



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Procesos Biocatalíticos Sostenibles en Líquidos
Iónicos Tipo Esponja**

**Dña. Celia Gómez García
2017**

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Escuela Internacional de Doctorado

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B
e Inmunología

Procesos Biocatalíticos Sostenibles en Líquidos
Iónicos Tipo Esponja

TESIS DOCTORAL

Celia Gómez García

DIRECTOR

D. Pedro Lozano Rodríguez

Murcia, 2017



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Pedro Lozano Rodríguez, Catedrático de Universidad del Área de Bioquímica y Biología Molecular en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Procesos Biocatalíticos Sostenibles en Líquidos Iónicos Tipo Esponja", realizada por D. Celia Gómez García, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 7 de Abril de 2017

Firmante: PEDRO LOZANO RODRIGUEZ; Fecha-hora: 06/04/2017 08:30:36; Emisor del certificado: CN=AC FNMT Usuarios,OU=Ceres,O=FNMT-RCM,C=ES;



Mod.T-20

Código seguro de verificación: RUxFMr/K-Ph3B8vbH-9NBHFSAD-n8OwJzL7

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 2 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos: CTQ-2011-28903; CTQ-2015-67927-R, (MINECO/FEDER) y 19278/PI/14 (Fundación SENECA CARM).

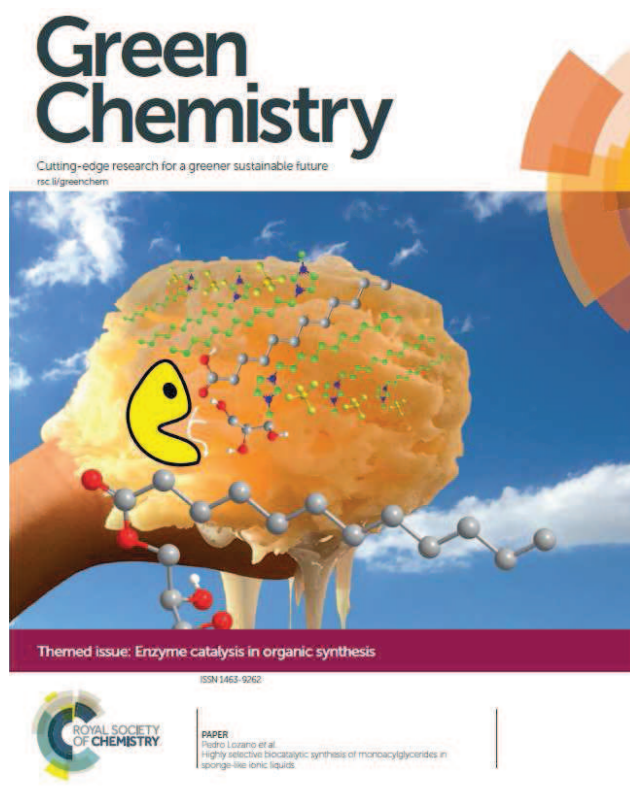
Parte de los resultados de investigación contenidos en la presente Memoria han sido objeto de las siguientes publicaciones:

Pedro Lozano, Juana M. Bernal, Susana Nieto, Celia Gómez, Eduardo García-Verdugo, Santiago V. Luis. **2015**. “Active biopolymers in green non-conventional media: A sustainable tool for developing clean chemical processes”. *Chemical Communications*, vol. 51, p. 17361-17374.

Pedro Lozano, Juana M. Bernal, Celia Gómez, Eduardo García-Verdugo, M. Isabel Burguete, Gregorio Sánchez-Gómez, Michel Vaultier, Santiago V. Luis. **2015**. “Green bioprocesses in sponge-like ionic liquids”. *Catalysis Today*, vol. 255, p. 54-59.

Pedro Lozano, Celia Gómez, Ángel Nicolás, Ramón Polo, Susana Nieto, Juana M. Bernal, Eduardo García-Verdugo, Santiago V. Luis. **2016**. “Clean enzymatic preparation of oxygenated biofuels from vegetable and waste cooking oils by using sponge-like ionic liquids technology”. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, vol. 4 (11), p. 6125–6132.

Pedro Lozano, Celia Gómez, Susana Nieto, Gregorio Sánchez-Gómez, Eduardo García-Verdugo, Santiago V. Luis. **2017**. “Highly selective biocatalytic synthesis of monoacylglycerides in Sponge-Like Ionic Liquids”. *Green Chemistry*, vol. 19, p. 390–396.



Congresos:

Pedro Lozano, Juana M. Bernal, Celia Gómez, Antonio G. Jara, María J. López, Gregorio Sánchez-Gómez. **2014**. “Sponge-Like Ionic Liquids: Switchable green solvents for biocatalysis and extraction”. 7th Green Solvents Conference. Dresden (Alemania).

Pedro Lozano, Juana M. Bernal, Celia Gómez, Gregorio Sánchez-Gómez. **2015**. “Procesos biocatalíticos verdes en Líquidos Iónicos Tipo Esponja”. 1ª Jornadas Españolas de biocatálisis, Madrid.

Pedro Lozano, Celia Gómez, Juana M. Bernal, Susana Nieto, Gregorio Sánchez-Gómez, José L. Serrano, Eduardo García-Verdugo, Santiago V. Luis. **2015**. “Ionic liquids and supercritical carbon dioxide: a good marriage for developing clean (bio) catalytic processes”, Canada.

Celia Gómez, Juana M. Bernal, José Luis Serrano, Gregorio Sánchez-Gómez, Pedro Lozano. **2015**. “Síntesis enzimática de biodiesel en líquidos iónicos con comportamiento esponja”. I Jornadas doctorales. Universidad de Murcia.

Celia Gómez, Susana Nieto, Juana M. Bernal, Gregorio Sánchez-Gómez, José L. Serrano, Eduardo García-Verdugo, Pedro Lozano. **2016**. “Síntesis enzimática de Monooleato de glicerilo en líquidos iónicos con comportamiento esponja”, Salamanca.

Susana Nieto, Celia Gómez, Javier Abrisqueta, Juana M. Bernal, Gregorio Sánchez-Gómez, José L. Serrano, Pedro Lozano. **2016**. “Toward Chemo Enzymatic transformation of (R,S)-1-Phenylethanol in Sponge like Ionic Liquids”, Salamanca.

Pedro Lozano, Celia Gómez, Juana M. Bernal, Susana Nieto, Gregorio Sánchez-Gómez. **2016**. “More on Green Chemical Processes in Sponge-like Ionic liquids: The clean Production of Monoacylglycerols”. 8th Green Solvents Conference. Dresden (Alemania).

Celia Gómez García, Susana Nieto Cerón, Ángel Nicolás Saavedra, Gregorio Sánchez-Gómez, Pedro Lozano. **2016**. “Síntesis enzimática de biodiesel en líquidos iónicos con comportamiento esponja”. Bioenergía. Universidad de Murcia.

Susana Nieto Cerón, Celia Gómez García, Ángel Nicolás Saavedra, Gregorio Sánchez-Gómez, Pedro Lozano. **2016**. “Líquidos iónicos: estrategia para la síntesis de glicerol monolaurato energéticamente sostenible”. Bioenergía. Universidad de Murcia.

Celia Gómez, Juana M. Bernal, Pedro Lozano. **2016**. “Síntesis enzimática de monooleato de glicerilo en líquidos iónicos con comportamiento esponja”. II Jornadas doctorales. Universidad de Murcia.

Ángel Nicolás, Susana Nieto, Celia Gómez, Gregorio Sánchez-Gómez, Pedro Lozano. **2016**. “Síntesis enzimática de biocombustibles oxigenados en líquidos iónicos tipo esponja”. Bioenergía. Universidad de Murcia.

Celia Gómez, Susana Nieto, Juana M. Bernal, Gregorio Sánchez-Gómez, Eduardo García verdugo, Santiago V. Luis, Pedro Lozano. **2017**. “Síntesis sostenible de monoacilglicéridos mediante catálisis enzimática en líquidos iónicos tipo esponja”. III Jornadas Doctorales.

A mi padre, corazón gigante de sabiduría y amor

Agradecimientos

“Lo esencial es invisible para los ojos”

El príncipito

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de un gran número de personas, a las que quisiera expresar mi más sincero agradecimiento:

En primer lugar, debo agradecer a mi director de Tesis D. Pedro Lozano Rodríguez. Infinitas gracias por confiar en mí desde el primer momento, gracias por abrirme las puertas del laboratorio como si fuera mi casa y gracias por permitirme aprender y disfrutar de la ciencia y la investigación haciéndome partícipe de tantas cosas.

En segundo lugar, agradezco a D^a. Juana María Bernal Palazón porque más que una co-directora se ha convertido en una amiga. Gracias por tu apoyo, por tu ayuda incondicional, por acompañarme en este viaje porque no podía tener mejor guía que tú.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio: a Bere, porque recuerdo el primer día que fuiste la primera en hablarme y ayudarme. A J. María, Ana, Julia, Antonio, Ramón...por compartir conmigo más de un ratico. Pero sobre todo gracias a Susana, David y Mariajo por su ayuda incondicional, por su apoyo e interés en que pudiera terminar con este trabajo y sobre todo por su amistad. Gracias por todos los momentos vividos y los que nos quedan...

A mis familiares, amigas y todos los que de una manera u otra han estado a mi lado estos años.

A mis cuñadas por darme junto a mis hermanos, mis sobrinos...pequeños corazones que alegran la vida, que tienen la magia de transformar todo lo malo en bueno, inundando de felicidad cada paso que dan.

Pero mi más profundo agradecimiento va dirigido a mis padres, porque todo lo que soy se lo debo a ellos. Gracias por apostar por mi carrera, por cada meta que me he propuesto. Gracias por vuestra ayuda sin recibir nada a cambio, por cada sonrisa cada vez que he conseguido algo, porque esa alegría era de sobra más alegría para vosotros. Gracias por permitirme crecer y estudiar rodeada de buenos valores e inculcándome la mejor educación para ser ante todo una buena persona. Gracias por la ayuda

incondicional con Juanjo...para el recuerdo queda nuestro viaje a Salamanca. Gracias a la vida por vosotros, por ser vuestra hija.

“Te espero...No estoy lejos, justo del otro lado del camino...”

En mi familia, entran mis hermanos como punto primordial. Gracias a ellos por el cariño y amor recibido, por sentirlos tan cerca cuando me pasa algo, porque a vuestro lado los miedos se vuelven amigos, porque son los guerreros de mi vida y siempre muestro mi orgullo a vosotros.

Y por último gracias a mi Guille, sin ti nada hubiera sido posible. Hemos tenido momentos de todo tipo a lo largo de esta tesis, pero hemos salido adelante luchando sin cesar, gracias por quererme y por cuidar de mí. Gracias porque tenemos lo más bonito de la vida, Juanjo.

RESUMEN

La búsqueda de procesos químicos económica y medioambientalmente sostenibles, basados en el desarrollo de síntesis catalíticas eficientes combinadas con nuevas estrategias de separación de los productos, son elementos claves en el desarrollo de la industria química del futuro inmediato, ya que conducen a un ahorro significativo en los costos de producción, así como a la minimización de los impactos ambientales. En este contexto, resulta fundamental la sustitución de los disolventes orgánicos volátiles por disolventes no volátiles y/o recuperables en su totalidad (i.e., líquidos iónicos, $scCO_2$), así como el empleo de biocatalizadores heterogéneos, que permiten su reutilización, proporcionando altas selectividades de reacción, y por lo tanto la no generación de productos secundarios, con lo que evitan costosas etapas de purificación, además de facilitar la integración de las etapas de transformación y de separación.

La Química Verde tiene como objetivo principal mantener y preservar el ambiente para beneficio de la sociedad. La idea fundamental, aplicada a los procesos químicos que nos permiten generar bienes de consumo, es no generar sustancias peligrosas y transformar las que ya se generan en compuestos menos peligrosos. Claramente es un objetivo que no puede lograrse en una sola etapa. Los procesos químicos incluyen una serie de pasos mediante los cuales las sustancias se transforman progresivamente para obtener el producto deseado. Sin embargo, en el proceso se utilizan disolventes que pueden ser muy agresivos con el ambiente e igualmente se generan compuestos, que llegan a ser sumamente tóxicos y de difícil tratamiento. En este sentido, la Química Verde tiene un conjunto de postulados que, si bien no nos dicen cómo hacerlo, sí nos indican la forma más deseable de llevarlo a cabo.

Los disolventes, que se usan generalmente como materiales auxiliares en síntesis química, actúan como medios para la reacción, el transporte y la separación del producto. La gran mayoría de los disolventes utilizados en los laboratorios académicos e industriales son líquidos moleculares, pertenecientes al grupo de los compuestos orgánicos volátiles, y donde su recuperación nunca puede ser total, y su reutilización se asocia a menudo con procesos de destilación que requieren de mucha energía. Sin embargo, la sustitución y/o eliminación de los mismos no es una tarea fácil, ya que por su funcionalidad resultan ser elementos clave en los procesos químicos.

En este sentido, la necesidad de crear una industria química más respetuosa con el medio ambiente ha centrado la atención en el uso de medios de reacción alternativos, y de nuevas estrategias sintéticas. Estos disolventes alternativos (i.e., líquidos iónicos), presentan como característica común la posibilidad de ser recuperados y reutilizados en su totalidad, razón por la que su explotación como alternativa a los disolventes orgánicos está, hoy en día, en máxima vanguardia.

Los líquidos iónicos (ILs), son sales que están completamente compuestas de iones y que son líquidas a temperaturas inferiores a 100°C. En contraste con los disolventes orgánicos convencionales, los ILs tienen muchas propiedades favorables incluyendo una presión de vapor extremadamente baja, baja inflamabilidad, alta conductividad iónica y térmica, buena potencia de disolución hacia muchos sustratos, alta estabilidad térmica y química y amplias propiedades electroquímicas. Las propiedades físicas y químicas de un líquido iónico pueden ser modulables en función del catión y del anión que lo conformen, existiendo numerosas combinaciones posibles (hasta 1018). Entre los cationes más comunes se encuentran los de imidazolio, piridinio, amonio, pirrolidinio y fosfonio, mientras que los aniones más comunes son: bis[(trifluorometil)sulfonyl]imida (NTf_2^-), hexafluorofosfato (PF_6^-), trifluorometilsulfonato (CF_3SO_3^-) y haluros.

No obstante, los objetivos de la Química Verde van mucho más allá de reemplazar los disolventes peligrosos por otros medioambientalmente benignos. La selectividad de los procesos catalíticos es igual de importante, debido a la necesidad de evitar reacciones y/o subproductos no deseados, y facilitar la recuperación de los productos. El empleo de catalizadores en los procesos químicos, en lugar de usar reacciones estequiométricas, es uno de los principios de la Química Verde. Los catalizadores son agentes químicos que disminuyen la energía necesaria para que un proceso ocurra, permitiendo que éste se lleve a cabo en una menor escala de tiempo, es decir, aceleran las reacciones. Además, un catalizador se emplea en concentraciones subestequiométricas y no se consume en el proceso. En los procesos químicos se utilizan muchos catalizadores de diversas naturalezas, mientras que en los sistemas biológicos los catalizadores son proteínas, llamadas enzimas.

Las enzimas son los catalizadores biológicos naturales de los procesos químicos que hacen posible la vida. Estas proteínas catalíticas evolucionaron para desarrollar su función en un medio compatible con la vida, como agua y membranas lipídicas. Estos catalizadores también se pueden utilizar para acelerar reacciones químicas fuera de su

ámbito biológico. De hecho, ya participan en varios procesos químicos en los que sus propiedades son deseadas, ya que presentan actividad en medios no acuosos, como disolventes orgánicos o líquidos iónicos. Es por ello, que la biocatálisis, o catálisis enzimática, consiste en el uso de enzimas para catalizar las reacciones químicas, donde los niveles de selectividad proporcionados son del máximo nivel. Su empleo ofrece otras ventajas sobre los métodos químicos tradicionales ya que se consigue aumentar la velocidad de la reacción química con una menor cantidad de enzima frente a la empleada con catalizadores tradicionales, permitiendo disminuir el gasto de energía y los costes del proceso. Actualmente los desarrollos científicos trabajan en su implementación en diferentes áreas de la síntesis química, como es el diseño de nuevos fármacos, el desarrollo de alimentos, o la obtención de productos y procesos químicos más eficientes, ecológicos y rentables. No obstante, la utilización de enzimas en procesos químicos que utilizan disolventes no acuosos, necesita conocer que éstas sean activas y estables en las condiciones de operación. Entre las enzimas más utilizadas, las lipasas han ganado un claro predominio, exhibiendo una amplia especificidad para reconocer sustratos muy diferentes.

El uso combinado de líquidos iónicos y biocatalizadores ha generado importantes expectativas para el desarrollo de procesos químicos en entornos no acuosos que sean medioambientalmente sostenibles. En este sentido, el comportamiento de fases de los sistemas agua/IL merece una mención especial. Aunque los ILs pueden considerarse como disolventes polares, no pueden considerarse similares a los disolventes moleculares polares con respecto a su miscibilidad con agua (i.e., ILs basados en aniones $[\text{NTf}_2]$ o $[\text{PF}_6]$ son inmiscibles con agua). Los ILs inmiscibles con agua muestran un elevado carácter higroscópico (i.e., $[\text{Bmim}][\text{NTf}_2]$ es capaz de absorber hasta un 1,4% p/p de contenido de agua), resultando esta característica clave para llevar a cabo procesos biocatalíticos, ya que permiten preservar el microambiente óptimo de la enzima mediante la conservación una capa de hidratación en la superficie de la proteína que mantiene su conformación activa.

La catálisis enzimática en solventes orgánicos es notablemente más eficiente que la biocatálisis convencional en solución acuosa, esto se debe principalmente a que el agua es mejor nucleófilo que por ejemplo, alcoholes, tioles o aminas, por esta razón, en presencia de la misma se favorecerá la hidrólisis frente a cualquier reacción de síntesis. La alta estabilidad de las lipasas en medios no acuosos se debe principalmente a que en presencia de sustratos hidrofóbicos, la lipasa puede adsorberlos en su interfase

hidrofóbica promoviendo cambios drásticos en la estructura de la enzima, que desencadenan su forma “abierta”, y permitiendo así la posibilidad de acceso del sustrato al centro activo. Debido a la necesidad de buscar medios no acuosos para llevar a cabo reacciones de síntesis catalizadas por lipasas, desde el año 2000, los ILs han emergido como excepcionales medios no acuosos para llevar a cabo este tipo de biotransformaciones debido a su excepcional capacidad para mantener las enzimas activas en un estado conformacional estable. El carácter polar de los ILs contrasta con la no miscibilidad en agua de algunos de ellos, lo cual es una interesante propiedad para los catalizadores enzimáticos, ya que una concentración crítica de agua es esencial para mantenerlos activos en ambientes no acuosos. La relación entre la estructura y la estabilidad de las enzimas frente a la desactivación en medios no acuosos como son los ILs fue objeto de amplio estudio por nuestro grupo, que haciendo uso de diversas técnicas espectroscópicas (i.e., fluorescencia, CD, o FTIT) analizaron los cambios conformacionales responsables de la estabilización o desactivación de las mismas en función del microambiente que la rodease (i.e., medios convencionales y ILs hidrofóbicos).

En esta Tesis Doctoral se utiliza el concepto de líquidos iónicos tipo esponja (SLILs), un término acuñado por nuestro grupo de investigación, y se aplica a la obtención de monoacilglicéridos y de biodiesel oxigenado. Este término hace referencia a ILs hidrófobos con largas cadenas laterales alquílicas que se comportan como fases líquidas conmutables a sólidas en función de la temperatura.

Estos ILs previamente ya han demostrado ser excelentes medios de reacción para llevar a cabo procesos biocatalíticos integrales limpios de síntesis y separación de productos puros. En estudios anteriores, se evaluó cómo estos ILs, tales como el IL- $[C_{18}tma][NTf_2]$, con puntos de fusión superiores a la temperatura ambiente, son capaces de disolver en estado líquido a compuestos hidrófobos (i.e., trioleína), proporcionando excelentes medios de reacción monofásicos para llevar a cabo reacciones de transesterificación enzimática catalizadas por lipasa y/o reacciones de esterificación con interés industrial.

En base a estas premisas se decidió evaluar su empleo en el desarrollo de los procesos de obtención de acilglicéridos mediante esterificación enzimática, y la síntesis biocatalítica de biodiesel oxigenado mediante reacciones de esterificación y transesterificación enzimática de diversos aceites vegetales y de desecho.

Los monoacilglicéridos (MAGs) son emulsionantes no iónicos, ampliamente utilizados en la industria cosmética y alimentaria cuando se encuentran puros. También resultan de gran interés en la industria médica como agentes antimicrobianos debido a su actividad biológica, así como portadores de medicinas en la industria farmacéutica.

La esterificación directa de glicerina con ácidos grasos libres es uno de las estrategias más populares para la síntesis selectiva de MAGs, si bien la inmiscibilidad entre ambos reactantes, y la eliminación del agua como subproducto de la reacción, son dos aspectos determinantes de la baja productividad que plantea esta estrategia sintética.

Por esta razón, parte de esta Tesis Doctoral pretende desarrollar un procedimiento para la producción limpia y sostenible de MAGs puros, basándonos en la combinación de la alta selectividad de Novozym-435, como catalizador enzimático, con las propiedades genuinas que han demostrado los SLILs para llevar a cabo este tipo de reacciones, ya que no solo son capaces de proporcionarle el ambiente idóneo (preservación del microambiente óptimo), sino que también podría permitir una separación sencilla del producto, así como la recuperación total del sistema SLIL-biocatalizador para su posterior reutilización.

Los resultados demostraron por primera vez, la idoneidad de diferentes SLILs (i.e., bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-hexadecil-3-metilimidazolío [C₁₆mim][NTf₂], tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolío [C₁₂mim][BF₄]) como medios de reacción para llevar a cabo la síntesis enzimática de MAGs por esterificación directa de glicerina con diferentes ácidos grasos libres (i.e., ácidos oleico, palmítico, mirístico, láurico y cáprico). Además, han sido objeto de estudio la optimización de las condiciones de reacción, así como el diseño de un protocolo de extracción de los productos de reacción mediante sencillas operaciones de enfriamiento/centrifugación haciendo uso del comportamiento tipo esponja que presentan estos líquidos iónicos.

El otro gran bloque desarrollado en la presente Tesis Doctoral fue el desarrollo de procesos biocatalíticos sostenibles para la obtención de biodiesel oxigenado en ILs tipo esponja. El biodiesel se sintetiza habitualmente por transesterificación de triacilglicéridos con metanol, produciendo ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) y glicerol como subproducto.

En el capítulo V se ha llevado a cabo la coproducción biocatalítica de biocombustibles oxigenados (ésteres metílicos de ácidos grasos, FAMES conjuntamente con ésteres grasos de solketilo, FASEs) mediante transesterificación de aceites vegetales (i.e., aceite de girasol, aceite de oliva, aceite de semillas de algodón, y aceite de cocina

usado) y/o esterificación directa de ácidos grasos (i.e., ácido láurico, mirístico, palmítico, y oleico, respectivamente) con solketal y metanol en diferentes líquidos iónicos hidrófobos (ILs) basados en cationes con largas cadenas laterales alquílicas. Los resultados mostraron conversiones cercanas al 100% de biodiesel oxigenado (para las distintas proporciones FAMEs/FASEs que se ensayaron) en 6h a 60°C. Además utilizando aceite de cocina usado (aceite de desecho) con ácidos grasos libres como sustrato, se han podido obtener biocombustibles procedentes de una fuente de triacilglicéridos sostenibles (i.e., 100% de conversión en relación FAMEs al 80% y FASEs al 20%). Es de destacar que la mezcla de reacción pudo ser separada fácilmente por sucesivas centrifugaciones en tres fases modificando la temperatura: IL, agua, y mezcla de FAMEs y FASEs, permitiéndose así la completa recuperación del sistema biocatalizador/IL para su posterior reutilización sin pérdida de actividad durante seis ciclos de operación.

