

CTSCAFE PARA CIUDADANOS.....

<http://www.ctscafe.pe>

ISSN 2521-8093



Volumen I- N° 3 noviembre 2017

<http://www.ctscafe.pe>

Lima - Perú

Obtención de derivados de Naproxeno por biotransformación y evaluación de su capacidad antiinflamatoria

Lic. Maribel Montoya Ayala

Departamento Académico de Bioquímica Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Lic. Maria J. Tataje M

Departamento Académico de Bioquímica
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Dr. Elena R. Benavides R

Departamento Académico de Bioquímica
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Lic. Antonio Osorio L

Departamento Académico de Bioquímica
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

14

Resumen: La Biotransformación del Naproxeno, [(S)-6-metoxi- α -metil-2-ácido naftalenacético], fue realizada utilizando el *Aspergillus Níger*, 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 Níger*. 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 espectroscopia 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 antiinflamatorio.

Palabras claves: Biotransformaciones/ Naproxeno/ *Aspergillus Níger*/ Actividad Anti-inflamatoria/ 6-demetilnaproxeno/ 7-hidroxi-6-metilnaproxeno/ 7-metoxi-6-metilnaproxeno.

Abstract: The Biotransformación of Naproxen [(S)-6-methoxy- α -methyl-2-naphthaleneacetic acid], was performed using a microorganism *Aspergillus niger*, which has known ability of hydroxylate aromatic rings. This biotechnological process was conducted in a liquid culture in optimum conditions for development of the microorganism. Two main metabolites were 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 and was used the model Carrageenin-induced paw edema to evaluate the pharmacological activity, was used such as standard naproxen, and naproxen sodium. It was determined that the methylated metabolite has not showed anti-inflammatory activity.

Keywords: Biotransformation/ Naproxen/ *Aspergillus Níger*/ Anti-inflammatory Activity/ 6-desmethylnaproxen/ 7-hydroxy-6methylnaproxen/ 7-methoxy-6methylnaproxen.

Résumé: La Biotransformation du Naproxeno, [(S) --6-metoxi- α -metil-2-ácido naftalenacético] a été réalisée en utilisant l'*Aspergillus Níger*, le micro-organisme qui caractérise par sa capacité pour hidroxilar des systèmes aromatiques. Le dit processus biotechnologique a été réalisé dans un milieu liquide bas des conditions parfaites pour le développement de l'*Aspergillus Níger*. Demetilnaproxeno majoritaires ont obtenu 2 metabolitos et 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno; lesquels ont été isolés au moyen des techniques chromatographiques, et identifiés au moyen de la spectroscopie de RMN (H^+) et une spectroscopie de masses. 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno il est été metilado au moyen des réactions chimiques à 7-metoxi-6-metilnaproxeno; et soumis à l'essai du Modèle Expérimental de l'Oedème la Pédale Induite par Carragenina pour évaluer l'activité pharmacologique, a été utilisée comme patron de comparaison au Naproxeno Base, et Naproxeno Sódico, où on a déterminé que le metabolito metilado ne présentait pas d'effet anti-inflammatoire.

Mots-clés: Biotransformaciones / Naproxeno / *Aspergillus Níger* / Activité Anti-inflamatoria / 6-demetilnaproxeno / 7-hidroxi-6metilnaproxeno / 7-metoxi-6metilnaproxeno.

1. 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, esta se produce 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 de la estereo-selectividad y la regio-especificidad, además de causar menos daños ambientales. El *Aspergillus niger* es ampliamente utilizado debido a su maquinaria enzimática, utiliza una gran variedad de sustratos para obtener sustancias conocidas. El objetivo del presente trabajo fue la obtención de una molécula biotransformada por *Aspergillus Níger*, a partir del Naproxeno, para luego evaluar su probable actividad antiinflamatoria. La Biotransformación se realizó en un medio de cultivo favorable para el 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 del Edema Pedal Inducido por Carragenina para la evaluación de la actividad antiinflamatoria, utilizando Naproxeno base y Naproxeno Sódico como standares.

2. Material y métodos

2.1. Materiales

Materiales, equipos y reactivos propios de laboratorio de biotecnología y farmacología.

2.2. Método:

2.2.1. Métodos microbiológicos:

- a) **Crecimiento del Microorganismo *A. Níger*.** La cepa de *A. Níger* fue sembrada, cada siete días, en un medio sólido (OGA base), a un pH de 6,5, incubada 7 días entre 25 y 30 °C; expuesta 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 que se observó con el crecimiento del hongo.
- b) **Conteo de Conidios:** 8 mL de una solución de Tween 80 J.T.Backer al 0,1 % en agua, fue esparcida en las placas con *A. Níger*, para recolectar el líquido sobrenadante, en el que se realizó el conteo de los conidios en una Cámara de Neubauer.
- c) **Preparación del Medio de Biotransformación:** Se prepararon 800 mL de Caldo Czapek, debidamente autoclavados y empleados para inocular el microorganismo e incluir posteriormente el sustrato.

