



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

ROZPRAWA DOKTORSKA

Bydgoszcz 2023



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Joanna Chałupka

**Enancjoselektywna biotransformacja wybranych substancji
czynnych z zastosowaniem cieczy jonowych**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Promotor:

Prof. dr hab. n. farm. Michał Piotr Marszał

Bydgoszcz 2023

*Promotorowi niniejszej pracy
Panu Profesorowi dr hab. Michałowi Piotrowi Marszałł
składam serdeczne podziękowania za nieocenioną
pomoc merytoryczną oraz wieloletnią opiekę naukową*

SPIS TREŚCI

FINANSOWANIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	6
PUBLIKACJE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	7
SŁOWA KLUCZOWE	8
KEYWORDS.....	8
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	9
WSTĘP	11
1. IZOMERIA	13
2. CHIRALNOŚĆ SUBSTANCJI CZYNNYCH	15
3. ENZYMATYCZNY ROZDZIAŁ KINETYCZNY JAKO METODA OTRZYMYWANIA CHIRALNIE CZYSTYCH ZWIĄZKÓW	20
4. ENZYMY	24
4.1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ENZYMÓW - BUDOWA I DZIAŁANIE 24	
4.2. KLASYFIKACJA I NOMENKLATURA ENZYMÓW	29
4.3. KINETYKA REAKCJI ENZYMATYCZNYCH.....	31
4.4. INHIBICJA ENZYMÓW ORAZ PRAKTYCZNE ZNACZENIE INHIBITORÓW.....	34
4.5. BIODOKATALIZA.....	36
4.6. LIPAZY	38
4.6.1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA	38
4.6.2. RODZAJE LIPAZ	39
4.6.3. REAKCJE KATALIZOWANE PRZEZ LIPAZY	41
4.6.4. ZASTOSOWANIE LIPAZ W ROZDZIALE RACEMATÓW.....	41
5. CIECZE JONOWE	43
5.1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA.....	43
5.2. METODY OTRZYMYWANIA CIECZY JONOWYCH	44
5.3. PODZIAŁ I BUDOWA CIECZY JONOWYCH.....	45
5.4. ZASTOSOWANIE CIECZY JONOWYCH	50
5.5. CIECZE JONOWE W ROZDZIELE KINETYCZNYM RACEMATÓW	52
6. PARAMETRY OPISUJĄCE ENANCJOSELEKTYWNOŚĆ REAKCJI.....	53
6.1. NADMIAR ENANCJOMERYCZNY	53
6.2. ENANCJOSELEKTYWNOŚĆ	54
6.3. KONWERSJA	55
7. CEL PRACY	56

8.	WYNIKI I Dyskusja Wyników	57
8.1.	Enzymatyczna enancjoselektywna biotransformacja chiralnych substancji aktywnych na przykładzie leków wykorzystywanych w terapii nadciśnienia [P1]	57
	Kopia pracy [P1]	59
8.2.	Zastosowanie dwufazowych układów katalitycznych w enancjoselektywnej biotransformacji racemicznego atenololu	69
	Kopia pracy [P2]	74
8.3.	Zastosowanie dwufazowych systemów katalitycznych w enancjoselektywnym rozdziale (<i>R,S</i>)-1-fenyletanolu	86
	Kopia pracy [P3]	90
8.4.	Optymalizacja enancjoselektywnej estryfikacji (<i>R,S</i>)-klopidogrelu z zastosowaniem cieczy jonowych	104
	Kopia pracy [P4]	108
9.	Wnioski	122
10.	Streszczenie	124
11.	Summary	126
12.	Literatura	128
13.	Spis rycin	136
15.	Oświadczenia współautorów o udziale w publikacjach	139
16.	Zaświadczenia o udziale w grantach	146
	Dorobek naukowy doktorantki	147

FINANSOWANIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Niniejsza rozprawa doktorska była współfinansowana ze środków grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki PRELUDIUM 14 nr: 2017/27/N/NZ7/02424.

PUBLIKACJE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

[P1]: Joanna Chalupka, Adam Sikora, A. Kozicka, Michał Piotr Marszałł. Overview: enzyme-catalyzed enantioselective biotransformations of chiral active compounds used in hypertension treatment, *Current Organic Chemistry*, 2020, Vol. 24, nr 23, s. 2782-2791. DOI: 10.2174/1385272824999201020204256

IF₂₀₂₀: 2,180; MEiN₂₀₂₀: 70

[P2]: Joanna Chalupka, Adam Sikora, Michał Piotr Marszałł. The utilization of two-phase catalytic system in enantioselective biotransformation of racemic atenolol, *Catalysts*, 2022, 12(9), 1068. DOI: 10.3390/catal12091068

IF₂₀₂₂: 4,501; MEiN₂₀₂₂: 100

[P3]: Joanna Chalupka, Jacek Dulęba, Adam Sikora, Tomasz Siódmiak, Michał Marszałł. The Application of Two-Phase Catalytic System in Enantioselective Separation of Racemic (*R,S*)-1-Phenylethanol, *Catalysts* 2023, 13(2), 292. DOI: 10.3390/catal13020292

IF₂₀₂₃: 4,501; MEiN₂₀₂₃: 100

[P4]: Joanna Chalupka, Adam Sikora, Marta Ziegler-Borowska, Michał Piotr Marszałł. Bio-approach of obtaining enantiomerically pure clopidogrel with the use of ionic liquid, *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(13), 11124. DOI: 10.3390/ijms241311124

IF₂₀₂₃: 6,208; MEiN₂₀₂₃: 140

Suma punktacji prac objętych rozprawą doktorską (zgodnie z rokiem wydania publikacji):

Impact Factor: 17,39; Punktacja MEiN: 410

SŁOWA KLUCZOWE

ciecze jonowe, biokataliza, enzymy, lipaza, rozdział kinetyczny

KEYWORDS

ionic liquids, biocatalysis, enzymes, lipase, kinetic resolution

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACE	ang. <i>Angiotensin-Converting Enzyme</i> Enzym konwertujący angiotensynę
ACS	ang. <i>Acute Coronary Syndrome</i> Ostry zespół wieńcowy
AILs	ang. <i>Aprotic Ionic Liquids</i> Aprotyczne (aprotonowe) ciecze jonowe
APIs	ang. <i>Active Pharmaceutical Ingredients</i> Aktywne składniki farmaceutyczne
C	ang. <i>Conversion</i> Konwersja
DAPT	ang. <i>Dual Antiplatelet Therapy</i> Podwójna terapia przeciwplateletowa
DKR	ang. <i>Dynamic Kinetic Resolution</i> Dynamiczny rozdział kinetyczny
[DMIM][MeSO₄]	ang. <i>1,3-dimethylimidazolium methyl sulfate</i> 1,3-dimetyloimidazoliowy metylosiarczan
E	ang. <i>Enantioselectivity</i> Enancjoselektywność
EMA	ang. <i>European Medicines Agency</i> Europejska Agencja Leków
[EMIM][BF₄]	ang. <i>1-Ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate</i> 1-Etylo-3-metyloimidazoliowy tetrafluoroboran
[EMIM][EtSO₄]	ang. <i>1-Ethyl-3-methylimidazolium ethyl sulfate</i> 1-Etylo-3-metyloimidazoliowy etylosiarczan
[EMIM][MSF₃]	ang. <i>1-Ethyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate</i> 1-Etylo-3-metyloimidazoliowy trifluorometanosulfonian
[EMIM][OTf]	ang. <i>1-Ethyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate</i> 1-Etylo-3-metyloimidazoliowy trifluorometanosulfonian
ee	ang. <i>enantiomeric excess</i> Nadmiar enancjomeryczny

EPCs	ang. <i>Enantiomerically Pure Compounds</i> Enancjomerycznie czyste związki
FDA	ang. <i>Food and Drug Administration</i> Agencja Żywności i Leków
HILs	ang. <i>Herbicial Ionic Liquids</i> Herbicydowe ciecze jonowe
[HMIM][BF₄]	ang. <i>1-Hexyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate</i> 1-Heksylo-3-metyloimidazoliowy tetrafluorofosforan
ILs	ang. <i>Ionic Liquids</i> Ciecze jonowe
IUPAC	ang. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej
KR	ang. <i>Kinetic Resolution</i> Rozdział kinetyczny
MRM	ang. <i>Multiple reaction monitoring</i> Monitorowanie reakcji wielokrotnych
NC-IUBMB	ang. <i>Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> Komitet Nomenklaturowy Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej
[OMIM][Cl]	ang. <i>1-Methyl-3-octylimidazolium chloride</i> 1-metylo-3-oktyloimidazoliowy chlorek
PILs	ang. <i>Protic Ionic Liquids</i> Protyczne (protonowe) ciecze jonowe
RTILs	ang. <i>Room Temperature Ionic Liquids</i> Ciecze jonowe o temperaturze pokojowej
TSILs	ang. <i>Task-specific Ionic Liquids</i> Ciecze jonowe do zadań specjalnych
UPLC-MS/MS	ang. <i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry</i> Ultraszybna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas

WSTĘP

W przypadku wielu substancji organicznych, w tym leków, wzór sumaryczny niewiele mówi o budowie związku, ponieważ cząsteczki mające ten sam skład atomowy mogą różnić się rozmieszczeniem poszczególnych atomów w przestrzeni, który wpływa na właściwości całej cząsteczki, a także na sposób jej oddziaływania w organizmie ludzkim. Obecnie we współczesnej farmakoterapii kładzie się istotny nacisk na stosowanie w leczeniu pojedynczych enancjomerów, ponieważ pozwala to na optymalizację efektu klinicznego, a także umożliwia zmniejszenie częstości i natężenie działań niepożądanych. Z uwagi na fakt, iż enancjomery leków są wzajemnymi odbiciami lustrzanymi różnią się przestrzennym ułożeniem atomów w swoich cząsteczkach przez co mogą wykazywać odrębne właściwości farmakokinetyczne, farmakodynamiczne, a także różny profil działań niepożądanych. Należy przy tym podkreślić, iż wiele substancji czynnych jest komercyjnie dostępne w produktach leczniczych w formie racematów, a nie czystych enancjomerów, co może skutkować większą ilością i intensywnością występowania działań niepożądanych, a także koniecznością przyjmowania większej dawki leku.

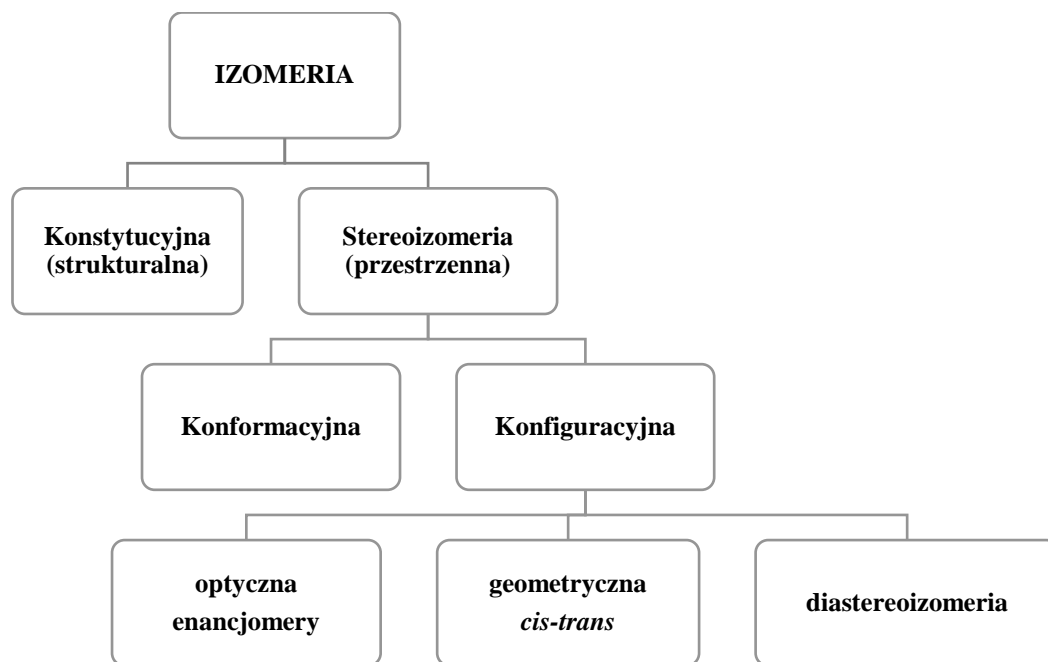
Jedną z metod umożliwiających otrzymanie czystego enancjomeru jest enzymatyczny rozdział kinetyczny. W tym celu przeprowadza się stereoselektywną biotransformację racematu w obecności lipazy pełniącej funkcję enancjoselektywnego biokatalizatora. Środowisko reakcji jest jednym z najistotniejszych czynników wpływających na efektywność i enancjoselektywność prowadzonej biotransformacji. Analiza danych literaturowych wskazuje, iż najczęściej w enancjoselektywnej estryfikacji katalizowanej przez lipazy wykorzystuje się organiczne rozpuszczalniki pełniące funkcję środowiska reakcji. Należy jednak zauważyć, iż rozpuszczalność racemicznych substancji czynnych jest często ograniczona w rozpuszczalnikach organicznych takich jak: acetonitryl, toluen czy dichlorometan. Z kolei zastosowanie alkoholi takich jak: metanol, etanol czy izopropanol wyklucza użycie lipaz z uwagi na ryzyko ich denaturacji. Dodatkowo, organiczne rozpuszczalniki wykazują negatywny wpływ na środowisko z uwagi na wysoką toksyczność i trudności związane z ich bezpieczną utylizacją. W związku z powyższym zastosowanie cieczy jonowych w rozdziałach kinetycznych racematów wydaje się być uzasadnioną próbą niwelowania negatywnych skutków wywołanych przez obecność organicznych rozpuszczalników. Dlatego zastosowanie cieczy jonowych w połączeniu z organicznymi rozpuszczalnikami nie tylko redukuje ilość toksycznych rozpuszczalników w mieszaninie reakcyjnej, ale także tworzy układ dwufazowy, który fizycznie rozdziela od siebie substraty

i produkty od białkowych katalizatorów. W efekcie zastosowanie dwufazowego układu katalitycznego zawierającego ciecz jonowe umożliwia łatwą separację enzymu ze środowiska reakcji i ponowne jego wykorzystanie w innych biotransformacjach co korzystnie wpływa na środowisko oraz jest w zgodzie z zasadami „zielonej chemii”.

Obszar tematyczny niniejszej rozprawy doktorskiej obejmuje ocenę wpływu cieczy jonowych na enancjoselektywne biotransformacje różnych racemicznych substancji powszechnie stosowanych w syntezie farmaceutycznej oraz w leczeniu. Wykonane badania naukowe skupiają się na zastosowaniu lipaz w rozdzielaczach kinetycznych (*R,S*)-atenololu, (*R,S*)-1-fenyletanolu oraz kwasu karboksylowego (*R,S*)-klopidogrelu w dwufazowych układach katalitycznych zawierających ciecz jonowe. W ramach przeprowadzonych badań porównano aktywność katalityczną testowanych lipaz w zaproponowanych biotransformacjach oraz zestawiono parametry opisujące zrealizowane rozdzielacze kinetyczne, takie jak: enancjoselektywność, konwersję i nadmiar enancjomeryczny substratów oraz produktów. Przeprowadzone badania naukowe stanowiły próbę połączenia nauk farmaceutycznych z biotechnologią. Z kolei efektem wykonanych badań było otrzymanie enancjomerycznie czystych substancji, które mogą zostać wykorzystane w przemyśle farmaceutycznym oraz przyczynią się do redukcji działań niepożądanych i poprawy *compliance* pacjenta.

1. IZOMERIA

Izomeria jest zjawiskiem polegającym na występowaniu związków chemicznych, które posiadają identyczny skład atomowy, jednak różnią się sposobem powiązania ze sobą tych atomów. Izomery posiadają ten sam wzór sumaryczny, ale inny wzór strukturalny oraz różnią się między sobą właściwościami chemicznymi i fizycznymi. W oparciu o tę definicję możliwych jest kilka rodzajów izomerii (**Rycina 1**).

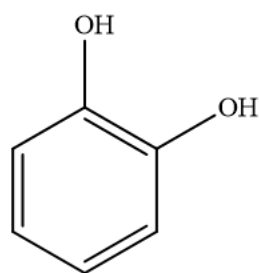


Rycina 1 Rodzaje izomerii

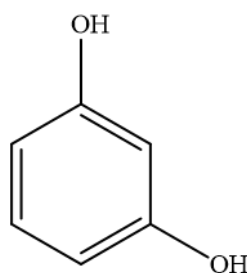
Wyróżniamy dwa podstawowe rodzaje izomerii cząsteczek organicznych:

- izomeria konstytucyjna (izomeria strukturalna);
- stereoizomeria (izomeria przestrzenna).

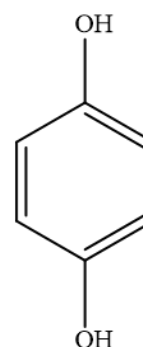
Izomery konstytucyjne to cząsteczki o takim samym składzie atomowym, ale różnych układach wiązań między atomami, co ilustrują przykłady katecholu, rezorcynolu i hydrochinonu (**Rycina 2**).



Katechol



Rezorcyrol



Hydrochinon

Rycina 2 Izomery konstytucyjne [1]

Wszystkie te związki mają ten sam skład atomowy ($C_6H_6O_2$), ale różne układy wiązań atomów, a zatem są odrębnymi jednostkami chemicznymi o różnych właściwościach chemicznych i fizycznych. Z kolei stereoizomery mają taką samą kolejność i sposób połączenia atomów, ale różnią się rozmieszczeniem atomów (lub grup atomów) w przestrzeni i te różne orientacje atomów nie mogą swobodnie wzajemnie się przekształcać przez rotację wiązań [2].

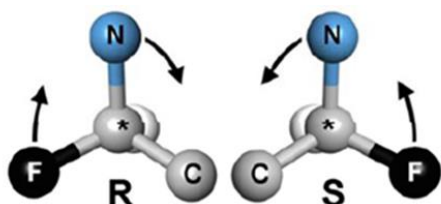
Położenie atomów w przestrzeni wynikające z obrotu wewnętrznego (rotacji) wokół wiązań pojedynczych węgiel-węgiel to konformacja. Cząsteczki różniące się konformacjami nazywamy izomerami konformacyjnymi. Rozmieszczenie atomów w przestrzeni to konfiguracja cząsteczki. Cząsteczki różniące się konfiguracją są izomerami konfiguracyjnymi. Stereoizomery konfiguracyjne są podzielone na podkategorie jako izomery optyczne (enancjomery) (**Rycina 3**) lub izomery geometryczne (*cis-trans*) lub diastereoizomery. Szczególną formą stereoizomerii jest izomeria konfiguracyjna (optyczna), która daje początek zjawisku chiralności [1-3].



Rycina 3 Izomery optyczne – enancjomery [1]

2. CHIRALNOŚĆ SUBSTANCJI CZYNNYCH

Chiralność można zdefiniować jako potencjał cząsteczki do występowania w dwóch asymetrycznych formach, które są nienakładającymi się wzajemnymi odbiciami lustrzanymi bez zmiany składu atomowego, połączeń atom-atom lub rzędów wiązań. Najczęstszą przyczyną chiralności w cząsteczce organicznej jest obecność atomu węgla związanego z czterema różnymi grupami. Takie atomy węgla określa się jako centra chiralności, chociaż stosuje się inne terminy, takie jak centrum stereogeniczne lub centrum asymetryczne [4]. Zjawisko to na ogół występuje z powodu różnicy w trójwymiarowej orientacji czterech różnych podstawników przyłączonych do jednego centralnego atomu, tworząc coś, co można uznać za lewą i prawą wersję tej samej cząsteczki. Te dwie wersje cząsteczki nazywane są enancjomerami. W celu rozróżnienia obu enancjomerów stosuje się system Cahna-Ingolda-Preloga lub notację *R/S* (**Rycina 4**), zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC, ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) [5]. Notacja D/L stosowana dla aminokwasów i cukrów jest ograniczona do tych dwóch typów cząsteczek, przy czym notacja D/L oznacza prawoskrętną (zgodnie z ruchem wskazówek zegara) i lewoskrętną (przeciwną do ruchu wskazówek zegara) rotację optyczną światła spolaryzowanego. Ta konwencja nie jest obecnie w powszechnym użyciu, ponieważ została zastąpiona notacją *R/S* dla chiralności i notacją +/- dla rotacji optycznej [6]. W celu rozróżnienia par enancjomerów stosuje się oznaczenia *R* (rectus) i *S* (sinister) [7].



Rycina 4 Konformacje *R/S* [7]

Dwie cząsteczki, których nie można nałożyć na siebie w lustrzanym odbiciu, nazywane są wzajemnymi enancjomerami. Związek zawierający tylko jeden rodzaj enancjomeru nazywany jest związkiem enancjomerycznie czystym lub homochiralnym. Natomiast jeśli związek zawiera równą ilość dwóch enancjomerów cząsteczki chiralnej, nazywa się racematem lub mieszaniną racemiczną, która nie może skręcać światła spolaryzowanego w płaszczyźnie. Niektóre cząsteczki mogą mieć więcej niż jedno centrum stereogeniczne. Jeśli cząsteczka ma „*n*” ilość centrów stereogenicznych, liczba stereoisomerów wynosi n^2 . Cząsteczki, które są stereoisomerami, ale nie są wzajemnymi enancjomerami, nazywane są diastereoizomerami.

Tego rodzaju izomerów nie można na siebie nałożyć i nie są one lustrzanymi odbiciami. Również ich właściwości fizyczne lub chemiczne są różne [4].

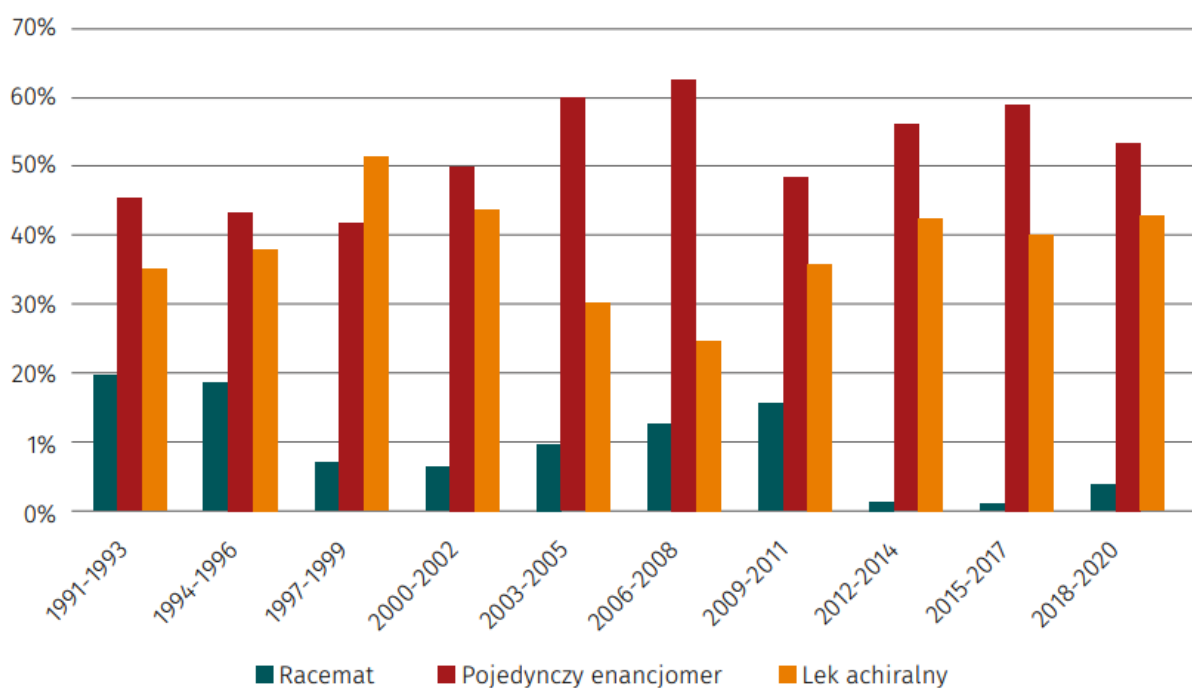
Enancjomery są zwykle opisywane jako związki mające identyczne właściwości fizyczne w środowiskach achiralnych, z wyjątkiem skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego. W rzeczywistości światło spolaryzowane w płaszczyźnie składa się z lewoskrętnych i prawoskrętnych składowych światła spolaryzowanego kołowo, które jest chiralne, a zjawisko rotacji optycznej wynika z niewielkich różnic w sposobie, w jaki cząsteczki chiralne oddziałują z tymi składnikami [7].

Chiralność substancji farmaceutycznych jest ważnym aspektem w badaniach nad lekami, ponieważ określa, w jaki sposób enancjomery będą oddziaływać z chiralnymi celami biologicznymi. Enancjomery leku chiralnego mogą mieć różne profile farmakokinetyczne i farmakologiczne, w konsekwencji zastosowanie pojedynczego czystego enancjomeru zamiast racematu może zwiększyć skuteczność i bezpieczeństwo leczenia. Tendencje współczesnego przemysłu farmaceutycznego dotyczące obecnego rynku leków chiralnych coraz częściej dążą do zamiany dotychczas stosowanych racematów i rozwoju nowych enancjomerycznie czystych leków. Zastąpienie na rynku wcześniej zatwierdzonego racematu jego wersją pojedynczego enancjomeru daje potencjalne zalety związane z wyższym indeksem terapeutycznym ze względu na lepszą siłę działania, selektywność i mniej działań niepożądanych, szybszy początek działania i narażenie pacjenta na mniejsze dawki leku. W każdym przypadku decyzja o zastosowaniu pojedynczego enancjomeru lub mieszaniny enancjomerów danego leku powinna być podjęta na podstawie danych z badań klinicznych i ekspertyzy klinicznej [7, 8].

Z punktu widzenia stereochemii leki można podzielić na achiralne, racemiczne i enancjomeryczne. Około 50% stosowanych obecnie w terapii małych cząsteczek to cząsteczki chiralne, zawierające co najmniej jedno centrum asymetrii w swojej strukturze, jednak ich zdecydowana większość sprzedawana jest w postaci racematów, a tylko około 25% w postaci czystych enancjomerów [9-11]. W dziedzinie farmaceutyków chiralnych punktem zwrotnym był rok 1992, kiedy to Agencja ds. Żywności i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) wydała oświadczenie polityczne dotyczące rozwoju i zatwierdzania leków chiralnych; polityka przyjmuje raczej surowe podejście do leków chiralnych, oferując szczegółowe wytyczne dotyczące ich oceny [7, 12]. Podobną politykę przyjęła później w 1994 roku Europejska Agencja Leków (EMA, ang. *European Medicines Agency*). Obie agencje regulacyjne wskazały zasady, które wyraźnie określają, że należy dążyć do opracowania enancjomerycznie czystego leku. Obecne przepisy nadal pozostawiają otwarte drzwi do produkcji racematów, o ile istnieją dowody na to, że podawanie racematu prowadzi do korzyści

terapeutycznych w porównaniu z pojedynczym enancjomerem. Wiele chiralnych leków jest nadal stosowanych klinicznie jako racematy, chociaż udowodniono, że profile farmakokinetyczne i farmakologiczne enancjomerów są różne. W większości przypadków za pożądany efekt farmakologiczny jest odpowiedzialny jeden z enancjomerów, zwany eutomerem, podczas gdy drugi enancjomer, zwany distomerem, może być nieaktywny, mniej aktywny lub w niektórych przypadkach może odpowiadać za występowanie dodatkowych działań niepożądanych [9, 13].

Enancjomerycznie czysty lek to substancja występująca w postaci czystego enancjomeru. Zastosowanie czystych enancjomerów w terapii jest nadal w niektórych przypadkach ograniczone pracochłonnością procesu syntezy enancjoselektywnej, wysokimi kosztami czystych enancjomerów oraz trudnościami w opracowaniu skutecznych enancjoselektywnych metod ich analizy [14]. Niewątpliwie udział enancjomerów w terapii farmakologicznej stale rośnie, a znaczna liczba zatwierdzonych przez FDA leków oparta jest na pojedynczych enancjomerach. Na **Rycinie 5** przedstawiono liczbę leków dopuszczonych w ciągu roku przez FDA według trzech wybranych kategorii (pojedyncze enancjomery, racematy i leki achiralne) w latach 1991–2020 [15-17]. Można zauważyć, że w ciągu ostatnich 10 lat FDA zatwierdziła mniej niż 10 leków w postaci racematów, a zdecydowana większość dopuszczonych substancji miała postać czystych enancjomerów [18].



Rycina 5 Leki dopuszczone do obrotu w latach 1991-2020 z wyłączeniem leków biologicznych [19]

W ciągu ostatnich dwóch dekad, oprócz wprowadzenia do terapii nowych czystych enancjomerów, dokonano ponownej oceny kilku „starych” racematów w celu zastąpienia ich czystymi enancjomerami [20]. Pod koniec lat 90. i na początku XXI wieku popularny stał się termin „przełącznik chiralny” ang. *Chiral Switch*, który odnosi się do zastąpienia chiralnego leku stosowanego w postaci racematu jego eutomerem. Zjawisko „przełączania chiralnego” doprowadziło do pojawienia się na rynku farmaceutycznym leków dostępnych jednocześnie zarówno w postaci czystych enancjomerów, jak i racematów [21, 22]. Potencjalne korzyści terapeutyczne strategii chiralnej zamiany są związane z poprawą indeksu terapeutycznego poprzez zwiększenie selektywności i siły działania w stosunku do receptorów, zmniejszenie działań niepożądanych, zmniejszenie międzyosobniczej zmienności odpowiedzi terapeutycznej, zmniejszenie podawanych dawek, poprawę profilu farmakokinetycznego i zmniejszenie liczby interakcji lekowych [20, 23, 24]. **Tabela 1** przedstawia korzyści terapeutyczne stosowania czystych enancjomerów w kilku udanych procesach zamiany chiralnej.

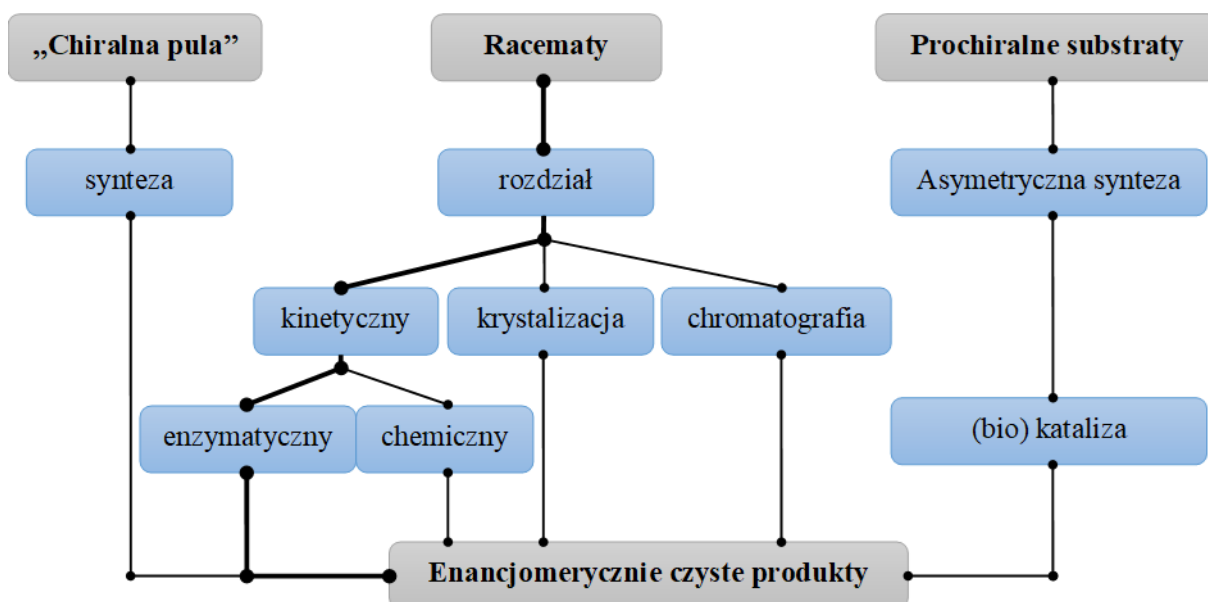
Tabela 1 Przykłady potencjalnych zalet zastosowania zamiany chiralnej [18]

Lp	Racemat	Aktywny enancjomer	Potencjalna korzyść terapeutyczna
1	Albuterol	Lewalbuterol	Zwiększona siła działania, zmniejszony rozwój nadreaktywności dróg oddechowych
2	Bupiwakaina	Lewobupiwakaina	Zmniejszone ryzyko kardiotoxyczności
3	Cetyryzyna	Lewocetyryzyna	Zwiększona siła działania
4	Citalopram	Escitalopram	Zwiększona siła działania, szybszy początek działania, lepszy profil tolerancji
5	Formoterol	Arformoterol	Zwiększona siła działania, zmniejszony rozwój nadreaktywności dróg oddechowych

6	Ibuprofen	Dexibuprofen	Zwiększona siła działania, Szybszy początek działania, zmniejszenie częstości występowania działań niepożądanych ze strony przewodu pokarmowego
7	Ketamina	Esketamina	Zwiększona tolerancja, krótszy czas rekonwalescencji, mniejsza częstość występowania skutków ubocznych
8	Ketoprofen	Deksketoprofen	Zwiększona siła działania, szybszy początek działania, zmniejszenie częstości występowania działań niepożądanych ze strony przewodu pokarmowego
9	Lansoprazol	Dekslanzoprazol	U niektórych pacjentów mniej zmienny profil farmakokinetyczny
10	Metylofenidat	Deksmetylofenidat	Zwiększona siła działania
11	Ofloksacyna	Lewofloksacyna	Zwiększona siła działania
12	Omeprazol	Esomeprazol	Mniej zmienny profil farmakokinetyczny u niektórych pacjentów

3. ENZYMATYCZNY ROZDZIAŁ KINETYCZNY JAKO METODA OTRZYMYWANIA CHIRALNIE CZYSTYCH ZWIĄZKÓW

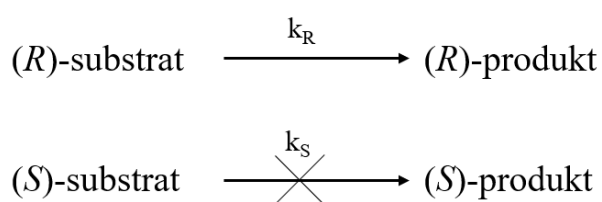
Istnieje kilka metod szeroko stosowanych w celu uzyskania enancjomerycznie czystych związków (EPC, ang. – *enantiomerically pure compounds*). W zależności od użytego materiału wyjściowego metody te możemy podzielić na trzy kategorie: syntezę z wykorzystaniem „chiralnej puli”, rozdział racematów oraz syntezę asymetryczną z wykorzystaniem prochiralnych substratów (**Rycina 6**). Pomimo znacznych postępów w rozwoju syntezy asymetrycznej rozdział racematów jest nadal najważniejszym przemysłowym podejściem do otrzymywania związków enancjomerycznie czystych.



Rycina 6 Metody otrzymywania związków enancjomerycznie czystych [25]

Rozdział kinetyczny (KR, ang. *Kinetic Resolution*) jest jedną z metod stosowanych przy rozdziale racematów. Definiuje się go jako proces, w którym dwa enancjomery mieszaniny racemicznej są przekształcane w produkty z różną szybkością w obecności katalizatora (biologicznego lub chemicznego). Jeśli rozdział kinetyczny jest skuteczny, jeden z enancjomerów mieszaniny racemicznej jest przekształcany w pożądaną produkt chiralny. W omawianym układzie katalitycznym reakcja jednego enancjomeru przebiega znacznie szybciej niż reakcja dla drugiego enancjomeru (**Rycina 7**). W przypadku działania enzymów na mieszaninę racemiczną, enzymy wykazują zdolność do rozróżniania i preferencyjnego

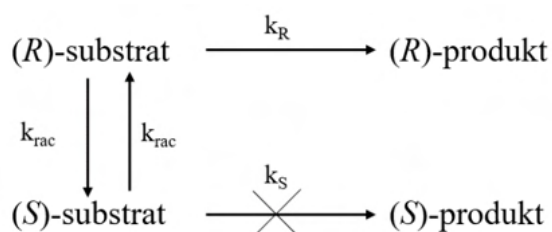
przenoszenia jednego enancjomeru na stronę produktu szybciej niż drugi enancjomer. Oznacza to, że enzymy różnicują chiralne centra enancjomerów i wykazują selektywność w katalizowanych przez nie reakcjach. Podczas reakcji enzymatycznej, aktywne miejsce enzymu, zwane centrum aktywnym, wiąże się selektywnie z jednym enancjomerem w sposób bardziej korzystny energetycznie, co prowadzi do przyspieszenia przemiany tego enancjomeru w produkt. Drugi enancjomer może mieć mniejszą zdolność do wiązania z enzymem, co prowadzi do wolniejszego przenoszenia na stronę produktu. Zdolność enzymów do selektywnego przenoszenia jednego enancjomeru w reakcjach asymetrycznych jest podstawą ich wykorzystania w kinetycznym rozdziale mieszanin racemicznych [26].



Rycina 7 Klasyczny rozdział kinetyczny (k_R – stała szybkości reakcji enancjomeru (R), k_S - stała szybkości reakcji enancjomeru (S)) [25]

Rozdział kinetyczny zachodzi kiedy szybkość reakcji dla jednego enancjomeru (k_R) nie równa się szybkości reakcji dla drugiego enancjomeru (k_S). W takiej sytuacji nie dochodzi do pełnej przemiany, lecz reakcja zostaje zatrzymana w pewnym punkcie pomiędzy 0% a 100% wartości konwersji. W idealnych warunkach rozdziału kinetycznego tylko jeden enancjomer bierze udział w reakcji. W takiej sytuacji, osiągnięcie 50% konwersji spowoduje powstanie końcowej mieszaniny zawierającej 50% reagentu (S) oraz 50% produktu (P), które będą zawierały różne enancjomery wyjściowego związku. W tym punkcie reakcja zostaje zatrzymana, a stosunek wszystkich reagentów nie ulegnie dalszej zmianie. To zjawisko ilustruje, jak rozdział kinetyczny może prowadzić do preferencyjnej produkcji jednego enancjomeru podczas enzymatycznego rozdziału kinetycznego. Maksymalna teoretyczna wydajność klasycznego rozdziału kinetycznego wynosi 50%, co stanowi pewne ograniczenie metody [27]. Aby poprawić wydajność procesu opracowano kilka metod wśród których można wyróżnić zastosowanie mezowiązków, prochiralnych substratów, odwrócenie stereochemii (stereoinwersja) niepożądanego enancjomeru, racemizację i recykling niepożądanego enancjomeru, a także dynamiczny rozdział kinetyczny (DKR, ang. *Dynamic Kinetic Resolution*), który jest modyfikacją klasycznego rozdziału kinetycznego. DKR pozwala otrzymać związki o tej samej wysokiej czystości enancjomerycznej, ale ze znacznie

poprawionymi wydajnościami (**Rycina 8**). W ten sposób obydwie enancjomery substratu można przekształcić w enancjomerycznie czysty produkt ze 100% wydajnością teoretyczną. Metoda ta również posiada pewne ograniczenia, ponieważ istnieje ryzyko racemizacji produktów oraz wymaga zastosowania promotorów racemizacji substratów, które dodatkowo komplikują układ katalityczny oraz charakteryzują się istotną toksycznością [28].



Rycina 8 Dynamiczny rozdział kinetyczny (DKR); (k_R – stała szybkości reakcji enancjomeru (R), k_S – stała szybkości reakcji enancjomeru (S), k_{rac} – stała szybkości racemizacji) [25]

Stosowanie enzymów w KR racemicznych substratów w celu uzyskania enancjomerycznie czystych związków od dawna jest kluczową strategią syntezy szeroko stosowaną zarówno w środowisku akademickim, jak i przemysłowym [29]. Biokatalizatory są przyjazne dla środowiska, niedrogie i trwałe oraz charakteryzują się wysoką enancjoselektywnością. Te cechy sprawiają, że są preferowane w przemyśle farmaceutycznym [4]. Jednymi z najczęściej stosowanych enzymów w biotransformacji racemicznych substratów są lipazy, które są znane jako cenne katalizatory w syntezie organicznej. Rozdział kinetyczny z wykorzystaniem tych enzymów może mieć dodatkową zaletę w produkcji optycznie czystych aktywnych składników farmaceutycznych, taką jak zmniejszone zapotrzebowanie na energię i koszty produkcji oraz łagodniejsze warunki reakcji [30].

Środowisko prowadzenia reakcji odgrywa istotną rolę w procesie rozdziału kinetycznego. Warunki reakcji, takie jak temperatura, pH, rodzaj użytych rozpuszczalników i obecność innych składników chemicznych, mogą mieć wpływ na selektywność reakcji i skuteczność rozdziału kinetycznego. W przypadku reakcji enzymatycznych, odpowiednie pH i temperatura są kluczowe dla aktywności enzymów i selektywności reakcji. Enzymy często wykazują optymalne wartości pH i temperatury, przy których są najbardziej aktywne i skuteczne w KR. Wybór rozpuszczalnika może również mieć wpływ na selektywność reakcji. Często stosuje się rozpuszczalniki chiralne lub dodatki, które mogą wpływać na interakcje między enancjomerami a enzymami lub innymi katalizatorami, poprawiając rozdział kinetyczny. Kataliza enzymatyczna w środowisku niewodnym jest najczęściej wykorzystywana w syntezie organicznej. Woda nie jest preferowanym rozpuszczalnikiem dla prawie wszystkich

zastosowań w chemii przemysłowej, ponieważ większość związków organicznych jest trudno rozpuszczalna i czasami niestabilna w roztworach wodnych. Ponadto usuwanie wody ze środowiska reakcji jest żmudne i kosztowne ze względu na jej wysoką temperaturę wrzenia i wysokie ciepło parowania. Z kolei biokataliza w rozpuszczalnikach organicznych w porównaniu do środowiska wodnego posiada kilka zalet, wśród których wymienić można: niska temperatura wrzenia rozpuszczalników organicznych ułatwia odzyskiwanie produktu; większa rozpuszczalność substancji niepolarnych; przesunięcie równowagi termodynamicznej faworyzuje syntezę zamiast hydrolizy [25]. Dodatkowo, obecność innych składników chemicznych, takich jak inhibitory lub kofaktory, może wpływać na selektywność reakcji i wprowadzać dodatkowe mechanizmy regulacji kinetyki KR. Dlatego, w celu skutecznego rozdziału kinetycznego, istotne jest dokładne kontrolowanie środowiska reakcji, zapewnienie optymalnych warunków reakcji oraz uwzględnienie wszelkich czynników, wpływających na selektywność i efektywność procesu.

4. ENZYMY

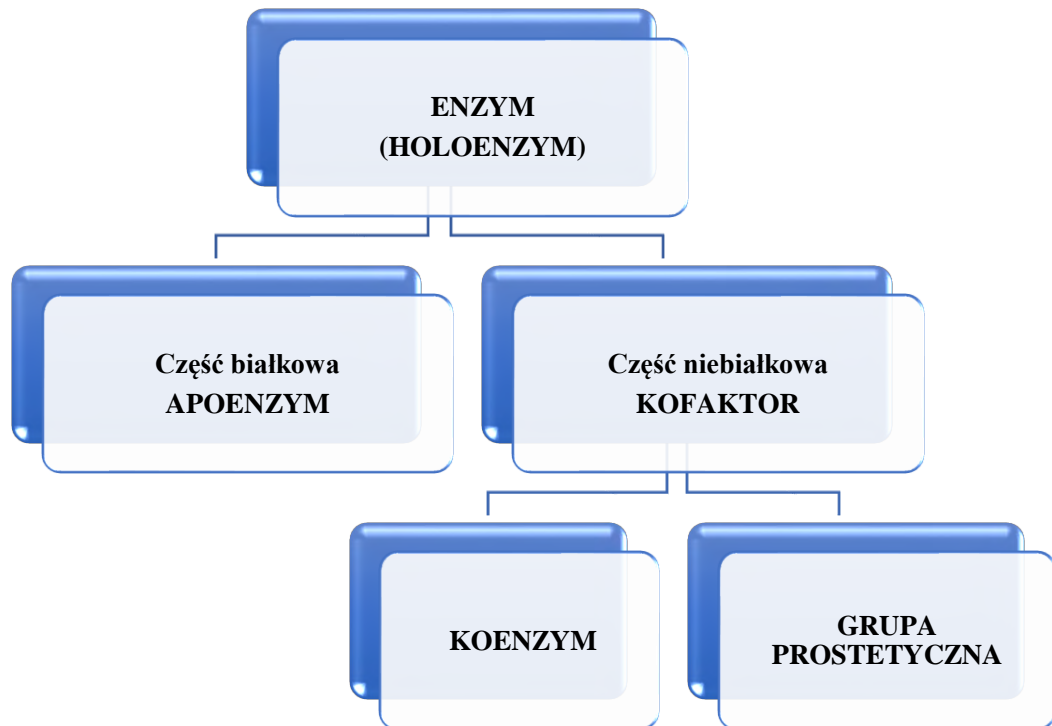
Enzymy to białkowe katalizatory pochodzenia biologicznego. Działają na zasadzie obniżania energii aktywacji reakcji, co powoduje przyspieszenie reakcji i umożliwia zachodzenie wielu istotnych procesów biochemicznych w organizmach. Większość enzymów to wielokrotnie sfałdowane globularne białka, które po zawieszeniu w roztworze wodnym tworzą koloidy [31].

Enzymy są wyjątkowymi katalizatorami, które coraz częściej znajdują zastosowanie w przemyśle i nauce. Istnieje wiele korzyści wynikających z wykorzystania enzymów jako katalizatorów w porównaniu do tradycyjnych katalizatorów metalicznych. Po pierwsze, enzymy są biokompatybilne, co oznacza, że są dobrze tolerowane przez organizmy żywe. Są również biodegradowalne i produkowane z odnawialnych źródeł, co przyczynia się do zrównoważonego rozwoju. Cena enzymów jest stosunkowo niezmienna w czasie, w przeciwieństwie do kosztownych katalizatorów metalicznych. Ich zastosowanie nie wymaga skomplikowanych etapów oczyszczania produktu celem ich usunięcia, co przyspiesza i upraszcza procesy produkcji. Reakcje enzymatyczne są przeprowadzane w łagodnych warunkach, w temperaturze i ciśnieniu zbliżonym do otoczenia, w roztworach o fizjologicznym pH. Dodatkowo, enzymy nie wymagają dodatkowej ochrony ani aktywacji grup funkcyjnych, co zmniejsza koszty i złożoność procesów. Procesy enzymatyczne są bardziej ekonomiczne pod względem wykorzystania dodatkowych reagentów, generują mniej odpadów i zużywają mniej energii w porównaniu do tradycyjnych procesów [32, 33].

4.1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ENZYMÓW - BUDOWA I DZIAŁANIE

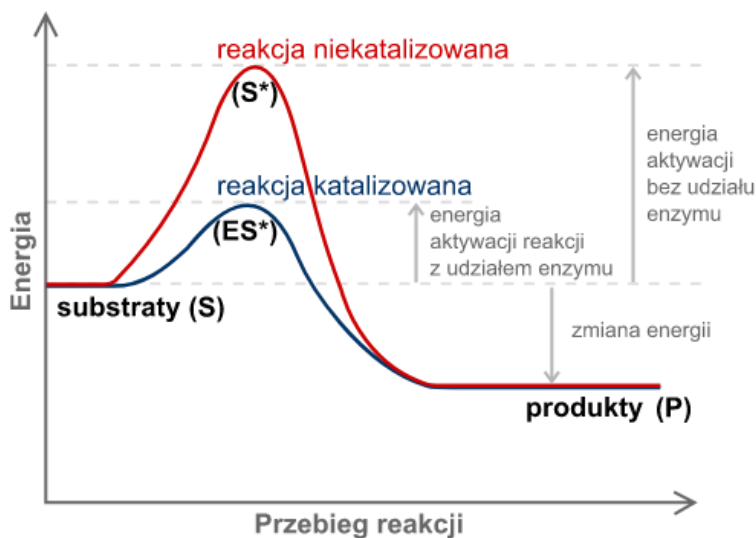
Enzymy są białkowymi katalizatorami, które odgrywają kluczową rolę niemal we wszystkich procesach biochemicznych zachodzących w organizmach żywych. Pełnią kluczową rolę w procesach życiowych, takich jak replikacja i transkrypcja DNA, synteza białek, metabolizm i przekazywanie sygnałów. Enzymy są niezbędne do zachowania homeostazy organizmu, regulacji metabolizmu, syntezy białek, trawienia składników pokarmowych i wielu innych istotnych procesów życiowych. Ich aktywność może być regulowana przez czynniki wewnętrzne i zewnętrzne, takie jak stężenie substratów, pH, temperatura czy obecność regulatorów enzymatycznych. Prawie wszystkie enzymy są białkami, z wyjątkiem niektórych cząsteczek RNA (rybozymów) wykazujących aktywność katalityczną. Enzymy składają się

z części białkowej (apoenzymu) oraz niebiałkowej (kofaktora), które współdziałają w celu zapewnienia aktywności katalitycznej. Połączenie apoenzymu z odpowiednim kofaktorem tworzy kompletną i aktywną formę enzymu, którą nazywamy holoenzymem (**Rycina 9**). Samodzielnie, te dwie części nie wykazują zdolności do katalizowania reakcji chemicznych. Aktywność enzymów jest zależna od obecności drobnocząsteczkowych składników niebiałkowych, wspomnianych wyżej kofaktorów, które pełnią kluczową rolę w procesie katalizy i rozszerzają możliwości katalityczne enzymu, wynikające z własności reszt aminokwasowych występujących w ich łańcuchach peptydowych. Kofaktory możemy podzielić na dwie grupy: grupy prostetyczne oraz koenzymy. Grupy prostetyczne (metaloenzymy) to kofaktory silnie, często kowalencyjnie związane z enzymem przez cały czas jego istnienia. Zwykle są to cząsteczki nieorganiczne i jony metali np.: Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Mn^{2+} , Cu^{2+} , $Fe^{2+/3+}$, ale także małe cząsteczki organiczne np.: flawiny i hem. Koenzymy to małe, niebiałkowe cząsteczki organiczne, wiążące się z enzymem tylko na czas reakcji i przenoszące grupy chemiczne pomiędzy poszczególnymi reakcjami. Kofaktory mogą pełnić różne funkcje w enzymach, takie jak przekazywanie grup funkcyjnych, transport elektronów czy stabilizacja struktury enzymu. Współpraca między częścią białkową a niebiałkową jest niezbędna dla aktywności enzymów. Połączenie białek z kofaktorami umożliwia skuteczne katalizowanie reakcji chemicznych i wykonywanie specyficznych funkcji biologicznych przez enzymy [34, 35].



Rycina 9 Części składowe enzymu

Enzym przyspiesza przebieg reakcji enzymatycznej poprzez obniżenie energii aktywacji ΔG_a . Umożliwia pokonanie bariery energetycznej, która utrudnia przekształcenie substratu w niestabilny stan przejściowy (**Rycina 10**). Energia aktywacji ΔG_a jest to energia potrzebna do przekształcenia substratu ze stanu spoczynkowego w stan przejściowy [36].



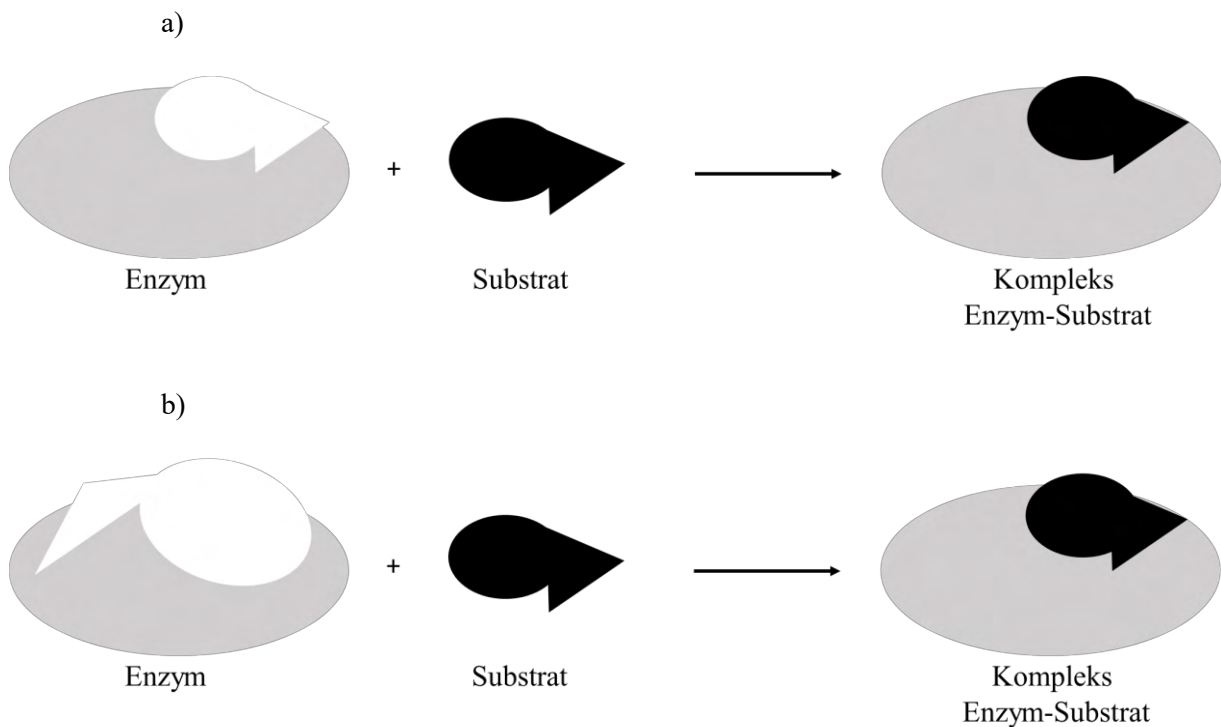
Rycina 10 Wartość energii aktywacji reakcji przebiegającej bez udziału enzymu i z udziałem enzymu [34]

Bariera energetyczna ogranicza szybkość reakcji, ponieważ wymaga dostarczenia odpowiedniej ilości energii, aby przekształcić substrat w stan przejściowy. Ważne jest, że enzymy same w sobie nie przesuwają stanu równowagi katalizowanej przemiany, ale przyspieszają jego osiągnięcie. Stosunek iloczynu stężeń produktów do iloczynu stężeń substratów danej reakcji jest wielkością stałą, niezależną od obecności enzymu. Enzymy działają poprzez wiązanie się z substratami w miejscu aktywnym enzymu, tworząc tym samym kompleks enzym-substrat. Miejsce aktywne jest często dopasowane strukturalnie do substratu, co pozwala na specyficzną interakcję między enzymem a substratem. W odróżnieniu do większości katalizatorów wykorzystywanych w syntezach chemicznych enzymy są specyficzne zarówno do typu katalizowanej reakcji jak i do pojedynczego substratu. Miejsce aktywne jest układem przestrzennym i zajmuje stosunkowo małą część całkowitej objętości enzymu, ponieważ tylko nieliczne reszty aminokwasowe białka enzymatycznego wchodzi w kontakt z substratem (reszty aminokwasowe w łańcuchach bocznych posiadają grupy, które mogą być donorami lub akceptorami protonów). W tworzeniu kompleksu enzym-substrat uczestniczą głównie słabe wiązania niekowalencyjne o niskiej energii, a tylko w nielicznych przypadkach wytwarzają się wiązania kowalencyjne, których energia jest wielokrotnie wyższa [36].

Poprzez swoje unikalne struktury przestrzenne, enzymy są w stanie efektywnie przyłączać substraty i katalizować przekształcenie chemiczne w produkty. Ta specyficzność substratu wynika z precyzyjnego dopasowania między strukturą enzymu a substratem, co umożliwia efektywne przeprowadzenie reakcji chemicznej [37, 38]. Podczas utworzonego kompleksu enzym-substrat zwiększa się prawdopodobieństwo zderzeń pomiędzy reagującymi cząsteczkami. Substraty zostają prawidłowo zorientowane w przestrzeni trójwymiarowej – cząsteczki bez enzymu zderzają się bezładnie, natomiast obecność biokatalizatora powoduje, że reagujące wiązania znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie. Dochodzi również do naprężenia wiązań w substracie, reorganizacji wiązań chemicznych, przeniesienie grup funkcyjnych lub innych przemian, które prowadzą do przekształcenia substratu w produkt. Po przeprowadzeniu reakcji enzymatycznej, produkt lub produkty zostają uwolnione, a enzym jest przygotowany do kolejnego cyklu reakcji. Utworzenie kompleksu enzym-substrat jest kluczowym etapem procesu katalizy enzymatycznej. Interakcja między enzymem a substratem w miejscu aktywnym umożliwia skuteczną katalizę reakcji chemicznej [34, 35].

