



Anales de la
Asociación
Química Argentina

LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA* INMOVILIZADA SOBRE SiO_2 NANOESTRUCTURADO APLICADA EN LA ESTERIFICACIÓN ENANTIOSELECTIVA DE IBUPROFENO

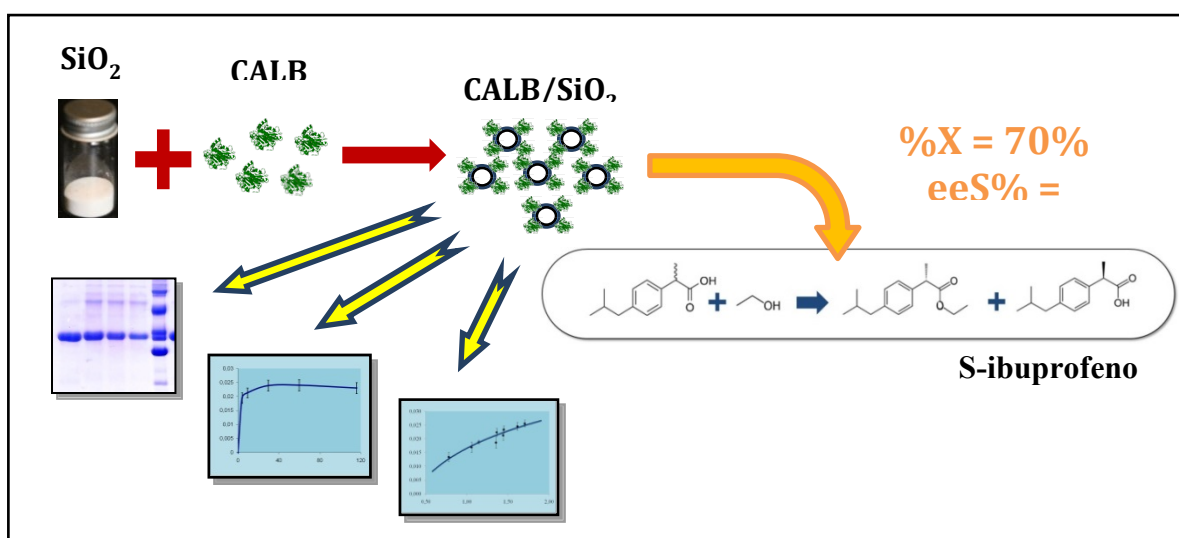
Carlos R. Llerena Suster^{1,2,*}, Matías E. Díaz Merino¹, Susana Morcelle del Valle¹,
Laura E. Briand²

¹Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIPROVE), Depto. de Cs. Biológicas, Fac. Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina;

²Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas –Dr Jorge J. Ronco CINDECA-CCT La Plata-CONICET, La Plata, Argentina.

* Autor Corresponsal: cllerena@quimica.unlp.edu.ar

Resumen Gráfico



Resumen

En el presente trabajo se prepararon biocatalizadores por adsorción simple de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) sobre dióxido de silicio nanoestructurado que se aplicaron en la resolución cinética enzimática de ibuprofeno racémico.

Se estudió la cinética de inmovilización y la isoterma de adsorción de la lipasa a partir de distintas soluciones de un extracto crudo. El límite máximo de dispersión de la proteína sobre el óxido es de $0,025\mu\text{moles}/\text{m}^2$ (25mg cada 100mg de soporte) y se obtuvo en menos de 30 minutos de inmovilización. Mediante electroforesis desnaturante, se determinó que existió una adsorción selectiva de la CALB con respecto a otras proteínas del extracto enzimático.

Los biocatalizadores se utilizaron para esterificar ibuprofeno con etanol en isooctano como co-solvente. Se alcanzó un 70% de conversión a las 24 hs. con 58% de exceso enantiomérico hacia el *S*-ibuprofeno.

Los ensayos de estabilidad mostraron que los biocatalizadores sólo perdieron entre 7 y 25% de su actividad después de más de siete meses de almacenamiento a 4°C. Los biocatalizadores con mayor carga enzimática resultaron ser los más estables.

Abstract

This investigation presents the synthesis of biocatalysts based on the lipase B of *Candida antarctica* CALB adsorbed on nanostructured silica oxide and their application of the kinetic resolution of racemic ibuprofen.

The kinetic of the immobilization and the isotherm of adsorption were studied. The maximum dispersion limit of the protein onto the oxide support was $0,025\mu\text{moles}/\text{m}^2$ (25mg per 100mg of support) and was achieved in 30min of immobilization. The studies by SDS-PAGE indicated that CALB was selectively adsorbed onto the SiO₂ support.

