masas. A. Características químicas de los compuestos

<b>Nombre químico</b>	<b>Fórmula lineal</b>	<b>Peso Molecular</b>
Naproxeno	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	230.26
6-demetilnaproxeno	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	216.26
7-hidroxi-6 demetilnaproxeno	C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub>	233.26

#### B. Resultados del Espectro

<b>Compuesto</b>	<b>m/z</b>
Naproxeno	170.0 m/z
	171.1 m/z
	188.0 m/z
	482.1 m/z
	727.2 m/z
7-hidroxi-6 demetilnaproxeno	187.1 m/z
	188.1 m/z
	201.1 m/z
	231.1 m/z
	267 m/z
	299 m/z

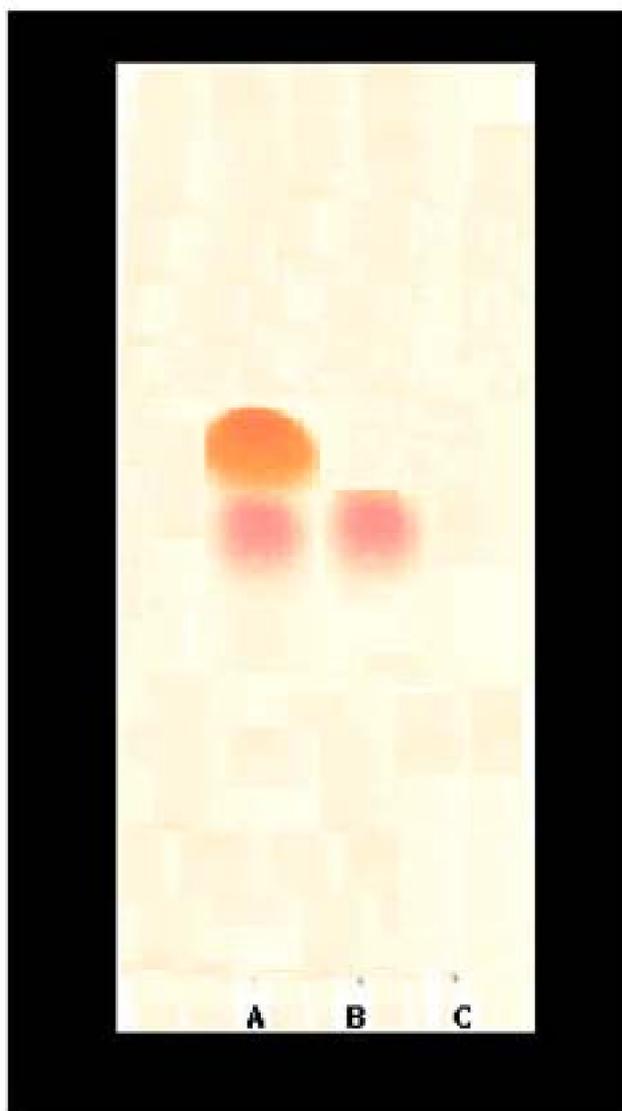
**Espectro 4. Espectro de masas para el Naproxeno**

Consultar el formato impreso.

**Espectro 5. Espectro de masas para el 7-hidroxi-6 demetilnaproxeno**

Consultar el formato impreso.

## **4. Metilación del 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno**



*Cromatograma N° 6. Identificación del Metabolito metilado*

**A:** Muestra con primer y segundo metabolito

**B:** Muestra con segundo metabolito: 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno

**C:** Muestra con segundo metabolito metilado: 7-metoxi-6- metilnaproxeno

**Soporte:** Silicagel G60

**Sistema de Solvente:** Tetrahidrofurano, Tolueno, Acido Acético Glacial 3: 30: 1 (v/v)

**Revelador:** Pauly

## 5. Actividad Antiinflamatoria

La actividad anti-inflamatoria del metabolito metilado (7-metoxi-6metilnaproxeno) fue

## Biotransformación del Naproxeno con *Aspergillus niger* y evaluación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos formados

---

evaluada en ensayos farmacológicos (Método de Edema Pedal Inducido por Carragenina), comparando el efecto farmacológico con estándares de Naproxeno Base y Naproxeno Sódico (Foto N° 3, N° 4, N° 5 y N° 6).