- d) **Inoculación:** En los matraces respectivos se inoculó 10^6 conidios de *A. Níger*/mL de caldo, se incubó entre 22 y 25° C agitándose una vez al día por tres días. Después del crecimiento del *A. Níger*, se adicionó Naproxeno Sódico a una concentración de 0,5 mg/mL de caldo. Luego se incubó durante 7 días.

2.2.2. Métodos Fitoquímicos:

- a) **Aislamiento de Metabolitos:** A los siete días, se colectaron los caldos, se filtraron, se lavó el micelio con 300 mL de agua caliente, obteniéndose soluciones límpidas de color naranja oscuro. Las soluciones obtenidas fueron sometidas al siguiente tratamiento: -Adición de HCl hasta pH 2, luego 96 g de NaCl hasta saturación; -extracción de metabolitos con Acetato de Etilo, tres veces por 150 mL cada una; -colección de la fase orgánica, desecar con Sulfato de Sodio, filtrar y evaporar; -Analizar los extractos por CCF, frente al Naproxeno Base, en metanol, como fase móvil: Tetrahidrofurano – Tolueno – Ácido Acético Glacial 3:30:1 v/v, y revelador reactivo de Pauly
- b) **Aislamiento de los metabolitos mediante cromatografía en columna:** En una columna cromatográfica se colocó lana de vidrio, enjuagada con acetato de etilo, la columna se cargó con silicagel, que también se lavó 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 agregó la pasta obtenida, y se incorporó solvente para asegurar el arrastre de los metabolitos. La fase móvil fue n-hexano, acetato de etilo, ácido fórmico 70:30:0,01 v/v; se obtuvieron fracciones de 10 mL cada una, se les aplicó CCF, empleando Tetrahidrofurano, Tolueno, Ácido Acético Glacial 3:30:1 v/v como fase móvil y se reveló con Reactivo de Pauly.
- c) **Cromatografía Preparativa:** A partir de las fracciones obtenidas se realizó la cromatografía preparativa, la fase móvil empleada fue Tetrahidrofurano, Tolueno, Ácido Acético Glacial 3:30:1 (v/v) y como revelador el Reactivo de Pauly. Las bandas obtenidas fueron eluidas en acetato de etilo, filtradas al vacío, evaporándose el solvente a presión reducida. Se realizó nuevamente la Cromatografía en columna para purificar el extracto obtenido en la etapa de aislamiento.
- d) **Elucidación Estructural:** Se aplicó espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (H^+) y espectrometría de Masas para la identificación de los metabolitos, cuyos espectros fueron comparados con los del Naproxeno estándar.
- e) **Metilación Química del Metabolito:** En un balón de tres cuellos 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 a 10 °C, 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 trasvasó 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, se lavó con agua destilada nuevamente. Se agregó sulfato de magnesio anhidro y se decantó. El éter fue removido por destilación.

2.2.2. Ensayos farmacológicos: Método Edema Pedal inducido por Carragenina:

- a) **Adaptación:** 78 ratas macho Holtzmann, de 180 a 240 g, con alimento peletizado durante siete días de adaptación, fueron pesados y clasificados en grupos de 6 animales por dosis, se les midió el volumen de la pata trasera derecha (medida basal) cada uno.
- b) **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: 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	3,37 mg/kg	6
	11,30 mg/kg	6
Blanco	_____	6
	Total	54

Fuente: Elaboración propia

Tabla N°2: Ensayos Confirmatorios

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

Fuente: Elaboración propia

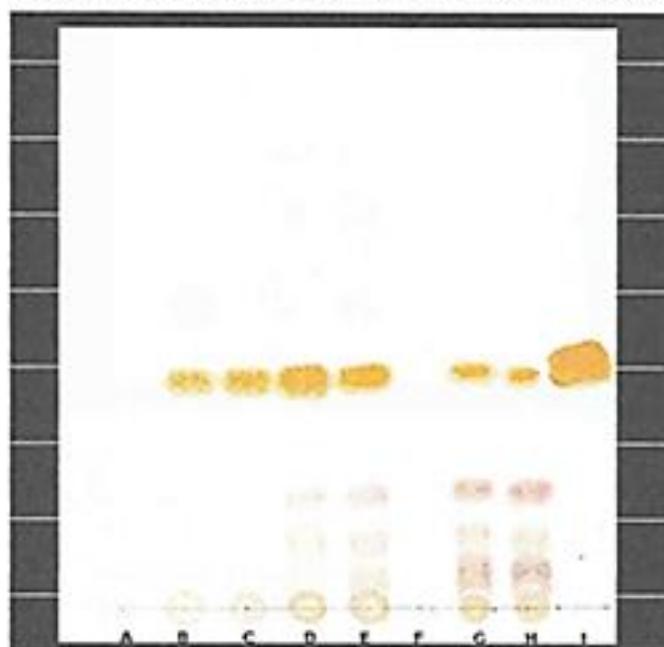
- c) **Edema Inducido por Carragenina:** Transcurrido 30 minutos de la administración de las drogas, el edema fue inducido mediante la administración subcutánea en la pata derecha de 0,1 mL de carragenina al 1 % en solución salina.
- d) **Medida de la Inflamación:** Se hizo con un pletismómetro cada hora, durante 6 horas.