The biocatalysts were used in the esterification of ibuprofen with ethanol with isooctane as cosolvent. The conversion of ibuprofen reached up to 70% at 24 hours of reaction with 58% of enantiomeric excess towards *S*-ibuprofen.

The stability assays showed that the biocatalysts only lost between 7 and 25% of their activity after more than seven months of storage at 4°C. Those biocatalysts with a protein loading higher than 21 mg onto 100mg of support were the most stable ones.

Palabras claves: Lipasa B de *Candida antarctica*, dióxido de silicio, resolución cinética, ibuprofeno

Keywords: *Candida antarctica* lipase B, silicon dioxide, kinetic resolution, ibuprofen

1. Introducción

En esta contribución se presenta la preparación y aplicación de biocatalizadores basados en la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) dispersa sobre dióxido de silicio nanoestructurado. Dicho soporte posee una alta superficie específica y su uso se incluye en una nueva y creciente área de la catálisis conocida como nanobiocatálisis [1-3]. Gracias a su estructura, estos materiales permiten soportar una elevada carga proteica [1], además debido a su reducido tamaño poseerán comportamientos similares a las enzimas libres en cuanto a su capacidad de movilidad y difusión, además de favorecer la transferencia de masa entre la enzima y el medio [2-5].

Una gran diversidad de soportes basados en dióxido de silicio han sido muy utilizados desde hace varias décadas tanto en investigación como en aplicaciones industriales debido a sus

múltiples ventajas [6-31]. Por su parte, la CALB es una de las lipasas más usadas como biocatalizador en un rango muy amplio de aplicaciones tanto en investigación como en la industria [9, 10, 18, 25-33].

El ibuprofeno presente en la mayoría de las formulaciones farmacéuticas, consiste en mezclas racémicas de los enantiómeros *R* y *S*, sin embargo, la forma *S*-ibuprofeno es la farmacológicamente activa [34]. La utilización del *S*-ibuprofeno puro permite reducir la dosis administrada en comparación con la mezcla racémica, disminuyendo así los efectos secundarios perjudiciales [34-37]. Para la obtención de enantiómeros puros, la resolución cinética enzimática se puede aplicar mediante distintas estrategias, entre ellas la síntesis enantioselectiva de ésteres [37-39]. En ese sentido, las lipasas más usadas en la esterificación de profenos provienen de los hongos *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei* y *Candida antarctica*. Mientras que las dos primeras esterifican preferentemente al *S*-ibuprofeno, la CALB esterifica más eficientemente al *R*-ibuprofeno, lo que representa una ventaja ya que permite la obtención directa del *S*-ibuprofeno como tal [38, 39].

En los últimos años se han reportado varios trabajos describiendo el uso de CALB en la esterificación del ibuprofeno, la gran mayoría utilizando el biocatalizador comercial Novozym® 435 [38-41]. Como nucleófilos, se han utilizado una gran variedad de alcoholes llegando a la conclusión que CALB esterifica mejor los alcoholes primarios de cadena corta [39]. Mientras que como medios de reacción, lo más habitual ha sido el uso, de isooctano [32, 40-43] y ciclopentano [44] cosolventes o se ha prescindido del mismo [38, 39, 45-47].

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Se utilizó dióxido de silicio Cab-O-Sil® EH 5 (328,90 m²/g). La CALB proviene de un extracto crudo comercial llamado Lipozyme® CalB L que fue donado por la empresa Novozymes.

Los colorantes Coomassie Brilliant Blue G250 (ultra puro) de USB. El D-sorbitol (> 98%) de SIGMA. El isopropanol (> 99,5%) y el metanol (99,8 %) de Carlo Erba. El ibuprofeno (99,57 %) de Parafarm y el isooctano de Merck.

2.2. Preparación de los biocatalizadores

Se prepararon 10 soluciones enzimáticas compuestas por distintos volúmenes, entre 1,50 y 3,00mL, del extracto crudo de CALB, llevados a un volumen de 21,0mL con agua destilada

desionizada. Dichas soluciones contenían entre 0,78 y 1,70 mg/mL de proteínas. En todos los casos, se tomó 1,00 mL de la solución de inmovilización para tener una muestra al tiempo inicial y los restantes 20,0 mL de la solución se mezclaron con 100,0mg del SiO₂ en un frasco de vidrio. Los frascos se mantuvieron a 30°C con agitación magnética durante 30min. Al finalizar, se centrifugó durante 20 minutos a $9600 \times g$ a 4°C. Se separó el sólido del sobrenadante y se procedió al lavado re-suspendiéndolo en agua destilada desionizada y centrifugándolo nuevamente. Los sobrenadantes (SN) se guardaron a 4°C para analizar su composición, mientras que el sólido se liofilizó durante 48h y se almacenó a 4°C.