Specyficzność enzymów dobrze oddaje zasada zamka i klucza sformułowana pod koniec XIX wieku przez Emila Fischera, która zakładała, że substrat musi mieć odpowiedni kształt, który pasuje do specyficznego miejsca aktywnego enzymu, podobnie jak klucz pasuje do zamka (**Rycina 11a**). Miejsce aktywne ma specyficzne właściwości chemiczne i geometrię,

które pozwalają na wiązanie się z substratem w sposób komplementarny, wówczas substrat może dokładnie wpasować się w miejsce aktywne enzymu, tworząc kompleks enzym-substrat. Jednak zakładana sztywność miejsca aktywnego enzymu uniemożliwia dynamiczne zmiany, które towarzyszą katalizie. W rzeczywistości, interakcje enzym-substrat są bardziej dynamiczne i elastyczne, a miejsce aktywne enzymu może ulegać pewnym zmianom strukturalnym podczas wiązania substratu. Wyjaśnienie tego problemu przedstawił Daniel Koshland w swojej teorii indukowanego dopasowania (**Rycina 11b**). Ten model sugeruje, że interakcja między enzymem a substratem nie jest jedynie pasywnym dopasowaniem kształtu, ale indukuje również zmiany konformacyjne w strukturze enzymu. Według modelu indukowanego dopasowania, substrat nie tylko musi pasować do miejsca aktywnego enzymu, ale również oddziałuje z nim w taki sposób, że indukuje zmiany konformacyjne w enzymie. W wyniku zmian konformacyjnych enzymu, miejsce aktywne staje się bardziej optymalne do przeprowadzenia reakcji chemicznej. Zmiany te mogą obejmować dostosowanie struktury miejsc wiązania, wprowadzenie reorganizacji w strukturze enzymu lub tworzenie dodatkowych oddziaływań chemicznych [39].



Rycina 11 Schemat powstawania kompleksu enzym-substrat (a) model zamka i klucza (b) model indukowanego dopasowania [40]

Enzymy są również stereospecyficznymi katalizatorami co oznacza, że wykazują zdolność do rozpoznawania i przekształcania substratów o określonej konfiguracji stereochemicznej. Przeważnie katalizują reakcje tylko jednego stereoizomeru danego związku. Jest to niezwykle istotne w produkcji leków, gdzie właściwa forma enancjomeryczna może mieć kluczowe znaczenie dla aktywności biologicznej i skuteczności leku [41].

4.2. KLASYFIKACJA I NOMENKLATURA ENZYMÓW

Nazewnictwo enzymów w przeszłości często było przypadkowe i niejednoznaczne. Niejednokrotnie używano nazw, które niewiele mówiły o funkcji lub właściwościach enzymów, co utrudniało ich identyfikację i porównywanie. Nazwy enzymów opierały się na różnych kryteriach, takich jak źródło, w którym zostały odkryte, lub reakcje chemiczne, których dotyczyły. Jednak te nazwy nie zawsze odzwierciedlały rzeczywistą funkcję enzymu, co powodowało mylące oznaczenia. Ponadto, ten sam enzym mógł być nazywany różnymi nazwami przez różnych naukowców lub w różnych systemach klasyfikacyjnych. Niejednokrotnie prowadziło to do zamieszania i trudności w ustaleniu, o który enzym dokładnie chodzi. W celu rozwiązania tych problemów, obecnie stosuje się bardziej systematyczne podejście do nazewnictwa enzymów. W 1955 roku Międzynarodowa Unia Biochemiczna podjęła decyzję o wprowadzeniu systematyki enzymów powołując Komisję ds. Enzymów (*Enzyme Commission*), która przypisała każdemu enzymowi unikatową nazwę i czteroczęściowy rozróżnialny numer EC (*Enzyme Commission number*) określający typ katalizowanej reakcji i jej substraty (**Tabela 2**). Każdy kod enzymu składa się z dwóch liter „EC” i czterech cyfr oddzielonych kropkami. Schemat takiego kodu przedstawiono poniżej (**Rycina 12**).

EC. a.b.c.d

Rycina 12 Wzór międzynarodowego kodu enzymatycznego

Poszczególne liczby kodu EC posiadają swoje znaczenie i reprezentują coraz dokładniejszą klasyfikację enzymu. Pierwsza liczba (a) określa główną klasę enzymu, druga (b) to podklasa, trzecia (c) to podpodklasa, czwarta (d) to numer seryjny używany do identyfikacji pojedynczego enzymu w podklasie. Obecnie nad klasyfikacją oraz nomenklaturą enzymów

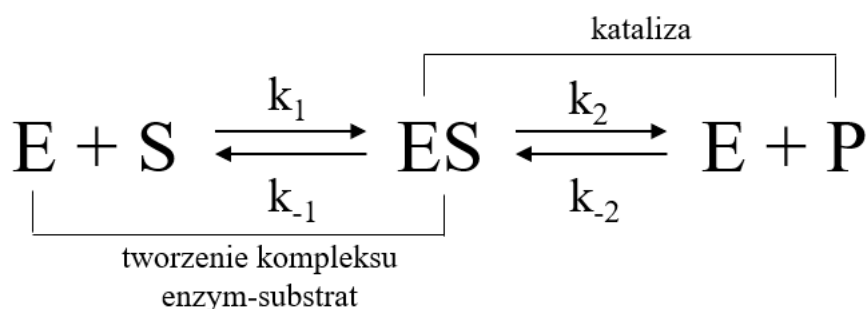
czuwa Komitet Nomenklaturowy Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (ang. NC-IUBMB, *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*). Dodatkowo, bazy danych takie jak UniProt i Enzyme Database gromadzą informacje o enzymach, co ułatwia dostęp do szczegółowych danych na ich temat. Klasyfikacja i nazewnictwo enzymów stanowią system, który umożliwia jednoznaczną identyfikację enzymów pod względem katalizowanych przez nie reakcji chemicznych. Jest to istotne dla precyzyjnego określenia funkcji enzymów i porównywania ich właściwości w różnych badaniach naukowych [42].

Tabela 2 Klasy enzymów [43]

Klasa	Katalizowana reakcja	Schemat reakcji	Przykład enzymu
EC1 Oksydoreduktazy	Reakcje utleniania i redukcji	$AH + B \rightarrow A + BH$ $A + O \rightarrow AO$	oksydaza
EC2 Transferazy	Przeniesienie grupy funkcyjnej z donora na akceptor	$AB + C \rightarrow A + BC$	kinaza
EC3 Hydrolazy	Rozkładają wiązania chemiczne z udziałem cząsteczki wody	$AB + H_2O \rightarrow AOH + BH$	lipaza
EC4 Liazy	Reakcje przekształcenia substratu, którym towarzyszy powstanie lub zanik wiązania podwójnego	$RCO_2COOH \rightarrow RCOH + CO_2$ lub $[X-A+BY] \rightarrow [A=B + XY]$	dekarboksylaza
EC5 Izomerazy	Reakcje izomeryzacji	$ABC \rightarrow BCA$	izomeraza
EC6 Ligazy	Reakcje syntezy kosztem energii pochodzącej z ATP	$X + Y + ATP \rightarrow XY + ADP + Pi$	syntetaza
EC 7 Translokazy	Katalizują ruch jonów lub cząsteczek przez membrany lub ich separację w membranach		transporter

4.3. KINETYKA REAKCJI ENZYMATYCZNYCH

Kinetyka enzymatyczna zajmuje się ilościowymi pomiarami szybkości reakcji katalizowanych przez enzymy oraz badaniem czynników, które wpływają na te szybkość (stężenie reagentów, temperatura, obecność katalizatorów). Kinetykę reakcji enzymatycznych obrazuje model Michaelisa-Menten. W 1913 roku Leonor Michaelis i Maud Menten opracowali teorię aktywności i kinetyki enzymów, która stała się fundamentalną podstawą dla zrozumienia mechanizmów działania enzymów. Ich prace skupiły się na przebiegu reakcji katalizowanej przez enzymy, koncentrując się na szybkości tych reakcji oraz wpływie stężeń substratów na szybkość reakcji enzymatycznych. Teoria Michaelisa-Menten zakłada, że podstawą katalizacyjnej reakcji enzymatycznej jest odwracalne wzajemne oddziaływanie substratu (S) z enzymem (E), przy którym powstaje nietrwały kompleks (ES), który następnie rozpada się na enzym i produkt reakcji (P) (**Rycina 13**) [44, 45].



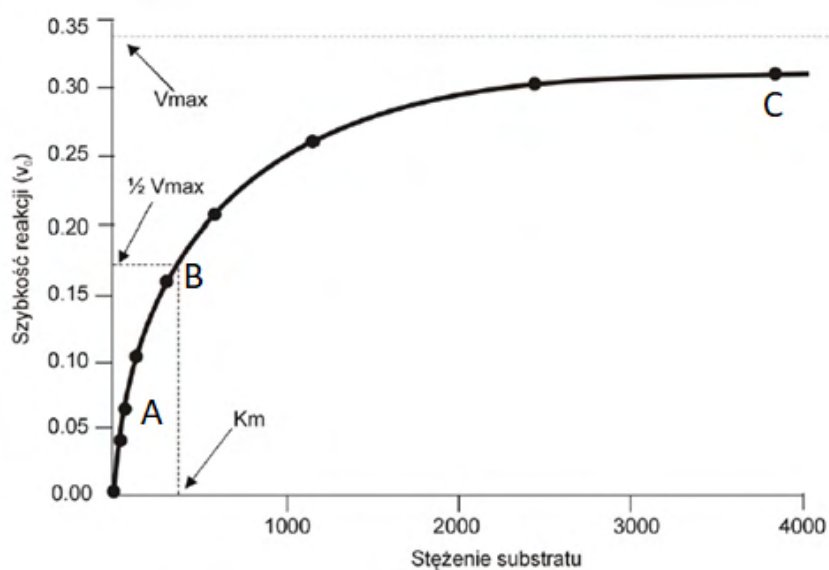
Rycina 13 Równanie reakcji enzymatycznej

W pierwszym etapie reakcji substraty łączą się odwracalnie z enzymem, tworząc kompleks enzym-substrat (ES) o stałej szybkości k_1 , czasami nazywany kompleksem Michaelisa. W kolejnym etapie, kompleks ten może rozpaść się na dwa sposoby. Może dysocjować na enzym (E) i substrat (S) z odwrotną stałą szybkości k_{-1} lub może dojść do chemicznej przemiany substratów i uwolnienia produktów o stałej szybkości k_2 , przy czym zakłada się, że produkt nie może ulec odwrotnej przemianie i ponownie stać się substratem. W związku z powyższym naukowcy sformułowali równanie kinetyczne, znane jako równanie Michaelisa-Menten (**Rycina 14**), które opisuje matematyczną zależność między początkową szybkością reakcji enzymatycznej V_0 , a stężeniem substratu [S] [46].

$$V_0 = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

Rycina 14 Równanie Michaelisa-Menten, V_{\max} – maksymalna szybkość reakcji, K_M – stała Michaelisa, $[S]$ – stężenie substratu

Stała Michaelisa (K_M) jest wskaźnikiem powinowactwa enzymu do substratu i reprezentuje stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej (V_0) osiąga połowę wartości maksymalnej szybkości (V_{\max}) dla danego stężenia enzymu. Przy stałym stężeniu enzymu, szybkość reakcji enzymatycznej zazwyczaj wzrasta wraz ze wzrostem stężenia substratu do pewnego punktu, a następnie osiąga maksymalną szybkość reakcji, która jest nazywana maksymalną prędkością reakcji (V_{\max}). Powyższą zależność obrazuje hiperbola (Rycina 15) [35, 46].

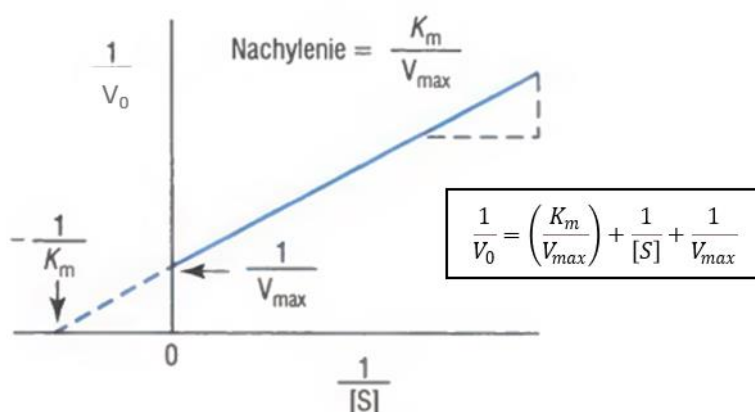


Rycina 15 Krzywa Michaelisa-Menten ilustrująca zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu. K_m – stała Michaelisa, V_{\max} – szybkość maksymalna reakcji

Mimo, że substrat może występować w nadmiarze, to nie wszystkie cząsteczki substratu są związane z enzymem w kompleks enzym-substrat (ES). Stała równowagi reakcji tworzenia kompleksu ES nie jest nieskończenie duża, co oznacza, że tylko pewna część enzymów będzie związana z substratem w danym momencie. Jeśli substrat występuje w nadmiarze (punkt A lub B na wykresie) (Rycina 15), to zwiększenie stężenia substratu (S) będzie prowadziło do większej liczby kompleksów ES, ponieważ więcej cząsteczek substratu będzie miało

możliwość związania się z enzymem. To z kolei zwiększa szybkość reakcji, wyrażaną jako wartość V_0 (początkowa szybkość reakcji). Z drugiej strony, jeśli zmniejszymy stężenie substratu (S), to liczba kompleksów ES zmniejszy się, ponieważ będzie mniej cząsteczek substratu dostępnych do związania z enzymem. W rezultacie, szybkość reakcji (V_0) będzie niższa. Zależność między stężeniem substratu a szybkością reakcji jest związana z tym, że tylko cząsteczki substratu związane z enzymem w kompleksie ES mogą być przekształcane w produkty. Zmiany w stężeniu substratu wpływają na liczbę kompleksów ES i odpowiednio zmieniają szybkość reakcji. Punkt C na wykresie (**Rycina 15**) przedstawia sytuację, w której cały enzym jest związany z substratem w kompleksie enzym-substrat (ES). W tym punkcie, wszystkie dostępne miejsca aktywne enzymu są nasycone substratem, i nie ma już wolnych enzymów, które mogłyby tworzyć nowe kompleksy ES. Dlatego dalsze zwiększenie stężenia substratu (S) w warunkach nasycenia nie będzie miało wpływu na przyspieszenie reakcji, ponieważ enzymy są już w pełni nasycone substratem, a reakcja osiągnęła swoją maksymalną prędkość (V_{max}). W warunkach nasycenia (punkt C **Rycina 15**), szybkość reakcji (V_0) zależy jedynie od szybkości z jaką produkty oddysocjują od enzymu (reprezentowane przez stałą szybkości k_2). Proces oddysocjowania produktów od enzymu pozwala enzymowi na związanie się z kolejnymi cząsteczkami substratu, które są dostępne w nadmiarze. Pomimo tego, że dalsze zwiększenie stężenia substratu nie wpływa na V_0 , enzymy wciąż pracują na swojej maksymalnej szybkości (V_{max}) w punkcie C [35].

Liniowym przekształceniem równania Michaelisa-Menten jest równanie Lineweavera-Burka (**Rycina 16**), które jest narzędziem stosowanym do wyznaczania wartości stałej Michaelisa (K_m) oraz maksymalnej prędkości reakcji (V_{max}).

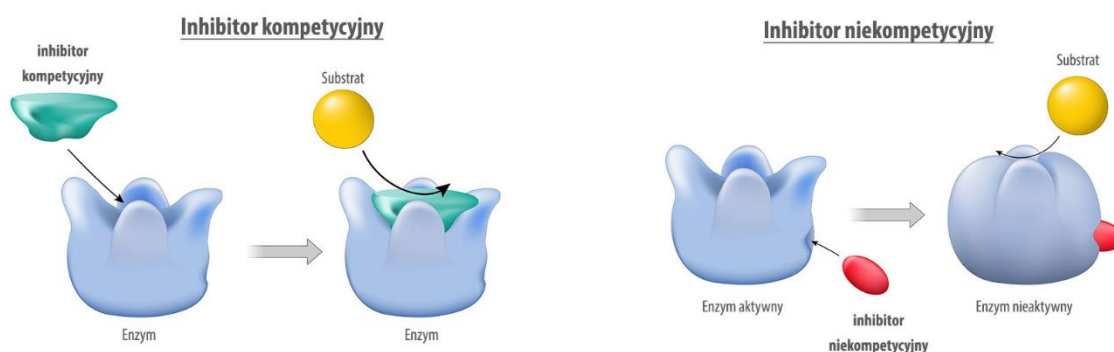


Rycina 16 Wykres Lineweavera – Burka (wykres podwójnej odwrotności) [35]

Kinetyka enzymatyczna odgrywa kluczową rolę w wielu aspektach związanych z farmakologią, projektowaniem oraz syntezą leków. Wiele leków jest zaprojektowanych w celu hamowania aktywności określonych enzymów w organizmie, które są związane z konkretnymi chorobami. Badania kinetyki enzymatycznej pozwalają zidentyfikować leki, które wykazują wysoką selektywność i aktywność wobec docelowego enzymu, minimalizując jednocześnie działania niepożądane na inne enzymy. W badaniach farmakodynamicznych kinetyka enzymatyczna pozwala na zrozumienie mechanizmu działania leków i ich oddziaływania z enzymami. Wartości K_m i V_{max} leku mogą pomóc określić, w jakim stopniu dany lek jest skuteczny w hamowaniu aktywności enzymów, a także w jakich dawkach może być podawany w celu osiągnięcia optymalnego efektu terapeutycznego. Kinetyka enzymatyczna pozwala również na ocenę, jak długo lek pozostaje aktywny w organizmie, jak szybko jest metabolizowany oraz jakie inne enzymy lub substancje mogą wpływać na jego działanie. To ważne dla ustalenia odpowiednich dawek leku i optymalnego schematu podawania. W przypadku badań nowych substancji leczniczych, kinetyka enzymatyczna może pomóc zidentyfikować te, które mają potencjał do działania jako inhibitory enzymatyczne lub aktywatory, co może być kluczowe dla ich terapeutycznego działania. W sytuacji określenia mechanizmu działania leków badania kinetyki enzymatycznej pozwalają na zrozumienie, jak lek oddziałuje z enzymami, czy działa konkurencyjnie lub niekonkurencyjnie oraz jak zmienia się aktywność enzymu w obecności leku. Wszystkie te aspekty są kluczowe dla rozwijania nowych leków, optymalnego dawkowania, zrozumienia ich oddziaływania w organizmie i skuteczności terapeutycznej. Kinetyka enzymatyczna jest zatem nieocenionym narzędziem w dziedzinie farmakologii i farmakoterapii [47, 48].

4.4. INHIBICJA ENZYMÓW ORAZ PRAKTYCZNE ZNACZENIE INHIBITORÓW

Inhibicja enzymatyczna jest procesem, w którym substancje zwane inhibitorami hamują aktywność enzymu i zmniejszają szybkość reakcji katalizowanej przez enzym. Można wyróżnić dwa główne rodzaje inhibitorów: inhibitory kompetycyjne oraz inhibitory niekompetycyjne (**Rycina 17**).



Rycina 17 Schemat działania inhibitorów kompetycyjnych i inhibitorów niekompetycyjnych

Inhibitory kompetycyjne konkurują z substratem o miejsce aktywne enzymu. Oznacza to, że inhibitor wiąże się z tym samym miejscem aktywnym, co substrat. W obecności inhibitora kompetycyjnego, szybkość reakcji enzymatycznej może być odwracalnie zmniejszona, ponieważ inhibitor hamuje zdolność substratu do związania się z enzymem i utworzenia kompleksu enzym-substrat (ES). Wprowadzenie większej ilości substratu może złagodzić inhibicję, ponieważ substrat konkuruje z inhibitorem o miejsce aktywne, zwiększając szanse na utworzenie kompleksu ES. K_m zwiększa się w obecności inhibitora kompetycyjnego, ale V_{max} pozostaje bez zmiany [34, 35].

Inhibitory niekompetycyjne wiążą się z enzymem w miejscu odmiennym niż miejsce aktywne, uniemożliwiając lub utrudniając przemianę substratu w produkt. Wprowadzenie większej ilości substratu nie złagodzi inhibicji, ponieważ inhibitor nie konkuruje z substratem o miejsce aktywne. Inhibitory niekompetycyjne obniżają V_{max} , ponieważ ograniczają one liczbę aktywnych miejsc enzymatycznych, które mogą katalizować reakcję. K_M pozostaje bez zmiany, ponieważ inhibitor nie wpływa na zdolność substratu do związania się z enzymem. Podsumowanie różnic pomiędzy wyżej opisanymi inhibitorami zestawiono w tabeli poniżej (**Tabela 3**) [34, 35].

Tabela 3 Różnice pomiędzy inhibitorem kompetycyjnym i inhibitorem niekompetycyjnym [34]

	Inhibitor kompetycyjny	Inhibitor niekompetycyjny
Budowa	Podobny do substratu	Niepodobny do substratu
Miejsce wiązania	Miejsce aktywne	Poza miejscem aktywnym
Odwracalność	Inhibicja odwracalna przez wzrost stężenia substratu	Inhibicja nieodwracalna przez wzrost stężenia substratu
V_{max}	Bez zmian	Maleje
K_m	wzrasta	Bez zmian

Oprócz wyżej wymienionych istnieją także inne rodzaje inhibicji, takie jak inhibicja mieszana, które łączą cechy zarówno inhibicji kompetycyjnej, jak i niekompetycyjnej. Poznanie różnic między różnymi typami inhibicji enzymatycznej jest ważne dla zrozumienia mechanizmów działania leków i regulacji reakcji chemicznych w organizmach. Inhibicja enzymatyczna odgrywa także kluczową rolę w farmakologii, ponieważ umożliwia selektywne i kontrolowane hamowanie aktywności enzymów i procesów biochemicznych w organizmach żywych. Inhibitory są wykorzystywane w farmakologii w różnych celach, zarówno w terapii, jak i w badaniach naukowych. Można wymienić kilka istotnych znaczeń inhibicji enzymatycznej w farmakologii. Wiele leków działa poprzez hamowanie aktywności enzymów, które są związane z rozwojem chorób. Inhibitory enzymatyczne mogą być stosowane w leczeniu różnych schorzeń, takich jak nadciśnienie, infekcje, choroby metaboliczne i nowotwory. Przykładami są inhibitory enzymów konwertujących angiotensynę (ACE, ang. *Angiotensin-Converting Enzyme*) w leczeniu nadciśnienia, inhibitory proteazy w terapii HIV, czy inhibitory kinazy tyrozynowej w leczeniu nowotworów [49].

4.5. BIODKATALIZA

Biodkataliza jest procesem, w którym reakcje chemiczne są katalizowane przez biologiczne katalizatory znane jako enzymy. Już w 1858 roku Louis Pasteur dostarczył pierwszego przykładu współczesnej biodkatalizy, demonstrując rozdział racemicznego kwasu winowego poprzez fermentację z różnymi mikroorganizmami, w tym z pospolitą pleśnią *Penicillium glaucum*. W tych eksperymentach kwas (+)-winowy był zużywany znacznie szybciej niż kwas (-)-winowy, co pozwoliło na wyizolowanie tego ostatniego [50].

Stosowanie biodkatalizatorów staje się coraz bardziej atrakcyjną alternatywą dla tradycyjnych metod chemicznych, ze względu na wysoką selektywność, łagodne warunki reakcji i procesy przyjazne dla środowiska [51]. Biodkataliza stała się kluczowym narzędziem w syntezie organicznej ze względu na szereg korzyści, które oferuje w porównaniu z tradycyjnymi metodami chemicznymi. Przydatność biodkatalizy w syntezie organicznej wynika z wielu czynników wśród których wymienić można:

- wysoki nadmiar enancjomeryczny: enzymy często wykazują dużą stereoselektywność, co oznacza, że mogą wytwarzać jeden enancjomer z wysokim stopniem czystości. Jest to szczególnie cenne w produkcji leków i substancji o określonej aktywności biologicznej, gdzie właściwa forma enancjomeryczna jest kluczowa;

- wydajność i efektywność: biokataliza pozwala na osiągnięcie wysokiej wydajności i selektywności reakcji, co prowadzi do zmniejszenia ilości produktów ubocznych i zwiększenia efektywności produkcji, co ma pozytywny wpływ na koszty i środowisko;
- łagodne warunki reakcji: enzymy działają w łagodnych warunkach temperaturowych i pH, co może pomóc w unikaniu reakcji ubocznych i degradacji cząsteczek;
- redukcja toksyczności: zastosowanie enzymów może zmniejszyć użycie toksycznych reagentów i rozpuszczalników, co przyczynia się do bardziej zrównoważonej i ekologicznej produkcji;
- możliwość pracy w układach wodnych: enzymy często pracują w środowisku wodnym, co może zastąpić stosowanie organicznych rozpuszczalników i przyczynić się do ograniczenia emisji zanieczyszczeń.

Dzięki tym korzyściom, biokataliza znalazła zastosowanie nie tylko w badaniach akademickich, ale także w przemyśle chemicznym i farmaceutycznym. Wprowadzenie enzymów do syntez organicznych przyczyniło się do produkcji nowych leków, związków o unikalnych właściwościach i wydajnych metod produkcji różnorodnych substancji organicznych. To sprawia, że biokataliza jest ważnym aspektem nowoczesnej syntezy organicznej, wspierając rozwój bardziej zrównoważonych i ekologicznych procesów chemicznych [33, 52-55]. Kilka dziedzin chemii syntetycznej i farmaceutycznej cieszy się już powszechnym zastosowaniem katalizy opartej na enzymach. Na przykład zastosowanie hydrolaz (w tym acylaz, amidaz, esteraz, lipaz i proteaz) stało się dobrze ugruntowane w wielu schematach syntezy i obecnie enzymy te nadal stanowią większość reakcji biokatalitycznych realizowanych na dużą skalę [56].

4.6. LIPAZY

4.6.1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA

Lipazy (acylohydrolazy triacyloglicerolu, EC 3.1.1.3) to enzymy należące do klasy hydrolaz, które katalizują hydrolizę długołańcuchowych triglicerydów do diglicerydów, monoglicerydów, kwasów tłuszczowych i glicerolu. Po raz pierwszy wyizolowano je z bakterii na początku XIX wieku, a związane z nimi badania były stale intensyfikowane ze względu na szczególne właściwości tych enzymów [57]. Lipazy stanowią najważniejszą grupę biokatalizatorów do zastosowań biotechnologicznych. Kiedy ogólnie przyjęto, że lipazy pozostają enzymatycznie aktywne w rozpuszczalnikach organicznych, zaczęto prowadzić badania nad opracowaniem tych enzymów jako idealnych narzędzi dla chemików organicznych. Wykazują znakomitą chemoselektywność, regioselektywność i stereoselektywność. Są łatwo dostępne w dużych ilościach, ponieważ wiele z nich można wytwarzać z dużą wydajnością z organizmów drobnoustrojowych, a mianowicie grzybów i bakterii. Zwykle nie wymagają kofaktorów ani nie katalizują reakcji ubocznych. Te właściwości sprawiają, że lipazy są najpowszechniej stosowaną grupą biokatalizatorów w chemii organicznej [58].

Ze wszystkich znanych enzymów lipazy przyciągnęły największą uwagę naukowców. Obecnie znanych jest prawie 4000 enzymów, z czego około 200 jest w zastosowaniu komercyjnym [59]. Oprócz ich naturalnej funkcji hydrolizy wiązań estrowych i karboksylowych, lipazy mogą katalizować reakcje estryfikacji, interestryfikacji i transestryfikacji w środowisku niewodnym. Ta wszechstronność sprawia, że lipazy są enzymami z wyboru do potencjalnych zastosowań w przemyśle spożywczym, detergentowym, farmaceutycznym, skórzanym, tekstylnym, kosmetycznym i papierniczym. Stosowane są również do syntezy wysokowartościowych chemikaliów, agrochemikaliów i nowych materiałów polimerowych. Najbardziej znaczące zastosowania przemysłowe lipaz zostały znalezione głównie w sektorze spożywczym, detergentowym i farmaceutycznym [60-62].

4.6.2. RODZAJE LIPAZ

Na rynku dostępnych jest wiele różnych preparatów lipaz, które pochodzą z różnych źródeł oraz różnią się między sobą ze względu na ich specyficzność, pochodzenie i funkcje (Tabela 4) [59].

Tabela 4 Wybrane przykłady lipaz

Nazwa lipazy	Symbol
Lipazy zwierzęce	
Lipaza trzustkowa Trzustkowa esteraza cholesterolowa	LPP -
Lipazy grzybowe	
<i>Candida rugosa</i> (<i>Candida cylindracea</i>)	CRL
<i>Geotrichum candidum</i>	GCL
<i>Humicola lanuginosa</i> (<i>Thermomyces lanuginosa</i>)	HLL
<i>Penicillium camemberti</i> (<i>Penicillium cyclopium</i>)	PcamL
<i>Rhizomucor javanicus</i> (<i>Mucor javanicus</i>)	RJL
<i>Rhizomucor miehei</i> (<i>Mucor miehei</i>)	RML
<i>Mucor circinelloides</i> (<i>Mucor javanicus</i>)	-
<i>Mucor racemosus</i>	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	ROL
<i>Candida antarctica A</i>	CAL-A
<i>Candida antarctica B</i>	CAL-B
<i>Aspergillus niger</i>	ANL

<i>Candida lipolytica</i>	CLL
<i>Penicillium roquefortii</i>	ProgL
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
Lipazy bakteryjne	
<i>Pseudomonas cepacia</i> (<i>Burkholderia cepacia</i>)	PCL
<i>Pseudomonas cepacia</i>	PCL-AH
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PFL
<i>Pseudomonas fragi</i>	PfragiL
<i>Chromobacterium viscosum</i> (<i>Pseudomonas glumae</i>)	CVL
<i>Pseudomonas sp.</i>	-
<i>Bacillus thermocatenulalus</i>	BTL2
<i>Alcaligenes sp.</i>	-

4.6.3. REAKCJE KATALIZOWANE PRZEZ LIPAZY

Lipazy wykazują wszechstronną specyficzność substratową, a co za tym idzie posiadają zdolność do katalizowania różnych typów reakcji (Tabela 5). Wysoka stabilność w rozpuszczalnikach organicznych pozwala na ich zastosowanie w reakcjach transestryfikacji i syntezie estrów. Dzięki swojej stabilności w różnych środowiskach, lipazy stały się niezastąpionymi narzędziami w wielu procesach przemysłowych, prowadząc do bardziej zrównoważonej produkcji i ograniczenia negatywnego wpływu na środowisko. Ich zdolność do katalizowania różnorodnych reakcji czyni je wartościowymi enzymami w przemyśle chemicznym i biotechnologicznym [63].

Tabela 5 Reakcje katalizowane przez lipazy [57]

Nr	Rodzaj reakcji	Schemat reakcji
1	Hydroliza estrów	$R_1COOR_2 + H_2O \leftrightarrow R_1COOH + R_2OH$
2	Synteza estrów	$R_1COOH + R_2OH \leftrightarrow R_1COOR_2 + H_2O$
3	Transestryfikacje:	
3a	Interestryfikacja	$R_1COOR_2 + R_3COOR_4 \leftrightarrow R_1COOR_4 + R_3COOR_2$
3b	Alkoholiza	$R_1COOR_2 + R_3OH \leftrightarrow R_1COOR_3 + R_2OH$
3c	Acydoliza	$R_1COOR_2 + R_3COOH \rightarrow R_3COOR_2 + R_1COOH$
4	Hydroliza amidów	$R_1CONHR_2 + H_2O \leftrightarrow R_1COOH + R_2NH_2$
5	Synteza amidów	$R_1COOH + R_2NH_2 \leftrightarrow R_1CONHR_2 + H_2O$
6	Aminoliza	$R_1COOR_2 + R_3NH_2 \rightarrow R_1CONHR_3 + R_2OH$
7	Hydroliza estrów tiolowych	$R_1COSR_2 + H_2O \leftrightarrow R_1COOH + R_2SH$
8	Synteza estrów tiolowych	$R_1COOH + R_2SH \leftrightarrow R_1COSR_2 + H_2O$
9	Synteza wodorotlenków kwasów karboksylowych	$RCOOH + H_2O_2 \leftrightarrow RCOO-OH + H_2O$

4.6.4. ZASTOSOWANIE LIPAZ W ROZDZIALE RACEMATÓW

Lipazy są dobrze znane jako cenne katalizatory w syntezie organicznej. Ponieważ lipazy są chiralne, mają zdolność rozróżniania dwóch enancjomerów mieszaniny racemicznej. Są szeroko stosowane w trzech głównych typach reakcji, w wyniku których powstają optycznie czyste związki. Należą do nich kinetyczne rozdzielanie racemicznych kwasów karboksylowych

lub alkoholi, enancjoselektywne różnicowanie grup mezo kwasów dikarboksylowych lub mezodioli oraz enancjotopowe różnicowanie grup prochiralnych kwasów dikarboksylowych i pochodnych dioli. Rozdzielanie racematów poprzez rozdział kinetyczny katalizowany lipazą jest jedną z najbardziej atrakcyjnych metod stosowanych w celu uzyskania enancjomerycznie czystych związków. Spośród wszystkich metod stosowanych w rozdzielaniu kinetycznym dominują reakcje estryfikacji w rozpuszczalnikach organicznych katalizowana lipazą. Zatem w obecności odpowiedniego donora acylu, enzymu oraz odpowiedniego rozpuszczalnika i w optymalnej temperaturze jeden enancjomer mieszaniny racemicznej selektywnie przenosi się do odpowiedniego estru, pozostawiając drugi nieprzereagowany enancjomer w enancjomerycznie czystej postaci [64-66].

W ostatnim czasie gwałtownie wzrosło zapotrzebowanie na enancjomerycznie czyste związki w przemyśle farmaceutycznym. Zainteresowanie to wynika głównie ze świadomości różnych efektów biologicznych różnych postaci produktów enancjomerycznych. Jeden enancjomer zwykle zapewnia pożądaną aktywność, podczas gdy przeciwny enancjomer może być nieaktywny lub czasami toksyczny. W związku z tym w ciągu ostatniej dekady nastąpił wzrost tendencji do wykorzystania enzymów do syntezy asymetrycznej i rozdziału kinetycznego w celu uzyskania czystych enancjomerów [67].

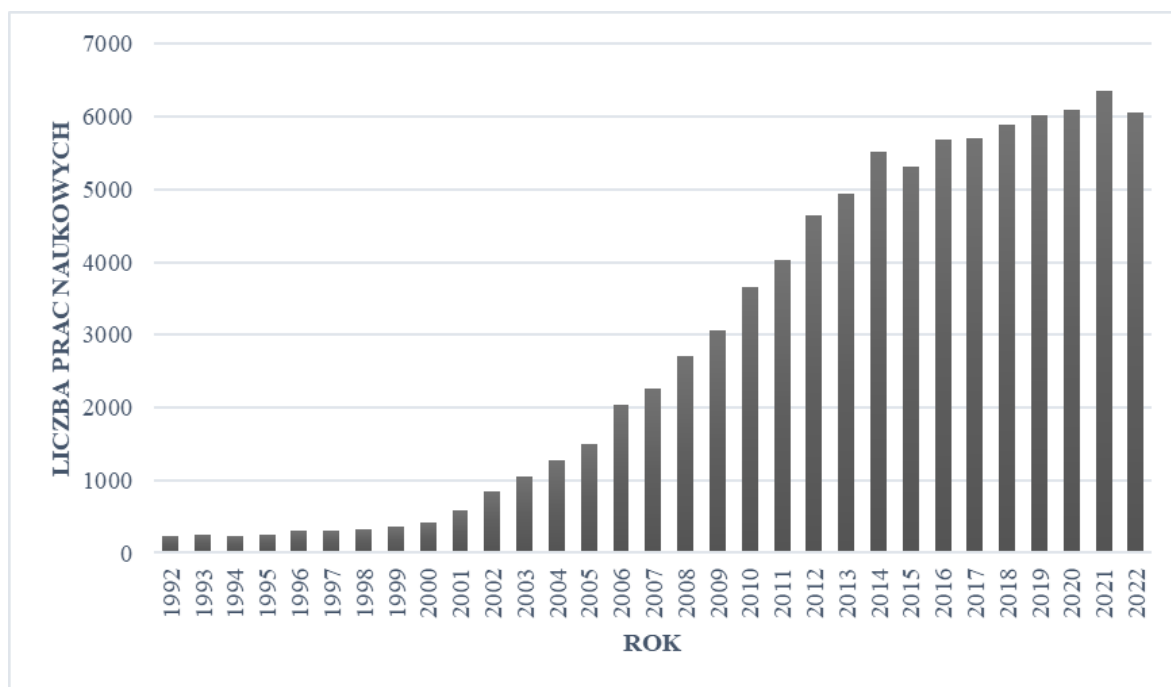
5. CIECZE JONOWE

5.1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA

Ciecze jonowe (ILs, ang. *ionic liquids*) to bardzo wyjątkowa klasa rozpuszczalników niemolekularnych, które od czasu ich pierwszego odkrycia w 1914 r. były szeroko badane w wielu dyscyplinach chemicznych [68]. Ciecze jonowe to związki chemiczne posiadające strukturę jonową, składającą się z organicznego kationu oraz anionu, który może mieć charakter organiczny lub nieorganiczny [69]. ILs są wspólnie określane jako sole organiczne, których temperatura topnienia wynosi poniżej 100 °C. W literaturze, ciecze jonowe, które pozostają w stanie ciekłym już w temperaturze pokojowej, są nazywane cieczami jonowymi o temperaturze pokojowej (RTILs, ang. *Room Temperature Ionic Liquids*). W porównaniu do innych związków ciecze jonowe charakteryzują się bardziej nieuporządkowaną strukturą sieci krystalicznej, co prowadzi do obniżenia ich temperatury topnienia. Ta właściwość jest często wynikiem niskiego stopnia symetrii jonów obecnych w cieczach jonowych. Stanowią alternatywę dla materiałów niebezpiecznych i lotnych ze względu na swoje unikalne właściwości fizykochemiczne, takie jak wyższa stabilność termiczna, prosty proces odzysku i znikoma prężność par, które eliminują problem związany z lotnością i palnością. Ich niezwykle właściwości pozwalają na zastąpienie konwencjonalnych rozpuszczalników organicznych powszechnie stosowane w wielu procesach, ze względu na ich lepszą wydajność i mniejszą szkodliwość. Ponadto, ich łatwe odzyskiwanie poprzez ekstrakcję lub destylację oraz możliwość ponownego wykorzystania dodatkowo podkreśla ich istotne cechy. Przyczynia się to do obniżenia kosztów różnych procesów o znaczeniu przemysłowym [70]. Ponadto są często określane jako „rozpuszczalniki projektowe” (ang. *designer solvents*), ponieważ ich właściwości, takie jak polarność, hydrofobowość, aktywność solwatująca, gęstość, temperatura topnienia, oraz lepkość, można do pewnego stopnia dostosować, zmieniając podstawniki kationowe, anionowe lub alkilowe obecne na kationie. Ze względu na atrakcyjne i praktyczne właściwości, ILs wzbudziły zainteresowanie przemysłu i nauki [71].

Badania z udziałem ILs wywarły wpływ na wiele dziedzin nauki, w tym materiałoznawstwo, inżynierię chemiczną, naukę o środowisku, biochemię, genetykę, biologię molekularną, chemię i farmację. Tym samym liczba publikacji naukowych związanych z ILs wzrosła od 1992 r. (**Rycina 18**) i cieszy się niesłabnącym zainteresowaniem naukowców. Dynamiczny rozwój badań nad cieczami jonowymi oraz ich wszechstronny potencjał

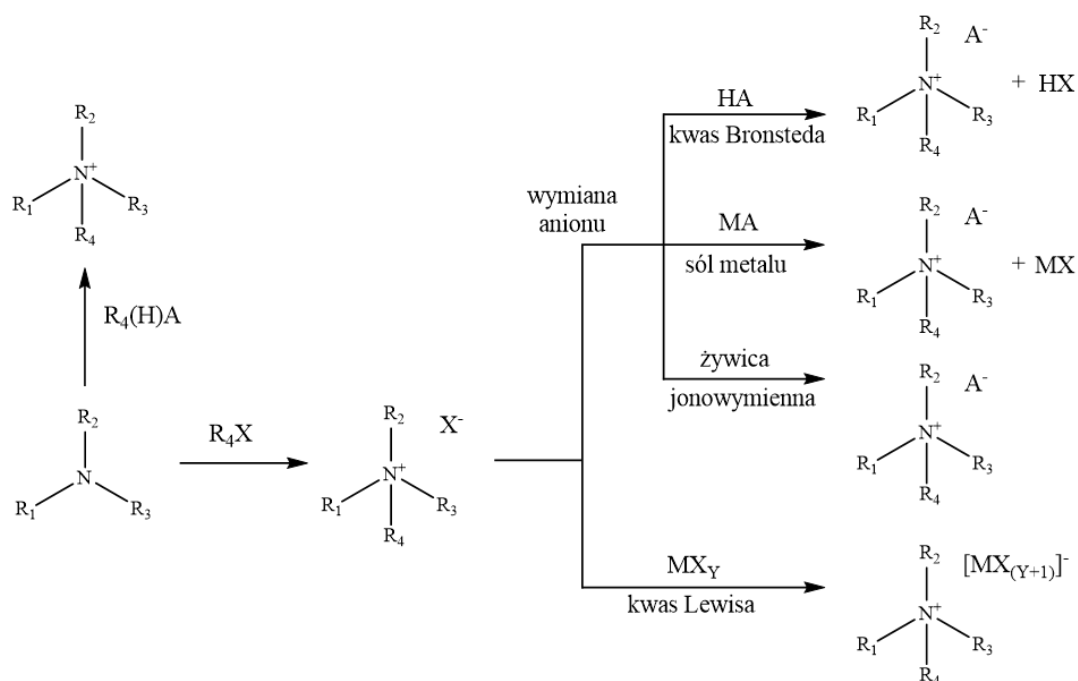
w różnych dziedzinach przemysłu stanowi silny dowód na ich rosnące znaczenie w dzisiejszym świecie nauki i technologii [72].



Rycina 18 Liczba prac naukowych (artykuły, monografie, streszczenia konferencyjne, rozdziały) na podstawie bazy Web of Science (poszukiwania na podstawie słów kluczowych „ionic liquid” zawartych w tytule lub abstrakcie prac w okresie 1992-2022)

5.2. METODY OTRZYMYWANIA CIECZY JONOWYCH

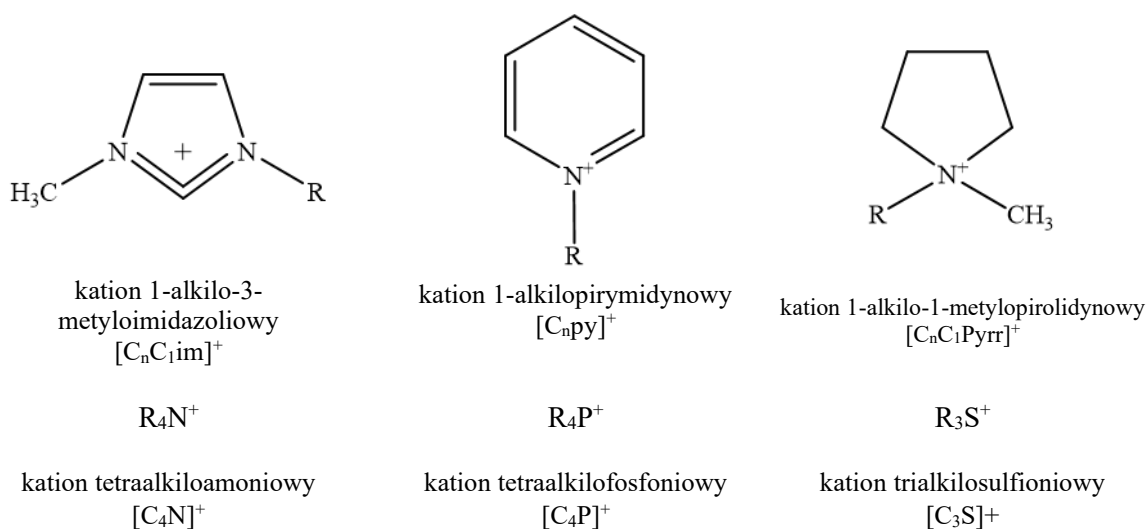
Istnieją dwa sposoby otrzymywania cieczy jonowych: synteza jednoetapowa oraz synteza dwuetapowa [73]. Synteza jednoetapowa polega na reakcji zasady Lewisa, najczęściej trzeciorzędowej aminy z odpowiednim czynnikiem czwartorzędowym np. siarczanem (VI) dialkylowym, metanosulfonianem alkilowym lub trifluorometanosulfonianem alkilowym. W syntezie dwuetapowej w pierwszym etapie otrzymywany jest prekursor cieczy jonowej, najczęściej czwartorzędowy halogenek amoniowy w reakcji aminy z odpowiednim halogenkiem alkilu lub arylu. W drugim etapie przeprowadza się reakcje wymiany jonowej, która może przebiegać na kilka sposobów poprzez reakcję z soli halogenkowej z kwasem Lewisa, kwasem Brønsteda, solą metalu lub w wyniku wymiany anionu na złożu jonowymiennym [69, 74-76]. Opisane metody otrzymywania cieczy jonowych (na przykładzie syntezy cieczy amoniowych) przedstawiono na poniższym schemacie (**Rycina 19**).



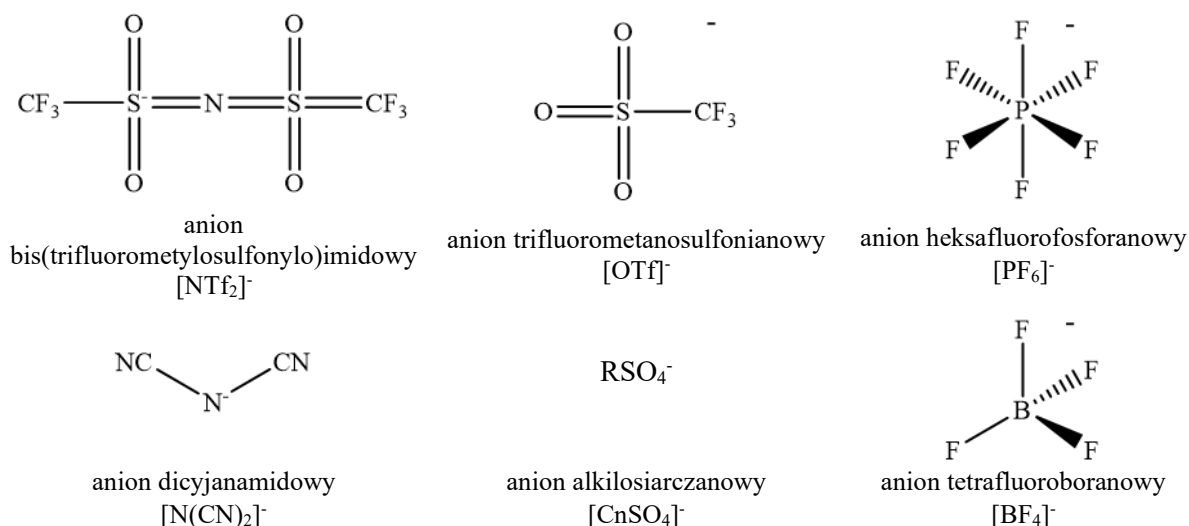
Rycina 19 Schemat otrzymywania cieczy jonowych: metoda jednoetapowa (1), metoda dwuetapowa (2) [73]

5.3. PODZIAŁ I BUDOWA CIECZY JONOWYCH

Istnieje wiele kombinacji kationów i anionów, które mogą tworzyć cieczy jonowe o różnych właściwościach, zastosowaniach i strukturze (**Rycina 20** i **Rycina 21**). Z uwagi na ich dużą różnorodność oszacowano, że może powstać nawet ponad 10^{18} możliwych kombinacji tych związków [77].



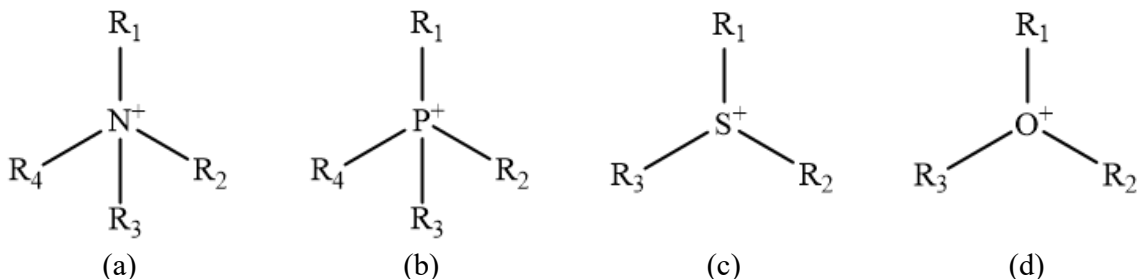
Rycina 20 Przykłady kationów tworzących cieczy jonowe [78]



Rycina 21 Przykłady anionów tworzących cieczy jonowe [78]

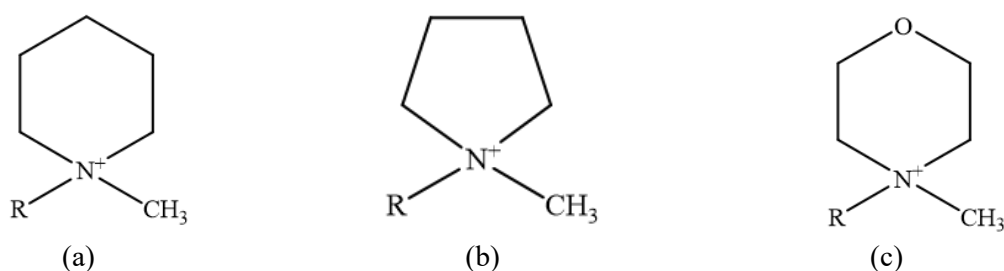
Klasyfikacja cieczy jonowych obejmuje ich budowę, właściwości czy zastosowanie. Ciecze jonowe składają się z dużego organicznego kationu o niskim stopniu symetrii oraz z małego anionu, który może mieć charakter organiczny lub nieorganiczny. W związku z tym możliwa jest ogólna i najprostsza klasyfikacja cieczy jonowych na podstawie ich struktury molekularnej. Analizując budowę chemiczną kationu, na którym występuje ładunek dodatni, można wyróżnić następujące ciecze jonowe (**Rycina 22**) [79, 80]:

- Amoniowe [R₄N]⁺ (a)
- Fosfoniowe [R₄P]⁺ (b)
- Sulfoniowe [R₃S]⁺ (c)
- Oksoniowe [R₃O]⁺ (d)

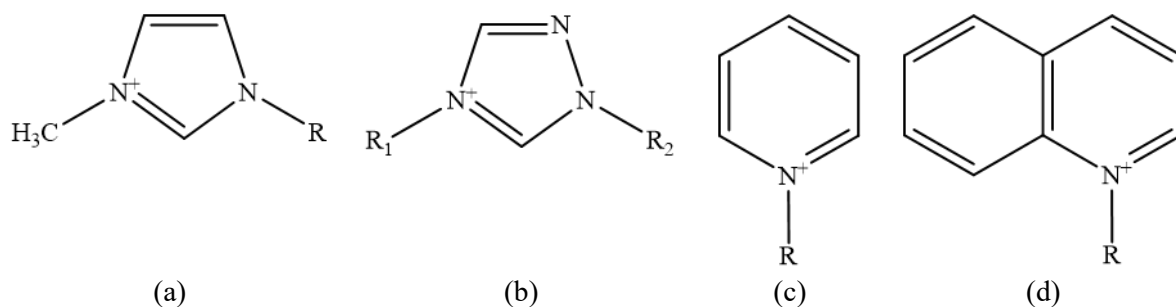


Rycina 22 Podział cieczy jonowych ze względu na budowę chemiczną kationu: amoniowe (a), fosfoniowe (b), sulfoniowe (c), oksoniowe (d)

Wśród wyżej wymienionych najbardziej poznaną i opisaną w literaturze grupę cieczy jonowych stanowią sole amoniowe. W przypadku soli amoniowych, dodatkowy podział przeprowadza się ze względu na hybrydyzację atomu azotu. Atom z ładunkiem dodatnim może być podstawiony przez grupy alkilowe, aryłowe lub heteroalkilowe, co nadaje kationowi charakter alifatyczny. Gdy atom z ładunkiem tworzy część struktury cyklicznej, mówimy o kationie heterocyklicznym. W zależności od rodzaju hybrydyzacji heteroatomu w kationie, możemy wyróżnić niearomatyczne kationy heterocykliczne o hybrydyzacji sp^3 (np.: 1-alkilo-1-metylopiperydyniowy (**Rycina 23a**), 1-alkilo-1-metylopirolidyniowy (**Rycina 23b**) lub 1-alkilo-1-morfolinowy (**Rycina 23c**) oraz aromatyczne kationy heterocykliczne o hybrydyzacji sp^2 , np.: kation 1-alkilo-3-metyloimidazoliowy (**Rycina 24a**), kation 1,3-dialkilo-1,2,4-triazoliowy (**Rycina 24b**), kation 1-alkilopirydyniowy (**Rycina 24c**) oraz kation 1-alkilochinoliniowy (**Rycina 24d**) [81].



Rycina 23 Kationy heterocykliczne niearomatyczne (hybrydyzacja sp^3)



Rycina 24 Kationy heterocykliczne aromatyczne (hybrydyzacja sp^2)

Podział cieczy jonowych na podstawie struktury kationu może być dodatkowo rozszerzony poprzez wprowadzenie pojęcia cieczy jonowych protycznych (protonowych) (PILs, ang. *protic ionic liquids*) oraz aprotycznych (aprotonowych) (AILs, ang. *aprotic ionic liquids*). PILs to podzbiór cieczy jonowych w których atom z ładunkiem dodatnim jest

związany co najmniej z jednym atomem wodoru [82-84]. Powstają one w wyniku równomolowego zmieszania kwasu Brønsteda i zasady Brønsteda [85, 86]. Natomiast jeśli atom z ładunkiem dodatnim nie jest związany z żadnym atomem wodoru, co oznacza maksymalną rzędowość, taka ciecz jonowa jest określana jako aprotonowa. W porównaniu z APILs, PILs często mają wyższą przewodność i płynność, a także niższą temperaturę topnienia. Są także tańsze i wygodniejsze w przygotowaniu, gdyż ich synteza nie wiąże się z powstawaniem produktów ubocznych. Istnieje jednak kilka doniesień na temat zdolności PILs do tworzenia sieci wiązań wodorowych, co może ograniczać jonowość PILs w porównaniu z APILs [87].

Struktura anionu stanowi kolejne istotne kryterium podziału cieczy jonowych. Możemy rozróżnić ciecze jonowe zawierające anion o charakterze nieorganicznym lub organicznym. Aniony nieorganiczne w cieczach jonowych charakteryzują się budową prostą, złożoną jednordzeniową oraz złożoną wielordzeniową (**Tabela 6**), natomiast aniony organiczne tworzą mrówczany, octany, mleczań, salicylany, benzoesany, trichlorooctany, trifluorooctany, cytryniany, alkilosiarczany (V), alkilobenzosulfoniany oraz trifluorometylosiarczany, acesulfamiany, sacharyniany oraz wiele innych [88].

Tabela 6 Aniony nieorganiczne wchodzące w skład cieczy jonowych [88]

Rodzaj anionu	Przykład anionu
Prosty	Cl ⁻ , Br ⁻ , I ⁻ , NO ²⁻ , NO ³⁻ , HSO ₄ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , H ₂ PO ₄ ⁻ , HPO ₄ ²⁻ , ClO ₄ ⁻ , ClO ₃ ⁻
Złożony jednordzeniowy	BF ₄ ⁻ , PF ₆ ⁻ , ZnCl ₃ ⁻ , CuCl ₃ ⁻ , SnCl ₃ ⁻ , AlCl ₄ ⁻
Złożony wielordzeniowy	Al ₂ Cl ₇ ⁻ , Al ₃ Cl ₁₀ ⁻ , FeCl ₇ ⁻

Ciecze jonowe (ILs) wykazują znaczące zróżnicowanie w kwestii właściwości fizykochemicznych i biologicznych, co otwiera drzwi do jeszcze szerszego zakresu potencjalnych zastosowań. W kontekście możliwości projektowania cieczy jonowych wprowadzono ogólne i praktyczne kryterium. Istniejące ciecze jonowe podzielono na trzy generacje (**Rycina 25**), zależnie od rodzaju właściwości dostarczanych przez strukturę kationu i anionu. Kolejność generacji odzwierciedla ewolucję badań nad cieczami jonowymi i ich rozwój historyczny [89].