3. Resultados:

El *Aspergillus niger* demostró tener resistencia para crecer en medio OGA con una concentración de hasta 0,3 % de Naproxeno Base. La biotransformación del Naproxeno Sódico, en siete días a 22 – 25 °C por *A. Níger* generó dos metabolitos evidenciados en CCF, por la presencia de dos manchas con Rf distintos, inicialmente se formó demetilnaproxeno (mancha color naranja) (Cromatografía 1 y 3) coincidente con el Rf del estándar, y la otra mancha de color violeta fue elucidada posteriormente (Cromatograma 2).

3.1. Proceso de biotransformación:

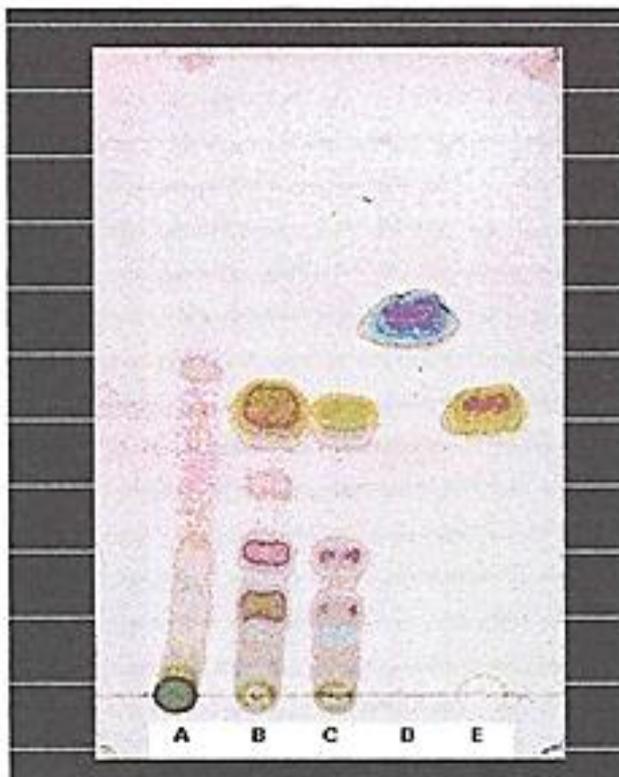
Cromatograma N° 1
Proceso de biotransformación el día 1, 3 y 6.



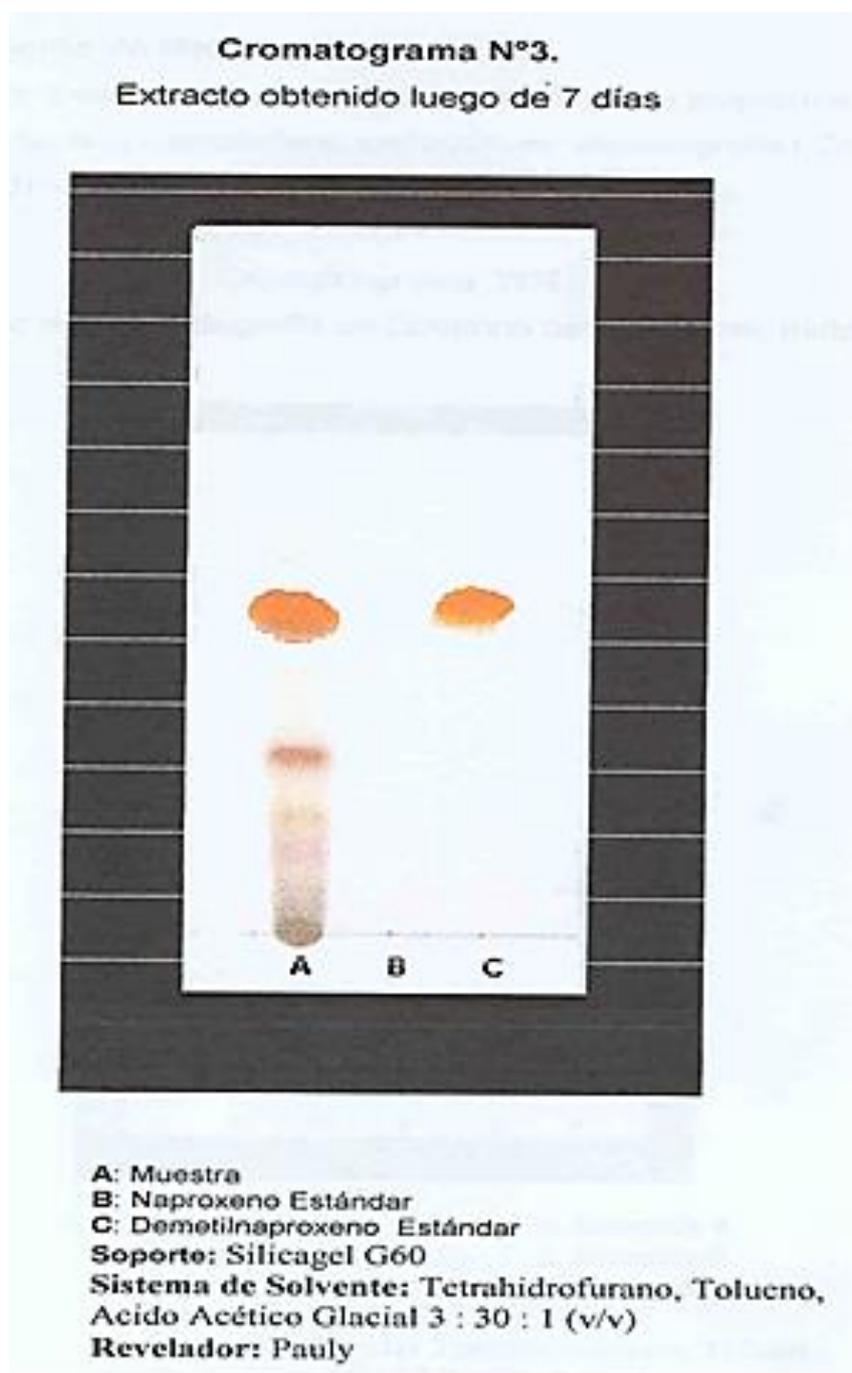
A: Blanco
B: Primera muestra: día 1
C: Segunda muestra: día 2
D: Primera muestra : día 3
E: Segunda muestra: día 3
Soporte: Silicagel G60
Sistema de Solvente: Tetrahydrofurano, Tolueno, Acido Acético Glacial 3 : 30 : 1 (v/v)
Revelador: Pauly
F: Naproxeno estándar
G: Primera muestra: día 6
H: Segunda muestra: día 6
I: Demetilnaproxeno estándar