En dicho ensayo se evidenció que el 7-metoxi-6metilnaproxeno no tiene efecto antiinflamatorio (Tabla N° 5, N° 6 y N° 7) y (Gráfico N° 1 y Gráfico N° 2).



*Foto N° 3: Pata sin inflamación*



*Foto N° 4: Pata izquierda inflamada*



*Foto N° 5: Inflamación a la primera hora*



*Foto N° 6: Inflamación a la segunda hora*

**Biotransformación del Naproxeno con *Aspergillus niger* y evaluación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos formados**

	Rep	Inic	Final	Incrementos Relativos	
				Incremento	Porcentaje
Naproxeno	1	100	82	18	17%
	2	100	87	13	13%
	3	100	105	5	5%
	4	100	92	8	8%
	5	100	104	6	6%
Naproxeno Sólido	1	100	85	15	15%
	2	100	87	13	13%
	3	100	88	12	12%
	4	100	99	1	1%
	5	100	98	2	2%
Naproxeno Líquido	1	100	82	18	18%
	2	100	87	13	13%
	3	100	88	12	12%
	4	100	99	1	1%
	5	100	98	2	2%

Tabla N° 5: Incrementos Relativos

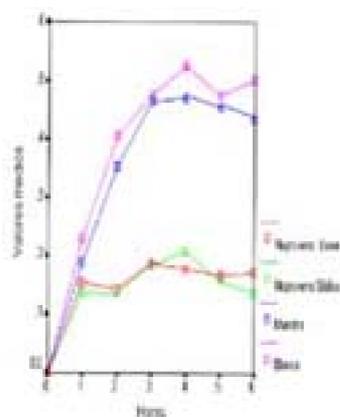


Gráfico N° 1. Incrementos Relativos

Rep	Forma	Inicio	Final	%
1	Naproxeno Base	100	85	15
	Naproxeno Sólido	100	120	20
	Naproxeno Líquido	100	125	25
2	Naproxeno Base	100	110	10
	Naproxeno Sólido	100	115	15
	Naproxeno Líquido	100	120	20
3	Naproxeno Base	100	110	10
	Naproxeno Sólido	100	115	15
	Naproxeno Líquido	100	120	20
4	Naproxeno Base	100	110	10
	Naproxeno Sólido	100	115	15
	Naproxeno Líquido	100	120	20
5	Naproxeno Base	100	110	10
	Naproxeno Sólido	100	115	15
	Naproxeno Líquido	100	120	20

Tabla N° 6: Eficiencia

	Estrato	Muestra	Estrato	Muestra con respecto a la muestra	
				Valor absoluto	Porcentaje
Naproxeno Base	0	1.041	1.42	0.24	0.07
	1	0.479	0.75	0.00	0.07
	2	0.074	0.00	0.00	0.17
	4	0.020	0.00	0.70	0.00
	5	0.000	1.00	0.10	0.79
Naproxeno Sódico	0	4.081	1.42	1.00	0.12
	1	0.040	0.75	0.00	0.24
	2	0.010	0.00	0.00	0.21
	4	0.027	0.00	0.10	0.00
	5	0.042	1.00	0.70	0.00
Muestra	0	3.018	1.42	1.21	0.04
	1	1.205	0.75	-0.04	0.05
	2	0.208	0.73	-1.00	0.12
	4	1.020	0.00	-0.01	0.00
	5	1.000	0.00	-0.00	0.00