Do pierwszej generacji cieczy jonowych (ILs) zaliczane są te, w których struktury kationu i anionu dostosowywano w celu uzyskania produktu o określonych właściwościach fizycznych. Istotny jest wpływ struktury kationu lub anionu na przewodnictwo elektryczne, co

ma praktyczne zastosowanie ich w roli elektrolitów. Jony w cieczach jonowych pierwszej generacji były również dobrane w taki sposób, aby osiągnąć konkretne parametry, takie jak temperatura topnienia, gęstość, lepkość, stabilność termiczna, hydrofilność lub współczynnik refrakcji [89, 90].

Druga generacja cieczy jonowych obejmuje te, które posiadają ukierunkowane właściwości chemiczne w połączeniu z wyjątkowymi parametrami fizycznymi. W tej kategorii dobór odpowiednich struktur kationu i anionu cieczy jonowej umożliwia dodatkowo kontrolowanie cech chemicznych, takich jak reaktywność, chiralność, stabilność elektrochemiczna, palność, zdolność do tworzenia kompleksów lub solwatacji, wrażliwość na utlenianie oraz zdolność do blokowania promieniowania UV [90, 91]. Możliwość dostrojenia niektórych z tych właściwości fizycznych i chemicznych, daje możliwość tworzenia „cieczy jonowych do zadań specjalnych” (TSILs, ang. *Task-specific ionic liquid*) [92, 93].

Trzecia generacja cieczy jonowych obejmuje związki charakteryzujące się określoną aktywnością biologiczną, obok wyselekcjonowanych właściwości fizykochemicznych. Wśród pierwszych przykładów cieczy jonowych III generacji znajdują się związki o działaniu bakteriobójczym. Jony, które są składnikami farmaceutycznych substancji aktywnych (APIs, ang. *Active Pharmaceutical Ingredients*), pełnią rolę zarówno kationów, jak i anionów cieczy jonowych III generacji, posiadających działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne [94]. W tej kategorii zaliczane są również środki ochrony roślin, takie jak pochodne triazoli o aktywności grzybobójczej, a także ciecze jonowe herbicydowe (HILs, ang. *Herbicidal Ionic Liquid*) obejmujące m.in. pochodne fenoksykwasów, które wykazują selektywną aktywność chwastobójczą wobec roślin dwuliściennych [90, 93].

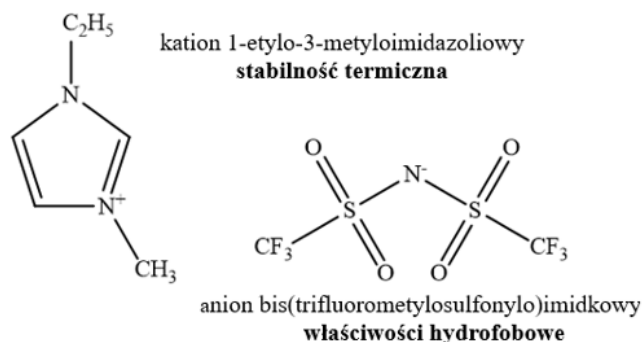
I GENERACJA CIECZY JONOWYCH

Ciecze jonowe o projektowalnych właściwościach fizycznych

Projektowalne właściwości fizyczne

gęstość
lepkość
temperatura topnienia
stabilność termiczna
hydrofobowość/hydrofilowość
przewodnictwo elektryczne
współczynnik refrakcji

Przykład



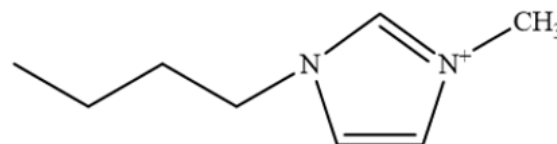
II GENERACJA CIECZY JONOWYCH

Ciecze jonowe o projektowalnych właściwościach fizykochemicznych

Projektowalne właściwości chemiczne

chiralność
solwatacja
palność
stabilność elektrochemiczna
blokowanie promieni UV
reaktywność
dodatni bilans tlenowy

Przykład



kation 1-butylo-3-metyloimidazoliowy
stabilność elektrochemiczna

Cl⁻ anion chlorkowy
zdolności solwatacyjne

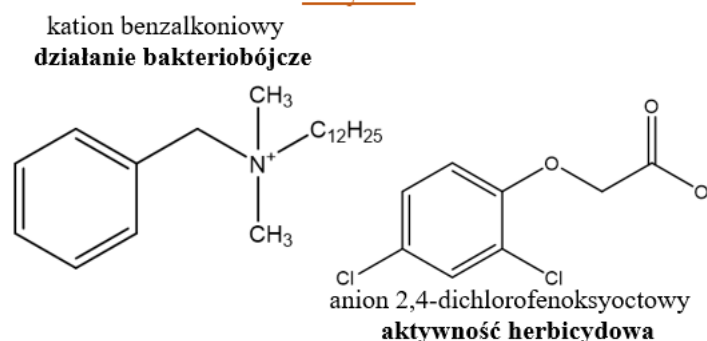
III GENERACJA CIECZY JONOWYCH

Ciecze jonowe o projektowalnych właściwościach biologicznych i fizykochemicznych

Projektowalne właściwości biologiczne

działanie bakteriobójcze
działanie grzybobójcze
działanie cytostatyczne
działanie przeciwzapalne
działanie znieczulające
aktywność herbicydowa

Przykład



kation benzalkoniowy
działanie bakteriobójcze

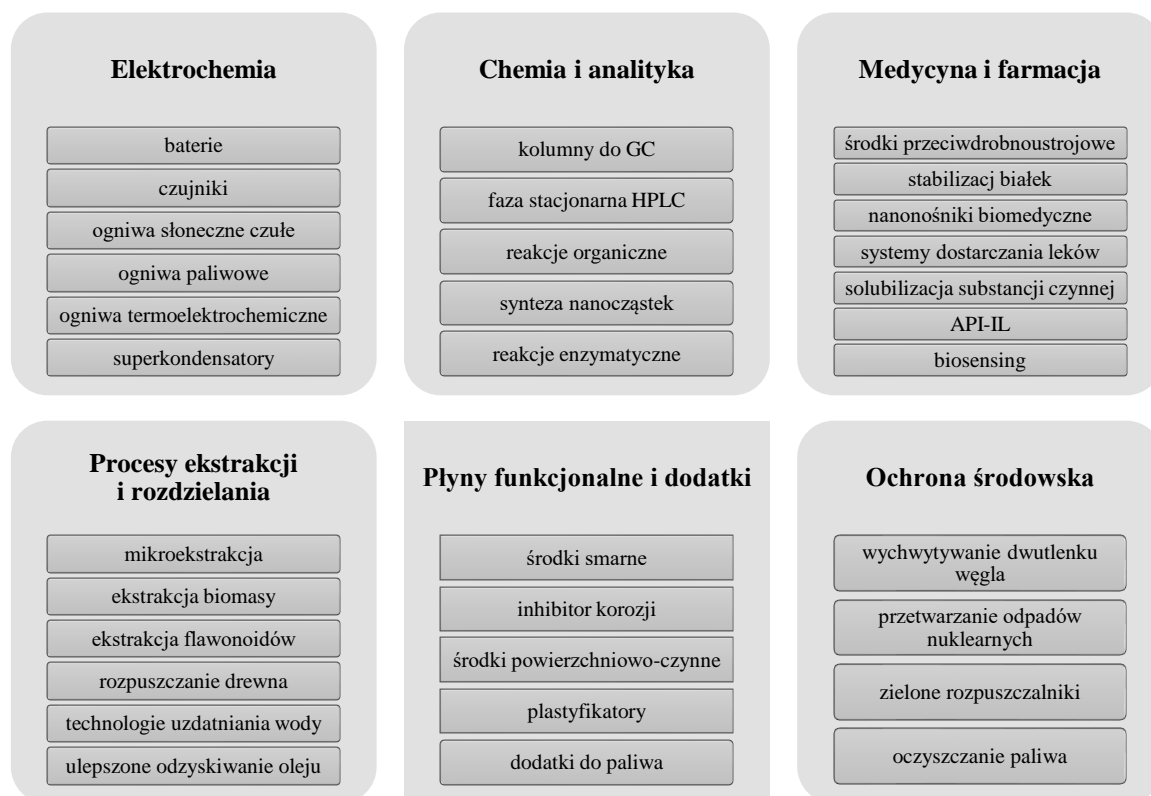
anion 2,4-dichlorofenoksyooctowy
aktywność herbicydowa

Rycina 25 Generacje cieczy jonowych

5.4. ZASTOSOWANIE CIECZY JONOWYCH

Ciecze jonowe stanowią wyjątkowe substancje chemiczne, które znalazły zastosowanie w różnych dziedzinach współczesnej nauki i przemysłu [95]. Poza ich właściwościami fizycznymi i chemicznymi, wyjątkowa aktywność biologiczna przyciąga uwagę biochemików i naukowców z dziedziny medycyny [96]. Ze względu na modyfikowalny charakter oraz właściwości fizykochemiczne ciecze jonowe są doskonałym zamiennikiem dla tradycyjnych rozpuszczalników wykorzystywanych w reakcjach organicznych. Znajdują szerokie zastosowanie w różnych syntezach organicznych, w tym także w reakcjach katalitycznych i enzymatycznych [97]. Ciecze jonowe znajdują szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu, takich jak przemysł chemiczny, elektrochemiczny, farmaceutyczny czy papierniczy

[98]. Ich zastosowanie pozwala m.in. rozwiązać problemy związane z rozwojem formułacji produktów leczniczych, które dotyczą między innymi niskiej rozpuszczalności lub polimorfizmu aktywnego składnika farmaceutycznego (API). Ciecze jonowe mogą być stosowane w postaci emulsji, mikroemulsji lub jonożelu, jako nośniki API lub część systemów dostarczania leków. Połączenie cieczy jonowych z API pozwala na otrzymanie pochodnych dwufunkcyjnych (API-IL), które mogą wykazywać lepsze właściwości fizykochemiczne i wyższą aktywność biologiczną w porównaniu do samego API [89, 99]. Dzięki swoim unikalnym właściwościom, ciecze jonowe stają się coraz bardziej atrakcyjne dla przemysłu farmaceutycznego, umożliwiając rozwój nowych, bardziej efektywnych i ekologicznych produktów farmaceutycznych [96, 100]. W roku 2000 różne grupy niezależnie odkryły na nowo potencjał cieczy jonowych jako rozpuszczalników dla reakcji katalizowanych przez enzymy, zwłaszcza lipazę [101-103]. ILs wykazują coraz bardziej istotne zastosowania w obszarze procesów analitycznych, takich jak chromatografia, spektrometria, ekstrakcja, analiza jonów metalu, matryce biologiczne, chromatografia gazowa (GC), wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) czy elektroforeza kapilarna [104]. Wybrane dziedziny zastosowania cieczy jonowych podsumowano na poniższej rycinie (**Rycina 26**).



Rycina 26 Wybrane dziedziny zastosowania cieczy jonowych [70]

5.5. CIECZE JONOWE W ROZDZIELE KINETYCZNYM RACEMATÓW

Rozpuszczalniki organiczne są nadal powszechnie stosowane jako media reakcyjne w stereoselektywnej biotransformacji racemicznych postaci farmaceutycznych substancji czynnych. Jednak większość z tych substancji jest toksyczna i niebezpieczna dla środowiska, a w wielu przypadkach może zanieczyścić końcowy produkt syntezy cząsteczkami organicznymi. Jednym z głównych obszarów zainteresowania dalszych badań w chemii jest unikanie toksycznych i nieprzyjaznych dla środowiska rozpuszczalników organicznych. W tym kontekście wiele uwagi poświęcono ostatnio poszukiwaniom nowych mediów reakcyjnych [101, 102, 105]. W odniesieniu do reakcji przeprowadzanych w konwencjonalnych rozpuszczalnikach, reakcje w ILs mają różne zachowania termodynamiczne i kinetyczne, co często prowadzi do poprawy wydajności procesu. Ponadto ciecze jonowe umożliwiają zwiększoną stabilność odczynników metaloorganicznych i biokatalizatorów, łatwe odzyskiwanie produktu, a także możliwy recykling katalizatorów homogenicznych. Poprzez modyfikację kationu i anionu ich właściwości można dostosować na wiele sposobów. W przypadku wszystkich procesów katalitycznych istnieją zasadniczo trzy możliwości ich zastosowania: jako współrozpuszczalniki, jako czysty rozpuszczalnik lub w układzie dwufazowym [106]. Biorąc pod uwagę te dodatkowe korzyści, uzasadnione jest oczekiwanie, że ciecze jonowe mogą również odgrywać znaczącą rolę w syntezie asymetrycznej, będącej jednym z głównych problemów przemysłu i środowiska akademickiego. Enzymatyczne reakcje katalityczne przeprowadzane w cieczach jonowych są przedmiotem intensywnych badań. W rozpuszczalnikach organicznych enzymy często są narażone na obniżoną aktywność lub stabilność. Ponadto, rozpuszczalniki hydroksylowe, takie jak metanol, glikol dietylenowy lub 1,2-propanodiol, nie są odpowiednie do acylacji z powodu konkurencji z substratem. Inne rozpuszczalniki, takie jak *N*-metyloformamid, denaturują lipazy. Z kolei ciecze jonowe mogą zostać skutecznie wykorzystane jako alternatywne środowisko do reakcji enzymatycznych, prowadząc do wyraźnie zwiększonej wydajności i stabilności operacyjnej białkowego katalizatora [107-109].

6. PARAMETRY OPISUJĄCE ENANCJOSELEKTYWNOŚĆ REAKCJI

Reakcje enancjoselektywne to rodzaj reakcji chemicznych polegających na selektywnym tworzeniu jednego enancjomery (izomeru optycznego) z substratu będącego mieszaniną racemiczną (zawierającą oba enancjomery w równych proporcjach). Reakcje enancjoselektywne wynikają z różnic w preferencjach i reaktywności chiralnych cząsteczek substratu oraz katalizatora, co prowadzi do selektywnego powstawania jednego enancjomery jako dominującego produktu. Reakcje tego typu występują tylko w przypadku substratów lub katalizatorów, które są chiralne. Parametry charakteryzujące ilościowo reakcje enancjoselektywne to nadmiar enancjomeryczny substratów (ee_s), nadmiar enancjomeryczny produktów (ee_p), stopień konwersji (C) oraz enancjoselektywność (E). Wszystkie te parametry są istotne dla oceny wydajności i selektywności reakcji rozdzielania kinetycznego. W praktyce laboratoryjnej dąży się do maksymalnej optymalizacji warunków prowadzenia reakcji tak, by zwiększyć jej selektywność i otrzymać jak najbardziej enancjomerycznie czysty produkt [26, 110].

6.1. NADMIAR ENANCJOMERYCZNY

Nadmiar enancjomeryczny (ee , ang. *enantiomeric excess*) jest miarą czystości enancjomerycznej w mieszaninie enancjomerów i określa stopień dominacji jednego enancjomery nad drugim. Wielkość ta informuje nas o efektywności rozdzielania mieszaniny racemicznej. Jest to wyrażony w procentach stosunek różnicy zawartości enancjomerów w danej mieszaninie do sumy ich zawartości w tej mieszaninie. Oblicza się go zarówno dla substratów – nadmiar enancjomeryczny substratów (ee_s) jak i dla produktów – nadmiar enancjomeryczny produktów (ee_p) na podstawie danych ilościowych, np.: pól powierzchni pików otrzymanych w wyniku chiralnego rozdzielania chromatograficznego. Nadmiar enancjomeryczny jest ważnym wskaźnikiem w reakcjach enancjoselektywnych. Wyższa wartość nadmiaru enancjomerycznego oznacza większą czystość enancjomeryczną, co jest pożądane w wielu dziedzinach, takich jak farmacja, chemia organiczna i produkcja leków. Wzory służące do obliczenia nadmiaru enancjomerycznego substratów oraz produktów przyjmują postać (**Rycina 27 i Rycina 28**) [25, 111, 112]:

$$ee_s = \frac{|R - S|}{R + S}$$

Rycina 27 Wzór wykorzystywany do obliczenia nadmiaru enancjomerycznego substratów, gdzie: ee_s - nadmiar enancjomeryczny substratów; R – pole powierzchni piku chromatograficznego uzyskanego podczas rozdzielania chromatograficznego dla enancjomeru R(-); S - pole powierzchni piku chromatograficznego uzyskanego podczas rozdzielania chromatograficznego dla enancjomeru S(+)

$$ee_p = \frac{|R - S|}{R + S}$$

Rycina 28 Wzór wykorzystywany do obliczenia nadmiaru enancjomerycznego produktów, gdzie: ee_p - nadmiar enancjomeryczny produktów; R – pole powierzchni piku chromatograficznego uzyskanego podczas rozdzielania chromatograficznego dla enancjomeru R(-); S - pole powierzchni piku chromatograficznego uzyskanego podczas rozdzielania chromatograficznego dla enancjomeru S(+)

Nadmiar enancjomeryczny równy 100% oznacza, że w skład mieszaniny wchodzi tylko jeden enancjomer, natomiast wartość 0% oznacza racemat (równomolową mieszaninę enancjomerów danego związku) [112].

6.2. ENANCJOSELEKTYWNOŚĆ

Enancjoselektywność (E, ang. *enantioselectivity* lub *enantiomeric ratio*) określana jest również jako stosunek enancjomeryczny. Pozwala określić, która reakcja jest enancjoselektywna. W przypadku enzymatycznego rozdzielania kinetycznego to parametr, który mierzy zdolność enzymu do rozróżniania enancjomerów. Na jego podstawie możemy ocenić enancjoselektywność reakcji oraz porównać aktywności stereoselektywne badanych enzymów. Dla reakcji nieselektywnych E przyjmuje wartość 1. Aby uznać reakcję za enancjoselektywną wartość E powinna wynosić co najmniej 20. Jednak wysokie wartości E są mniej dokładnie, ponieważ stosunek enancjomeryczny jest funkcją logarymiczną czystości enancjomerycznej. Enancjoselektywność można obliczyć na podstawie wartości konwersji i nadmiaru enancjomerycznego produktów lub substratów (**Rycina 29** i **Rycina 30**) [25] [111, 112].

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 + ee_s)]}{\ln[(1 - c)(1 - ee_s)]}$$

Rycina 29 Wzór służący do obliczenia enancjoselektywności z wykorzystaniem ee_s , gdzie: E – Enancjoselektywność; c - współczynnik konwersji [%]; ee_s - nadmiar enancjomeryczny substratów [%]

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 + ee_p)]}{\ln[(1 - c)(1 - ee_p)]}$$

Rycina 30 Wzór służący do obliczenia enancjoselektywności z wykorzystaniem ee_p , gdzie: E – Enancjoselektywność; c - współczynnik konwersji [%]; ee_p - nadmiar enancjomeryczny produktów [%]

6.3. KONWERSJA

Współczynnik konwersji (C, ang. *conversion lub conversion rate*) w odniesieniu do reakcji enancjoselektywnej określa stopień przemiany racemicznego substratu w preferowany enancjomer (produkt reakcji). Jest to miara wydajności reakcji rozdziału kinetycznego. Wyrażany stosunkiem nadmiaru enancjomerycznego substratów do sumy nadmiaru enancjomerycznego substratów i produktów [25, 111, 112]. Obliczamy go na podstawie poniższego wzoru (**Rycina 31**):

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \times 100\%$$

Rycina 31 Wzór wykorzystywany do obliczenia współczynnika konwersji, gdzie: c – współczynnik konwersji [%]; ee_s - nadmiar enancjomeryczny substratów [%]; ee_p - nadmiar enancjomeryczny produktów [%]

W przypadku modelowej reakcji enancjoselektywnej na drodze rozdziału kinetycznego, oczekuje się, że współczynnik konwersji wyniesie 50%. Wynika to z założenia, że reakcja jest selektywna tylko dla jednego enancjomeru, podczas gdy drugi enancjomer nie ulega przemianie i jego stała szybkości reakcji wynosi $k = 0$. Należy jednak zauważyć, że choć reakcja może osiągnąć wysoki współczynnik konwersji, to wciąż może być obecny pewien stopień zanieczyszczenia drugim enancjomerem. W celu oceny czystości enancjomerycznej produktu stosuje się dodatkowe wskaźniki, takie jak wspomniane wyżej nadmiar enancjomeryczny lub enancjoselektywność [25, 112].

7. CEL PRACY

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była optymalizacja warunków reakcji rozdziału kinetycznego wybranych substancji czynnych z wykorzystaniem lipaz jako enancjoselektywnych biokatalizatorów w dwufazowym układzie katalitycznym składającym się z rozpuszczalnika organicznego oraz cieczy jonowej.

W zrealizowanych badaniach analizowano różne czynniki wpływające na rozdział kinetyczny, takie jak: rodzaj lipazy, czas inkubacji, medium reakcyjne czy zastosowanie cieczy jonowej. Analizy zostały przeprowadzone z wykorzystaniem ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LCMS-MS/MS) lub detektorem DAD. W ramach realizowanych prac badawczych oceniono wpływ wyżej wymienionych czynników na wartość parametrów takich jak: enancjoselektywność, czystość enancjomeryczna produktów oraz substratów, a także stopień konwersji realizowanych rozdziałów kinetycznych.

Cel pracy realizowano poprzez:

- a) analizę literatury naukowej dotyczącej rozdziałów kinetycznych produktów leczniczych stosowanych w kardiologii na przykładzie leków β -adrenolitycznych;
- b) optymalizację procesu rozdziału chromatograficznego (*R,S*)-atenololu, (*R,S*)-1-fenyletanolu oraz (*R,S*)-klopidogrelu z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych chiralnych faz stacjonarnych oraz systemów HPLC i UPLC-MS/MS;
- c) optymalizację rozdziałów kinetycznych (*R,S*)-atenololu, (*R,S*)-1-fenyletanolu oraz (*R,S*)-klopidogrelu na drodze enancjoselektywnej biotransformacji z zastosowaniem dwufazowych układów katalitycznych zawierających cieczy jonowe;
- d) testowanie i ocenę aktywności wykorzystanych lipaz w kolejnych cyklach reakcyjnych enancjoselektywnej biotransformacji (*R,S*)-atenololu, (*R,S*)-1-fenyletanolu oraz (*R,S*)-klopidogrelu.

8. WYNIKI I DISKUSJA WYNIKÓW

8.1. ENZYMATYCZNA ENANCJOSELEKTYWNA BIOTRANSFORMACJA CHIRALNYCH SUBSTANCJI AKTYWNYCH NA PRZYKŁADZIE LEKÓW WYKORZYSTYWANYCH W TERAPII NADCIŚNIENIA [P1]

Opis dotyczy pracy [P1]: Joanna Chałupka, Adam Sikora, A. Kozicka, Michał Piotr Marszałł.
Overview: enzyme-catalyzed enantioselective biotransformations of chiral active compounds used in hypertension treatment, *Current Organic Chemistry*, 2020, Vol. 24, nr 23, s. 2782-2791.

Enzymatyczny rozdział kinetyczny jest jedną z metod pozwalających na otrzymanie enancjomerycznie czystych substancji aktywnych. W przeciwieństwie do klasycznej syntezy organicznej, reakcje enzymatyczne charakteryzują się łagodnymi warunkami reakcji oraz niewielką ilością produktów ubocznych, przez co są bezpieczniejsze dla środowiska. Celem przeprowadzonego w ramach rozprawy doktorskiej przeglądu systematycznego była analiza danych literaturowych dotyczących enzymatycznego rozdziału kinetycznego leków β -adrenolitycznych.

Leki β -adrenolityczne są szeroko stosowane w leczeniu nadciśnienia tętniczego i zaburzeń sercowo-naczyniowych. Ze względu na fakt, że β -blokery posiadają w swojej strukturze asymetryczny atom węgla, występują w dwóch formach enancjomerycznych. Dostępne literaturowo dane zgodnie potwierdzają, że (*S*)-enancjomery tych leków wykazują pożądaną efekt terapeutyczny, podczas gdy podawanie racematów może powodować wystąpienie niebezpiecznych skutków ubocznych, takich jak skurcz oskrzeli lub rozwój cukrzycy. Pomimo dowodów, β -blokery są wciąż komercyjnie dostępnymi lekami stosowanymi w terapii schorzeń sercowo-naczyniowych głównie jako racematy.

Enzymatyczne rozdziały kinetyczne (*R,S*)-atenololu oraz (*R,S*)-propranololu zostały szczegółowo opisane w literaturze naukowej przez 7 niezależnych zespołów badawczych. Wszystkie opisywane reakcje polegały na przeprowadzeniu enancjoselektywnych transestryfikacji odpowiedniego β -blokeru ((*R,S*)-atenololu lub (*R,S*)-propranololu) z octanem winylu, octanem izopropenyli lub butanianem winylu. Naukowcy testowali wiele układów

katalitycznych z zastosowaniem różnych enzymów, jednak najczęściej stosowane były lipazy z *Candida antarctica* oraz z *Candida rugosa*. Każdy zespół naukowy wykorzystywał organiczne solwenty jako środowisko reakcji, takie jak: acetonitryl, chloroform, eter diisopropylowy, metanol, tetrahydrofuran czy toluen. Niemniej wszystkie wymienione wyżej rozpuszczalniki są potencjalnie szkodliwe dla środowiska oraz mogą negatywnie wpływać na stabilność operacyjną i aktywność katalityczną białkowego katalizatora. Należy podkreślić, iż tylko jeden zespół naukowy, Dwivedee i wsp., przeprowadził rozdział kinetyczny z zastosowaniem dwufazowego układu katalitycznego, który składał się z cieczy jonowej ([EMIM][BF₄]) oraz toluenu [113]. Takie podejście wiązało się ograniczeniem szkodliwego wpływu organicznych rozpuszczalników na środowisko, a także umożliwiło uzyskanie produktu o wysokiej czystości enancjomerycznej. Co więcej dwufazowy układ katalityczny umożliwia łatwe odseparowanie enzymu oraz substratów i produktów ze środowiska reakcji, co w konsekwencji pozwala na ponowne wykorzystanie katalizatora w kolejnych cyklach katalitycznych.

Rezultaty omawianych badań zostały szczegółowo opisane w publikacji pt.: „Overview: Enzyme-catalyzed Enantioselective Biotransformation of Chiral Active Compounds Used in Hypertension Treatment” opublikowanej w *Current Organic Chemistry*: 2020, 24, 1-10, w której autorami byli: Joanna Chałupka, Adam Sikora, Aleksandra Kozicka, Michał Piotr Marszał [P1].

MINI-REVIEW ARTICLE

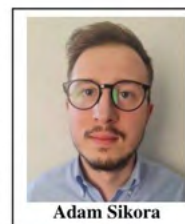
Overview: Enzyme-catalyzed Enantioselective Biotransformation of Chiral Active Compounds Used in Hypertension Treatment

Joanna Chalupka¹, Adam Sikora^{1,*}, Aleksandra Kozicka² and Michał Piotr Marszałł¹¹Department of Medicinal Chemistry, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Faculty of Pharmacy, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Dr. A. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz, Poland; ²Department of Medical Genetics, University in Cambridge, Lv 6 Addenbrooke's Treatment Centre, Cambridge, United Kingdom

ARTICLE HISTORY

Received: July 19, 2020
Revised: September 16, 2020
Accepted: September 22, 2020DOI:
10.2174/1385272824999201020204256

Abstract: Enzymatic kinetic resolution is one of the methods which allows for the synthesis of enantiomerically pure various active pharmaceutical ingredients. In contrast to chemical routes, enzymatic reactions have characteristics, including mild reaction conditions, a few by-products, and relatively high activity of the used enzymes. β -adrenolytic drugs are widely used in the treatment of hypertension and cardiovascular disorders. Due to the fact that β -blockers possess an asymmetric carbon atom in their structure, they are presented in two enantiomeric forms. It was reported by many studies that only the (*S*)-enantiomers of these drugs possess the desired therapeutic effect, whereas the administration of the racemate may cause dangerous side effects, such as bronchoconstriction or diabetes. Nevertheless, β -blockers are still commercially available drugs mainly used in medicine as racemates, whereas there are several methods that are widely used in order to obtain enantiomerically pure compounds.



Adam Sikora

Keywords: Enzyme, kinetic resolution, lipase, cardiology, chiral compounds, β -blockers.

1. INTRODUCTION

At Present, there are several methods, which allow to obtain enantiomerically pure compounds – based on the applied substrates. These include organic synthesis with the use of “chiral pool”, which are optically pure substrates, resolution of the racemate, as well as asymmetric synthesis by using pro-chiral substrates [1]. The use of enzymes in various biotransformations is widely studied and described by numerous scientists [2-55]. Enzymes as biocatalysts could be used in racemate resolution and stereoselective syntheses [56-60]. However, the application of optically pure substrates seems to be the optimal choice, because it allows to obtain optically pure compounds in the shortest time and without any additional chemical reactions [61-64]. Nevertheless, Kinetic Resolution (KR) is the method which is most often applied in order to obtain enantiomerically pure compounds because, compared to the “chiral pool”, it is significantly cheaper and as emphasized by many scientists, it is more eco-friendly [65].

Nowadays, the chirality of drugs has become an interesting area in the field of development, design, discovery, and marketing of new drugs. It is visible by an increased global trend in the amount of new-approved enantiomerically pure medicines. During the past decade, the majority of new molecular entities (NMEs) approved worldwide were single enantiomers, representing 130 out of 205 of all NMEs (63%). The second place was obtained by achiral compounds, amounting to 56 of all NMEs (27%). Additionally, it

should be noted that globally, in 2010, no single racemic drug was approved [66]. The racemic drugs possessing asymmetric carbon atom occur in two enantiomeric forms. Although the physical and chemical properties of both enantiomers are similar, they could very often differ from each other in the biological effects, which was proven by numerous scientific studies. In the case of β -blockers, mostly the (*S*)-enantiomers of these drugs are responsible for desired therapeutic effects, due to their higher affinity to the β -adrenergic receptors, compared to their antipodes. [67]. Therefore, the (*R*)-enantiomers of β -blockers usually possess no effect at all or can cause some adverse effects, such as diabetes or bronchoconstriction. Nevertheless, β -blockers are mainly administered to patients as racemic mixtures and are one of the most frequently used agents in medicine [68, 69].

2. METHODOLOGY

A systematic investigation of all published and unpublished literature, including oral presentations, was conducted to minimize the risk of bias. A database search, including PubMed, Web of Knowledge, and Google Scholar databases, without time limitations, was conducted by three independent investigators (J.C. A.S., and A.K.). The following keywords were applied: “atenolol” and “kinetic resolution”, “propranolol” and “kinetic resolution”, “sotalol” and “kinetic resolution”, “pindolol” and “kinetic resolution”, “beta-blocker” and “kinetic resolution”. References of retrieved studies were searched manually for additional studies and reviews. No language restrictions were applied. Data were abstracted on prespecified forms. All divergences were resolved by discussion with a fourth investigator (M.P.M.). Experimental studies reporting the kinetic resolution of entities used in cardiology were considered eligible. Reviews were also considered by the source of citations of

*Address correspondence to this author at the Department of Medicinal Chemistry, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Faculty of Pharmacy, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Dr. A. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz, Poland; Tel.: +48 52 5853540; Fax: +48 525853529; E-mail: adam.sikora@cm.umk.pl

relevant studies and interpretation of their results. After a systematic search, 1719 citations were identified: 134 in Web of Knowledge, 1503 in Google Scholar, 68 in PubMed. Duplicate / multiple citations and reviews not containing any relevant information were excluded. Finally, 11 original reports directly related to the enzymatic kinetic resolution of racemic atenolol and propranolol were considered eligible for inclusion in the paper [70-80]. The detailed flow chart of the selection of studies is shown in Fig. (1).

3. KINETIC RESOLUTION OF CHIRAL COMPOUNDS

There are several methods that are widely used in order to obtain enantiomerically pure compounds, such as stereoselective synthesis and resolution of racemates. Kinetic resolution is one of the methods which is applied in the resolution of racemates, where one enantiomer from the reaction medium is transferred to the product much faster than the other one. However, a kinetic resolution is required to be catalyzed by a chemocatalyst or biocatalyst, such as a microorganism or enzyme. Nevertheless, lipases as biocatalysts have been commonly applied in numerous studies in the enantioselective esterification, enantioselective transesterification, and enantioselective hydrolysis [81-101].

The enantioselective esterification, as well as enantioselective transesterification, is an organic reaction, where one of the enantiomers of a chiral drug is converted to the ester in the presence of

appropriate lipase as a biocatalyst. The main role of lipase in above-mentioned reactions is to lower the esterification activation energy to only one of two enantiomers from the reaction mixture. Thus, the kinetic resolution of chiral drugs relies on composing the proper reaction system, which includes a mixture of appropriate lipase (in a native or immobilized form) and a specific solvent as a reaction medium. Then, it is possible to compare obtained results of performed enantioselective biotransformation by the value of conversion (c), enantiomeric excess of product and substrate (ee_p/ee_s) as well as the value of enantioselectivity (E-ratio; E). Numerous studies confirmed that there are many different factors having a great impact on the efficiency and efficacy of kinetic resolution, such as reaction medium, temperature, reaction time, and even agitation speed while incubated [102-105]. The stereospecific esterification, as a resolution of racemic compounds, could be achieved in non-aqueous media, whereas in aqueous media, the resolution is extended to enantioselective hydrolysis of the corresponding esters [106-108].

4. ENANTIOSELECTIVE BIOTRANSFORMATION OF RACEMIC ATENOLOL

Among all of the performed studies focused on the kinetic resolution of β -adrenolytic drugs, racemic atenolol is the compound, which is most often biotransformed by scientists and described (Table 1).

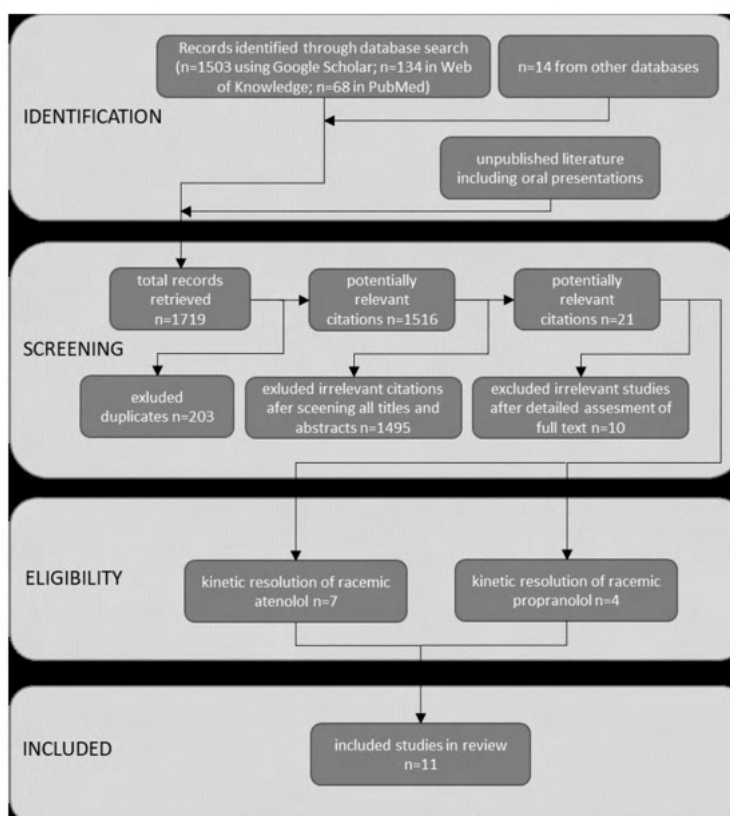


Fig. (1). The flow chart of studies selection.

Table 1. List of studies dedicated to enzymatic kinetic resolution of racemic atenolol. In bold were selected the components, which resulted in obtaining the best conditions of described biotransformation.

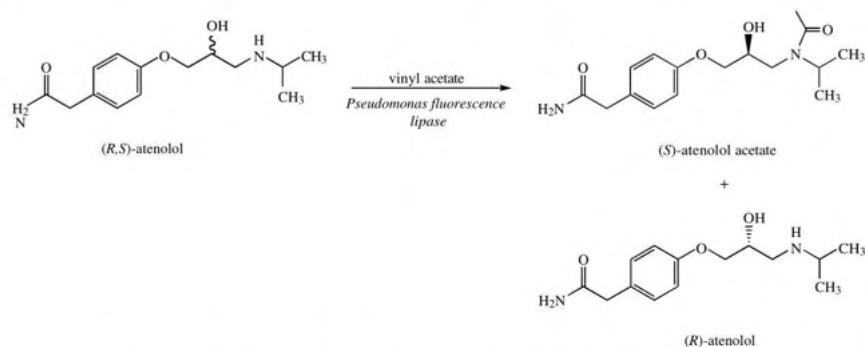
Author	Reference	Enantioselectivity	Enzyme Lipase	Acetylating Agent	Reaction medium
Agustian <i>et al.</i>	[70]	17	<i>Pseudomonas fluorescense</i>	Vinyl acetate	Tetrahydrofuran
Barbosa <i>et al.</i>	[71]	65	<i>Candida antarctica B</i>	Vinyl acetate	Toluene, Hexane
Dvivedee <i>et al.</i>	[72]	210	<i>Candida antarctica A</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> (PCL), <i>Mucor meihei</i> (MML), <i>Candida rugosa</i> (CRL L8525), <i>Candida rugosa</i> (CRL L1754), <i>Candida rugosa</i> (CRL 62316), <i>Candida cylindracea</i> (CCL), <i>Aspergillus niger</i> (ANL), porcine pancreas lipase (PPL), lipase AY "Amano 30" (CRL).	Vinyl acetate	[EMIM]BF ₄ in toluene, acetonitrile, 1,3-dioxane, diethylether, dichloromethane, tertiary butyl methyl ether, benzene.
Lund <i>et al.</i>	[73]	278	<i>Candida antarctica B</i>	Vinyl butanoate	Toluene
Sikora <i>et al.</i>	[74-76]	67	<i>Candida rugosa</i> (OF), <i>Candida rugosa</i> (MY), <i>Alcaigenes fecalis</i> (QLM), <i>Pseudomonas strutzeri</i> (TL), <i>Candida antarctica</i> (CALBY), <i>Aspergillus niger</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> (SL) <i>Alcaigenes sp.</i> (PL).	Isopropenyl acetate, vinyl acetate	Toluene, acetonitrile, diisopropyl ether, tert-butyl methyl ether, tetrahydrofuran, chloroform.

Agustian *et al.* [70] conducted the study in which authors tested the influence of reaction parameters on the kinetic resolution of racemic atenolol with the use of free lipase from *Pseudomonas fluorescense* (Fig. 2). The investigation was conducted *via* transesterification reaction for the production of pharmacologically active (*S*)-atenolol with high enantiomeric purity. Moreover, the authors tested the effect of diversity of substrate concentration, reaction temperature, molar ratio of substrate-acetyl donor as well as enzyme loading. Additionally, the authors investigated the agitation speed and stated that the enantioselectivity $E = 12-15$ was obtained while agitation speed equaled 170-230 rpm. Therefore, the speed of 200 rpm was chosen as the optimum value because, according to the results, it gave the highest conversion of (*S*)-atenolol. Then, the authors tested the influence of temperature on the proposed biotransformation of racemic atenolol. The range of investigated temperatures was 30-50 °C, however, the acceptable enantioselectivity ($E = 17$) was found when the temperature equaled 45 °C. The ratios of substrate-acetyl donors were also examined. The conversion of the performed kinetic resolution was in the range of 44.67-61.58 % with $E = 12-23$ during the variation of the substrate molar ratio.

Barbosa *et al.* [71] conducted a kinetic resolution of racemic atenolol with the use of lipase B from *Candida antarctica*. The authors tested the influence of the immobilization protocol of used

enantioselective enzymes in organic media on enantiospecific production of atenolol acetate. The reaction was carried out in toluene or hexane. The acetylating agent was vinyl acetate (33.3 mM). The authors also investigated the concentration of racemic atenolol, whose range was 3.3-16.6 mM. Before reaction, the water activity of the reaction was adjusted to the value of $a_w = 0.15$ by pre-equilibration in the presence of saturated salt solution MgCl₂. The reaction was incubated at 25 °C and continuously shaken at 200 rpm. The authors tested the immobilization protocol of *Candida antarctica* lipase on various modified Eupergit C (EC) supports (Fig. 3). As it turned out, the best value of enantioselectivity ($E = 65$) was obtained by using enzyme immobilized onto EC and toluene as a reaction medium. The (*R*)-enantiopreference was observed for all tested complexes of enzyme-support.

Dvivedee *et al.* [72] carried out an environmental-friendly synthesis of (*S*)-atenolol, which was based on a kinetic resolution in an ionic liquid study with the use of intermediates in an aqueous medium. During the study, the screening of different lipases from *Pseudomonas cepacia*, *Candida antarctica*, and *Candida rugosa* was conducted. *Candida antarctica* lipase A was chosen for kinetic resolution because of the highest enantioselectivity during the reaction of transesterification of racemic alcohol with the use of vinyl acetate as the acyl donor (Fig. 4). The reactions, with the use of lipase from *Candida antarctica*, were conducted in toluene as an

**Fig. (2).** Kinetic resolution of racemic atenolol with the use of vinyl acetate as acetylating agent and lipase from *Pseudomonas fluorescense*.

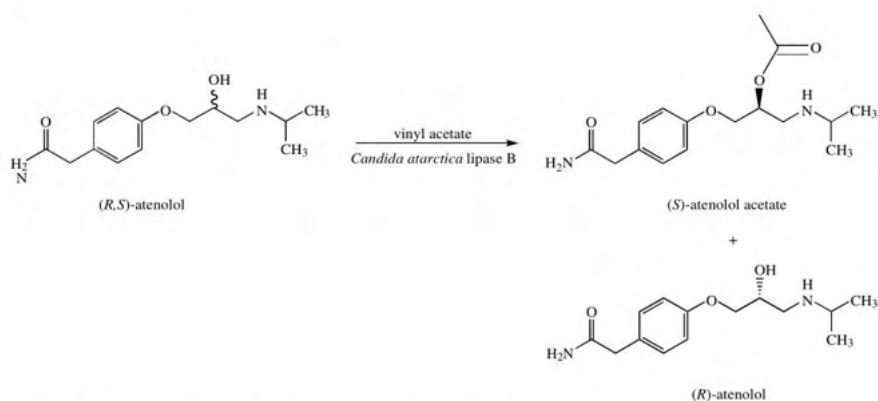


Fig. (3). Kinetic resolution of racemic atenolol with the use of vinyl acetate as acetylating agent and lipase from *Candida antarctica*.

organic solvent with the addition of ionic liquid [EMIM][BF₄]. The authors tested other organic solvents, such as acetonitrile, 1,4-dioxane, diethylether, dichloromethane, *t*-butyl-methyl ether, and benzene, however, toluene characterized the best chemical features, and its use allowed to achieve the best values of enantioselective parameters. The effect of various acyl donors was also investigated. The authors tested benzyl acetate, isopropenyl acetate, vinyl acetate, and ethyl acetate, and, according to their studies, the choice of vinyl acetate allowed to obtain the best values of enantiomeric excesses of both substrates and products as well as the conversion of reaction. Finally, the described reactions facilitate to get the (*S*)-atenolol along with (*R*)-atenolol acetate with $C = 48,9\%$, $E = 210$, $ee_p = 96,9\%$ and $ees = 91,1\%$.

Lund *et al.* [73] investigated the kinetic resolution of the racemic building block of atenolol. The authors performed enantioselective biotransformation of 4-(3-chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl)acetamide with the use of lipase B from *Candida antarctica* with vinyl butanoate as acyl donor in acetonitrile as reaction medium (Fig. 5). The reactions were incubated for 27h before the solvent was removed, and the enzyme was filtered off. The synthesis was conducted in New Brunswick Incubator Shaker at 30 °C agitating at 200 rpm. The process of enantioselective transesterification started by adding 20 mg of CALB. Finally, the authors obtained the prod-

uct with a high value of enantiomeric purity and enantioselectivity, which was $ee_p = 99\%$ and $E = 278$.

Sikora *et al.* conducted a kinetic resolution of racemic atenolol with the use of lipase from *Candida rugosa* in the native and immobilized form [74-76]. In the described studies, the authors decided to investigate the influence of various enzymes in native form and organic solvents as reaction media as well the impact of acetylating agent, such as isopropenyl acetate and vinyl acetate, on the effectiveness of enantioselective biotransformation of racemic atenolol. Finally, the authors stated that the application of toluene as reaction medium, lipase from *Candida rugosa*, and isopropenyl acetate as acetylating agent resulted in achieving the best parameters of performed kinetic resolution of (*R,S*)-atenolol (Fig. 6). The enantioselectivity was $E = 66,9$ and the enantiomeric excess of products was $ee_p = 94,1\%$, whereas the conversion was $c = 41,84\%$. In other studies, the authors decided to investigate the influence of enzyme immobilization on enantioselective biotransformation of racemic atenolol. The immobilization of the enzyme was performed with the use of sulfo-NHS and EDC onto the surface of previously synthesized chitosan magnetic nanoparticles. The magnetic carriers were coated with modified chitosan with various numbers of long-distanced free amino groups.

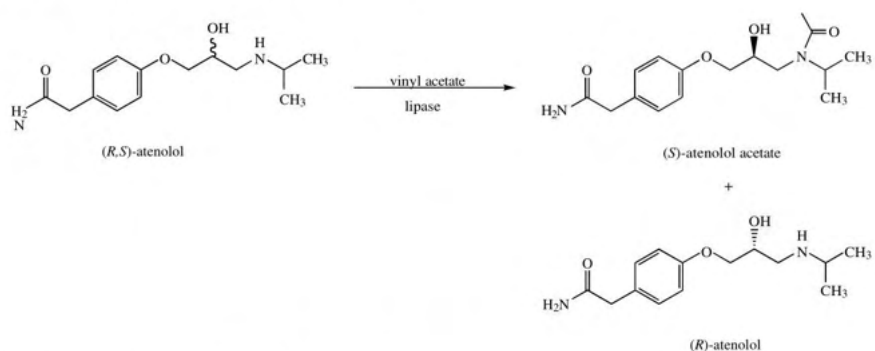


Fig. (4). Kinetic resolution of the racemic substrate further used in the synthesis of enantiomerically pure atenolol, along with the use of vinyl acetate as an acetylating agent and various lipases.

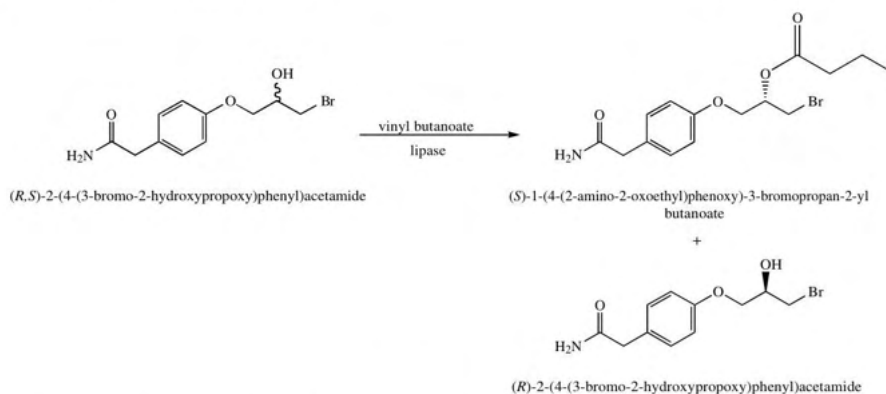


Fig. (5). Kinetic resolution of racemic substrate further used in the synthesis of enantiomerically pure atenolol with the use of vinyl butanoate as acetylating agent and various lipases.

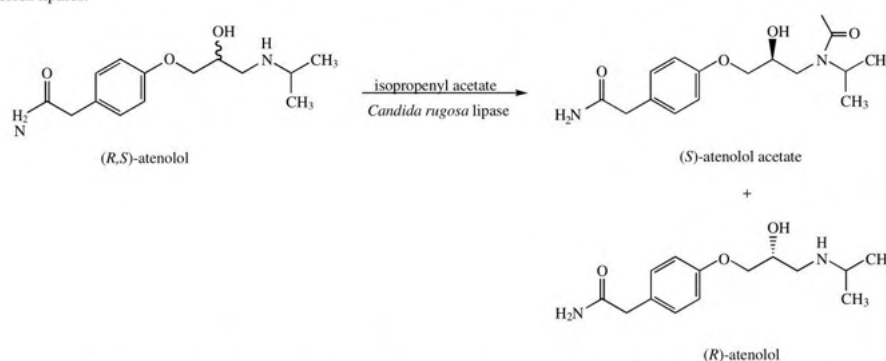


Fig. (6). Kinetic resolution of racemic atenolol with the use of isopropenyl acetate as acetylating agent and lipase from *Candida rugosa*.

5. ENANTIOSELECTIVE BIOTRANSFORMATION OF RACEMIC PROPRANOLOL

Propranolol, chemically known as (1-iso-propylamino-3-(1-naphthoxy)-2-propanol), is one of the first commercially available beta-adrenergic blocking agents, however still widely used in medicine. It is mainly used in the treatment of hypertension and other cardiovascular diseases. It was confirmed by numerous studies that the desired therapeutic effect is connected with (*S*)-enantiomer of the drug, whereas the administration of a racemic mixture of propranolol could cause dangerous side effects, such as diabetes or bronchoconstriction. Nevertheless, propranolols, like above-mentioned atenolol, are commercially available in medicine only as a racemate. Therefore, there are plenty of numbers of research studies, which are focused on development and strategies, which allow to obtain (*S*)-propranolol with high enantiomeric purity (Table 2).

Chiou *et al.* [77] described the study in which the authors performed the kinetic resolution of racemic propranolol by lipase-catalyzed *N*-acetylation. The screening of various lipases in free form and reaction media was investigated. Finally, to obtain preliminary results during the performed studies, it was decided to perform enantioselective biotransformation of racemic propranolol with the use of lipase from *Candida rugosa* OF and isopropenyl acetate as an acetylating agent and isopropyl ether as reaction me-

dium (Fig. 7). The authors also claimed that the amino group of aminol has a higher nucleophilicity, therefore, it reacts with an acetylating agent. The other main outcome was that the solvents with higher values of hydrophobicities, such as toluene, isopropyl ether, and *t*-butyl methyl ether, generally allow to achieve better enantioselectivity when applied to enantioselective biotransformations.

Barbosa *et al.* tested enzyme preparations of lipase B from *Candida antarctica* (CAL-B) on kinetic resolution of (*R,S*)-propranolol. The enzyme was immobilized on partially modified Eupergit C supports and pure Eupergit C. Finally, as described by authors, enantioselectively synthesized vinyl acetate as an acyl donor and toluene as an organic solvent were used. However, the influence of toluene and hexane on the enantioselectivity of CAL-B was investigated. The use of toluene and hexane allowed to obtain a high enantiomeric ratio due to the high hydrophobicity of the above-mentioned organic media. The researchers decided to apply toluene because it is commonly used in this type of enantioselective esterification as water-repellent solvents characterized better enantioselectivity than hexane. Additionally, the authors claimed that the enol esters, as vinyl acetate, are the most suitable acetylating agents for kinetic resolution of esters. The enantioselectivity conducted with the use of vinyl acetate was higher than with the use of isopropenyl acetate. Therefore, the researchers decided to use vinyl

Table 2. List of studies dedicated to enzymatic kinetic resolution of racemic propranolol. In bold was selected the components which resulted in obtaining the best conditions of biotransformation.

Author	Reference	Enantioselectivity	Enzyme Lipase	Acetylating Agent	Reaction Medium
Chiou <i>et al</i>	[77]	20.7	<i>Burkholderia cepacian</i> (Amano PS), <i>Candida rugosa</i> MY, <i>Candida rugosa</i> OF, Amano L10, Amano AP15, Amano D20, <i>Candida rugosa</i> (Sigma)	Isopropenyl acetate , vinyl acetate	toluene, chloroform, tert-butyl methyl ether, tert-amyl alcohol, isopropyl ether , tetrahydrofuran, acetonitrile.
Barbosa <i>et al</i>	[78]	57.0	<i>Candida antarctica</i> B	Vinyl acetate	Toluene
Escorcía <i>et al</i>	[79, 80]	higher than 20	<i>Candida antarctica</i> B	Vinyl acetate	Mixture of toluene/methanol in various proportions

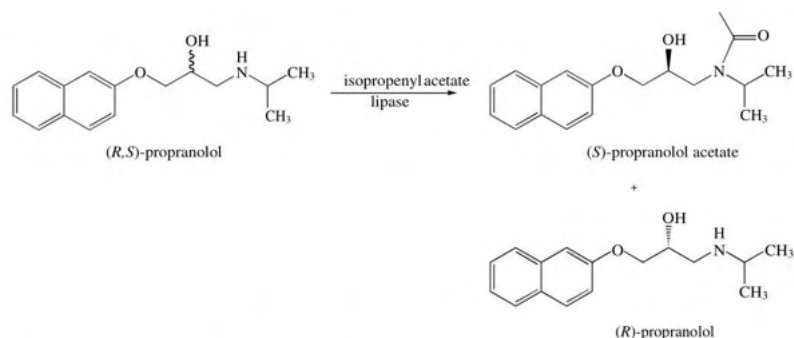


Fig. (7). Kinetic resolution of racemic propranolol with the use of vinyl acetate as acetylating agent and lipase from *Candida rugosa*.

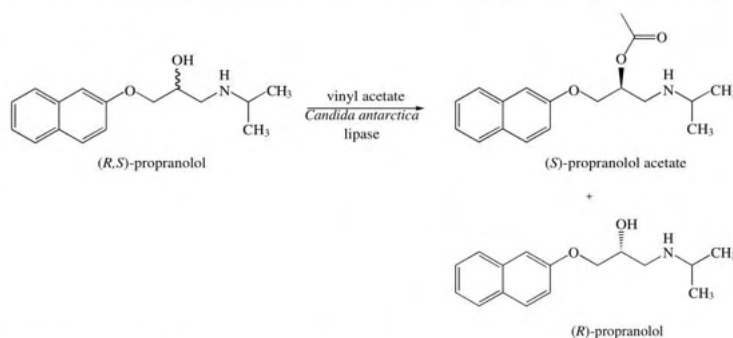


Fig. (8). Kinetic resolution of racemic propranolol with the use of vinyl acetate as acetylating agent and lipase from *Candida Antarctica*.

acetate as an acyl donor. In a study, CAL-B was immobilized on epoxy supports activated with different functional groups. The most effective catalytic system was obtained by applying *Candida antarctica* lipase immobilized onto epoxy supports without chemical modification (EC-CAL-B) (Fig. 8). The E-value equaled 57, whereas the enantiomeric excess of substrates was $ee_s = 96\%$.

Escorcía *et al.* [80] described an experimental and computational study of enantioselective acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. The authors stated that due to the low solubility of racemic atenolol in pure toluene, it was decided to apply the mixture of methanol and toluene. The researchers also investigated the addition of ethanol, hexane and THF, however, the solubility of propranolol in these media is on an insufficient level. Finally, two types of reaction mixtures were pre-

pared. The first mixture consisted of (R,S)-propranolol (39 mM) dissolved in a mixture of toluene/methanol (20 mL; 97/7 v/v) with the addition of vinyl acetate as an acetylating agent (117 mM). The other mixture contained (R,S)-propranolol (28 mM), which was dissolved in a mixture of toluene/methanol (5 mL; 96/4 v/v) and vinyl acetate (54 mM). The enantioselective acetylation of racemic propranolol was started by direct adding the lipase from *Candida antarctica* (3 mg) in free form, which was previously purified with the use of octyl agarose beads in both types of reaction mixtures. Then, the product was incubated at 200 rpm and 25 °C (Fig. 9). As the authors stated, the proposed catalytic system allowed to obtain O-propranolol acetate with high enantiomeric purity. After 12 h of reaction, the researchers obtained products with $ee_p = 95\%$, whereas the enantioselectivity was $E = 61$, but the conversion was only $c = 33\%$. Therefore, it was decided to incubate the reaction

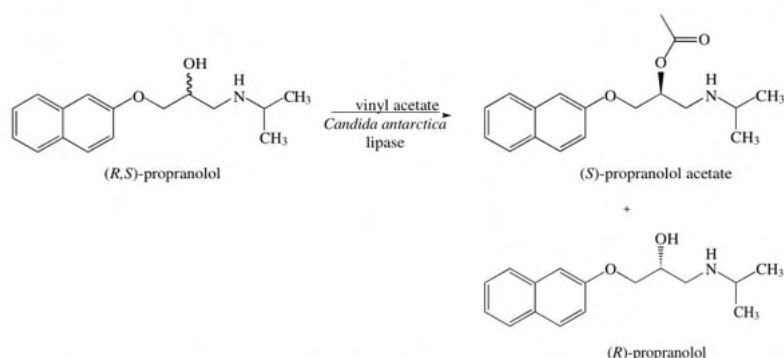


Fig. (9). Kinetic resolution of racemic propranolol with the use of vinyl acetate as acetylating agent and lipase from *Candida Antarctica*.

mixture longer and after 140h of reaction, the enantiomeric excess of products decreased and was only $ee_p = 22\%$, but the conversion was $c = 82\%$ and the enantiomeric excess of substrates was $ee_s = 99\%$, whereas the enantioselectivity was at the same high level ($E = 61$).