Se demuestra así la excelente idoneidad de estos SLILs para llevar a cabo procesos cíclicos de reutilización del derivado enzimático inmovilizado debido a la alta estabilidad que presenta en estos nuevos medios de reacción. Además, se ha desarrollado un protocolo sencillo y verde para la separación fácil y limpia de los productos. El producto de reacción libre de IL se separa fácilmente, permitiendo la recuperación directa del SLIL para su posterior reutilización.

Estos hechos abren un nuevo camino en el desarrollo de una Química Verde más sostenible para la obtención de MAGs y biodiesel oxigenado. Además de asentar una nueva plataforma de síntesis de ésteres grasos de interés industrial. Todo esto fue posible gracias a las maravillosas propiedades demostradas por estos ILs para llevar a cabo procesos de reacción/separación, debido a la posibilidad que poseen de conmutar de estado líquido a sólido y viceversa con la temperatura. La sinergia entre las enzimas y los líquidos iónicos tipo esponja (SLILs) abren el camino a nuevas plataformas sostenibles para el desarrollo de procesos de interés industrial en la Química Verde.

LISTADO DE ABREVIATURAS

- FAMEs:** Ésteres metílicos de ácidos grasos
- FASEs:** Ésteres solketílicos de ácidos grasos
- MAGs:** Monoacilglicéridos
- CaL B** Lipasa B de *Candida antárctica*
- IME** Derivado enzimático inmovilizado
- CG** Cromatografía de gases
- MS** Molecular sieves (agente desecante)
- SF** Medio libre de disolvente
- TB** Tert-Butanol
- IL** Líquido iónico
- ILs** Líquidos iónicos
- SLIL** Líquidos iónicos tipo esponja
- [C₁₂mim][BF₄]**: Tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio
- [C₁₄mim][BF₄]**: Tetrafluoroborato de 1-tetradecil-3-metilimidazolio
- [C₁₆mim][BF₄]**: Tetrafluoroborato de 1-hexadecil-3-metilimidazolio
- [C₁₀mim][NTf₂]**: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-decil-3-metilimidazolio
- [C₁₂mim][NTf₂]**: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-dodecil-3-metilimidazolio
- [C₁₄mim][NTf₂]**: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-tetradecil-3-metilimidazolio
- [C₁₆mim][NTf₂]**: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-hexadecil-3-metilimidazolio
- [C₁₈mim][NTf₂]**: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-octadecil-3-metilimidazolio
- [C₁₀tma][NTf₂]**: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de deciltrimetilamonio
- [C₁₂tma][NTf₂]**: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de dodeciltrimetilamonio
- [C₁₄tma][NTf₂]**: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de tetradeciltrimetilamonio
- [C₁₆tma][NTf₂]**: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de hexadeciltrimetilamonio
- [C₁₈tma][NTf₂]**: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de octadeciltrimetilamonio

Resumen	i
Listado de abreviaturas	vii
Índice	ix
Capítulo I: HACIA UNA QUÍMICA MÁS SOSTENIBLE...	1
Química sostenible	3
Estructura y propiedades de los Líquidos Iónicos	11
Las enzimas en los Líquidos Iónicos	18
Procesos biocatalíticos sostenibles en Fluidos Supercríticos	24
Procesos de flujo en Disolventes Neotéricos	28
Aplicaciones de los Líquidos Iónicos en la tecnología del ADN	34
Bibliografía	39
Capítulo II: BIOPROCESOS EN LÍQUIDOS IÓNICOS TIPO ESPONJA	45
Diseño de bioprocesos químicos sostenibles integralmente en ILs hidrofóbicos	47
Diseño de procesos sostenibles en ILs tipo esponja	51
Bibliografía	65
Capítulo III: OBJETIVOS	67
Capítulo IV: SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE MAGs EN LÍQUIDOS IÓNICOS TIPO ESPONJA	73
Resumen	75
Introducción	76
Parte experimental	82
Resultados y discusión	86
Conclusiones	97
Bibliografía	99
Capítulo V: SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE BIODIESEL Y BIOCMBUSTIBLES OXIGENADOS EN LÍQUIDOS IÓNICOS TIPO ESPONJA	101
Resumen	103
Introducción	104
Parte experimental	111
Resultados y discusión	116
Conclusiones	126
Bibliografía	127
Capítulo VI: DISCUSIÓN FINAL Y CONCLUSIONES	129
Introducción	131
Discusión	133
Conclusiones	135

CAPÍTULO I

**INTRODUCCIÓN: “HACIA UNA QUÍMICA MÁS
SOSTENIBLE...”**

Capítulo I

Capítulo I

QUÍMICA SOSTENIBLE

La Química sostenible ó Química Verde se podría definir como una filosofía química dirigida hacia el diseño de productos y procesos químicos que reduzcan o eliminen el uso o la generación de sustancias peligrosas, tanto para el medio ambiente como para los seres humanos. Surge para paliar la percepción social negativa que la química ha ido cosechando con el paso del tiempo, fundamentada en su gran medida por los deterioros medioambientales provocados por el crecimiento incontrolado en los países desarrollados del sector industrial químico, así como en el enorme impacto social de algunos errores cometidos por las industrias petroquímica y farmacéutica.

La Química Verde se basa en el desarrollo de reacciones químicas más selectivas y eficientes, y en el uso de condiciones de reacción más seguras. Es por ello que se fomenta el uso de disolventes ambientalmente no contaminantes y benignos para el medio ambiente que puedan ser fácilmente reutilizables y recuperables (Lozano *et al.*, 2011a; Pollet y Davey, 2014), además del empleo de catalizadores selectivamente eficientes en los procesos químicos (Anastas *et al.*, 2001; Reichardt, 2007; Sheldon, 2008, 2012).

La Química es la ciencia que más ha contribuido a la mejora de la calidad de vida y al bienestar del hombre, generando avances importantísimos en diferentes campos como son la higiene, la alimentación, producción de nuevos materiales y la salud (Sheldon, 2012). A lo largo del siglo XX, las aplicaciones de la Química en el campo de la medicina han crecido de un modo exponencial, aportando soluciones a una infinidad de problemas de salud, lo cual ha permitido incrementar la esperanza de vida, situada en los 35 años a principios del siglo XX, hasta los 80 años que hay en la actualidad (Foro Química y Sociedad, 2012). La Química Verde se aplica en todo el ciclo de la vida de un producto químico, desde la etapa de diseño, pasando por su fabricación, su uso y disposición final, siguiendo en todo momento criterios de sostenibilidad. Fue en 1998, cuando la Química Verde o Química sostenible comenzó a tener importancia tras la publicación de los Doce principios de la Química verde (**Tabla 1**) enunciados por Paul T. Anastas y John C. Warner (Anastas y Warner, 1998), consolidándose posteriormente como disciplina científica con la aparición de revistas como *Green Chemistry* (RSC), *ChemSusChem* (VCH-Wiley), *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* (ACS) etc., así como con la creación de la plataforma europea

Capítulo I

SusChem, y con el papel relevante alcanzado por las agencias de control medioambiental en los países desarrollados.

La falta continuada de crear una industria química más prudente con el medio ambiente ha centrado la atención en el uso de medios de reacción alternativos de nuevos métodos sintéticos. Entre estos disolventes alternativos, también llamados disolventes neotéricos, se encuentran los fluidos supercríticos, los disolventes perfluorados y los líquidos iónicos (Lozano *et al.*, 2011a; Dominguez y Maugeri, 2011; Abe *et al.*, 2012), que presentan como principal característica común la posibilidad de ser recuperados y reutilizados en su totalidad (Reichardt, 2007; Lozano, 2010a).

Tabla 1. Los principios de la Química verde (Anastas y Warner, 1998).

1. Prevención	Es mejor prevenir la formación de residuos que tratar de limpiar tras su formación
2. Eficiencia atómica	Los métodos sintéticos deben ser diseñados para conseguir la máxima incorporación en el producto final de todas las materias usadas en el proceso
3. Síntesis segura	Cuando sea posible, se deben diseñar metodologías sintéticas para el uso y la generación de sustancias con escasa toxicidad humana y ambiental
4. Productos seguros	Se deben diseñar productos químicos que, preservando la eficacia de su función, presenten una toxicidad escasa
5. Disolventes seguros	Las sustancias auxiliares (disolventes, agentes de separación, etc.) deben resultar innecesarias en lo posible y, cuanto menos deben ser inocuas
6. Eficiencia energética	Las necesidades energéticas deben ser consideradas en relación a sus impactos ambientales y económicos. Los métodos sintéticos deben ser llevados a temperatura y presión ambiente
7. Fuentes renovables	Las materias de partida deben ser renovables y no extingüibles, en la medida que esto resulte practicable técnica y económicamente
8. Evitar derivados	La formación innecesaria de derivados (bloqueo de grupos, protección/desprotección, modificación temporal de procesos físicos/químicos) debe ser evitada en cuanto sea posible
9. Catalizadores	Los reactivos catalíticos (tan selectivos como sea posible) son superiores a los estequiométricos
10. Biodegradabilidad	Los productos químicos han de ser diseñados de manera que, al final de su función, no persistan en el ambiente, sino que se fragmenten en productos de degradación inerte
11. Polución	Se deben desarrollar las metodologías analíticas que permitan el monitoreo a tiempo real durante el proceso y el control previo a la formación de sustancias peligrosas
12. Prevención de accidentes	Las sustancias y las formas de su uso en un proceso químico, deben ser elegidas de manera que resulte mínima la posibilidad de accidentes

Capítulo I

Por tanto, los disolventes son elementos clave en los procesos químicos, en los que actúan como medios de transporte en la reacción y en la separación del producto. Ellos son responsables de una parte importante de los procesos de impacto ambiental en la industria química y tienen una gran relevancia en la seguridad y la salud.

La sostenibilidad de los procesos químicos comienza con la catálisis, debido a que la selectividad en las transformaciones químicas está directamente relacionada con varios de los principios de la Química Verde, es decir, la prevención, la economía atómica, la síntesis de productos menos peligrosos, la reducción de los derivados, etc (Anastas y Warner, 1998). La formación inherente de desechos/contaminantes y subproductos no deseados en los procesos sintéticos clásicos, basados en el uso de cantidades estequiométricas de los reactivos, se puede minimizar mediante el uso de diversas etapas catalíticas (Sheldon, 2008; Busacca *et al.*, 2011). El desarrollo de procesos catalíticos eficientes conduce a un ahorro significativo en los costos de producción para la industria, así como de los impactos ambientales. Otros aspectos ecológicos que deben tenerse en cuenta para el desarrollo de procesos químicos limpios incluyen el uso de materias primas renovables (Farran *et al.*, 2015; Luska *et al.*, 2015) en medios de reacción benignos (Lozano, 2010a; Pollet y Davey, 2014), incluso bajo condiciones de flujo (García-Verdugo *et al.*, 2015), así como metodologías de activación de la reacción, por ejemplo, microondas y irradiaciones ultrasónicas, etc. (De la Hoz *et al.*, 2005; Izquierdo *et al.*, 2013), para mejorar la eficiencia catalítica sobre las fuentes de energía convencionales (Varma, 2014; Wu *et al.*, 2014). Todos estos conceptos claves pueden ser integrados para el desarrollo de procesos selectivos de transformación y separación, capaces de proporcionar directamente productos puros, incluyendo la reutilización de todos los elementos del sistema de reacción, como pueden ser catalizadores, disolventes, etc.

La naturaleza ha sido siempre una fuente de inspiración para los químicos. Esto les ha llevado a emplear biopolímeros (i.e., enzimas y ARN) como catalizadores, vista su capacidad para catalizar transformaciones en los sistemas vivos de forma altamente eficiente, sostenible, biocompatible y biodegradable. Como ejemplo relevante cabe citar, el trabajo pionero de Edward Buchner, Premio Nobel de Química 1907, donde se demostró la capacidad de un extracto de levaduras muertas para llevar a cabo la fermentación alcohólica, un camino biocatalítico de diez pasos para la transformación de la glucosa en etanol (Buchner y Rapp, 1901; Buchner y Meisenheimer, 1903). Este

Capítulo I

descubrimiento fue determinante no sólo para desechar la teoría del vitalismo, sino también para destacar la conveniencia y utilidad del empleo de zimasas (enzimas) en el desarrollo de una gran variedad de procesos catalíticos de interés industrial.

Las enzimas, en base a su extrema selectividad (quimio-, regio- y enantioselectividad) para las reacciones químicas que catalizan, constituyen claramente una potente caja de herramientas para el procesos químicos catalíticos verdes, dado que anulan la aparición de subproductos indeseados. Una gran variedad de reacciones catalizadas por enzimas han sido llevadas a cabo con éxito a escala de laboratorio, ofreciendo claras ventajas para la síntesis de productos químicos finos enantiopuros contra cualquier otro tipo de catalizadores (Gotor-Fernández y Gotor, 2009; Clouthier y Pelletier, 2012; Kholer y Turner, 2015). Los avances en la genómica, la evolución dirigida y nuestra explotación de la biodiversidad natural han conducido a mejoras en la actividad, la estabilidad y la especificidad de las enzimas, acompañado de un enorme aumento en el número y la variedad de sus aplicaciones industriales (Kumar y Singh, 2013; Currin *et al.*, 2015; Applegate y Berkowitz, 2015). Además, las aplicaciones tecnológicas de enzimas se han mejorado en gran medida en ambientes no acuosos, en lugar de su medio de reacción acuoso natural, debido a la promiscuidad catalítica que da lugar a la expansión del repertorio de biotransformaciones (Klibanov, 2001; Busto *et al.*, 2010; Humble y Berglund, 2011).

Entre las enzimas más utilizadas, las lipasas (**Figura 1**) han ganado una gran importancia, exhibiendo una amplia especificidad para reconocer muy diferentes sustratos, y catalizar reacciones diferentes utilizadas en la síntesis de productos farmacéuticos y medicamentos (Solano *et al.*, 2012; Pérez-Sánchez *et al.*, 2013; Palomo y Filice, 2015), biocombustibles (Bernal *et al.*, 2012; Gog *et al.*, 2012; Lourinho y Brito, 2015), alimentos y aditivos cosméticos (Fernández-Lafuente, 2010; Ansorge-Schumacher y Thum, 2013; Zhang *et al.*, 2015; Neta *et al.*, 2015).

La selección idónea de medios de reacción no acuosos es clave para el éxito de los procesos biocatalíticos, aunque el cambio de agua a los disolventes no acuosos no siempre es una respuesta sencilla a causa de la desactivación enzimática (Klibanov, 2001; Busto *et al.*, 2010; Humble y Berglund, 2011). A este respecto, la posibilidad de utilizar disolventes que puedan ser recuperados y reutilizados en su totalidad tras un proceso químico, y su combinación con las enzimas, constituye la más clara oportunidad para el desarrollo de procesos 100% sostenibles. En este sentido, los

Capítulo I

líquidos iónicos (ILs) (Rantwijk y Sheldon, 2007; Roosen *et al.*, 2008; Itoh *et al.*, 2009; Lozano, 2010a; Gao *et al.*, 2015) y los fluidos supercríticos como el dióxido de carbono (scCO₂) (Hobbs *et al.*, 2007; Lozano *et al.*, 2011a; Knez *et al.*, 2014) son un tipo de disolventes verdes no acuosos, que han recibido el mayor interés para el diseño de enfoques sostenibles de (bio)transformaciones catalíticas y procesos de separación del producto, incluso en operaciones de flujo (Lozano *et al.*, 2011b; García-Verdugo *et al.*, 2015). Pero son los ILs empleados como medios de reacción y/o los sistemas bifásicos basados en la combinación de éstos con sistemas de flujo, ILs/scCO₂, los que van a permitir el desarrollo de nuevas plataformas de síntesis química.

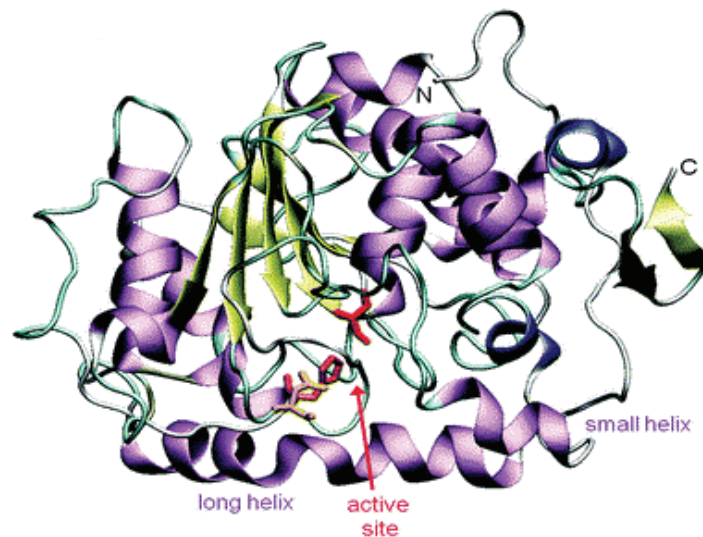


Figura 1. Estructura tridimensional de la estructura de lipasa B de *Candida antártica* (Klähn *et al.*, 2011).

Por esta razón, el entender las relaciones estructura-función de los biocatalizadores en líquidos iónicos, o en los sistemas bifásicos ILs/scCO₂, es fundamental para el desarrollo de nuevas plataformas de síntesis química más sostenibles. Para el desarrollo de procesos con ILs será necesario tener en cuenta conceptos claves como: su organización estructural, propiedades, comportamiento de fases con los sustratos del medio, así como las interacciones que tienen lugar cuando se emplean con enzimas (Frauenfelder *et al.*, 2009; McMahoo *et al.*, 2014), permitiendo mantener sus funciones catalíticas durante un mayor periodo de tiempo. La combinación

Capítulo I

de sistemas biológicos y disolventes verdes en reactores apropiados (i.e., reactores de membrana, reactores heterogéneos con sistemas bifásicos ILs/scCO₂, etc.), podría ser considerada como una caja de herramientas eficiente para dar un impulso a los procesos químicos limpios de interés industrial, pudiendo proporcionar productos puros directamente, y permitir una fácil recuperación de los biocatalizadores y el IL para su posterior reutilización. Otra herramienta eficiente para el diseño de procesos biocatalíticos continuos la ofrecen los sistemas bifásicos SILP/scCO₂ que permite proporcionar directamente los productos puros, a la vez de preservar la estructura del biocatalizador y por lo tanto de su actividad (Lozano, 2010a; Lozano *et al.*, 2011a).

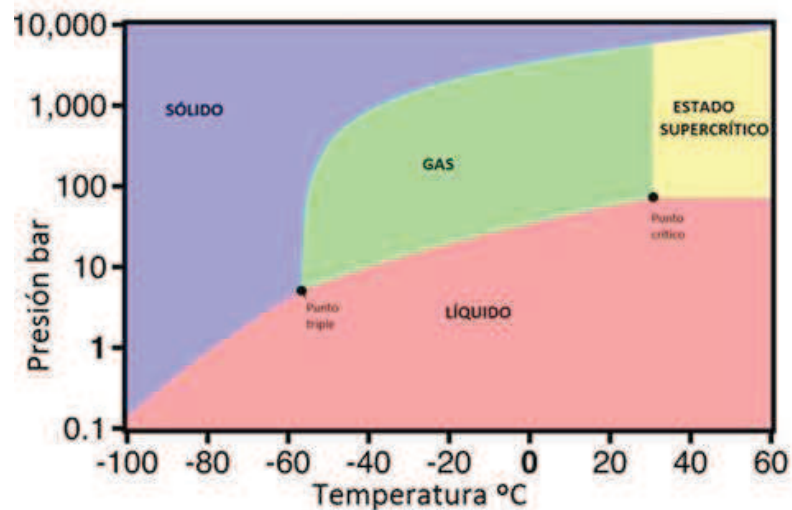


Figura 2. Diagrama de fases de presión y temperatura del CO₂ (Lozano *et al.*, 2011a).

Un *fluido supercrítico* se define como un estado de la materia a una presión y temperatura superior a su punto crítico, pero por debajo de la presión requerida para condensar en un sólido. La posibilidad de manipular las propiedades físicas de estos disolventes, simplemente cambiando la presión o la temperatura es una característica única en los sistemas supercríticos, que les permite mostrar habilidades excepcionales en procesos de extracción, reacción, fraccionamiento y análisis químico (Jessop y Leitner, 1999). Los fluidos supercríticos presentan difusividades similares a los gases, así como bajas viscosidades, hecho que facilita los fenómenos de transporte de masa, y mejora considerablemente la eficacia de los procesos catalíticos. Además, dado que los fluidos supercríticos son disolventes de baja polaridad, su utilización ha estado enfocada

Capítulo I

al procesamiento, extracción y transformación de compuestos hidrófobos. Donde tras liberar la presión del estado supercrítico, los compuestos transportados/disueltos se separan fácilmente por simple precipitación, obteniéndose libres de toda traza de fluido supercrítico, mientras que dicho solvente neotérico puede ser re-presurizado para su reutilización (Li y Trost, 2008). El dióxido de carbono (**Figura 2**) es el compuesto más popular utilizado como fluido supercrítico, no sólo por ser químicamente inerte, no tóxico, no inflamable, barato y fácilmente disponible, sino también por presentar parámetros críticos relativamente bajos (i.e., $P_c = 73.8$ bar; $T_c = 31.0$ °C) que son fácilmente accesibles con la tecnología industrial disponible, y es considerado como un disolvente verde (Leitner, 2002).

Otros fluidos supercríticos son menos atractivos debido a su inflamabilidad (i.e., etano, propano), alto costo, (i.e., CHF_3) o pobre poder solvente (i.e., SF_6), habiendo sido utilizados por esta razón en muy pocos estudios (Lozano *et al.*, 2010b). El término de disolventes fluorados hace referencia a disolventes orgánicos perfluoro-sustituídos (i.e., alcanos, éteres de dialquilo, trialquilaminas, etc.), que además de su carácter no polar e hidrofóbico, también son disolventes químicamente inertes, fácilmente reciclables, no tóxicos, y con una densidad superior a los correspondientes no fluorados (Horvath y Rábai, 1994).

Desde el punto de vista de la química sintética, el interés en dichos disolventes se encuentra en que presentan una miscibilidad dependiente de la temperatura con los disolventes orgánicos clásicos, lo que permite el desarrollo de sistemas bifásicos no acuosos. Así, en base a las diferencias de solubilidad entre los sustratos y productos, tales mezclas de disolventes bifásicos fluorados/orgánicos se pueden utilizar para convertir un medio de reacción heterogéneo en uno homogéneo con la mejora de las velocidades de transferencia de masa, y finalmente reconvertirlo en un medio heterogéneo para facilitar la separación del producto en la fase orgánica, mediante simples cambios de temperatura (Horvath, 1998). No obstante, el empleo de disolventes orgánicos volátiles como sistema de extracción de los productos es un punto importante para la adecuación integral de estos sistemas en el ámbito de la Química Verde. Es por ello que se han propuesto métodos sintéticos alternativos basados en el uso de sistemas bifásicos que combinan disolventes perfluorados (i.e., Krytox) y fluidos supercríticos con resultados asombrosos (Hobbs y Thomas, 2007).

Capítulo I

Tanto los fluidos supercríticos, como los disolventes fluorados pertenecen al grupo de los disolventes moleculares. Por el contrario, los líquidos iónicos representan un grupo diferente de disolventes neotéricos, constituido por sustancias orgánicas de naturaleza exclusivamente iónica. El criterio comúnmente usado para definirlos es que son sales con puntos de fusión inferior a 100°C, aunque es un criterio que resulta arbitrario y de escaso interés, ya que carece de significado físico real en la actualidad. Sin embargo, ha llegado a ser ampliamente popular debido a que presentan la condición de que es más fácil trabajar con ellos que con sales cuyos puntos de fusión son mucho más elevados, existiendo ILs con puntos de fusión por debajo de la temperatura ambiente. La baja presión de vapor que presentan estos disolventes neotéricos, haciendo que prácticamente no se evaporen nunca, es la cualidad más importante que poseen, y que ha generado un enorme interés en su estudio y aplicación desde principios de este siglo XXI (Wasserscheid y Welton, 2008).