Tabla N° 7: Eficiencia de la muestra con respecto a Naproxeno y Naproxeno Sódico

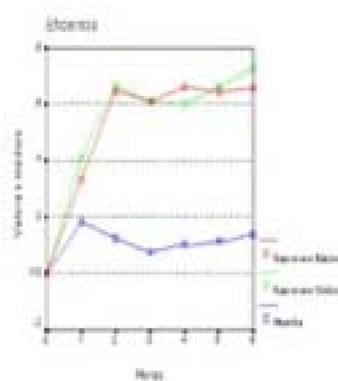


Gráfico N° 2. Eficiencia de la Muestra



---

## V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis el Naproxeno fue transformado por *Aspergillus niger* ATCC 9142, se obtuvieron 2 metabolitos principales y otros en concentraciones menores que no fueron estudiados. Los primeros fueron identificados como: 6-demetilnaproxeno y 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno, desarrollándose el proceso principalmente en las siguientes etapas:

1. Biotransformación del Naproxeno
2. Metilación del 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno.
3. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria del 7-metoxi-6-metilnaproxeno.

1. El Naproxeno fue transformado a 6-demetilnaproxeno siendo este el metabolito mayoritario también reportado en la transformación realizada por especies de *Cunninghamella* <sup>(39)</sup>, la hidroxilación del 6-demetilnaproxeno, muestra claramente la capacidad de hidroxilación del *Aspergillus niger* ATCC 9142 debido a la gran variedad de enzimas que posee dentro de las cuales se hallan las enzimas monooxigenasas <sup>(48)</sup> (hidroxilasas que posibilitan conocidas reacciones en las posiciones orto y para del núcleo aromático) <sup>(43)</sup>

2. La biotransformación del Naproxeno realizada por el microorganismo, tiene similitud con el metabolismo del Naproxeno en los mamíferos habiéndose encontrado el 6-demetilnaproxeno. <sup>(53)</sup> <sup>(65)</sup>

Nosotros realizamos la biotransformación del Naproxeno en el caldo Czapek-peptona modificado <sup>(49)</sup> durante un período de 7 días <sup>(35)</sup> entre 20 -25 ° C por ser la

temperatura óptima para la actividad de las enzimas del hongo.

El conteo de conidios se realizó por medio de la cámara de Neubauer aplicando la técnica de conteo de glóbulos blancos por ser una técnica sencilla y de fácil manejo. Las esporas fueron suspendidas en Tween 80 debido a que esta sustancia surfactante permite una buena cosecha de esporas de *Aspergillus niger* que no son fácilmente suspendibles en agua.

La concentración del inóculo comúnmente empleada para este tipo de biotransformaciones es  $10^6$  conidios / mL.

Se utilizó pH 2 para favorecer la extracción debido a que al llevarlo a la forma ácida aseguramos que todo el metabolito disociado pase a la fase orgánica, además se generó un coeficiente de reparto a favor de la fase orgánica al adicionar cloruro de sodio (2,7g/mL).

Por la naturaleza química de los metabolitos se utilizó como solvente para la extracción acetato de etilo, se trata de un solvente con capacidad medianamente polar, sirviendo para aislar el 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno.

La fase móvil empleada en el análisis cromatográfico para identificar la presencia de metabolitos fue la misma que la recomendada en obras oficiales para el Naproxeno (Tetrahidrofurano, Tolueno, Acido Acético Glacial 3: 30: 1 v/v), debido a la similitud estructural de los compuestos obtenidos. El reactivo de Pauly sirvió para identificar compuestos aromáticos hidroxilados.

Se observa que los cromatogramas muestran moléculas con  $R_f$  menores a la del 6-demetilnaproxeno y el 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno, las cuales son producto de la formación de polímeros de catecoles <sup>(67)</sup>

Para el aislamiento del metabolito de interés en la columna cromatográfica se utilizó como fase móvil (n-hexano:acetato de etilo: ácido fórmico), en diferentes proporciones; se obtuvo una mejor separación con las proporciones 70: 30: 0,1 v/v.

La elucidación estructural de los metabolitos aislados se realizó mediante RMN H<sup>+</sup> y espectrometría de Masas, además de los análisis cromatográficos oportunamente señalados.