CONCLUSION

In recent years, the studies dedicated to enzymatic kinetic resolution of atenolol and propranolol have been investigated by numerous scientists. Generally, the performed enantioselective acetylation of β -adrenolytic drugs was performed in various organic solvents, however, the most often applied was toluene. Additionally, the scientists pointed out that the selection of proper lipase as enantioselective biocatalysts is crucial to achieve efficient kinetic resolution of the above-mentioned drugs. Nevertheless, among all reviewed studies, the most often applied were lipases from *Candida antarctica* and *Candida rugosa*. Furthermore, as it was reported, the impact of acetylating agents also played a key role in investigated biotransformation. The scientists tested both vinyl acetate and isopropenyl acetate, however, it is difficult to point out which is the most appropriate for kinetic resolution of β -blockers. When the authors decided to use lipase from *Candida antarctica*, the vinyl acetate as acetylation agent resulted in obtaining the products with a better value of enantiomeric excess, whereas when *Candida rugosa* lipase as biocatalyst was applied, the reactions were more efficient with the use of isopropenyl acetate.

In summary, there are many different reaction factors, which highly influence the effectiveness of the enantioselective acetylation of β -blockers. However, it is necessary to optimize the methods of kinetic resolution in order to obtain enantiomerically pure products.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

FUNDING

The project was partially supported by a research grant from the National Science Centre, 2017/27/N/NZ7/02424.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

REFERENCES

- Ghanem, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*, **2007**, *63*(8), 1721-1754. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2006.09.110>
- Tahir, H.M.; Abd Rahman, R.; Leow, A.T.C.; Ali, M.S.M. Expression, characterisation and homology modelling of a novel Hormone-Sensitive Lipase (HSL)-like esterase from *Glaciozyma antarctica*. *Catalysts*, **2020**, *10*(1), 58. <https://doi.org/10.3390/catal10010058>
- Liu, Y.Q.; Liu, J.G.; Kong, J.; Wang, R.; Liu, M.; Strappe, P.; Blanchard, C.; Zhou, Z.K. Citrate esterification of debranched waxy maize starch: structural, physicochemical and amylolysis properties. *Food Hydrocoll.*, **2020**, *2020*, 105704. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105704>
- Grajales-Hernández, D.A.; Velasco-Lozano, S.; Armendáriz-Ruiz, M.A.; Rodríguez-González, J.A.; Camacho-Ruiz, R.M.; Asalf-Torres, A.; López-Gallego, F.; Mateos-Díaz, J.C. Carrier-bound and carrier-free immobilization of type A feruloyl esterase from *Aspergillus niger*: searching for an operationally stable heterogeneous biocatalyst for the synthesis of butyl hydroxycinnamates. *J. Biotechnol.*, **2020**, *316*, 6-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.04.004> PMID: 32305629
- Sannino, F.; Costantini, A.; Ruffo, F.; Aronne, A.; Venezia, V.; Califano, V. Covalent immobilization of β -glucosidase into mesoporous silica nanoparticles from anhydrous acetone enhances its catalytic performance. *Nanomaterials (Basel)*, **2020**, *10*(1), e108. <http://dx.doi.org/10.3390/nano10010108> PMID: 31948120
- Malar, C.G.; Seenivasan, M.; Kumar, K.S.; Kumar, A.; Parthiban, R. Review on surface modification of nanocarriers to overcome diffusion limitations: an enzyme immobilization aspect. *Biochem. Eng. J.*, **2020**, *2020*, 157574. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2020.107574>
- Bezerra, R.M.; Monteiro, R.R.C.; Neto, D.M.A.; da Silva, F.F.M.; de Paula, R.C.M.; de Lemos, T.L.G.; Fechine, P.B.A.; Correa, M.A.; Bohn, F.; Gonçalves, L.R.B.; Dos Santos, J.C.S. A new heterofunctional support for enzyme immobilization: PEI functionalized Fe₃O₄ MNPs activated with divinyl sulfone. Application in the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme Microb. Technol.*, **2020**, *138*109560 <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109560> PMID: 32527529
- Can, H.; Yildiz, T.; Onar, H.C. Synthesis of chiral 1,3-keto-acetates through enzymatic kinetic resolution with amano lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *ChemistrySelect*, **2020**, *5*(25), 7543-7547. <http://dx.doi.org/10.1002/slct.202001987>
- Wang, B.; Zhu, B.L.; Gong, J.; Weng, J.S.; Xia, F.F.; Liu, W.Q. Resolution of racemic 1-(4-methoxyphenyl) ethanol using immobilized lipase with high substrate tolerance. *Biochem. Eng. J.*, **2020**, *2020*, 107559. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2020.107559>
- Błaszczak, J.; Kielbasinski, P. Quarter of a century after: a glimpse at the conformation and mechanism of *Candida antarctica* Lipase B. *Crystals (Basel)*, **2020**, *10*(5), 404. <http://dx.doi.org/10.3390/cryst10050404>
- Liu, D.M.; Dong, C. Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications. *Process Biochem.*, **2020**, *92*, 464-475. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.005>

- [12] Zhang, Y.Y.; Sun, Y.J.; Tang, H.; Zhao, Q.X.; Ren, W.J.; Lv, K.Y.; Yang, F.K.; Wang, F.Y.; Liu, J.H. One-pot enzymatic synthesis of enantiopure 1,3-oxathiolanes using *Trichosporon laibachii* lipase and the kinetic model. *Org. Process Res. Dev.*, **2020**, *24*(4), 579-587. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00010>
- [13] Feng, X.; Guo, J.; Zhang, R.; Liu, W.; Cao, Y.; Xian, M.; Liu, H. An aminotransferase from *Enhydrobacter aerossacus* to obtain optically pure β -phenylalanine. *ACS Omega*, **2020**, *5*(14), 7745-7750. <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.9b05416> PMID: 32309682
- [14] Siren, S.; Dahlström, K.M.; Puttreddy, R.; Rissanen, K.; Salminen, T.A.; Scheinin, M.; Li, X.G.; Liljebäck, A. *Candida antarctica* Lipase A-based enantioselective recognition of a highly strained 4-Dibenzocyclooctynol (DIBO) used for PET imaging. *Molecules*, **2020**, *25*(4), e879. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25040879> PMID: 32079253
- [15] Diaz-Vidal, T.; Rosales-Rivera, L.C.; Mateos-Diaz, J.C.; Rodriguez, J.A. A series of novel esters of capsaicin analogues catalyzed by *Candida antarctica* lipases. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **2020**, *25*(1), 94-103. <http://dx.doi.org/10.1007/s12257-019-0290-4>
- [16] Hegyesi, N.; Hodosi, E.; Polyák, P.; Faludi, G.; Balogh-Weiser, D.; Pukán-szky, B. Controlled degradation of poly- ϵ -caprolactone for resorbable scaffolds. *Colloids Surf. B Biointerf.*, **2020**, *186*, 110678. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110678> PMID: 31812078
- [17] Lokha, Y.; Arana-Peña, S.; Rios, N.S.; Mendez-Sanchez, C.; Gonçalves, L.R.B.; Lopez-Gallego, F.; Fernandez-Lafuente, R. Modulating the properties of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads by altering the immobilization conditions. *Enzyme Microb. Technol.*, **2020**, *133*, 109461. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109461> PMID: 31874681
- [18] Su, A.; Kiokekli, S.; Navivala, M.; Shirke, A.N.; Pavlidis, I.V.; Gross, R.A. Cutinases as stereoselective catalysts: specific activity and enantioselectivity of cutinases and lipases for menthol and its analogs. *Enzyme Microb. Technol.*, **2020**, *133*, 109467. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109467> PMID: 31874689
- [19] Shin, M.; Seo, J.; Baek, Y.; Lee, T.; Jang, M.; Park, C. Novel and efficient synthesis of phenethyl formate via enzymatic esterification of formic acid. *Biomolecules*, **2020**, *10*(1), e70. <http://dx.doi.org/10.3390/biom10010070> PMID: 31906270
- [20] Nagaroor, V.; Gummadi, S.N. Biochemical characterization of an esterase from *Clostridium acetobutylicum* with novel GYSMG pentapeptide motif at the catalytic domain. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2020**, *47*(2), 169-181. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-019-02253-8> PMID: 31807968
- [21] Ma, Z.; Mi, Y.; Han, X.; Li, H.; Tian, M.; Duan, Z.; Fan, D.; Ma, P. Transformation of ginsenoside via deep eutectic solvents based on choline chloride as an enzymatic reaction medium. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **2020**, *43*(7), 1195-1208. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-020-02314-8> PMID: 32140900
- [22] Marchut-Mikolajczyk, O.; Drożdżyński, P.; Struszczyk-Świta, K. Biodegradation of slop oil by endophytic *Bacillus cereus* EN18 coupled with lipase from *Rhizomucor miehei* (Palatase®). *Chemosphere*, **2020**, *250*, 126203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126203> PMID: 32092570
- [23] Kim, T.H.; Kang, S.H.; Han, J.E.; Seo, E.J.; Jeon, E.Y.; Choi, G.E.; Park, J.B.; Oh, D.K. Multistep engineering of enzyme cascade catalysis for one-pot preparation of nylon monomers from renewable fatty acids. *ACS Catal.*, **2020**, *10*(9), 4871-4878. <http://dx.doi.org/10.1021/acscatal.9b05426>
- [24] Jiang, Y.; Li, Z.; Zheng, S.; Xu, H.; Zhou, Y.J.J.; Gao, Z.; Meng, C.; Li, S. Establishing an enzyme cascade for one-pot production of α -olefins from low-cost triglycerides and oils without exogenous H₂O₂ addition. *Biotechnol. Biofuels*, **2020**, *13*(1), 52. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-020-01684-1> PMID: 32190117
- [25] Gomes, A.; Brito, M.V.; Marques, R.A.; Lima, L.B.; Cavalcante, I.M.; Vieira, T.D.N.; Nunes, F.M.; Lima, M.A.S.; Uchoa, D.E.; Lima, C.S.; Silva, G.S.; Candido, J.R.; Lima-Neto, P.; Mattos, M.C.; de Oliveira, F.L.S.; Zanatta, G.; Oliveira, M.C.F. Multi-step bioconversion of annonalide by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* and theoretical investigation of the decarboxylase pathway. *J. Mol. Struct.*, **2020**, *2020*, 1204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127514>
- [26] Elgharabawy, A.A.M.; Moniruzzaman, M.; Goto, M. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids: part II. *Biochem. Eng. J.*, **2020**, *2020*, 154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2019.107426>
- [27] Zhang, F.; Zhu, C.T.; Peng, Q.M.; Wang, F.Q.; Sheng, S.; Wu, Q.Y.; Wang, J. Enhanced permeability of recombinant *E. coli* cells with deep eutectic solvent for transformation of rutin. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2020**, *95*(2), 384-393. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.5949>
- [28] Perez-Venegas, M.; Tellez-Cruz, M.M.; Solorza-Feria, O.; Lopez-Munguia, A.; Castillo, E.; Juaristi, E. Thermal and mechanical stability of immobilized *Candida antarctica* Lipase B: an approximation to mechanochemical energetics in enzyme catalysis. *ChemCatChem*, **2020**, *12*(3), 803-811. <http://dx.doi.org/10.1002/cctc.201901714>
- [29] Lima, R.N.; dos Anjos, C.S.; Orozco, E.V.M.; Porto, A.L.M. Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. *Molecular Catalysis*, **2019**, *466*, 75-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcat.2019.01.007>
- [30] Lindeque, R.M.; Woodley, J.M. Reactor selection for effective continuous biocatalytic production of pharmaceuticals. *Catalysts*, **2019**, *9*(3), 262. <http://dx.doi.org/10.3390/catal9030262>
- [31] Xing, X.; Jia, J.Q.; Zhang, J.F.; Zhou, Z.W.; Li, J.; Wang, N.; Yu, X.Q. CALB Immobilized onto magnetic nanoparticles for efficient kinetic resolution of racemic secondary alcohols: long-term stability and reusability. *Molecules*, **2019**, *24*(3), e490. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24030490> PMID: 30704049
- [32] Zhao, Z.P.; Zhou, M.C.; Liu, R.L. Recent developments in carriers and non-aqueous solvents for enzyme immobilization. *Catalysts*, **2019**, *9*(8), 647. <http://dx.doi.org/10.3390/catal9080647>
- [33] Craveiro, R.; Meneses, L.; Durazzo, L.; Rocha, A.; Silva, J.M.; Reis, R.L.; Barreiros, S.; Duarte, A.R.C.; Paiva, A. Deep eutectic solvents for enzymatic esterification of racemic menthol. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2019**, *7*(24), 19943-19950. <http://dx.doi.org/10.1021/acsschemeng.9b05434>
- [34] Rios, N.S.; Morais, E.G.; Dos Santos Galvão, W.; Andrade Neto, D.M.; Dos Santos, J.C.S.; Bohn, F.; Correa, M.A.; Fecine, P.B.A.; Fernandez-Lafuente, R.; Gonçalves, L.R.B. Further stabilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* immobilized on octyl coated nanoparticles via chemical modification with bifunctional agents. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2019**, *141*, 313-324. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.003> PMID: 31491511
- [35] Nadar, S.S.; Rathod, V.K. One pot synthesis of α -amylase metal organic framework (MOF)-sponge via dip-coating technique. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2019**, *138*, 1035-1043. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.099> PMID: 31325508
- [36] Falcone, N.; Shao, T.; Rashid, R.; Kraatz, H.B. Enzyme entrapment in amphiphilic myristyl-phenylalanine hydrogels. *Molecules*, **2019**, *24*(16), e2884. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24162884> PMID: 31398913
- [37] Suman, S.K.; Patnam, P.L.; Ghosh, S.; Jain, S.L. Chicken feather derived novel support material for immobilization of laccase and its application in oxidation of veratryl alcohol. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2019**, *7*(3), 3464-3474. <http://dx.doi.org/10.1021/acsschemeng.8b05679>
- [38] Cha, H.J.; Park, J.B.; Park, S. Esterification of secondary alcohols and multi-hydroxyl compounds by *Candida antarctica* Lipase B and subtilisin. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **2019**, *24*(1), 41-47. <http://dx.doi.org/10.1007/s12257-018-0379-1>
- [39] Xu, Y.; Li, F.; Yang, K.X.; Qiao, Y.G.; Yan, Y.J.; Yan, J.Y. A facile and robust non-natural three enzyme biocatalytic cascade based on *Escherichia coli* surface assembly for fatty alcohol production. *Energy Convers. Manage.*, **2019**, *181*, 501-506. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2018.12.042>
- [40] Oelschlägel, M.; Zimmerling, J.; Tischler, D.; Review, A. A review: the styrene metabolizing cascade of side-chain oxygenation as biotechnological basis to gain various valuable compounds. *Front. Microbiol.*, **2018**, *9*, 490. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00490> PMID: 29623070
- [41] Fraatz, M.A.; Goldmann, M.; Geissler, T.; Gross, E.; Backes, M.; Hilmer, J.M.; Ley, J.; Rost, J.; Francke, A.; Zorn, H. Biotechnological production of methyl-branched aldehydes. *J. Agric. Food Chem.*, **2018**, *66*(10), 2387-2392. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04793> PMID: 29534574
- [42] Seo, E.J.; Yeon, Y.J.; Seo, J.H.; Lee, J.H.; Boñgol, J.P.; Oh, Y.; Park, J.M.; Lim, S.M.; Lee, C.G.; Park, J.B. Enzyme/whole-cell biotransformation of plant oils, yeast derived oils, and microalgae fatty acid methyl esters into nonanoic acid, 9-hydroxynonanoic acid, and 1,9-nonanedioic acid. *Biore-sour. Technol.*, **2018**, *251*, 288-294. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.036> PMID: 29288957
- [43] Garcia-Silvera, E.E.; Martinez-Morales, F.; Bertrand, B.; Morales-Guzmán, D.; Rosas-Galván, N.S.; León-Rodríguez, R.; Trejo-Hernández, M.R. Production and application of a thermostable lipase from *Serratia marcescens* in detergent formulation and biodiesel production. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2018**, *65*(2), 156-172. <http://dx.doi.org/10.1002/bab.1565> PMID: 28444972
- [44] Memarpoor-Yazdi, M.; Karbalaei-Heidari, H.R.; Doroodmand, M.M. Enantioselective hydrolysis of ibuprofen ethyl ester by a thermophilic immobilized lipase, ELT, from *Rhodothermus marinus*. *Biochem. Eng. J.*, **2018**, *130*, 55-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2017.11.016>
- [45] Sharma, A.; Meena, K.R.; Kanwar, S.S. Molecular characterization and bioinformatics studies of a lipase from *Bacillus thermoamylovorans* BHK67. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**, *107*(Pt B), 2131-2140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.092> PMID: 29051101
- [46] Xie, W.L.; Huang, M.Y. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto graphene oxide Fe₃O₄ nanocomposites: characterization and application for biodiesel production. *Energy Convers. Manage.*, **2018**, *159*, 42-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2018.01.021>
- [47] Aghababae, M.; Beheshti, M.; Bordbar, A.K.; Razmjou, A. Novel approaches to immobilize *Candida rugosa* lipase on nanocomposite membranes prepared by covalent attachment of magnetic nanoparticles on poly acrylonitrile membrane. *RSC Adv.*, **2018**, *8*(9), 4561-4570. <http://dx.doi.org/10.1039/C7RA11866J>

- [48] Arana-Pena, S.; Lokha, Y.; Fernandez-Lafuente, R. Immobilization of eversa lipase on octyl agarose beads and preliminary characterization of stability and activity features. *Catalysts*, **2018**, *8*(11), 511. <http://dx.doi.org/10.3390/catal8110511>
- [49] Adnan, M.; Li, K.; Xu, L.; Yan, Y.J. X-Shaped ZIF-8 for immobilization *Rhizomucor miehei* lipase via encapsulation and its application toward biodiesel production. *Catalysts*, **2018**, *8*(3), 96. <http://dx.doi.org/10.3390/catal8030096>
- [50] Rahmayetty; Whulanza, Y.; Sukirno; Rahman, S. F.; Suyono, E. A.; Yohda, M.; Gozan, M., Use of *Candida rugosa* lipase as a biocatalyst for L-lactide ring-opening polymerization and polylactic acid production. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **2018**, *16*, 683-691. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.015>
- [51] Wang, F.Q.; He, S.; Zhu, C.T.; Rabausch, U.; Streit, W.; Wang, J. The combined use of a continuous-flow microchannel reactor and ionic liquid cosolvent for efficient biocatalysis of unpurified recombinant enzyme. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2018**, *93*(9), 2671-2680. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.5621>
- [52] Musa, N.; Latip, W.; Abd Rahman, R.N.Z.; Salleh, A.; Ali, M.S.M. Immobilization of an antarctic pseudomonas AMS8 lipase for low temperature ethyl hexanoate synthesis. *Catalysts*, **2018**, *8*(6), 234. <http://dx.doi.org/10.3390/catal8060234>
- [53] Kianmehr, A.; Oladnabi, M.; Mahrooz, A.; Ansari, J.; Mahdizadeh, R. Enzymatic characterization of a NADH-dependent diaphorase from *Lysinibacillus* sp. strain PAD-91. *Protein Expr. Purif.*, **2018**, *146*, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2018.01.005> PMID: 29414067
- [54] Tian, K.; Tai, K.; Chua, B.J.W.; Li, Z.; Li, Z. Directed evolution of *Thermomyces lanuginosus* lipase to enhance methanol tolerance for efficient production of biodiesel from waste grease. *Bioresour. Technol.*, **2017**, *245*(Pt B), 1491-1497. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.108> PMID: 28571627
- [55] Bento, H.B.S.; de Castro, H.F.; de Oliveira, P.C.; Freitas, L. Magnetized poly(STY-co-DVB) as a matrix for immobilizing microbial lipase to be used in biotransformation. *J. Magn. Magn. Mater.*, **2017**, *426*, 95-101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.11.061>
- [56] Tarczykowska, A.; Sikora, A.; Marszall, M.P. Lipases - valuable biocatalysts in kinetic resolution of racemates. *Mini Rev. Org. Chem.*, **2018**, *15*(5), 374-381. <http://dx.doi.org/10.2174/1570193X15666171228145012>
- [57] Lesniarek, A.; Chojnacka, A.; Drodz, R.; Szymańska, M.; Gładkowski, W. Free and immobilized licitase™ ultra as the biocatalyst in the kinetic resolution of (*E*)-4-arylbut-3-en-2-yl esters. *Molecules*, **2020**, *25*(5), e1067. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25051067> PMID: 32120991
- [58] Mendoza-Ortiz, P.A.; Gama, R.S.; Gomez, O.C.; Luiz, J.H.H.; Fernandez-Lafuente, R.; Cren, E.C.; Mendes, A.A. Sustainable enzymatic synthesis of a solketal ester-process optimization and evaluation of its antimicrobial activity. *Catalysts*, **2020**, *10*(2), 218. <http://dx.doi.org/10.3390/catal10020218>
- [59] Liu, G.Y.; Zhang, P.L.; Xu, W.F.; Wang, L.J.; Tang, K.W. Lipase-catalyzed hydrolysis of (plus, -)-2-(4-methylphenyl) propionic methyl ester enhanced by hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2019**, *94*(1), 147-158. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.5756>
- [60] Toro, E.C.; Rodriguez, D.F.; Morales, N.; Garcia, L.M.; Godoy, C.A. Novel Combi-lipase systems for fatty acid ethyl esters production. *Catalysts*, **2019**, *9*(6), 546. <http://dx.doi.org/10.3390/catal9060546>
- [61] Dwivedee, B.P.; Soni, S.; Sharma, M.; Bhaumik, J.; Laha, J.K.; Banerjee, U.C. Promiscuity of lipase-catalyzed reactions for organic synthesis: a recent update. *ChemistrySelect*, **2018**, *3*(9), 2441-2466. <http://dx.doi.org/10.1002/slct.201702954>
- [62] Siodmiak, T.; Mangels, D.; Vander Heyden, Y.; Ziegler-Borowska, M.; Marszall, M.P. High enantioselective Novozym 435-catalyzed esterification of (R,S)-flurbiprofen monitored with a chiral stationary phase. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2015**, *175*(5), 2769-2785. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-014-1455-4> PMID: 25561056
- [63] Ghanem, A.; Aboul-Enein, H.Y. Application of lipases in kinetic resolution of racemates. *Chirality*, **2005**, *17*(1), 1-15. <http://dx.doi.org/10.1002/chir.20089> PMID: 15515046
- [64] Siodmiak, T.; Ziegler-Borowska, M.; Marszall, M.P. Lipase-immobilized magnetic chitosan nanoparticles for kinetic resolution of (R,S)-ibuprofen. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **2013**, *94*, 7-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.04.008>
- [65] Nishihara, T.; Shiomi, A.; Kadotani, S.; Nokami, T.; Itoh, T. Remarkably improved stability and enhanced activity of a Burkholderia cepacia lipase by coating with a triazolium alkyl-PEG sulfate ionic liquid. *Green Chem.*, **2017**, *19*(21), 5250-5256. <http://dx.doi.org/10.1039/C7GC02319G>
- [66] Agranat, I.; Wainschein, S.R.; Zusman, E.Z. The predicated demise of racemic new molecular entities is an exaggeration. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2012**, *11*(12), 972-973. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3657-c1> PMID: 23197042
- [67] Agesen, F.N.; Weeke, P.E.; Tfelt-Hansen, P.; Tfelt-Hansen, J.; Escape, N.E.T. for ESCAPE^{NET}. Pharmacokinetic variability of beta-adrenergic blocking agents used in cardiology. *Pharmacol. Res. Perspect.*, **2019**, *7*(4), e00496. <http://dx.doi.org/10.1002/prp2.496> PMID: 31338197
- [68] Carlberg, B.; Samuelsson, O.; Lindholm, L.H. Atenolol in hypertension: is it a wise choice? *Lancet*, **2004**, *364*(9446), 1684-1689. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17355-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17355-8) PMID: 15530629
- [69] Zelazszyk, D.; Kieć-Kononowicz, K. Biocatalytic approaches to optically active beta-blockers. *Curr. Med. Chem.*, **2007**, *14*(1), 53-65. <http://dx.doi.org/10.2174/092986707779313480> PMID: 17266567
- [70] Agustian, J.; Kamaruddin, A.H.; Aboul-Enein, H.Y. Enantio-conversion and -selectivity of racemic atenolol kinetic resolution using free *Pseudomonas fluorescens* lipase (Amano) conducted via transesterification reaction. *RSC Adv.*, **2016**, *6*(31), 26077-26085. <http://dx.doi.org/10.1039/C6RA01942K>
- [71] Barbosa, O.; Ortiz, C.; Torres, R.; Fernandez-Lafuente, R. Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* in organic media: enantiospecific production of atenolol acetate. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **2011**, *71*(3-4), 124-132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.04.008>
- [72] Dwivedee, B.P.; Ghosh, S.; Bhaumik, J.; Banerjee, U.C. Lipase-catalyzed green synthesis of enantiopure atenolol. *RSC Adv.*, **2015**, *5*(21), 15850-15860. <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA16365F>
- [73] Lund, I.T.; Bockmann, P.L.; Jacobsen, E.E. Highly enantioselective CALB-catalyzed kinetic resolution of building blocks for beta-blocker atenolol. *Tetrahedron*, **2016**, *72*(46), 7288-7292. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2016.02.018>
- [74] Sikora, A.; Chelminiak-Dudkiewicz, D.; Siodmiak, T.; Tarczykowska, A.; Sroka, W.D.; Ziegler-Borowska, M.; Marszall, M.P. Enantioselective acetylation of (R,S)-atenolol: the use of *Candida rugosa* lipases immobilized onto magnetic chitosan nanoparticles in enzyme-catalyzed biotransformation. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2016**, *134*(A), 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.09.017>
- [75] Sikora, A.; Chelminiak-Dudkiewicz, D.; Ziegler-Borowska, M.; Marszall, M.P. Enantioselective acetylation of (R,S)-atenolol with the use of lipases immobilized onto new-synthesized magnetic nanoparticles. *Tetrahedron Asymmetry*, **2017**, *28*(2), 374-380. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetasy.2017.01.012>
- [76] Sikora, A.; Sroka, W.D.; Siodmiak, T.; Marszall, M.P. Kinetic resolution of (R,S)-atenolol with the use of lipases in various organic solvents. *Curr. Org. Synth.*, **2017**, *14*(5), 747-754. <http://dx.doi.org/10.2174/1570193X161230120414>
- [77] Chiou, T.W.; Chang, C.C.; Lai, C.T.; Tai, D.F. Kinetic resolution of propranolol by a lipase-catalyzed *N*-acetylation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *7*(4), 433-436. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-894X\(97\)00028-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-894X(97)00028-0)
- [78] Barbosa, O.; Ariza, C.; Ortiz, C.; Torres, R. Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphthoxy)-2-propanolol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B). *N. Biotechnol.*, **2010**, *27*(6), 844-850. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2010.07.015> PMID: 20667519
- [79] Escorcia, A.M.; Daza, M.C.; Doerr, M. Computational study of the enantioselectivity of the O-acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **2014**, *108*, 21-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.06.010>
- [80] Escorcia, A.M.; Molina, D.; Daza, M.C.; Doerr, M. Acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B: an experimental and computational study. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **2013**, *98*, 21-29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.09.019>
- [81] Osuna, Y.; Sandoval, J.; Saade, H.; López, R.G.; Martínez, J.L.; Colunga, E.M.; de la Cruz, G.; Segura, E.P.; Arévalo, F.J.; Zon, M.A.; Fernández, H.; Ilyina, A. Immobilization of Aspergillus niger lipase on chitosan-coated magnetic nanoparticles using two covalent-binding methods. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **2015**, *38*(8), 1437-1445. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-015-1385-8> PMID: 25759161
- [82] Carvalho, P.O.; Contesini, F.J.; Ikegaki, M. Enzymatic resolution of (R,S)-ibuprofen and (R,S)-ketoprofen by microbial lipases from native and commercial sources. *Braz. J. Microbiol.*, **2006**, *37*(3), 329-337. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000300024>
- [83] Yun, I.; Park, J.Y.; Park, J.; Kim, M.J. Base-free dynamic kinetic resolution of secondary alcohols with a ruthenium-lipase couple. *J. Org. Chem.*, **2019**, *84*(24), 16293-16298. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.9b02510> PMID: 31778067
- [84] Serafin-Lewañczuk, M.; Klimek-Ochab, M.; Brzezińska-Rodak, M.; Żymaniak-Duda, E. Fungal synthesis of chiral phosphonic synthetic platform - scope and limitations of the method. *Bioorg. Chem.*, **2018**, *77*, 402-410. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.01.027> PMID: 29427855
- [85] Reddy, U.C.; Manheri, M.K. 1-Hydroxymethyl-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-2-ene skeleton in enantiopure form through enzymatic kinetic resolution. *Chirality*, **2019**, *31*(4), 336-347. <http://dx.doi.org/10.1002/chir.23060> PMID: 30753757
- [86] Aguilon, A.R.; Avelar, M.N.; Gotardo, L.E.; de Souza, S.P.; Leao, R.A.C. Jr. II; Miranda, L.S.M.; de Souza, R. Immobilized lipase screening towards

- continuous-flow kinetic resolution of (+)-1,2-propanediol. *Mol. Catal.*, **2019**, *467*, 128-134.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcat.2019.01.034>
- [87] Xu, J.T.; Hu, L. Asymmetric one-pot synthesis of five- and six-membered lactones via dynamic covalent kinetic resolution: exploring the regio- and stereoselectivities of lipase. *Tetrahedron Lett.*, **2019**, *60*(12), 868-871.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.02.030>
- [88] Moustafa, G.A.I.; Kasama, K.; Higashio, K.; Akai, S. Base-promoted lipase-catalyzed kinetic resolution of atropisomeric 1,1'-biaryl-2,2'-diols. *RSC Adv.*, **2019**, *9*(3), 1165-1175.
<http://dx.doi.org/10.1039/C8RA09070J>
- [89] Moisa, M.E.; Bencze, L.C.; Paizs, C.; Tosa, M.I. Continuous-flow enzymatic kinetic resolution mediated by a lipase nanobioconjugate. *Stud. Univ. Babeş-Bolyai Chem.*, **2019**, *64*(2), 79-86.
<http://dx.doi.org/10.24193/subchem.2019.2.07>
- [90] Farkas, E.; Oláh, M.; Földi, A.; Kóti, J.; Éles, J.; Nagy, J.; Gal, C.A.; Paizs, C.; Hornyánszky, G.; Poppe, L. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of amines in fully continuous-flow mode. *Org. Lett.*, **2018**, *20*(24), 8052-8056.
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.orglett.8b03676> PMID: 30543299
- [91] Kovacs, B.; Forró, E.; Fulop, F. *Candida antarctica* lipase B catalyzed kinetic resolution of 1,2,3,4-tetrahydro-beta-carbolines: substrate specificity. *Tetrahedron*, **2018**, *74*(48), 6873-6877.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2018.10.034>
- [92] Kmezc, I.; Varga, Z.; Szekely, E. One pot kinetic resolution and product separation with corn germ oil and supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*, **2018**, *141*, 218-223.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2018.01.014>
- [93] Belkacemi, F.Z.; Merabet-Khelassi, M.; Aribi-Zouioueche, L.; Riant, O. Production of l-menthyl acetate through kinetic resolution by *Candida cylindracea* lipase: effects of alkaloids as additives. *Res. Chem. Intermed.*, **2018**, *44*(11), 6847-6860.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11164-018-3525-7>
- [94] Perez-Venegas, M.; Juaristi, E. Mechanoenzymatic resolution of racemic chiral amines, a green technique for the synthesis of pharmaceutical building blocks. *Tetrahedron*, **2018**, *74*(44), 6453-6458.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2018.09.029>
- [95] Bassut, J.; Rocha, A.M.R.; Franca, A.D.; Leao, R.A.C.; Monteiro, C.; Afonso, C.A.M.; de Souza, R. PEG(600)-carboxylates as acylating agents for the continuous enzymatic kinetic resolution of alcohols and amines. *Mol. Catal.*, **2018**, *459*, 89-96.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcat.2018.08.019>
- [96] Mathpati, A.C.; Bhanage, B.M. Prediction of enantioselectivity of lipase catalyzed kinetic resolution using umbrella sampling. *J. Biotechnol.*, **2018**, *283*, 70-80.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.024> PMID: 30031094
- [97] Ou, Z.; Pan, J.; Du, L.; Tang, L. Kinetic resolution of 1-phenylethanamine in a solvent-free system by free and immobilized lipase. *N. Biotechnol.*, **2018**, *44*, S73-S73.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2018.05.884>
- [98] Shivaprasad, P.; Jones, M.D.; Patterson, D.A.; Emanuelsson, E.A.C. Kinetic resolution of 1-phenylethanol in the spinning mesh disc reactor: investigating the reactor performance using immobilized lipase catalyst. *Chem. Eng. Process. - Process Intens.*, **2018**, *132*, 56-64.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2018.08.012>
- [99] de Gonzalo, G. Lipase catalyzed kinetic resolution of racemic 1,2-diols containing a chiral quaternary center. *Molecules*, **2018**, *23*(10), 2503.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules23102503> PMID: 30274321
- [100] Moisa, M.E.; Poppe, L.; Gal, C.A.; Bencze, L.C.; Irimie, F.D.; Paizs, C.; Peter, F.; Tosa, M.I. Click reaction-aided enzymatic kinetic resolution of secondary alcohols. *React. Chem. Eng.*, **2018**, *3*(5), 790-798.
<http://dx.doi.org/10.1039/C8RE00091C>
- [101] Lesniarek, A.; Chojnacka, A.; Gladkowski, W. Application of Lecitase (R) ultra-catalyzed hydrolysis to the kinetic resolution of (E)-4-phenylbut-3-en-2-yl esters. *Catalysts*, **2018**, *8*(10), 432.
<http://dx.doi.org/10.3390/catal8100423>
- [102] Sikora, A.; Siódmiak, T.; Marszał, M.P. Kinetic resolution of profens by enantioselective esterification catalyzed by *Candida antarctica* and *Candida rugosa* lipases. *Chirality*, **2014**, *26*(10), 663-669.
<http://dx.doi.org/10.1002/chir.22362> PMID: 25080075
- [103] de Almeida, D.K.C.; da Silva, M.R.; de Mattos, M.C.; Nunes, F.M.; Ballereau, S.; Genisson, Y.; Maraval, V.; Chauvin, R.; Oliveira, M.C.F. Lipase-catalyzed enantioselective kinetic resolution of rac-lipidic alkynylcarbinols and a C-5 synthon thereof via a hydrolysis approach. *Mol. Catal.*, **2020**, *2020*, 110926.
<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2020.110926>
- [104] Kühn, F.; Katsuragi, S.; Oki, Y.; Scholz, C.; Akai, S.; Gröger, H. Dynamic kinetic resolution of a tertiary alcohol. *Chem. Commun. (Camb.)*, **2020**, *56*(19), 2885-2888.
<http://dx.doi.org/10.1039/C9CC09103C> PMID: 32037430
- [105] Zhang, Y.; Cheng, F.; Yan, H.; Zheng, J.; Wang, Z. The enzymatic resolution of 1-(4-chlorophenyl)ethylamine by Novozym 435 to prepare a novel triazolopyrimidine herbicide. *Chirality*, **2018**, *30*(11), 1225-1232.
<http://dx.doi.org/10.1002/chir.23016> PMID: 30238626
- [106] Wu, J.C.; Low, H.R.; Leng, Y.; Chow, Y.; Li, R.; Talukder, M.M.R.; Choi, W.J. Ketoprofen resolution by enzymatic esterification and hydrolysis of the ester product. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **2006**, *11*(3), 211-214.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02932032>
- [107] Duleba, J.; Siódmiak, T.; Marszał, M.P. Amano lipase PS from *Burkholderia cepacia* - evaluation of the effect of substrates and reaction media on the catalytic activity. *Curr. Org. Chem.*, **2020**, *24*(7), 798-807.
<http://dx.doi.org/10.2174/1385272824666200408092305>
- [108] Pascale, N.C.; Chastinet, J.J.; Bila, D.M.; Sant Anna, G.L., Jr; Quitério, S.L.; Vendramel, S.M.R. Enzymatic hydrolysis of floatable fatty wastes from dairy and meat food-processing industries and further anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.*, **2019**, *79*(5), 985-992.
<http://dx.doi.org/10.2166/wst.2018.508> PMID: 31025978

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

8.2. ZASTOSOWANIE DWUFAZOWYCH UKŁADÓW KATALITYCZNYCH W ENANCJOSELEKTYWNEJ BIOTRANSFORMACJI RACEMICZNEGO ATENOLOLU

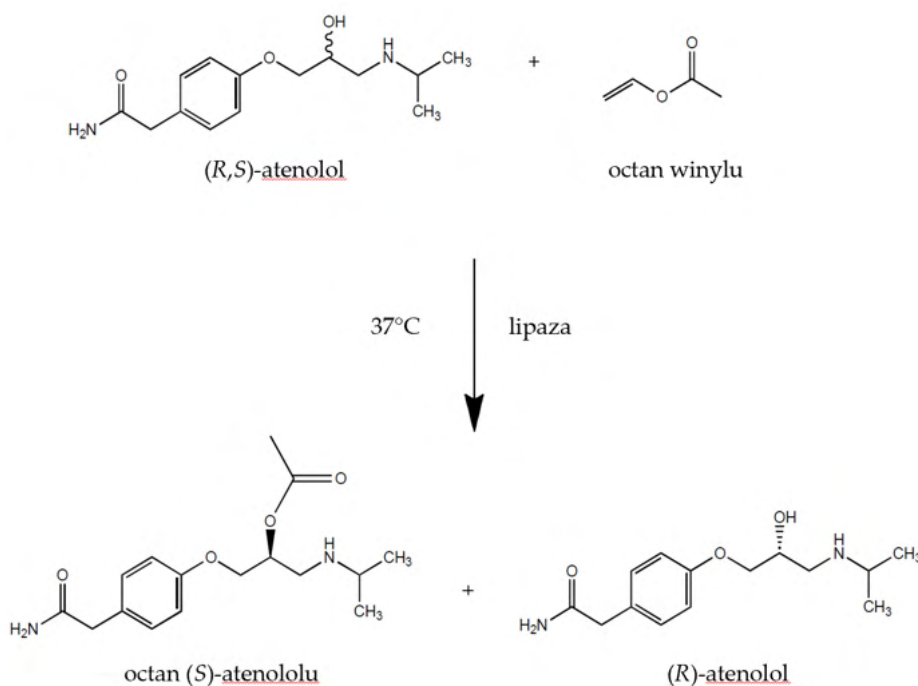
Opis dotyczy pracy [P2]: Joanna Chałupka, Adam Sikora, Michał Piotr Marszał. The utilization of two-phase catalytic system in enantioselective biotransformation of racemic atenolol, *Catalysts*, 2022, 12(9), 1068. DOI: 10.3390/catal12091068.

W ostatnim czasie obserwuje się zwiększoną zachorowalność na choroby układu sercowo-naczyniowego. Złe lub brak nawyków żywieniowych, nadmierny stres, siedzący tryb życia czy nawet całkowity brak aktywności fizycznej to tylko niektóre z wielu czynników, które wpływają na rozwój wyżej wymienionych chorób, będących główną przyczyną przedwczesnych zgonów w Polsce i Europie. Nadciśnienie tętnicze jest jedną z najczęstszych chorób stwierdzanych u osób dorosłych. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia w 2000 roku na świecie chorowało 972 miliony dorosłych ludzi na nadciśnienie tętnicze, z czego 639 milionów w krajach rozwijających się gospodarczo. Przewiduje się, że w 2025 będzie na świecie 1,5 miliarda osób z nadciśnieniem. W Polsce nadciśnienie tętnicze stwierdza się u 15% ludzi w wieku 31-44 lat, u 45% w wieku 45-65 lat i u około 59% u osób powyżej 65 roku życia. Częściej chorują mężczyźni niż kobiety. Ciśnienie tętnicze ma tendencje do podwyższania się wraz z wiekiem. Z uwagi na powyższe, należy obiektywnie stwierdzić, że leki obniżające ciśnienie tętnicze, w tym β -blokery, z całą pewnością należą do jednych z najważniejszych we współczesnym leczeniu.

W przypadku wielu substancji organicznych, w tym leków, wzór sumaryczny niewiele mówi o budowie związku, ponieważ cząsteczki mające ten sam skład atomowy mogą różnić się rozmieszczeniem poszczególnych atomów w przestrzeni. Z kolei różne ułożenie przestrzenne tych samych atomów wpływa na właściwości całej cząsteczki, a także na sposób jej oddziaływania w organizmie ludzkim. Obecnie we współczesnej farmakoterapii kładzie się istotny nacisk na stosowanie w leczeniu pojedynczych enancjomerów, ponieważ pozwala to na optymalizację efektu klinicznego stosowanych dotychczas mieszanin racemicznych, a także pozwala na zmniejszenie częstości i natężenia działań niepożądanych. Z uwagi na fakt, iż enancjomery leków są swoimi odbiciami lustrzanymi, a zatem różnią się przestrzennym ułożeniem atomów w swoich cząsteczkach mogą posiadać odrębne właściwości pod względem farmakokinetycznym, farmakodynamicznym, a także w profilu działań niepożądanych. Należy

przy tym podkreślić, iż β -blokery, pomimo faktu, iż są jednymi z najbardziej popularnych leków w leczeniu nadciśnienia tętniczego, występują w większości komercyjnie dostępnych produktów leczniczych w formie mieszanin enancjomerów, a nie czystych enancjomerów, co może skutkować większą ilością działań niepożądanych, a także koniecznością przyjmowania większej dawki leku. Jedną z metod umożliwiającą na otrzymanie czystego enancjomeru jest enzymatyczny rozdział kinetyczny. W tym celu przeprowadza się stereoselektywną biotransformację racematu w obecności enzymu pełniącego funkcję enancjoselektywnego biokatalizatora. W procesie stereoselektywnej biotransformacji z zastosowaniem lipaz najczęściej wykorzystuje się organiczne rozpuszczalniki, które pełnią funkcję środowiska reakcji. Należy jednak wziąć pod uwagę, że większość tych związków jest toksyczna i niebezpieczna dla środowiska. Z kolei zastosowanie cieczy jonowych jako środowiska reakcji niesie za sobą wiele zalet, ponieważ są przyjazne dla środowiska, a prowadzone w nich transformacje często zachodzą szybciej.

Celem naukowym badań było zoptymalizowanie enzymatycznego rozdziału kinetycznego (*R,S*)-atenololu z wykorzystaniem dwufazowego układu katalitycznego zawierającego cieczę jonową. W ramach zrealizowanych prac badawczych testowano wpływ cieczy jonowych oraz dwóch izoform lipazy z *Candida rugosa* (OF lub MY) na rozdział kinetyczny (*R,S*)-atenololu z zastosowaniem octanu winylu pełniącego funkcję donora grupy acetylowej (**Rycina 32**).



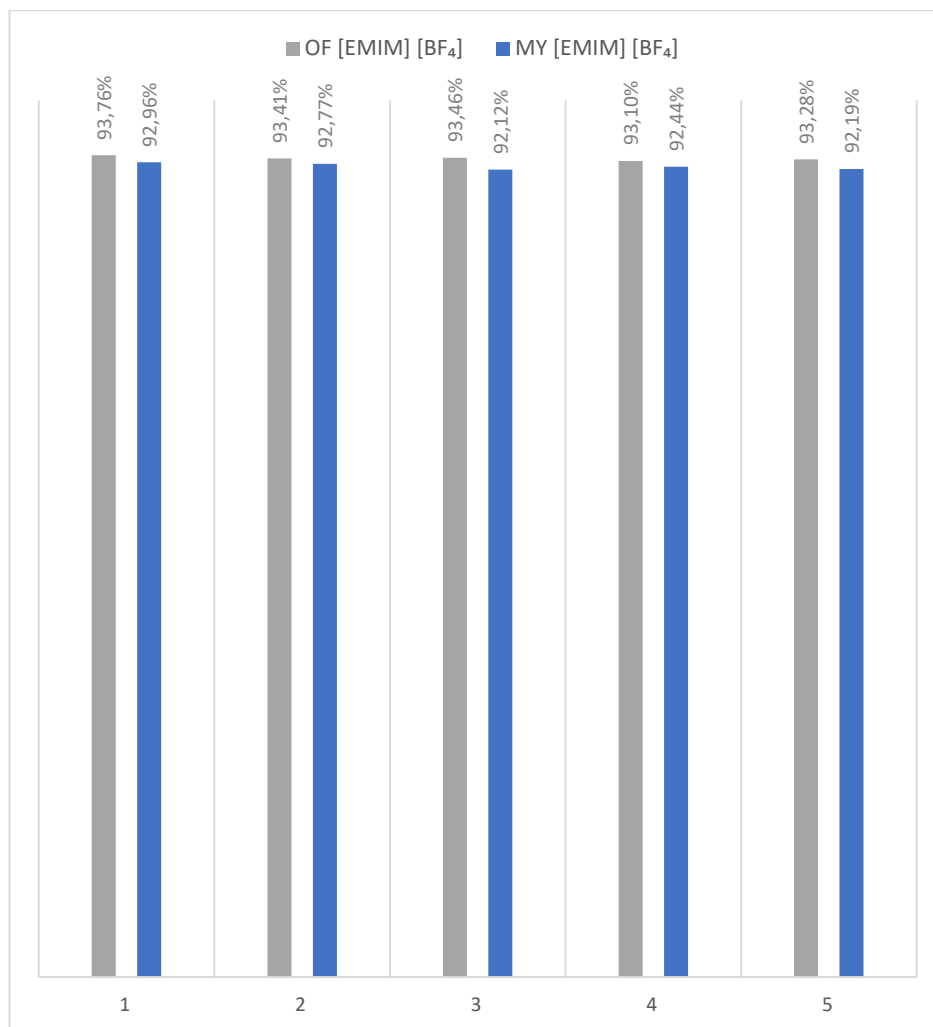
Rycina 32 Rozdział kinetyczny (*R,S*)-atenololu

W efekcie badano 8 różnych układów katalitycznych przedstawionych w **Tabeli 7**. Enancjoselektywne biotransformacje były inkubowane przez 120 godzin w kontrolowanych warunkach temperaturowych wynoszących 37°C przy stałej prędkości mieszania RPM = 250. Każdy układ katalityczny był próbkowany co 24 godziny i analizowany z zastosowaniem systemu UPLC-MS/MS, co pozwoliło na ocenę zachodzących zmian prowadzonych rozdziałów kinetycznych, które dotyczyły: nadmiarów enancjomerycznych substratów i produktów, konwersji oraz enancjoselektywności. W celu analizy jakościowej oraz ilościowej mieszanin reakcyjnych zoptymalizowano chiralny rozdział chromatograficzny z zastosowaniem kolumny Lux Cellulose-2. Rodział chromatograficzny był prowadzony w warunkach izokratycznych, w temperaturze 30°C, przy przepływie $F_R = 0,8\text{mL/min}$. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu, izopronaolu oraz dieetyloaminy w stosunku objętościowym wynoszącym 98/2/0,1. Detekcja analitów odbywała się z wykorzystaniem trybu MRM, w których identyfikowano zarówno prekursorzy oraz produkty powstałe na skutek fragmentacji prekursorów w komorze kolizyjnej spektrometru mas typu potrójny kwadrupol. Zaproponowane podejście analityczne stanowiło dodatkowe potwierdzenie jakościowe oznaczanych analitów pozyskanych w wyniku prowadzonych rozdziałów kinetycznych.

Tabela 7 Parametry rozdziału kinetycznego (*R,S*)-atenololu z zastosowaniem różnych układów katalitycznych

Środowisko reakcji	Lipaza	ee_s	ee_p	c	E
Toluen	<i>Candida rugosa</i> OF	61,80%	93,60%	39,77%	56,99
	<i>Candida rugosa</i> MY	52,00%	93,00%	35,86%	46,34
Toluen [EMIM][BF ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF	59,98%	93,76%	39,01%	57,22
	<i>Candida rugosa</i> MY	50,00%	92,96%	34,97%	45,07
Toluen [EMIM][OTf]	<i>Candida rugosa</i> OF	58,78%	79,60%	42,48%	15,88
	<i>Candida rugosa</i> MY	52,24%	77,60%	40,23%	13,27
Toluen [EMIM][EtSO ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF	1,60%	1,40%	53,30%	1,04
	<i>Candida rugosa</i> MY	1,86%	0,36%	83,89%	1,02

Zastosowanie cieczy jonowych w różny sposób wpływało na aktywność katalityczną lipaz z *Candida rugosa*. W efekcie wykorzystanie [EMIM][BF₄] razem z toluenem umożliwiło stworzenie układu katalitycznego, które pozwolił na uzyskanie enancjomerycznie czystych pochodnych atenololu o największej czystości katalitycznej, przy zachowaniu najwyższej enancjoselektywności rozdziału kinetycznego, co także było zgodne z wynikami przedstawionymi w Publikacji 1 [P1] niniejszej rozprawy doktorskiej. Dodatkowo mieszanina cieczy jonowej z toluenem stworzyła układ dwufazowy, który fizycznie odseparowywał od siebie zawieszony w toluenie enzym oraz substraty z produktami, które koncentrowały się w cieczy jonowej. W efekcie umożliwiło to na ponowne wykorzystanie lipaz w kolejnych cyklach katalitycznych poprzez wprowadzenie zawieszonego w toluenie białka do kolejnych cieczy jonowych zawierających nowe substraty. Zrealizowane badania udowodniły, że zarówno lipaza z *Candida rugosa* OF oraz MY zachowała swoją wysoką stabilność operacyjną oraz aktywność katalityczną w 5-ciu kolejnych cyklach katalitycznych, czego dowodzi utrzymująca się na stałym poziomie wartość nadmiarów enancjomerycznych produktów dla kolejnych reakcji katalizowanych przez wykorzystywane ponownie enzymy (**Rycina 33**).



Rycina 33 Porównanie wartości nadmiarów enancjomerycznych produktów dla rozdziałów kinetycznych (*R,S*)-atenololu katalizowanych przez ponownie wykorzystane lipazy z *Candida rugosa* OF i MY

Rezultaty omawianych badań zostały szczegółowo opisane w publikacji pt.: „The Utilization of Two-Phase Catalytic System in Enantioselective Biotransformation of Racemic Atenolol” opublikowanej w *Catalysts*: 2022, 12, 1068, w której autorami byli: Joanna Chałupka, Adam Sikora, Michał Piotr Marszał [P2].

Article

The Utilization of Two-Phase Catalytic System in Enantioselective Biotransformation of Racemic Atenolol

 Joanna Chalupka , Adam Sikora  and Michał Piotr Marszałł*

Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Dr. A. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz, Poland

* Correspondence: mmars@cm.umk.pl; Tel.: +48-52-585-3532

Abstract: There are several methods that allow enantiomerically pure compounds to be obtained. In the study presented herein, the enantioselective biotransformations of (*R,S*)-atenolol were performed with the use of various catalytic systems containing ionic liquids and toluene as a reaction medium, vinyl acetate as an acetylating agent as well as lipases from *Candida rugosa*. The conducted studies prove that, the use of the two-phase reaction system enables the reuse of the biocatalyst in another cycle and allows to achieve satisfactory kinetic resolution parameters.

Keywords: *Candida rugosa* lipase; ionic liquid; racemic atenolol; enantioselective biotransformation



Citation: Chalupka, J.; Sikora, A.; Marszałł, M.P. The Utilization of Two-Phase Catalytic System in Enantioselective Biotransformation of Racemic Atenolol. *Catalysts* **2022**, *12*, 1068. <https://doi.org/10.3390/catal12091068>

Academic Editor:
Gloria Fernandez-Lorente

Received: 8 September 2022
Accepted: 16 September 2022
Published: 19 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cardiovascular disorders are the leading cause of death in the world. More than 75% of heart disease and stroke-related fatalities take place in low- and middle-income nations. Elevated blood pressure, often known as hypertension, is a serious medical condition that dramatically raises the risk of cardiovascular disorders. Specific systolic and diastolic blood pressure values or the documented usage of antihypertensive drugs can be used to diagnose hypertension. Only 14% of the estimated 1.4 billion people with high blood pressure have it under control. There are, nevertheless, affordable therapy choices [1–3].

Due to the fact that β -blockers, including atenolol, in their chemical structure have an asymmetric carbon atom, which is their chiral center, they exist in the form of two enantiomers, i.e., (*R*)-enantiomer and (*S*)-enantiomer [4,5]. (*S*)-enantiomers of β -blockers are usually responsible for the therapeutic action, since the (*R*)-enantiomers of β -blockers have significantly lower affinity to the β -adrenergic receptors and could cause additional adverse events. Nevertheless, β -blockers are still mainly administered as racemates, instead of pure enantiomers and thus could be responsible for unnecessary side effects.

Currently, there are three main ways to obtain optically pure compounds (including therapeutic agents). It is an organic synthesis using a “chiral pool” of optically pure substrates; racemate separation; as well as asymmetric synthesis with the use of pro-chiral substrates. Enzymatic transformations are appreciated by many good features such as high selectivity, milder reaction conditions, and biocompatibility, which become an alternative powerful tool in organic synthesis. Therefore, the kinetic resolution (racemate resolution) with the use of enzymes, which relies on carrying out a stereoselective biotransformation, is one of the most frequently used methods due to the fact that, compared to the use of a “chiral pool”, it is significantly less expensive and does not require the use of toxic and environmentally hazardous chemical compounds [6–17].

In the process of stereoselective biotransformation of racemic forms of active pharmaceutical ingredients, it is still common to use organic solvents that act as a reaction medium. Nevertheless, most of these compounds are toxic and dangerous to the environment, and in many cases, they can cause organic contamination of the final synthesis product, e.g., β -blocker derivatives. On the other hand, the use of ionic liquids as the reaction medium

brings many advantages. Many ionic liquids have been developed to solve specific synthetic problems and are therefore also referred to as so-called “design solvents”. Their unique properties make them useful in many technological processes [18]. Ionic liquids are considered also as “green solvents” that exhibit several unique characteristics, such as high ionic conductivity, high solvation power, thermal stability, low volatility, and recyclability [19–21]. These “green” solvents are environmentally friendly and the transformations with the use of ionic liquids are often faster. Additionally, the ionic liquids can be recovered from the bioreactor and reused in subsequent catalytic cycles, which reduces the overall cost of the biotransformation [22–27]. Therefore, nowadays, more and more processes in the pharmaceutical industry, including stereoselective biotransformations, are carried out with the use of ionic liquids [28–31].

2. Results and Discussion

2.1. Enantioselective Biotransformation of Racemic Atenolol

Candida rugosa OF and MY lipases, which are commercially available, were used to study the enantioselective biotransformation of (*R,S*)-atenolol in a variety of two-phase reaction conditions (Figure 1). Atenolol has very little solubility in organic solvents. Therefore, the research that was undertaken was concentrated on exploring different reaction systems to omit the racemic compound’s solubility issue. The types of ionic liquid and enzyme isoforms used in the developed and tested catalytic systems varied from one another. It directly led to the acquisition of numerous products of appropriate quality for a given catalytic system. However, some of the evaluated reaction systems demonstrated adequate kinetic resolution performance criteria (Table 1). It was seen during the studies that, in every case, the value of conversion was rising with the reaction time.

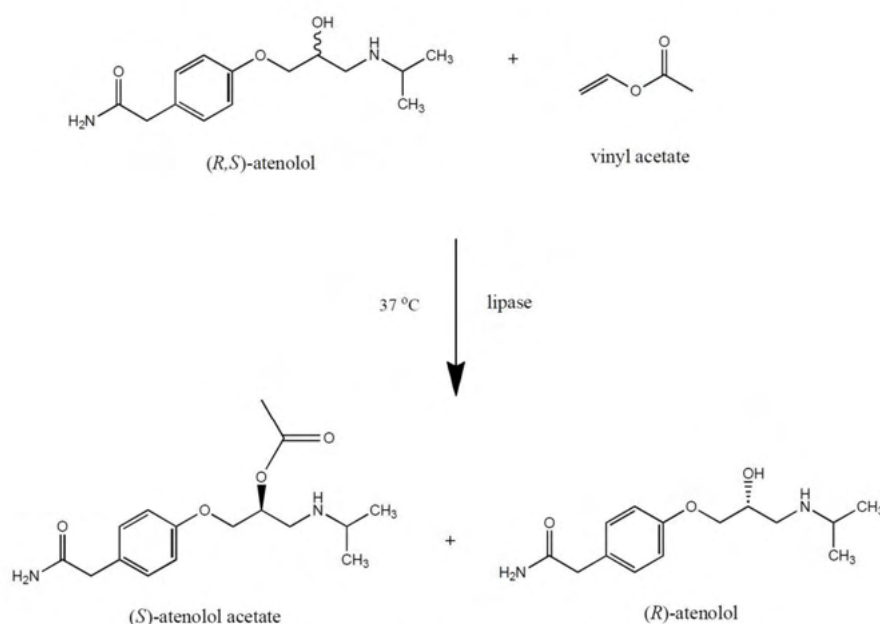


Figure 1. Enantioselective biotransformation of (*R,S*)-atenolol with the use of *Candida rugosa* lipase as biocatalyst. The reaction mixture consisted of (*R,S*)-atenolol (3.0 mg, 0.01 mM), vinyl acetate (2.0 μ L, 0.02 mM), lipases from *Candida rugosa* OF or MY (10.0 mg), and toluene (10 mL) with or without the addition of ionic liquid (500 μ L) and was incubated for 120 h along with mechanical shaking (250 RPM) at 37 °C.