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



3.2. Aislamiento de metabolitos:

Mediante cromatografía en columna y cromatografía preparativa se logró el aislamiento de los metabolitos, analizando 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: Tetrahydrofurano, 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

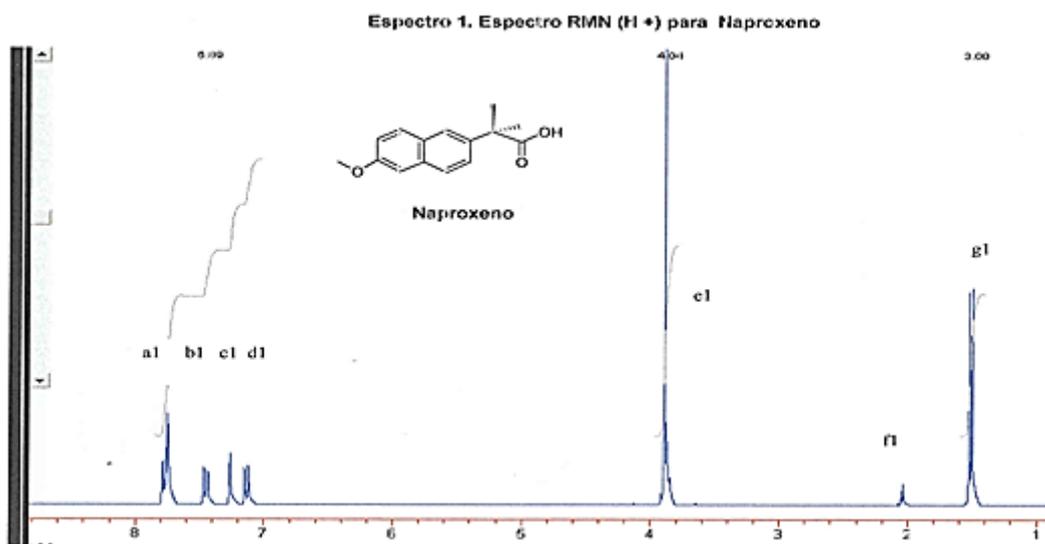
Sistema de Solvente: Tetrahidrofurano, Tolueno,
Acido Acético