El contenido proteico de las muestras iniciales y los sobrenadantes fue analizado mediante el macrométodo de Bradford [48] por cuadruplicado, para ello se utilizó una curva de calibración realizada con un patrón de CALB pura comercial [49]. A partir de estos resultados se calculó la cantidad de proteína adsorbida sobre el SiO₂ en cada sistema biocatalítico (CALB/SiO₂) y el límite máximo de adsorción.

2.3. Cinética de la adsorción de proteína

La cinética de adsorción de proteínas sobre SiO₂ se estudió a través de la determinación de la cantidad de proteína adsorbida en función del tiempo a partir de una solución que contenía inicialmente 1,4mg/mL de proteína.

Se tomaron alícuotas de un 1,00mL de la solución de inmovilización a los 5, 10, 30, 60 y 120 minutos y se las centrifugó durante 5 minutos a una velocidad de $11300 \times g$. Los sobrenadantes de cada muestra fueron analizados mediante el método de Bradford.

2.4. Esterificación enantioselectiva del ibuprofeno

Los biocatalizadores preparados se aplicaron en la esterificación de (R/S)-ibuprofeno empleando etanol como agente nucleofílico. El procedimiento consistió en mezclar, en frascos de vidrio color caramelo, 20mg de los biocatalizadores con 10mL de una solución de etanol 0,12M e ibuprofeno 0,12M en isooctano. Las mezclas de reacción se mantuvieron a 45°C en agitación orbital a 200 rpm [39]. En cada medida de actividad se realizaron, en paralelo, ensayos en blanco sin agregar el biocatalizador.

En primer lugar, se evaluó la actividad a distintos tiempos de reacción entre 8 y 24 hs. Posteriormente, se determinó la actividad de los distintos biocatalizadores preparados a un

tiempo de 24hs. Se estudió el efecto del tiempo de almacenamiento a 4°C, comparando la actividad de los biocatalizadores recién preparados y 220 días después.

De las soluciones de cada ensayo de actividad, se tomaron 50µL para determinar el exceso enantiomérico del sustrato (eeS%) por cromatografía líquida HPLC quiral. El porcentaje de conversión fue determinado mediante titulación de las muestras y los blancos contra una solución estandarizada de KOH 0,1 M en etanol.

Los resultados muestran una rápida adsorción de proteínas sobre el soporte durante los primeros 5 minutos, alcanzándose el máximo de adsorción a los 30 minutos de contacto enzima-soporte. Tiempos mayores no producen mayor adsorción proteica. Por otra parte, en el sobrenadante del lavado, se obtuvo un valor de proteínas inferior al límite de detección del método (0,1 mg/mL), lo que indica que no se produce una desorción significativa en el mismo.

3. Resultados

3.1. Adsorción de CALB sobre el SiO₂ nanoestructurado: cinética y límite máximo de dispersión

En la Figura 1 se muestra la variación de la cantidad de proteínas adsorbidas al soporte en función del tiempo.

Los resultados muestran una rápida adsorción de proteínas sobre el soporte durante los primeros 5 minutos, alcanzándose el máximo de adsorción a los 30 minutos de contacto enzima-soporte. Tiempos mayores no producen mayor adsorción proteica.

Por otra parte, en el sobrenadante del lavado, se obtuvo un valor de proteínas inferior al límite de detección del método (0,1 mg/mL), lo que indica que no se produce una desorción significativa en el mismo.

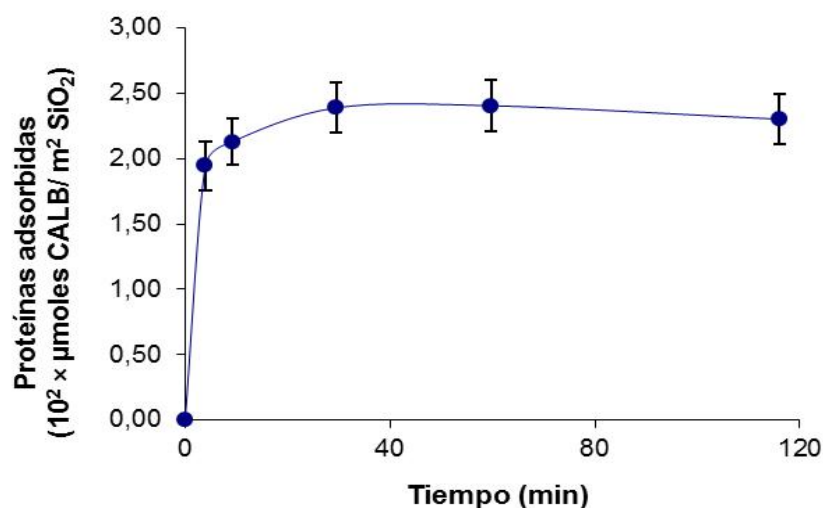


Figura 1. Proteínas adsorbidas sobre SiO₂ en función del tiempo a 30 °C.