Table 1. List of obtained results of performed enantioselective biotransformation of (R,S)-atenolol after 120 h of incubation: enantiomeric excesses of substrates (ee_s), products (ee_p), conversion (c), and enantioselectivity (E).

Reaction Medium	Lipase	ee_s	ee_p	c	E
Toluene	<i>Candida rugosa</i> OF	61.80%	93.60%	39.77%	56.99
	<i>Candida rugosa</i> MY	52.00%	93.00%	35.86%	46.34
Toluene [EMIM] [BF ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF	59.98%	93.76%	39.01%	57.22
	<i>Candida rugosa</i> MY	50.00%	92.96%	34.97%	45.07
Toluene [EMIM] [OTf]	<i>Candida rugosa</i> OF	58.78%	79.60%	42.48%	15.88
	<i>Candida rugosa</i> MY	52.24%	77.60%	40.23%	13.27
Toluene [EMIM] [EtSO ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF	1.60%	1.40%	53.30%	1.04
	<i>Candida rugosa</i> MY	1.86%	0.36%	83.89%	1.02

ee_s —enantiomeric excesses of substrates; ee_p —enantiomeric excesses of products; c —conversion; E —enantioselectivity.

The lipase from *Candida rugosa* OF had the greatest outcomes among all examined catalytic systems, nevertheless. After 120 h of incubation, the (S)-atenolol acetate was obtained, with the highest value of enantioselectivity which equaled $E = 57.22$, whereas the enantiomeric excesses of the product equaled $ee_p = 93.76\%$. Although the application of lipase from *Candida rugosa* MY allowed to obtain acceptable results, in particular catalytic systems, the enantiomeric purity of achieved products was lower compared to the results obtained with the use of lipase from *Candida rugosa* OF. Finally, the use of *Candida rugosa* MY lipase allowed to obtain the (S)-atenolol acetate with the enantioselectivity equaled $E = 45.07$, whereas the enantiomeric excess of product was $ee_p = 92.96\%$ after 120 h of incubating the reaction mixture.

2.2. Effect of Reaction Time

One of the most crucial aspects of the kinetic resolution of racemic chemicals was found to be the incubation duration of the reaction mixture among all evaluated influencing factors on enzyme-catalyzed biotransformations. Other investigations have shown that the enantioselectivity and enantiomeric excess of both products and substrates rapidly decline when the reaction medium is incubated for an excessively long time. The lack of substrate makes the reaction no longer regarded as enantioselective as a result of the conversion value having the potential to be higher than 50%. Commercially available lipases from *Candida rugosa* OF and MY, vinyl acetate (2 μ L) as an acetylating agent, (R,S)-atenolol (3.0 mg), ionic liquid (500 μ L), and toluene (10 mL) were utilized as the reaction medium in the experiment. The biotransformations were carried out for 120 h at 30 °C. According to Figure 2, the reaction duration increased along with the conversion, enantiomeric excess of the substrate, and enantiomeric ratio. Over the same time span, the product's enantiomeric excess slowly diminished. The value of conversion was the highest after 120 h of reaction (Figure 2), and it varies depending on the type of catalytic system (Table 1).

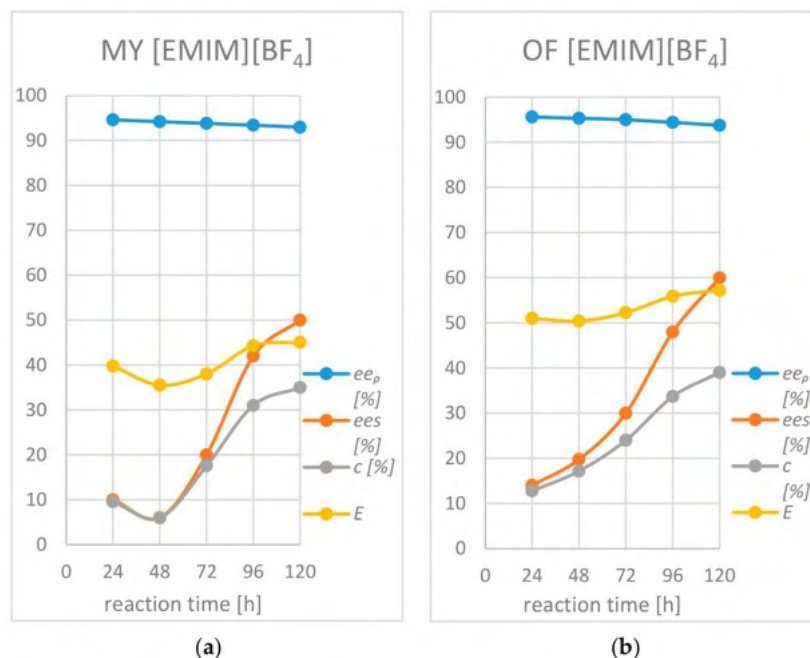


Figure 2. Effect of reaction time on the enzymatic parameters of performed kinetic resolution of (R,S)-atenolol in two-phase catalytic system consisting of [EMIM] [BF₄] and lipase from *Candida rugosa* OF (a) or *Candida rugosa* MY (b) including values of both enantiomeric excesses of substrates (ee_s) and products (ee_p) as well as conversion (c) and enantioselectivity (E).

2.3. Effect of Biocatalysts

The enzyme-catalyzed biotransformation of racemic atenolol with the use of vinyl acetate as an acetylating agent was carried out using *Candida rugosa* (OF, MY) lipases in native forms, and their catalytic and enantioselective capabilities were examined. The use of lipases from *Candida rugosa* OF produced the highest levels of enantioselectivity among all evaluated catalytic systems, as indicated in Table 1. It should be highlighted that reactions utilizing lipase OF had greater enantiomeric ratios and enantiomeric excess of product than reactions using lipase MY. Since both enzymes could only be deemed to be enantioselective in one of the investigated reaction media, the observed results for both lipases were comparable in terms of their sensitivity to the reaction medium. It should be also noted that the differences between compared isoforms of *Candida rugosa* lipases were mainly related in observed conversion, which affected the enantioselective, rather than enantiomeric excess of products, which were similar.

2.4. Effect of Reaction Medium

The investigated systems were effective in reaction media both with and without ionic liquids. As it was observed, *Candida rugosa* lipase exhibited various catalytic properties depending on type of reaction medium. Due to this, one of the most crucial aspects of improving reaction conditions to increase enantioselectivity is selecting the best reaction medium. Taking into account the addition of ionic liquids, it should be noted that only [EMIM] [BF₄] was appropriate for the enantioselective acetylation of racemic atenolol among the three investigated ionic liquids, [EMIM] [OTf] and [EMIM] [EtSO₄], as shown in Table 1. Racemic atenolol was sufficiently soluble in [EMIM] [OTf] and [EMIM] [EtSO₄], however, these ionic liquids are ineffective as reaction media for the

enantioselective biotransformation of racemic atenolol, resulting in decreased enantiomeric excess of product and enantioselectivity. Therefore, it appears that using [EMIM] [BF₄] and toluene as the reaction medium is ideal, and using it led to greater enantiomeric excess of product, with values higher than 93% (Figure 3). Furthermore, the employment of this catalytic system allowed for the achievement of a high value of enantioselectivity (Figure 4). The reactions carried out only in this reaction medium could be identified as being enantioselective since the E-values were in all investigated systems with [EMIM] [BF₄] higher than 40. It should be emphasized that the reaction without the addition of ionic liquids also allowed to obtain comparable kinetic resolution parameters. Nevertheless, the composition of the two-phase catalytic system obtained by direct addition of ionic liquids gave the possibility to easily separate the substrates and products from the reaction medium, by withdrawing ionic liquids containing atenolol and resulted derivatives and by replacing it with fresh ones containing only substrates allowed to reuse the biocatalysts remaining in reaction system.

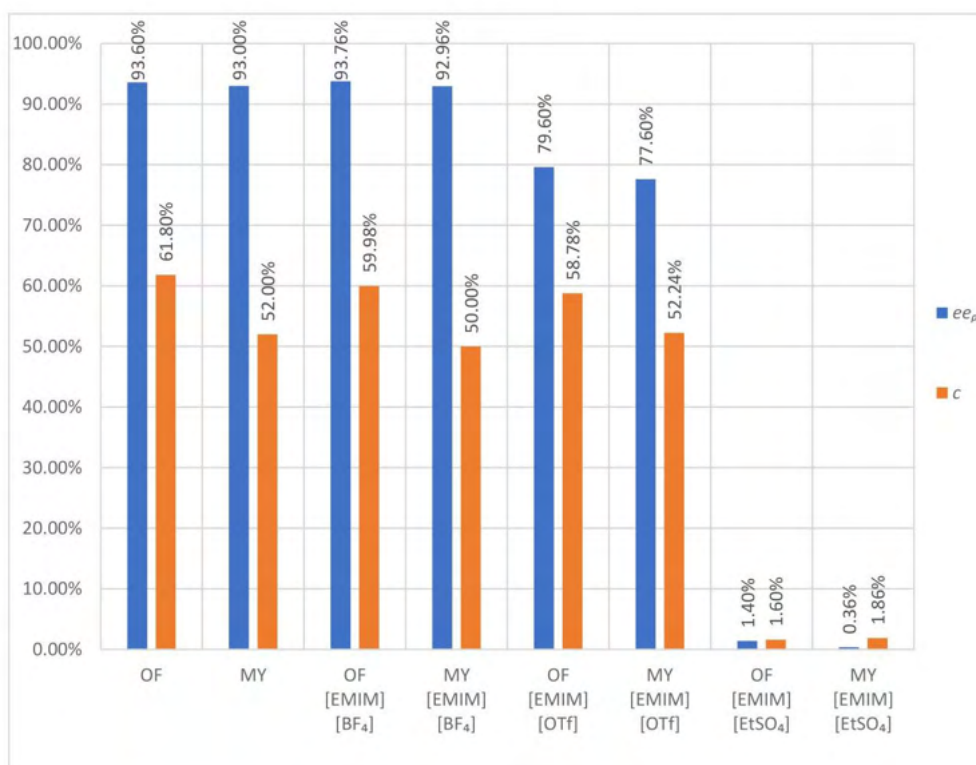


Figure 3. Overview of obtained results of performed enantioselective biotransformation of (*R,S*)-atenolol after 120 h of incubation including enantiomeric excesses of products (ee_p) and conversion (c).

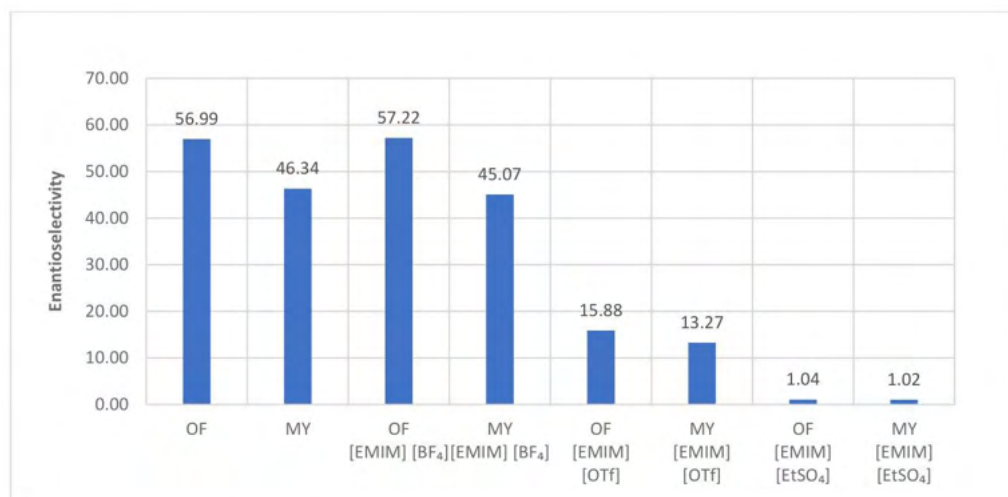


Figure 4. Overview of obtained results of performed enantioselective biotransformation of (*R,S*)-atenolol after 120 h of incubation including enantioselectivity (*E*).

2.5. Effect of Lipase Reusability in Enzyme-Catalyzed Biotransformation of (*R,S*)-Atenolol

One of the most significant benefits of using ionic liquids in two-phase enzyme-catalyzed biotransformation is the ability to reuse the enzymes in another catalytic system by simply substituting the ionic liquids with specific substrates and products of reaction. During the study, the effect of native lipases' capacity for reuse on the kinetic resolution of racemic atenolol was investigated. After the indicated substrate substitution method, the *Candida rugosa* lipases OF and MY were employed again for this purpose.

Following the catalytic process, the remaining ionic liquids containing the enantiomers of atenolol and atenolol acetate were transferred to the separated tube. The same lipase that was suspended and remained in toluene was then introduced to the new quantity of ionic liquids containing the racemic atenolol as a reaction substrate. The correct acetylating agent was applied in order to initiate the enantioselective reaction (vinyl acetate). Five reaction cycles were carried out for the purpose of the experiments that were presented, which amount to 600 h of catalytic and operational activity of the enzymes that were used. Enantiomeric excesses of all evaluated reaction mixture products after the fifth reaction cycle were greater than 90% of the initial value (Figure 5).

In a reaction medium made up of toluene and [EMIM] [BF₄], lipase from *Candida rugosa* OF produced the highest value of enantiomeric excess. Nevertheless, it was found that after five reaction cycles, there was no discernible difference in the catalytic activity of any of the used enzymes. The acquired results therefore showed that using ionic liquids not only has direct benefits linked to getting catalytic parameters that are above acceptable levels, but also enables the separation of substrates and products from the catalytic system and the reuse of the enzyme in another cycle.

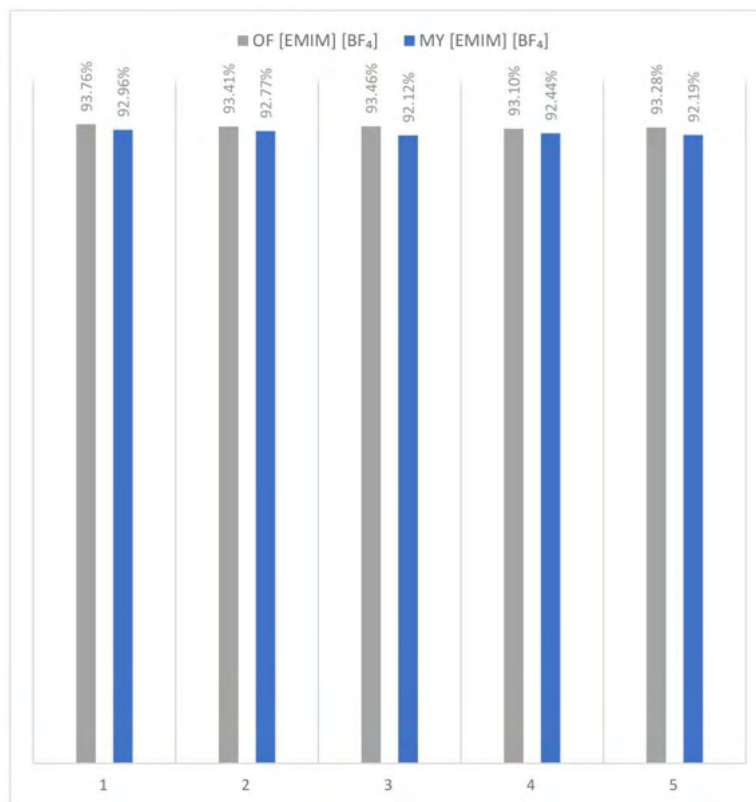


Figure 5. Comparison of the values of enantiomeric excesses of products in five reaction cycles with the reused lipases from *Candida rugosa* in enantioselective biotransformation of (*R,S*)-atenolol.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals

Acetonitrile, acetyl chloride, diethylamine, [EMIM] [BF₄], [EMIM] [EtSO₄], [EMIM] [OTf], vinyl acetate, isopropanol, (*R*)-atenolol, (*R,S*)-atenolol, and toluene were purchased from Merck (Sigma-Aldrich Co. Stainheim, Germany).

Lipases from *Candida rugosa* MY and OF were a gift from Meito Sangyo Co., Ltd. (Tachikawa, Japan). The activity of lipase from *Candida rugosa* OF is 360,000 U/g powder, whereas the activity of lipase from *Candida rugosa* MY is 30,000 U/g powder. The thermal stability of both lipases is equal or below 37 °C and optimum pH is 6–7.

In the conducted study, the water was used, which was obtained using a Milli-Q Water Purification System (Millipore, Bedford, MA, USA).

3.2. Instrumentation

The Refrigerated CentriVap Concentrator, which was bought from Labconco, was used to purify the HPLC samples.

Shimadzu UPLC-MS/MS system (Japan) used for the HPLC study was equipped with an autosampler (SIL-40AC), two solvent supply pumps with gradient systems (LC-40AD), a degasser (DGU-30A5), a column oven (CTO-40AC), a UV detector (SPD-M20A), and a triple quadrupole mass spectrometer detector (model: LCMS-8045). The Guard Cartridge System model KJO-4282 and Lux Cellulose-2 (LC-2) column with cellulose tris(3-chloro-

4-methylphenylcarbamate) stationary phase, both obtained from Phenomenex Co., were used to perform the chiral resolutions.

All incubations were carried out in specialized incubating apparatuses, models: Inkubator1000 and Unimax 1010, which were bought from Heidolph, at a controlled temperature and rotation (250 RPM) (Schwabach, Germany). Every piece of glass that was used was oven-dried overnight before being cooled in a nitrogen stream.

3.3. Chromatographic Conditions

In previously published papers [32–34], the chiral chromatographic resolution optimization method of (*R,S*)-atenolol and its acetylated derivatives was discussed. Finally, baseline chiral separation of the enantiomers of both atenolol and atenolol acetate was accomplished using a chiral column made of Lux Cellulose-2 which was thermostatic at 30 °C. Acetonitrile, isopropanol, and diethylamine were combined in the ideal mobile phase at a volumetric ratio of 98/2/0.1.

The mobile phase flow rate was tuned at 0.8 mL/min in order to get a good resolution. Utilizing a triple quadrupole mass spectrometer in multiple reaction monitoring mode, the detection was made (MRM). Atenolol had MRM transitions of 267.20 > 116.10, 267.20 > 190.05, and 267.20 > 145.05, whereas atenolol acetate had transitions of 309.20 > 116.10, 309.20 > 145.15, 309.20 > 158.10, and 309.20 > 190.05, which is shown in Figure 6 and was in line with other published articles [35,36] as well as the METLIN database, which directly proves that the identified peaks were from atenolol and atenolol acetate. The retention time of (*R*)-atenolol acetate was $t_R = 7.717$ min, (*S*)-atenolol acetate was $t_R = 8.516$ min, (*R*)-atenolol was $t_R = 19.921$ min, and (*S*)-atenolol was $t_R = 17.539$ min (Figure 7).

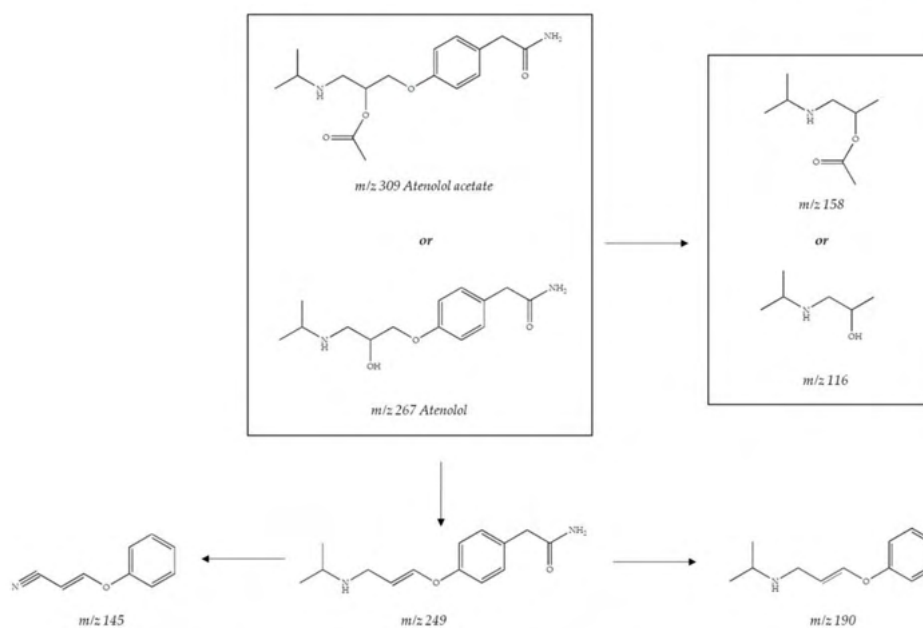


Figure 6. Fragmentation pathways for molecular ions of atenolol.

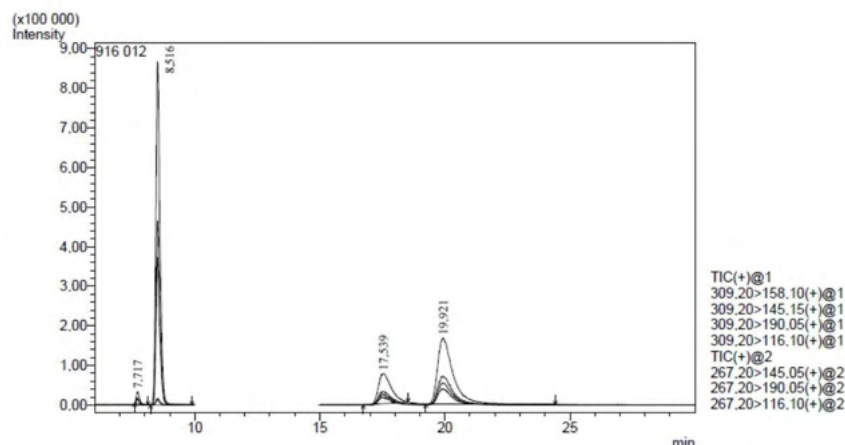


Figure 7. Chromatogram of (R,S)-atenolol and its esters after 120 h of kinetic resolution of (R,S)-atenolol with the use of *Candida rugosa* OF in two-phase reaction media containing [EMIM] [BF₄] and toluene: (R)-enantiomer of atenolol acetate ($t_R = 7.717$), (S)-enantiomer of atenolol acetate ($t_R = 8.516$), (S)-atenolol ($t_R = 17.539$), (R)-atenolol ($t_R = 19.921$). Chromatographic conditions: Lux Cellulose-2 (4.6 \times 250 mm \times 3 μ m) column, mobile phase: acetonitrile/2-propanol/diethylamine (98/2/0.1 v/v/v), F = 1 mL/min, t = 30 °C.

Using equations based on peak areas from chromatograms of (R,S)-atenolol and its acetylated forms, it was possible to determine the optical purity of both substrates and products as well as the enantioselectivity of the enzyme-catalyzed biotransformation that was carried out.

3.4. Kinetic Resolution of (R,S)-Atenolol

In a 20 mL glass flask, enantioselective biotransformation of racemic atenolol was performed. The reaction mixture contained (R,S)-atenolol (3.0 mg, 0.01 mM) dissolved in 0.5 mL of chosen ionic liquid put in 10 mL of toluene, which combined, constituted a two-phase reaction medium. Vinyl acetate (2 μ L, 0.02 mM) was used as an acetyl donor in the reaction. The ionic liquids [EMIM] [BF₄], [EMIM] [OTf], and [EMIM] [EtSO₄] were investigated as part of the investigation. By directly adding 10 mg of native lipase from *Candida rugosa* OF or MY to the previously assembled bioreactor, the enzyme-catalyzed biotransformation of (R,S)-atenolol was initiated. At 37 °C, the reaction mixture was incubated while being shaken (250 RPM).

The enantioselective biotransformation of (R,S)-atenolol was monitored using a chiral stationary phase and an UPLC system coupled with a triple quadrupole mass spectrometer in MRM mode. Samples of 30 μ L of ionic liquid were collected at predetermined time points every 24 h for 120 h. Next, racemic atenolol and its acetylated forms were extracted from the ionic liquid by vigorous shaking with 500 μ L of acetonitrile for 10 min, and after centrifugation and filtration via syringe filters, the prepared samples were placed into the vials and further injected into a UPLC chiral column.

4. Conclusions

The results of the experiment supported the hypothesis that *Candida rugosa* lipases, both OF and MY, can catalyze the enantioselective acetylation of racemic atenolol with the use of vinyl acetate as acetylating agent. It turned out that using two-phase catalytic systems with toluene and ionic liquid, as well as *Candida rugosa* lipase and vinyl acetate, allowed for the production of highly enantioselective parameters. According to the previously published paper related to kinetic resolution of (R,S)-atenolol, toluene was the most suitable

reaction solvent, whereas the acetylating agent was vinyl acetate or isopropenyl acetate. Nevertheless, all previously published studies emphasized that the solubility of atenolol in toluene is slight [32–34,37,38]. The substrate concentration was at the same level as it is reported herein. The main aim of the performed study was to verify the possibility to perform kinetic resolution of racemic atenolol in a two-phase catalytic system with the use of vinyl acetate. According to available literature, it was decided to test three various ionic liquids, e.g., [EMIM] [BF₄], [EMIM] [OTf], and [EMIM] [EtSO₄] [39–44]. The used ionic liquids, however, displayed a variety of kinetic characteristics, leading to varying enantioselectivities and enantiomeric excesses of substrates and products. According to a previous report, enzymatic transesterification is inhibited by the direct addition of [EMIM] [EtSO₄] to the reaction mixture, but the results presented here demonstrate that a smooth transesterification reaction caused by the addition of [EMIM] [EtSO₄] produced the highest values of conversion [29]. However, the E-value dramatically decreased, making it impossible to regard this reaction system as enantioselective. Additionally, given that this IL may function as an esterification catalyst, this result may suggest that the reaction carried out in the catalytic system including [EMIM] [EtSO₄] is non-enzymatic.

Although the native *Candida rugosa* lipase OF in a system including [EMIM] [BF₄] produced the best results among all evaluated catalytic systems ($E = 57.22$, $ee_p = 93.76\%$), the obtained results were comparable to the results obtained without the addition of ionic liquid ($E = 56.99$, $ee_p = 93.60\%$). Nevertheless, the usage of the tested ionic liquids provided the opportunity to remove substrates and products from the enzyme's catalytic system and reuse it. The conducted investigation shown that both lipases from *Candida rugosa* OF and MY maintained their high operational stabilities and catalytic activity even after five reaction catalytic cycles. It should be emphasized that the two-phase catalytic systems containing ionic liquids could be highly significant from an economic perspective because they permit a direct and significant overall cost reduction of the carried out enzyme-catalyzed biotransformation by the easy separation of substrates and products from the reaction mixture and reuse of the biocatalyst in another reaction. Additionally, it should emphasize that the solubility of atenolol in organic solvents, which are compatible with the biocatalysts such as toluene, is rather low and requires higher volumes of reaction medium, which has a negative impact on the environment. Therefore, the future prospects of the presented study should be referred in seeking new functionality of reaction mixtures, which apart from resulting in obtaining better and more efficient reaction parameters, should also be more "green" and gives the possibility of reusing.

Author Contributions: Conceptualization, J.C. and A.S.; methodology, J.C. and A.S.; investigation, J.C. and A.S.; writing—original draft preparation, J.C.; writing—review and editing, M.P.M.; visualization, J.C.; supervision, M.P.M.; funding acquisition, A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: A research grant from the National Science Centre, number 2017/27/N/NZ7/02424, helped to partially fund the experiment.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors wish to express their sincere thanks to Meito Sangyo Co. (Japan) for the supply of lipases OF and MY from *Candida rugosa*.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Burger, R.J.; Delagrangé, H.; van Valkengoed, I.G.M.; de Groot, C.J.M.; van den Born, B.J.H.; Gordijn, S.J.; Ganzevoort, W. Hypertensive Disorders of Pregnancy and Cardiovascular Disease Risk Across Races and Ethnicities: A Review. *Front. Cardiovasc. Med.* **2022**, *9*, 933822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. O'Gallagher, K.; Teo, J.T.; Shah, A.M.; Gaughran, F. Interaction between Race, Ethnicity, Severe Mental Illness, and Cardiovascular Disease. *J. Am. Heart Assoc.* **2022**, *11*, e025621. [[CrossRef](#)]

3. Muntner, P.; Hardy, S.T.; Fine, L.J.; Jaeger, B.C.; Wozniak, G.; Levitan, E.B.; Colantonio, L.D. Trends in Blood Pressure Control Among US Adults With Hypertension, 1999–2000 to 2017–2018. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2020**, *324*, 1190–1200. [[CrossRef](#)]
4. Seebauer, C.T.; Graus, M.S.; Huang, L.; McCann, A.; Wylie-Sears, J.; Fontaine, F.; Karnezis, T.; Zurakowski, D.; Staffa, S.J.; Meunier, F.; et al. Non-beta blocker enantiomers of propranolol and atenolol inhibit vasculogenesis in infantile hemangioma. *J. Clin. Investig.* **2022**, *132*, e151109. [[CrossRef](#)]
5. Ali, I.; Alam, S.D.; Raja, R.; Shirsath, V.; Jain, A.K.; Yusuf, K.; Aljuwayid, A.M.; Sillanpaa, M. Chiral separation of beta-blockers by supercritical fluid chromatography using Chiralpak-IG and Chiralpak IBN-5 columns. *Chirality* **2022**, *34*, 848–855. [[CrossRef](#)]
6. Wang, B.; Zhu, B.L.; Gong, J.; Weng, J.S.; Xia, F.F.; Liu, W.Q. Resolution of racemic 1-(4-methoxyphenyl) ethanol using immobilized lipase with high substrate tolerance. *Biochem. Eng. J.* **2020**, *158*, 107559. [[CrossRef](#)]
7. de Almeida, D.K.C.; da Silva, M.R.; de Mattos, M.C.; Nunes, F.M.; Ballereau, S.; Genisson, Y.; Maraval, V.; Chauvin, R.; Oliveira, M.C.F. Lipase-catalysed enantioselective kinetic resolution of rac-lipidic alkynylcarbinols and a C-5 synthon thereof via a hydrolysis approach. *Mol. Catal.* **2020**, *488*, 110926. [[CrossRef](#)]
8. Higashio, K.; Katsuragi, S.; Kundu, D.; Adebar, N.; Plass, C.; Kühn, F.; Groger, H.; Akai, S. Continuous-Flow Dynamic Kinetic Resolution of Racemic Alcohols by Lipase-Oxovanadium Cocatalysis. *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, *2020*, 1961–1967. [[CrossRef](#)]
9. De Almeida, L.A.; Marcondes, T.H.; Milagre, C.D.F.; Milagre, H.M.S. Lipase-oxovanadium heterogeneous catalysis system: A robust protocol for the dynamic kinetic resolution of sec-alcohols. *Chemcatchem* **2020**, *12*, 2849–2858. [[CrossRef](#)]
10. Fonseca, T.D.; Vega, K.B.; da Silva, M.R.; de Oliveira, M.D.F.; de Lemos, T.L.G.; Contente, M.L.; Molinari, F.; Cespugli, M.; Fortuna, S.; Gardossi, L.; et al. Lipase mediated enzymatic kinetic resolution of phenylethyl halohydrins acetates: A case of study and rationalization. *Mol. Catal.* **2020**, *485*, 110819. [[CrossRef](#)]
11. Kuhn, F.; Katsuragi, S.; Oki, Y.; Scholz, C.; Akai, S.; Groger, H. Dynamic kinetic resolution of a tertiary alcohol. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 2885–2888. [[CrossRef](#)]
12. Mato, R.; Manzano, R.; Reyes, E.; Prieto, L.; Uria, U.; Carrillo, L.; Vicario, J.L. Kinetic Resolution in Transannular Morita-Baylis-Hillman Reaction: An Approximation to the Synthesis of Sesquiterpenes from Guaiane Family. *Catalysts* **2022**, *12*, 67. [[CrossRef](#)]
13. Fukawa, Y.; Mizuno, Y.; Kawade, K.; Mitsukura, K.; Yoshida, T. Novel (S)-Selective Hydrolase from *Arthrobacter* sp. K5 for Kinetic Resolution of Cyclic Amines. *Catalysts* **2021**, *11*, 809. [[CrossRef](#)]
14. Soto, M.; Sanz-Machin, I.; Rodriguez-Solla, H.; Gotor-Fernandez, V. Chemoenzymatic Stereoselective Synthesis of trans-Flavan-4-ols via Lipase-Catalyzed Kinetic Resolutions. *Catalysts* **2021**, *11*, 1296. [[CrossRef](#)]
15. Biedermann, D.; Hurtova, M.; Benada, O.; Valentova, K.; Biedermannova, L.; Kren, V. Continuous Diastereomeric Kinetic Resolution-Silybins A and B. *Catalysts* **2021**, *11*, 1106. [[CrossRef](#)]
16. Mendoza-Ortiz, P.A.; Gama, R.S.; Gomez, O.C.; Luiz, J.H.H.; Fernandez-Lafuente, R.; Cren, E.C.; Mendes, A.A. Sustainable Enzymatic Synthesis of a Solketal Ester-Process Optimization and Evaluation of Its Antimicrobial Activity. *Catalysts* **2020**, *10*, 218. [[CrossRef](#)]
17. Serra, S.; De Simeis, D. Stereoselective Synthesis of Terpenoids through Lipase-Mediated Resolution Approaches. *Catalysts* **2020**, *10*, 504. [[CrossRef](#)]
18. Uddin, M.; Basak, D.; Hopefl, R.; Minofar, B. Potential Application of Ionic Liquids in Pharmaceutical Dosage Forms for Small Molecule Drug and Vaccine Delivery System. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2020**, *23*, 158–176. [[CrossRef](#)]
19. Lhermerout, R.; Perkin, S. A new methodology for a detailed investigation of quantized friction in ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 455–466. [[CrossRef](#)]
20. Imam, H.T.; Krasnan, V.; Rebros, M.; Marr, A.C. Applications of Ionic Liquids in Whole-Cell and Isolated Enzyme Biocatalysis. *Molecules* **2021**, *26*, 4791. [[CrossRef](#)]
21. Sheldon, R.A. Biocatalysis in ionic liquids: State-of-the-union. *Green Chem.* **2021**, *23*, 8406–8427. [[CrossRef](#)]
22. Xu, P.; Liang, S.; Zong, M.H.; Lou, W.Y. Ionic liquids for regulating biocatalytic process: Achievements and perspectives. *Biotechnol. Adv.* **2021**, *51*, 107702. [[CrossRef](#)]
23. Wang, Y.; Chen, X.Y.; Liang, X.Y.; Liang, Z.H.; Cheng, H.; Li, X.; Li, L.L. Pepsin-Catalyzed Asymmetric Cross Aldol Reaction Promoted by Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents. *Catal. Lett.* **2020**, *150*, 2549–2557. [[CrossRef](#)]
24. Abdussalam-Mohammed, W.; Ali, A.Q.; Errayes, A.O. Green Chemistry: Principles, Applications, and Disadvantages. *Chem. Methodol.* **2020**, *4*, 408–423. [[CrossRef](#)]
25. Itoh, T. Activation of Lipase-Catalyzed Reactions Using Ionic Liquids for Organic Synthesis. In *Application of Ionic Liquids in Biotechnology*; Itoh, T., Koo, Y.M., Eds.; Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology; Springer: Berlin, Germany, 2019; Volume 168, pp. 79–104.
26. Lima, R.N.; dos Anjos, C.S.; Orozco, E.V.M.; Porto, A.L.M. Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. *Mol. Catal.* **2019**, *466*, 75–105. [[CrossRef](#)]
27. Itoh, T.; Koo, Y.M. Application of Ionic Liquids in Biotechnology Preface. In *Application of Ionic Liquids in Biotechnology*; Itoh, T., Koo, Y.M., Eds.; Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology; Springer International Publishing Ag: Cham, Switzerland, 2019; Volume 168, pp. V–VII.
28. Wang, F.Q.; He, S.; Zhu, C.T.; Rabausch, U.; Streit, W.; Wang, J. The combined use of a continuous-flow microchannel reactor and ionic liquid cosolvent for efficient biocatalysis of unpurified recombinant enzyme. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2018**, *93*, 2671–2680. [[CrossRef](#)]

29. Itoh, T.; Ouchi, N.; Hayase, S.; Nishimura, Y. Lipase-catalyzed enantioselective acylation in a halogen free ionic liquid solvent system. *Chem. Lett.* **2003**, *32*, 654–655. [[CrossRef](#)]
30. Cui, X.; Ding, Q.; Shan, R.N.; He, C.H.; Wu, K.J. Enantioseparation of flurbiprofen enantiomers using chiral ionic liquids by liquid-liquid extraction. *Chirality* **2019**, *31*, 457–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Elgharbawy, A.A.M.; Moniruzzaman, M.; Goto, M. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids: Part II. *Biochem. Eng. J.* **2020**, *154*, 107426. [[CrossRef](#)]
32. Sikora, A.; Chelminiak-Dudkiewicz, D.; Siodmiak, T.; Tarczykowska, A.; Sroka, W.D.; Ziegler-Borowska, M.; Marszall, M.P. Enantioselective acetylation of (R,S)-atenolol: The use of *Candida rugosa* lipases immobilized onto magnetic chitosan nanoparticles in enzyme-catalyzed biotransformation. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2016**, *134*, 43–50. [[CrossRef](#)]
33. Sikora, A.; Chelminiak-Dudkiewicz, D.; Ziegler-Borowska, M.; Marszall, M.P. Enantioseparation of (R,S)-atenolol with the use of lipases immobilized onto new-synthesized magnetic nanoparticles. *Tetrahedron-Asymmetry* **2017**, *28*, 374–380. [[CrossRef](#)]
34. Sikora, A.; Sroka, W.D.; Siodmiak, T.; Marszall, M.P. Kinetic Resolution of (R, S)-atenolol with the Use of Lipases in Various Organic Solvents. *Curr. Org. Synth.* **2017**, *14*, 747–754. [[CrossRef](#)]
35. Wang, H.; Zhao, Y.; Liao, P.; Wu, S.; Hou, Y.L.; Sun, W.J.; Ding, L.; Chen, B. Rapid Determination of Illegally Added beta-Receptor Blockers in Traditional Medicines and Dietary Supplements by DCBI-MS Method. *Chem. J. Chin. Univ. Chin.* **2013**, *34*, 556–562. [[CrossRef](#)]
36. Lwin, E.M.P.; Gerber, C.; Song, Y.M.; Leggett, C.; Ritchie, U.; Turner, S.; Garg, S. A new LC-MS/MS bioanalytical method for atenolol in human plasma and milk. *Bioanalysis* **2017**, *9*, 517–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Dwivedee, B.P.; Ghosh, S.; Bhaumik, J.; Banoth, L.; Banerjee, U.C. Lipase-catalyzed green synthesis of enantiopure atenolol. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 15850–15860. [[CrossRef](#)]
38. Lund, I.T.; Bockmann, P.L.; Jacobsen, E.E. Highly enantioselective CALB-catalyzed kinetic resolution of building blocks for beta-blocker atenolol. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 7288–7292. [[CrossRef](#)]
39. Montalban, M.G.; Collado-Gonzalez, M.; Lozano-Perez, A.A.; Banos, F.G.D.; Villora, G. Extraction of organic compounds involved in the kinetic resolution of rac-2-pentanol from n-hexane by imidazolium-based ionic liquids: Liquid-liquid equilibrium. *J. Mol. Liq.* **2018**, *252*, 445–453. [[CrossRef](#)]
40. Ramos-Martin, J.; Khiari, O.; Alcantara, A.R.; Sanchez-Montero, J.M. Biocatalysis at Extreme Temperatures: Enantioselective Synthesis of both Enantiomers of Mandelic Acid by Transesterification Catalyzed by a Thermophilic Lipase in Ionic Liquids at 120 degrees C. *Catalysts* **2020**, *10*, 1055. [[CrossRef](#)]
41. Elgharbawy, A.A.; Muniruzzaman, M.; Salleh, H.M.; Alam, M.D.Z. Ionic Liquids as a Green Solvent for Lipase-Catalyzed Reactions. In *Industrial Applications of Green Solvents, Volume I*; Inamuddin, Ahamed, M.I., Asiri, A.M., Eds.; Materials Research Foundations: Millersville, PA, USA, 2019; Volume 50, pp. 21–60.
42. Park, S.; Doan, T.T.N.; Koo, Y.M.; Oh, K.K.; Lee, S.H. Ionic liquids as cosolvents for the lipase-catalyzed kinetic resolution of ketoprofen. *Mol. Catal.* **2018**, *459*, 113–118. [[CrossRef](#)]
43. Wang, Y.; Cheng, H.; He, J.R.; Yao, Q.X.; Li, L.L.; Liang, Z.H.; Li, X. Enzymes-Catalyzed Knoevenagel Condensation Promoted by Ionic Liquid and Deep Eutectic Solvent. *Catal. Lett.* **2022**, *152*, 1215–1223. [[CrossRef](#)]
44. Jadav, D.; Pandey, D.K.; Patil, T.; Singh, D.K.; Dharaskar, S.; Bandyopadhyay, R.; Tsunoji, N.; Kumar, R.; Bandyopadhyay, M. Ordered silica matrices supported ionic liquids as highly efficient catalysts for fine chemical synthesis. *J. Porous Mater.* **2022**, 1–15. [[CrossRef](#)]

8.3. ZASTOSOWANIE DWUFAZOWYCH SYSTEMÓW KATALITYCZNYCH W ENANCJOSELEKTYWNYM ROZDZIALE (*R,S*)-1-FENYLOETANOLU

Opis dotyczy pracy [P3]: [Joanna Chałupka](#), Jacek Dulęba, Adam Sikora, Tomasz Siódmiak, Michał Marszał. The Application of Two-Phase Catalytic System in Enantioselective Separation of Racemic (*R,S*)-1-Phenylethanol, *Catalysts* 2023, 13(2), 292. DOI: 10.3390/catal13020292.

Synteza organiczna jest jednym z najważniejszych sposobów opracowywania nowych leków i prekursorów. Jednocześnie, wraz ze znacznym rozwojem rynku farmaceutycznego, stale rośnie zapotrzebowanie na nowe leki. Dlatego nowe reakcje syntezy i analizy katalizatorów chemicznych odgrywają kluczową rolę w wyznaczaniu trendów naukowych. Ten typ reakcji ma jednak pewne ograniczenia. Koszt stosowania katalizatorów chemicznych jest wysoki i często przewyższa korzyści związane z wydajnością reakcji. Proces często wymaga ekstremalnych warunków reakcji, zwłaszcza w aspekcie temperatury i ciśnienia. Ponadto co raz częściej obserwuje się niską specyficzność katalizatorów. Z kolei reakcje wykorzystujące enzymy jako katalizatory, zwane inaczej biokatalizą, są alternatywnym rozwiązaniem pozwalającym uczynić syntezę bardziej wydajną, tańszą i przyjazną dla środowiska.

1-fenyletanol jest aromatycznym alkoholem naturalnie występującym w kwiatach herbaty, winogronach czy kakao. Z uwagi na fakt, iż posiada centrum chiralne 1-fenyletanol występuje w formie dwóch enancjomerów. (*S*)-1-fenyletanol jest często wykorzystywany w syntezie organicznej celem pozyskania różnych substancji aktywnych odpowiedzialnych za efekt terapeutyczny. Z uwagi na swoją strukturę (*S*)-1-fenyletanol stanowi rdzeń leków przeciwcukrzycowych oraz antydepresantów. Dodatkowo (*S*)-1-fenyletanol jest wykorzystywany w syntezie antybiotyków, leków przeciwgrzybiczych i przeciw pasożytniczych.

Celem naukowym badań było zoptymalizowanie enzymatycznego rozdziału kinetycznego (*R,S*)-1-fenyletanolu, który umożliwił uzyskanie czystego enancjomerycznie (*S*)-1-fenyletanolu. W ramach zrealizowanych prac badawczych zaproponowano enancjoselektywną biotransformację w wyniku której otrzymano (*S*)-1-fenyletanol (**Rycina 34**). W tym celu testowano łącznie 40 układów katalitycznych, które różniły się czynnikiem

28	Octan winylu	<i>n</i> -heptan	[DMIM][MeSO ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
29	Octan winylu	toluen	[HMIM][BF ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
30	Octan winylu	toluen	[OMIM][Cl]	<i>Candida rugosa</i> OF
31	Octan winylu	toluen	[EMIM][BF ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
32	Octan winylu	toluen	[DMIM][MeSO ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
33	Octan izopropenyłu	<i>n</i> -heptan	[HMIM][BF ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
34	Octan izopropenyłu	<i>n</i> -heptan	[OMIM][Cl]	<i>Candida rugosa</i> OF
35	Octan izopropenyłu	<i>n</i> -heptan	[EMIM][BF ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
36	Octan izopropenyłu	<i>n</i> -heptan	[DMIM][MeSO ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
37	Octan izopropenyłu	toluen	[HMIM][BF ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
38	Octan izopropenyłu	toluen	[OMIM][Cl]	<i>Candida rugosa</i> OF
39	Octan izopropenyłu	toluen	[EMIM][BF ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
40	Octan izopropenyłu	toluen	[DMIM][MeSO ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF

Utworzone systemy katalityczne zostały poddane inkubacji w kontrolowanych warunkach temperaturowych wynoszących 37°C przy stałej prędkości wytrząsania równej RPM = 250 przez 168 godzin. W celu monitorowania zmian zachodzących w mieszaninie reakcyjnej pobierano próbki co 24 godziny i po odpowiednim przygotowaniu badano je z zastosowaniem chiralnej wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej. Wcześniej zoptymalizowany rozdział chromatograficzny pozwalał na jakościowe oraz ilościowe oznaczenie obydwóch enancjomerów 1-fenyløetanolu oraz octanu 1-fenyløetanolu. Fazę stacjonarną stanowiła chiralna kolumna Lux-Cellulose 3, natomiast fazą ruchomą była mieszanina *n*-heptanu, 2-propanolu oraz kwasu trifluorooctowego w stosunku objętościowym wynoszącym 98,7/1,3/0,15. Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła $F_R = 1$ mL/min, natomiast rozdział chromatograficzny odbywał się w temperaturze 15°C. Detekcja odbywała się za pomocą detektora UV-VIS rejestrującego chromatogram przy długości fali wynoszącej $\lambda = 254$ nm.

Wyniki realizowanych eksperymentów potwierdziły pierwotną hipotezę, że lipazy z *Burkholderia cepacia* oraz *Candida rugosa* są zdolne do katalizowania enancjoselektywnej acetylacji racemicznego 1-fenyløetanolu z użyciem octanu winylu lub octanu izopropenyłu jako czynnika acetylującego. Zastosowanie dwufazowych układów katalitycznych z cieczą jonową pozwoliło na uzyskanie wysokich parametrów enancjoselektywnych. Zastosowane cieczerze jonowe charakteryzowały się zróżnicowaną charakterystyką kinetyczną, prowadzącą do zaobserwowania różnych enancjoselektywności i nadmiarów enancjomerycznych substratu i produktu. W efekcie układ katalityczny zawierający lipazę *Burkholderia cepacia*, [EMIM][BF₄] i *n*-heptan jako środowisko reakcji oraz octan winylu jako środek acetylujący okazał się najbardziej wydajnym i enancjoselektywnym układem, co potwierdziły obserwowane parametry rozdziału kinetycznego ($E=379,0$, $ee_p = 98,9\%$). Spośród innych

testowanych układów katalitycznych za enancjoselektywne można uznać także te, które zawierały [HMIM][BF₄] i [OMIM][Cl]. Z kolei mieszaniny reakcyjne zawierające [DMIM][MeSO₄] hamowały aktywność zastosowanych biokatalizatorów i zatrzymały biotransformację. Należy jednak podkreślić, że kompozycja układu katalitycznego z cieczą jonową i rozpuszczalnikiem organicznym, takim jak *n*-heptan czy toluen tworzy układ dwufazowy, w którym faza organiczna zawiera lipazę, natomiast faza cieczy jonowej zawiera substraty z produktami enancjoselektywnej biotransformacji. W praktyce umożliwia to na łatwą separację białkowego biokatalizatora ze środowiska reakcji i dalsze jego wykorzystywanie w kolejnych cyklach katalitycznych, co także zostało potwierdzone w ramach zrealizowanych prac badawczych. Co więcej, zaproponowane biotransformacje w dwufazowych układach katalitycznych znacznie ograniczają użycie potencjalnie toksycznych rozpuszczalników organicznych, co pozostaje w zgodzie z założeniami „zielonej chemii”.

Rezultaty omawianych badań zostały szczegółowo opisane w publikacji pt.: „The Application of Two-Phase Catalytic System in Enantioselective Separation of Racemic (*R,S*)-1-Phenylethanol” opublikowanej w *Catalysts*: 2023, 13, 292, w której autorami byli: Joanna Chałupka, Jacek Dulęba, Adam Sikora, Tomasz Siódmiak, Michał Piotr Marszał [P3].

Article

The Application of Two-Phase Catalytic System in Enantioselective Separation of Racemic (*R,S*)-1-Phenylethanol

 Joanna Chałupka †, Jacek Dułęba †, Adam Sikora *, Tomasz Siódmiak  and Michał Piotr Marszałł

Department of Medicinal Chemistry, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Faculty of Pharmacy, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Poland, Dr. A. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz, Poland

* Correspondence: adam.sikora@cm.umk.pl; Tel.: +48-52-585-3532

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Kinetic resolution is one of the methods which allows obtaining enantiomerically pure compounds. In the study presented herein, enantioselective biotransformations of (*R,S*)-1-phenylethanol were performed with the use of various catalytic systems containing ionic liquids and *n*-heptane or toluene as a reaction medium, vinyl acetate or isopropenyl acetate as an acetylating agent, and lipases from *Burkholderia cepacia* or *Candida rugosa*. The conducted studies proved that the use of *Burkholderia cepacia* lipase, vinyl acetate, and *n*-heptane with [EMIM][BF₄] allows obtaining enantiomerically pure 1-phenylethyl acetate, with the enantiomeric excess of products $e_p = 98.9\%$, conversion $c = 40.1\%$, and high value of enantioselectivity $E > 200$. Additionally, the use of ionic liquids allowed us to reuse enzyme in 5 reaction cycles, ensuring the high operational stability of the protein.

Keywords: racemic 1-phenylethanol; *Burkholderia cepacia* lipase; *Candida rugosa* lipase; ionic liquid; enantioselective biotransformation



Citation: Chałupka, J.; Dułęba, J.; Sikora, A.; Siódmiak, T.; Marszałł, M.P. The Application of Two-Phase Catalytic System in Enantioselective Separation of Racemic (*R,S*)-1-Phenylethanol. *Catalysts* **2023**, *13*, 292. <https://doi.org/10.3390/catal13020292>

Academic Editor: Evangelos Topakas

Received: 6 December 2022

Revised: 19 January 2023

Accepted: 25 January 2023

Published: 28 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The organic reaction is the most important way to develop new drugs and precursors. At the same time, with the significant development of the pharmaceutical market, the need for new drugs is ever-growing. Therefore, chemical catalyst synthesis and analysis reactions play a crucial role in setting scientific trends. However, this type of reaction has some limitations [1]. The cost of applying chemical catalysts is high and often exceeds reaction efficiency benefits. The process often requires extreme conditions of reaction, especially temperature and pressure. Moreover, the low specificity of catalysts has been observed [1,2]. The reaction using enzymes as catalysts, commonly known as biocatalysis, is the alternative solution to make synthesis more efficient, cheap, and environmentally friendly [3].

Lipases (E.C. 3.1.1.3) belong to ones of the most widely applied biocatalysts. They are characterized by high activity, stability, and stereoselectivity in catalyzing broad spectra of reaction without applying cofactors [1,4,5]. The advantages of the reactions catalyzed by these enzymes are occurring in aqueous and non-aqueous mediums, the high solubility of hydrophobic substrates, the possibility to reuse the enzyme, and the high specificity of the reaction [1,6]. Esterification and transesterification are the most common organic reactions catalyzed by lipases [7]. Therefore, they are used in obtaining expected products with high efficiency. Enantioselectivity is the feature of lipases that allows obtaining chirally pure compounds, especially drugs and their building blocks [8–12]. Due to chiral centre (or centres) in their structure, chiral drugs show various pharmacological activities depending on each enantiomer. So far, there have been many chiral drugs in the form of enantiomers characterized by better therapeutic activity than the other enantiomer included in the racemic mixture of this drug [13]. Lipases were applied in many reactions to obtain pure compounds or key intermediates [14]. A significant way to obtain an optically pure drug or intermediate is the kinetic resolution of a racemic mixture of a chemical compound. This

reaction is based on transferring one enantiomer from the reaction medium faster than the other one [8]. The kinetic resolution of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) as (*R,S*)-ibuprofen (towards *S*-enantiomer) catalyzed by a lipase from *Candida antarctica* (CAL-B) and lipase from *Candida rugosa* (CRL) and (*R,S*)-flurbiprofen (towards *R*-enantiomer) is widely described in the literature [3,9,13,15]. CRL has also been used in the synthesis of other NSAID ((*S*)-naproxen), cardiological β -blocker ((*S*)-atenolol) [16,17], and critical intermediates of ezetimibe, a drug used in hypercholesterolemia [14]. On the other hand, CAL-B catalyzed the reaction of obtaining (*R*)-ketorolac (NSAID) antibiotics, quinolone derivatives, and (-)-chloramphenicol and (as Novozym 435) pimecrolimus, the compound used in the therapy of dermatitis [14]. In synthesizing rasagiline mesylate from racemic indanol, an essential drug in treating Parkinsonian syndrome, the reaction was catalyzed by a lipase from *Thermomyces languinosis* (TLL). Lipases from *Pseudomonas sp.* also undoubtedly have significance in chiral synthesis. *Pseudomonas stutzeri* lipase (TL) has been applied in achieving benzoin derivatives as the chiral building block. Moreover, *Pseudomonas cepacia* lipase (PCL), commonly named lipase from *Burkholderia cepacia* (BCL), has been tested in receiving numerous chiral intermediates such as tetrahydrofuran intermediates [14], mandelic acid [18,19], and *myo*-inositol [20,21]. However, all the compounds mentioned above are obtained in reactions catalyzed by a narrow spectrum of enzymes. The kinetic resolution of the one of the most commonly studied (*R,S*)-1-phenylethanol (RS-1-PHE), important secondary alcohol with a chiral center (Figure 1), is catalyzed by a wide range of lipases toward obtaining the chirally pure building block (*R*)-1-phenylethanol (*R*-1-PHE). In pharmacy, *R*-1-PHE was applied in ophthalmic preservatives and cholesterol intestinal adsorption [22–24]. This enantiomer was also used in the cosmetic industry as a mild fragrance [22,25]. It is worth mentioning that the enantiomers of (*R,S*)-1-phenylethanol showed various odors—(*R*)-1-phenylethanol has a floral, earthy-green, and honeysuckle aroma, whereas the (*S*)-1-phenylethanol is characterized by a mild hyacinth and gardenia smell with the addition of strawberries [26]. On the other hand, 1-phenylethyl acetate odor was described as sweet and fruity, tropical, mango, woody, musty, and honey-like with floral powdery nuances [27,28]. Both enantiomers of (*R,S*)-1-phenylethanol also exist in volatile plants.

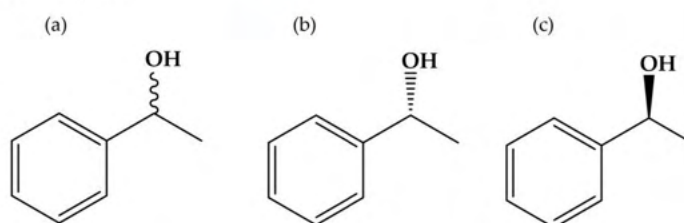


Figure 1. The structures of (*R,S*)-1-phenylethanol (a), and enantiomers: (*R*)-1-phenylethanol (b), and (*S*)-1-phenylethanol (c).

As mentioned above, (*R,S*)-1-phenylethanol was kinetically separated in the reaction catalyzed by a wide spectrum of lipases [29]. The mechanism of this process is based on the acylation of (*R,S*)-1-phenylethanol as the acyl acceptor with ester as the acyl donor in the presence of an appropriate solvent and lipase as the catalyst [30]. The result of the reaction is (*R*)-1-phenylethyl acetate [31,32]. The most used acyl donor is vinyl acetate, due to the high enantiomeric excess of product obtained during the reaction [31–33]. The enantiomeric excess of product was close to 100%. However, alternative donors, such as isopropenyl acetate, have also been investigated (Figure 2) [30,34]. To improve the efficiency of the reaction, the lipase was commonly applied in its immobilized form using various physicochemical supports [22,31].