En la actualidad los líquidos iónicos son sustancias sujetas a una enorme actividad de investigación en aplicaciones industriales, y gran parte de este interés se ha centrado en su designación como "disolventes de diseño", ya que sus propiedades físico-químicas puede ser moduladas mediante la selección adecuada del catión y el anión (algunas estimaciones realizadas indican hasta un trillón de posibilidades) pudiendo llegar a resultar como disolventes óptimos para una aplicación dada. En este sentido, el uso de programas computacionales para el diseño de líquidos iónicos con unas propiedades dadas está abriendo enormes posibilidades (Bhargava *et al.*, 2008). Este concepto de disolvente de diseño está siendo objeto de estudio, sobre todo de cómo el cambio de los iones en los líquidos iónicos puede afectar a sus propiedades físicoquímicas, además de a otras cualidades más allá de sus propiedades solventes (Dominguez, 2008; Niedermeyer *et al.*, 2012). No obstante, no sólo los aspectos más beneficiosos de estos solventes están siendo punto de interés, también los posibles efectos negativos que podrían acarrear de su utilización a gran escala sobre el medio ambiente está siendo ampliamente estudiado (Bubalo *et al.*, 2014).

Sin embargo, la finalidad de la "Química Verde" no solamente es la sustitución de disolventes dañinos por otros ambientalmente benignos. Otros factores como el incremento de la selectividad de los procesos de síntesis química, con objeto de evitar reacciones no deseadas y/o subproductos, facilitar la recuperación de los productos, evitar la formación de residuos que está estrechamente relacionada con el uso

Capítulo I

tradicional de cantidades estequiométricas de los reactivos (Anastas *et al.*, 2001; Sheldon, 2008, 2012), son objeto también de esta filosofía química. Una forma de solventar estos problemas es mediante el cambio de metodologías estequiométricas por procesos catalíticos que mejorará de forma significativa la eficiencia sintética. Por lo tanto, podemos concluir que la sostenibilidad de las transformaciones químicas está estrechamente relacionada tanto con el uso de catalizadores estereoespecíficos, como de la ingeniería del proceso (Lozano *et al.*, 2010a; Sheldon, 2012). Teniendo en cuenta que muchos desarrollos y aplicaciones de la Química están asociados con el empleo de disolventes orgánicos volátiles, la utilización de sistemas alternativos que no generen emisiones incontroladas de contaminantes, se presenta como una opción de máximo interés. Es por ello que la utilización de los líquidos iónicos como alternativa a los disolventes orgánicos está, hoy en día, en máxima vanguardia. La incorporación de biocatalizadores en estos disolventes neotéricos ha proporcionado nuevas oportunidades para el desarrollo de procesos verdes de síntesis química (Lozano *et al.*, 2006, 2009a, 2010a, 2011a; Pérez *et al.*, 2010; Domínguez y Maugeri, 2011). Otra forma de emplear estos disolventes, es emplearlos en el recubrimiento de catalizadores heterogéneos que mediante interacciones iónicas o covalentes, en este caso, los ILs soportados sobre resinas macroporosas, SILPs (Riisager *et al.*, 2006; Abe *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2014), son capaces de mejorar el rendimiento de los catalizadores (i.e., actividad, estabilidad y selectividad).

ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LOS LÍQUIDOS IÓNICOS

Los líquidos iónicos (ILs) son sales que funden a temperaturas inferiores a 100°C (Wasserscheid y Welton, 2008). A diferencia de los disolventes moleculares tradicionales, los líquidos iónicos se encuentran constituidos exclusivamente por pares de iones, es decir, un catión de naturaleza orgánica y un anión orgánico o inorgánico (**Figura 3**). El catión y anión de los líquidos iónicos puede ser diseñado de tal forma que las sales resultantes no se pueden empaquetar de forma compacta y como consecuencia, dichas sustancias no pueden cristalizar fácilmente y permanecen en estado líquido dentro de un amplio rango de temperaturas, incluso a temperatura ambiente (RTILs, room temperature ionic liquids) (Bonhote *et al.*, 1996; Dupont *et al.*,

Capítulo I

2004). En base a sus particularidades, los ILs se utilizan en procesos fotoquímicos, bioquímicos, catalíticos, de separación industrial, como aditivos en lubricación, electrolitos en baterías, captura de gases ácidos, células de combustible, recuperación de combustible nuclear, neutralización de gases tóxicos, etc. (Dupont *et al.*, 2002, Dupont, 2011; Rogers y Seddon, 2003).

Los ILs, como se ha comentado anteriormente, son un grupo de sales fundidas clásicas usadas en varios campos de la ciencia. En este contexto, conocer el universo nanoestructural es la mejor herramienta para conocer y comprender las propiedades genuinas de estos nuevos disolventes y sus posibles aplicaciones en los diversos campos de la ciencia (Marsh *et al.*, 2004; Dupont, 2011). En relación a la estructura de los ILs, aunque presentan el mismo tipo de interacciones iónicas que las sales fundidas, una de sus principales diferencias está asociada a la gran estructura asimétrica que presenta al menos, uno de los iones que lo conforman. Esta asimetría opuesta al elevado ordenamiento causado por la fuerte carga entre las interacciones iónicas que causa la cristalización en el caso de las sales fundidas, es la principal responsable de su estado líquido o bajo punto de fusión. Las propiedades físicas y químicas (polaridad, hidrofobicidad, miscibilidad con otros disolventes) de un líquido iónico pueden ser modulables dependiendo del catión y el anión que lo conforman, existiendo numerosas combinaciones posibles (hasta 1018).

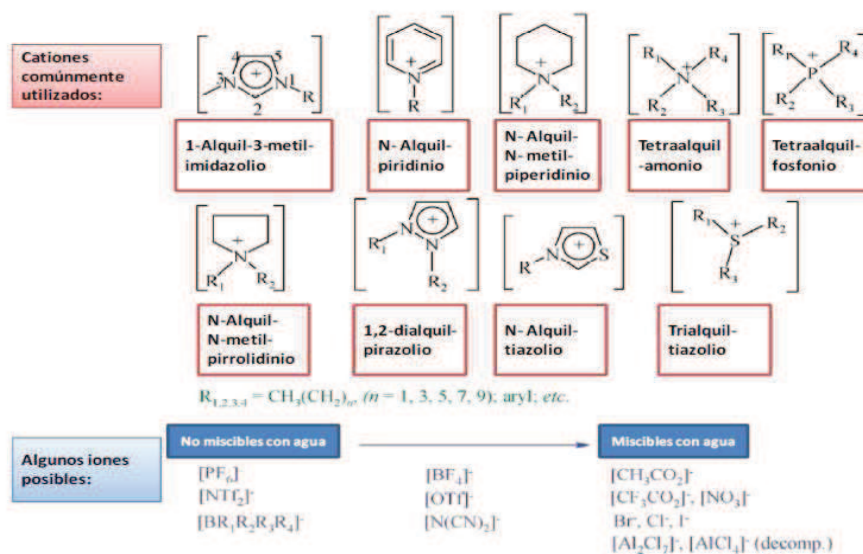


Figura 3. Algunas combinaciones comunes de Líquidos Iónicos (Plechkova y Seddon, 2008).

Capítulo I

Entre los cationes más comunes se encuentran los de imidazolio, piridinio, amonio, pirrolidinio y fosfonio, mientras que los aniones más usados son bis[(trifluorometil)sulfonyl]imida (NTf_2^-), hexafluorofosfato, (PF_6^-), trifluorometilsulfonato (CF_3SO_3^-) y haluros, tal como se presenta en la **Figura 3** (Plechkova y Seddon, 2008). Otra característica estructural peculiar que presentan los ILs, es la presencia de una red en la que interaccionan los cationes generando estructuras pre-organizadas principalmente, a través de enlaces de hidrógeno que inducen la direccionalidad estructural (“efectos entrópicos”), en contraste con los agregados de las sales clásicas que están formados únicamente por enlaces iónicos (i.e., estructuras ordenadas en base a la carga). En apoyo de este modelo, cabe citar una revisión de los estudios de rayos-X realizados en los últimos años, sobre la estructura de las sales de 1,3-dialquilimidazolio. En ellos se han relevado una tendencia común: en el estado sólido, estas sales forman una red cooperativa extendida de los cationes y los aniones, conectados por interacciones iónicas. Las unidades monoméricas siempre consisten en un catión de imidazolio rodeado al menos de 3 aniones, y sucesivamente, cada anión rodeado al menos de 3 cationes. Especialmente, los ILs con cationes imidazolio forman dos grandes disposiciones en 3D, a saber, formando apilamientos tipo Π entre los anillos imidazolio, situándose los aniones acomodados en forma de cadenas, y formando columnas consistentes en cationes alternados con aniones (Dupont, 2011).

Teniendo en cuenta la amplia gama de líquidos iónicos y sus aplicaciones, es difícil generalizar sus propiedades y descubrir las tendencias generales, por esta razón diversos autores hacen más hincapié en sus diferencias que en sus similitudes. Además, algunas de las propiedades descritas hace unos años, están ahora sujetas a controversia. Estas propiedades incluyen, por ejemplo, el comportamiento electroquímico, la estabilidad térmica a largo plazo (la cual se sobreestimó en el pasado), la polaridad, la volatilidad (algunos ILs son destilables bajo ciertas condiciones), etc. (Earle *et al.*, 2006; Neto *et al.*, 2012). No obstante, es necesario hacer una mención especial a la incorporación de otras moléculas en la red del IL, fenómeno que ocurre cuando dichos ILs actúan como disolventes de sustancias moleculares, y que causan cambios en sus propiedades químicas y físicas, incluso en la formación de regiones polares y no polares. En este sentido, Dupont y Braz (2004) describieron los ILs como materiales nanoestructurados, que permiten albergar a moléculas neutras en las regiones menos

Capítulo I

polares, mientras que las especies iónicas o polares experimentan una difusión más rápida en las regiones polares, tal como se observó en ILs basados en 1-butil-3-metilimidazolio mediante técnicas espectroscópicas (Yu *et al.*, 2012). Otros autores (Zhang *et al.*, 2012), sin embargo estudiaron el comportamiento tribológico del IL-tetrafluoroborato de 1-metil-3-hexadecilimidazolio $[C_{16}mim][BF_4]$ como aditivo en el aceite de parafina, observando cómo dicho IL (mp 49°C) cambió de estado sólido a una fase cristalina líquida a 80°C, donde las moléculas de IL se dispusieron en capas, ubicando sus largos ejes moleculares de modo paralelos entre sí, lo que se tradujo en unas excelentes propiedades tribológicas.

En este mismo contexto, estudios estructurales realizados con nitrato de propilamonio mostraron que dicho IL se comportaba como una nanoestructura continua de autoensamble, que se asemeja a una esponja anfílica. En el caso de los ILs basados en el catión pirrolidinio, se ha podido observar que los iones están organizados también en una red nanoestructurada. Cuando dichos cationes poseen sustituyentes alquílicos de corta longitud de cadena, estos se ordenan en estructuras monocapa catión-anión confinadas a modo de una película delgada, mientras que cuando el catión posee sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena, el sistema se organiza estructuralmente mediante la formación de bicapas (Smith *et al.*, 2013).

Adicionalmente a estas peculiaridades estructurales de los ILs, dichos solventes neotéricos poseen una serie de propiedades genéricas como son las siguientes (Olivier-Bourbigou *et al.*, 2010):

-“**Muy baja volatilidad**”. La temperatura de ebullición de los ILs no puede determinarse experimentalmente a presión atmosférica, ya que éstos descomponen a temperaturas más bajas. Sin embargo, se ha descrito que los ILs pueden ser destilados entre 200-300°C pero a una presión significativamente reducida, y a una muy baja velocidad de destilación (Earle *et al.*, 2006; Neto *et al.*, 2012).

-“**No inflamabilidad**”. Parte del interés de los ILs, se ha centrado en el uso de los mismos como una alternativa “verde” a los disolventes orgánicos volátiles, principalmente porque los ILs se consideran como no volátiles y no inflamables a temperatura ambiente o a temperaturas superiores, de modo que se pueden utilizar cerca de fuentes de calor (Wasserscheid y Welton, 2008). La inflamabilidad de los líquidos

Capítulo I

iónicos se atribuyó principalmente a la descomposición de los mismos que generaron sustancias inflamables en lugar de su vaporización, como ha venido ocurriendo con los líquidos combustibles/inflamables tradicionales.

-**“Alta Polaridad”**. Esta propiedad es una de las más genuinas de los líquidos iónicos (Rantwijk y Sheldon, 2007; Jessop *et al.*, 2012). La polaridad de un disolvente suele determinarse mediante los desplazamientos de los máximos de emisión de fluorescencia de un colorante solvatocrómico (i.e., rojo Nilo). Las medidas solvatocrómicas indican que los líquidos iónicos poseen una polaridad similar a la observada en disolventes moleculares polares (i.e., etanol, formamida, etc.) (Poole, 2004). Ha sido descrito que las interacciones entre soluto-disolvente obedecen a un modelo de interacción dual. Así, los líquidos iónicos pueden comportarse como disolventes apolares con solutos apolares, o pueden manifestar un comportamiento polar con solutos polares (Rantwijk y Sheldon, 2007; Chiappe *et al.*, 2009), ya que, los líquidos iónicos pueden considerarse materiales nanoestructurados con regiones polares y apolares (Dupont y Braz, 2004).

-**“Estabilidad Térmica”**. El inicio de la descomposición térmica calculada a partir del análisis gravimétrico (TGA) indica una alta estabilidad térmica para muchos ILs, generalmente superior a 350°C. Sin embargo, se pueden encontrar valores más bajos, lo cual hay que tener presente cuando los ILs se utilizan en procesos catalíticos. Los ILs presentan una alta estabilidad química y electroquímica, que también están directamente controladas por la naturaleza del catión y el anión que los conforman (Poole, 2004).

-**“Punto de Fusión”**. En términos generales, los ILs tienen bajos puntos de fusión, normalmente por debajo de la temperatura ambiente, pudiendo en algunos casos ser de -100°C. Los datos deben ser considerados con precaución, ya que el punto de fusión de muchos líquidos iónicos puede ser incierto ya que algunos pueden experimentar un superenfriamiento y la presencia de impurezas puede tener una gran influencia. El punto de fusión de este tipo de sustancias depende enormemente del tamaño del líquido iónico, de su carga y de la distribución de la misma. Así, al aumentar el tamaño del anión y del catión disminuye el punto de fusión. Del mismo modo, un

Capítulo I

incremento en la simetría de los iones, supone un aumento en el punto de fusión ya que permite un mayor empaquetamiento de los mismos. Además, las diferentes conformaciones en el catión pueden frustrar la cristalinidad, permitiendo la formación de cristales o/y polimorfos. El efecto de la simetría en el punto de fusión también se refleja en los altos puntos de fusión de las sales de 1, 3-dimetilimidazolio y 1,3-dietilimidazolio, en comparación con los cationes análogos de las sales más asimétricas 1-etil-3-metilimidazolio o 1-butil-3-metilimidazolio (Poole, 2004; Wasserscheid y Welton, 2008). En el caso de cationes imidazolio con sustituyentes alquilo, un incremento en la longitud de cadena supone una disminución en el punto de fusión por cuestiones de empaquetamiento, llegando a una situación de mínimo sobre los 6-8 átomos de carbono, donde la tendencia se invierte debido a la importancia de las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas de los sustituyentes. En relación a la dependencia del punto de fusión con la carga se puede decir, de forma general, que la existencia de puentes de hidrógeno y la deslocalización de la carga, conducen a un aumento del punto de fusión (Plechkova y Seddon, 2008).

-“**Conductividad iónica y electroquímica**”. Los ILs poseen una serie de propiedades que los hacen ser disolventes adecuados en procesos electroquímicos, tales como gran estabilidad a la oxidación/reducción, altas ventanas electroquímicas (ej., la ventana electroquímica del agua es de 1.23 V, mientras que para los ILs podría ser de 5-6 V) y relativamente buena conductividad eléctrica (Koel, 2000).

-“**Densidad**”. Los ILs son generalmente más densos que cualquiera de los disolventes orgánicos o el agua, con valores de densidad que varían desde 1 a 1.6 g/mL (Wasserscheid y Welton, 2008).

-“**Viscosidad**”. Desde el punto de vista de la ingeniería, la viscosidad de los ILs puede afectar a las propiedades de transporte (transferencia de masa, difusión...), lo que puede generar problemas en algunas aplicaciones catalíticas, por ejemplo en las operaciones de mezclado y bombeo. La viscosidad de la mayoría de ILs es relativamente alta en comparación con la de los disolventes convencionales. En la literatura se describe, para una variedad de ILs, que el rango de viscosidad varía desde 66 hasta 1110 cP a 20- 25°C, para dar idea del orden de la magnitud, la viscosidad del

Capítulo I

agua a temperatura ambiente es de 0.890 cP (Wasserscheid y Welton, 2008). La viscosidad de los ILs presenta una fuerte dependencia con la temperatura y se ve afectada por la presencia de impurezas. Para el mismo catión, se ha observado como el cambio de anión afecta de manera muy significativa a la viscosidad de estas sales, disminuyendo su valor en la serie como consecuencia del tamaño y la deslocalización de la carga; $\text{Cl}^- > \text{PF}_6^- > \text{BF}_4^- > \text{NTf}_2^-$ (Bonhoote *et al.*, 1996). En estos casos, los parámetros determinantes de la viscosidad son el tamaño del anión y la basicidad del mismo. Así, la disminución en el tamaño del anión disminuye las interacciones de van der Waals, incrementando la interacción electrostática a través de puentes de hidrógeno. Los valores de viscosidad en los ILs también se ven afectados por la naturaleza del catión orgánico. Esta tendencia no está correlacionada con el tamaño del anión, ya que le afectan otros fenómenos como el establecimiento de puentes de hidrógeno con el catión. Aunque la influencia del catión en la viscosidad es menor, se ha observado que un aumento en la longitud de cadena del sustituyente alquílico del catión imidazolio supone un aumento en los valores de viscosidad, pudiendo ser ésta disminuida por el uso de cadenas muy ramificadas.

-**“Toxicidad y biodegradabilidad”**. Debido a las genuinas propiedades de los ILs, éstos se muestran como excelentes candidatos medioambientalmente “benignos” para sustituir a los disolventes moleculares convencionales. Pero su carácter verde ha sido ampliamente cuestionado debido principalmente al riesgo que sobre los ecosistemas podrían plantear y que debería ser evaluado (Bubalo *et al.*, 2014). Por esta razón muchos estudios y modelos se han planteado para evaluar este posible daño medioambiental. Alvarez-Guerra e Irabien (2011) han desarrollado un modelo con la intención de minimizar la consecuente consumición de tiempo y de recursos cada vez que haya que analizar dicho riesgo en ecosistemas acuáticos. Este modelo está basado en la estimación de la ecotoxicidad de los ILs, y consiste en ensayos estandarizados con la bacteria *Vibrio fischeri* y la aplicación de un modelo discriminante de mínimos cuadrados. También ha sido ampliamente objeto de estudio la toxicidad de ILs basados en cationes imidazolio, donde se ha visto como el incremento de la longitud de cadena de los sustituyentes alquílicos en el catión imidazolio aumentó el valor de toxicidad (EC50), mientras que la naturaleza aniónica del IL tuvo un menor efecto. Tras diferentes ensayos se ha visto como estos nuevos disolventes son mucho más tóxicos

Capítulo I

que los disolventes convencionales, por esta razón es altamente importante tener en cuenta su velocidad de degradación y su persistencia en el medio ambiente, así como su completa eliminación de la fase acuosa (Romero *et al.*, 2008).

LAS ENZIMAS EN LOS LÍQUIDOS IÓNICOS

Todas las enzimas son proteínas, macromoléculas poliméricas en base a una secuencia única de unidades de aminoácidos, que muestran un alto nivel de organización estructural 3-D, también llamado conformación. El mantenimiento de la conformación nativa se lleva a cabo de forma dinámica por un alto número de interacciones intramoleculares (i.e., enlaces débiles de hidrógeno, enlaces de Van der Walls), así como las interacciones con otras moléculas, principalmente agua como disolvente natural para la vida (Li y Cirino, 2014; Brown y Rabbitt, 2014). En efecto, las enzimas están diseñadas por las células para funcionar en medios acuosos dentro de un estrecho rango de condiciones ambientales (i.e., temperatura, pH, etc.), que de hecho representan los límites de la vida. Fuera de estas condiciones, las enzimas generalmente se vuelven inactivas debido a una pérdida en la conformación nativa a través del despliegue de la proteína.

Por otra parte, el enorme potencial de las enzimas como catalizadores en química, determinado por su alto nivel de actividad y selectividad (estéreo-, quimio- y regioselectividad), se encuentra estrechamente ligado a la conservación de su conformación nativa (Lozano, 2010a). Es de destacar, que las enzimas, como catalizadores de los sistemas vivos, constituyen claramente potentes herramientas para procesos químicos verdes. Hay que tener en cuenta que las enzimas normalmente se pliegan de tal manera que los residuos no polares están encerrados en un núcleo hidrófobo, mientras que los residuos polares tienden a moverse a la superficie, donde se hidratan. Los medios no convencionales, ofrecen sistemas idóneos para mantener ese microambiente de agua, necesario para conservar su conformación activa. Las proteínas anhidras son completamente inactivas, y es necesario una mínima cantidad de moléculas de agua para que puedan desempeñar su función catalítica, manteniendo las estructuras internas que conforman su centro activo, mediante la conservación de las fuertes interacciones con la capa de hidratación (Frauenfelder *et al.*, 2009; McMahoo *et al.*,

Capítulo I

2014). Por ello, los disolventes inmiscibles en agua (Arakawa *et al.*, 2007) permiten ofrecer una alta actividad enzimática, ya que se supone que una enzima hidratada colocada en un sistema hidrófobo seco está atrapada en el estado nativo, siendo capaz de mantener su actividad catalítica (Klibanov, 2001; Busto *et al.*, 2010; Humble y Berglund, 2011).

Los líquidos iónicos son excepcionales medios de reacción no acuosos para llevar a cabo tanto procesos quimio-catalíticos (Dupont *et al.*, 2002; Dupont y Scholten, 2010; Hallett y Welton, 2011; Dupont y Meneghetti, 2013) como biocatalíticos (Rantwijk y Sheldon, 2007; Roosen *et al.*, 2008; Itoh *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2015; Lozano *et al.*, 2015). Los ILs típicos usados más usados en los procesos biocatalíticos se basan en cationes orgánicos, por ejemplo, dialquilimidazolio, tetraalquilamonio, etc., junto con aniones que tienen una carga fuertemente deslocalizados, por ejemplo, el anión $[PF_6]$. En contraste con los disolventes orgánicos convencionales, la etiqueta verde de los ILs está encabezada por su carácter no volátil, lo que permite su plena recuperación para su posterior reutilización. Además, aquellos *no miscibles con agua*, son disolventes polares e higroscópicos y absorben fácilmente un pequeño porcentaje de agua (Aki *et al.*, 2001; Poole, 2004), lo que favorece la preservación del microambiente óptimo de la enzima. Como ejemplo representativo de ILs de interés en biocatálisis cabe citar el bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-butil-3-metilimidazolio ($[Bmim][NTf_2]$), IL prácticamente inmisible en agua (solubilidad del agua, 1.4%) (Bonhote *et al.*, 1996), hecho que le confiere una ventaja adicional interesante para entender su excelente idoneidad en la biocatálisis. La presencia de moléculas de agua esenciales en ILs es clave para el mantenimiento de las conformaciones de proteínas nativas en aplicaciones biocatalíticas. Aunque la investigación sobre las reacciones catalizadas por enzimas en líquidos iónicos comenzó en el año 2000 (Erbeldinger *et al.*, 2000; Madeira-Lau *et al.*, 2000), el uso de tales disolventes neotéricos en biotransformaciones se ha incrementado exponencialmente a más de 4.800 artículos publicados hasta hoy (Search in ISI Web of Knowledge, 2000-2016). Los investigadores se han centrado en primer lugar en la idoneidad de los líquidos iónicos como medios de reacción para la biocatálisis, a continuación, en la comprensión del comportamiento excepcional de biocatalizadores en algunos tipos de líquidos iónicos, y finalmente en el desarrollo de procesos verdes para la biotransformación y la separación del producto (Hobbs y Thomas, 2007; Rantwijk y Sheldon, 2007; Roosen *et al.*, 2008; Itoh *et al.*, 2009; Lozano, 2010a; Lozano *et al.*,

Capítulo I

2011a; Brown y Rabbitt, 2014; Knez *et al.*, 2014; Li y Cirino, 2014; Pollet *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2015; García-Verdugo *et al.*, 2015).