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos en la dispersión de la lipasa sobre SiO₂ a partir de distintas soluciones de proteína a 30 °C.

Tabla 1. Concentraciones iniciales **C_i** y finales **C_f** de proteína de las soluciones utilizadas en diversas preparaciones, cantidad de proteínas adsorbidas sobre 100,0 mg de SiO₂ (mg %) y por unidad de área de soporte (μmoles/m²) y rendimiento de la adsorción.

| Sistema | C _i | C _f | Proteína adsorbida | Rendimiento | |
|---------------|----------------|----------------|--------------------|-------------|------|
| Biocatalítico | (mg/mL) | (mg/mL) | (mg %) | (%) | |
| A | 0,78 | 0,10 | 13,47 | 0,013 | 86,6 |
| B | 1,05 | 0,20 | 17,03 | 0,017 | 80,7 |
| C | 1,14 | 0,20 | 18,56 | 0,018 | 82,8 |
| D | 1,25 | 0,32 | 18,94 | 0,019 | 68,6 |
| E | 1,36 | 0,23 | 22,56 | 0,022 | 82,9 |
| F | 1,45 | 0,27 | 23,53 | 0,023 | 81,2 |
| G | 1,49 | 0,37 | 22,41 | 0,022 | 77,8 |
| H | 1,55 | 0,41 | 22,86 | 0,023 | 73,7 |
| I | 1,61 | 0,38 | 24,73 | 0,025 | 76,7 |
| J | 1,70 | 0,42 | 25,71 | 0,026 | 75,5 |

Se observó un aumento en la cantidad de CALB adsorbida al aumentar la concentración inicial de proteínas. Por otra parte, el rendimiento, calculado como porcentaje de proteínas adsorbidas en relación al total de las mismas expuestas al soporte, fue, en todas las preparaciones, muy elevado.

3.2. Resolución cinética de ibuprofeno

En la Figura 2 se muestran los valores de conversión (%X) y exceso enantiomérico (eeS%) hacia el *S*-ibuprofeno obtenidos en la esterificación del profeno con etanol utilizando el sistema CALB/SiO₂ B.

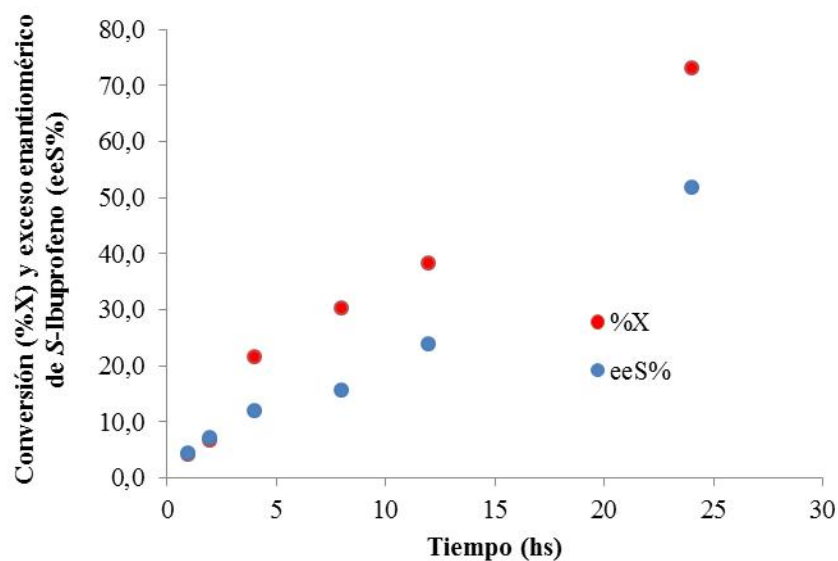


Figura 2. Porcentaje de conversión %X (●) y exceso enantiomérico de *S*-ibuprofeno (eeS%) (●) en función del tiempo de reacción.

Se observa que hubo un aumento en el porcentaje de conversión al aumentar el tiempo de actividad, llegando a alcanzar valores cercanos al 70% a las 24 horas de reacción. El exceso enantiomérico aumentó hasta valores superiores al 50%.

En la Figura 3 se muestran los valores de actividad enzimática en micromoles de ibuprofeno esterificados por minuto y eeS% obtenidos usando los sistemas A, B, E, G, H y J a un tiempo de reacción de 24 hs.

Se observa que cuando la cantidad de proteínas adsorbidas aumenta de 0,013 a 0,017 $\mu\text{moles}/\text{m}^2$ también aumentan la actividad y el exceso enantiomérico. Sin embargo, en valores de proteínas adsorbidas mayores a 0,020 $\mu\text{moles}/\text{m}^2$ estos parámetros parecen alcanzar un máximo.