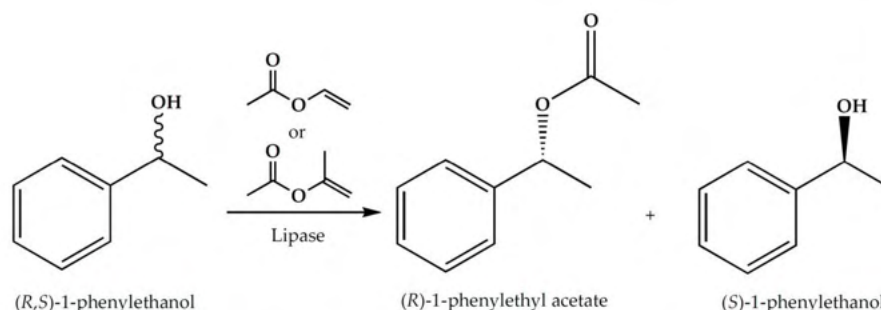


Figure 2. The kinetic resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol using various acyl donors: vinyl acetate or isopropenyl acetate.

Ionic liquids (ILs) are organic salts in which the ions are poorly coordinated, which makes them liquid below 100 °C or at room temperature [35]. They are composed of a large organic cation with a low degree of symmetry and a small anion, which may be organic or inorganic in origin [36]. Considering the chemical structure of the cation on which the positive charge is located, the following ionic liquids (ILs) are distinguished: Ammonium [R₄N]⁺, Phosphonium [R₄P]⁺ (b), Sulfonium [R₃S]⁺ (c), Oxonium [R₂O]⁺ (d) (Figure 3) [37].

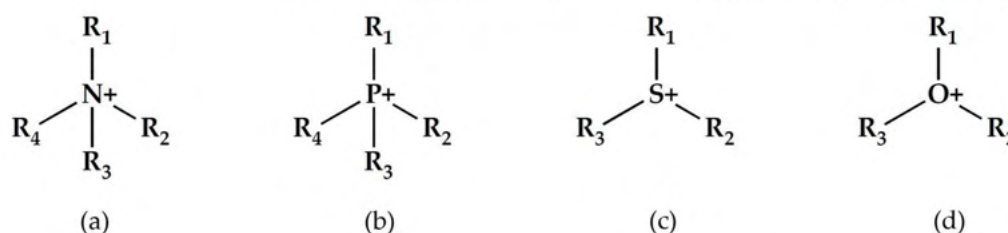


Figure 3. Ionic liquids: ammonium (a), phosphonium (b), sulfonium (c), and oxonium (d).

Ionic liquids are unusual chemical compounds that are used in many fields of modern science. Many ionic liquids have been developed to solve specific synthetic problems and are therefore also referred to as so-called “design solvents”. Their unique properties make them useful in many technological processes [35]. Ionic liquids are also considered as “green solvents” that exhibit several unique characteristics such as high ionic conductivity, high solvation power, thermal stability, low volatility, and recyclability. Therefore, ionic liquids have potential pharmaceutical applications for drug design and formulation development. ILs are widely used in the pharmaceutical industry, mainly as catalysts and reaction media to replace volatile organic solvents [38]. Conventional organic solvents pose a threat to the environment due to the volatility, highly flammability, toxicity, and carcinogenic properties they exhibit. Ionic liquids are promising green solvent alternatives to the volatile organic solvents due to their ease of reuse, non-volatility, thermal stability and ability to dissolve a variety of organic and organometallic compounds [36,39]. The use of ionic liquids as a reaction medium has many advantages. These “green” solvents are environmentally friendly and their transformations are often faster [40]. Additionally, ionic liquids can be recovered from the bioreactor and reused in subsequent catalytic cycles, which reduces the overall cost of the process. The main advantage of the use of ionic liquids, especially [EMIM][BF₄], is that they increase the catalytic properties of lipase from *Burkholderia cepacia*. Additionally, due to the fact that the direct addition of ionic liquids to the reaction system containing organic solvent such as: *n*-heptane or toluene creates a two-phase catalytic system in which one phase contains lipase, whereas the second phase contains substrates and products, it provides the possibility to reuse biocatalyst in other catalytic reactions

by simple separation of lipase from the catalytic system. The conducted studies proved that the use of *Burkholderia cepacia* lipase, vinyl acetate, and *n*-heptane with [EMIM][BF₄] as a two-phase reaction medium allows obtaining enantiomerically pure 1-phenylethyl acetate. Additionally, the composition of the two-phase reaction system allowed reusing the enzyme in five reaction cycles, ensuring the high operational stability of the protein.

2. Results and Discussion

2.1. Enantioselective Biotransformation of Racemic 1-Phenylethanol

Burkholderia cepacia and *Candida rugosa* lipases, which are commercially available, were used to study the enantioselective biotransformation of (*R,S*)-1-phenylethanol in a variety of two-phase reaction conditions. Ionic liquids are characterized by various advantages while being utilized in the kinetic resolution of racemic compounds, as abovementioned; therefore, the research that was undertaken concentrated on exploring different reaction systems. The types of ionic liquid, acetylating agent, lipase, and solvent were tested so the obtained catalytic systems varied from one another. Finally, it was composed of 32 reaction systems with addition of ionic liquids and 8 reaction systems without IL, as is listed in Table 1. However, only some of the evaluated reaction systems demonstrated adequate kinetic resolution performance criteria (Table 2). The catalytic system containing lipase from *Burkholderia cepacia*, vinyl acetate as acetylating agent as well as *n*-heptane and [EMIM][BF₄] as reaction medium allowed obtaining the greatest outcomes among all examined catalytic systems, nevertheless. The performed studies showed that only selected ionic liquids enhanced the catalytic properties of enzymes.

Table 1. List of catalytic systems tested in kinetic resolution of racemic 1-phenylethanol.

No	Acetylating Agent	Reaction Medium	Ionic Liquid	Lipase
1	Vinyl acetate	<i>n</i> -heptane	None	<i>Burkholderia cepacia</i>
2	Vinyl acetate	toluene	None	<i>Burkholderia cepacia</i>
3	Isopropenyl acetate	<i>n</i> -heptane	None	<i>Burkholderia cepacia</i>
4	Isopropenyl acetate	toluene	None	<i>Burkholderia cepacia</i>
5	Vinyl acetate	<i>n</i> -heptane	None	<i>Candida rugosa</i> OF
6	Vinyl acetate	toluene	None	<i>Candida rugosa</i> OF
7	Isopropenyl acetate	<i>n</i> -heptane	None	<i>Candida rugosa</i> OF
8	Isopropenyl acetate	toluene	None	<i>Candida rugosa</i> OF
9	Vinyl acetate	<i>n</i> -heptane	[HMIM][BF ₄]	<i>Burkholderia cepacia</i>
10	Vinyl acetate	<i>n</i> -heptane	[OMIM][Cl]	<i>Burkholderia cepacia</i>
11	Vinyl acetate	<i>n</i> -heptane	[EMIM][BF ₄]	<i>Burkholderia cepacia</i>
12	Vinyl acetate	<i>n</i> -heptane	[DMIM][MeSO ₄]	<i>Burkholderia cepacia</i>
13	Vinyl acetate	toluene	[HMIM][BF ₄]	<i>Burkholderia cepacia</i>
14	Vinyl acetate	toluene	[OMIM][Cl]	<i>Burkholderia cepacia</i>
15	Vinyl acetate	toluene	[EMIM][BF ₄]	<i>Burkholderia cepacia</i>
16	Vinyl acetate	toluene	[DMIM][MeSO ₄]	<i>Burkholderia cepacia</i>
17	Isopropenyl acetate	<i>n</i> -heptane	[HMIM][BF ₄]	<i>Burkholderia cepacia</i>
18	Isopropenyl acetate	<i>n</i> -heptane	[OMIM][Cl]	<i>Burkholderia cepacia</i>
19	Isopropenyl acetate	<i>n</i> -heptane	[EMIM][BF ₄]	<i>Burkholderia cepacia</i>
20	Isopropenyl acetate	<i>n</i> -heptane	[DMIM][MeSO ₄]	<i>Burkholderia cepacia</i>
21	Isopropenyl acetate	toluene	[HMIM][BF ₄]	<i>Burkholderia cepacia</i>
22	Isopropenyl acetate	toluene	[OMIM][Cl]	<i>Burkholderia cepacia</i>

Table 1. Cont.

No	Acetylating Agent	Reaction Medium	Ionic Liquid	Lipase
23	Isopropenyl acetate	toluene	[EMIM][BF ₄]	<i>Burkholderia cepacia</i>
24	Isopropenyl acetate	toluene	[DMIM][MeSO ₄]	<i>Burkholderia cepacia</i>
25	Vinyl acetate	<i>n</i> -heptane	[HMIM][BF ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
26	Vinyl acetate	<i>n</i> -heptane	[OMIM][Cl]	<i>Candida rugosa</i> OF
27	Vinyl acetate	<i>n</i> -heptane	[EMIM][BF ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
28	Vinyl acetate	<i>n</i> -heptane	[DMIM][MeSO ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
29	Vinyl acetate	toluene	[HMIM][BF ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
30	Vinyl acetate	toluene	[OMIM][Cl]	<i>Candida rugosa</i> OF
31	Vinyl acetate	toluene	[EMIM][BF ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
32	Vinyl acetate	toluene	[DMIM][MeSO ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
33	Isopropenyl acetate	<i>n</i> -heptane	[HMIM][BF ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
34	Isopropenyl acetate	<i>n</i> -heptane	[OMIM][Cl]	<i>Candida rugosa</i> OF
35	Isopropenyl acetate	<i>n</i> -heptane	[EMIM][BF ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
36	Isopropenyl acetate	<i>n</i> -heptane	[DMIM][MeSO ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
37	Isopropenyl acetate	toluene	[HMIM][BF ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
38	Isopropenyl acetate	toluene	[OMIM][Cl]	<i>Candida rugosa</i> OF
39	Isopropenyl acetate	toluene	[EMIM][BF ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF
40	Isopropenyl acetate	toluene	[DMIM][MeSO ₄]	<i>Candida rugosa</i> OF

After 168 h of incubation, the (*R*)-1-phenylethyl acetate was obtained with the highest value of enantiomeric excesses of the product being $ee_p = 98.0\%$, whereas the enantioselectivity was $E = 205.0$. The application of lipase from *Burkholderia cepacia* resulted in obtaining acceptable results in specific reaction systems, whereas the use of *Candida rugosa* OF lipase did not provide sufficient kinetic resolution of racemic compounds in all tested catalytic systems.

2.2. Effect of Reaction Time

It is significant to test the duration of reaction time, since it is one of the most crucial aspects of the kinetic resolution of racemic compounds. Other investigations have shown that the enantioselectivity and enantiomeric excess of both products and substrates rapidly decline when the reaction medium is incubated for an excessively long time. During prolonged reaction, the reaction can no longer be regarded as enantioselective, as a result of the conversion having the potential to be higher than 50%. Commercially available lipases from *Burkholderia cepacia* (10 mg), vinyl acetate (28.25 μ L; 0.3 mM) as an acetylating agent, (*R,S*)-1-phenylethanol (10 μ L; 0.08 mM), [EMIM][BF₄] (200 μ L), and *n*-heptane (400 μ L) were utilized as the reaction media in the experiment. The biotransformations were carried out for 168 h at 37 °C. According to Figures 4 and 5, the reaction duration increased along with the conversion, enantiomeric excess of the substrate, and enantiomeric ratio. Over the same time span, the value of enantiomeric excess of products was constant. The value of conversion was the highest after 168 h of reaction, and it varied depending on the type of catalytic system (Table 2).

Table 2. Enzymatic parameters including enantiomeric excesses of products (ee_p) and substrates (ee_s), conversion (c), and enantioselectivity (E) of different reaction systems screened for the enantioselective transesterification of (*R,S*)-phenylethanol after 168 h of incubation.

No	ee_p	ee_s	c	E
1	96.6%	23.2%	19.4%	72.4
2	96.7%	37.0%	27.7%	86.8
3	97.0%	48.3%	33.3%	105.9
4	96.8%	40.1%	29.3%	90.5
5	95.6%	12.0%	11.1%	49.4
6	97.9%	8.1%	7.7%	104.2
7	91.3%	12.0%	11.6%	24.7
8	96.6%	7.8%	8.9%	10.0
9	97.0%	12.0%	11.0%	74.4
10	94.1%	88.0%	48.3%	96.5
11	98.9%	68.1%	40.8%	379.0
12	39.1%	0.0%	0.0%	2.3
13	27.1%	0.5%	1.8%	1.8
14	78.7%	23.2%	22.8%	10.5
15	89.0%	42.0%	32.1%	25.9
16	19.9%	0.0%	0.1%	1.5
17	12.7%	0.4%	3.2%	1.3
18	21.2%	0.5%	2.4%	1.6
19	20.4%	0.2%	1.2%	1.5
20	0.3%	0.0%	1.8%	1.0
21	2.1%	0.1%	4.2%	1.0
22	5.9%	0.1%	0.9%	1.1
23	42.1%	0.5%	1.2%	2.5
24	68.2%	0.6%	0.9%	5.3
25	49.0%	13.0%	21.0%	3.3
26	29.0%	2.4%	7.7%	1.9
27	79.8%	18.2%	18.6%	10.6
28	39.2%	0.0%	0.0%	2.3
29	2.4%	0.0%	0.5%	1.1
30	9.4%	0.5%	5.2%	1.2
31	29.5%	0.5%	1.7%	1.9
32	0.1%	0.0%	3.5%	1.0
33	21.2%	17.0%	44.5%	1.8
34	19.2%	5.9%	23.5%	1.6
35	24.6%	18.6%	43.1%	2.0
36	1.3%	0.0%	0.3%	1.0
37	0.2%	0.1%	38.7%	1.0
38	24.1%	5.2%	17.8%	1.7
39	20.2%	0.1%	0.6%	1.5
40	2.9%	0.0%	0.8%	1.1

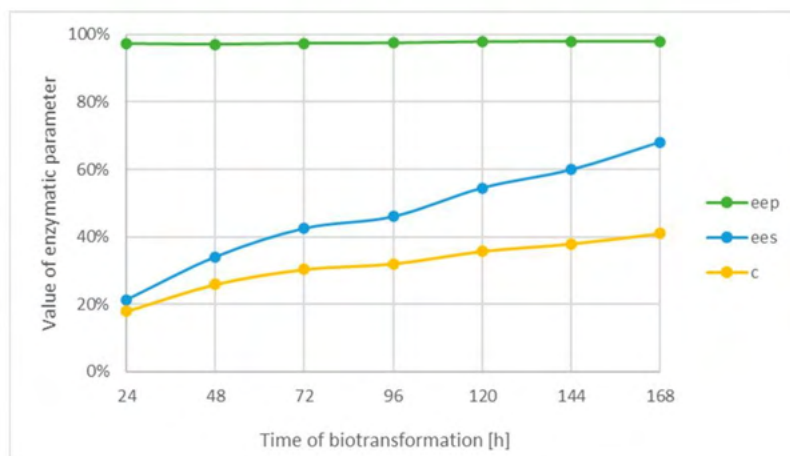


Figure 4. Effect of reaction time on the enzymatic parameters of the performed kinetic resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol in the two-phase catalytic system consisting of [EMIM][BF₄] and *n*-heptane as well as lipase from *Burkholderia cepacia* including values of both enantiomeric excesses of substrate (ee_s) and product (ee_p) as well as conversion (c).

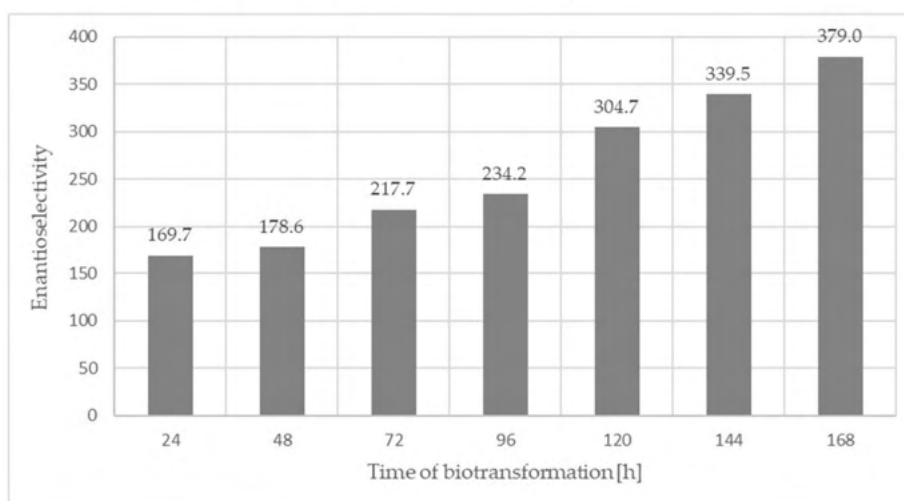


Figure 5. Effect of reaction time on the enantioselectivity (E) of the performed kinetic resolution of (*R,S*)-phenylethanol in the two-phase catalytic system consisting of [EMIM][BF₄] and *n*-heptane as well as lipase from *Burkholderia cepacia*.

2.3. Effect of Biocatalysts

The enzyme-catalyzed biotransformation of racemic phenylethanol was carried out using lipases from *Candida rugosa* OF and *Burkholderia cepacia* in native forms, and their catalytic and enantioselective capabilities were examined. The use of lipase from *Candida rugosa* OF in spite of previously published studies with other racemic compounds were not suitable for kinetic resolution of (*R,S*)-phenylethanol and did not allow obtaining satisfactory results of enantioselectivity among all evaluated catalytic systems, as indicated

in Table 2. Nevertheless, the use of *Burkholderia cepacia* lipase allowed obtaining the product of (*R*)-phenylethyl acetate with a high value of enantiomeric excess and conversion. Nevertheless, the performed studies proved that the utilized biocatalysts are sensitive to reaction conditions, and only some from the tested reaction systems were appropriate to the enzyme, as indicated in Table 2.

2.4. Effect of Reaction Medium

Some of the catalytic systems presented herein were effective in kinetic resolution of (*R,S*)-phenylethanol. As was observed, *Candida rugosa* lipase exhibited low stereoselectivity in the assayed reaction media and it was not suitable for kinetic resolution of racemic 1-phenylethanol. Nevertheless, the performed studies proved that *Burkholderia cepacia* lipase is the proper biocatalyst to perform kinetic resolution. Nevertheless, among all tested catalytic systems, only a few containing *Burkholderia cepacia* lipase were effective. Because of this, one of the most crucial aspects of improving reaction conditions to increase enantioselectivity is selecting the best reaction medium. Taking into account the addition of ionic liquids, it should be noted that, according to the obtained results, only [EMIM][BF₄], [HMIM][BF₄], and [OMIM][Cl] were appropriate for the enantioselective acetylation of racemic phenylethanol. However, the addition of [DMIM][MeSO₄] inhibited the biocatalysts and stopped the reaction. During the experiments the influence of organic solvent was also tested. The catalytic systems contained *n*-heptane or toluene. As it turned out, only one tested catalytic system containing ionic liquid ([EMIM][BF₄]) and toluene was appropriate for kinetic resolution of racemic phenylethanol. Although the enantioselective value for this catalytic system was higher than 20 ($E = 25.94$, sample No.: 23), it was still significantly lower than the E -values obtained for analogues catalytic systems containing *n*-heptane instead of toluene (Figures 6 and 7). Therefore, it should be noted that the catalytic systems containing *n*-heptane as the reaction medium, vinyl acetate as the acetylating donor, and *Burkholderia cepacia* lipase were the most efficient among all tested mixtures. The obtained results were also in line with other studies published elsewhere, in which *n*-heptane was selected as the optimal reaction medium. Nevertheless, it should be noted that despite organic solvents being suitable for enzymatic biotransformation, they are toxic to the environment; thus, it was decided to compose a two-phase catalytic system in which the amount of *n*-heptane would be limited, but still create the optimal surrounding for lipase, whereas the substrates and products would be placed in ionic liquid, which could be easily separated from the reaction mixture. To limit the amount of organic solvent, it was decided to combine ionic liquid and organic solvent in a volumetric ratio equal to 2:1. Finally, the addition of [EMIM][BF₄] to the mixture exhibited the best kinetic resolution parameters, yielding the enantioselectivity $E = 379.0$, enantiomeric excess of products $ee_p = 98.9\%$, and conversion $c = 40.8\%$ after 7 days of reaction.

2.5. Effect of Lipase Reusability in Enzyme-Catalyzed Biotransformation of Racemic Compound

One of the most important advantages of using ionic liquids in two-phase enzyme-catalyzed biotransformations is that the enzyme can be reused in different catalytic systems simply by replacing the ionic liquid with specific substrates and reaction products. During the study, the influence of the recyclability of native lipases on the kinetic resolution of racemic atenolol was investigated. *Burkholderia cepacia* lipase was again used for this purpose according to the indicated substrate-exchange method.

After the catalytic process, the remaining ionic liquid containing enantiomers of 1-phenylethanol and its derivatives was transferred to a separate tube. The same remaining lipase suspended in *n*-heptane was then added to a new batch of ionic liquid containing racemic 1-phenylethanol as the reaction substrate. The correct acetylating agent was used to initiate the enantioselective reaction (vinyl acetate). In the presented experiment, five reaction cycles were performed, reaching 840 h of catalytic and operational activity of the enzymes used. Enantiomeric excesses for all evaluated reaction mixtures after the fifth reaction cycle exceeded 95% of the starting value (Figure 8).

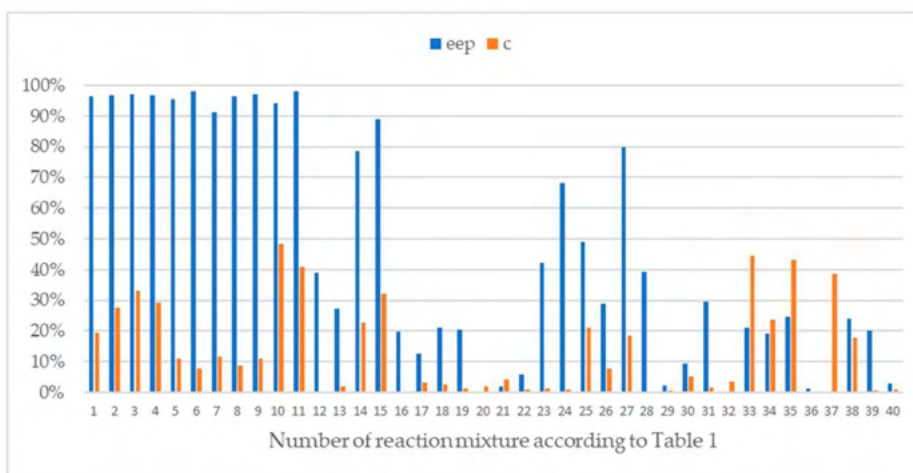


Figure 6. Enzymatic parameters of the performed kinetic resolution including enantiomeric excesses of products (ee_p) and conversion (c) of different reaction media screened for the enantioselective acetylation of (*R,S*)-phenylethanol after 168 h of incubation.

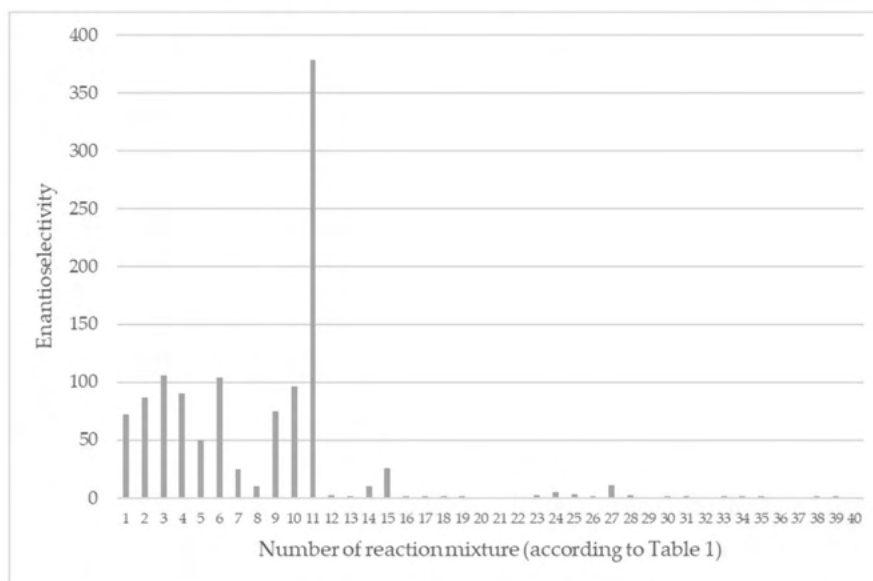


Figure 7. Enantioselectivity values of the assayed enzymatic transesterifications of (*R,S*)-1-phenylethanol after 168 h of incubation.

After five reaction cycles, there was no discernible difference in the catalytic activity of the enzyme in the next catalytic cycles found. Thus, the results obtained show that not only are there direct benefits associated with using ionic liquids to reach catalyst parameters beyond acceptable levels, but also the separation of substrates and products from the catalytic system.

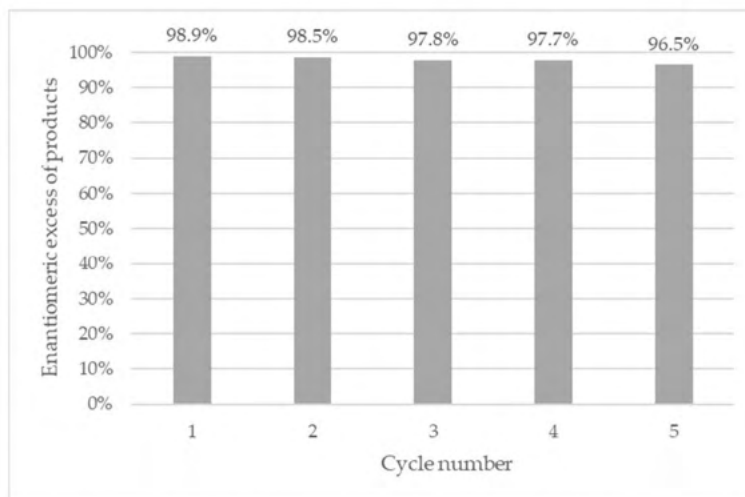


Figure 8. Comparison of the values of enantiomeric excesses of products in five reaction cycles with the reused lipases from *Burkholderia cepacia* in enantioselective biotransformation of (*R,S*)-1-phenylethanol.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals

Amano PS lipase from *Burkholderia cepacia* (APS-BCL) ($\geq 30,000$ U/g) was obtained from Sigma Aldrich. Lipases from *Candida rugosa* OF were a gift from Meito Sangyo Co., Ltd. Heptane, isopropanol, toluene trifluoroacetic acid, and ionic liquids such as 1-hexyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate [HMIM][BF₄], 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate [EMIM][BF₄], 1,3-dimethylimidazolium methyl sulfate [DMIM][MeSO₄], and 1-methyl-3-octylimidazolium chloride [OMIM][Cl] were purchased from Sigma Aldrich. The substrates of kinetic resolution ((*R,S*)-1-phenylethanol, isopropenyl acetate, vinyl acetate), as well as reference standards of (*R,S*)-1-phenylethyl acetate, (*R*)-1-phenylethanol, and (*R*)-1-phenylethyl acetate were purchased from Sigma Aldrich.

3.2. Instrumentation

The HPLC analysis were performed with the use of the Shimadzu HPLC-system (Kyoto, Japan), which was equipped with an autosampler (model: SIL-20AC HT); solvent delivery pump combined with gradient systems (model: LC-20 CE); a degasser (model: DGU-20A5); a column oven (model: CTO-10ASVP); a UV-VIS detector (model: SPD-20A). The chiral resolutions were conducted by using Lux Cellulose-3 (LC-3) (4.6 mm \times 250 mm \times 5 μ m) column with cellulose tris(4-methylbenzoate) which were purchased from Phenomenex Co (Torrance, CA, USA). All incubations were performed at a controlled temperature and number of rotations (250 RPM) in the incubating apparatus, model: the Inkubator1000 and Unimax 1010, which were purchased from Heidolph (Schwabach, Germany). The HPLC samples were concentrated using the Refrigerated CentriVap Concentrator, which was purchased from Labconco (Kansas City, MO, USA).

3.3. Chromatographic Conditions

The use of a chiral column: Lux Cellulose-3 thermostated at 15 °C allowed us to achieve baseline chiral separation of the enantiomers of both (*R*) and (*S*)-1-phenylethanol and their esters. The optimal mobile phase consisted of *n*-heptane/2 propanol/trifluoroacetic acid (98.7/1.3/0.15, *v/v/v*). In order to obtain satisfactory resolution, the flow rate of the mobile phase was set at 1 mL/min. The UV detection wavelength was set at 254 nm. In

order to optimize chromatographic conditions, reference samples of (*R,S*)-1-phenylethanol, (*R,S*)-1-phenylethyl acetate, (*R*)-1-phenylethanol, and (*R*)-1-phenylethyl acetate were used.

3.4. Kinetic Resolution of (*R,S*)-1-Phenylethanol

Enantioselective biotransformation of (*R,S*)-1-phenylethanol using vinyl acetate or isopropenyl acetate as the acetylating agent resulted in the production of phenylethyl acetate (Figure 2). All tested reaction systems were in triplicate and consisted of commercially available lipase from *Candida rugosa* OF or lipase from *Burkholderia cepacia*, vinyl acetate (28.25 μ L; 0.3 mM) or isopropenyl acetate (35.98 μ L; 0.3 mM) as the acetyl donor, racemic 1-phenylethanol 10 μ L, 0.08 mM) as well as ionic liquid (200 μ L) and toluene or heptane (400 μ L) as the reaction media. The reaction was started by the addition of 10 mg of lipase in native form. The reaction mixture was shaken at 250 rpm at $t = 37$ °C. The process of enantioselective acetylation was monitored using chiral stationary phases and a HPLC system. The samples were withdrawn at previously established time points (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 h) and then evaporated and re-dissolved in pure *n*-heptane, filtered, and injected into the HPLC system.

The percentage enantiomeric excesses of the substrate (ee_s) and product (ee_p), conversion (c) as well as enantioselectivity (E) were calculated [40,41] as shown below:

$$ee_s = \frac{|R - S|}{R + S} \times 100\%$$

$$ee_p = \frac{|R - S|}{R + S} \times 100\%$$

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \times 100\%$$

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 + ee_p)]}{\ln[(1 - c)(1 - ee_p)]}$$

where R represents the values of peak areas for (*R*)-phenylethanol and its ester and S represents the values of peak areas for (*S*)-phenylethanol and its ester.

4. Conclusions

The results of the experiment supported the hypothesis that lipase from *Burkholderia cepacia* is able to catalyze the enantioselective acetylation of racemic 1-phenylethanol with the use of vinyl acetate as acetylating agent. It turned out that using two-phase catalytic systems with toluene or *n*-heptane and ionic liquid, as well as *Burkholderia cepacia* lipase and vinyl acetate, allowed for the production of highly enantioselective parameters. According to a previously published paper related to the kinetic resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol, *n*-heptane was one of the most suitable reaction solvents, whereas the acetylating agent was vinyl acetate or isopropenyl acetate [41–43]. Nevertheless, the main aim of the performed study was to verify the possibility to perform kinetic resolution of racemic 1-phenylethanol in a two-phase catalytic system. According to available literature in terms of enantioselective biotransformation of racemic compounds, it was decided to test four ionic liquids, i.e., [HMIM][BF₄], [OMIM][Cl], [EMIM][BF₄], and [DMIM][MeSO₄] [44–49]. The used ionic liquids, however, displayed a variety of kinetic characteristics, leading to varying enantioselectivities and enantiomeric excesses of substrate and product.

Although the native *Burkholderia cepacia* lipase in the system including [EMIM][BF₄] and *n*-hexane as the reaction media and vinyl acetate as the acetylating agent produced the best results among all evaluated catalytic systems ($E = 379.0$, $ee_p = 98.9\%$), enantioselective biotransformations were also observed for systems containing [HMIM][BF₄] and [OMIM][Cl]. Only the reaction medium containing [DMIM][MeSO₄] inhibited the biocatalysts and stopped the biotransformation. Nevertheless, taking into account other studies published elsewhere, the proposed herein catalytic system allowed us to obtain satisfactory results, since the enantiomeric excesses of the product were close to 100%, whereas the

enantioselectivity was about 400, which is in line with some other results [50–52]. On the other hand, there are also previously published studies related to the kinetic resolution of 1-phenylethanol with the use of ionic liquids; nevertheless, without the composition of the two-phase catalytic system, there is no possibility of ease of separation of lipase from the reaction system or to reuse it in other bioseparations [53–57]. Whereas, the composition of the catalytic system with ionic liquid and organic solvents such as *n*-heptane or toluene creates a two-phase bioreactor, with separate compartments containing lipase and substrates with products of enantioselective biotransformation. Additionally, it should be noted that, in the presented approach, the usage of potentially toxic organic solvents is significantly limited, which is in parallel with the “green chemistry” methodology.

Author Contributions: Conceptualization, J.C. and A.S.; methodology, J.C., J.D. and A.S.; investigation, J.C., J.D. and A.S.; writing—original draft preparation, J.C., J.D. and A.S.; writing—review and editing, T.S. and M.P.M.; visualization, J.C. and J.D.; supervision, A.S.; funding acquisition, A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The project was partially supported by a research grant from the National Science Centre, 2017/27/N/NZ7/02424.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors wish to express their sincere thanks to Meito Sangyo Co. (Japan) for the supply of lipases OF from *Candida rugosa*.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Boas, R.V.N.; de Castro, H.F. A review of synthesis of esters with aromatic, emulsifying, and lubricant properties by biotransformation using lipases. *Biotechnol. Bioeng.* **2022**, *119*, 725–742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zeng, F.K.; Yang, B.; Wang, Y.H.; Wang, W.F.; Ning, Z.X.; Li, L. Enzymatic Production of Monoacylglycerols with Camellia Oil by the Glycerolysis Reaction. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2010**, *87*, 531–537. [[CrossRef](#)]
- Siodmiak, T.; Haraldsson, G.G.; Duleba, J.; Ziegler-Borowska, M.; Siodmiak, J.; Marszall, M.P. Evaluation of Designed Immobilized Catalytic Systems: Activity Enhancement of Lipase B from *Candida antarctica*. *Catalysts* **2020**, *10*, 876. [[CrossRef](#)]
- Kapoor, M.; Gupta, M.N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem.* **2012**, *47*, 555–569. [[CrossRef](#)]
- Jiang, C.Y.; Cheng, C.C.; Hao, M.; Wang, H.B.; Wang, Z.Y.; Shen, C.; Cheong, L.Z. Enhanced catalytic stability of lipase immobilized on oxidized and disulfide-rich eggshell membrane for esters hydrolysis and transesterification. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *105*, 1328–1336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pencreach, G.; Leullier, M.; Baratti, J.C. Properties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *56*, 181–189. [[CrossRef](#)]
- Xu, L.; Cui, G.L.; Ke, C.X.; Fan, Y.L.; Yan, Y.J. Immobilized Burkholderia cepacia Lipase on pH-Responsive Pullulan Derivatives with Improved Enantioselectivity in Chiral Resolution. *Catalysts* **2018**, *8*, 13. [[CrossRef](#)]
- Chalupka, J.; Sikora, A.; Kozicka, A.; Marszall, M.P. Overview: Enzyme-catalyzed Enantioselective Biotransformation of Chiral Active Compounds Used in Hypertension Treatment. *Curr. Org. Chem.* **2020**, *24*, 2782–2791. [[CrossRef](#)]
- Sikora, A.; Siodmiak, T.; Marszall, M.P. Kinetic Resolution of Profens by Enantioselective Esterification Catalyzed by *Candida antarctica* and *Candida rugosa* Lipases. *Chirality* **2014**, *26*, 663–669. [[CrossRef](#)]
- Tarczykowska, A.; Sikora, A.; Marszall, M.P. Lipases—Valuable Biocatalysts in Kinetic Resolution of Racemates. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2018**, *15*, 374–381. [[CrossRef](#)]
- Ghanem, A.; Aboul-Enein, H.Y. Application of lipases in kinetic resolution of racemates. *Chirality* **2005**, *17*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, K.; Wang, J.H.; He, Y.J.; Cui, G.L.; Abdulrazaq, M.A.; Yan, Y.J. Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of Burkholderia cepacia lipase via immobilization on melamine-glutaraldehyde dendrimer modified magnetic nanoparticles. *Chem. Eng. J.* **2018**, *351*, 258–268. [[CrossRef](#)]
- Siodmiak, T.; Mangelings, D.; Vander Heyden, Y.; Ziegler-Borowska, M.; Marszall, M.P. High Enantioselective Novozym 435-Catalyzed Esterification of (R,S)-Flurbiprofen Monitored with a Chiral Stationary Phase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *175*, 2769–2785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Carvalho, A.; Fonseca, T.D.; de Mattos, M.C.; de Oliveira, M.D.F.; de Lemos, T.L.G.; Molinari, F.; Romano, D.; Serra, I. Recent Advances in Lipase-Mediated Preparation of Pharmaceuticals and Their Intermediates. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 29682–29716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Siodmiak, T.; Ziegler-Borowska, M.; Marszall, M.P. Lipase-immobilized magnetic chitosan nanoparticles for kinetic resolution of (R,S)-ibuprofen. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2013**, *94*, 7–14. [[CrossRef](#)]
16. Sikora, A.; Chelminiak-Dudkiewicz, D.; Ziegler-Borowska, M.; Marszall, M.P. Enantioseparation of (RS)-atenolol with the use of lipases immobilized onto new-synthesized magnetic nanoparticles. *Tetrahedron Asymmetry* **2017**, *28*, 374–380. [[CrossRef](#)]
17. Sikora, A.; Chalupka, J.; Marszall, M.P. The Use of Ion Liquids as a Trojan Horse Strategy in Enzyme-Catalyzed Biotransformation of (R,S)-Atenolol. *Catalysts* **2020**, *10*, 787. [[CrossRef](#)]
18. Debowska, R.M.; Kaszuba, A.; Michalak, I.; Dzwigalowska, A.; Ciescinska, C.; Jakimiuk, E.; Zielinska, J. Evaluation of the efficacy and tolerability of mandelic acid-containing cosmetic formulations for acne skin care. *Prz. Dermatol.* **2015**, *102*, 316–321. [[CrossRef](#)]
19. Dabkowska, K.; Szweczyk, K.W. Influence of temperature on the activity and enantioselectivity of Burkholderia cepacia lipase in the kinetic resolution of mandelic acid enantiomers. *Biochem. Eng. J.* **2009**, *46*, 147–153. [[CrossRef](#)]
20. Manoel, E.A.; Ribeiro, M.F.P.; dos Santos, J.C.S.; Coelho, M.A.Z.; Simas, A.B.C.; Fernandez-Lafuente, R.; Freire, D.M.G. Accurel MP 1000 as a support for the immobilization of lipase from Burkholderia cepacia: Application to the kinetic resolution of myo-inositol derivatives. *Process Biochem.* **2015**, *50*, 1557–1564. [[CrossRef](#)]
21. Pintaudi, B.; Di Vieste, G.; Bonomo, M. The Effectiveness of Myo-Inositol and D-Chiro Inositol Treatment in Type 2 Diabetes. *Int. J. Endocrinol.* **2016**, *2016*, 9132052. [[CrossRef](#)]
22. Suan, C.L.; Sarmidi, M.R. Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2004**, *28*, 111–119. [[CrossRef](#)]
23. Bozan, A.; Songur, R.; Mehmetoglu, U. The production of enantiomerically pure 1-phenylethanol by enzymatic kinetic resolution method using response surface methodology. *Turk. J. Chem.* **2020**, *44*, 1352–1365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Stradomska, D.; Heba, M.; Czernek, A.; Kuznik, N.; Gillner, D.; Maresz, K.; Pudlo, W.; Jarzebski, A.; Szymanska, K. Lipase Immobilized on MCFs as Biocatalysts for Kinetic and Dynamic Kinetic Resolution of sec-Alcohols. *Catalysts* **2021**, *11*, 518. [[CrossRef](#)]
25. Dou, X.; Meng, F.P.; Duan, W.Y.; Liu, Q.Q.; Li, H.; Du, S.H. Growth inhibition and oxidative stress in two species of marine diatoms exposed to 1-phenylethanol. *J. Oceanol. Limnol.* **2019**, *37*, 1342–1352. [[CrossRef](#)]
26. Zhou, Y.; Peng, Q.Y.; Zhang, L.; Cheng, S.H.; Zeng, L.T.; Dong, F.; Yang, Z.Y. Characterization of enzymes specifically producing chiral flavor compounds (R)- and (S)-1-phenylethanol from tea (*Camellia sinensis*) flowers. *Food Chem.* **2019**, *280*, 27–33. [[CrossRef](#)]
27. Gassenmeier, K.; Schwager, H.; Houben, E.; Clery, R. Unequivocal Identification of 1-Phenylethyl Acetate in Clove Buds (*syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry) and Clove Essential Oil. *Foods* **2017**, *6*, 46. [[CrossRef](#)]
28. Boratynski, F.; Szczepanska, E.; Grudniewska, A.; Olejniczak, T. Microbial Kinetic Resolution of Aroma Compounds Using Solid-State Fermentation. *Catalysts* **2018**, *8*, 28. [[CrossRef](#)]
29. Zhou, Y.; Dong, F.; Kunimasa, A.; Zhang, Y.Q.; Cheng, S.H.; Lu, J.M.; Zhang, L.; Murata, A.; Mayer, F.; Fleischmann, P.; et al. Occurrence of Glycosidically Conjugated 1-Phenylethanol and Its Hydrolase beta-Primeverosidase in Tea (*Camellia sinensis*) Flowers. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 8042–8050. [[CrossRef](#)]
30. Duleba, J.; Siodmiak, T.; Marszall, M.P. Amano Lipase PS from Burkholderia cepacia—Evaluation of the Effect of Substrates and Reaction Media on the Catalytic Activity. *Curr. Org. Chem.* **2020**, *24*, 798–807. [[CrossRef](#)]
31. Li, X.; Huang, S.S.; Xu, L.; Yan, Y.J. Improving activity and enantioselectivity of lipase via immobilization on macroporous resin for resolution of racemic 1-phenylethanol in non-aqueous medium. *BMC Biotechnol.* **2013**, *13*, 92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Xie, C.J.; Wu, B.; Qin, S.; He, B.F. A lipase with broad solvent stability from Burkholderia cepacia RQ3: Isolation, characteristics and application for chiral resolution of 1-phenylethanol. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2016**, *39*, 59–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Fan, Y.X.; Xie, Z.M.; Zhang, H.W.; Qian, J.Q. Kinetic resolution of both 1-phenylethanol enantiomers produced by hydrolysis of 1-phenylethyl acetate with *Candida antarctica* lipase B in different solvent systems. *Kinet. Catal.* **2011**, *52*, 686–690. [[CrossRef](#)]
34. Melais, N.; Aribi-Zouiouche, L.; Riant, O. The effect of the migrating group structure on enantioselectivity in lipase-catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethanol. *C. R. Chim.* **2016**, *19*, 971–977. [[CrossRef](#)]
35. Uddin, M.; Basak, D.; Hopeff, R.; Minofar, B. Potential Application of Ionic Liquids in Pharmaceutical Dosage Forms for Small Molecule Drug and Vaccine Delivery System. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2020**, *23*, 158–176. [[CrossRef](#)]
36. Curreri, A.M.; Mitragotri, S.; Tanner, E.E.L. Recent Advances in Ionic Liquids in Biomedicine. *Adv. Sci.* **2021**, *8*, 2004819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. D’Anna, F.; Noto, R. Di- and Tricationic Organic Salts: An Overview of Their Properties and Applications. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 4201–4223. [[CrossRef](#)]
38. Egorova, K.S.; Gordeev, E.G.; Ananikov, V.P. Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceutics and Medicine. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7132–7189. [[CrossRef](#)]
39. Thomas, P.A.; Marvey, B.B. Room Temperature Ionic Liquids as Green Solvent Alternatives in the Metathesis of Oleochemical Feedstocks. *Molecules* **2016**, *21*, 184. [[CrossRef](#)]
40. Elgharbawy, A.A.; Riyadi, F.A.; Alam, M.Z.; Moniruzzaman, M. Ionic liquids as a potential solvent for lipase-catalysed reactions: A review. *J. Mol. Liq.* **2018**, *251*, 150–166. [[CrossRef](#)]
41. Yan, H.D.; Wang, Z.; Qian, J.Q. Efficient kinetic resolution of (RS)-1-phenylethanol by a mycelium-bound lipase from a wild-type *Aspergillus oryzae* strain. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2017**, *64*, 251–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Grollmisch, A.; Kragl, U.; Grosseheilmann, J. Enzyme Immobilization in Polymerized Ionic Liquids-based Hydrogels for Active and Reusable Biocatalysts. *Synopen* **2018**, *2*, 192–199. [[CrossRef](#)]
43. Matsumoto, T.; Ito, M.; Fukuda, H.; Kondo, A. Enantioselective transesterification using lipase-displaying yeast whole-cell biocatalyst. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 481–485. [[CrossRef](#)]
44. Montalban, M.G.; Collado-Gonzalez, M.; Lozano-Perez, A.A.; Banos, F.G.D.; Villora, G. Extraction of organic compounds involved in the kinetic resolution of rac-2-pentanol from n-hexane by imidazolium-based ionic liquids: Liquid-liquid equilibrium. *J. Mol. Liq.* **2018**, *252*, 445–453. [[CrossRef](#)]
45. Ramos-Martin, J.; Khiari, O.; Alcantara, A.R.; Sanchez-Montero, J.M. Biocatalysis at Extreme Temperatures: Enantioselective Synthesis of both Enantiomers of Mandelic Acid by Transesterification Catalyzed by a Thermophilic Lipase in Ionic Liquids at 120 degrees C. *Catalysts* **2020**, *10*, 1055. [[CrossRef](#)]
46. Elgharabawy, A.A.; Muniruzzaman, M.; Salleh, H.M.; Alam, M.D.Z. Ionic Liquids as a Green Solvent for Lipase-Catalyzed Reactions. *Ind. Appl. Green Solvents* **2019**, *1*, 21–60.
47. Park, S.; Doan, T.T.N.; Koo, Y.M.; Oh, K.K.; Lee, S.H. Ionic liquids as cosolvents for the lipase-catalyzed kinetic resolution of ketoprofen. *Mol. Catal.* **2018**, *459*, 113–118. [[CrossRef](#)]
48. Jadav, D.; Pandey, D.K.; Patil, T.; Singh, D.K.; Dharaskar, S.; Bandyopadhyay, R.; Tsunaji, N.; Kumar, R.; Bandyopadhyay, M. Ordered silica matrices supported ionic liquids as highly efficient catalysts for fine chemical synthesis. *J. Porous Mater.* **2022**, *29*, 2003–2017. [[CrossRef](#)]
49. Wang, Y.; Cheng, H.; He, J.R.; Yao, Q.X.; Li, L.L.; Liang, Z.H.; Li, X. Enzymes-Catalyzed Knoevenagel Condensation Promoted by Ionic Liquid and Deep Eutectic Solvent. *Catal. Lett.* **2022**, *152*, 1215–1223. [[CrossRef](#)]
50. Qin, L.N.; Yu, X.W.; Xu, Y. Asymmetric Transesterification Resolution of (R,S)-alpha-Phenylethanol in a Non-aqueous Medium by Microbial Lipase. *Chin. J. Catal.* **2011**, *32*, 1639–1644. [[CrossRef](#)]
51. Yan, H.D.; Guo, B.H.; Wang, Z.; Qian, J.Q. Surfactant-modified *Aspergillus oryzae* lipase as a highly active and enantioselective catalyst for the kinetic resolution of (RS)-1-phenylethanol. *3 Biotech* **2019**, *9*, 265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Shivaprasad, P.; Jones, M.D.; Patterson, D.A.; Emanuelsson, E.A.C. Kinetic resolution of 1-phenylethanol in the spinning mesh disc reactor: Investigating the reactor performance using immobilised lipase catalyst. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **2018**, *132*, 56–64. [[CrossRef](#)]
53. Schofer, S.H.; Kaftzik, N.; Wasserscheid, P.; Kragl, U. Enzyme catalysis in ionic liquids: Lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity. *Chem. Commun.* **2001**, 425–426. [[CrossRef](#)]
54. Shan, H.X.; Lu, Y.; Li, Z.J.; Li, M.; Tao, L.H.; Dang, W.M. Resolution of (R,S)-1-Phenylethanol Catalyzed by Lipase in Novel 1,3-Dibutylimidazolium Ionic Liquid. *Acta Chim. Sin.* **2010**, *68*, 1010–1016.
55. Paljevac, M.; Knez, Z.; Habulin, M. Enzyme-catalyzed Acylation of (R,S)-1-phenylethanol in 1-butyl-3-methylimidazolium Based Ionic Liquids. *Acta Chim. Slov.* **2009**, *56*, 399–409.
56. Lozano, P.; De Diego, T.; Larnicol, M.; Vaultier, M.; Iborra, J.L. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of rac-1-phenylethanol in ionic liquids and ionic liquids/supercritical carbon dioxide systems. *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 1559–1565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Habulin, M.; Knez, Z. Optimization of (R,S)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2009**, *58*, 24–28. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

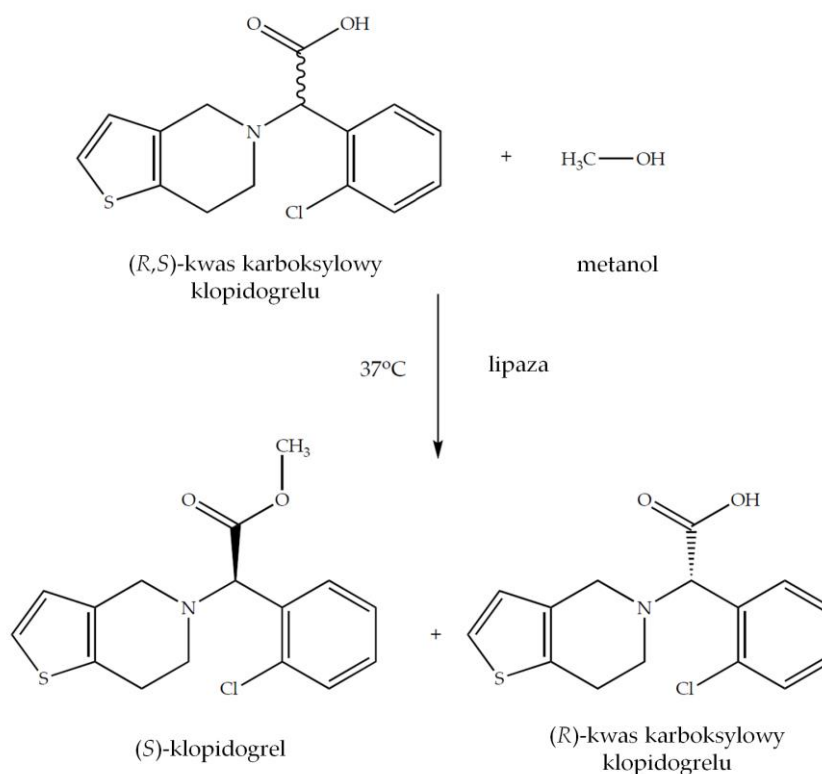
enancjomerycznie czystego (*S*)-klopidogrelu (**Rycina 35**). W ramach przeprowadzonych badań weryfikowano wpływ środowiska reakcji oraz lipazy z *Candida rugosa* na konwersję oraz enancjoselektywność realizowanych rozdziałów kinetycznych. W efekcie utworzono 18 różnych układów katalitycznych, które zawierały *n*-heptan, *n*-heksan lub cykloheksan bez dodatku cieczy jonowych oraz z dodatkiem [EMIM][EtSO₄], [EMIM][MSF₃], [HMIM][BF₄], [EMIM][BF₄] lub [DMIM][MeSO₄] (**Tabela 9**).

Tabela 9 Systemy katalityczne poddane enancjoselektywnej biotransformacji kwasu karboksylowego (*R,S*)-klopidogrelu (ee_p – nadmiar enancjomeryczny produktów; ee_s – nadmiar enancjomeryczny substratów; c – konwersja; E – enancjoselektywność)

L. p.	Środowisko reakcji		ee _p	ee _s	c	E
	Rozpuszczalnik organiczny	Ciecz jonowa				
1	<i>n</i> -heptan	-	87,17%	65,15%	42,77%	28,56
2	<i>n</i> -heptan	[EMIM][EtSO ₄]	85,70%	29,85%	25,84%	17,36
3	<i>n</i> -heptan	[EMIM][MSF ₃]	84,60%	53,77%	38,86%	20,47
4	<i>n</i> -heptan	[HMIM][BF ₄]	80,69%	44,06%	35,32%	14,39
5	<i>n</i> -heptan	[EMIM][BF ₄]	90,74%	90,11%	49,83%	63,55
6	<i>n</i> -heptan	[DMIM][MeSO ₄]	84,87%	37,15%	30,44%	17,55
7	<i>n</i> -heksan	-	94,44%	25,83%	21,48%	44,99
8	<i>n</i> -heksan	[EMIM][EtSO ₄]	83,88%	44,61%	34,72%	17,67
9	<i>n</i> -heksan	[EMIM][MSF ₃]	92,75%	21,53%	18,84%	32,80
10	<i>n</i> -heksan	[HMIM][BF ₄]	87,54%	63,16%	41,91%	28,75
11	<i>n</i> -heksan	[EMIM][BF ₄]	92,14%	68,95%	42,80%	50,51
12	<i>n</i> -heksan	[DMIM][MeSO ₄]	80,02%	36,25%	31,18%	12,81
13	cykloheksan	-	94,03%	42,20%	30,98%	49,24
14	cykloheksan	[EMIM][EtSO ₄]	85,52%	35,90%	29,57%	18,17
15	cykloheksan	[EMIM][MSF ₃]	93,05%	50,78%	35,31%	46,06
16	cykloheksan	[HMIM][BF ₄]	87,43%	84,70%	49,21%	40,00
17	cykloheksan	[EMIM][BF ₄]	94,21%	92,71%	49,60%	113,40
18	cykloheksan	[DMIM][MeSO ₄]	81,05%	28,83%	26,24%	12,63

Testowane układy katalityczne zostały poddane inkubacji w kontrolowanych warunkach temperaturowych wynoszących 37°C przy stałej prędkości wytrząsania równej RPM = 250 przez 120 godzin. W ramach realizowanych badań obserwowano zmiany zachodzące w mieszaninach reakcyjnych poprzez analizę jakościowo-ilościową substratów i produktów biotransformacji z zastosowaniem chiralnej ultrasłabej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (UPLC-MS/MS). W tym celu zoptymalizowano rozdziały chromatograficzne niezależnie dla substratów (enancjomery kwasu karboksylowego klopidogrelu) oraz produktów (enancjomery klopidogrelu). W analizie chromatograficznej substratów zastosowano chiralną kolumnę chromatograficzną Lux

Cellulose-2, a fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu, metanolu oraz kwasu mrówkowego w stosunku objętościowym wynoszącym 87,5/12,5/0,1. Z kolei w analizie chromatograficznej produktów zastosowano chiralną kolumnę chromatograficzną Lux Cellulose-3, a fazę ruchomą stanowiła mieszanina metanolu oraz kwasu mrówkowego w stosunku objętościowym wynoszącym 100/0,1. Obydwie analizy były prowadzone przy prędkości przepływu wynoszącym $F_R = 0,8 \text{ mL/min}$, a kolumny były termostatowane w temperaturze 20°C . Detekcja substratów oraz produktów odbywała się z wykorzystaniem trybu MRM kwadropolowego spektrometru mas.