Se determinaron los espectros del 6-demetilnaproxeno (Espectro N° 2) y del 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno (Espectro N° 3); con la finalidad de facilitar la interpretación espectroscópica se determinó el espectro de una muestra químicamente pura Naproxeno (Espectro N° 1). El espectro del Naproxeno muestra picos los cuales denominamos a1 (7.8), b1 (7.5), c1 (7.3), d1(7.1), e1 (3.8), f1 (2.05), y g1 (1.5) en donde se muestra que la zona para los hidrógenos aromáticos está comprendida entre los valores de 7.1 y 7.8, para las señales emitidas en la posición del C-6, los hidrógenos del metoxilo se tiene un valor de 3.8, mientras que para los hidrógenos del C-2 se observa un valor de 1.5.

La evidencia más importante de la formación del Demetilnaproxeno es la casi desaparición del pico 3.8 en la posición del C-6, además esto fue corroborado por la reacción positiva frente al Reactivo de Paulys, para los hidrógenos aromáticos y para los hidrógenos de la posición del C-2 se observan que los picos se mantienen.

Al hidroxilarse el 6-Demetilnaproxeno a 7-hidroxi-6-Demetilnaproxeno se observan los siguientes picos denominados como: a3 (7.55), b3 (7.15), c3 (7.1), d3 (6.85), e3 (3.75), f3 (2.6), g3 (2.25), h3 (1.45), i 3 (1.3) y j 3 (1.2).

Para este compuesto en la posición del C-6 se observa el pico correspondiente al grupo metilo no ha desaparecido totalmente debido a que el compuesto no se halla totalmente puro (97 % de pureza) por eso se evidencian picos pequeños en esta zona para el grupo metilo. Para la posición del C-7 en el espectro 3 se generan señales para el grupo hidroxilos en esta posición, mientras que para el espectro1 no se observa ninguna banda desde que el naproxeno no posee un grupo hidroxilos en las posiciones 6 y 7.

En el análisis del espectro de masas para el 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno con peso molecular de 233.24 m/z se observa el pico al que hemos denominado M1 es el resultado de la diferencia del peso molecular menos la escisión del grupo carboxilo y un hidrógeno correspondiente al compuesto que es estable y se observa al 100% (M1) 187.1 m/z, el pico (M2) 188.1 la diferencia de 45 unidades con respecto al ión molecular indica que se ha decarboxilado. (M3) 231.1 m/z muestra un ión molecular deprotonado. (M4) 267.0 m/z es un ión molecular mayor que el ión molecular decarboxilado (188.1 m/z) aumenta en 79 unidades, y lo mismo sucede con el (M5) 299.0 m/z. En el espectro de Masas del metabolito se observa que la última señal no corresponde al valor aproximado al peso molecular del compuesto sino que es mucho mayor 647.3, lo que evidenciaría la formación de dímeros y polímeros del metabolito o que no se encuentra totalmente purificado el metabolito de interés extraído, pero se observa que para el estándar de naproxeno también se evidencia que el peso molecular o un valor aproximado no es la última señal que se genera en el espectro ya que para el estandar hallamos que la última señal tiene un valor de 727.2, lo que sustentaría que la última señal no necesariamente es la del valor aproximado del peso molecular.

3. El método de metilación empleado fue un método convencional, el cual se caracteriza por no alterar la estructura molecular, sólo metila en posiciones donde existe un hidróxilo, produciendo una eterificación, que se caracteriza por la fuerte unión del metóxido. Para detener la reacción se utilizó  $H_2SO_4$ . Se observa que la reacción fue completada al evidenciar la desaparición del color ya que el reactivo de Paulys se utiliza solo para compuestos aromáticos con sustituyentes fenólicos, y al haberse metilado la molécula se corroboró lo evidenciado en la CCF.

3. En los resultados farmacológicos la muestra y las sustancias de comparación fueron suspendidas en solución de Carboximetilcelulosa al 0,25% debido a que la muestra no era soluble en medio acuoso, así como lo indica el protocolo para evaluar esta etapa siguiendo el Modelo antipirético y anti-inflamatorio de los efectos del naproxeno en ratas <sup>(70)</sup>.