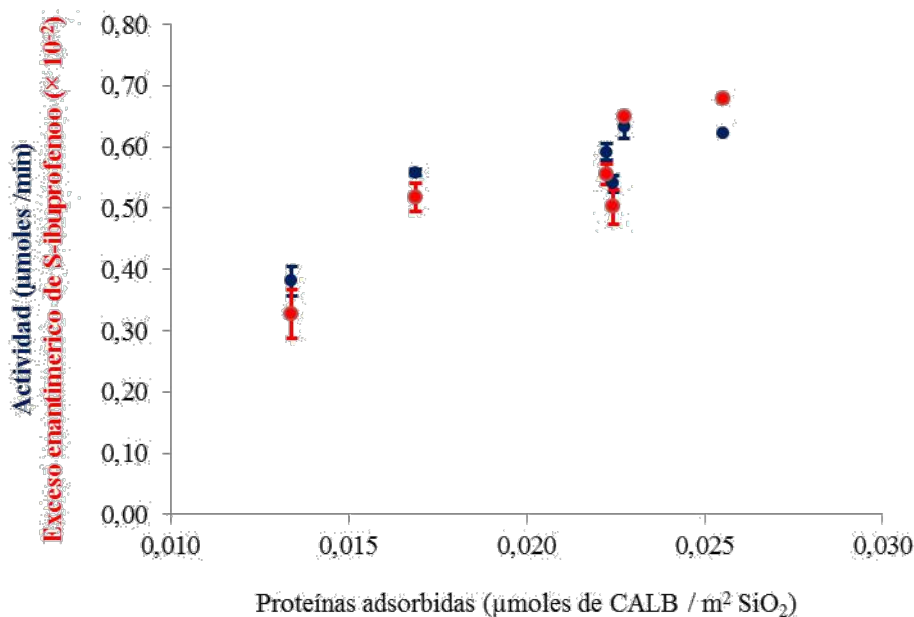


Figura 3. Actividad catalítica (●) y exceso de enantiomérico de *S*-ibuprofeno versus proteínas adsorbidas (●) para 24 hs de reacción a 45 °C.

3.3. Efecto del almacenamiento

Se estudió la estabilidad de los biocatalizadores después de más de 7 meses de almacenamiento a 4°C. En este contexto, se determinó la actividad inicial de los biocatalizadores y después de 220 días de almacenamiento. Los sistemas utilizados en este ensayo fueron el A, B, G y J.

A partir de los valores de actividad se calculó el porcentaje de pérdida de actividad en ese lapso de tiempo con la ecuación (1):

$$\% \text{ Pérdida de actividad} = \frac{(A_0 - A_{220}) \times 100}{A_0} \quad (1)$$

donde A_0 y A_{220} son los valores de actividad inicial y después de 220 días de preparados, respectivamente.

En la Figura 4 se presenta la pérdida de actividad en función de las proteínas adsorbidas en cada biocatalizador.

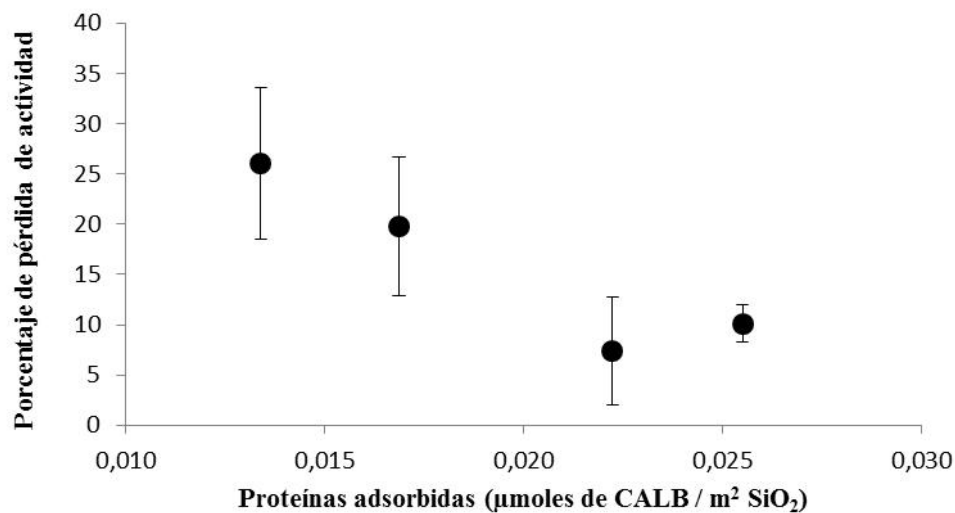


Figura 4. Porcentaje de actividad perdida frente a la cantidad de proteínas adsorbidas después de un almacenamiento del biocatalizador de 220 días.