Rycina 35 Rozdział kinetyczny kwasu karboksylowego (R,S)-klopidogrelu

Analiza dostępnej literatury naukowej potwierdza różne metody pozyskiwania (S)-klopidogrelu. Niemniej jednak, wciąż istnieje konieczność poszukiwania bardziej ekologicznych i ekonomicznych metod otrzymywania (S)-klopidogrelu, który jest zalecanym przez Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne inhibitorem P_2Y_{12} . Wyniki przeprowadzonych eksperymentów potwierdziły hipotezę, że lipaza z *Candida rugosa* OF jest odpowiednia do katalizowania rozdziału kinetycznego racemicznego kwasu karboksylowego klopidogrelu. W ramach zrealizowanych badań przeprowadzono enancjoselektywną biotransformację racemicznego kwasu karboksylowego klopidogrelu w różnych warunkach reakcji. Łącznie

testowano pięć różnych cieczy jonowych, takich jak: [EMIM][EtSO₄], [EMIM][MSF₃], [HMIM][BF₄], [EMIM][BF₄], a także [DMIM][MeSO₄]. Udowodniono, że zastosowanie dwufazowego układu katalitycznego z cykloheksanem i [EMIM][BF₄] oraz lipazą *Candida rugosa* pozwoliło na uzyskanie wysoce enancjoselektywnych parametrów ($E = 113,40$; $ee_p = 94,21\%$). Zauważono także, że zastosowane cieczy jonowe wykazywały różne właściwości kinetyczne, co prowadziło do obserwacji różnych wartości enancjoselektywności i nadmiarów enancjomerycznych dla substratów i produktów. Enancjoselektywność oraz aktywność katalityczna lipazy *Candida rugosa* zmieniała się w zależności od obecności różnych anionów pochodzących od cieczy jonowych w następującej kolejności: [BF₄]⁻ > [MSF₃]⁻ > [MeSO₄]⁻ > [EtSO₄]⁻ oraz kationów w następujący sposób: [EMIM]⁺ > [HMIM]⁺ > [DMIM]⁺. Przeprowadzone badania potwierdziły, że cieczy jonowe zawierające różne aniony i kationy, mogą wykazywać zmienne oddziaływania z enancjoselektywnym biokatalizatorem, choćby poprzez oddziaływania jonowe i dipolarne, wiązania wodorowe lub van der Waalsa. W efekcie wspomniane oddziaływania bezpośrednio wpływają na konformację enzymu przez co zmniejszają lub zwiększają enancjoselektywne oraz katalityczne właściwości biokatalizatorów.

Z uwagi na fakt, iż zastosowanie dwufazowego układu reakcyjnego fizycznie rozdziela substraty z produktami od białkowego katalizatora, istnieje możliwość łatwej separacji biokatalizatora od substratu i produktu, co daje możliwość ponownego wykorzystania lipaz w innej reakcji. Dodatkowo należy podkreślić, że rozpuszczalność racemicznego kwasu karboksylowego klopidogrelu w rozpuszczalnikach organicznych jest stosunkowo niska i wymaga znacznych objętości medium reakcyjnego, co może mieć negatywny wpływ na środowisko, który jest niwelowany przez dodatek cieczy jonowych.

Rezultaty omawianych badań zostały szczegółowo opisane w publikacji pt.: „Bio-Approach for Obtaining Enantiomerically Pure Clopidogrel with the Use of Ionic Liquids” opublikowanej w *International Journal of Molecular Sciences*: 2023, 24, 11124, w której autorami byli: Joanna Chałupka, Adam Sikora, Marta Ziegler-Borowska oraz Michał Piotr Marszał [P4].



Article

Bio-Approach for Obtaining Enantiomerically Pure Clopidogrel with the Use of Ionic LiquidsJoanna Chalupka ¹, Adam Sikora ^{1,*}, Marta Ziegler-Borowska ² and Michał Piotr Marszałł ¹

¹ Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Dr. A. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz, Poland; joanna.chalupka@cm.umk.pl (J.C.); mmars@cm.umk.pl (M.P.M.)

² Department of Biomedical Chemistry and Polymer Science, Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Gagarina 7, 87-100 Toruń, Poland; martaz@umk.pl

* Correspondence: adam.sikora@cm.umk.pl; Tel.: +48-52-585-3532

Abstract: Clopidogrel is a chiral compound widely used as an antiplatelet medication that lowers the risk of blood clots, strokes, and heart attacks. The main aim of the study presented herein was to obtain (S)-clopidogrel, which is commercially available in treatments, via the kinetic resolution of racemic clopidogrel carboxylic acid with the use of lipase from *Candida rugosa* and a two-phase reaction medium containing an ionic liquid. For this purpose, the enantioselective biotransformation of clopidogrel carboxylic acid and chiral chromatographic separation with the use of a UPLC-MS/MS system were optimized. The best kinetic resolution parameters were obtained by using a catalytic system containing lipase from *Candida rugosa* OF as a biocatalyst, cyclohexane and [EMIM][BF₄] as a two-phase reaction medium, and methanol as an acyl acceptor. The enantiomeric excess of the product was $ee_p = 94.21\% \pm 1.07$ and the conversion was $c = 49.60\% \pm 0.57\%$, whereas the enantioselectivity was $E = 113.40 \pm 1.29$. The performed study proved the possibility of obtaining (S)-clopidogrel with the use of lipase as a biocatalyst and a two-phase reaction medium containing an ionic liquid, which is in parallel with green chemistry methodology and does not require environmentally harmful conditions.

Keywords: clopidogrel; ionic liquid; enantioselective biotransformation; lipase; *Candida rugosa*



Citation: Chalupka, J.; Sikora, A.; Ziegler-Borowska, M.; Marszałł, M.P. Bio-Approach for Obtaining Enantiomerically Pure Clopidogrel with the Use of Ionic Liquids. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 11124. <https://doi.org/10.3390/ijms241311124>

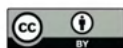
Academic Editor: Paschalis Alexandridis

Received: 17 May 2023

Revised: 28 June 2023

Accepted: 28 June 2023

Published: 5 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cardiovascular disease (CVD), including transient ischemic attack (TIA), acute coronary syndrome (ACS), and peripheral artery disease (PAD) and minor strokes, are primarily treated and secondarily prevented with antiplatelet therapy. The P2Y₁₂ inhibitors, of which clopidogrel was one of the first, are crucial components of antiplatelet therapy, which helps treat and prevent secondary cardiovascular disease (CVD). Clopidogrel is frequently used in conjunction with aspirin as a part of dual antiplatelet treatment (DAPT) for the secondary prevention of ACS. In randomized studies of ACS patients, newer and more effective P2Y₁₂ inhibitors (ticagrelor and prasugrel) have demonstrated a more significant reduction in ischemia risk than clopidogrel. However, these more recent, more potent P2Y₁₂ inhibitors still have limitations [1–10]. Therefore, clopidogrel is still one of the most frequently used antiplatelet medicines.

Clopidogrel is a thienopyridine derivative prodrug that, in order to exert its antithrombotic effect, must first be activated by the liver. The active metabolite selectively inhibits adenosine diphosphate-induced platelet aggregation by irreversibly inhibiting the platelet adenosine diphosphate P2Y₁₂ receptor [3,11–14]. Clopidogrel is an enantiomeric medication that undergoes metabolic conversion to activate its (S)-configuration. When administered in high dosages in animals, the (R)-enantiomer of the activated form of clopidogrel has the potential to cause convulsions and is devoid of any antithrombotic

efficacy [15]. As a result, only the (S)-enantiomer of clopidogrel is commercially available in treatment [16].

According to the European Society of Cardiology (ESC) guidelines on DAPT (2017), for acute myocardial infarctions in patients presenting with an ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) (2017), revascularization (2018), the diagnosis and management of chronic coronary syndromes (2019), and acute coronary syndromes in patients presenting without a persistent ST-segment elevation (NSTEMI-ACS) (2020), clopidogrel is one of the P2Y₁₂ receptor inhibitors associated with an excellent safety profile, mainly in terms of gastrointestinal and skin disorders, allergies, and neutropenia. The wide variability in the pharmacodynamic response to clopidogrel is connected to various factors, including genotype polymorphisms. In patients with chronic coronary syndromes that are undergoing or have undergone percutaneous coronary interventions (PCI), clopidogrel is the default P2Y₁₂ inhibitor in addition to acetylsalicylic acid (ASA). Similarly, suppose oral anticoagulation is needed (e.g., for stroke prevention in atrial fibrillation) in patients with chronic coronary syndrome. In that case, triple therapy should be initiated with an oral anticoagulant (OAC), ASA, and clopidogrel in patients with a moderate or high risk of stent thrombosis, irrespective of the type of stent used [17–19]. Considering the information mentioned above, clopidogrel remains the preferable medicine for treating cardiovascular disorders requiring P2Y₁₂ inhibition.

There are now three basic methods for acquiring optically pure substances, which is an asymmetric organic synthesis using pro-chiral substrates, racemate separation, and a “chiral pool” of optically pure substrates. A high selectivity, more favorable reaction conditions, and biocompatibility are just a few of the positive characteristics that make enzyme-mediated transformations so valued as a potent alternative instrument in organic synthesis. Since organic synthesis relies on performing a stereoselective biotransformation, and is therefore significantly less expensive than using a “chiral pool,” kinetic resolution (racemate resolution) with the use of enzymes is one of the most widely used techniques [20–31]. It also avoids the use of environmentally hazardous and toxic chemical compounds.

Organic solvents are still customary as reaction media in the stereoselective biotransformation of racemic forms of active pharmaceutical substances. However, most of these substances are poisonous and hazardous to the environment, and in many instances, they can contaminate the final synthesis product with organic molecules. On the other hand, ionic liquids offer several benefits when used as the reaction medium. Ionic liquids are frequently referred to as “design solvents” since they have been designed to address various synthetic issues. They are helpful in numerous technical processes due to their unique characteristics [32–36]. Ionic liquids are regarded as “green solvents” because they have a number of distinctive properties, such as an extremely low vapor pressure and a high thermal stability, which offer advantages such as the ease of containment, product recovery, and a recycling ability as well as a high ionic conductivity and a high solvation power.

2. Results and Discussion

2.1. Enantioselective Biotransformation of Racemic Clopidogrel

The enantioselective biotransformation of (R,S)-clopidogrel carboxylic acid was examined under various conditions using commercially available lipase from *Candida rugosa* OF (Figure 1). The research investigated several reaction systems to avoid the solubility problem with the racemic molecule. The created and tested catalytic systems utilized several kinds of ionic liquids, such as: [EMIM][EtSO₄], [EMIM][MSF₃], [HMIM][BF₄], [EMIM][BF₄], and [DMIM][MeSO₄]. Nevertheless, only a few of the tested reaction systems met the required performance standards for kinetic resolution (Table 1). In every instance, it was seen during the studies that the conversion value increased with the reaction time.

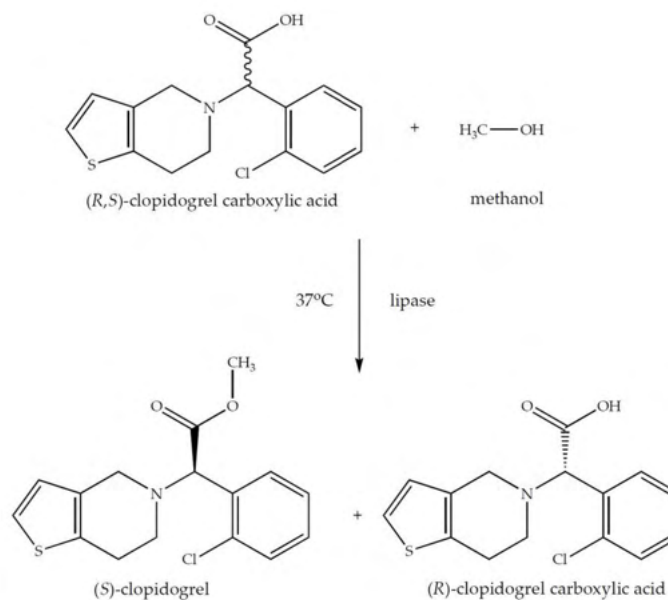


Figure 1. Enantioselective esterification of (*R,S*)-clopidogrel carboxylic acid with the use of *Candida rugosa* lipase as the biocatalyst. The reaction mixture consisted of (*R,S*)-clopidogrel carboxylic acid (3.5 mg, 0.01 mM); methanol (3.0 μ L, 0.25 mM); lipase from *Candida rugosa* OF (10.0 mg); and *n*-hexane, *n*-heptane, or cyclohexane (5 mL) with or without the addition of an ionic liquid (100 μ L), and was incubated for 5 days (120 h) along with shaking (250 RPM) at 37 $^{\circ}$ C.

Table 1. List of obtained results of performed enantioselective esterification of (*R,S*)-clopidogrel carboxylic acid after 5 days (120 h) of reaction: enantiomeric excesses of substrates (ee_s), products (ee_p), conversion (c), and enantioselectivity (E).

Reaction Medium		ee_p	ee_s	c	E
Organic Solvent	Ionic Liquid				
<i>n</i> -heptane	-	87.17% $\pm 1.50\%$	65.15% $\pm 1.12\%$	42.77% $\pm 0.74\%$	28.56 ± 0.49
<i>n</i> -heptane	[EMIM][EtSO ₄]	85.70% $\pm 1.47\%$	29.85% $\pm 0.51\%$	25.84% $\pm 0.44\%$	17.36 ± 0.30
<i>n</i> -heptane	[EMIM][MSF ₃]	84.60% $\pm 1.46\%$	53.77% $\pm 0.92\%$	38.86% $\pm 0.67\%$	20.47 ± 0.35
<i>n</i> -heptane	[HMIM][BF ₄]	80.69% $\pm 1.39\%$	44.06% $\pm 0.76\%$	35.32% $\pm 0.61\%$	14.39 ± 0.25
<i>n</i> -heptane	[EMIM][BF ₄]	90.74% $\pm 1.56\%$	90.11% $\pm 1.55\%$	49.83% $\pm 0.86\%$	63.55 ± 1.09
<i>n</i> -heptane	[DMIM][MeSO ₄]	84.87% $\pm 1.46\%$	37.15% $\pm 0.64\%$	30.44% $\pm 0.52\%$	17.55 ± 0.30
<i>n</i> -hexane	-	94.44% $\pm 1.66\%$	25.83% $\pm 0.73\%$	21.48% $\pm 0.60\%$	44.99 ± 0.34

Table 1. Cont.

Reaction Medium		ee _p	ee _s	c	E
Organic Solvent	Ionic Liquid				
<i>n</i> -hexane	[EMIM][EtSO ₄]	83.88% ±1.85%	44.61% ±0.51%	34.72% ±0.42%	17.67 ±0.88
<i>n</i> -hexane	[EMIM][MSF ₃]	92.75% ±1.64%	21.53% ±0.87%	18.84% ±0.68%	32.80 ±0.35
<i>n</i> -hexane	[HMIM][BF ₄]	87.54% ±1.82%	63.16% ±0.42%	41.91% ±0.37%	28.75 ±0.64
<i>n</i> -hexane	[EMIM][BF ₄]	92.14% ±1.72%	68.95% ±1.24%	42.80% ±0.82%	50.51 ±0.56
<i>n</i> -hexane	[DMIM][MeSO ₄]	80.02% ±1.57%	36.25% ±0.71%	31.18% ±0.61%	12.81 ±0.25
cyclohexane	-	94.03% ±1.07%	42.20% ±0.48%	30.98% ±0.35%	49.24 ±0.56
cyclohexane	[EMIM][EtSO ₄]	85.52% ±0.97%	35.90% ±0.41%	29.57% ±0.34%	18.17 ±0.21
cyclohexane	[EMIM][MSF ₃]	93.05% ±1.06%	50.78% ±0.58%	35.31% ±0.40%	46.06 ±0.53
cyclohexane	[HMIM][BF ₄]	87.43% ±1.00%	84.70% ±0.97%	49.21% ±0.56%	40.00 ±0.46
cyclohexane	[EMIM][BF ₄]	94.21% ±1.07%	92.71% ±1.06%	49.60% ±0.57%	113.40 ±1.29
cyclohexane	[DMIM][MeSO ₄]	81.05% ±0.92%	28.83% ±0.33%	26.24% ±0.30%	12.63 ±0.14

ee_p—enantiomeric excesses of products; ee_s—enantiomeric excesses of substrates; c—conversion; E—enantioselectivity.

The reaction containing cyclohexane and [EMIM][BF₄] as the reaction medium produced the best results out of all the investigated catalytic systems. The (*S*)-clopidogrel was produced after 120 h of incubation, with the maximum value of enantioselectivity equaling E = 113.4 ± 1.20 and the product's enantiomeric excesses equaling ee_p = 94.21% ± 1.07%. Although using other tested reaction systems enabled the achievement of passable results, the enantiomeric purity of the products was inferior.

2.2. Effect of Reaction Time

One of the most affecting aspects of the kinetic resolution of racemic compounds was found to be the incubation duration of the reaction mixture among all the evaluated influencing factors on enzyme-catalyzed biotransformations. Other investigations have shown that the enantioselectivity and enantiomeric excess of both products and substrates rapidly decline when the reaction medium is incubated excessively. The lack of a substrate makes the reaction no longer regarded as enantioselective because the conversion value has the potential to be higher than 50%. Commercially available lipases from *Candida rugosa* OF, methanol (3 µL) as an acyl acceptor, (*R,S*)-clopidogrel carboxylic acid (3.0 mg), an ionic liquid (100 µL), and an organic solvent (5 mL) were utilized as the reaction media in the experiment. The biotransformations were carried out for 120 h at 37 °C. According to Figures 2 and 3, the enantiomeric excess of the substrates, the conversion, and the enantiomeric ratio increased along with the reaction duration. Over the same period, the product's enantiomeric excess slowly diminished. The conversion value was the highest after 120 h of reaction (Figure 2), and it varied depending on the type of catalytic system (Table 1).

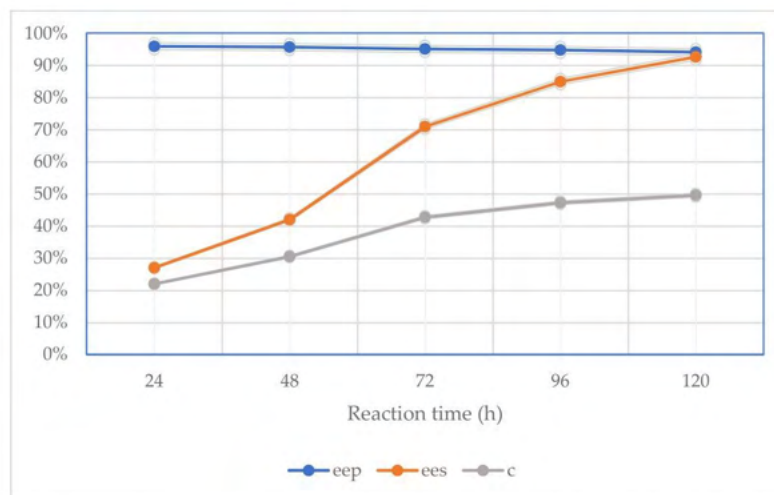


Figure 2. Effect of reaction time on the enzymatic parameters of performed kinetic resolution of (*R,S*)-clopidogrel carboxylic acid in the two-phase catalytic system consisting of [EMIM][BF₄] and cyclohexane, including values of enantiomeric excesses of both substrates (ee_s) and products (ee_p) as well as conversion (c) and enantioselectivity (E).

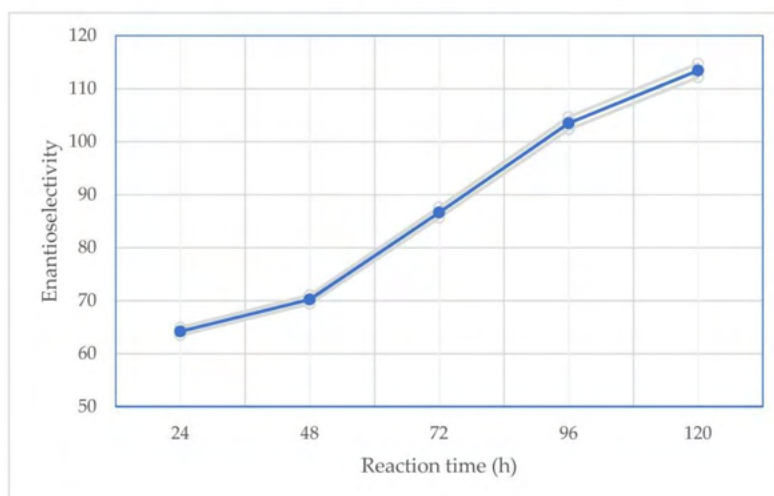


Figure 3. Effect of reaction time on the enzymatic parameters of performed kinetic resolution of (*R,S*)-clopidogrel carboxylic acid in the two-phase catalytic system consisting of [EMIM][BF₄] and cyclohexane, including values of enantioselectivity (E).

2.3. Effect of Reaction Medium

The investigated catalytic systems were effective in the reaction media both with and without ionic liquids. Nevertheless, it was observed that *Candida rugosa* lipase OF exhibited various catalytical properties depending on the type of reaction system. Due to this, one of the most crucial aspects of improving reaction conditions to increase enantioselectivity is selecting the best reaction medium. Therefore, the effect of five different ILs was tested

for the production of (*S*)-clopidogrel. Table 1 shows that the type of utilized ionic liquid and organic solvent had a significant influence on the enzyme-catalyzed biotransformation of (*R,S*)-clopidogrel carboxylic acid. This was proven by obtaining various values of conversion ($c = 18.84\% \pm 0.68\% - 49.60\% \pm 0.57\%$), enantiomeric excesses of products ($ee_p = 80.02\% \pm 1.57\% - 94.21\% \pm 1.07\%$), and enantioselectivity ($E = 12.63 \pm 0.14 - 113.40 \pm 1.29$).

According to the choice of organic solvent, various reaction media were tested during the chemical esterification of clopidogrel carboxylic acid, such as acetonitrile, chloroform, cyclohexane, dichloroethane, dichloromethane, *n*-hexane, *n*-heptane, methanol, *t*-butyl-methyl ether, methyl octane, and ethyl octane. The chemical esterifications were performed using the above-mentioned organic solvents, sulfuric acid as catalysts, and methanol as the acyl acceptor. All reactions were carried out for 24 h at 37 °C. After that, all mixtures were tested in terms of the efficiency of esterification using an HPLC analysis. Based on the obtained results, cyclohexane, *n*-heptane, and *n*-hexane were selected as the most appropriate organic solvents for further experiments related to the kinetic resolution of racemic clopidogrel carboxylic acid.

Taking into account the addition of ionic liquids, it should be noted that [EMIM][BF₄] was the best for the enantioselective esterification of (*R,S*)-clopidogrel carboxylic acid among all the tested ILs in every catalytic system, as is shown in Table 1. The catalytic efficiency of *Candida rugosa* lipase varies depending on different anions of the ILs in the following order: [BF₄]⁻ > [MSF₃]⁻ > [MeSO₄]⁻ > [EtSO₄]⁻, and on different cations of the ILs as follows: [EMIM]⁺ > [HMIM]⁺ > [DMIM]⁺. As previously described in the literature, various ILs, which contain different anions and cations, could interact with the enantioselective biocatalyst in various ways, such as through ionic and dipolar interactions, hydrogen bonding, or van der Waals forces. It was previously stated that anions with a lower hydrogen bond basicity have been demonstrated as enzyme-compatible, since they do not affect the internal conformation of the enzyme's structure [37].

Racemic clopidogrel carboxylic acid was fully dissolved in [EMIM][EtSO₄], [EMIM][MSF₃], [HMIM][BF₄], [EMIM][BF₄], or [DMIM][MeSO₄], and then one of the organic solvents was added. The best kinetic resolution parameters were observed for the system containing [EMIM][BF₄] and cyclohexane. In all the tested reaction systems, the enantiomeric excesses of products were higher than 80% (Figure 4). Based on the previously described studies, biotransformation could be considered enantioselective if the *E*-ratio is higher than 20. In Figure 5, the *E*-ratios of the tested systems are summed up. Each system without the addition of ionic liquids could be considered enantioselective. Nevertheless, the addition of an ionic liquid could increase the enantioselectivity of the kinetic resolution of the clopidogrel carboxylic acid.

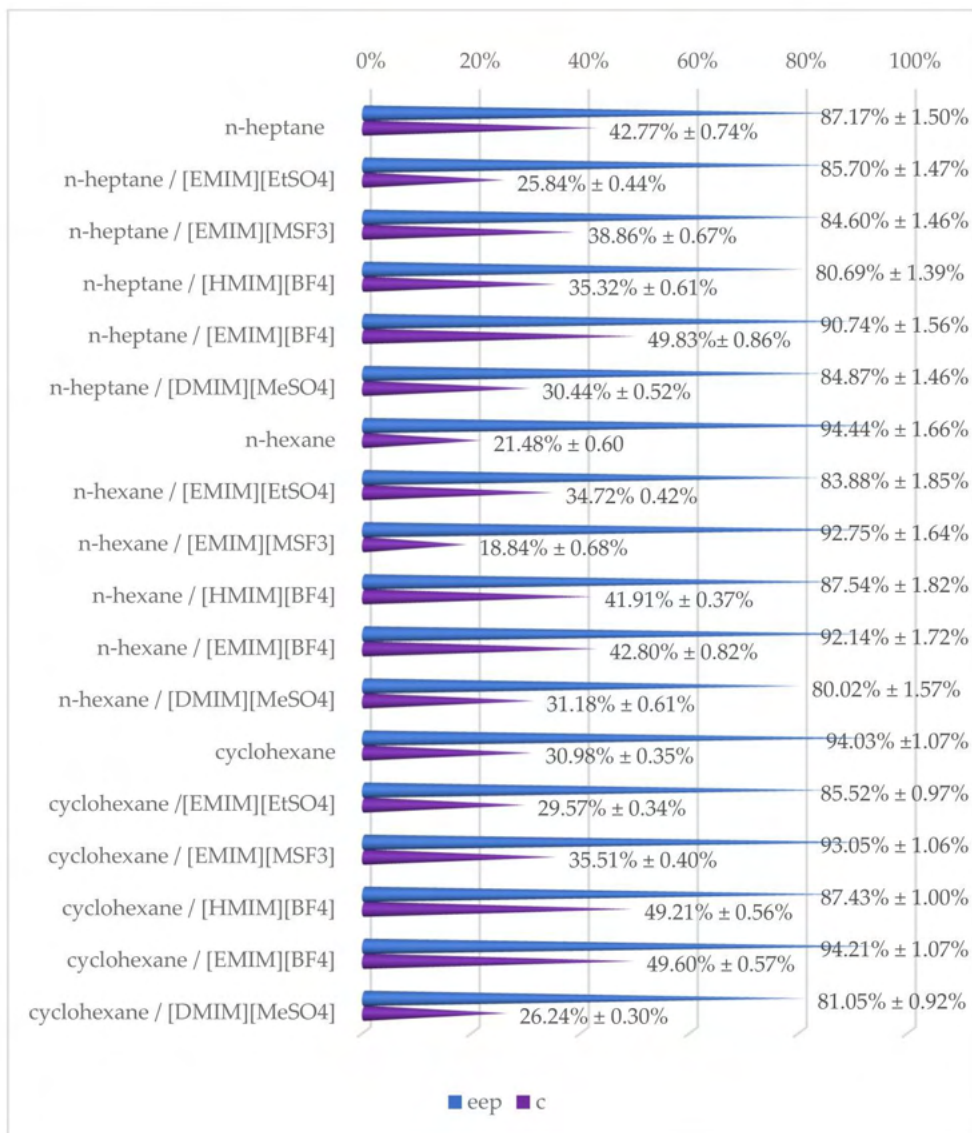


Figure 4. Overview of obtained results of performed enantioselective biotransformation of (*R,S*)-clopidogrel carboxylic acid after 120 h of incubation, including enantiomeric excesses of products (e_p) and conversion (c).

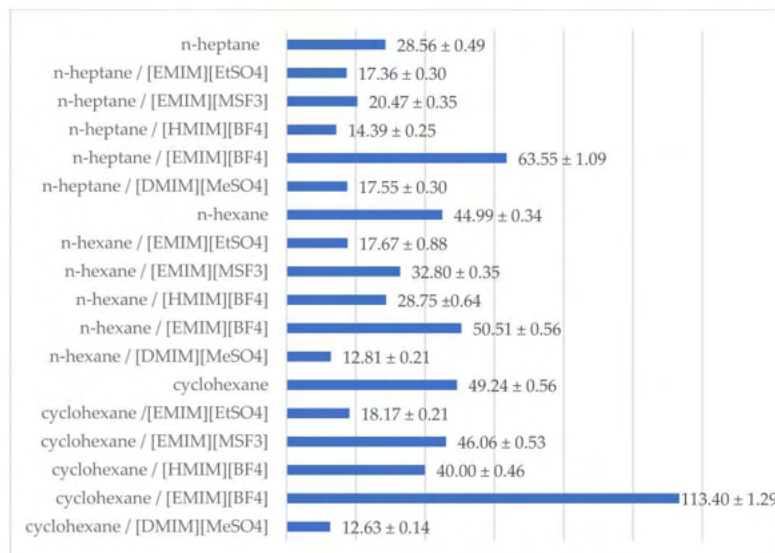


Figure 5. Overview of obtained results of performed enantioselective biotransformation of (*R,S*)-clopidogrel carboxylic acid after 120 h of incubation, including entantioselectivity (*E*).

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals

Acetonitrile, methanol, formic acid, [EMIM][BF₄], [EMIM][EtSO₄], [HMIM][BF₄], [EMIM][MSF₃], [DMIMMeSO₄], *n*-heptane, *n*-hexane, and cyclohexane were purchased from Merck, Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Germany.

(*R,S*)-clopidogrel carboxylic acid, (*R,S*)-clopidogrel, (*R*)-clopidogrel, and (*S*)-clopidogrel were purchased from Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada.

Lipase from *Candida rugosa* OF was a gift from Meito Sangyo Co., Tachikawa, Japan. The activity of lipase from *Candida rugosa* OF was a 360,000 U/g powder. The thermal stability of lipase was equal to or below 37 °C, and the optimal pH was 6–7.

In the conducted study, the water used was obtained using a Milli-Q Water Purification System, Millipore, Bedford, MA, USA.

3.2. Instrumentation

The HPLC samples were washed using refrigerated CentriVap concentrators purchased from Labconco, Kansas City, MO, USA. The Shimadzu, Kyoto, Japan, UPLC-MS/MS system used for the HPLC studies consisted of an autosampler (SIL-40AC), two solvent feed pumps with a gradient system (LC-40AD), a degasser (DGU-30A5), a column oven (CTO-40AC), a UV detector (SPD-M20A), and a triple quadrupole mass spectrometer detector (model: LCMS-8045).

A model KJO-4282 Guard Cartridge System and a Lux Cellulose-2 (LC-2) chiral column with a cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate) stationary phase, as well as a Lux Cellulose-3 (LC-3) chiral column with a cellulose tris(4-methyl benzoate) from Phenomenex Co., Torrance, CA, USA, were used in the chiral chromatographic separations.

All incubations were performed in a dedicated incubator, model Incubators 1000 and Unimax 1010. The incubators were purchased from Heidolph, Schwabach, Germany with controlled temperature and rotation (250 RPM). Each piece of glass used was dried in an oven overnight before being cooled with a stream of nitrogen.

3.3. Chromatographic Conditions

In order to optimize the chiral separations of all reagents, e.g., the enantiomers of racemic clopidogrel carboxylic acid and the enantiomers of racemic clopidogrel, various chromatographic conditions were investigated. Finally, the baseline chiral separations of the enantiomers of both clopidogrel carboxylic acid and clopidogrel were accomplished using two different chiral columns: Lux Cellulose-2 for (*R,S*)-clopidogrel carboxylic acid and Lux Cellulose-3 for (*R,S*)-clopidogrel. The composition of the mobile phase for the chiral separation of (*R,S*)-clopidogrel carboxylic acid included acetonitrile, methanol, and formic acid in a volumetric ratio of 87.5/12.5/0.1, whereas for the chiral separation of (*R,S*)-clopidogrel, the mobile phase was composed of methanol and formic acid in a volumetric ratio of 100/0.1.

In both the optimized chromatographic conditions, the mobile phase flow rate was set at 0.8 mL/min in order to obtain a proper resolution. A triple quadrupole mass spectrometer in multiple reaction monitoring modes (MRMs) was utilized to detect chiral compounds. (*R,S*)-clopidogrel carboxylic acid had MRM transitions of 308.30 > 198.10, 308.30 > 152.10, and 308.30 > 111.25, whereas (*R,S*)-clopidogrel had transitions of 322.20 > 212.15, 322.20 > 185.15, and 322.20 > 155.10 (Figure 6).

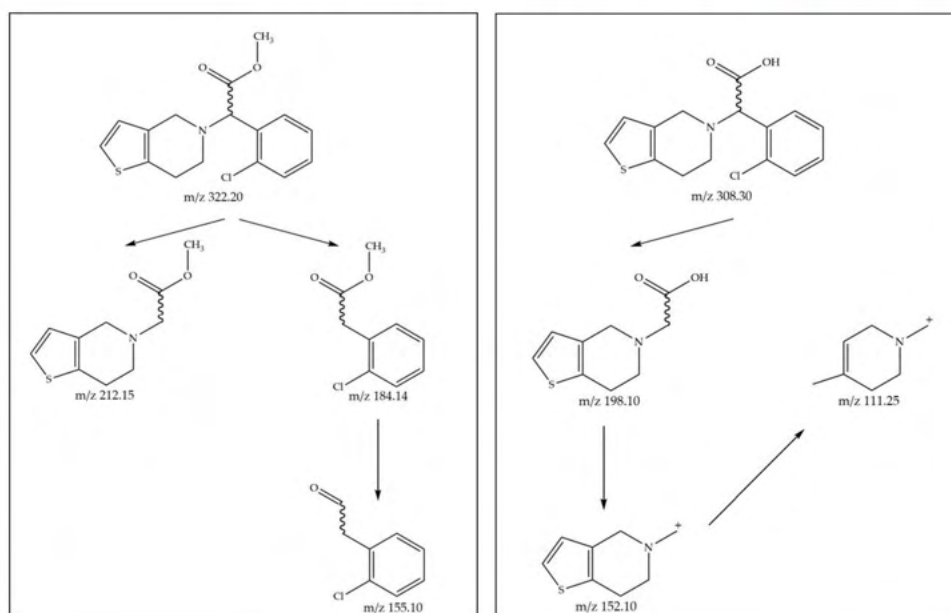


Figure 6. Fragmentation pathways for molecular ions of (*R,S*)-clopidogrel (m/z 322.20) and (*R,S*)-clopidogrel carboxylic acid (m/z 308.30).

The retention time of (*R*)-clopidogrel carboxylic acid was $t_R = 5.821$ min and (*S*)-clopidogrel carboxylic acid was $t_R = 7.539$ min, whereas (*R*)-clopidogrel was $t_R = 5.595$ min and (*S*)-clopidogrel was $t_R = 7.214$ min (Figure 7).

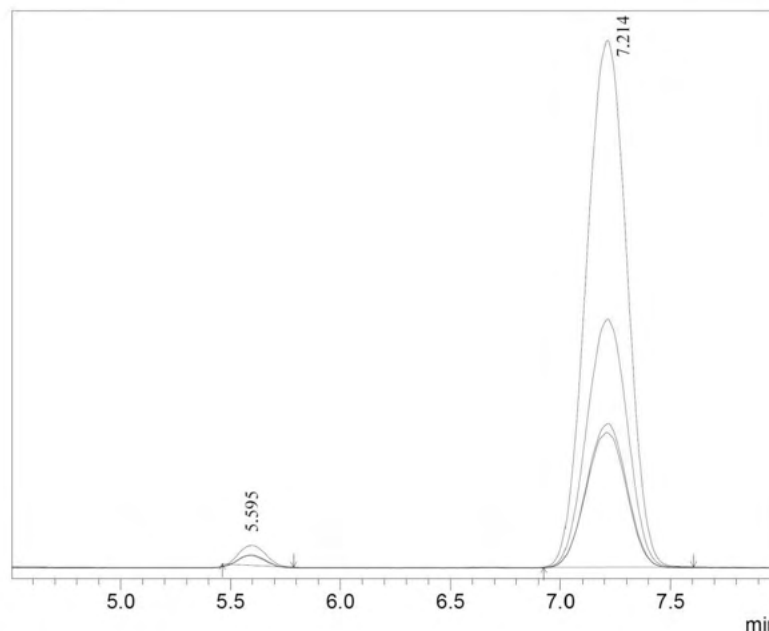


Figure 7. Chromatogram of *(R,S)*-clopidogrel after 120 h of kinetic resolution of *(R,S)*-clopidogrel carboxylic acid with the use of *Candida rugosa* OF in two-phase reaction media containing [EMIM] [BF₄] and cyclohexane: *(R)*-clopidogrel ($t_R = 5.595$ min) and *(S)*-clopidogrel ($t_R = 7.214$ min). Chromatographic conditions: Lux Cellulose-3 (4.6 × 250 mm × 3 μm) column, mobile phase: methanol/formic acid (100/0.1 v/v), $F_R = 0.8$ mL/min, $t = 20$ °C.

Using the equations described by Chen et al. [38] and Chen et al. [39] based on the peak areas from chromatograms of the enantiomers of clopidogrel carboxylic acid and clopidogrel, it was possible to determine the conversion and optical purity of both substrates and products, as well as the enantioselectivity of the enzyme-catalyzed biotransformation that was carried out.

3.4. Kinetic Resolution of *(R,S)*-Clopidogrel Carboxylic Acid

In a 10 mL glass flask, the enantioselective biotransformation of racemic clopidogrel carboxylic acid was performed. The reaction mixture contained *(R,S)*-clopidogrel carboxylic acid (3.0 mg, 0.01 mM) dissolved in 250 μL of the chosen ionic liquid and placed in 5 mL of *n*-hexane, *n*-heptane, or cyclohexane, which, when combined, constituted a two-phase reaction medium. In the samples without ionic liquids, *(R,S)*-clopidogrel carboxylic acid (3.0 mg, 0.01 mM) was directly dissolved in 5 mL of one of the above-mentioned organic solvents. The reaction used methanol (3 μL, 0.25 mM) as an acyl acceptor. The effect of the addition of the ionic liquids [EMIM][BF₄], [EMIM][EtSO₄], [HMIM][BF₄], [EMIM][MSF₃], or [DMIMMeSO₄] on the kinetic resolution of *(R,S)*-clopidogrel carboxylic acid was a part of the investigation. By directly adding 10 mg of native lipase from *Candida rugosa* OF to the previously assembled bioreactor, the enzyme-catalyzed biotransformation of *(R,S)*-carboxylic acid was initiated. The reaction mixtures were incubated and shaken (250 RPM) at 37 °C.

By using a chiral stationary phase and a UPLC system coupled with a triple quadrupole mass spectrometer in MRM mode, the enantioselective biotransformation of *(R,S)*-clopidogrel carboxylic acid was monitored. Samples of 10 μL of ionic liquid containing the substrates

and products were collected at predetermined time points every 24 h for 120 h. Next, the chiral compounds were extracted from the ionic liquid via liquid–liquid extraction by vigorous shaking with 500 μ L of acetonitrile for 10 min. After centrifugation and filtration using syringe filters, the prepared samples were transferred into the vials and directly injected into a UPLC chiral column.

4. Conclusions

Several other approaches previously described elsewhere allow for the obtaining of (*S*)-clopidogrel [16,40,41]. Nevertheless, more attempts to find green and economical synthetic methods recommended by the ESC P2Y12 inhibitor are still necessary. The presented study aimed to optimize the most suitable conditions to obtain enantiomerically pure (*S*)-clopidogrel at a laboratory scale. The experiment's results support the hypothesis that *Candida rugosa* lipase OF is suitable for catalyzing the kinetic resolution of racemic clopidogrel carboxylic acid. It was proven that using the two-phase catalytic system with cyclohexane, [EMIM][BF₄], and *Candida rugosa* lipase allowed for the obtaining of highly enantioselective parameters. The enantioselective biotransformation of racemic clopidogrel carboxylic acid was performed under various reaction conditions. The study verified the possibility of performing the kinetic resolution of racemic clopidogrel carboxylic acid in a two-phase catalytic system using methanol as an acyl acceptor. According to the available literature, it was decided to test five various ionic liquids: [EMIM][EtSO₄], [EMIM][MSF₃], [HMIM][BF₄], [EMIM][BF₄], and [DMIM][MeSO₄] [42–47]. The used ionic liquids, however, displayed a variety of kinetic characteristics, leading to varying enantioselectivities and enantiomeric excesses of substrates and products. The catalytic efficiency of the *Candida rugosa* lipase varied depending on the different anions of the ILs in the following order: [BF₄][−] > [MSF₃][−] > [MeSO₄][−] > [EtSO₄][−], and on the different cations of the ILs as follows: [EMIM]⁺ > [HMIM]⁺ > [DMIM]⁺. As has been previously described in the literature, various ILs, which contain different anions and cations, could possibly interact with the enantioselective biocatalyst in various ways, such as through ionic and dipolar interactions, hydrogen bonding, or van der Waals forces [37]. Nevertheless, it is important not to affect the enzyme conformation. Therefore, it seems that factors such as the reaction medium influence the enzyme conformation and could decrease or increase the enantioselective properties of biocatalysts. Although the biotransformations were performed at a laboratory scale, the optimized conditions and the described observations could be considered significant milestones for further scaling up the production and for possible industrial synthesis, which is planned.

It should be stressed that two-phase catalytic systems containing ionic liquids can be critical from an economic point of view, as they allow for a direct and substantial reduction in the overall cost of biotransformations catalyzed by enzymes. Since the biocatalysts can be easily separated from the substrate and the product, the lipase can be reused in another reaction. This approach has been comprehensively described elsewhere in kinetic resolutions of various racemic compounds using ionic liquids [29,48,49]. Furthermore, it should be emphasized that the solubility of racemic clopidogrel carboxylic acid in organic solvents is relatively low and requires more significant volumes of the reaction medium, which could have a negative impact on the environment. Therefore, the future prospects of the presented study should be referred to when seeking a new functionality for reaction mixtures, which, apart from obtaining better and more efficient reaction parameters, should also be “greener” and re-usable.

Author Contributions: Conceptualization, J.C. and A.S.; methodology, J.C. and A.S.; investigation, J.C. and A.S.; writing—original draft preparation, J.C.; writing—review and editing, M.P.M.; visualization, J.C.; supervision, M.Z.-B. and M.P.M.; funding acquisition, A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: A research grant from the National Science Centre, number 2017/27/N/NZ7/02424, funded the experiment.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors wish to express their sincere thanks to Meito Sangyo Co. (Japan) for the supply of lipase OF from *Candida rugosa*.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Carlin, S.; Eikelboom, J. Are P2Y12 inhibitors superior to aspirin for long-term secondary prevention of cardiovascular disease? *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **2023**, *21*, 305–309. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Erlinge, D.; Amisten, S.; Braun, O.; Johansson, L.; Ridderstrale, M.; Melander, O. The P2Y12/P2Y13 haplotype is not associated with acute myocardial infarction, cardiovascular risk factors or diabetes. *Eur. Heart J.* **2008**, *29*, 826.
3. Fujisaki, T.; Kuno, T.; Ando, T.; Briasoulis, A.; Takagi, H.; Bangalore, S. Potent P2Y12 inhibitors versus Clopidogrel in elderly patients with acute coronary syndrome: Systematic review and meta-analysis. *Am. Heart J.* **2021**, *237*, 34–44. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Girotra, S.; Stebbins, A.; Wruck, L.M.; Riley, D.; Kripalani, S.; Munoz, D.; Efron, M.B.; Gupta, K.; Whittle, J.; Benziger, C.; et al. Effect of Aspirin Dosing in Patients Treated with P2Y12 Inhibitors for Secondary Prevention of Cardiovascular Events. *Circulation* **2022**, *146*, A14192. [\[CrossRef\]](#)
5. Mannan, F.; Saluja, S.; Contractor, H.; Abidin, N.; Fitchet, A.; Tin, L.; Woolfson, P.; Garg, S.; Anderson, S. Next generation P2Y12 inhibitors improve survival in acs: An analysis from the british cardiovascular intervention society database. *Heart* **2021**, *107*, A30. [\[CrossRef\]](#)
6. Niezgodna, P.; Sikora, J.; Baranska, M.; Sikora, A.; Buszko, K.; Sieminska, E.; Marszall, M.P.; Siller-Matula, J.M.; Jilma, B.; Alexopoulos, D.; et al. Crushed sublingual versus oral ticagrelor administration strategies in patients with unstable angina. *Thromb. Haemost.* **2017**, *117*, 718–726. [\[CrossRef\]](#)
7. Piao, J.X.; Yoo, C.; Kim, S.; Whang, Y.W.; Shin, S.; Choi, C.U. Assessment of therapeutic platelet inhibition in cardiac patients: Comparative study between VerifyNow-P2Y12 and AnySis-P2Y12 assay. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **2021**, *78*, 439–448. [\[CrossRef\]](#)
8. Senzel, L.; Ahmed, T.; Spitzer, E.D. Laboratory Monitoring of Platelet P2Y12 Receptor Inhibitors and Reversal of Antiplatelet Agents: An ACLPS Critical Review. *Am. J. Clin. Pathol.* **2019**, *152*, 1–6. [\[CrossRef\]](#)
9. Seung, H.; Wrobel, J.; Wadle, C.; Buehler, T.; Chiang, D.; Rettkowski, J.; Cabezas-Wallscheid, N.; Hechler, B.; Wolf, D.; Duereschmied, D.; et al. The role of P2Y12 in cardiovascular disease beyond atherothrombosis: P2Y12 signaling promotes emergency hematopoiesis after myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **2022**, *43*, 3006.
10. Wang, L.; Wang, J.X.; Xu, J.X.; Qin, W.X.; Wang, Y.M.; Luo, S.S.; Wang, G.X. The Role and Molecular Mechanism of P2Y12 Receptors in the Pathogenesis of Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 9078. [\[CrossRef\]](#)
11. DeRaad, R.; Jennings, L.K.; Hord, E.; Welder, J.S. Antiplatelet Effects of Ticagrelor versus Clopidogrel in Native American Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Circulation* **2015**, *132*, A12498. [\[CrossRef\]](#)
12. Geisler, T.; Langer, H.; Wydymus, M.; Gohring, K.; Zurn, C.; Bigalke, B.; Stellos, K.; May, A.E.; Gawaz, M. Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation. *Eur. Heart J.* **2006**, *27*, 2420–2425. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Joung, K.I.; Kim, K.H.; Hsieh, C.Y.; Shin, J.Y. Exploring pharmacogenetic difference using adverse event database: An example of clopidogrel and cardiovascular events. *Pharmacogenomics* **2020**, *21*, 1157–1168. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Ma, T.K.W.; Lam, Y.Y.; Tan, V.P.; Yan, B.P. Variability in response to clopidogrel: How important are pharmacogenetics and drug interactions? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2011**, *72*, 697–706. [\[CrossRef\]](#)
15. Reist, M.; Roy-De Vos, M.; Montseny, J.P.; Mayer, J.M.; Carrupt, P.A.; Berger, Y.; Testa, B. Very slow chiral inversion of clopidogrel in rats: A pharmacokinetic and mechanistic investigation. *Drug Metab. Dispos.* **2000**, *28*, 1405–1410.
16. Sashikanth, S.; Raju, V.; Somaiah, S.; Rao, P.S.; Reddy, K.V. An Asymmetric Synthesis of Clopidogrel Hydrogen Sulfate. *Synth.-Stuttg.* **2013**, *45*, 621–624. [\[CrossRef\]](#)
17. Valgimigli, M.; Bueno, H.; Byrne, R.A.; Collet, J.P.; Costa, F.; Jeppsson, A.; Juni, P.; Kastrati, A.; Kolh, P.; Mauri, L.; et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS. *Eur. Heart J.* **2018**, *39*, 213. [\[CrossRef\]](#)
18. Williams, B.; Mancia, G.; Spiering, W.; Rosei, E.A.; Azizi, M.; Burnier, M.; Clement, D.L.; Coca, A.; de Simone, G.; Dominiczak, A.; et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur. Heart J.* **2018**, *39*, 3021–3104. [\[CrossRef\]](#)
19. Hudzik, B.; Blachut, A.; Lesiak, M.; Kubica, J.; Wojakowski, W.; Gasior, M. Summary of the European Society of Cardiology guidelines on dual antiplatelet therapy in patients after percutaneous coronary interventions. *Kardiol. Pol.* **2022**, *80*, 974–989. [\[CrossRef\]](#)
20. Adriaensen, K.; Vercammen, J.; Van Goethem, C.; Eyley, S.; Vankelecom, I.; Thielemans, W.; De Vos, D. Novel heterogeneous ruthenium racemization catalyst for dynamic kinetic resolution of chiral aliphatic amines. *Green Chem.* **2020**, *22*, 85–93. [\[CrossRef\]](#)

21. Aguillon, A.R.; Avelar, M.N.; Gotardo, L.E.; de Souza, S.P.; Leao, R.A.C.; Itabaiana, I., Jr.; Miranda, L.S.M.; de Souza, R. Immobilized lipase screening towards continuous-flow kinetic resolution of (+/−)-1,2-propanediol. *Mol. Catal.* **2019**, *467*, 128–134. [[CrossRef](#)]
22. Agustian, J.; Kamaruddin, A.H.; Aboul-Enein, H.Y. Enantio-conversion and -selectivity of racemic atenolol kinetic resolution using free *Pseudomonas fluorescens* lipase (Amano) conducted via transesterification reaction. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 26077–26085. [[CrossRef](#)]
23. Agustian, J.; Kamaruddin, A.H. The Reaction Mechanism and Kinetics Data of Racemic Atenolol Kinetic Resolution via Enzymatic Transesterification Process Using Free *Pseudomonas fluorescens* Lipase. *Int. J. Chem. Kinet.* **2016**, *48*, 253–265. [[CrossRef](#)]
24. Bozan, A.; Songur, R.; Mehmetoglu, U. The production of enantiomerically pure 1-phenylethanol by enzymatic kinetic resolution method using response surface methodology. *Turk. J. Chem.* **2020**, *44*, 1352–1365. [[CrossRef](#)]
25. de Almeida, D.K.C.; da Silva, M.R.; de Mattos, M.C.; Nunes, F.M.; Ballereau, S.; Genisson, Y.; Maraval, V.; Chauvin, R.; Oliveira, M.C.F. Lipase-catalysed enantioselective kinetic resolution of rac-lipidic alkynylcarbinols and a C-5 synthon thereof via a hydrolysis approach. *Mol. Catal.* **2020**, *488*, 809.
26. Fukawa, Y.; Mizuno, Y.; Kawade, K.; Mitsukura, K.; Yoshida, T. Novel (S)-Selective Hydrolase from *Arthrobacter* sp. K5 for Kinetic Resolution of Cyclic Amines. *Catalysts* **2021**, *11*, 809. [[CrossRef](#)]
27. Lesniarek, A.; Chojnacka, A.; Gladkowski, W. Application of Lecitase (R) Ultra-Catalyzed Hydrolysis to the Kinetic Resolution of (E)-4-phenylbut-3-en-2-yl Esters. *Catalysts* **2018**, *8*, 423. [[CrossRef](#)]
28. Chalupka, J.; Sikora, A.; Kozicka, A.; Marszall, M.P. Overview: Enzyme-catalyzed Enantioselective Biotransformation of Chiral Active Compounds Used in Hypertension Treatment. *Curr. Org. Chem.* **2020**, *24*, 2782–2791. [[CrossRef](#)]
29. Chalupka, J.; Duleba, J.; Sikora, A.; Siodmiak, T.; Marszall, M.P. The Application of Two-Phase Catalytic System in Enantioselective Separation of Racemic (R,S)-1-Phenylethanol. *Catalysts* **2023**, *13*, 292. [[CrossRef](#)]
30. Sikora, A.; Siodmiak, T.; Marszall, M.P. Kinetic Resolution of Profens by Enantioselective Esterification Catalyzed by *Candida antarctica* and *Candida rugosa* Lipases. *Chirality* **2014**, *26*, 663–669. [[CrossRef](#)]
31. Sikora, A.; Sroka, W.D.; Siodmiak, T.; Marszall, M.P. Kinetic Resolution of (R,S)-atenolol with the Use of Lipases in Various Organic Solvents. *Curr. Org. Synth.* **2017**, *14*, 747–754. [[CrossRef](#)]
32. Di, X.H.; Zhang, Y.; Fu, J.Y.; Yu, Q.; Wang, Z.M.; Yuan, Z.H. Ionic Liquid-Strengthened Immobilized *Rhizomucor miehei* Lipase for Catalytic Esterification of Itaconic Acid in Aqueous Media. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 1805–1812. [[CrossRef](#)]
33. Hussain, A.; AlAjmi, M.F.; Hussain, I.; Ali, I. Future of Ionic Liquids for Chiral Separations in High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2019**, *49*, 289–305. [[CrossRef](#)]
34. Itoh, T. Biotransformation in ionic liquid. In *Future Directions in Biocatalysis*, 2nd ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 27–67. [[CrossRef](#)]
35. Lozano, P.; Alvarez, E.; Bernal, J.M.; Nieto, S.; Gomez, C.; Sanchez-Gomez, G. Ionic Liquids for Clean Biocatalytic Processes. *Curr. Green Chem.* **2017**, *4*, 116–129. [[CrossRef](#)]
36. Teixeira, R.; Lourenco, N.M.T. Enzymatic kinetic resolution of sec-alcohols using an ionic liquid anhydride as acylating agent. *Tetrahedron-Asymmetry* **2014**, *25*, 944–948. [[CrossRef](#)]
37. Wei, T.; Yang, K.P.; Bai, B.; Zang, J.; Yu, X.; Mao, D.B. Enzymatic Hydrolytic Resolution of Racemic Ibuprofen Ethyl Ester Using an Ionic Liquid as Cosolvent. *Molecules* **2016**, *21*, 905. [[CrossRef](#)]
38. Chen, C.S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C.J. Quantitative-analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294–7299. [[CrossRef](#)]
39. Sih, C.J.; Wu, S.H. Resolution of enantiomers via biocatalysis. *Top. Stereochem.* **1989**, *19*, 63–125.
40. Saeed, A.; Shahzad, D.; Faisal, M.; Larik, F.A.; El-Seedi, H.R.; Channar, P.A. Developments in the synthesis of the antiplatelet and antithrombotic drug (S)-clopidogrel. *Chirality* **2017**, *29*, 684–707. [[CrossRef](#)]
41. Ferraboschi, P.; De Mieri, M.; Galimberti, F. Chemo-enzymatic approach to the synthesis of the antithrombotic clopidogrel. *Tetrahedron-Asymmetry* **2010**, *21*, 2136–2141. [[CrossRef](#)]
42. Montalban, M.G.; Collado-Gonzalez, M.; Lozano-Perez, A.A.; Banos, F.G.D.; Villora, G. Extraction of organic compounds involved in the kinetic resolution of rac-2-pentanol from n-hexane by imidazolium-based ionic liquids: Liquid-liquid equilibrium. *J. Mol. Liq.* **2018**, *252*, 445–453. [[CrossRef](#)]
43. Ramos-Martin, J.; Khiari, O.; Alcántara, A.R.; Sanchez-Montero, J.M. Biocatalysis at Extreme Temperatures: Enantioselective Synthesis of both Enantiomers of Mandelic Acid by Transesterification Catalyzed by a Thermophilic Lipase in Ionic Liquids at 120 °C. *Catalysts* **2020**, *10*, 1055. [[CrossRef](#)]
44. Elgharbawy, A.A.; Muniruzzaman, M.; Salleh, H.M.; Alam, M.D.Z. Ionic Liquids as a Green Solvent for Lipase-Catalyzed Reactions. In *Industrial Applications of Green Solvents, Vol I*; Inamuddin, D., Ahamed, M.I., Asiri, A.M., Eds.; Materials Research Foundations; Materials Research Forum: Millersville, PA, USA, 2019; Volume 50, pp. 21–60.
45. Park, S.; Doan, T.T.N.; Koo, Y.M.; Oh, K.K.; Lee, S.H. Ionic liquids as cosolvents for the lipase-catalyzed kinetic resolution of ketoprofen. *Mol. Catal.* **2018**, *459*, 113–118. [[CrossRef](#)]
46. Wang, Y.; Cheng, H.; He, J.R.; Yao, Q.X.; Li, L.L.; Liang, Z.H.; Li, X. Enzymes-Catalyzed Knoevenagel Condensation Promoted by Ionic Liquid and Deep Eutectic Solvent. *Catal. Lett.* **2022**, *152*, 1215–1223. [[CrossRef](#)]

47. Jadav, D.; Pandey, D.K.; Patil, T.; Singh, D.K.; Dharaskar, S.; Bandyopadhyay, R.; Tsunoji, N.; Kumar, R.; Bandyopadhyay, M. Ordered silica matrices supported ionic liquids as highly efficient catalysts for fine chemical synthesis. *J. Porous Mater.* **2022**, *29*, 2003–2017. [[CrossRef](#)]
48. Chalupka, J.; Sikora, A.; Marszall, M.P. The Utilization of Two-Phase Catalytic System in Enantioselective Biotransformation of Racemic Atenolol. *Catalysts* **2022**, *12*, 1068. [[CrossRef](#)]
49. Heba, M.; Wolny, A.; Kastelik-Hryniewiecka, A.; Stradomska, D.; Jurczyk, S.; Chrobok, A.; Kuznik, N. Green Dynamic Kinetic Resolution-Stereoselective Acylation of Secondary Alcohols by Enzyme-Assisted Ruthenium Complexes. *Catalysts* **2022**, *12*, 1395. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

9. WNIOSKI

Zrealizowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej badania naukowe stanowią podstawę merytoryczną pozwalającą na następujące wnioskowanie:

- ✓ Enzymatyczny rozdział kinetyczny umożliwia otrzymanie chiralnie czystych produktów; [P1], [P2], [P3], [P4].
- ✓ Zastosowanie chiralnej chromatografii cieczowej pozwala na monitorowanie zmian zachodzących w mieszaninach reakcyjnych oraz ocenę parametrów realizowanych rozdziałów kinetycznych; [P2], [P3], [P4].
- ✓ Zastosowanie lipaz z *Candida rugosa* w rozdziale kinetycznych (*R,S*)-atenololu oraz kwasu karboksylowego (*R,S*)-klopidogrelu umożliwia uzyskanie enancjomerycznie czystych produktów; [P2], [P4].
- ✓ Zastosowanie lipazy z *Burkholderia cepacia* w rozdziale kinetycznym (*R,S*)-1-fenyletanolu pozwala na uzyskanie enancjomerycznie czystego produktu; [P3].
- ✓ Zastosowanie cieczy jonowych w rozdziałach kinetycznych (*R,S*)-atenololu, (*R,S*)-1-fenyletanolu oraz kwasu karboksylowego (*R,S*)-klopidogrelu wywiera istotny wpływ na efektywność i enancjoselektywność realizowanych biotransformacji; [P2], [P3], [P4].
- ✓ [EMIM][BF₄] w połączeniu z toluenem tworzy układ dwufazowy, który zwiększa aktywność katalityczną lipazy z *Candida rugosa* oraz umożliwia uzyskanie czystego enancjomerycznie octanu (*S*)-atenololu; [P2].
- ✓ [EMIM][BF₄] w połączeniu z heptanem tworzy układ dwufazowy, który zwiększa aktywność katalityczną lipazy z *Burkholderia cepacia* oraz umożliwia uzyskanie czystego enancjomerycznie (*S*)-1-fenyletanolu; [P3].
- ✓ [EMIM][BF₄] w połączeniu z cykloheksanem tworzy układ dwufazowy, który zwiększa aktywność katalityczną lipazy z *Candida rugosa* oraz umożliwia uzyskanie czystego enancjomerycznie (*S*)-klopidogrelu; [P4].
- ✓ Ciecze jonowe wpływają na konformację lipaz poprzez oddziaływania jonowe, dipolarne, wiązania wodorowe lub van der Waalsa prowadząc do inhibicji lub

hiperaktywacji biokatalizatorów w rozdzielach kinetycznych racematów; [P2], [P3], [P4].