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

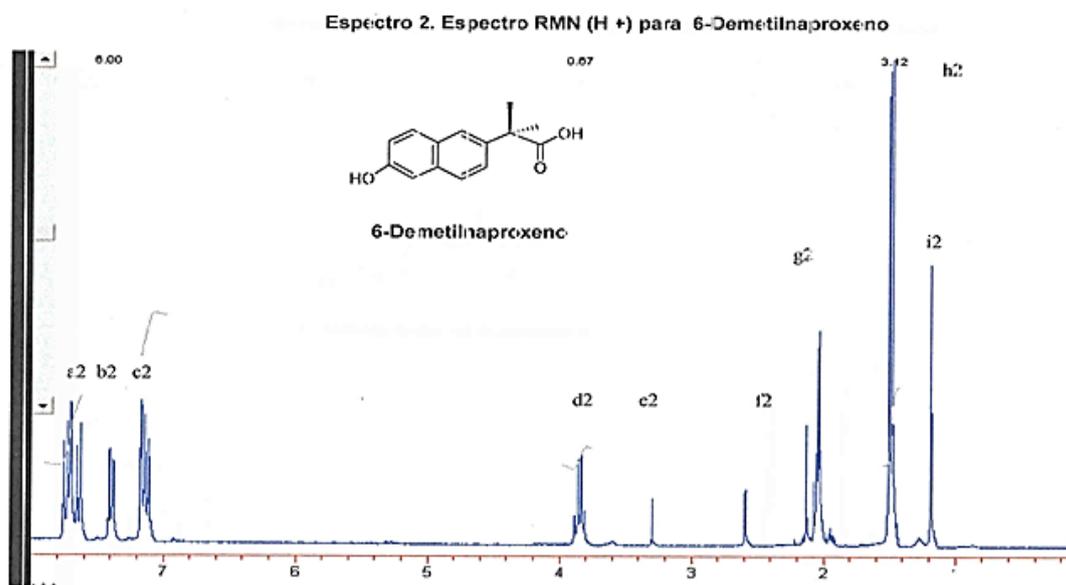
Revelador: Pauly

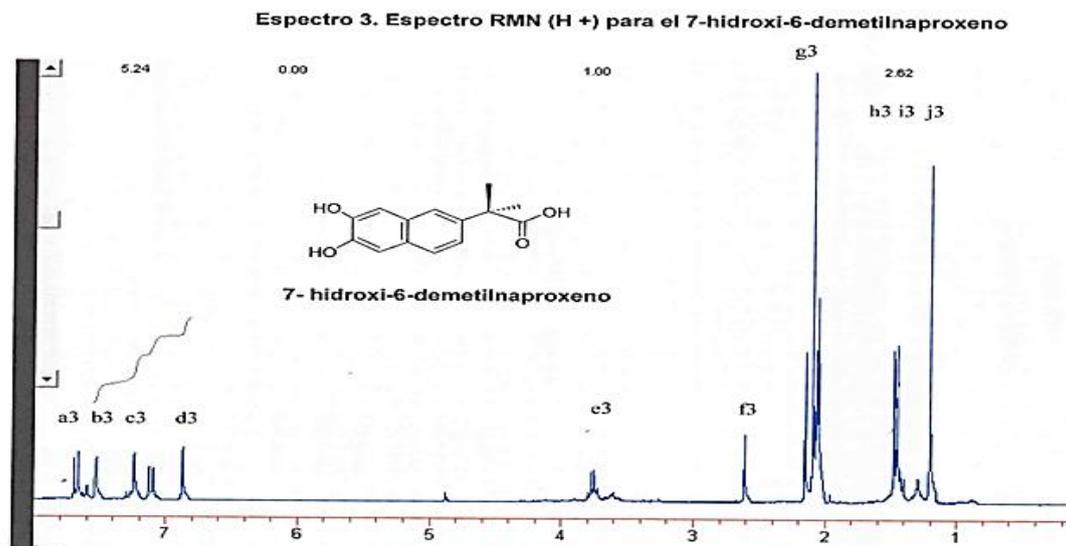
3.3. Elucidación de metabolitos

El análisis espectroscópico por resonancia magnética Nuclear (RMN – H⁺) se determinó tomando las bandas del Naproxeno y Dimetilnaproxeno como referenciales (Espectro 1 y 2) en comparación con el metabolito 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno (Espectro 3).