Las concentraciones ideales que fueron ensayadas en los patrones fueron proporcionales a la concentración de la dosis posológica para los seres humanos, mientras que las concentraciones ensayadas en el metabolito fueron tanto proporcional a la dosis para el ser humano, como una dosis menor para evaluar su potencia.

No se evaluó una concentración mayor a la proporcional a la dosis posológica debido a la poca cantidad que se obtuvo de metabolito metilado, siendo este punto una de los

inconvenientes en la realización de biotransformaciones.

Los resultados obtenidos comprobaron que el metabolito metilado teniendo una estructura química similar al Naproxeno no posee efecto anti-inflamatorio significativo. Los resultados obtenidos en la observaciones experimentales mostraron que a medida que avanzaba el tiempo los estándares Naproxeno Base y Naproxeno Sódico posee una acción más pronunciada que la muestra ensayada, otra consideración importante que deriva de lo premisa anterior es que los estándares poseen una eficiencia mayor que la muestra para contrarrestar el efecto inducido por la carragenina.

## CONCLUSIONES

- El Naproxeno se hidroxilo en posición orto mediante el pool enzimático del *Aspergillus niger*, lo cual se evidenció mediante los espectros de RMN H<sup>+</sup> y espectros de Masas asociados al análisis cromatográfico.
- En la biotransformación del Naproxeno se obtuvo el 6-demetilnaproxeno, metabolito que se evidencia tanto en el metabolismo humano y del *Aspergillus niger*.
- El 7-metoxi-6-metilnaproxeno no presenta actividad antiinflamatoria.



## RECOMENDACIONES

- La biotransformación es una herramienta biotecnológica que puede ser aprovechada debido a que el material enzimático de los microorganismos es similar al del ser humano, además de no generar subproductos contaminantes.
- Debe ampliarse las investigaciones en biotransformación utilizando otros microorganismos y sustratos, ampliando así las técnicas de obtención de nuevos compuestos, e implementándola a gran escala.



---

# BIBLIOGRAFÍA

- Allen CC., Boyd DQ., Larkin MJ., Reid KA., Sharma ND., Wilson. Metabolism of Naphthalene, 1-Naphtol, Indene and Ondole by Rhodococcus sp. Strains NCIMB12038. J. Applied and Environment Microbiology, 1997; 63(1): 151-155
- Asano Y., Selection and Directed Evolution of New Microbial Biocatalysis and Their Application to Organic Synthesis. J. Agric. Chem. Biotechnology, 2000; 43(4), 207.
- Antebi E., David F. Biotechnology Strategies for Life, Cambridge, Ed. The MIT Press; 1986: 122-181
- Bu'lock J., Kristiansen B. Introducción a la Biotecnología Básica en: Biotecnología Básica. Barcelona, Ed. Acribia S.A.;1991: 3-10
- Azerad R., Regio and Stereoselective, Microbial Hydroxylation of Terpenoids Compound en: Stereoselective Biocatalysis. New York, Ed. Marcel Dekker, Inc; 2000, 153-180
- Brittain G. Analytical Profiles of Drug Substances and excipients, 21, California, Ed. Brittain G., Academic Press Inc, 1992: 352-371.
- Borne RF. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs en: Principles of Medicinal Chemistry. Philadelphia, Ed. Williams & Wilkins, 4th ed.; 1995: 535-580
- Bu'lock J., Kristiansen B. Introducción a la Biotecnología Básica en: Biotecnología Básica. Barcelona, Ed. Acribia S.A; 1991: 3-10
- Burton SG., Cowan DA., Woodley. The Search for the Ideal Biocatalyst. J. Nature Biotechnology, 2002; 20: 37-45
- Cooley JH., Williams RV. Determination of the Enantiomeric Purity of Naproxen: An