Para el caso de *líquidos iónicos miscibles en agua*, la actividad biocatalítica depende de la naturaleza y concentración de los iones, debido a la capacidad de algunos líquidos iónicos para desactivar las enzimas mediante el paso de agua. Como ejemplo, la alcalasa que cataliza la resolución enantioselectiva de N-acetil aminoácidos se ha mejorado en gran medida mediante el uso de 10% v/v de N-etilpiridiniotrifluoroacetato ([EPY][TFA]), pero se observó como la actividad cayó drásticamente a mayor concentración de IL (Zhao y Malhotra, 2002). En otro ejemplo, las mejores actividades para la oxidación del catecol catalizada por lacasa en [Bmim][Br] y [Bmim][N(CN)₂] se observaron a concentraciones entre un 10-20% y 50-60% (v/v) en agua, respectivamente, mientras que la actividad se redujo a mayor y menor concentraciones (Shiporskov *et al.*, 2008). Un comportamiento similar de la caída de la actividad de las enzimas en este tipo de ILs, se observó para otras enzimas (i.e., cloroperoxidasa, formiato deshidrogenasa, β-galactosidasa), y se atribuye a la miscibilidad del IL en agua (Rantwijk y Sheldon, 2007; Roosen *et al.*, 2008; Itoh *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2015).

Por otro lado, todos los *líquidos iónicos inmiscibles en agua* probados (i.e., [Bmim][NTf₂], [Bmim][PF₆], [Btma][NTf₂], etc.) se han mostrado como medios de reacción adecuados para biotransformaciones, apareciendo como alternativas viables a los disolventes orgánicos moleculares para la síntesis orgánica con bajo contenido de agua (Sheldon, 2007; Roosen *et al.*, 2008; Itoh *et al.*, 2009; Lozano, 2010a; Bernal *et al.*, 2012; Dominguez de María, 2012; Gog *et al.*, 2012; Dupont *et al.*, 2014; Pollet *et al.*, 2014; García-Verdugo *et al.*, 2015; Lourhino y Brito, 2015; Lozano *et al.*, 2015; Rantwijk y Gao *et al.*, 2015). Estos líquidos iónicos proporcionan un microambiente apropiado a las enzimas, debido a la conservación de la capa de hidratación esencial, lo que resulta en una mejora de la actividad y estabilidad (Lozano *et al.*, 2001; Persson y Bornscheuer, 2003; Kaar *et al.*, 2003; Baker *et al.*, 2004; De Diego *et al.*, 2004; De Diego *et al.*, 2005). Como ejemplo de estudios que abalan su bondad, demostrando como son capaces de mantener las estructuras secundarias de las proteínas, podemos destacar los realizados sobre monelina (Baker *et al.*, 2004), α-quimiotripsina (De Diego *et al.*, 2004) y CALB (De Diego *et al.*, 2005) en varios líquidos iónicos inmiscibles en agua (i.e., [Bmim][NTf₂], [Btma][NTf₂], [Bmpy][NTf₂]), llevados a cabo tanto por dicroísmo circular como por espectroscopia de fluorescencia, que correlacionan los

Capítulo I

fenómenos de estabilización de los líquidos iónicos con el mantenimiento de la estructura nativa de las enzimas, mostrando conformaciones flexibles y activas. Estos ILs forman una matriz iónica fuerte que retiene moléculas de enzima en un microambiente adecuado, lo que resulta en una red supramolecular capaz de mantener la conformación de la proteína activa debido a la conservación de una capa esencial de agua.

Por esta razón, también se ha recurrido al empleo de estos ILs como agentes para recubrir enzimas y estabilizarlas en medios no acuosos obteniendo biocatalizadores con mejor rendimiento en la actividad, estabilidad y enantioselectividad (Lozano *et al.*, 2007; Abe *et al.*, 2010; Yoshiyama *et al.*, 2013). Como ejemplo de esta aplicación tenemos el IL [1- (3'-fenilpropil) -3-metilimidazolio][PF₆], que aunque es sólido a temperatura ambiente, se convierte en líquido por encima de los 53°C, se utilizó para estabilizar la lipasa *P. cepacia* en fase líquida, que tras su enfriamiento y, disminución del tamaño de la mezcla sólida, se obtuvo un derivado de enzima inmovilizada útil con enantioselectividad marcadamente mejorada y sin perder ninguna actividad significativa hacia la reutilización (Lee y Kim, 2002). En otro ejemplo, se observó cómo la actividad y la estabilidad de la celulasa con cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio ([Bmim][Cl]), un IL miscible en agua que produce la rápida desactivación de la enzima (Turner *et al.*, 2003), donde su estabilidad se pudo mejorar en gran medida mediante el recubrimiento de las partículas inmovilizadas de la enzima con líquidos iónicos hidrofóbicos (i.e., [Bmim][NTf₂]) (Lozano *et al.*, 2011c), lo que permitió a su vez que la celulasa fuera capaz de catalizar la sacarificación de soluciones de celulosa en el IL-[Bmim][Cl] a 50°C. Se han estudiado también los líquidos iónicos formados por iones hidrófobos pero hidratados (es decir, más de siete moléculas de agua por un par de iones) que se aplicaron con éxito para la separación de proteínas activas solubles en agua por cambio de fase dinámica de estos líquidos iónicos (Kohno y Ohno, 2012; Ohno *et al.*, 2015).

Todos estos fenómenos se han atribuido a la característica estructural única de los líquidos iónicos (Rantwijk y Sheldon, 2007; Roosen *et al.*, 2008; Itoh *et al.*, 2009; Lozano, 2010a; Gao *et al.*, 2015; Lozano *et al.*, 2015).

Fue Dupont (Dupont y Braz, 2004; Dupont, 2011; Stassen *et al.*, 2015) quién describió la organización estructural de líquidos iónicos de imidazolio en fases sólida y líquida, que se basaba en la formación de una red extendida de cationes y aniones unidos entre sí por enlaces de hidrógeno (**Figura 4**).

Capítulo I

La unidad monomérica siempre está constituida por un catión imidazolio rodeado por al menos tres aniones y, a su vez, cada uno de aniones está rodeado por al menos tres cationes de imidazolio, en el que el enlace de hidrógeno más fuerte siempre implica el H más ácido, colocadas en posición C-2 del anillo de imidazolio. La red supramolecular también es mantenida por las interacciones típicas de apilamiento entre anillos heterocíclicos. Por lo tanto, también se observó como la incorporación de otras moléculas en la red del IL induce cambios en la organización estructural, y puede causar, en algunos casos (i.e., agua), la formación de regiones polares y no polares.

Los ILs hidratados se muestran como materiales nanoestructurados, que permiten a las moléculas neutras residir en las regiones polares, y a las especies iónicas o polares a difundirse más rápidamente en las regiones más polares o más ricas en agua (Dupont y Braz, 2004).

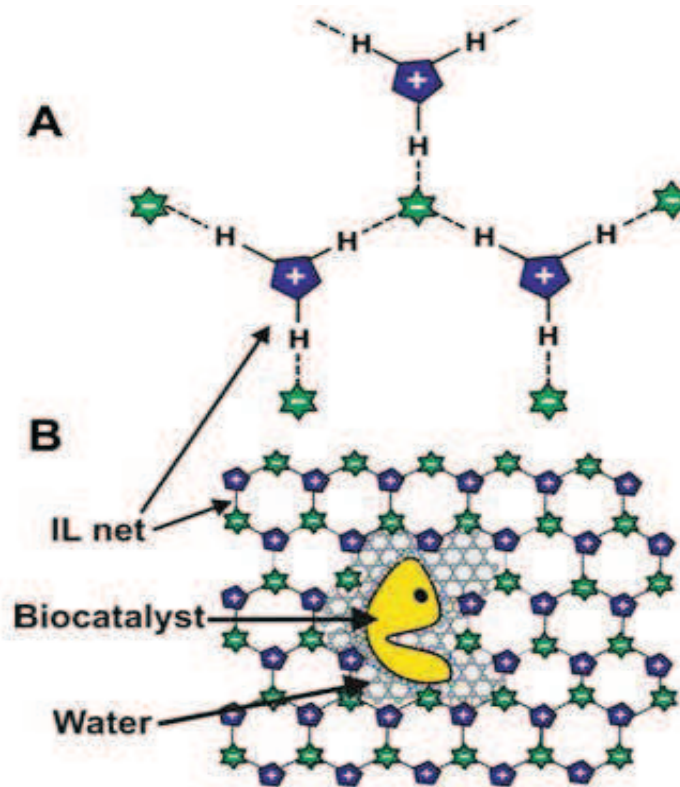


Figura 4 (A) Modelo bidimensional de la estructura supramolecular de los ILs con cationes imidazolio basados en interacciones de hidrógeno (Dupont y Braz ,2004; Dupont, 2011; Stassen *et al.*, 2015). (B) Descripción del esquema de la “inclusión” de la enzima en regiones húmedas dentro de la red de IL (Lozano *et al.*, 2001,2015, 2015a; Kaar *et al.*, 2003; Persson y Bornscheuer, 2003).

Capítulo I

De acuerdo con ello, las enzimas en líquidos iónicos inmiscibles en agua también deberían estar consideradas como incluidas en los huecos hidrófilos de la red, donde la estabilización observada de enzimas puede ser atribuida al mantenimiento de esta fuerte red alrededor de la proteína. Además, considerando un proceso enzimático clásico que se produce en agua mediante el aumento de la temperatura (Lozano *et al.*, 1994; Lozano *et al.*, 1997), el desplegamiento de la proteína podría también atribuirse a la interrupción de la organización estructural del medio, como consecuencia del aumento de la energía cinética de las moléculas de agua con el calor (Terpstra *et al.*, 1990; Athes *et al.*, 1998). La estructura supramolecular extremadamente ordenada de los líquidos iónicos en fase líquida puede ser capaz de actuar como un "molde" (Hayes *et al.*, 2015), manteniendo una estructura tridimensional activa de la enzima en nanoambientes acuosos, y evitando el desplegamiento clásico que se produce (Lozano *et al.*, 2001; Persson y Bornscheller, 2003; Kaar *et al.*, 2003; Lozano *et al.*, 2005; Lozano, 2010a; Pollet *et al.*, 2014).

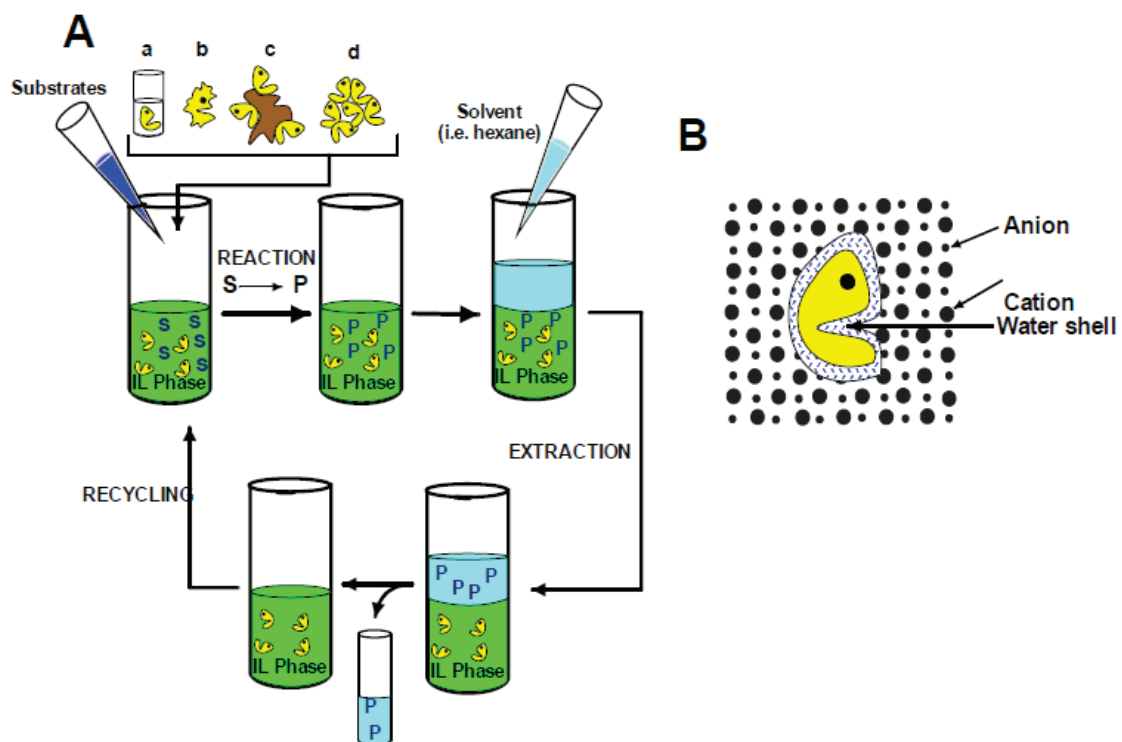


Figura 5. (A) Método para llevar a cabo reacciones catalizadas por enzimas en sistemas monofásicos basados en ILs, incluido el reciclaje y la separación del producto: (a) enzima en disolución acuosa; (a) enzima libre liofilizada; (c) enzima inmovilizada en soportes sólidos y (d) agregados de enzimas. (B) Representación de la molécula de enzima en ILs inmiscibles en agua (Lozano, 2010a).

Capítulo I

Clásicamente, las enzimas inmovilizadas obtenidas por unión química o física sobre soportes sólidos se han considerado ventajoso sobre las moléculas de enzima libres, ya que facilitan la recuperación y reutilización del biocatalizador, lo que permite el diseño de procesos continuos (Barbosa *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2013; Sheldon y Van Pelt, 2013) (**Figura 5**).

Sin embargo, en el caso de líquidos iónicos inmiscibles en agua, las moléculas de enzima libre en suspensión en estos medios se comportaban como biocatalizadores inmovilizados o anclados, debido a que no se pueden separar por extracción líquido-líquido (es decir, con tampón o soluciones acuosas). Por lo tanto, estos líquidos iónicos inmiscibles en agua deben ser considerados como un soporte de inmovilización de líquido, en lugar de un reactivo en el medio (Lozano *et al.*, 2001; Lozano *et al.*, 2015). Para eliminar las moléculas de proteína de los ILs, es necesario un filtro en la solución de enzima-IL a través de membranas de ultrafiltración con un tamaño de poro menor que el peso molecular de la enzima (Shöfer *et al.*, 2001; Kaftzik *et al.*, 2002).

PROCESOS BIOCATALÍTICOS SOSTENIBLES EN FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Como se ha mencionado anteriormente, los fluidos supercríticos (SCFs) son otra alternativa “ecológica o verde” a los disolventes orgánicos como medio para desarrollar procesos biocatalíticos sostenibles.

En cuanto a la biocatálisis, es bien sabido que las proteínas son insolubles en todos los SCF, lo que les permite ser fácilmente recuperados y reutilizados, mientras que la alta difusividad de gas y las bajas viscosidades de los SCF, mejoran las difusividades de los reactivos al sitio activo de las enzimas. Además, los productos pueden ser fácilmente liberados de trazas de disolventes, ya que los SCF se eliminan por simple despresurización (Mesiano *et al.*, 1999; Leitner *et al.*, 2002). Si se seleccionan las condiciones de presión y temperatura apropiadas, las enzimas son catalíticamente activas en SCFs. Aunque el CO₂, el etano, el propano, el butano, el SF₆ y el CHF₃ son fluidos típicos adecuados para la biocatálisis en condiciones supercríticas (**Tabla 2**), el dióxido de carbono supercrítico sigue siendo el SCF más popular para la biocatálisis por sus excelentes propiedades (Mesiano *et al.*, 1999). Además, el carácter químicamente inerte del CO₂ (Hobbs *et al.*, 2007) podría estar cuestionado en relación a su interacción

Capítulo I

con las proteínas, ya que el CO₂ forma carbamatos con grupos ε-amino de residuos de lisina colocados sobre la superficie de la enzima, disminuyendo el pH de la capa acuosa que rodea la enzima. Ambos fenómenos han estado directamente relacionados con la habitual desactivación enzimática observada en scCO₂ (Knez, 2009).

La estabilización enzimática basada en la inmovilización de enzimas sobre un soporte se ha convertido en una herramienta clave para desarrollar procesos biocatalíticos en SCFs. Aunque estos procesos se pueden realizar en tanques discontinuos de alta presión, al trabajar en sistemas de flujo continuo, de mayor interés debido a una serie de ventajas prácticas y técnicas (Leitner *et al.*, 2010; Sheldon *et al.*, 2012), como es la alimentación continua del reactor, facilita la transferencia de masa debido al aumento de la difusividad de los sustratos hacia el centro activo, además de permitirnos el aislamiento y purificación del producto.

Tabla 2. Fluidos usados para biocatálisis en condiciones cercanas a las supercríticas o supercríticas.

Fluido	D (g/l)	Tc (°C)	Pc (MPa)
Agua (H ₂ O)	348	374.3	22.12
Acetona (C ₃ H ₆ O)	278	235.1	4.70
Etanol (C ₂ H ₆ O)	276	240.9	6.14
Metanol (CH ₄ O)	272	239.6	8.09
Butano (C ₄ H ₁₀)	230	152.0	3.75
Propano (C ₃ H ₈)	217	96.7	4.25
Hexafluoruro de azufre (SF ₆)	755	45.5	3.77
Etano (C ₂ H ₆)	203	32.3	4.88
Fluoroformo (CHF ₃)	516	26.2	4.85
Metano (CH ₄)	162	-82.6	4.60
Dióxido de carbono (CO ₂)	469	31.3	7.29

Es de gran interés para la industria cosmética y farmacéutica la producción de ésteres de ácidos grasos de cadena larga (i.e., oleato de alquilo). A modo de ejemplo, se puede citar la síntesis enzimática de oleato de octilo mediante la reacción de esterificación entre el ácido oleico y el 1-octanol catalizada por la lipasa de *R. miehei* (Lipozyme^{RM}) inmovilizada sobre una resina de intercambio aniónico macroporosa en un reactor discontinuo y continuo en scCO₂, pudiendo alcanzar hasta un 93% de

Capítulo I

conversión y manteniendo la productividad durante 50 días (Laudani *et al.*, 2007) (Figura 6).

Se utilizó un reactor similar continuo para la resolución cinética de rac-1-feniletanol catalizada por Novozym 435 (hasta 99% de ee del producto), así como para la reacción de esterificación del geraniol con ácido acético en scCO₂ (rendimiento del producto próximo al 85%) (Couto *et al.*, 2011). Además la combinación de dicho reactor enzimático y las adecuadas condiciones supercríticas permitió mejorar los resultados debido a la disminución de las limitaciones difusionales, además de que fue posible la fácil recuperación del producto.

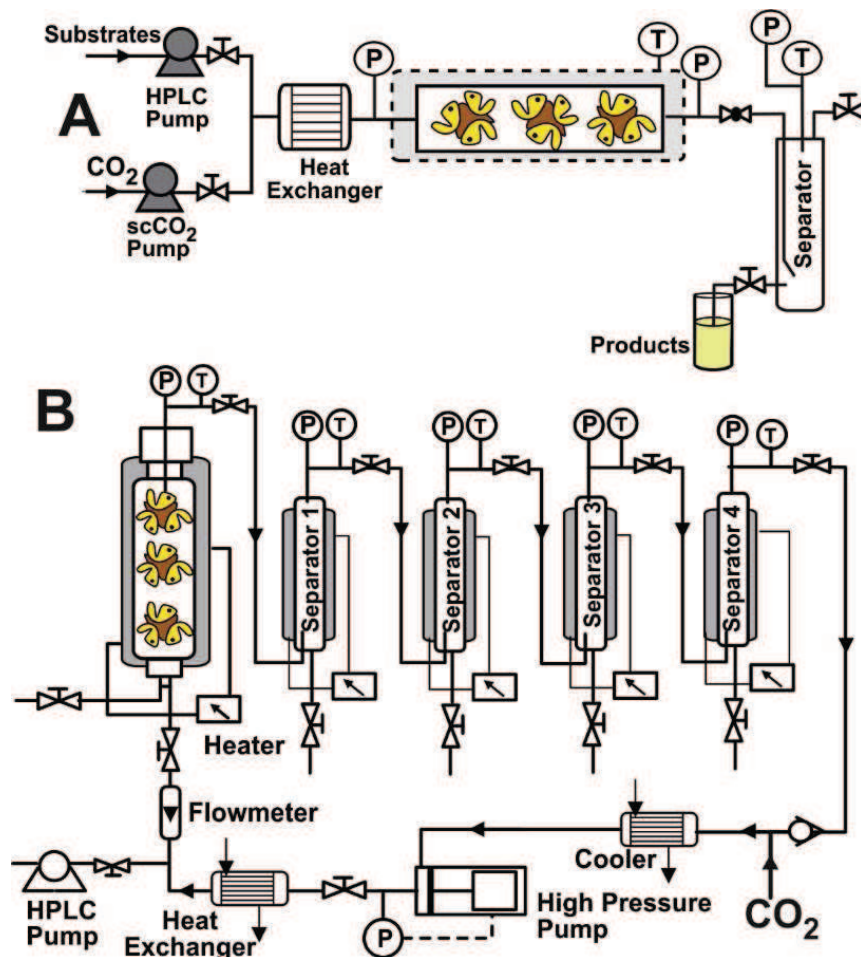


Figura 6. A Reactor de flujo continuo para la síntesis biocatalítica de oleato de octilo (Laudani *et al.*, 2007), acetato de R-1-fenil-etilo (Matsuda *et al.*, 2004) y acetato de geraniol en scCO₂ (Couto *et al.*, 2011). B. Proceso continuo para producir oleato de etilo combinando la reacción biocatalítica continua y scCO₂ (Marty *et al.*, 1994; Lozano *et al.*, 2015).

Capítulo I

Alternativamente, los reactores de lecho fijo pueden ser también fácilmente configurados mediante un montaje secuencial de flujo, bajo condiciones supercríticas, abriendo camino para llevar a cabo reacciones químicas en múltiples etapas (Luis *et al.*, 2009). Esto va a permitir el diseño de procesos quimocatalíticos y biocatalíticos en cascada de múltiples etapas, aumentando así el valor de los productos sintetizados. Un ejemplo representativo fue el estudio realizado por Poliakoff y colaboradores donde llevaron a cabo la hidrogenación en tándem de acetofenona catalizada por paladio (Pd) seguida de la resolución cinética del rac-1-feniletanol catalizada por el derivado enzimático inmovilizado de CalB (Novozym 435) en $scCO_2$ (Figura 7A) (Hobbs *et al.*, 2006).

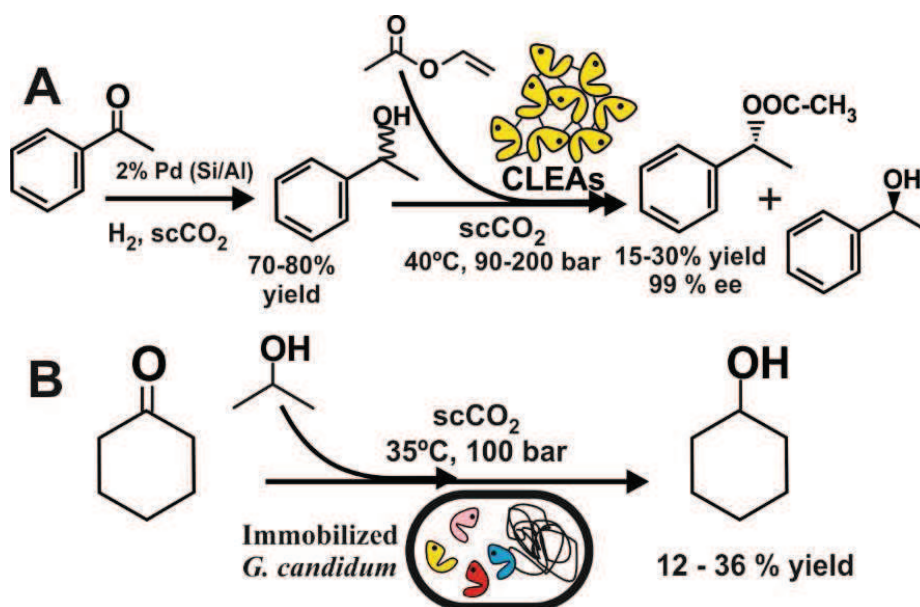


Figura 7. A. Hidrogenación de acetofenona catalizada por Pd acoplado a agregados enzimáticos cruzados (CLEAs) y resolución cinética (KR) del rac-1-feniletanol resultante en $scCO_2$ (Hobbs *et al.*, 2006). B. Reducción biocatalítica de ciclohexanona en $scCO_2$ (Matsuda *et al.*, 2003; Lozano *et al.*, 2015).