Se puede observar que a medida que aumenta la cantidad de proteínas adsorbidas, el porcentaje de actividad que se pierde es menor, hasta aproximadamente $0,020 \mu\text{moles}/\text{m}^2 \text{SiO}_2$, cuando el porcentaje de pérdida llega a un 7% aproximadamente.

4. Discusión

A partir de lo observado en la Figura 1, se pudo establecer que el tiempo óptimo para la inmovilización es de alrededor de 30 minutos. Como se ve en la Tabla 1, la carga proteica en los biocatalizadores aumenta conforme aumenta la concentración inicial en las soluciones, llegando a una máxima dispersión de proteína sobre dióxido de silicio de $(0,024 \pm 0,002) \mu\text{moles}/\text{m}^2$ ($(240 \pm 20) \text{mg}/\text{g}$). Dicha carga proteica, resultó ser significativamente mayor a lo informado en distintos trabajos publicados previamente en los que también se describe la inmovilización de CALB sobre distintos soportes basados en sílice. Cruz y colaboradores en 2009, usando sílice pirogénica obtuvieron biocatalizadores con $111 \text{mg}/\text{g}$ [18]. Serra y colaboradores, en 2010, reportaron que la carga proteica alcanzada sobre sílice mesoporosa ordenada (SBA-15) estuvo entre 23 y $44 \text{mg}/\text{g}$ de soporte, en sílice mesoporosa periódica fue de $90 \text{mg}/\text{g}$, usando sílice amorfa $45 \text{mg}/\text{g}$ y sólo usando sílice amorfa modificada lograron cargas entre 200 y $400 \text{mg}/\text{g}$, valores similares o un poco mayores a los obtenidos en el presente trabajo [9]. En 2014, Shang y colaboradores resaltan la carga enzimática lograda en soportes de nanocables de ZnO en sílica macroporosa, habiendo alcanzado $197 \text{mg}/\text{g}$ [30]. Menor a $10 \text{mg}/\text{g}$ fue la carga obtenida por los grupos de Gandomkar en 2015 [28] y Mittersteiner en 2017 [29] al inmovilizar CALB en sílica epoxi-funcionalizada y sílica gel,

respectivamente. La carga enzimática alcanzada también fue superior a la conseguida por nuestro grupo de investigación al inmovilizar CALB sobre un soporte de TiO₂ nanoestructurado [32]. La alta carga enzimática se relaciona con la gran área superficial del material nanoestructurado. Por otra parte, es destacable que los mismos se logran mediante un procedimiento rápido y simple que no requiere modificaciones de la enzima y/o soporte a diferencia de lo descrito en otras publicaciones.

Con respecto a la actividad de los biocatalizadores preparados se observó que llegan a un máximo cuando sobrepasan una carga proteica de alrededor de 20 mg/100 mg (0,02 $\mu\text{moles}/\text{m}^2$). El hecho de que una mayor cantidad de enzimas adsorbidas no produzca un incremento en la actividad se podría explicar si se supone que una vez cubierta la superficie del soporte las enzimas se adsorben en multicapas bloqueando el acceso de la totalidad de las lipasas a los sustratos del medio. Otra explicación para este comportamiento podría ser una limitación difusional de los sustratos, en cuyo caso la actividad estaría condicionada por la velocidad con la que los sustratos llegan hasta la enzima inmovilizada [25].

A partir del cálculo de la actividad específica (AE) se puede establecer cuáles biocatalizadores son los más eficientes en la esterificación del ibuprofeno. La AE queda definida en unidades internacionales (UI), como μmoles de ibuprofeno convertidos por minuto por mg de proteínas adsorbidas en cada ensayo. La AE máxima fue de 0,192 UI cuando se utilizó el sistema CALB/SiO₂ B, en el cual se adsorbieron 17,03mg de proteínas en 100,0 mg de soporte.

El mejor resultado de actividad obtenido en estos estudios preliminares, se consiguió con el sistema H (228,6 mg/g) a las 24hs y tuvo un %X de 76 y eeS% de 65%. Este valor de conversión permite calcular una productividad [37] de 0,633 micromoles de ibuprofeno convertido por minuto ($\mu\text{mol}/\text{min}$) en las condiciones de la mezcla de reacción. Dicha productividad posiciona al biocatalizador preparado entre los mejores que se han descrito en bibliografía usando CALB como fuente enzimática en la esterificación de ibuprofeno. En comparación, usando distintas cantidades de Novozym®435, José y colaboradores en 2014 alcanzaron 0,47 $\mu\text{mol}/\text{min}$ [43]; Foresti y colaboradores en 2009, 0,35 $\mu\text{mol}/\text{min}$ [38]; mientras el grupo de Carvalho en 2006 0,13 $\mu\text{mol}/\text{min}$ [42]. Si comparamos el valor de actividad específica (por mg de biocatalizador) el biocatalizador preparado se destaca aún más ya que la masa usada en los ensayos es mucho menor.