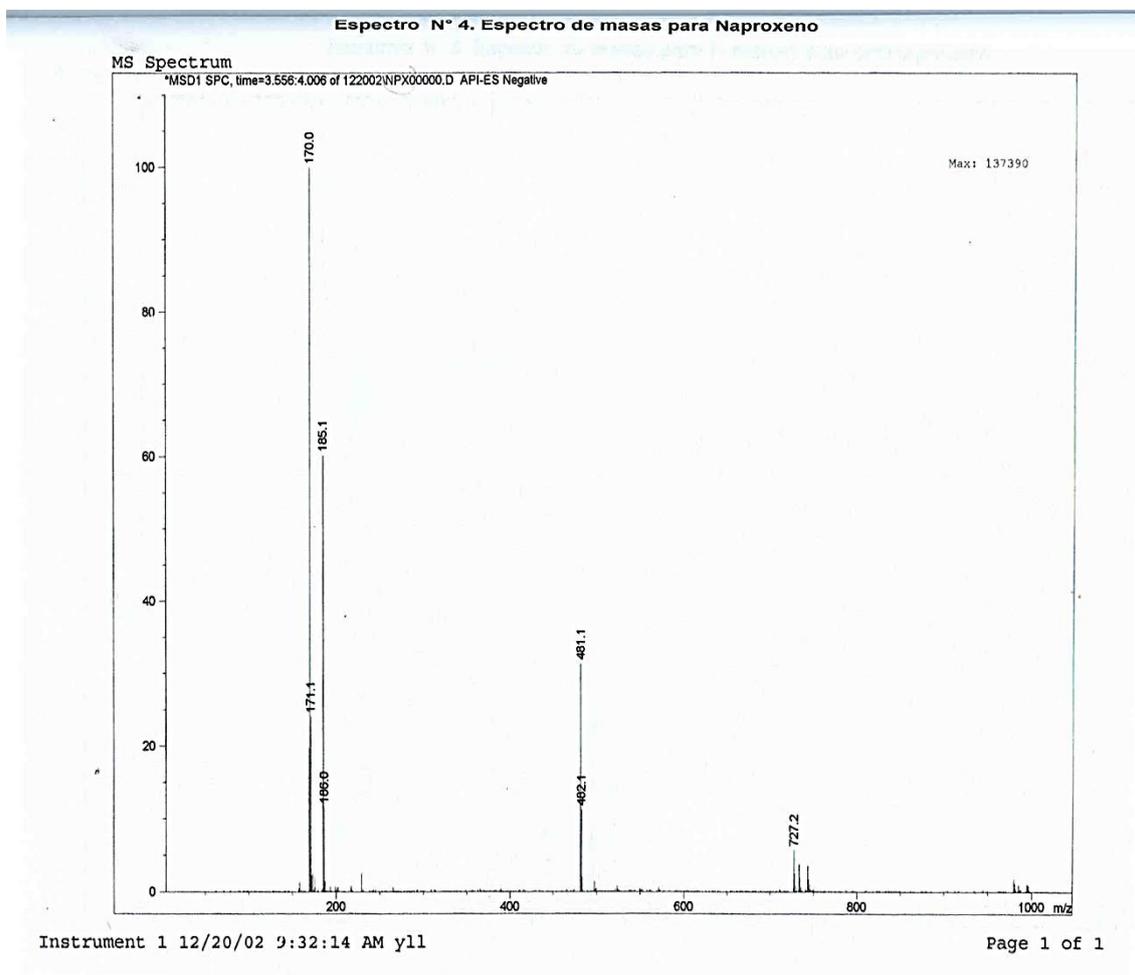


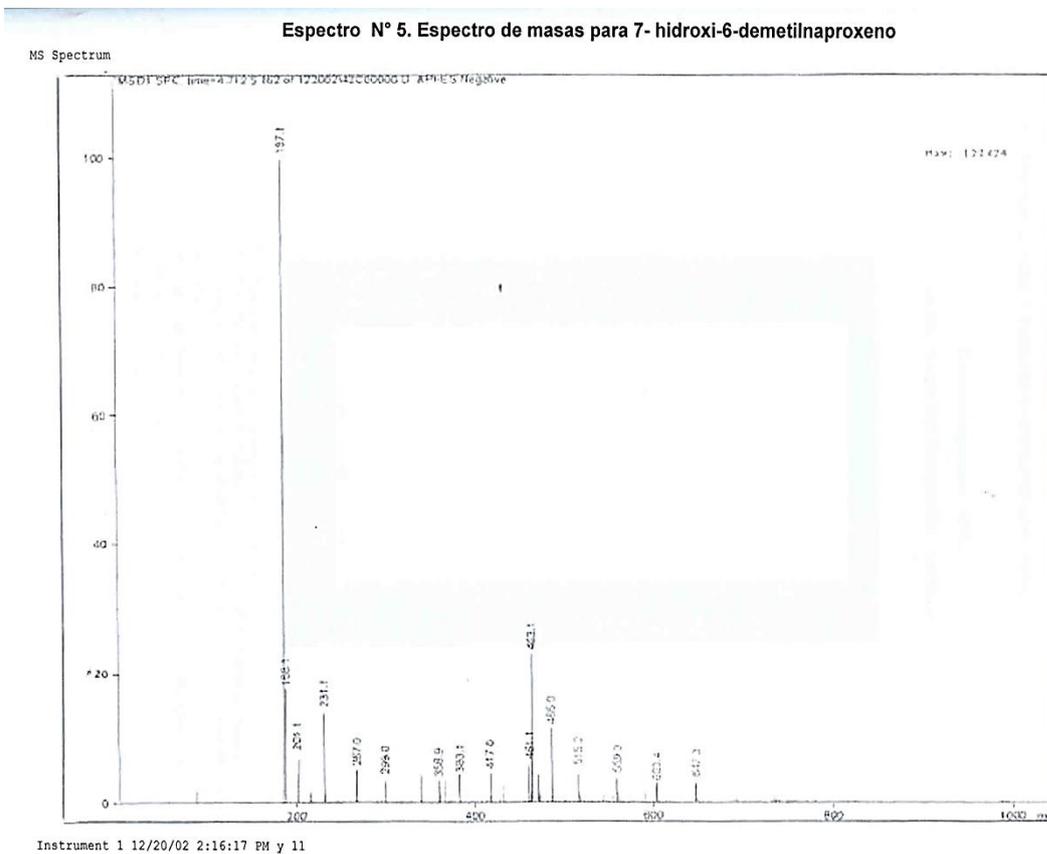
24





26

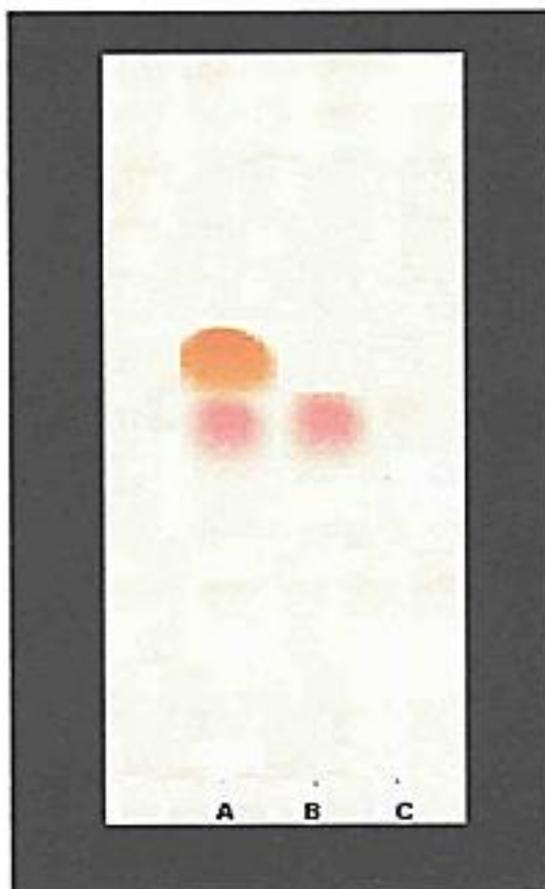




3.4. Metilación del 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno

4. Metilación del 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno

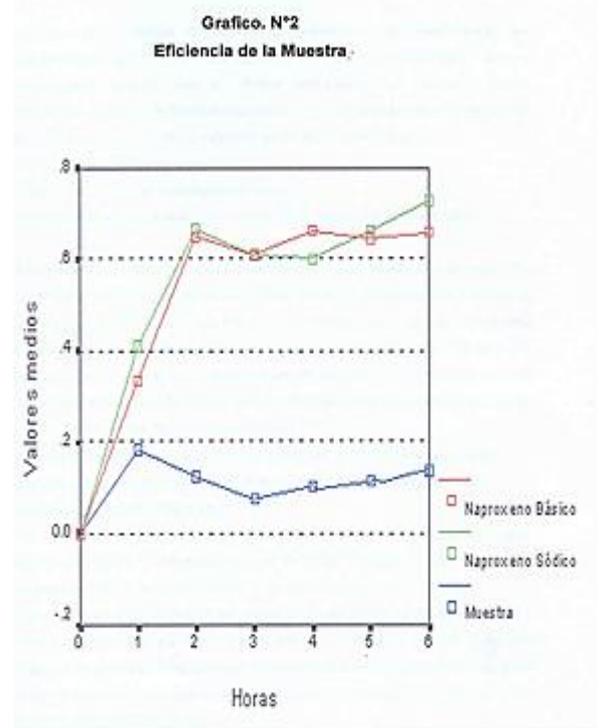
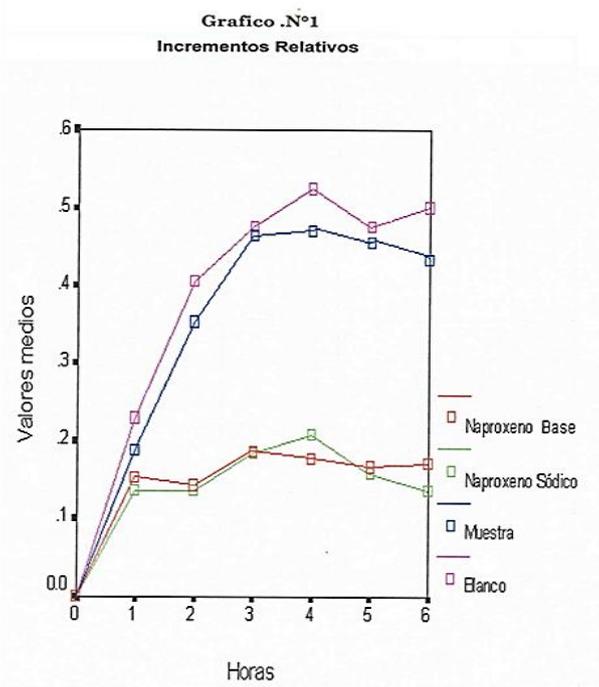
Cromatograma N°6.
Identificación del Metabolito metilado



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

3.5. Actividad antiinflamatoria:

La actividad antiinflamatoria del metabolito metilado (7-metoxi-6-metilnaproxeno) fue evaluada en ensayos farmacológicos (Método de edema Pedal Inducido por Carragenina), comparando el efecto farmacológico con estándares de Naproxeno Base y Naproxeno Sódico. En dicho ensayo se evidenció que el 7-metoxi-6-metilnaproxeno no tiene efecto antiinflamatorio.



4. Discusión:

El naproxeno fue transformado por *Aspergillus Níger* 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:

- a) El Naproxeno fue transformado a 6-metilnaproxeno, metabolito mayoritario, también reportado en la transformación realizada por especies de *Cunninghamella*¹, la hidroxilación de 6-demetilnaproxeno, muestra claramente la capacidad de hidroxilación del *Aspergillus Níger* ATCC 9142 gracias a las enzimas monooxigenasas² (hidroxilasas que posibilitan reacciones en las posiciones orto y para del núcleo aromático)³.
- b) La biotransformación del naproxeno realizada por el microorganismo, tiene similitud con el metabolismo del naproxeno en los mamíferos habiéndose encontrado el 6-metilnaproxeno^{4,5}. Las condiciones fueron óptimas para la actividad de las enzimas del hongo. Por la naturaleza química de los metabolitos, se utilizó como solvente de extracción acetato de etilo, medianamente polar, para aislar el 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno. Los cromatogramas muestran moléculas con Rf menores al del 6-demetilnaproxeno y el 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno, por la formación de polímeros de catecoles⁶. Para el aislamiento del metabolito de interés en la columna cromatográfica se utilizó como fase móvil (n-hexano: acetato de etilo: ácido fórmico), en proporciones 70: 30 : 0,1 v/v. La elucidación de los metabolitos aislados se realizó mediante RMN H+ y espectrometría de masas, además de los análisis cromatográficos oportunamente señalados. Se determinaron los espectros de 6-demetilnaproxeno (N° 2) y del 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno (N° 3); con la finalidad de facilitar la interpretación espectroscópica se determinó el espectro de una muestra químicamente pura de Naproxeno (N° 1), este muestra picos: **a1**(7.8), **b1**(7.5), **c1**(7.3), **d1**(7.1), **e1**(3.8), **f1** (2.05), y **g1** (1.5) la zona para los hidrógenos aromáticos esta comprendida entre 7.1 y 7.8, para las señales emitidas en la posición del C-6, los hidrógenos del metoxilo tienen un valor de 3.8, mientras que los hidrógenos del C-2 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, esto fue corroborado por la reacción positiva frente al Reactivo de Pauly, para los hidrógenos aromáticos y para los hidrógenos de la posición del C-2 los picos se mantienen. Al hidroxilarse el 6-Demetilnaproxeno a 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno se observan los picos denominados: a3 (7.55), b3 (7.15), c3 (7.1), d3 (6.85), e3 (3.75), f3 (2.6), g3 (2.25), h3 (1.45), i3 (1.3) y j3 (1.2); en la posición del C-6 se observa que el pico correspondiente al grupo metilo no ha desaparecido totalmente debido a que el compuesto no se halla totalmente puro (97 % de pureza), 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 espectro 1 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 el pico 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 descarboxilado. (M3) 231.1 m/z muestra un ión molecular desprotonado. (M4) 267.0 m/z es un ión molecular mayor que el ión molecular descarboxilado (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 estándar 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. El método de metilación empleado fue un método convencional, que se caracteriza por no alterar la estructura molecular, sólo metila en posiciones donde existe un hidrófilo, produciendo una eterificación, que se caracteriza por la fuerte unión del metóxido. Para detener la reacción se utilizó H₂SO₄, la reacción completa se evidencia al desaparecer el color ya que el reactivo de Pauly se utiliza solo para compuestos aromáticos con sustituyentes fenólicos, y al haberse metilado la molécula se corroborará lo evidenciado en la CCF.

- c) En los resultados farmacológicos la muestra y las sustancias de comparación fueron suspendidas en solución de carboximetilcelulosa al 0,25 %, así como lo indica el protocolo para evaluar esta etapa siguiendo el Modelo antipirético y antiinflamatorio de los efectos del naproxeno en ratas⁷. Las concentraciones ideales que fueron ensayadas en los patrones fueron proporcionales a la concentración de la dosis posológica para los seres humanos.

5. Conclusiones

- El naproxeno se hidroxiló en posición orto mediante el pool enzimático del *Aspergillus niger*, lo cual se evidencia mediante los espectros de RMN H⁺ 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 Níger*.
- El 7-hidroxi-6-demetilnaproxeno no presenta actividad antiinflamatoria.

7. 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; así como, las técnicas de obtención de nuevos compuestos, e implementándola a gran escala.

8. Literatura Citada

1. **Da-Fang, Z.** Microbial Transformation of Naproxen by *Cunninghamella sp.* *Acta Pharmacologica Sinica*, 24(5), 442-447. 2003.
2. **Hudlicky, T.; Gonzalez D., Gibson D.** Enzymatic Dihydroxylation of Aromatics in Enantioselective Synthesis: Expanding Asymmetric Methodology. *Aldrichimica Acta*; 32(29): 35-59. 1999.
3. **Faber, K.** Biotransformations in Organic Chemistry. Ed. Springer, 4th ed. 226-236. Berlín. 2000.
4. **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*, 70(3): 300-311. 2000.
5. **Borne, RF.** Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs en: Principles of Medicinal Chemistry. Ed. Williams & Wilkins, 41ed.; 535-580 Philadelphia. 1995.
6. **Wandrey, C.; Liese, A.; Kihumbu, D.** Industrial Biocatalysis: Past, Present, and Future. *J Organic Process Research & Development*, 4: 286-290. 2000.
7. **Josa, M.; Pérez, J.; Rapado.** Pharmacokinetic /Pharmacodynamic Modeling of Antipyretic and Anti-Inflamrnatory Effects of Naproxen in the Rat. *J.Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297: 198-205. 2001.

En el siguiente número de.....

REVISTA DE INVESTIGACIÓN MULTIDISCIPLINARIA



<http://www.ctscafe.pe>

Volumen II- N° 4 Marzo 2017

Nuevas secciones y comentarios.....

311

*Contáctenos en nuestro correo electrónico
revistactscafe@gmail.com*

Página Web:
www.ctscafe.pe

Blog:
<https://ctscafeparaciudadanos.blogspot.com/>

Facebook
<https://www.facebook.com/Revista-CTSCafe-1822923591364746/>