- ✓ Spośród testowanych cieczy jonowych [EMIM][BF₄] najkorzystniej wpływa na aktywność katalityczną oraz enancjoselektywność lipaz z *Candida rugosa* oraz *Burkholderia cepacia*; [P1], [P2], [P3], [P4].
- ✓ Zastosowanie dwufazowych układów katalitycznych w rozdzielach kinetycznych racematów fizycznie odseparowuje substraty i produkty od białkowego katalizatora, co umożliwia na łatwą separację enzymu ze środowiska reakcji i jego ponowne wykorzystanie w kolejnej biotransformacji; [P2], [P3], [P4].
- ✓ Lipazy z *Candida rugosa* oraz *Burkholderia cepacia* wykorzystywane w 5-ciu kolejnych cyklach katalitycznych wykazują wysoką aktywność katalityczną oraz enancjoselektywność. [P2], [P3], [P4].

10. STRESZCZENIE

W latach 50-tych ubiegłego wieku lek o nazwie handlowej Contergan® zawierający racemiczny talidomid wywołał tragiczne w skutkach działania niepożądane u kobiet ciężarnych. Z uwagi na różną farmakodynamikę oraz profil działań niepożądanych poszczególnych enancjomerów talidomidu, pozornie bezpieczny, nowy lek wykazujący działanie przeciwbólowe, przeciwwymiotne oraz uspokajające u ciężarnych kobiet był odpowiedzialny za istotną teratogenność płodów. W efekcie stosowania przez kobiety ciężarne leku urodziło się około 12 tysięcy dzieci z zaburzeniami, z których około 4 tysiące nie przeżyło pierwszego roku. Z uwagi na niebezpieczeństwo związane ze stosowaniem chiralnych produktów leczniczych w formie mieszanin enancjomerów lub diastereoizomerów od ponad 30 lat istnieją regulacje prawne przedstawione zarówno przez Amerykańską Agencję ds. Leków i Żywności (FDA) oraz Europejską Agencję Leków (EMA) nakazujące wykonanie pełnej charakterystyki substancji chiralnych w aspekcie bezpieczeństwa i skuteczności ich działania w proponowanym wskazaniu terapeutycznym. W związku z powyższym chiralność leków jest obecnie niezwykle istotnym obszarem w fazie projektowania i komercjalizacji nowych produktów leczniczych, co jest szczególnie widoczne poprzez wzrost światowego trendu w ilości nowych zatwierdzonych enancjomerycznie czystych leków.

Jedną z metod umożliwiającą pozyskanie chiralnie czystych substancji jest rozdział kinetyczny oparty na wykorzystaniu enzymów pełniących funkcję enancjoselektywnych katalizatorów. Podejście to jest korzystne z ekonomicznego oraz ekologicznego punktu widzenia, ponieważ przeprowadzane w ten sposób biotransformacje nie wymagają drastycznych warunków reakcji co wpisuje się w trendy zielonej chemii. Dodatkowo zastosowanie cieczy jonowych w enzymatycznych rozdzielaczach kinetycznych niesie za sobą dodatkowe korzyści, związane z redukcją ilości wykorzystywanych toksycznych rozpuszczalników organicznych oraz możliwością łatwego odseparowania enzymów ze środowiska reakcji i ich ponownego wykorzystania w kolejnych cyklach katalitycznych.

W ramach zrealizowanych prac naukowych przeprowadzono systematyczny przegląd literaturowy badań naukowych, które dotyczyły rozdzielaczy kinetycznych leków β -adrenolitycznych, a następnie zoptymalizowano rozdzielacze kinetyczne z wykorzystaniem dwufazowych układów katalitycznych zawierających cieczy jonowe dla (*R,S*)-atenololu, (*R,S*)-1-fenyletanolu i kwasu karboksylowego (*R,S*)-klopidogrelu.

Przeprowadzony przegląd literaturowy pozwolił na zaobserwowanie korzyści wynikającej ze stosowania cieczy jonowych w rozdzielaczach kinetycznych leków β -

adrenolitycznych. Wprawdzie przytoczone w pracy badania, zrealizowane przez niezależne zespoły badawcze przedstawiały różne sposoby pozyskania chiralnie czystych pochodnych leków β -adrenolitycznych na drodze enzymatycznego rozdziału kinetycznego. Jednak to zastosowanie cieczy jonowych w dwufazowym układzie katalitycznych przyczyniło się do uzyskania produktów o najwyższej czystości enancjomerycznej.

W kolejnym etapie badań zoptymalizowano rozdział kinetyczny (*R,S*)-atenololu z zastosowaniem lipazy z *Candida rugosa* w dwufazowym układzie katalitycznych zawierającym ciecz jonową. W tym celu przeprowadzono serie badań, w których testowano wpływ różnych cieczy jonowych na realizowany rozdział kinetyczny. W wyniku przeprowadzonych badań zaproponowano mieszaninę reakcyjną pozwalającą na uzyskanie chiralnie czystego octanu (*S*)-atenololu.

Następnie wykonano badania dotyczące zastosowania dwufazowego układu reakcyjnego w rozdziale kinetycznym (*R,S*)-1-feniloetanolu. W ramach zrealizowanych prac badawczych zoptymalizowano enancjoselektywną biotransformację oraz określono wpływ czynnika acetylującego, środowiska reakcji oraz zastosowanego biokatalizatora na efektywność i enancjoselektywność prowadzonych rozdziałów kinetycznych. W efekcie zaproponowano optymalne warunki enancjoselektywnej esteryfikacji umożliwiającej uzyskanie chiralnie czystego (*S*)-1-feniloetanolu.

W ostatnim etapie prac badawczych zoptymalizowano rozdział kinetyczny kwasu karboksylowego (*R,S*)-klopidogrelu. W trakcie badań naukowych testowano wpływ środowisk reakcji, które różniły się między sobą rozpuszczalnikiem organicznym oraz cieczą jonową, na enancjoselektywność oraz wydajność prowadzonych biotransformacji. Zrealizowane prace naukowe umożliwiły zaproponowanie optymalnych warunków enancjoselektywnej estryfikacji pozwalającej na uzyskanie chiralnie czystego (*S*)-klopidogrelu.

11. SUMMARY

In the 1950s, a drug with the trade name Contergan® containing racemic thalidomide caused tragic adverse reactions in pregnant women.

Due to the different pharmacodynamics and side-effect profile of the individual thalidomide enantiomers, the apparently safe new drug showing analgesic, antiemetic and sedative effects in pregnant women was responsible for significant foetal teratogenicity. The use of the drug by pregnant women resulted in the birth of approximately 12,000 children with the disorder, of which approximately 4 000 did not survive the first year. Because of the dangers of using chiral medicinal products in the form of mixtures of enantiomers or diastereoisomers, for more than 30 years there have been regulations put forward by both the US Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) mandating the full characterisation of chiral substances in terms of safety and efficacy for their proposed therapeutic indication. As a result, drug chirality is now an extremely important area in the design and commercialisation phase of new medicinal products, which is particularly evident through the increasing global trend in the number of new enantiomerically pure drugs approved.

One method for obtaining chirally pure substances is kinetic separation based on the use of enzymes acting as enantioselective catalysts. This approach is advantageous from an economic as well as ecological point of view, as biotransformations carried out in this way do not require drastic reaction conditions, which is in line with green chemistry trends. In addition, the use of ionic liquids in enzyme kinetic separations has the additional benefits of reducing the amount of toxic organic solvents used and the possibility of easily separating enzymes from the reaction environment and reusing them in subsequent catalytic cycles.

As part of the completed scientific work, a systematic literature review of scientific studies that addressed kinetic separations of β -blocker drugs was carried out, followed by optimised kinetic separations using biphasic catalytic systems containing ionic liquids for (*R,S*)-atenolol, (*R,S*)-1-phenylethanol and the carboxylic acid of (*R,S*)-clopidogrel.

The literature review conducted allowed the observation of the benefit of ionic liquids in the kinetic resolutions of β -blocker drugs. Although the studies cited in this paper, carried out by independent research teams, presented different ways of obtaining chirally pure derivatives of β -blocker drugs by enzymatic kinetic separation. However, it was the use of ionic liquids in a two-phase catalytic system that contributed to obtaining products with the highest enantiomeric purity.

In the next stage of the study, the kinetic resolution of (*R,S*)-atenolol was optimised using a lipase from *Candida rugosa* in a two-phase catalytic system containing ionic liquids. To this end, series of studies were carried out to test the effect of different ionic liquids on the former kinetic resolutions. As a result of these studies, a reaction mixture was proposed to yield chirally pure (*S*)-atenolol acetate.

Subsequently, studies were performed on applying a two-phase reaction system in the kinetic resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol. The research optimized the enantioselective biotransformation and determined the effect of the acetylating agent, the reaction environment, and the biocatalyst used on the efficiency and enantioselectivity of the kinetic separations performed. As a result, the optimum conditions for enantioselective esterification to obtain chirally pure (*S*)-1-phenylethanol were proposed.

In the final stage of the research work, the kinetic resolution of the carboxylic acid of (*R,S*)-clopidogrel was optimised. In the course of the research, the influence of the reaction environments, which differed in organic solvent and ionic liquid, on the enantioselectivity and efficiency of the biotransformations carried out was tested. The completed scientific work made it possible to propose optimum conditions for enantioselective esterification allowing to obtain enantiomerically pure (*S*)-clopidogrel.

12. LITERATURA

1. DeRuiter, J., *Isomerism and Stereochemistry*. Principles of drug action I, Winter, 2005. **1**: p. 1-11.
2. Chhabra, N., M.L. Aseri, and D. Padmanabhan, *A review of drug isomerism and its significance*. Int J Appl Basic Med Res, 2013. **3**(1): p. 16-8.
3. McConathy, J. and M.J. Owens, *Stereochemistry in drug action*. Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry, 2003. **5**(2): p. 70.
4. Kaya, C., K. Birgul, and B. Bulbul, *Fundamentals of chirality, resolution, and enantiopure molecule synthesis methods*. Chirality, 2023. **35**(1): p. 4-28.
5. Book, G., *Compendium of chemical terminology*. International Union of Pure and Applied Chemistry, 2014. **528**.
6. Caldwell, J. and I.W. Wainer, *Stereochemistry: definitions and a note on nomenclature*. Human Psychopharmacology-Clinical and Experimental, 2001. **16**: p. S105-S107.
7. Brooks, W.H., W.C. Guida, and K.G. Daniel, *The Significance of Chirality in Drug Design and Development*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2011. **11**(7): p. 760-770.
8. Coelho, M.M., et al., *Enantioselectivity in Drug Pharmacokinetics and Toxicity: Pharmacological Relevance and Analytical Methods*. Molecules, 2021. **26**(11).
9. Nguyen, L.A., H. He, and C. Pham-Huy, *Chiral drugs: an overview*. Int J Biomed Sci, 2006. **2**(2): p. 85-100.
10. Hutt, A.J., *Drug chirality and its pharmacological consequences*, in *Smith and Williams' Introduction to the Principles of Drug Design and Action*. 2019, CRC Press. p. 97-166.
11. Ceramella, J., et al., *A Look at the Importance of Chirality in Drug Activity: Some Significant Examples*. Applied Sciences-Basel, 2022. **12**(21).
12. De Camp, W.H., *Chiral drugs: the FDA perspective on manufacturing and control*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 1993. **11**(11-12): p. 1167-1172.
13. Sekhon, B.S., *Exploiting the power of stereochemistry in drugs: an overview of racemic and enantiopure drugs*. J. Mod. Med. Chem, 2013. **1**(10): p. 10-36.
14. Murakami, H., *From racemates to single enantiomers - Chiral synthetic drugs over the last 20 years*. Novel Optical Resolution Technologies, 2007. **269**: p. 273-299.
15. Agranat, I., S.R. Wainschein, and E.Z. Zusman, *The predicated demise of racemic new molecular entities is an exaggeration*. Nature Reviews Drug Discovery, 2012. **11**(12).

16. Caner, H., et al., *Trends in the development of chiral drugs*. Drug Discovery Today, 2004. **9**(3): p. 105-110.
17. Shen, Z.W., C. Lv, and S. Zeng, *Significance and challenges of stereoselectivity assessing methods in drug metabolism*. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2016. **6**(1): p. 1-10.
18. Hancu, G. and A. Modroiu, *Chiral Switch: Between Therapeutical Benefit and Marketing Strategy*. Pharmaceuticals, 2022. **15**(2).
19. Kocot, N., et al., *Leki chiralne—standard czy wyzwanie dla współczesnej farmacji? Rozważania o wybranych pochodnych kwasu 2-arylopropionowego*. Farm Pol, 2022. **78**(1): p. 29-37.
20. Agranat, I., H. Caner, and A. Caldwell, *Putting chirality to work: The strategy of chiral switches*. Nature Reviews Drug Discovery, 2002. **1**(10): p. 753-768.
21. Hutt, A.J., *The chiral switch: the development of single enantiomer drugs from racemates*. Universitas Comeniana. Acta Facultatis Pharmaceuticae, 2003. **50**: p. 7-23.
22. Calcaterra, A. and I. D'Acquarica, *The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018. **147**: p. 323-340.
23. Tucker, G.T., *Chiral switches*. The Lancet, 2000. **355**(9209): p. 1085-1087.
24. Gellad, W.F., et al., *Assessing the Chiral Switch: Approval and Use of Single-Enantiomer Drugs, 2001 to 2011*. American Journal of Managed Care, 2014. **20**(3): p. E90-E97.
25. Ghanem, A. and H.Y. Aboul-Enein, *Application of lipases in kinetic resolution of racemates*. Chirality, 2005. **17**(1): p. 1-15.
26. Thejashree, G.L., et al., *Kinetic and Dynamic Kinetic Resolution by Dual Catalysis*. European Journal of Organic Chemistry, 2022. **2022**(44).
27. Pellissier, H., *Recent developments in organocatalytic dynamic kinetic resolution*. Tetrahedron, 2016. **72**(23): p. 3133-3150.
28. Pellissier, H., *Dynamic kinetic resolution*. Tetrahedron, 2003. **59**(42): p. 8291-8327.
29. Choi, W.J., *Biotechnological production of enantiopure epoxides by enzymatic kinetic resolution*. Applied microbiology and biotechnology, 2009. **84**: p. 239-247.
30. Sikora, A., T. Siódmiak, and M.P. Marszałł, *Kinetic resolution of profens by enantioselective esterification catalyzed by Candida antarctica and Candida rugosa lipases*. Chirality, 2014. **26**(10): p. 663-669.

31. Singh, J. and P.S. Panesar, *Industrial enzymes: Basic information, assay, and applications*, in *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship*. 2023, Elsevier. p. 295-309.
32. Sheldon, R.A., A. Basso, and D. Brady, *New frontiers in enzyme immobilisation: robust biocatalysts for a circular bio-based economy*. Chemical Society Reviews, 2021. **50**(10): p. 5850-5862.
33. Wu, S.K., et al., *Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications*. Angewandte Chemie-International Edition, 2021. **60**(1): p. 88-119.
34. Bańkowski, E., *Biochemia*. Wydawnictwo Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2009.
35. Rodwell, V.W., et al., *Biochemia Harpera ilustrowana*. 2018: PZWL Wydawnictwo Lekarskie.
36. Frey, P.A. and A.D. Hegeman, *Enzymatic reaction mechanisms*. 2007: Oxford University Press.
37. Sheldon, R.A.A., D. Brady, and M.L.L. Bode, *The Hitchhiker's guide to biocatalysis: recent advances in the use of enzymes in organic synthesis*. Chemical Science, 2020. **11**(10): p. 2587-2605.
38. Devine, P.N., et al., *Extending the application of biocatalysis to meet the challenges of drug development*. Nature Reviews Chemistry, 2018. **2**(12): p. 409-421.
39. Zhang, Z.J., et al., *"Induced Fit-Lock and Key" Model in Enzymic Reactions*. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2011. **38**(5): p. 418-426.
40. Palmer, T. and P.L. Bonner, *4 - Specificity of Enzyme Action*, in *Enzymes (Second Edition)*, T. Palmer and P.L. Bonner, Editors. 2011, Woodhead Publishing. p. 67-75.
41. Skarydova, L., et al., *Enzyme stereospecificity as a powerful tool in searching for new enzymes*. Current drug metabolism, 2010. **11**(6): p. 547-559.
42. McDonald, A.G. and K.F. Tipton, *Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties*. The FEBS journal, 2014. **281**(2): p. 583-592.
43. Pera, L.M., et al., *Biotransformations*. 2008.
44. Ainsworth, S., *Michaelis-menten kinetics*, in *Steady-state enzyme kinetics*. 1977, Springer. p. 43-73.
45. Seibert, E. and T.S. Tracy, *Fundamentals of Enzyme Kinetics: Michaelis-Menten and Non-Michaelis-Type (Atypical) Enzyme Kinetics*. ENZYME KINETICS IN DRUG METABOLISM, 2 EDITION: Fundamentals and Applications, 2021. **2342**: p. 3-27.
46. Srinivasan, B., *A guide to the Michaelis–Menten equation: steady state and beyond*. The FEBS journal, 2022. **289**(20): p. 6086-6098.

47. Nagar, S., U.A. Argikar, and D.J. Tweedie, *Enzyme Kinetics in Drug Metabolism: Fundamentals and Applications*. Enzyme Kinetics in Drug Metabolism: Fundamentals and Applications, 2014. **1113**: p. 1-6.
48. Seibert, E. and T.S. Tracy, *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Enzyme Kinetics in Drug Metabolism: Fundamentals and Applications, 2014. **1113**: p. 9-22.
49. Waldrop, G.L., *A qualitative approach to enzyme inhibition*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2009. **37**(1): p. 11-15.
50. Hughes, G. and J.C. Lewis, *Introduction: biocatalysis in industry*. 2018, ACS Publications. p. 1-3.
51. Yang, M., et al., *Using ionic liquids in whole-cell biocatalysis for the nucleoside acylation*. Microbial Cell Factories, 2014. **13**(1): p. 1-11.
52. Bell, E.L., et al., *Biocatalysis*. Nature Reviews Methods Primers, 2021. **1**(1): p. 46.
53. Paiva, S.L., *Biocatalysis*. Nature Reviews Methods Primers, 2021. **1**(1).
54. Li, Z.Y., Z.L. Wu, and Y. Chen, *Evolution of industrialization of biocatalysis*. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2003. **23**(12): p. 1446-1451.
55. Huang, X.Q., M.F. Cao, and H.M. Zhao, *Integrating biocatalysis with chemocatalysis for selective transformations*. Current Opinion in Chemical Biology, 2020. **55**: p. 161-170.
56. Lima-Ramos, J., W. Neto, and J.M. Woodley, *Engineering of biocatalysts and biocatalytic processes*. Topics in Catalysis, 2014. **57**: p. 301-320.
57. Casas-Godoy, L., et al., *Lipases: an overview*. Lipases and phospholipases: methods and protocols, 2012: p. 3-30.
58. Jaeger, K.-E. and T. Eggert, *Lipases for biotechnology*. Current opinion in biotechnology, 2002. **13**(4): p. 390-397.
59. Sharma, R., Y. Chisti, and U.C. Banerjee, *Production, purification, characterization, and applications of lipases*. Biotechnology advances, 2001. **19**(8): p. 627-662.
60. Houde, A., A. Kademi, and D. Leblanc, *Lipases and their industrial applications: an overview*. Applied biochemistry and biotechnology, 2004. **118**: p. 155-170.
61. Chandra, P., et al., *Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review*. Microbial cell factories, 2020. **19**: p. 1-42.
62. Patel, N., et al., *Lipases: sources, production, purification, and applications*. Recent patents on biotechnology, 2019. **13**(1): p. 45-56.
63. Schmid, R.D. and R. Verger, *Lipases: interfacial enzymes with attractive applications*. Angewandte Chemie International Edition, 1998. **37**(12): p. 1608-1633.

64. Ghanem, A., *The utility of cyclodextrins in lipase-catalyzed transesterification in organic solvents: enhanced reaction rate and enantioselectivity*. *Organic & biomolecular chemistry*, 2003. **1**(8): p. 1282-1291.
65. Ghanem, A. and V. Schurig, *Dedicated to the Memory of Prof. E. Bayer – Lipase-catalyzed irreversible transesterification of secondary alcohols using isopropenyl acetate*. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, 2003. **134**: p. 1151-1157.
66. Ghanem, A. and V. Schurig, *Lipase-catalyzed access to enantiomerically pure (R)- and (S)-trans-4-phenyl-3-butene-2-ol*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003. **14**(1): p. 57-62.
67. Karadeniz, F., E. Bayraktar, and Ü. Mehmetoglu, *Kinetic resolution of racemic 1-phenyl 1-propanol by lipase catalyzed enantioselective esterification reaction*. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 2010. **38**(5): p. 288-293.
68. Ho, T.D., et al., *Ionic liquids in analytical chemistry: fundamentals, advances, and perspectives*. *Analytical chemistry*, 2014. **86**(1): p. 262-285.
69. Wasserscheid, P. and T. Welton, *Ionic liquids in synthesis*. Vol. 1. 2008: Wiley Online Library.
70. Kaur, G., H. Kumar, and M. Singla, *Diverse applications of ionic liquids: A comprehensive review*. *Journal of Molecular Liquids*, 2022. **351**: p. 118556.
71. Earle, M.J. and K.R. Seddon, *Ionic liquids. Green solvents for the future*. *Pure and applied chemistry*, 2000. **72**(7): p. 1391-1398.
72. Singh, S.K. and A.W. Savoy, *Ionic liquids synthesis and applications: An overview*. *Journal of Molecular Liquids*, 2020. **297**: p. 112038.
73. Ratti, R., *Ionic liquids: synthesis and applications in catalysis*. *Adv. Chem*, 2014. **2014**(3): p. 1-16.
74. Sowmiah, S., C.I. Cheng, and Y.H. Chu, *Ionic Liquids for Green Organic Synthesis*. *Current Organic Synthesis*, 2012. **9**(1): p. 74-95.
75. Lu, J., et al., *Synthesis, Purification and Recycling of Ionic Liquid*. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 2015. **12**(5): p. 435-448.
76. Alcalde, E., et al., *A simple halide-to-anion exchange method for heteroaromatic salts and ionic liquids*. *Molecules*, 2012. **17**(4): p. 4007-4027.
77. Silva, W., et al., *Revisiting ionic liquid structure-property relationship: A critical analysis*. *International journal of molecular sciences*, 2020. **21**(20): p. 7745.
78. Welton, T., *Ionic liquids: a brief history*. *Biophysical reviews*, 2018. **10**(3): p. 691-706.

79. Weingärtner, H., *Understanding ionic liquids at the molecular level: facts, problems, and controversies*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008. **47**(4): p. 654-670.
80. Dong, K., et al., *Multiscale studies on ionic liquids*. *Chemical Reviews*, 2017. **117**(10): p. 6636-6695.
81. Freemantle, M., *An introduction to ionic liquids*. 2010: Royal Society of chemistry.
82. Angell, C.A., N. Byrne, and J.-P. Belieres, *Parallel developments in aprotic and protic ionic liquids: physical chemistry and applications*. *Accounts of chemical research*, 2007. **40**(11): p. 1228-1236.
83. Peric, B., et al., *(Eco) toxicity and biodegradability of selected protic and aprotic ionic liquids*. *Journal of hazardous materials*, 2013. **261**: p. 99-105.
84. Greaves, T.L. and C.J. Drummond, *Protic ionic liquids: properties and applications*. *Chemical reviews*, 2008. **108**(1): p. 206-237.
85. Greaves, T.L. and C.J. Drummond, *Protic ionic liquids: evolving structure–property relationships and expanding applications*. *Chemical reviews*, 2015. **115**(20): p. 11379-11448.
86. Nuthakki, B., et al., *Protic ionic liquids and ionicity*. *Australian journal of chemistry*, 2007. **60**(1): p. 21-28.
87. Ghandi, K., *A review of ionic liquids, their limits and applications*. *Green and sustainable chemistry*, 2014. **2014**.
88. Castner, E.W. and J.F. Wishart, *Spotlight on ionic liquids*. *The Journal of chemical physics*, 2010. **132**(12).
89. Hough, W.L., et al., *The third evolution of ionic liquids: active pharmaceutical ingredients*. *New Journal of Chemistry*, 2007. **31**(8): p. 1429-1436.
90. Pernak, J., T. Rzemieniecki, and K. Materna, *O cieczach jonowych „w pigułce”(historia, właściwości i rozwój)*. *Chemik*, 2016. **70**(9): p. 471-480.
91. Roszak, R., et al., *Effect of chiral ionic liquids on palladium-catalyzed Heck arylation of 2, 3-dihydrofuran*. *Applied Catalysis A: General*, 2011. **409**: p. 148-155.
92. Llaver, M., et al., *Task-specific ionic liquids: Applications in sample preparation and the chemistry behind their selectivity*. *Advances in Sample Preparation*, 2022. **1**: p. 100004.
93. Ferraz, R., et al., *Ionic liquids as active pharmaceutical ingredients*. *ChemMedChem*, 2011. **6**(6): p. 975-985.
94. Shamshina, J.L., et al., *Chemistry: Develop ionic liquid drugs*. *Nature*, 2015. **528**(7581): p. 188-189.

95. Greer, A.J., J. Jacquemin, and C. Hardacre, *Industrial applications of ionic liquids*. *Molecules*, 2020. **25**(21): p. 5207.
96. Egorova, K.S., E.G. Gordeev, and V.P. Ananikov, *Biological activity of ionic liquids and their application in pharmaceuticals and medicine*. *Chemical Reviews*, 2017. **117**(10): p. 7132-7189.
97. Hallett, J.P. and T. Welton, *Room-temperature ionic liquids: solvents for synthesis and catalysis*. 2. *Chemical reviews*, 2011. **111**(5): p. 3508-3576.
98. Swatloski, R.P., et al., *Dissolution of cellulose with ionic liquids*. *Journal of the American chemical society*, 2002. **124**(18): p. 4974-4975.
99. Moshikur, R.M. and M. Goto, *Ionic liquids as active pharmaceutical ingredients (APIs), in Application of ionic liquids in drug delivery*. 2021, Springer. p. 13-33.
100. Uddin, M.N., et al., *Potential application of ionic liquids in pharmaceutical dosage forms for small molecule drug and vaccine delivery system*. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2020. **23**: p. 158-176.
101. Madeira Lau, R., et al., *Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids*. *Organic Letters*, 2000. **2**(26): p. 4189-4191.
102. Cull, S.G., et al., *Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations*. *Biotechnology and bioengineering*, 2000. **69**(2): p. 227-233.
103. Erbedinger, M., A.J. Mesiano, and A.J. Russell, *Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid– an alternative to enzymatic catalysis in organic solvents*. *Biotechnology progress*, 2000. **16**(6): p. 1129-1131.
104. Sun, P. and D.W. Armstrong, *Ionic liquids in analytical chemistry*. *Analytica chimica acta*, 2010. **661**(1): p. 1-16.
105. Chalupka, J., et al., *Bio-Approach for Obtaining Enantiomerically Pure Clopidogrel with the Use of Ionic Liquids*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023. **24**(13).
106. Kragl, U., M. Eckstein, and N. Kaftzik, *Enzyme catalysis in ionic liquids*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002. **13**(6): p. 565-571.
107. Van Rantwijk, F. and R.A. Sheldon, *Biocatalysis in ionic liquids*. *Chemical reviews*, 2007. **107**(6): p. 2757-2785.
108. Park, S. and R.J. Kazlauskas, *Biocatalysis in ionic liquids–advantages beyond green technology*. *Current opinion in Biotechnology*, 2003. **14**(4): p. 432-437.
109. Yang, Z. and W. Pan, *Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005. **37**(1): p. 19-28.

110. Jose, C., M.V. Toledo, and L.E. Briand, *Enzymatic kinetic resolution of racemic ibuprofen: past, present and future*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2016. **36**(5): p. 891-903.
111. Chen, C.S., et al., *QUANTITATIVE-ANALYSES OF BIOCHEMICAL KINETIC RESOLUTIONS OF ENANTIOMERS*. *Journal of the American Chemical Society*, 1982. **104**(25): p. 7294-7299.
112. Ghanem, A., *Lipase-catalyzed kinetic resolution of racemates: a versatile method for the separation of enantiomers*, in *Enantiomer Separation: Fundamentals and Practical Methods*, F. Toda, Editor. 2004, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 193-230.
113. Dwivedee, B.P., et al., *Lipase-catalyzed green synthesis of enantiopure atenolol*. *Rsc Advances*, 2015. **5**(21): p. 15850-15860.

13. SPIS RYCIN

Rycina 1 Rodzaje izomerii	13
Rycina 2 Izomery konstytucyjne [1]	14
Rycina 3 Izomery optyczne – enancjomery [1].....	14
Rycina 4 Konformacje R/S [7].....	15
Rycina 5 Leki dopuszczone do obrotu w latach 1991-2020 z wyłączeniem leków biologicznych [19].....	17
Rycina 6 Metody otrzymywania związków enancjomerycznie czystych [25]	20
Rycina 7 Klasyczny rozdział kinetyczny (k_R – stała szybkości reakcji enancjomeru R, k_S - stała szybkości reakcji enancjomeru S) [25]	21
Rycina 8 Dynamiczny rozdział kinetyczny (DKR); (k_R – stała szybkości reakcji enancjomeru R, k_S - stała szybkości reakcji enancjomeru S, k_{rac} – stała szybkości racemizacji) [25]	22
Rycina 9 Części składowe enzymu	26
Rycina 10 Wartość energii aktywacji reakcji przebiegającej bez udziału enzymu i z udziałem enzymu [34]	26
Rycina 11 Schemat powstawania kompleksu enzym-substrat (a) model zamka i klucza (b) model indukowanego dopasowania [40]	28
Rycina 12 Wzór międzynarodowego kodu enzymatycznego	29
Rycina 13 Równanie reakcji enzymatycznej	31
Rycina 14 Równanie Michaelisa-Menten, V_{max} – maksymalna szybkość reakcji, K_M – stała Michaelisa, $[S]$ – stężenie substratu.....	32
Rycina 15 Krzywa Michaelisa-Menten ilustrująca zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu. K_m – stała Michaelisa, V_{max} – szybkość maksymalna reakcji	32
Rycina 16 Wykres Lineweavera – Burka (wykres podwójnej odwrotności) [35]	33
Rycina 17 Schemat działania inhibitorów kompetycyjnych i inhibitorów niekompetycyjnych	35
Rycina 18 Liczba prac naukowych (artykuły, monografie, streszczenia konferencyjne, rozdziały) na podstawie bazy Web of Science (poszukiwania na podstawie słów kluczowych ionic liquid zawartych w tytule lub abstrakcie prac w okresie 1992-2022)	44
Rycina 19 Schemat otrzymywania cieczy jonowych: metoda jednoetapowa (1), metoda dwuetapowa (2) [72]	45
Rycina 20 Przykłady kationów tworzących ciecze jonowe [77].....	45

Rycina 21 Przykłady anionów tworzących cieczy jonowe [77].....	46
Rycina 22 Podział cieczy jonowych ze względu na budowę chemiczną kationu: amoniowe (a), fosfoniowe (b), sulfoniowe (c), oksoniowe (d).....	46
Rycina 23 Kationy heterocykliczne niearomatyczne (hybrydyzacja sp^3).....	47
Rycina 24 Kationy heterocykliczne aromatyczne (hybrydyzacja sp^2).....	47
Rycina 25 Generacje cieczy jonowych	50
Rycina 26 Wybrane dziedziny zastosowania cieczy jonowych [69].....	51
Rycina 27 Wzór wykorzystywany do obliczenia nadmiaru enancjomerycznego substratów, gdzie: ee_s - nadmiar enancjomeryczny substratów; R – pole powierzchni piku chromatograficznego uzyskanego podczas rozdzielania chromatograficznego dla enancjomeru R-(-); S - pole powierzchni piku chromatograficznego uzyskanego podczas rozdzielania chromatograficznego dla enancjomeru S-(+)	54
Rycina 28 Wzór wykorzystywany do obliczenia nadmiaru enancjomerycznego produktów, gdzie: ee_p - nadmiar enancjomeryczny produktów; R – pole powierzchni piku chromatograficznego uzyskanego podczas rozdzielania chromatograficznego dla enancjomeru R-(-); S - pole powierzchni piku chromatograficznego uzyskanego podczas rozdzielania chromatograficznego dla enancjomeru S-(+)	54
Rycina 29 Wzór służący do obliczenia enancjoselektywności z wykorzystaniem ee_s , gdzie: E – Enancjoselektywność; c - współczynnik konwersji [%]; ee_s - nadmiar enancjomeryczny substratów [%]	55
Rycina 30 Wzór służący do obliczenia enancjoselektywności z wykorzystaniem ee_p gdzie: E – Enancjoselektywność; c - współczynnik konwersji [%]; ee_p - nadmiar enancjomeryczny produktów [%]	55
Rycina 31 Wzór wykorzystywany do obliczenia współczynnika konwersji, gdzie: c – współczynnik konwersji [%]; ee_s - nadmiar enancjomeryczny substratów [%]; ee_p - nadmiar enancjomeryczny produktów [%]	55
Rycina 32 Rozdział kinetyczny (R,S)-atenololu	70
Rycina 33 Porównanie wartości nadmiarów enancjomerycznych produktów dla rozdziałów kinetycznych (R,S)-atenololu katalizowanych przez ponownie wykorzystane lipazy z <i>Candida rugosa</i> OF i MY	73
Rycina 34 Rozdział kinetyczny (R,S)-1-fenyletanolu	87
Rycina 35 Rozdział kinetyczny kwasu karboksylowego (R,S)-klopidogrelu	106

14. SPIS TABEL

Tabela 1 Przykłady potencjalnych zalet zastosowania zamiany chiralnej [18]	18
Tabela 2 Klasy enzymów [42]	30
Tabela 3 Różnice pomiędzy inhibitorem kompetycyjnym i inhibitorem niekompetycyjnym [34]	35
Tabela 4 Wybrane przykłady lipaz	39
Tabela 5 Reakcje katalizowane przez lipazy	41
Tabela 6 Aniony nieorganiczne wchodzące w skład cieczy jonowych [87]	48
Tabela 7 Parametry rozdziału kinetycznego (<i>R,S</i>)-atenololu z zastosowaniem różnych układów katalitycznych	71
Tabela 8 Systemy katalityczne poddane enancjoselektywnej biotransformacji (<i>R,S</i>)-1-fenyletanolu	87
Tabela 9 Systemy katalityczne poddane enancjoselektywnej biotransformacji kwasu karboksylowego (<i>R,S</i>)-klopidogrelu (ee_p – nadmiar enancjomeryczny produktów; ee_s – nadmiar enancjomeryczny substratów; c – konwersja; E – enancjoselektywność).....	105

15. OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW O UDZIALE W PUBLIKACJACH

mgr farm. Joanna Chałupka



Bydgoszcz, 09.08.2023

mgr farm. Joanna Chałupka
Katedra Chemii Leków
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

Oświadczam, że w publikacjach:

[P1]: **Joanna Chałupka**, Adam Sikora, A. Kozicka, Michał Piotr Marszałł. Overview : enzyme-catalyzed enantioselective biotransformations of chiral active compounds used in hypertension treatment, *Current Organic Chemistry* 2020, Vol. 24, nr 23, s. 2782-2791. DOI: 10.2174/1385272824999201020204256.

[P2]: **Joanna Chałupka**, Adam Sikora, Michał Piotr Marszałł. The utilization of two-phase catalytic system in enantioselective biotransformation of racemic atenolol, *Catalysts* 2022, 12(9), 1068. DOI: 10.3390/catal12091068.

[P3]: **Joanna Chałupka**, Jacek Dulęba, Adam Sikora, Tomasz Siódmiak, Michał Piotr Marszałł. The Application of Two-Phase Catalytic System in Enantioselective Separation of Racemic (R,S)-1-Phenylethanol, *Catalysts* 2023, 13(2), 292. DOI: 10.3390/catal13020292.

[P4]: **Joanna Chałupka**, Adam Sikora, Marta Ziegler-Borowska, Michał Piotr Marszałł. Bio-approach of obtaining enantiomerically pure clopidogrel with the use of ionic liquid, *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(13), 11124. DOI: 10.3390/ijms241311124.

mój wkład polegał na stworzeniu koncepcji badań i hipotezy badawczej, zaplanowaniu i wykonaniu badań, opracowaniu danych, przeglądzie piśmiennictwa, napisaniu manuskryptów, wprowadzeniu poprawek, przygotowaniu manuskryptów do recenzji, zapewnieniu integralności pracy.

UNIwersytet MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Wydział Farmaceutyczny ul. Jagiellońska 13-15, 85-067 Bydgoszcz, Polska
tel. +48 52 585 34 00, e-mail: dziekfarm@cm.umk.pl
www.cm.umk.pl

prof. dr hab. Michał Marszał



Bydgoszcz, 09.08.2023

prof. dr hab. Michał Marszał
Katedra Chemii Leków
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

Oświadczam, że w publikacjach:


[P1]: Joanna Chałupka, Adam Sikora, A. Kozicka, **Michał Piotr Marszał**. Overview : enzyme-catalyzed enantioselective biotransformations of chiral active compounds used in hypertension treatment, *Current Organic Chemistry* 2020, Vol. 24, nr 23, s. 2782-2791.
DOI: 10.2174/1385272824999201020204256.

[P2]: Joanna Chałupka, Adam Sikora, **Michał Piotr Marszał**. The utilization of two-phase catalytic system in enantioselective biotransformation of racemic atenolol, *Catalysts* 2022, 12(9), 1068. DOI: 10.3390/catal12091068.

[P3]: Joanna Chałupka, Jacek Dulęba, Adam Sikora, Tomasz Siódmiak, **Michał Piotr Marszał**. The Application of Two-Phase Catalytic System in Enantioselective Separation of Racemic (R,S)-1-Phenylethanol, *Catalysts* 2023, 13(2), 292. DOI: 10.3390/catal13020292.

[P4]: Joanna Chałupka, Adam Sikora, Marta Ziegler-Borowska, **Michał Piotr Marszał**. Bio-approach of obtaining enantiomerically pure clopidogrel with the use of ionic liquid, *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(13), 11124.
DOI: 10.3390/ijms241311124.

wkład mojej pracy związany był z opieką nad doktorantką i dotyczył konsultacji merytorycznych oraz korekty manuskryptów.

Kierownik
Katedry Chemii Leków

prof. dr hab. Michał Marszał

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Wydział Farmaceutyczny ul. Jagiellońska 13-15, 85-067 Bydgoszcz, Polska
tel. +48 52 585 34 00, e-mail: dziekfarm@cm.umk.pl
www.cm.umk.pl

dr n. farm. Adam Sikora



Bydgoszcz, 09.08.2023

dr n. farm. Adam Sikora
Katedra Chemii Leków
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

Oświadczam, że w publikacjach:

[P1]: Joanna Chałupka, **Adam Sikora**, A. Kozicka, Michał Piotr Marszałł. Overview : enzymecatalyzed enantioselective biotransformations of chiral active compounds used in hypertension treatment, *Current Organic Chemistry* 2020, Vol. 24, nr 23, s. 2782-2791. DOI: 10.2174/1385272824999201020204256.

[P2]: Joanna Chałupka, **Adam Sikora**, Michał Piotr Marszałł. The utilization of two-phase catalytic system in enantioselective biotransformation of racemic atenolol, *Catalysts* 2022, 12(9), 1068. DOI: 10.3390/catal12091068.

[P3]: Joanna Chałupka, Jacek Dulęba, **Adam Sikora**, Tomasz Siódmiak, Michał Piotr Marszałł. The Application of Two-Phase Catalytic System in Enantioselective Separation of Racemic (R,S)-1-Phenylethanol, *Catalysts* 2023, 13(2), 292. DOI: 10.3390/catal13020292.

[P4]: Joanna Chałupka, **Adam Sikora**, Marta Ziegler-Borowska, Michał Piotr Marszałł. Bio-approach of obtaining enantiomerically pure clopidogrel with the use of ionic liquid, *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(13), 11124. DOI: 10.3390/ijms241311124.

mój wkład dotyczył konsultacji merytorycznych oraz korekty manuskryptów.

dr Adam Sikora

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Wydział Farmaceutyczny ul. Jagiellońska 13-15. 85-067 Bydgoszcz, Polska
tel. +48 52 585 34 00, e-mail: dziekfarm@cm.umk.pl
www.cm.umk.pl

dr n. farm. Tomasz Siódmiak



Bydgoszcz, 09.08.2023

dr n. farm. Tomasz Siódmiak
Katedra Chemii Leków
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

Oświadczam, że w publikacji:

[P3]: Joanna Chałupka, Jacek Dulęba, Adam Sikora, **Tomasz Siódmiak**, Michał Piotr Marszałł.
The Application of Two-Phase Catalytic System in Enantioselective Separation of Racemic
(*R,S*)-1-Phenylethanol, *Catalysts* 2023, 13(2), 292. DOI: 10.3390/catal13020292.

mój wkład dotyczył konsultacji naukowych oraz korekty manuskryptu.

dr Tomasz Siódmiak

mgr farm. Jacek Dulęba



Bydgoszcz, 09.08.2023

mgr farm. Jacek Dulęba
Katedra Chemii Leków
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

Oświadczam, że w publikacji:

[P3]: Joanna Chałupka, **Jacek Dulęba**, Adam Sikora, Tomasz Siódmiak, Michał Piotr Marszałł.
The Application of Two-Phase Catalytic System in Enantioselective Separation of Racemic (*R,S*)-
1-Phenylethanol, *Catalysts* 2023, 13(2), 292. DOI: 10.3390/catal13020292.

mój wkład obejmował opracowanie metodologii analizy HPLC oraz częściową realizację prac badawczych.

Jacek Dulęba

dr hab. Marta Ziegler-Borowska



Dr hab. Marta Ziegler-Borowska
Wydział Chemii UMK
Katedra Chemii Biomedycznej i Polimerów
Zespół Chemii Medycznej

Toruń, 09.08 2023r.

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

Oświadczam, że w publikacji:

[P4]: Joanna Chałupka, Adam Sikora, Marta Ziegler-Borowska, Michał Piotr Marszałł. Bio-approach of obtaining enantiomerically pure clopidogrel with the use of ionic liquid, *International Journal of Molecular Sciences*, **2023**, 24(13), 11124. DOI: 10.3390/ijms241311124.

mój wkład obejmował konsultacje naukowe.

Marta Ziegler-Borowska

mgr farm. Aleksandra Kozicka

Cambridge, 09.08.2023

mgr farm. Aleksandra Kozicka
Department of Medical Genetics
University in Cambridge
Lv 6 Addenbrooke's Treatment Centre
Cambridge, United Kingdom

Oświadczenie współautora o udziale w publikacji

Oświadczam, że w publikacji:

[P1]: Joanna Chałupka, Adam Sikora, **Aleksandra Kozicka**, Michał Piotr Marszałł. Overview :
enzyme-catalyzed enantioselective biotransformations of chiral active compounds used in
hypertension treatment, *Current Organic Chemistry* 2020, Vol. 24, nr 23, s. 2782-2791.
DOI: 10.2174/1385272824999201020204256.

mój udział obejmował częściowy przegląd literatury naukowej.

Kozicka Aleksandra

16. ZAŚWIADCZENIA O UDZIALE W GRANTACH

PRELUDIUM 17



Bydgoszcz, 01.08.2023

dr n. farm. Adam Sikora
Katedra Chemii Leków
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

ZAŚWIADCZENIE

Zaświadczam, że Pani mgr Joanna Chałupka wykonywała prace badawcze w ramach projektu pt.: „Nowe pochodne klopidogrelu - enancjoselektywna biosynteza oraz aktywność przeciwplytkowa in vitro”, którego byłem kierownikiem. Projekt uzyskał finansowanie Narodowego Centrum Nauki na lata 2018-2021 w ramach konkursu PRELUDIUM 14 (nr: 2017/27/N/NZ7/02424).

Adiunkt
Katedry Chemii Leków
dr Adam Sikora

A handwritten signature in blue ink that reads "Adam Sikora".

DOROBEK NAUKOWY DOKTORANTKI

I. Zestawienie pełnego wykazu działalności naukowej

Publikacje	7
Publikacje w języku angielskim	7
Publikacje w języku polskim	0
Publikacje jako pierwszy autor	4
Sumaryczny IF	27.463
Sumaryczna punktacja MEiN	750
Konferencje krajowe	8
Konferencje zagraniczne	2
Referaty:	6
Postery:	6
ORCID:	0000-0003-3045-5703
Web of Science:	ABE-2036-2020
Liczba cytowań	
Web of Science*	38
Scopus *	39
Google Scholar*	49
Hirsh index	
Web of Science*	2
Scopus*	2
Google Scholar*	3

*dane na dzień 28.08.2023

II. Publikacje niebędące przedmiotem rozprawy doktorskiej

1. Sikora A., Tarczykowska A., **Chalupka J.**, Marszał M.P., Kinetic resolution of a β -adrenolytic drug with the use of lipases as enantioselective biocatalysts, *Medical Research Journal*, 2018, 3(1), 38-42. DOI: 10.5603/MRJ.2018.0007.

IF: X , Punktacja MEiN₂₀₁₈: 100

2. Piechowska K., Świtalska M., Cytarska J., Jaroch K., Łuczykowski K., **Chalupka J.**, Wietrzyk J., Misiura K., Bojko B., Kruszewski S., Łączkowski K.Z., Discovery of tropinone-thiazole derivatives as potent caspase 3/7 activators, and noncompetitive tyrosinase inhibitors with high antiproliferative activity : rational design, one-pot tricomponent synthesis, and lipophilicity determination, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 175, 162-171. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.05.006.

IF₂₀₁₉: 5.572 , Punktacja MEiN₂₀₁₉: 140

3. Sikora A., **Chalupka J.**, Marszał M.P., The Use of Ion Liquids as a Trojan Horse Strategy in Enzyme-Catalyzed Biotransformation of (*R,S*)-Atenolol, *Catalysts*, 2020, 10(7), 787. DOI: 10.3390/catal10070787.

IF₂₀₂₀: 4.501 , Punktacja MEiN₂₀₂₀: 100

Suma punktacji prac nieobjętych rozprawą doktorską (zgodnie z rokiem wydania publikacji):

Impact Factor: 10.073 , Punktacja MEiN: 340

III. Udział w konferencjach – plakaty

- 1. Temat:** Synthesis of sulphanyl porphyrazines with bulky phthalimide substituents in the periphery synergic effect with nanostructural components for catalytical properties
Autorzy: Michał Falkowski, T. Rebis, Ł. Popena, J. Piskorz, Jacek Dulęba, **Joanna Chałupka**, G. Milczarek, Michał P. Marszałł
Konferencja: 18th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry
Miejsce i data: Lubljana, Słowenia, 18.09.2019 – 21.09.2019
- 2. Temat:** Zastosowanie dwufazowych układów katalitycznych w enancjoselektywnych biotransformacjach środków leczniczych
Autorzy: **Joanna Chałupka**, Adam Sikora, Michał Piotr Marszałł
Konferencja: XII Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce - Badania i Rozwój
Miejsce i data: Poznań, 16.11.2020
- 3. Temat:** Wpływ cieczy jonowych jako środowiska reakcji w rozdziale kinetycznym racemicznego atenololu
Autorzy: **Joanna Chałupka**, Adam Sikora, Michał Piotr Marszałł
Konferencja: XIII Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce - Badania i Rozwój
Miejsce i data: Poznań, 22.03.2021
- 4. Temat:** Ciecze jonowe jako środowisko reakcji dla rozdziału kinetycznego (*R,S*)-klopidogrelu
Autorzy: **Joanna Chałupka**, Adam Sikora, Michał Marszałł
Konferencja: XIV Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce - Badania i Rozwój
Miejsce i data: Poznań, 26.11.2022
- 5. Temat:** Zastosowanie cieczy jonowych w enancjoselektywnej biotransformacji (*R,S*)-klopidogrelu
Autorzy: **Joanna Chałupka**, Adam Sikora, Michał Piotr Marszałł
Konferencja: Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców Analiza Zagadnienia, Analiza Wyników – Wystąpienie Młodego Naukowca Edycja IV
Miejsce i data: Kraków, 05.03.2022- 06.03.2022

6. **Temat:** The effect of commercially available DPIs on respiratory drug aerosolization
Autorzy: Joanna Chalupka, Adam Sikora, Michał Piotr Marszałł
Konferencja: 7th Edition of Global Conference on Pharmaceutics and Novel Drug Delivery Systems. PDDS 2022.
Miejsce i data: Paryż, Francja, 08.09.2022-09.09.2022

IV. Udział w konferencjach – referaty

1. **Temat:** Rozdział kinetyczny racemicznych form substancji czynnych w dwufazowych układach katalitycznych z wykorzystaniem lipaz jako enancjoselektywnych biokatalizatorów
Autorzy: Joanna Chalupka, Adam Sikora, Michał Piotr Marszałł
Konferencja: Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców Analiza Zagadnienia, Analiza Wyników – Wystąpienie Młodego Naukowca Edycja IV
Miejsce i data: Kraków, 05.03.2022- 06.03.2022
2. **Temat:** Rozdział kinetyczny (*R,S*)-atenololu z wykorzystaniem lipaz z *Candida rugosa* jako enancjoselektywnych biokatalizatorów
Autorzy: Joanna Chalupka, Adam Sikora, Michał Piotr Marszałł
Konferencja: Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn: "ALFA I OMEGA CZ. VI"
Miejsce i data: Kraków, 17.03.2022-18.03.2022
3. **Temat:** Application of ionic liquids in enantioselective biotransformations of pharmaceutical active substances
Autorzy: Joanna Chalupka, Adam Sikora, Michał Piotr Marszałł
Konferencja: National Scientific Conference "e-Factory of Science". 7th edition
Miejsce i data: Łódź, 09.04.2022
4. **Temat:** Optimization of catalytic systems in the obtaining of (s)-1-(isopropylamino)-3-phenoxy-2-propanol
Autorzy: Joanna Chalupka, Adam Sikora, Michał Piotr Marszałł
Konferencja: National Scientific Conference "Understand the science". VI edition
Miejsce i data: Łódź, 17.09.2022

5. **Temat:** Future needs for inhaled drug delivery
Autorzy: Adam Sikora, **Joanna Chalupka**, Michał Piotr Marszałł
Konferencja: 7th Edition of Global Conference on Pharmaceutics and Novel Drug Delivery Systems. PDDS 2022
Miejsce i data: Paryż, Francja, 08.09.2022-09.09.2022

6. **Temat:** The cotinine concentration in urine, anthropometrical data and selected clinical variables in hospitalised patients due to alcohol dependence
Autorzy: Damian Czarnecki, Anna Długosz, Adam Sikora, **Joanna Chalupka**, Michał Zaborowski, Julia Cukrowska, Michał Marszałł, Marcin Ziółkowski
Konferencja: International Conference on Chemical and Behavioral Addictions
Miejsce i data: Poznań, 09.03.2023-11.03.2023

V. **Udział w projektach badawczych**

1. Chromatografia w analityce farmaceutycznej i biomedycznej – nr WF471, Podstawowa Działalność Statutowa, Katedra Chemii Leków, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu - **wykonawca**
Okres realizacji projektu: 2018 - 2023

2. Projekt „Nowe pochodne klopidogrelu – enancjoselektywna biosynteza oraz aktywność przeciwpłytkowa in vitro” finansowany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM 14, nr rejestracyjny: 2017/27/N/NZ7/02424 – **wykonawca**
Okres realizacji projektu: 01.01.2018 – 31.12.2020

3. Projekt „NEED: design emisji dawki inhalatorów suchego proszku” finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach XII programu LIDER, nr. LIDER /52/0276/L-12/20/NCBR/2021 - **wykonawca (specjalista ds. analityki)**
Okres realizacji projektu: 01.01.2022 – 31.12.2024

4. Projekt: „Xhaller Main - uniwersalny inhalator suchego proszku do administracji leków wziewnych". Projekt realizowany w ramach konkursu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju: Szybka Ścieżka 2/1.1.1/2019 - **wykonawca (specjalista ds. analityki)**
Okres realizacji projektu: 01.02.2020 – 31.03.2022

VI. Współpraca

1. Katedra Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu
Lata: 2018-2019
2. Department of Medical Genetics, University in Cambridge, Lv 6 Addenbrooke's Treatment Centre, Cambridge, United Kingdom
Lata: 2019-2020
3. Katedra Chemii Biomedycznej i Polimerów, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Lata: 2022-2023

VII. Kursy, szkolenia, warsztaty

1. **Temat:** Pharmacovigilance Basis for Students, Graduates and Academics. Certificate No. PL 25/S0091/2021.
Miejsce i data: Online, 09.10.2021
2. **Temat:** Basic principles of Regulatory Affairs for medicinal products, veterinary products with elements of pharmacovigilance
Miejsce i data: Warszawa, 19.02.2022 (online)
3. **Temat:** Regulatory and Pharmacovigilance Documentation for medicinal and veterinary products
Miejsce i data: Warszawa, 20.02.2022 (online)
4. **Temat:** Przygotowanie próbek: przydatne wskazówki dotyczące procesu oczyszczania - PL
Miejsce i data: Online, 07.10.2022
5. **Temat:** Szkolenie aplikacyjne dotyczące pracy z systemem SHIMADZU LC-MS- 8045 oraz oprogramowaniem LabSolutions zorganizowanym przez firmę SHIM-POL A.M. Borzymowski
Miejsce i data: Bydgoszcz, 17.01.2021 – 18.01.2021

6. **Temat:** Szkolenie aplikacyjne dotyczące pracy z systemem SHIMADZU LCMS IT-TOF oraz oprogramowaniem LC-Solutions zorganizowanym przez firmę SHIM-POL A.M. Borzymowski
Miejsce i data: Bydgoszcz, 26.01.2022 - 27.01.2022
7. **Temat:** Wymagania normy ISO 9001:2015. Szkolenie nr 1872/03/2016 zorganizowane przez TÜV NORD Polska Sp.z o.o.
Miejsce i data: Katowice, 30.03.2016
8. **Temat:** Auditor wewnętrzny Systemu Zarządzania Jakością wg ISO 9001:2015. Certyfikat nr 5976/11/2016.
Miejsce i data: Katowice, 07.11.2016 - 09.11.2016

VIII. Nagrody o zasięgu uczelnianym

1. Stypendium Rektora dla najlepszych doktorantów Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum UMK w Toruniu: 2020/2021, 2021/2022, 2022/2023
2. Stypendium Projakościowe dla doktorantów: 2019/2020, 2020/2021, 2021/2022, 2022/2023
3. Stypendium doktoranckie: 2018/2019, 2019/2020, 2020/2021, 2021/2022, 2022/2023
4. Stypendium dla doktorantów w ramach programu “Inicjatywa doskonałości – uczelnia badawcza” IDUB: 2020/2021

IX. Inne

1. Członek Wydziałowej Komisja Programowa dla kierunku farmacja na kadencję 2020-2024