En este mismo ensayo, se evaluó la influencia de la naturaleza del catalizador mediante la preparación de agregados enzimáticos reticulados (CLEAs), que posteriormente se compararon con los resultados obtenidos por Novozym 435 (derivado enzimático sin reticular), donde se observó cómo estos CLEAs presentaron notables mejoras tanto en la conversión como en la selectividad de la reacción. Este trabajo mostró claramente cómo la realización de reacciones en serie presentaba una ventaja

Capítulo I

considerable sobre la realización de las reacciones por separado y en ausencia de SCF. Estos resultados permitieron incrementar la productividad económica del proceso global al acoplar la etapa quimio-catalítica a la enzimática, lo que permitió llevar a cabo la reacción en múltiples etapas con $scCO_2$.

Otro estudio a modo de ejemplo fue el realizado esta vez con células como biocatalizadores en procesos de flujo continuo con $scCO_2$. Se usaron células inmovilizadas de *G. Candidum* para la reducción continua de ciclohexanona en condiciones supercríticas (**Figura 7B**) (Matsuda *et al.*, 2003). El biocatalizador se recicló hasta cuatro veces con sólo una ligera pérdida de actividad. El reciclaje no fue posible utilizando el correspondiente sistema discontinuo porque los biocatalizadores no toleraban la despresurización repetida a muy baja temperatura, y por lo tanto fue necesario para llevar a cabo la separación del producto del biocatalizador usar disolventes orgánicos. Este método también se aplicó para la reducción asimétrica de o-fluoroacetofenona, logrando una enantioselectividad excelente ($ee > 99\%$) y un mayor rendimiento que el correspondiente al proceso discontinuo ($0,24 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ frente a $0,13 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$, a 35°C y 100 bares).

PROCESOS DE FLUJO EN DISOLVENTES NEOTÉRICOS

La combinación de ILs y $scCO_2$ da lugar a sistemas bifásicos con varias sinergias positivas, encabezadas por la estabilización de biocatalizadores, y la posibilidad de llevar a cabo la extracción de los productos hidrofóbicos de forma continua, lo que abre un abanico de nuevas oportunidades para desarrollar procesos verdes integrales en ambientes no acuosos. El trabajo pionero del grupo de Brennecke demostró que los ILs (i.e., [Bmim][PF₆]) y el $scCO_2$ forman sistemas bifásicos. Por lo tanto, la alta solubilidad de $scCO_2$ en la fase del IL, permitía extraer compuestos hidrófobos previamente disueltos (i.e., naftaleno), estos resultados permitieron desarrollar procesos para separar productos solubles en $scCO_2$ de los medios de reacción basados en ILs (Kazarian *et al.*, 2000; Kazarian *et al.*, 2002; Cadena *et al.*, 2004). Este descubrimiento fue clave para futuros desarrollos en procesos catalíticos multifásicos verdes que involucran etapas tanto de transformación química como de extracción del producto. La catálisis multifásica ofrece oportunidades prometedoras para desarrollar

Capítulo I

procesos químicos continuos (i.e., el catalizador funciona en una fase y el producto se suministra y extrae continuamente en la segunda fase) (Hobbs *et al.*, 2007; Lozano 2010a; García-Verdugo *et al.*, 2015).

La biocatálisis en sistemas bifásicos IL/scCO₂ se describió originalmente en 2002, para desarrollar procesos químicos completamente verdes en entornos no acuosos. Mediante este enfoque, el flujo de scCO₂ transporta el sustrato a la fase de IL que contiene el biocatalizador y extrae entonces el (los) producto (s) de la fase del IL. Posteriormente, los productos que se obtienen del reactor por simple descompresión están libres de IL, mientras que el CO₂ se puede reciclar por compresión. Además, si el producto de reacción no requiere ninguna purificación adicional, el proceso mejora la economía del proceso, porque el sistema funciona como una caja negra capaz de transformar sustratos puros en productos puros sin generación de residuos. Las biotransformaciones se producen luego en una fase de IL (fase catalítica), mientras que los sustratos y productos permanecen en gran parte en la fase de SCF (fase extractiva). Debe tenerse en cuenta que el conocimiento del comportamiento de fase de los sistemas IL/scCO₂ es esencial para desarrollar cualquier proceso, ya que determina las condiciones de contacto entre scCO₂ y soluto (Keskin *et al.*, 2007; Roth 2009).

Este enfoque biocatalítico verde se probó por primera vez en dos reacciones diferentes catalizadas por CALB: síntesis de ésteres alifáticos por transesterificación entre 1-alcánolos y ésteres vinílicos (i.e., butirato de butilo a partir de butirato de vinilo y 1-butanol) y la resolución cinética de rac-1-feniletanol. En estas condiciones, la enzima mostró un excepcional nivel de actividad, enantioselectividad ($ee > 99,9\%$) y estabilidad operativa (i.e., la enzima sólo perdió el 15% de actividad después de 11 ciclos de 4 h). Por lo tanto, también se pueden obtener excelentes resultados para las biotransformaciones con scCO₂ y los ILs incluso en condiciones extremas, es decir, 100 bares y 150°C (Lozano *et al.*, 2003). Mediante la selección apropiada del IL con respecto a las características polares de sustratos y productos, se puede además obtener mejoría de la productividad debido a una mejor transferencia de masa entre la fase del IL y el scCO₂ (Lozano *et al.*, 2004).

Capítulo I

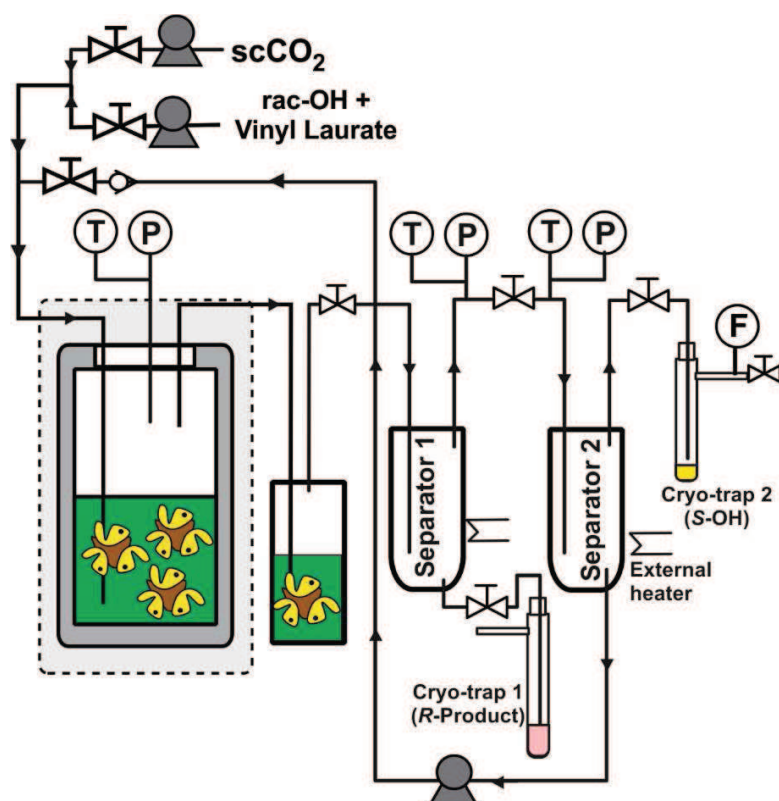


Figura 8. Esquema de un sistema de reacción/separación de flujo continuo para la resolución cinética enzimática y separación de enantiómeros usando IL y $scCO_2$ (P, control de la presión; T, control de temperatura; F, control de flujo) (Lozano *et al.*, 2004, 2015).

Un paso más hacia la biocatálisis verde en sistemas bifásicos IL/ $scCO_2$ fue la selección apropiada del donador de acilo en la resolución cinética catalizada por CALB (KR) de $rac\text{-1-feniletanol}$, debido a que la separación selectiva del producto sintético puede ser un paso integrado del proceso completo. Al aumentar la longitud de la cadena alquílica del donador de acilo (i.e., laurato de vinilo), el producto sintético estereoselectivo (i.e., laurato de R-1-feniletilo) puede separarse selectivamente del S-1-feniletanol no reaccionado con $scCO_2$ en dos crio-trampas diferentes (**Figura 8**). Este proceso aprovecha el hecho de que la solubilidad de un compuesto en $scCO_2$ depende tanto de la polaridad como de la presión de vapor. Por lo tanto, si la cadena alquílica de un producto éster es suficientemente larga, su baja volatilidad debería significar que es menos soluble en $scCO_2$ que el alcohol correspondiente. Sumando al proceso la introducción de dos cámaras de separación adicionales a una presión y temperatura apropiadas además dio como resultado la separación selectiva del producto sintético y el

Capítulo I

alcohol sin reaccionar de la mezcla de reacción (66% de rendimiento, ee > 99,9%) (Reetz *et al.*, 2003).

Los procesos multicatalíticos integrales, por el cual un sustrato inicial es transformado catalíticamente en un producto final en dos o más pasos catalíticos consecutivos en el mismo sistema de reacción, son de gran interés para la industria química (Luis *et al.*, 2009; García-Verdugo *et al.*, 2015). Un ejemplo de un proceso multicatalítico sostenible es la resolución cinética dinámica (DKR) de *sec*-alcoholes en sistemas bifásicos IL/scCO₂. Un procedimiento DKR se basa en la combinación de una reacción de resolución cinética enzimática (KR) con una racemización química *in situ* del enantiómero no deseado, que teóricamente debería permitir alcanzar hasta el 100% de un producto puro enantiomérico. Este enfoque se demostró con éxito combinando la CALB inmovilizada con una zeolita de tipo faujasita (CBV400) en un reactor de lecho compacto bajo scCO₂ a 50°C y 100 bar. Mediante el recubrimiento tanto de los catalizadores químicos como enzimáticos con el IL-[Btma][NTf₂], se obtuvo directamente un producto enantiomérico casi puro (98% de rendimiento, 96% ee) a la salida del reactor durante 14 días de funcionamiento continuo y sin ninguna pérdida en la actividad enzimática (Lozano *et al.*, 2009). Este trabajo mostró claramente el enorme potencial de los sistemas multicatalíticos (enzimáticos o quimio-enzimáticos) en ILs/scCO₂ para la síntesis de fármacos ópticamente activos de manera sostenible.

Un paso más hacia los sistemas bifásicos de IL/scCO₂ optimizados surgió del desarrollo de la inmovilización de los ILs sobre soportes sólidos. La inmovilización facilita su fácil separación, permitiendo el desarrollo de procesos de flujo continuo y evitando derrames accidentales. Esto es importante a la luz de los problemas toxicológicos y ecotoxicológicos recientemente planteadas por algunos ILs. Además, reducen el coste del proceso, debido a la menor cantidad de líquido iónico involucrado.

La inmovilización de los ILs en un soporte de material estructurado, puede realizarse por diferentes métodos: impregnación, adsorción, unión covalente, etc. En términos generales, los líquidos iónicos soportados en fase sólida, son comúnmente denominados SILPs (*“Supported Ionic Liquid Phases”*) (Lozano *et al.*, 2002; Lozano *et al.*, 2003; Lozano *et al.*, 2004; Lozano 2010). Pero los líquidos iónicos soportados mediante enlace covalente en superficies poliméricas, reciben el nombre de SILLPs (*“Supported Ionic Liquid Like-Phases”*) (Kim *et al.*, 2004; García-Verdugo *et al.*, 2015). El desarrollo de diferentes matrices poliméricas para su posterior aplicación

Capítulo I

como soportes ha sido de amplio objeto de estudio. La estructura polimérica y los grupos funcionales que la conforman, así como la morfología resultante, son de vital importancia para su uso como soportes catalíticos, pues se ha demostrado que las propiedades del catalizador varían en función del tipo de soporte polimérico.

Se ha caracterizado una gran diversidad de SILLPs con diferentes cationes, aniones, así como una naturaleza de soporte y carga variable, incluyendo su estabilidad térmica y polaridad. Por lo tanto, los SILLP podrían considerarse como "disolventes sólidos" o como materiales nanoestructurados con microambientes de polaridad sintonizable capaces de inmovilizar y estabilizar las especies catalíticas.

Lozano y colaboradores (Lozano *et al.*, 2007) demostraron la eficiencia de estos sistemas en $scCO_2$ para llevar a cabo la síntesis de propionato de citronelilo comparados con los tradicionales de recubrimiento de la enzima con IL. Para ello prepararon columnas de monolitos (ILs soportados) en las cuales inmovilizaron a CALB. Estos biorreactores se diseñaron para trabajar en sistemas de miniflujo para la síntesis continua en $scCO_2$ de este aroma mediante transesterificación. La actividad catalítica de estos mini-reactores de flujo permaneció prácticamente constante durante 7 ciclos operacionales de 5h cada uno, en diferentes condiciones supercríticas. Este mismo grupo demostró nuevamente la bondad de estos sistemas, pero esta vez utilizando CALB inmovilizada en diferentes resinas poliméricas en las cuales el IL estuvo unido covalentemente al soporte, para llevar a cabo una reacción estereoespecífica, como es la resolución cinética (KR) del *rac*-1-feniletanol por lotes y de forma continua. Los biocatalizadores mostraron buenos rendimientos en un disolvente orgánico convencional (hexano) y en dióxido de carbono supercrítico ($scCO_2$) (Lozano *et al.*, 2010). La DKR utilizando una combinación de CALB-SILLP y zeolita (CP811E-150) en el mismo reactor produjo un proceso no selectivo (63% ee), donde se produjeron ambos enantiómeros del éster. La baja selectividad se puede atribuir a la transesterificación del (S)-1-feniletanol por la zeolita. Por esta razón, al recubrir la zeolita tipo beta con un IL hidrófobo se logró reducir significativamente su actividad racemizante y la reacción secundaria (acilación). Esto fue debido al hecho de que la monocapa del IL aumentó la transferencia de masa de los reactivos a los sitios activos y también aisló de los sitios ácidos la eventual presencia de agua en el sistema. Se observaron rendimientos alrededor del 70% con un aumento significativo de la enantioselectividad (R-éster (> 99,9% ee)). Por último, al reducir el flujo del sistema

Capítulo I

con el fin de aumentar el rendimiento del proceso, se obtuvieron rendimientos del (R)-éster del 92% con una excelente enantioselectividad ($> 99,9\%$) (Lozano *et al.*, 2010b).

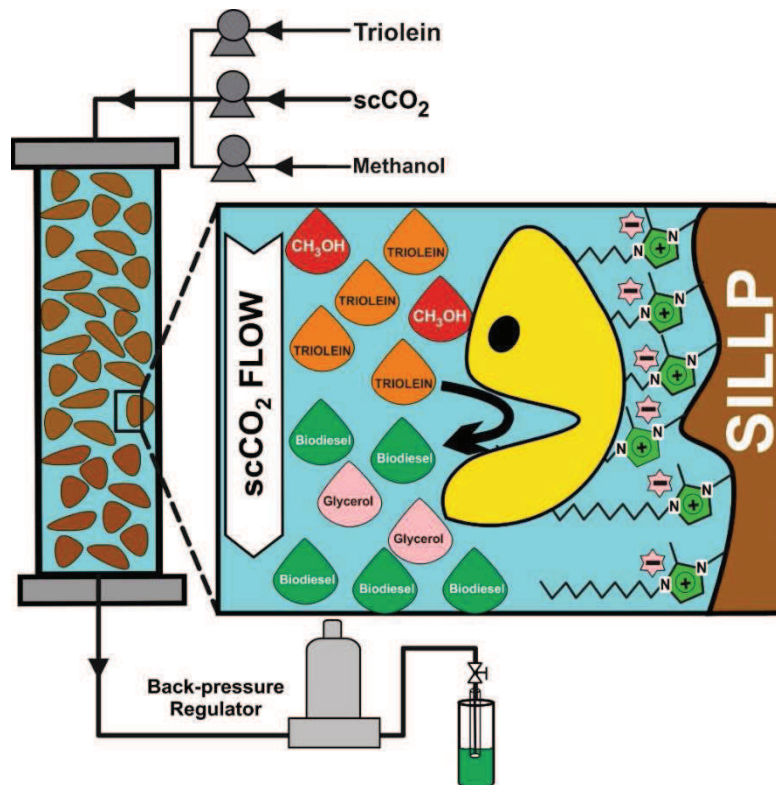


Figura 9. Esquema de un reactor de flujo continuo basado en CALB inmovilizada sobre SILLPs para la síntesis de biodiesel en scCO₂ (Lozano *et al.*, 2012, 2015).

En otro ejemplo, se utilizaron diferentes soportes nanoestructurados, basados en diferentes cationes de 1-decil-2-metilimidazolio unidos covalentemente a una matriz porosa de poliestireno-divinilbenceno (SILLP), como vehículos para inmovilizar CALB. La idoneidad de estos derivados de lipasa inmovilizados para llevar a cabo la síntesis de biodiesel (oleato de metilo) por metanolisis de trioleina se ha probado tanto en terc-butanol como en scCO₂ (180 bares, 45 °C) como medio de reacción (**Figura 9**). El uso de soportes modificados con baja carga de IL unidos covalentemente a las principales cadenas de cadena polimérica, proporcionan materiales estructurados que conducen a los mejores rendimientos de biodiesel (hasta 95%) y estabilidad operativa (85% de rendimiento de biodiesel después de 45 ciclos de 8-4 h) en scCO₂ (45 °C, 180 bar). La presencia de t-butanol, como cosolvente inerte, en la fase de scCO₂ fue clave

Capítulo I

para evitar el envenenamiento del biocatalizador por el glicerol como subproducto. Estos resultados muestran el enorme potencial de los biocatalizadores soportados en SILLPs para la producción de biodiesel mediante una tecnología completamente verde (Lozano *et al.*, 2012).

APLICACIONES DE LOS LÍQUIDOS IÓNICOS EN LA TECNOLOGÍA DEL ADN

Los ácidos nucleicos son biopolímeros caracterizados por una gran flexibilidad conformacional, lo que permite su adaptación a diferentes condiciones ambientales. En este sentido, los ILs se presentan como nuevos medios para su solubilización, permitiendo así desde su aislamiento hasta la estabilización de su estructura conformacional, lo que permitirá desarrollar posibles aplicaciones tecnológicas futuras.

En este contexto, el estudio de las curvas de fusión UV de las secuencias de ADN ha demostrado que los pares de bases A-T son más estables en el IL hidrolizado de colina dihidrogenofosfato (CDP) que los pares de bases G-C en comparación con el estudio realizado en medio acuoso. Este IL también aumentó la estabilidad de las interacciones de Hoogsteen, las cuales fueron comparables a las establecidas por los pares de bases de Watson-Cricks, que se basan en interacciones electrostáticas entre los cationes orgánicos de la red del IL con el esqueleto fosfato del ADN, mientras que los aniones forman principalmente enlaces de hidrógeno con las bases citosina, adenina y guanina. Todas estas interacciones son responsables de la alta estabilidad de la estructura del ADN de doble hebra (dsADN) en los ILs, los cuales permiten mantener la estructura cristalina de la forma B nativa. Además, estos ILs evitan el plegado apropiado de las proteínas, a modo de ejemplo se encuentran las nucleasas que ayudan a reducir la degradación del ADN durante su almacenamiento (Tateishi-Karimata *et al.*, 2014).

Otra aplicación de los ILs, debido a la alta estabilidad de los dsADN y la triple hélice del ADN, es que han hecho posible el uso de sondas que reconocen una secuencia específica sin un paso previo de desnaturalización. Esto simplifica la metodología de los sistemas para detectar secuencias de ADN particulares, tales como microarrays de ADN, transferencia de Southern o hibridación *in situ*, de gran relevancia en medicina.

Capítulo I

Debe destacarse la especial relevancia del G-quadruplex en los sistemas biológicos, especialmente en el cáncer. Por ejemplo, en telómeros humanos, donde inhiben la actividad telomerasa, y en las regiones promotoras de oncogenes, donde regulan la expresión génica. Los cuadruplex G son altamente polimórficos según las condiciones de los medios o diferentes estímulos, lo que ha generado un gran interés en aplicaciones no biológicas como catalizadores, biosensores y estructuras basadas en ADN. Puesto que para muchas aplicaciones las condiciones deben ser estrictamente anhidras, los disolventes eutécticos profundos (DESs, que comparten la mayoría de las cualidades notables de los ILs pero difieren en la presencia de un componente molecular orgánico no iónico como constituyente predominante) proporcionan un medio libre de agua que estabiliza los cuadruplex G en su conformación paralela favorecida.

Relacionada con esta característica de la biosensibilidad molecular a través de los cambios estructurales en las secuencias de ADN, los aptámeros son ácidos nucleicos de cadena sencilla (ssADN o ARN) que reconocen específicamente dianas deseadas, tales como proteínas, aminoácidos, antibióticos o moléculas pequeñas. De este modo, Machado y colaboradores estudiaron la influencia del nitrato de etilamonio en la capacidad de reconocimiento molecular de un aptámero de AMP a altas concentraciones, este IL redujo la estabilidad térmica de la estructura intramecular dsADN de la sonda, y aceleró la tasa de hibridación de ssADN. Sin embargo, esta característica excepcional de aumento de la estabilidad de los ácidos nucleicos en ILs no sólo está ligada al ADN como se puede ver en la **Figura 10**, el IL-CDP (colina fosfato hidratada) es capaz de prolongar la vida de un pequeño ARN interferente (siRNA) durante un máximo de tres meses, incluso en presencia de RNAsa A. El uso de ILs como disolventes ofrece una oportunidad extraordinaria para siRNA, que es el principal problema en la estrategia de silenciar la expresión génica. De esta manera, también se ha estudiado como el IL-tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato de guanidinio (Gua-IL) puede aumentar las atracciones entre las moléculas de ADN mediante interacciones electrostáticas.

La excelente idoneidad de ILs para disolver y estabilizar ADNs ha abierto la puerta a ensayos en el aislamiento y purificación de ADN a partir de soluciones acuosas. La extracción de ADN representa un avance significativo en muchas aplicaciones debido a la complejidad de aislar el ADN altamente puro de una matriz celular o de muestras ambientales complejas.

Capítulo I

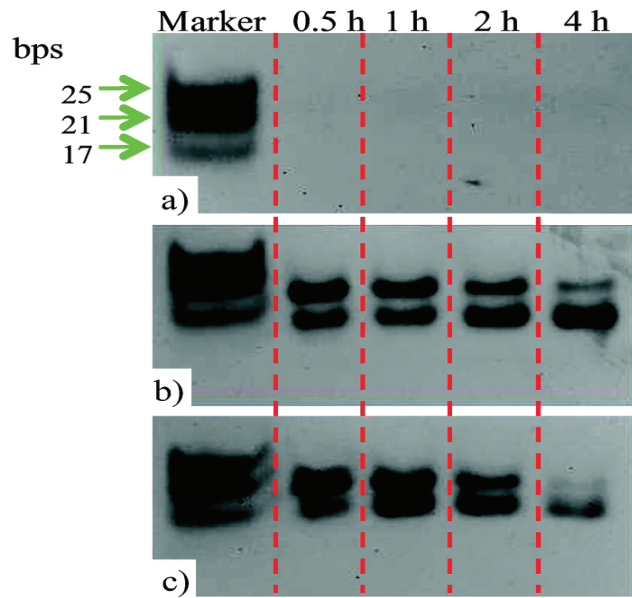


Figura 10. Perfil de degradación de siRNA en (A) tampón fosfato, (B) 20% (p/p) de IL-CDP y (C) 50% (p/p) de IL-CDP después de incubar durante intervalos de tiempo especificados en una solución de RNAsa A. a 37°C (Mazid *et al.*, 2014).