- organic chemistry laboratory experiment. *J. Chemical Education*, 1997; 74(6), 1
- Crueger W., Crueger A. Selección de Nuevos Metabolitos en Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Barcelona, Ed. Acribia S.A.; 1989: 1-11
- Da-Fang Z. Microbial Transformation of Naproxen by *Cunninghamella* sp. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2003; 24(5), 442-447
- De Oliveira B., Dos Santos M., Leal P. Biotransformation of the Diterpenoid, Isosterol by *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* and *Rhizopus arrizus*. *J. Phytochemistry*, 1999; 51, 737-741
- Demyttenaere J., De Kimpe N. Biotransformation of Terpenes by Fungi-Study of the Pathways Involved. *J. of Molecular Catalysis Enzimatic*, 2001; 11, 265-270
- Di Gennaro P., Bestetti G., Galli E., Orsini F., Pelizzoni. F., Sello G. Bioconversion of Substituted Naphthalenes to corresponding 1,2 Dihydroxy derivatives by *Escherichia coli* Recombinant Strains. *Tetrahedron Letters*, 1997; 38(35), 6267-6270
- Faber K. Biotransformations in Organic Chemistry. Berlin, Ed. Springer, 4th ed., 2000, 226-236
- Flórez J., Armijo JA., Mediavilla A., *Farmacología Humana*, Barcelona, Ed. Masson, 3era ed.; 1997:355-374.
- Guroff G., Daly J., Jerina D., Renson J., Witkop B., Udenfriend S. Hydroxylation-Induced Migration: The NIH Shift. *Science*. 1967; 157:1524-1530
- Harrison JT., Lewis B., Nelson P., Rooks W., Roszkowski A., Tomolonis A., Fried JH. Nonsteroidal Antiinflammatory Agents: 6-substituted 2-naphthylacetic acids, 1970; 13:203-205hu
- Hashimoto T., Noma Y., Asakawa Y. Biotransformation of the Terpenoids from The Crude Drugs and Animal Origin by Microorganisms. *J. Heterocycles*, 2001; 54(1): 529-558
- Hashimoto Y., Noma Y., Kato S., Tanaka M., Takaoka S., Asakawa Y. Biotransformation of Hinesol Isolated from the Crude Drug *Atractylodes lancea* by *Aspergillus niger* and *Aspergillus cellulosa*. *J. Chem. Pharm. Bull*, 1999; 47(5): 716-717
- Holland H., Morris T., Nava P., Zabic M. A new Paradigm for Biohydroxylation by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. *J. Tetrahedron*, 1999; 55: 7441-7460
- Holland H. *Organic Synthesis with Oxidative Enzymes*. New York, Ed. VHC Publishers Inc; 1992.
- Huang Z., Dostal L., Rosazza JP. Mechanisms of Ferulic Acid Conversions to Vanillic Acid and Guaiacol by *Rhodotorula rubra*. *J. Biological Chemistry*, 1993; 268(32): 23954-23958
- Hu S., Genain G., Azerad R. Microbial Transformation of Steroids: Contribution to 14a-Hydroxylations. *J. Steroids*, 1995; 60: 337-352.
- Hudlicky T., Gonzalez D., Gibson D. Enzymatic Dihydroxylation of Aromatics in Enantioselective Synthesis: Expanding Asymmetric Methodology. *Aldrichimica Acta*, 1999; 32(29): 35-59
- Josa M., Pérez J., Rapado., *Pharmacokinetic /Pharmacodynamic Modeling of*