5. Conclusiones

En el presente trabajo se obtuvieron biocatalizadores compuestos por la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) inmovilizada en un soporte nanoestructurado de SiO₂. Mediante adsorción simple se alcanzó una alta carga enzimática en menos de 30 minutos de contacto.

Los biocatalizadores preparados presentaron una importante actividad en las reacciones de esterificación de ibuprofeno con etanol en los medios de reacción utilizado a tiempos de reacción relativamente cortos y con niveles aceptables de enantioselectividad.

Se optimizó el biocatalizador en cuanto al contenido enzimático en los mismos observando que por aumentarlo por encima de 0,02 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ no produce mayores niveles de actividad.

Por último, se comprobó que los biocatalizadores resultaron muy estables después de varios meses de almacenamiento a 4 °C.

Dados los resultados obtenidos en los ensayos de actividad, estabilidad y el cálculo de AE, se concluye que los mejores biocatalizadores serán aquellos con una carga de alrededor de 22 mg/100mg (0,022 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$).

Estos ensayos preliminares resultan auspiciosos para continuar el estudio de este tipo de biocatalizadores con el fin de ser utilizarlos a nivel industrial en la resolución de los isómeros del ibuprofeno.

Referencias

- [1] M.L. Verma, C.J. Barrow, M. Puri, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2013**, 97 (1), 23–39
- [2] P. Wang, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2009**, 152 (2), 343–352.
- [3] W. Shuai, R.K. Das, M. Naghdi, S.K. Brar, M. Verma, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **2017**, 64 (4), 496–508.
- [4] J. Kim, J.W. Grate, P. Wang, *Chemical Engineering Science*, **2006**, 61 (3), 1017–1026.
- [5] S.A. Ansari, Q. Husain, *Biotechnology Advances*, **2012**, 30 (3), 512–523.
- [6] Z. Knezevic, S. Siler-Marinkovic, L. Mojovic, *Acta Periodica Technologica*, **2004**, 280 (35), 151–164.
- [7] A.A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato, *Journal of Chemical Biology*, **2013**, 6 (4), 185–205.
- [8] E. Serra, A. Mayoral, Y. Sakamoto, R.M. Blanco, I. Díaz, *Microporous and Mesoporous Materials*, **2008**, 114 (1–3), 201–213.
- [9] E. Serra, E. Díez, I. Díaz, R.M. Blanco, *Microporous and Mesoporous Materials*, **2010**, 132 (3), 487–493.