La necesidad de eliminar contaminantes como proteínas, moléculas orgánicas pequeñas, polisacáridos, fosfolípidos, así como disolventes orgánicos que pueden interferir, ha fomentado el desarrollo de nuevas metodologías con alto rendimiento, pureza y recuperación. Uno de los primeros intentos fue el uso de ILs para la microextracción líquido-líquido dispersiva *in situ* de ADN. Este método mostró una alta eficiencia de extracción de ADN, aunque la recuperación de ADN del IL no fue posible. Desde entonces, se han llevado a cabo diversos enfoques, como el empleo de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 (NPs) modificadas con $[\text{C}_6\text{Mim}][\text{Br}]$ (bromuro de 1-hexil-3-metilimidazolio), lo que permitió mejorar la tasa de adsorción de ADN y posterior decaído para su reciclaje. En el mismo ámbito, se estudió un método rápido para la extracción de ADN plasmídico basado en microesferas poliméricas de IL (PIL, poli[1-vinil-3-(2-metoxi-2-oxietil)imidazolio][PF_6]). Este IL exhibió una excelente capacidad de adsorción/extracción de ADN (hasta 190,7 μg de ADN/mg de PIL) con respecto a otros métodos descritos hasta la fecha, y una fácil separación de las microesferas simplemente regulando la concentración de sal. Aún más, la aplicación de los ILs en la extracción de ADN se ha mejorado introduciendo disolventes magnéticos hidrofóbicos de ILs que combinan la afinabilidad del IL con la naturaleza magnética del

Capítulo I

disolvente. Este IL magnético permitió evitar los pasos de centrifugación que consumen tiempo y pueden afectar a la calidad del ADN aislado. Además, los ILs se presentan como una estrategia clave para resolver problemas técnicos graves en Biología Molecular, como la escasa amplificación de secuencias de ADN ricas en GC por PCR.

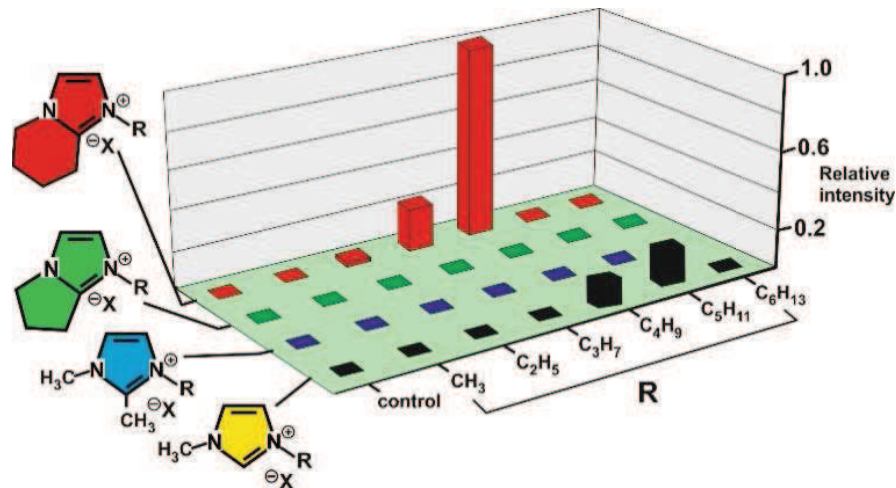


Figura 11. Cribado de ILs (70 mM) para promover la amplificación por PCR de un fragmento de genes ricos en GC (contenido de GC al 80%), 266 pb (Shi *et al.*, 2012).

Estas secuencias son muy comunes en los elementos promotores que regulan la expresión génica, y hay un obstáculo para varios propósitos en los que la PCR se utiliza habitualmente, como son la secuenciación y replicación de genes, detección y diagnóstico de enfermedades, identificación forense de huellas genéticas o manipulación de genes de organismos transgénicos. Por lo tanto, se ha demostrado que un IL bicíclico de imidazolio, es altamente eficaz no sólo para promover la PCR de ADN rico en GC reduciendo al mínimo la amplificación no específica, sino también facilitar la PCR en condiciones suaves del ADN normal rico en pares de bases de GC (**Figura 11**) (Shi *et al.*, 2012).

Por último, también debe señalarse el potencial de las aplicaciones de los ILs en el campo de los nanobiosensores. De este modo, se estudió la combinación de los ILs con nanomateriales para la hibridación y detección del ADN, el desarrollo de ADN con alta conductividad iónica utilizando ILs, así como electrodos compuestos de IL de carbono (CLILE) para inmovilizar sondas de ssADN. Este electrodo mostró una alta tasa de reconocimiento, buena estabilidad y alto grado de discriminación entre las

Capítulo I

secuencias de ADN. Por ello, los ILs han demostrado una excelente idoneidad para una amplia gama de aplicaciones en medicina y nanotecnología en un futuro próximo.

Capítulo I

BIBLIOGRAFÍA

- Abe Y., Yoshiyama K., Yagi Y., Hayase S., Kawatsura M., Itoh T., **2010**. *Green Chem.*, 12, 1976-1980.
- Abe Y., Yagi Y., Hayase S., Kawatsura M., Itoh T., **2012**. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 51, 9952–9958.
- Aki S. N. V. K., Brennecke J. F., Samanta A., **2001**. *Chem. Commun.*, 413-414.
- Alvarez-Guerra M., Irabien A., **2011**. *Green Chem.* 13, 1507.
- Anastas P.T.; Warner J.C., **1998**. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York, p 30.
- Anastas P.T., Kirchoff M.M., Williamson T.C., **2001**. *Appl. Catal. A Gen.*, 221, 3–13.
- Ansorge-Schumacher M. B., Thum O., **2013**. *Chem. Soc. Rev.*, 42, 6475-6490.
- Applegate G. A., Berkowitz D. B., **2015**. *Adv. Synth. Cat.*, 357, 1619-1632.
- Arakawa T., Kita Y., Timasheff S. N., **2007**. *Biophys. Chem.*, 131, 62-70.
- Athes V., Combes D., Zwick A., **1998**. *J. Raman Spectrosc.*, 29, 373-378.
- Baker S. N., McCleskey T. M., Pandey S., Baker G. A., **2004**. *Chem. Commun.*, 940-941.
- Barbosa O., Ortiz C., Berenguer-Murcia A., Torres R., Rodrigues R. C., Fernandez-Lafuente R., **2014**. *RSC Adv.*, 4, 1583-1600.
- Bernal J. M., Lozano P., Garcia-Verdugo E., Burguete M. I., Sanchez-Gomez G., Lopez-Lopez G., Pucheault M., Vaultier M., Luis S. V., **2012**. *Molecules*, 17, 8696-8719.
- Bhargava B. L.; Balasubramanian S. Klein M. L., **2008**. Modelling room temperature ionic liquids. *Chem. Commun.*, 3339-335.
- Bonhôte P., Dias A.P., Papageorgiou N., Kalyanasundaram K., Grätzel M., **1996**. *Inorg. Chem.*, 35, 1168–1178.
- Brown S. D., Babbitt P. C., **2014**. *J. Biol. Chem.*, 289, 30221-30228.
- Bubalo M.C., Radosevic K.; Redovnikovic I.R.; Halambek J.; Srcek V.G., **2014**. *Ecotoxicol. Env. Safety.*, 99, 1-12.
- Buchner E., Rapp R., **1901**. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 34, 1523-1530.
- Buchner E., Meisenheimer J., **1903**. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 36, 634-638.
- Busacca C. A., Fandrick D. R., Song J. J., Senanayake C. H., **2011**. *Adv. Synth. Cat.*, 353, 1825-1864.
- Busto E., Gotor-Fernandez V., Gotor V., **2010**. *Chem. Soc. Rev.*, 39, 4504-4523.
- Cadena C., Anthony J. L., Shah J. K., Morrow T. I., Brennecke J. F., Maginn E. J., **2004**. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 5300-5308.
- Chiappe C., Malvaldi M., Pomelli C.S., **2009**. *Pure Appl. Chem.*, 81, 767–776.
- Clouthier C. M., Pelletier J. N., **2012**. *Chem. Soc. Rev.*, 41, 1585-1605.
- Couto R., Vidinha P., Peres C., Ribeiro A. S., Ferreira O., Oliveira M. V., Macedo E. A., Loureiro J. M., Barreiros S., **2011**. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50, 1938-1946.
- Currin A., Swainston N., Day P. J., Kell D. B., **2015**. *Chem. Soc. Rev.*, 44, 1172-1239.
- De Diego T., Lozano P., Gmouh S., Vaultier M., Iborra J. L., **2004**. *Biotechnol. Bioeng.*, 88, 916-924.
- De Diego T., Lozano P., Gmouh S., Vaultier M., Iborra J.L., **2005**. *Biomacromolecules*, 6, 1457-1464.
- De la Hoz A., Diaz-Ortiz A., Moreno A., **2005**. *Chem. Soc. Rev.*, 34, 164–178.
- Dominguez P., **2008**. *Chem. Intl. Ed.*, 47, 6960-6968.
- Dominguez P., Maugeri Z., **2011**. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 15, 220-225.

Capítulo I

- Dominguez de Maria P., **2012**. (Ed.) *Wiley-VCH*.
- Dupont J., de Souza R. F., Suarez P. A. Z., **2002**. *Chem. Rev.*, 102, 3667-3699.
- Dupont J., Braz J., **2004**. *Chem. Soc.*, 15, 341-350.
- Dupont J., Scholten J. D., **2010**. *Chem. Soc. Rev.* 39, 1780-1804.
- Dupont J., **2011**. *Acc. Chem. Res.*, 44, 1223-1231.
- Dupont J., Meneghetti M. R., **2013**. *Curr. Opin. Colloid In.* 18, 54-60.
- Dupont J., Itoh T., Lozano P., Malhotra S. V., **2014**. (Eds). *CRC Press-Taylor & Francis*.
- Earle M.J., Esperança J.M.S.S., Gilea M.A., Lopes J.N.C., Rebelo L.P.N., Magee J.W., Seddon K.R., Widegren J.A., **2006**. *Nat.*, 439, 831-4.
- Erbeldinger M., Mesiano A. J., Russell A. J., **2000**. *Biotechnol. Prog.*, 16, 1129-1131.
- Farran A., Cai C., Sandoval M., Xu Y. M., Liu J., Hernaiz M. J., Linhardt R. J. **2015**. *Chem. Rev.*, 115, 6811-6853.
- Fernandez-Lafuente R., **2010**. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 62, 197-212.
- Foro Química y Sociedad, **2012**. *RSEQ-ANQUE-FEIQUE*.
- Frauenfelder H., Chen G., Berendzen J., Fenimore P. W., Jansson H., McMahon B.H., Stroe I. R., Swenson J., Young R.D., **2009**. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 106, 5129-5134.
- Gao W. W., Zhang F. X., Zhang G. X., Zhou C. H., **2015**. *Biochem. Eng. J.*, 99, 67-84.
- García-Verdugo E., Altava B., Burguete M. I., Lozano P., Luis S. V., **2015**. *Green Chem.*, 17, 2693-2713.
- Gog A., Roman M., Tosa M., Paizs C., Irime F., **2012**. *Renew. Energ.*, 39, 10-16.
- Gotor-Fernandez V., Gotor V., **2009**. *Curr. Opin. Drug Discov. Develop.*, 12, 784-797.
- Hallett J. P., Welton T., **2011**. *Chem. Rev.* 111, 3508-3576.
- Hayes R., Warr G. G., Atkin R., **2015**. *Chem. Rev.*, 115, 6357-6426.
- Hobbs H. R., Kondor B., Stephenson P., Sheldon R. A., Thomas N. R., Poliakov M., **2006**. *Green Chem.*, 8, 816-821.
- Hobbs H.R., Thomas N.R., **2007**. *Chem. Rev.*, 107, 2786-820.
- Horváth I.T., Rábai J., **1994**. *Sci.*, 266, 72-5.
- Horvath I.T., **1998**. *Acc. Chem. Res.*, 31, 641-650.
- Humble M.S., Berglund P., **2011**. *Eur. J. Org. Chem.*, 19, 3391-3401.
- Itoh T. **2009**. *J. Synth. Org. Chem. Japan*, 67, 143-155.
- Izquierdo D.F., Bernal J.M., Burguete M.I., García-Verdugo E., Lozano P., Luis S.V., **2013**. *RSC Adv.*, 3, 13123-13126.
- Jessop P.J., Leitner W., **1999**. *Wiley-VCH*, Weinheim.
- Jessop P.G., Jessop D.A., Fu D., Phan L., **2012**. *Green Chem.*, 14, 1245.
- Kaar J. L., Jesionowski A. M., Berberich J. A., Moulton R., Russell A. J., **2003**. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 4125-4131.
- Kazarian S.G., Briscoe T. Welton B. J., **2000**. *Chem. Commun*, 2047-2048.
- Kazarian S. G., Sakellarios N., Gordon C. M., **2002**. *Chem. Commun.*, 1314-1315.
- Kaftzik N., Wasserscheid P., Kragl U., **2002**. *Org. Proc. Res. Dev.*, 6, 553-557.
- Keskin S., Kayrak-Talay D., Akman U., Hortaçsu O., **2007**. *J. Supercrit. Fluids*, 43, 150-180.
- Kim D. W., Chi D. Y. **2004**. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 483-485.
- Klähn M., Lim G. S., Seduraman A., Wu P. **2011**. *Chem. Phys.*, 13, 1649-1662.

Capítulo I

- Klibanov A.M., **2001**. *Nature*, 409 241-245.
- Knez. J. **2009**. *Supercrit. Fluids*, 47, 357-372
- Knez Z., Markocic E., Leitgeb M., Primožic M., Hrncic M. K., Skerget M., **2014**. *Energy*, 77, 235-243.
- Koel, **2000**. *Proc. Est. Acad. Sci. Chem.* 49, 1.
- Kohler V., Turner N.J., **2015**. *Chem. Commun.*, 51, 450-464.
- Kohn Y., Ohno H., **2012**. *Chem. Commun.*, 48, 7119-7130
- Kumar A., Singh S., **2013**. *Curr. Rev. Biotechnol.*, 4, 365-378.
- Laudani C. G., Habulin M., Knez Z., Porta G. D., Reverchon E., **2007**. *J. Supercrit. Fluids*, 41, 74-81.
- Lee J. K., Kim M. J., **2002**. *J. Org. Chem.*, 67, 6845.
- Leitner W., **2002**. *Chem. Res.*, 35, 746-56.
- Leitner W., Jessop P.G. (eds), **2010**. Wiley-VCH, *Handbook of Green Chemistry-Green Solvents: Supercritical Solvents*, vol. 4.
- Li C.J., Trost B.M., **2008**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105,13197-202.
- Li Y., Cirino P. C., **2014**. *Biotechnol. Bioeng.*, 111, 1273-1287.
- Lourinho G., Brito P., **2015**. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 14, 287-316.
- Lozano P., Combes D., Iborra J. L., **1994**. *J. Biotechnol.*, 35, 9-18.
- Lozano P., De Diego T., Iborra J. L., **1997**. *Eur. J. Biochem.*, 248, 80-85.
- Lozano P., De Diego T., Carrie D., Vaultier M., Iborra J.L., **2001**. *Biotechnol. Lett.*, 23, 1529-1533.
- Lozano P., De Diego T., Carrié D., Vaultier M., Iborra J. L., **2002**. *Chem. Commun*, 692-693.
- Lozano P., De Diego T., Carrié D., Vaultier M., Iborra J. L., **2003**. *Biotechnol. Prog.*, 19, 380-382.
- Lozano P., De Diego T., Gmouh S., Vaultier M., Iborra J. L., **2004**. *Biotechnol. Prog.*, 20, 661-669.
- Lozano P., De Diego T., Gmouh S., Vaultier M., Iborra J.L., **2005**. *Biocatal. Biotransfor.*, 23, 169-176.
- Lozano P., de Diego T., Iborra J.L., **2006**. *Humana Press Inc. Totowa, N.J., USA. Vol. 22. (Ed. J.M. Guisan). 257 – 268.*
- Lozano P., Garcia-Verdugo E., Piamtongkam R., Karbass N., De Diego T., Burguete M. I., Luis S. V., Iborra J. L., **2007**. *Adv. Synth. Catal*, 349, 1077-1084.
- Lozano P., De Diego T., Iborra J.L., **2009a**. *Green Chemistry – Green Catalysis, Vol. 3: Biocatalysis*, (Ed. Robert H. Crabtree). 51-73. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Lozano P., **2010a**. *Green Chem.* 12, 555-569.
- Lozano P., García-Verdugo E., Karbass N., Montague K., De Diego T., Burguete M. I., Luis S. V., **2010b**. *Green Chem.*, 12, 1803-1810.
- Lozano P., García-Verdugo E., Luis S.V., Pucheault M., Vaultier M., **2011a**. *Curr. Org.Synth.*, 8, 810-823.
- Lozano P., Bernal J.M., Vaultier M., **2011b**. *Fuel*, 90, 3461-3467.
- Lozano P., Bernal B., Bernal J.M., Pucheault M., Vaultier M., **2011c**. *Green Chem.*, 13, 1406-1410.
- Lozano P., García-Verdugo E., Bernal J. M., Izquierdo D. F., Burguete M.I., Sánchez-Gómez G. y Luis S. V. **2012**. *ChemSusChem*, 5,790 – 798.
- Lozano P., Bernal J. M., Nieto S., Gómez C., García-Verdugo E., Luis S. V., **2015**. *Chem. Commun.*, 51, 17361.
- Lozano P., Bernal J. M., Garcia-Verdugo E., Sanchez-Gomez G., Vaultier M., Burguete M. I., Luis S. V., **2015a**. *Green Chem.* 17, 3706-3717.

Capítulo I

- Luis S. V., Garcia-Verdugo E. G., **2009**. *RSC, Green Chemistry Series*.
- Luska K. L., Migowski P., Leitner W., **2015**. *Green Chem.*, 17, 3195-3206.
- Madeira-Lau R., Rantwijk F. van, Seddon K. R., Sheldon R. A., **2000**. *Org Lett.* 2, 4189-4191.
- Marsh K., Boxall J., Lichtenthaler R., **2004**. *Fluid Phase Equilib.*, 219, 93-98.
- Marty A., Combes D. y Condoret J. S., **1994**. *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 497-504.
- Matsuda T., Watanabe K., Kamitanaka T., Harada T., Nakamura K., **2003**. *Chem. Commun.*, 1198-1199.
- McMahon B. H., Frauenfelder H., Fenimore P. W., **2014**. *Eur. Phys. J.-Spec. Top.*, 223, 915-926.
- Mesiano A. J., Beckman E. J., Russel A. J., **1999**. *Chem. Rev.*, 99, 623-633.
- Neta N. S., Teixeira J. A., Rodrigues L. R., **2015**. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 55, 595-610.
- Neto B.A.D., Meurer E.C., Galaverna R., Bythell B.J., Dupont J., Cooks R.G., Eberlin M.N., **2012**. *J. Phys. Chem. Lett.*, 3, 3435-3441.
- Niedermeyer H., Hallett J.P., Villar-Garcia I.J., Hunt P.A., Welton T., **2012**. Mixtures of ionic liquids. *Chem. Soc. Rev.*, 41, 7780-802.
- Ohno H., Fujita K., Kohno Y., **2015**. *Chem. Phys.*, 17, 14454-14460.
- Palomo J. M., Filice M., **2015**. *Biotechnol. Adv.*, 33, 605-613.
- Perez M., Sinisterra J.V., Hernaiz M.J., **2010**. *Curr. Org. Synth.*, 14, 2366-2383.
- Perez-Sanchez M., Sandoval M., Hernaiz M. J., De Maria P. D., **2013**. *Curr. Org. Chem.*, 17, 1188-1199.
- Persson M., Bornscheuer U. T., **2003**. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 22, 21-27.
- Plechkova N. V., Seddon K.R., **2008**. *Chem. Soc. Rev.*, 37, 123-50.
- Pollet P., Davey E.A., **2014**. Urena-Benavides E.E., Eckert C.A., Liotta C.L., *Green Chem.*, 16, 1034-1055.
- Poole C.F., **2004**. *J. Chromatogr. A.*, 1037, 49-82.
- Rantwijk van F., Sheldon R.A., **2007**. *Chem. Rev.*, 107, 2757-2785.
- Reetz M.T., Wiesenhofer W., Francio G., Leitner W., **2003**. *Adv. Synth. Catal.*, 345, 1221-1228.
- Reichardt C., **2007**. *Org. Process Res. Dev.*, 11, 105-113.
- Riisager A., Fehrmann R., Haumann M., Wasserscheid P., **2006**. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 695-706.
- Rodrigues R. C., Ortiz C., Berenguer-Murcia A., Torres R., Fernandez-Lafuente R., **2013**. *Chem. Soc. Rev.*, 42, 6290-6307.
- Rogers R.D., Seddon K.R., **2003**. *Chemistry Sci.*, 302, 792-793.
- Romero A., Santos A., Tojo J., Rodriguez A., **2008**. *J. Hazard. Mater.*, 151(1), 268-73.
- Roosen C., Muller P., Greiner L., **2008**. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 81, 607-614.
- Roth M., **2009**. *J. Chromatogr. A*, 1216, 1861-1880.
- Schneider M.J., Haumann M., Stricker M., Sundermeyer J., Wasserscheid P., **2014**. *J. Catal.*, 309, 71-78.
- Search in ISI Web of Knowledge, Topic: (ionic liquid* AND biocatal*) OR (ionic liquid* AND enzym*); Year published: **2000-2016**.
- Sheldon R.A., **2008**. *Chem. Commun.*, 3352-3365.
- Sheldon R.A., **2012**. *Chem. Soc. Rev.*, 41, 2012, 1437-1451.
- Sheldon R. A., Van Pelt S., **2013**. *Chem. Soc. Rev.*, 42, 6223-6235.
- Shi Y., Liu Y-L., Lai P-Y., Tseng M-C., Tseng M-J., Li Y., Chu Y-H., **2012**, *Chem. Commun.*, 48, 5325-5327.

Capítulo I

- Shipovskov S., Gunaratne H. Q. N., Seddon K. R., Stephens G., **2008**. *Green Chem.*, 10, 806-810.
- Shöfer S.H., Kaftzik N., Wasserscheid P., Kragl U., **2001**. *Chem. Commun.*, 425-426.
- Smith, A.M.; Lovelock, K.R.J.; Gosvami, N.N.; Licence, P.; Dolan, A.; Welton, T.; Perkin, S. **2013**. *J. Phys. Chem. Lett.*, 4, 378-382.
- Solano D. M., Hoyos P., Hernaiz M. J., Alcantara A. R., Sanchez-Montero J. M., **2012**. *Bioresour. Technol.*, 115, 196-207.
- Stassen H. K., Ludwig R., Wulf A., Dupont J., **2015**. *Chem. Eur. J.*, 21, 8324-8335.
- Tateishi-Karimata H., Sugimoto N., **2014**. *Nucleic Acids Research*, 14, 8831-8844.
- Terpstra P., Combes D., Zwick A., **1990**. *J. Chem. Phys.*, 92, 65-70.
- Turner M. B., Spear S. K., Huddleston J. G., Holbrey J. D., Rogers R. D. **2003**, *Green Chem.* 5, 443-447.
- Varma R. S., **2014**. *Green Chem.*, 16, 2027-2041.
- Wasserscheid P; Welton T (eds), **2008**. 2nd ed. *Wiley-VCH*.
- Wu Z. L., Borretto E., Medlock J., Bonrath W., Cravotto G., **2014**. *ChemCatChem.*, 6, 2762-2783.
- Yoshiyama K., Abe Y., Hayase S., Nokami T., Itoh T., **2013**. *Chem. Lett.*, 42, 663-665.
- Yu Y., Beichel W., Dlubek G., Krause-Rehberg R., Paluch M., Pionteck J., Pfefferkorn D., Bulut S., Friedrich C., Pogodina N., Krossing I., **2012**. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14, 6856-6868.
- Zhang C., Zhang S., Yu L., Zhang P., Zhang Z., Wu Z., **2012**. *Tribol. Lett.*, 46, 49-54.
- Zhang G. L., Qi F., Jia H. Y., Zou C. L., Li C., **2015**. *RSC Adv.*, 5, 52444-52451.
- Zhao H., Malhotra S. V., **2002**. *Biotechnol Lett.*, 24, 1257-1260.