- Antipyretic and Anti-Inflammatory Effects of Naproxen in the Rat. *J. Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001; 297:198-205.
- Katzung B., *Farmacología Experimental y Clínica*. Buenos Aires, Ed. El Moderno, 2nd ed, 1997
- Kieslich k., Van Der Bont J., Van Der Tweel W. General Introduction to Biocatalysts and Screening en: *New Frontiers in Screening for Microbial Biocatalysts*. Amsterdam, Ed Elsevier Science B.V, 2nd ed.; 1998: 3-17
- Kohler H., Witholt B., Meyer A., Wurrsten M., Schmid A. Hydroxylation of Indole by Laboratory Evolved 2-hydroxybiphenyl 3- monooxygenase. *J. Biological Chemistry*, 2002; 277(37): 34161-34167
- Kolasa T., Brooks C D W., Rodriguez KE., Summers J B., Dellaria JF.,Hulkower K I., Bouska J., Bell R L., Carter G W., Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs as Scaffolds for Design of 5-Lipoxygenase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 1997; 40: 819-824.
- Korzekwa KR., Krishnamachari N. Shou M., Ogai A., Parise RA., Rettie AE., Gonzales Fj. Evaluation of Atypical Cytochrome P450 Kinetics with Two- Substrate Models: Evidence that Multiple Substrates can Simultaneously Bind to Cytochrome P450 Active Sites. *J. Biochemistry*, 1998;37.4137-4137
- Kuang-Chao W., Microbiological Hidroxilation of 6-Substituted-2-Isopropyl Naphthalenes, sintex Corp PA, IFI Claims Patent US3687813.
- Lahlou H., Noma Y., Hashimoto T., Asakawa Y. Microbial Transformation of Dehydropinguisenol by *Aspergillus* sp. *J. Phytochemistry* 2000; 54, 455-460
- Lacroix I., Biton J., Azerad R. Microbial Biotransformation of a Synthetic Immunomodulating Agent HR 325. *J. Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1997; 5(7), 1369-1380
- Lacroix I., Biton J., Azerad R. Microbial Biotransformation of a Synthetic Immunomodulating Agent HR 325. *J. Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1997; 5(7), 1369-1380
- León R., Fernández P., Pinheiro MH., Cabral JM. Whole-Cell Biocatalysis in Organic Media. *J. Enzyme and Microbial Technology*, 1998; 23: 483-500
- Li ZJ., Shukla V., Fordyce AP., Pedersen AG., Wenger KS., Marten MR. Fungal Morphology and Fragmentation Behavior in a Fed-Batch *Aspergillus oryzae* Fermentation at the Production Scale. *J. Biotechnology and Bioengineering*, 2000; 70(3): 300-311
- Litter M. *Manual Litter Farmacología Experimental y Clínica*. Buenos Aires, Ed. El Ateneo, 7th ed.; 1986.
- Michaels P., Rossaza J. Methods for Biocatalysis and Biotransformations en: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington D.C., Ed. American Society of Microbiology, 2nd ed.; 1999: 165-180
- Myazawa M., Noma Y., Yamamoto K., Kameoka H. Biotransformation of 1,4-cineole to 2-endo-hydroxy-1,4-cineole by *Aspergillus niger*. *J. Chemistry Express*, 1991; 6(10): 771-774
- Myazawa M., Noma Y., Yamamoto K., Kameoka H. Bioconversion of (+)-fenchone to 5-endo-hydroxipenchone by *Aspergillus niger*. *J. Chemistry Express*, 1990; 5(6): 407-410