- [10] J. Forde, A. Vakurov, T.D. Gibson, P. Millner, M. Whelehan, I.W. Marison, C. Ó'Fágáin, *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2010**, 66, 203–209.
- [11] M. Nikolić, V. Srdić, M. Antov, *Biocatalysis and Biotransformation*, **2009**, 27 (4), 254–262
- [12] S. Gao, Y.J. Wang, X. Diao, G.S. Luo, Y.Y. Dai, *Bioresource Technology*, **2010**, 101, 3830–3837.
- [13] B. Zou, Y. Hu, D. Yu, J. Xia, S. Tang, W. Liu, H. Huang, *Biochemical Engineering Journal*, **2010**, 53, 150–153.
- [14] T. Itoh, R. Ishii, S. Matsuura, J. Mizuguchi, S. Hamakawa, T.A. Hanaoka, T. Tsunoda, F. Mizukami, *Colloids and Surfaces*, **2010**, B 75, 478–482.
- [15] S.I. Matsuura, R. Ishii, T. Itoh, S. Hamakawa, T. Tsunoda, T. Hanaoka, F. Mizukami, *Chemical Engineering Journal*, **2011**, 167, 744–749.
- [16] Z. Zhou, M. Hartmann, *Topics in Catalysis*, **2012**, 55 (16–18), 1081–1100.
- [17] H. Gustafsson, E.M. Johansson, A. Barrabino, M. Odén, K. Holmberg, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2012**, 100, 22–30.
- [18] J.C. Cruz, P.H. Pfomm, M.E. Rezac, *Process Biochemistry*, **2009**, 44 (1), 62–69.
- [19] S.S. Dhiman, D. Kalyani, S.S. Jagtap, J.R. Haw, Y.C. Kang, J.K. Lee, *Applied Microbiology Biotechnology*, **2013**, 97, 1081–1091.
- [20] S.S. Dhiman, S.S. Jagtap, M. Jeya, J.R. Haw, Y.C. Kang, J.K. Lee, *Biotechnology Letters*, **2012**, 34, 1307–1313.
- [21] V. Dandavate, H. Keharia, D. Madamwar, *Process Biochemistry*, **2009**, 44, 349–352.
- [22] Y.H. Deng, D. Qi, C. Deng, X. Zhang, D. Zhao, *Journal of the American Chemical Society*, **2008**, 130, 28–29.
- [23] H. Kim, H.S. Kwon, J. Ahn, C.H. Lee, I.K. Ahn, *Biocatalysis and Biotransformation*, **2009**, 27, 246–253.
- [24] D.T. Tran, C.L. Chen, J.S. Chang, *Journal of Biotechnology*, **2012**, 158, 112–119.
- [25] C. Forsyth, S.V. Patwardhan, *Journal of Material Chemistry*, **2013**, B 1, 1164–1174.
- [26] O. Kirk, M.W. Christensen, *Organic Process Research and Development*, **2002**, 6 (4), 446–451.
- [27] L. dos Reis-Costa, A.M. Soares, S.C. França, H.C. Trevisan, T.J. Roberts, *Protein and Peptide Letters*, **2002**, 10, 619–628.
- [28] S. Gandomkar, Z. Habibi, M. Mohammadi, M. Yousefi, S. Salimi, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **2015**, 4, 550–554.
- [29] M. Mittersteiner, B.L. Linshalm, A.P.F. Vieira, P.B. Brondani, D.R. Scharf, P.C. de Jesus, *Chirality*, **2018**, 30, 106–111.
- [30] C.Y. Shang, W.X. Li, R.F. Zhang, *Enzyme and Microbial Technology*, **2014**, 61–62, 28–34.
- [31] M. Mittersteiner, T.M. Machado, P.C. de Jesus, P.B. Brondani, D.R. Scharf, R. Wenhausen Jr., *Journal Brazilian Chemical Society*, **2017**, 28 (7), 1185–1192.
- [32] C.R. Llerena Suster, M.V. Toledo, A. Fittipaldi, S.R. Morcelle, L.E. Briand, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2017**, 92, 2870–2880.

- [33] E. Anderson, K.M. Larsson, O. Kirk, *Biocatalysis and Biotransformation*, **1998**, 16, 181–204.
- [34] J. Flórez, *Farmacología Humana*, 3° Ed., Ediciones Científicas y técnicas, Barcelona, **1998**.
- [35] C. Jose, C. Resolución biocatalica de enantiomeros del ibuprofeno. Tesis Doctoral. (2013) CINDECA. Fac de Cs. Exactas. UNLP.
- [36] A.M. Evans, *Clinical Rheumatology*, **2001**, 20, 9–14.
- [37] P.O. Carvalho, Q.B. Cass, S.A. Calafatti, F.J. Contesini, R. Bizaco, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **2006**, 23 (3), 291–300.
- [38] M.L. Foresti, M. Galle, M.L. Ferreira, L.E. Briand, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2009**, 84, 1461-1473.
- [39] C. José, M.V. Toledo, L.E. Briand, *Critical Reviews in Biotechnology*, **2015**, 8551, 1–13.
- [40] P.O. Carvalho, F.J. Contesini, M. Ikegaki, *Brazilian Journal of Microbiology*, **2006**, 37 (3), 329-337.
- [41] C. José, M.V. Toledo, J.O. Grisales, L.E. Briand, *Current Catalysis*, **2014**, 3 (2), 131–138.
- [42] F.J. Contesini, P.O. Carvalho, *Tetrahedron Asymmetry*, **2006**, 17, 2069–2073.
- [43] P.O. Carvalho, F.J. Contesini, R. Bizaco, S.A. Calafatti, G.A. Macedo, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **2006**, 33, 713.
- [44] A. Ducret, M. Trani, P. Pepin, R. Lortie, *Biotechnology Techniques*, **1995**, 9, 591–6.
- [45] M. Trani, A. Ducret, P. Pepin, R. Lortie, *Biotechnology Letters*, **1995**, 17, 1095–1098.
- [46] P. Pepin, R. Lortie, *Biotechnology and Bioengineering*, **1999**, 63, 502–5.
- [47] F. Ergan, M. Trani, R. Lortie, *Annals of the New York Academy of Science Enzyme Engineering XII*, **2006**, 750, 228–31.
- [48] M.M. Bradford, *Analytical Biochemistry*, **1976**, 72, 248-254.
- [49] C.R. Llerena Suster, L.E. Briand, S.R. Morcelle, *Colloids and Surfaces B: Biointerface*, 2014, 121, 11-20.