Capítulo I

CAPÍTULO II

BIOPROCESOS EN LÍQUIDOS IÓNICOS TIPO ESPONJA

Capítulo II

Capítulo II

DISEÑO DE BIOPROCESOS QUÍMICOS SOSTENIBLES INTEGRALMENTE EN ILs HIDROFÓBICOS

Para construir una industria química más sostenible se hace necesario desarrollar procesos de transformación selectiva de los sustratos y de separación directa de productos, incluyéndose la recuperación y reutilización posterior de todos los elementos del sistema de reacción (i.e., catalizadores, solventes). En este contexto y con objeto de solventar parte de estos problemas, se presentan los ILs como excelentes medios de reacción no acuosos para la llevar a cabo procesos de catálisis enzimática (**Figura 1**), cuya aplicación ha sido ampliamente descrita, observándose mejoras significativas en la actividad, estabilidad y la selectividad con respecto a los disolventes orgánicos convencionales (Sheldon y Roger, 2016).

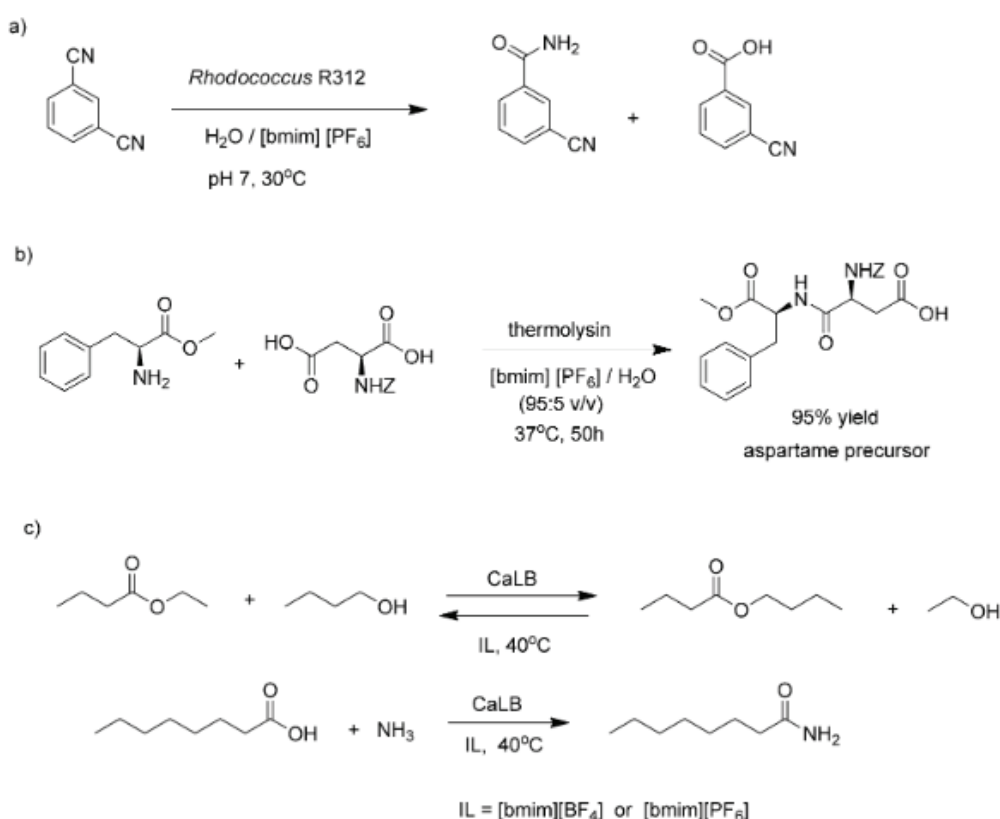


Figura 1. Primeros ejemplos de biocatálisis en Líquidos Iónicos: (a) Hidrólisis de nitrilo catalizada por *Rhodococcus* R312 en medio IL-[Bmin][PF₆] y agua, (Cull *et al.*, 2000) (b) Reacción entre ácido aspártico y L-fenilalanina para producir Z-Aspartamo en IL-[Bmin][PF₆] con 5% de agua, (Erbeldinger *et al.* 2000) (c) Transesterificaciones y amidaciones catalizadas por *CaLB* en medios IL-[Bmin][PF₆] ó IL-[Bmin][BF₄]. (Madeira-Lau *et al.*, 2000)

Capítulo II

Mientras que los trabajos iniciales se centraron en conocer la adecuación de estos medios de reacción en reacciones de síntesis catalizadas por hidrolasas (proteasas y lipasas) (Van Rantwijk y Sheldon, 2007), los estudios posteriores incluyeron otras enzimas como oxidorreductasas, peroxidasas o incluso el empleo de deshidrogenasas. Se ha observado también que el uso de los líquidos iónicos da lugar en algunos casos, a excelentes resultados en relación a rendimiento, (enantio)selectividad y/o estabilidad. De este modo, los líquidos iónicos no sólo se están empleando para reemplazar los disolventes tradicionales, sino que su uso también presenta ventajas adicionales en los procesos biocatalíticos (Domínguez, 2008).

La desactivación enzimática es consecuencia de una pérdida de la conformación catalíticamente activa de la enzima, provocada por un cambio en condiciones ambientales y/o de entorno (i.e., pH, temperatura, disolventes orgánicos), ya que la estabilidad de esta conformación depende de las interacciones entre la enzima y su microentorno. De hecho, la estructura nativa de una enzima es mantenida por diferentes fuerzas no-covalentes como interacciones por puente de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones iónicas e interacciones de Van der Waals. A temperatura elevada, estas fuerzas se reducen, y la estructura tridimensional de las moléculas de las enzimas se despliega (De Diego *et al.*, 2004). Todos los procesos que causan la desactivación enzimática, implican una ruptura de las interacciones agua-proteína en la primera capa de hidratación de estas biomoléculas, lo que genera una ruptura de los equilibrios termodinámicos que sostienen la arquitectura del biopolímero (Lozano *et al.*, 2015). De este modo, en un medio orgánico no miscible con agua, donde las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas del disolvente no afectan a las interacciones agua-proteína, la rigidez en la estructura enzimática crece, dando lugar a un aumento en la estabilidad térmica. Por lo tanto, y aunque no existe ninguna regla que lo prediga, la estructura enzimática dependerá enormemente de la naturaleza del disolvente, siendo ésta mayor en los disolventes hidrofóbicos (no miscibles con agua), que en los hidrofílicos. Estas propiedades han suscitado enorme interés en la comunidad científica.

Adicionalmente a lo anterior, entre las premisas necesarias para desarrollar un modelo de reacción/separación eficiente, también se contempla en primer lugar, el empleo de medios de reacción homogéneos, donde los sustratos se encuentren totalmente disueltos, proporcionando mayores velocidades de reacción en los procesos

Capítulo II

biocatalíticos, ya que se consigue una disminución considerable de las limitaciones difusionales. No obstante, también hay que considerar que, en la mayor parte de los medios donde los sustratos son miscibles, los productos de reacción también lo son. Esto hace que sea necesario el diseño de estrategias para la extracción y purificación de los mismos. En el caso de los líquidos iónicos no miscibles con agua, el enfoque experimental más popular empleado hasta hace relativamente poco tiempo, consistía en la adición directa de los biocatalizadores sobre el medio IL con los sustratos previamente incorporados, que tras la finalización de la reacción, la obtención de los productos se lleva a cabo mediante extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos volátiles, lo que permite rentabilizar el proceso mediante la reutilización del sistema biocatalizador/IL (Madeira-Lau *et al.*, 2000; Lozano *et al.*, 2001; Schofer *et al.*, 2001; Itoh *et al.*, 2002; Kaftzik *et al.*, 2002; Kaar *et al.*, 2003; Persson y Bornscheuer, 2003; Shimomura *et al.*, 2015) (Figura 2A).

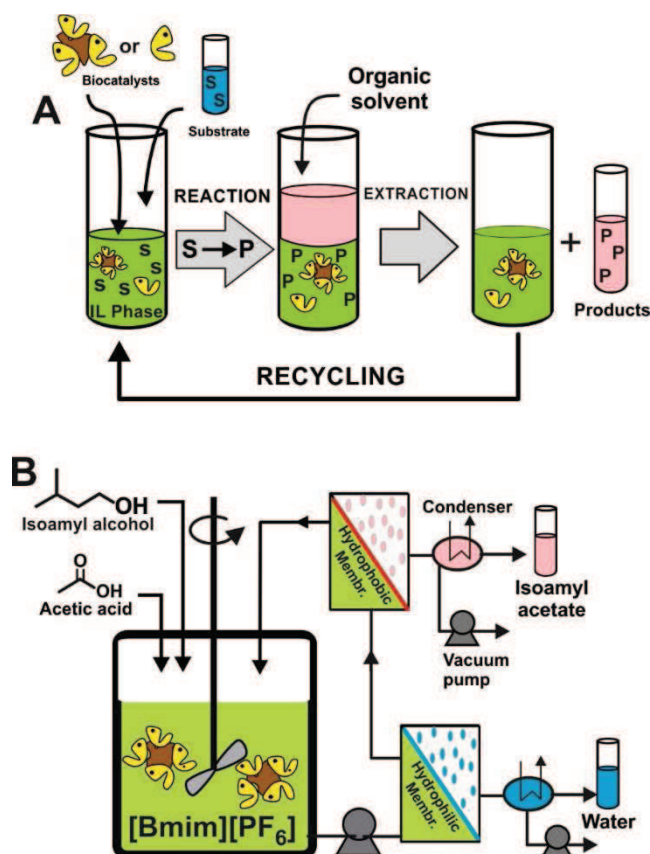


Figura 2. A. Reacciones catalizadas por enzimas en medio IL, incluyendo recuperación del producto mediante extracción líquido-líquido con un disolvente orgánico y reciclado del sistema enzima/IL. B. Síntesis de acetato de isoamilo catalizada por lipasa inmovilizada en $[\text{Bmim}][\text{PF}_6]$ usando un reactor de tanque agitado acoplado a unidades de pervaporación para la separación de productos (Gubicza *et al.*, 2003; Lozano *et al.*, 2015).

Capítulo II

Por esta razón, y teniendo en cuenta que la sostenibilidad del proceso global se ve claramente afectada negativamente por el empleo de disolventes orgánicos volátiles en la etapa de extracción de los productos, diversos grupos de investigación han buscado y desarrollado diversas estrategias alternativas para la recuperación del producto basadas en herramientas sostenibles (i.e., tecnología de membrana). En un trabajo pionero de Afonso y col. (Schofer *et al.*, 2001) demostraron la excelente adecuación de las técnicas de pervaporación para la recuperación cuantitativa y selectiva de los compuestos volátiles (i.e., hexanoato de etilo) de los ILs (i.e., [Bmim][PF₆]). La pervaporación, es un proceso de separación con membranas aplicado a mezclas líquidas de compuestos miscibles, en el que a partir de una corriente de alimentación se obtienen dos corrientes líquidas, cada una de ellas más concentrada en sus componentes que la alimentación inicial. Las membranas utilizadas son membranas densas no porosas, y la separación se consigue mediante la aplicación de vacío en el lado de la membrana donde se recoge el permeado en forma de vapor, mientras que por el otro lado circula el líquido de alimentación cuya separación se busca. Posteriormente se procede a condensar este vapor, generando como producto un líquido permeado. (Shao y Huang, 2007).

Este enfoque ha sido ampliamente aplicado para la síntesis enzimática de ésteres con propiedades de fragancia aromática (i.e., acetato de etilo, acetato de isoamilo) por esterificación entre alcoholes y ácidos carboxílicos utilizando líquidos iónicos como medio de reacción. A modo de ejemplo, podemos citar varios estudios de esterificación de ácido acético y alcohol isoamílico, catalizada por CALB, en un reactor tanque agitado que contenía [Bmim][PF₆] como medio de reacción. Mediante el acoplamiento de dos unidades de membrana de pervaporación en el sistema reactor, fue posible eliminar tanto el acetato de isoamilo (100% de conversión) como el otro subproducto (agua), mediante el uso de membranas hidrófobas e hidrófilas, respectivamente, en continuo, durante 72 horas, y sin ninguna pérdida de actividad de la enzima (Gubicza *et al.*, 2003; Gubicza *et al.*, 2008, Findrik *et al.*, 2012) (**Figura 2B**).

En el mismo contexto, también se utilizaron ILs para preparar membranas líquidas soportadas (SLM) para el transporte selectivo de moléculas orgánicas con grupos funcionales orgánicos representativas (i.e., hexilamina, metilmorfolina). La combinación adecuada de líquidos iónicos y del material de apoyo, fue crucial para lograr una buena selectividad en separaciones (Branco *et al.*, 2002). El uso de este enfoque con la biocatálisis se mostró como herramienta útil para la separación limpia de

Capítulo II

ácidos orgánicos (i.e., ácido 4-fenoxibutírico, ácido 3-fenoxipropiónico), y mezclas racémicas de compuestos orgánicos (i.e., rac-ibuprofeno) (Miyako *et al.*, 2003, 2005).

DISEÑO DE PROCESOS SOSTENIBLES EN ILs TIPO ESPONJA

En un paso más hacia el desarrollo de un enfoque “limpio” para la recuperación del producto puro a partir de las distintas fases de los ILs, han surgido un nuevo tipo de ILs basados en cationes con sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena (i.e., octadeciltrimetilamonio) y aniones hidrofóbicos (i.e., bistriflimida). Dichos ILs (i.e., $[C_{18}tma][NTf_2]$) son sólidos a temperatura ambiente, y han demostrado poseer un comportamiento conmutable de estado sólido a líquido en función de la temperatura, para valores compatibles con la catálisis enzimática.

Este fenómeno se demostró por primera vez en el trabajo publicado por nuestro grupo de investigación (Lozano *et al.*, 2012), donde se emplearon estos líquidos iónicos de cadena larga para llevar a cabo la síntesis biocatalítica de dieciséis ésteres alifáticos con propiedades aromáticas mediante esterificación directa entre ácidos carboxílicos y alcoholes terpénicos en medio de reacción líquido iónico como fase iónica líquida-sólida conmutable en función de la temperatura (**Figura 3**) (líquida a la temperatura de reacción de 50°C y sólida tras enfriar al terminar la misma), con la posterior separación del producto por centrifugación a temperatura controlada, todo ello realizado de una manera eficiente y con rendimientos superiores al 95% tras 4 horas de operación (Lozano *et al.*, 2015).

Este comportamiento del IL podría explicarse como consecuencia de la organización nano-estructural del $[C_{16}tma][NTf_2]$, donde las grandes cadenas laterales alquílicas del catión interactúan para formar agujeros hidrofóbicos adecuados para la incorporación del soluto (i.e., acetato de isoamilo, acetato de geranilo, etc). La disminución en el volumen libre de la red iónica producido por el enfriamiento permitió la compactación de la fase sólida del líquido iónico mediante centrifugación, y la consiguiente liberación de las moléculas de acetato de isoamilo contenidas en la red.

Capítulo II

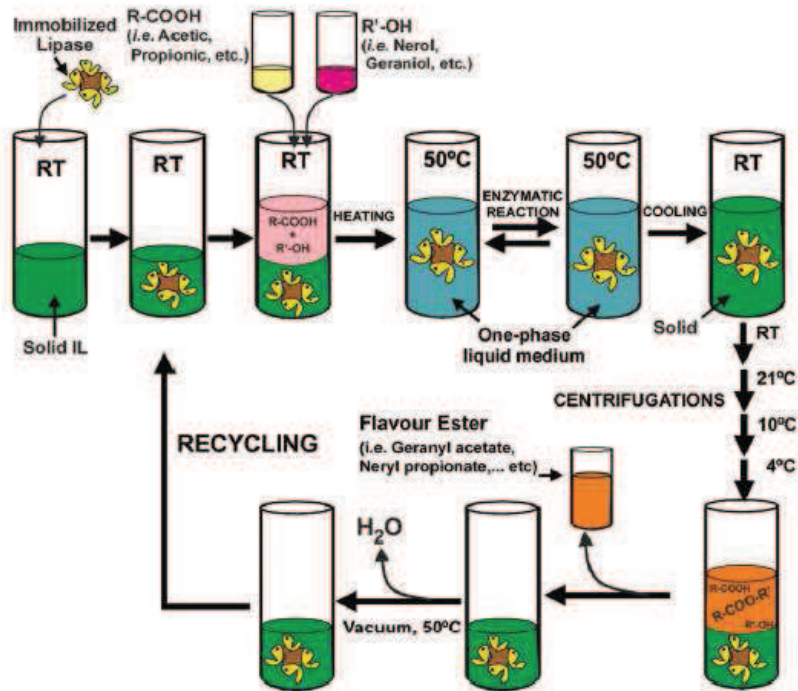


Figura 3. Esquema del protocolo cíclico para la producción de ésteres aromáticos por esterificación directa catalizada por lipasa en fases conmutables líquido/sólido, y reutilización del sistema enzima/IL (Lozano *et al.*, 2012).

Para llegar a estas conclusiones, se estudió la idoneidad del líquido iónico [C₁₆tma][NTf₂] para disolver acetato de geranilo, acetato de citronelilo, acetato de nerilo o acetato de isoamililo a concentraciones de 50, 60 y 70% de IL y 50°C (**Figura 4A**), resultando sistemas líquidos monofásicos en todos los casos a 60 °C (punto de fusión del IL-[C₁₆tma][NTf₂] es de 64°C), mientras que al enfriarse se formaron sistemas completamente sólidos (**Figura 4B**). Además, cada fase sólida se separaba en dos fases, una parte superior libre de IL y otra sólida inferior que contiene el IL, a través de un protocolo iterativo de centrifugación de cuatro etapas (15 min, 14000 rpm) desde temperatura ambiente hasta 4°C (**Figura 4C**).

Capítulo II

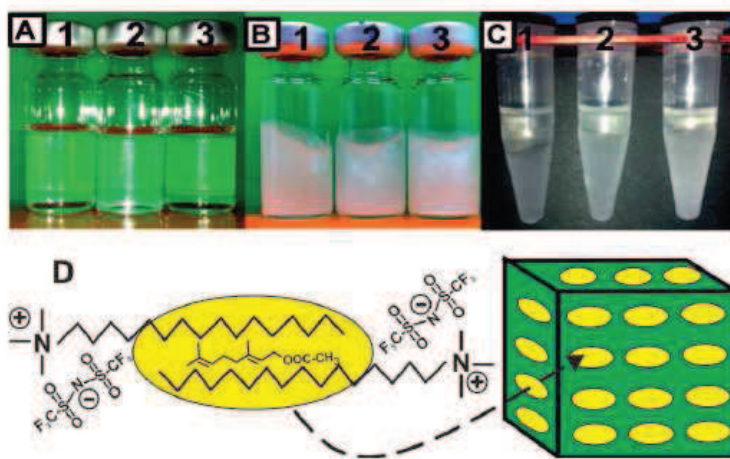
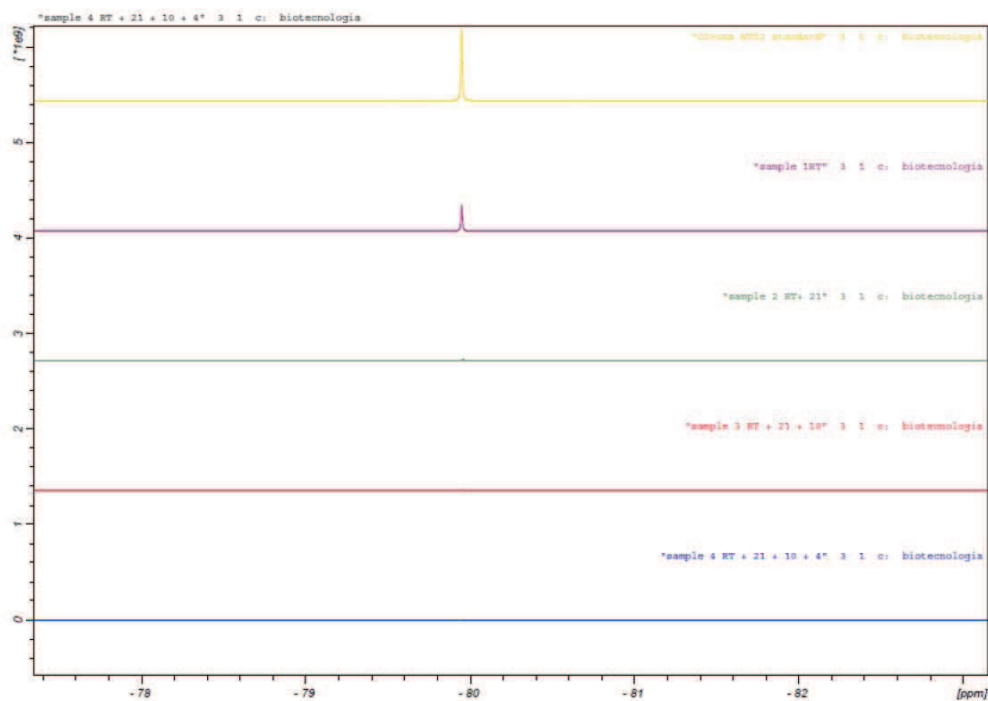


Figura 4. Comportamiento de fases al 50/50 (1), 60/40 (2) y 70/30 (3) (p/p) de mezclas de [C₁₆tma][NTf₂]/acetato de geranilo a 50 °C (A), 25 °C (B) y después de cuatro etapas de centrifugación consecutivas a 14.000 rpm (15 min) y a temperatura ambiente, 21, 10 y 4°C (C), respectivamente. (D) Esquema hipotético de la organización estructural de la red sólida (verde) con agujeros hidrofóbicos (amarillo) del [C₁₆tma][NTf₂] que contiene al acetato de geranilo (Lozano *et al.*, 2012).

El protocolo de extracción del éster aromático se fundamentó claramente en estos cambios de estado de las mezclas de reacción, principalmente, donde las etapas de centrifugación fueron las responsables de la desorción del aroma del líquido iónico sólido. Por otra parte, la combinación de la centrifugación y el enfriamiento en diferentes etapas, favoreció la extracción de la mayor parte de los mismos en la primera etapa de centrifugación (se partió de la temperatura más alta), mientras que con las consiguientes centrifugaciones lo que se consiguió fue su purificación como pudo verse en los espectros de ¹⁹F RMN realizados para el caso donde se empleó acetato de geranilo, como soluto a extraer (**Figura 5**), a causa de la disminución de la temperatura que favoreció a su vez, la disminución de la solubilidad del IL disuelto ahora en el aroma (Lozano *et al.*, 2012).