- Myazawa M., Noma Y., Yamamoto K., Kameoka H. Biohydroxylation of 1,4-cineole to 8-hydroxy-1,4-cineole by *Aspergillus niger*. *J. Chemistry Express*, 1992; 7(9): 721-724
- Myazawa M., Noma Y., Yamamoto K., Kameoka H. Biohydroxylation of 1,4-cineole to 9-hydroxy-1,4-cineole by *Aspergillus niger*. *J. Chemistry Express*, 1992; 7(4): 305-308
- Noma Y., Asakawa Y. *Aspergillus* spp.: Biotransformation of Terpenoids and related Compounds. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 1995; 33(8): 63-96
- Noma Y., Tatsumi Ch. Microbial Conversion of Carvone. *Ann Res Stud Osaka Joshigakuen Junior College* 1976; 20:33-47.
- Overhage J., Steinbuchel A., Priefert H. Highly Efficient Biotransformation of Eugenol to Ferulic Acid an Further Conversion to Vainillin in Recombinant Strains of *Escherichia coli*. *J. Applied and Enviromental Microbiology*, 2003; 69(11), 6569.
- Pelczar MJ. Hongos en: *Microbiología*. Mexico DF, Ed. Mc.Graw Hill, 4th ed.; 1991, 247-270
- Quintana MG., Dalton HD. Biotransformation of Aromatic Compounds by Immobilized Bacterial Strains in Barium Alginate Beads. *J. Enzyme and Microbial technology*, 1999; 24: 232-236
- Robbins M., *Patología Estructural y Funcional Interamericana*, Madrid Editorial Mc.Graw-Hill. 1990
- Rosazza J., Huang Z., Dostal T., Rousseau B. Biocatalytic Transformation of Ferulic Acid: An Abundant Aromatic Natural Product. *J. of Industrial Microbiology*, 1995; 15, 457-471
- Sakaki T., Inouye K. Practical Aplication of Mammalian Cytochrome P450. *J. Bioscience and Bioengineering*, 2000; 90(6): 583-590
- Sariaslani S., Neidleman S., *Microbial Cytochromes P-450 and Xenibiotic Metabolism*. *Adv. Appl. Microbiol.* 1991; 36, 133-178
- Schulze B., Wubbolts. Biocatalysis for Industrial Production of Fine Chemicals. *J. Current Opinion in Biotechnology*, 1999; 10: 609-615
- Scott M., Baker A. Drug Discovery an operating Model for a New Era. *J. Nature Biotechnology*, 2001; 19: 727-730
- Smith RV., Rosazza JP. Microbial Transformation as a Means of Preparing Mammalian Drug Metabolites en: *Microbial transformations of Bioactive Compounds*, Volume II. Florida, Ed. CRC Press; 1982: 1-42
- Stephen A., Stinson C. Chiral Drugs Interactions. *Chemical & Engineering News*, 1999; 77(41), 101-120
- Stephanopoulos G., Aristidon A., Nielsen J. *The Essence of Metabolic Engineering en Metabolic Engineering Principles and Methodologies*. San Diego, Ed. Academic Press; 1998: 1-20
- Stinson SC. Pharmaceutical Fine Chemicals. *Chemical & Engineering News*, 2000; 78(28): 63-96
- Takahashi H., Homa Y., Toyota M. Biotransformation of (+) and (-) Neomenthols and Isomenthol by *Aspergillus niger*. *J. Phitochemistry*, 1994; 35(6), 1465.
- Tanaka A., Araki H., Komoike Y., Hase S., Takeuchi K., Inhibition of both COX-1 and

- 
- COX-2 is Required for Development of Gastric Damage in Response to Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *J. Physiology*, 2001; 95:21-27
- The Merck Index: An encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th ed., New Jersey, Ed. Merck & Co., Inc.; 2001: 1140
- Tramper J., Van Der Plas H., Linko P. Microbiologically Catalysed Reaction Steps in the Field of Vitamin and Carotenoid Syntheses en: *Biocatalysis in Organic Syntheses*. Ed. Elsevier Science Publishing Company Inc, New York; 1985: 99-118
- Turner WB. Primary and Secondary Metabolism in: *Fungal Metabolites*. New York, Ed. Academic Press.; 1997: 13-22
- Tutaya A. Características del Conocimiento en Relación a la Prescripción de los Antiinflamatorios No Esteroides (AINES) en Médicos de Establecimientos de Salud de Lima y Callao. *Revista de salud y Medicamentos*, 1999; 12(46), 20-32.
- Ueda M., Sashida R. Microbial Production of 2-hydroxynicotinic acid from Nicotinic Acid by Intact Cells of MCI 3289. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1998; 4: 199-204
- Wackett L., Hershberger D. *Biocatalysis and Biodegradation, Microbial Transformation of Organic Compounds*. Washington D.C., Editorial ASM Press, 2001.
- Wainwright M, *Introducción a la Biotecnología de Hongos*. Zaragoza, Ed. Acribia S.A.; 1992
- Wandrey C., Liese A., Kihumbu D. Industrial Biocatalysis: Past, Present, and Future. *J. Organic Process Research & Development*, 2000; 4: 286-290
- Wubbolts M., Witholt B. *Selected Industrial Biotransformations*. New York, Ed. Monite, 1998, 271-290