A Comparative ^{19}F -NMR spectra



B Comparative ^1H -NMR spectra

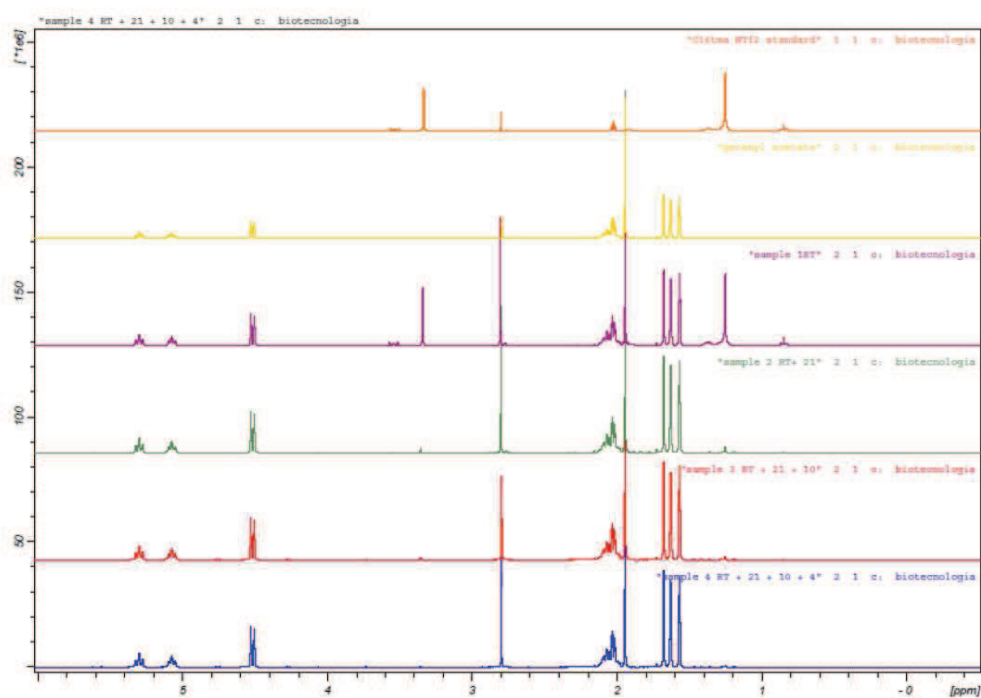


Figura 5. (A) Espectros de ^{19}F RMN realizados a las muestras obtenidas tras las sucesivas centrifugaciones de una mezcla de acetato de geranilo/ $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ (50:50, w: w) solidificada para: $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, sobrenadante primera centrifugación, sobrenadante segunda centrifugación, sobrenadante tercera centrifugación y sobrenadante obtenido tras la cuarta centrifugación.

(B) Espectros de ^1H RMN para: $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, acetato de geranilo, sobrenadantes de la primera, segunda, tercera y cuarta centrifugación (Lozano *et al.*, 2012).

Capítulo II

La viabilidad del proceso de separación fue demostrada, mediante muestras que se tomaron de cada centrifugación, y fueron analizadas por espectrometría de ^{19}F RMN (**Figura 5A**) para la detección del flúor presente en las muestras (asociado al anión bistriflimida presente exclusivamente en el IL) y ^1H RMN para garantizar que el espectro del aroma de acetato de geranilo correspondía exclusivamente con el del extracto (**Figura 5B**). Los resultados de los espectros de ^{19}F RMN confirmaron que usando el protocolo de separación diseñado para tal fin, fue posible obtener el producto totalmente exento de IL, aunque en las primeras centrifugaciones se observara su presencia, en las etapas sucesivas, se consiguió eliminar completamente. En estudios preliminares, usando solamente una única etapa de centrifugación a 25, 21 o 10°C, el sistema bifásico obtenido se incubó en hielo y se observó como el extracto pasó a ser un sólido. Esto se debió a la presencia de líquido iónico residual en el mismo. Este fenómeno no se observó cuando se realizó el protocolo de separación basado en cuatro etapas de centrifugación anteriormente descrito.

Los fenómenos ocurridos durante el desarrollo del protocolo de extracción pudieron ser explicados en base a los cambios en la organización estructural del líquido iónico al pasar de estado líquido a sólido (**Figura 4D**). Aunque muchos trabajos publicados se han centrado en el comportamiento de fases del líquido iónico con compuestos orgánicos, ningún estudio publicado hasta la fecha trata sobre las transiciones que tienen lugar entre las fases líquido iónico líquido a sólido conteniendo este tipo de sustancias disueltas. Sin embargo, estudios realizados con líquidos iónicos con base catiónica imidazolio (Dupont, 2011) mostraron como existen patrones estructurales semejantes en ambas fases, líquida y sólida, como resultado de una red iónica formada por unidades monoméricas de un catión rodeado por tres aniones y viceversa. La incorporación de moléculas a la red del líquido iónico causa cambios en sus propiedades físico-químicas, e incluso genera la formación de regiones polares y apolares. Esta es la causa por la cual los líquidos iónicos se describen como materiales nano-estructurados, que permiten que las moléculas neutras residan en las regiones menos polares, mientras que las especies iónicas o polares experimentan una difusión más rápida hacia las regiones más polares (Lozano *et al.*, 2015).

De acuerdo con estos resultados, la genuina característica observada en la **Figura 4D**, podría explicarse como consecuencia de la organización nano-estructurada del $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, donde las grandes cadenas laterales alquílicas del catión interactúan

Capítulo II

para formar agujeros hidrofóbicos adecuados para la incorporación del acetato de isoamilo. De esta manera, el acetato de isoamilo podría considerarse incluido tanto en la fase sólida como en la líquida del líquido iónico. La disminución en el volumen libre de la red iónica producido por el enfriamiento permitió la compactación de la fase sólida del líquido iónico mediante centrifugación, y la consiguiente liberación de las moléculas de acetato de isoamilo contenidas en la red. En lo referente a la distribución del líquido iónico y el aroma tras las etapas de centrifugación, jugó un papel fundamental las densidades de ambos, ya que al ser la densidad del líquido iónico sólido $[C_{16}tma][NTf_2]$ de 1.09 g/ml a 25°C y la del acetato de isoamilo de 0.876 g/ml a 25°C, se favoreció el desplazamiento del aroma a la parte superior. Por lo tanto, la red del líquido iónico podría ser considerada como una nano-esponja que puede cambiar de fase sólida a fase líquida, y *viceversa*, como resultado del cambio de temperatura, con huecos de volumen variable, que son adecuados para el alojamiento o la liberación de moléculas hidrofóbicas en función de que su estado, sea líquido o sólido, respectivamente.

Este enfoque sostenible para la extracción de productos en procesos en los cuales participan líquidos iónicos como medios de reacción, basados exclusivamente en tecnologías sencillas (enfriamiento, centrifugación, etc.) podría suponer una revolución en este tipo de procesos pudiendo ser aplicado a un amplio espectro de procesos sintéticos. Por lo tanto, la red del líquido iónico podría ser considerada como una nano-esponja que puede cambiar de fase sólida a fase líquida, y *viceversa*, como resultado del cambio de temperatura, con huecos de volumen variable, que son adecuados para el alojamiento o la liberación de moléculas hidrofóbicas en función de que su estado, sea líquido o sólido, respectivamente (**Figura 4D**).

Por ello, Lozano y col. concluyeron que, en esta clase de líquidos iónicos nanoestructurados en forma de red iónica con comportamiento tipo esponja, el éster de interés estaba incluido en la red iónica en lugar de estar disuelto, por lo que la disminución en el volumen libre de la red producida por el enfriamiento permitió la compactación de la fase sólida del líquido iónico por centrifugación y la consiguiente liberación de las moléculas del éster fuera de la red (Lozano *et al.*, 2013, 2015).

De este modo, este tipo de procesos de biocatálisis y posterior separación del producto con sencillas operaciones de extracción suponen un abanico de nuevas posibilidades para el desarrollo de procesos industriales verdes (Lozano *et al.*, 2012). Además, los resultados de este estudio pudieron incluso ser aplicados, por primera vez,

Capítulo II

en la elaboración de una nueva estrategia fácil y sencilla para producir biodiesel directamente a través de un enfoque biocatalítico sostenible en estos nuevos líquidos iónicos con comportamiento esponja (**Figura 6**) (Lozano *et al.*, 2013).

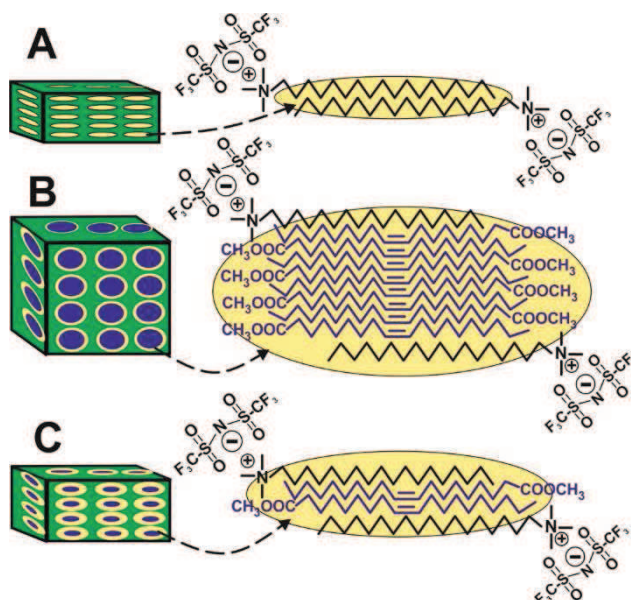


Figura 6. Representación esquemática de la hipótesis de comportamiento esponja para líquidos iónicos: (A) Muestra de la red IL-[C₁₈tma][NTf₂] seca, (B) una esponja "hinchada" conteniendo oleato de metilo y (C) una esponja "seca" después de "escurrirla" por centrifugación (Lozano *et al.*, 2013).

Vista la capacidad de estos líquidos iónicos hidrofóbicos (ILs con sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena de cationes tanto amonio como imidazolio y naturaleza aniónica: NTf₂) para llevar a cabo procesos de reacción/separación de obtención de ésteres aromáticos, el grupo de Lozano y col., decidieron extrapolar este modelo a otro similar para llevar a cabo la obtención de biodiesel a partir de trioleína (fuente de triacilglicéridos) y metanol mediante transesterificación catalizada por el derivado enzimático inmovilizado Novozym 435.

El biodiesel generalmente se sintetiza por transesterificación de triacilglicéridos con metanol, produciendo ésteres metílicos de ácidos grasos y glicerol como subproducto utilizando cualquier catalizador químico (i.e., KOH) o biológico (i.e., las lipasas). Sin embargo, la inmiscibilidad entre los dos sustratos de aceite vegetal y metanol es uno de los principales inconvenientes responsables de la baja eficacia de los catalizadores y, para el caso de la biocatálisis, esto también causa la desactivación de la

Capítulo II

enzima completa y rápida como resultado de la interacción directa entre la proteína catalítica y la fase de metanol.

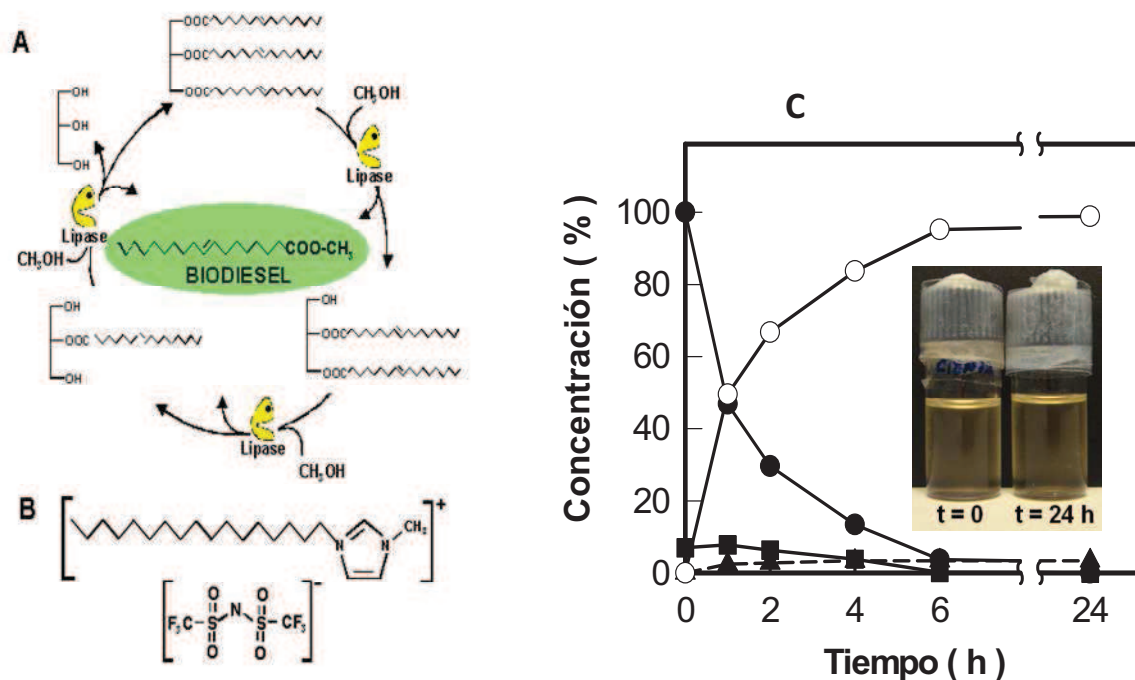


Figura 7. (A) Ilustración de síntesis de biodiesel catalizada por lipasas en la metanólisis de la trioleína. (B). 1-metil-3-octadecilimidazolium bis(trifluorometilsulfonil) imida y (C). Perfil de reacción de trioleína (●), dioleína (■), monooleína (▲) y oleato de metilo (○) para la metanólisis de trioleína catalizada por Novozym 435 en $[C_{18}mim][NTf_2]$ a 60 °C. Condiciones de reacción: 64 % w/w de IL; trioleína (275 mg, 0.31 mmol); metanol 60 mg, 1.88 mmol; Novozyme 435 10% w/w, 27.5 mg (Lozano *et al.*, 2010).

Previamente, el grupo había demostrado como estos nuevos ILs hidrofóbicos eran capaces de disolver los sustratos del medio, ya que todos los ILs ensayados hasta ese momento conseguían estabilizar parcialmente a las enzimas pero en ningún caso se consiguieron disolverlos, formando siempre sistemas bifásicos IL/TO. Por esta razón se probó uno de estos ILs capaces de aportar sistemas monofásicos, el IL- $[C_{18}mim][NTf_2]$, para evaluar su capacidad como disolvente en esta reacción. Los resultados obtenidos (Figura 7) demostraron que este IL no sólo era capaz de disolver tanto la trioleína como el MeOH, sino que además resultó ser excelente medio para llevar a cabo la síntesis enzimática de biodiesel, obteniéndose rendimientos cercanos al 100 % tras sólo 8h de operación (Lozano *et al.*, 2010).

Los ILs basados en cationes alquilo con largas cadenas laterales (i.e., $[C_{18}mim][NTf_2]$, $[C_{18}tma][NTf_2]$, etc.) demostraron ser capaces de disolver ambos sustratos de reacción (trioleína y metanol), a cualquier concentración, proporcionando

Capítulo II

medios de reacción monofásicos, que demostraron ser idóneos para la síntesis biocatalítica de biodiesel, con conversiones del orden del 96% tras sólo 6h de operación a 60°C (**Figura 7C**). La excelente adecuación del sistema enzima/IL en el proceso de síntesis de biodiesel también se demostró mediante el desarrollo de un estudio de estabilidad a 60°C, donde se comprobó cómo estos medios eran capaces de preservar prácticamente el 90% de su actividad catalítica durante 100 días de incubación (**Figura 8**), con una vida media aproximada de 1370d (Lozano *et al.*, 2010; 2011; 2013).

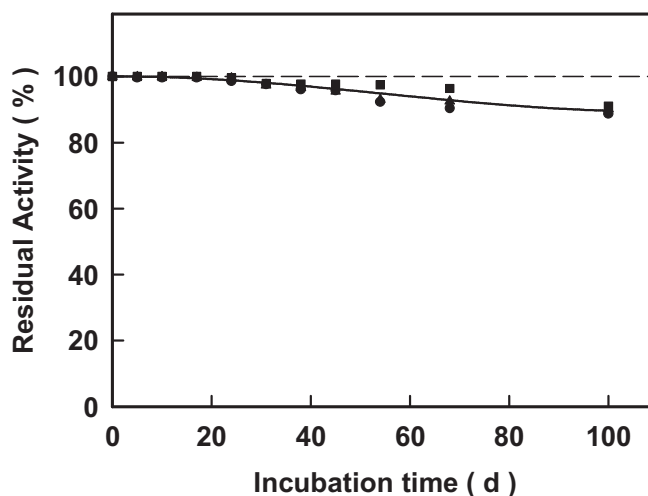


Figura 8. Actividad residual mostrada por el derivado enzimático Novozym 435 después de ser incubado a 60°C al 50/50 (p/p) trioleína/IL (■, [C₁₈tma][NTf₂]; ▲ [C₁₆tma][NTf₂]; ●, [C₁₄tma][NTf₂]) a 60 °C (Lozano *et al.*, 2013).

Pero para demostrar realmente la bondad de estos nuevos medios de reacción fue necesario establecer un modelo de separación eficiente y verde con el medio ambiente. El protocolo cíclico, sencillo y limpio que se propuso para la extracción tanto del biodiesel sintetizado como del subproducto glicerol de la mezcla de reacción fue posible gracias al comportamiento tipo esponja de estos líquidos iónicos hidrófobos (**Figura 6**). La adición de agua durante el protocolo de extracción, (disolvente molecular verde no miscible con el biodiesel y el SLIL), permitió la mejora de la separación de todas las fases, proporcionando una manera fácil y sostenible para separar tanto el glicerol, como el metanol no reaccionado del biodiesel.

A pesar de la excelencia de este enfoque sostenible y directo para la separación de biodiesel y glicerol de estos ILs de tipo esponja (i.e., biodiesel casi puro y libre de

Capítulo II

IL, la completa recuperación del IL), el bajo rendimiento de extracción de biodiesel (48.9% para $[C_{18}tma][NTf_2]$) resultaba una clara limitación para su posible explotación industrial. Por esta razón, se estudió la capacidad de los ILs tipo esponja $[C_{16}tma][NTf_2]$ y $[C_{18}tma][NTf_2]$ para "absorber" el biodiesel y posteriormente "escurrirlo" usando el protocolo de centrifugación establecido. La fase de IL sólido resultante se usó iterativamente para disolver muestras de oleato de metilo (550 mg), y se determinó el rendimiento en la etapa de extracción al final de cada ciclo (**Figura 9**).

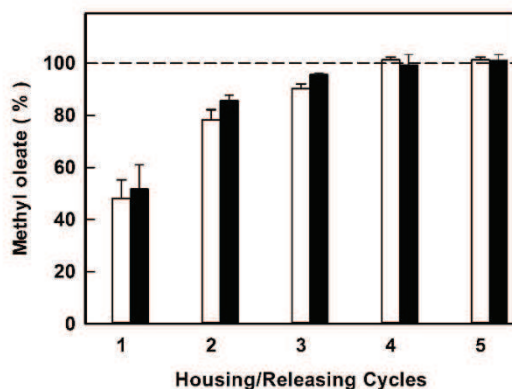


Figura 9. Rendimiento de extracción en oleato de metilo (MO) extraído del sistema MO/ $[C_{18}tma][NTf_2]$ (barras blancas) o $[C_{16}tma][NTf_2]$ (barras negras) 55/45 (w/w) durante 5 ciclos consecutivos de disolución/extracción usando protocolos de enfriamiento/centrifugación con una etapa adicional de lavado con agua. Después de cada ciclo, el IL sólido resultante fue usado para disolver una nueva muestra de MO (550 mg) a 60°C (Lozano *et al.*, 2013).

Como puede observarse para ambos ILs, la cantidad de oleato de metilo liberado de la fase sólida-IL aumentó durante los tres ciclos operativos iniciales y luego permaneció constante durante los siguientes ciclos tras los cuales se extrajo completamente el oleato de metilo disuelto (Lozano *et al.*, 2013). Se determinó mediante ^{19}F RMN el contenido de IL ($[C_{16}tma][NTf_2]$ o $[C_{18}tma][NTf_2]$) en las fases sólidas finales, que fue de 76,2 (\pm 6,1) y 78,0 (\pm 7,6)% (p / p), respectivamente. Estos resultados reflejaron como estos ILs presentaban un comportamiento similar a una esponja, y tras los tres primeros ciclos iniciales de "disolución/escurrido". La "esponja húmeda" fue capaz de liberar completamente todo el nuevo biodiesel durante el

Capítulo II

protocolo de centrifugación tras el tercer ciclo de extracción. De esta manera, se confirmó la idoneidad de la metodología propuesta para la separación del biodiesel limpio (Lozano *et al.*, 2013).

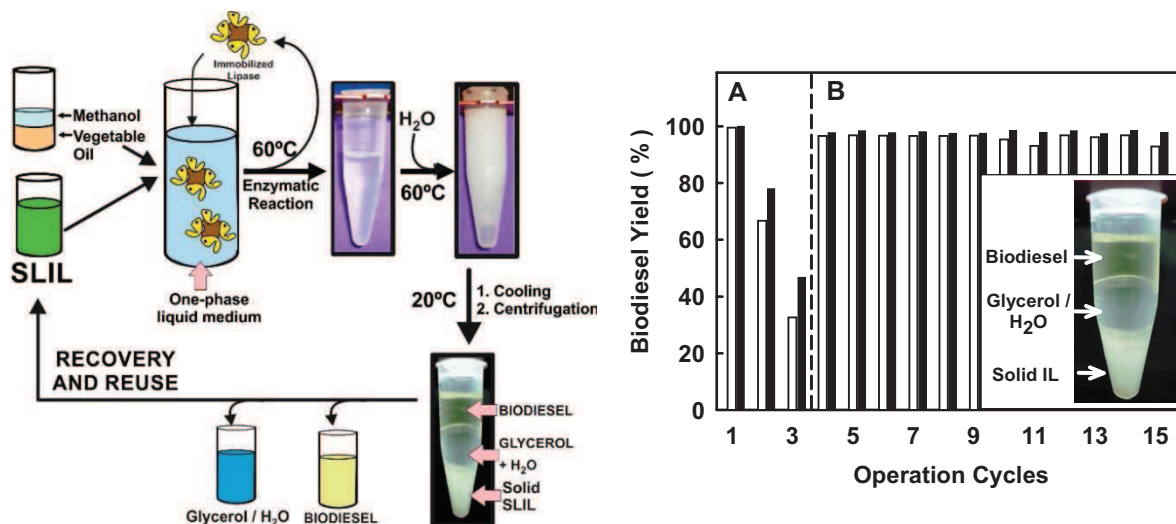


Figura 11. (A). Protocolo cíclico para la síntesis biocatalítica y purificación del biodiesel en IL tipo esponja, incluida la plena recuperación y reutilización del sistema enzimático-IL (Lozano *et al.*, 2013). (B). Protocolo de reciclaje del sistema Novozym 435/[C₁₆tma][NTf₂] (barra blanca) o [C₁₈tma][NTf₂] (barra negra) para la producción de biodiesel por metanolisis de trioleína mediante etapas catalíticas reiterativas, seguidas de la etapa de separación de los productos durante cada ciclo. El derivado enzimático se reutilizó directamente (A), o después del lavado con t-butanol (B) (Lozano *et al.*, 2012).

Una vez evaluada la idoneidad del método de extracción de los productos de reacción, se llevó a cabo la síntesis biocatalítica de biodiesel de forma cíclica y reiterativa (**Figura 11A**) con objeto de evaluar la capacidad de reutilización del sistema Novozym 435/IL. Los resultados mostraron una pérdida brusca tras los dos primeros ciclos de utilización del sistema debido al envenenamiento del biocatalizador con el glicerol generado en el proceso sobre la superficie del mismo. Por esta razón se decidió utilizar terc-butanol como disolvente de lavado del mismo, pudiéndose así recuperar prácticamente el 100% de conversión y mantenerse la misma durante los siguientes ciclos operacionales (**Figura 11B**).

La idoneidad del método, la probaron mediante la plena recuperación y reutilización del sistema biocatalizador/SLIL, sin pérdida de rendimiento tras 15 ciclos de reutilización.

Capítulo II

Este fenómeno permitirá abrir un nuevo camino en la química verde para la separación de los productos procedentes de los medios de reacción basados en líquidos iónicos.

En este contexto, el grupo de Lozano y col. propusieron una nueva metodología para la producción de acetato de anisilo, basada en estos sistemas conmutables, para llevar a cabo el proceso de producción de manera sostenible con completa reutilización del sistema IL/biocatalizador, basada en la reacción de esterificación directa entre el ácido acético y el alcohol anisílico, con la consecuente producción de acetato de anisilo y agua (reacción controlada por el equilibrio) y utilizando estos IL hidrofóbicos como medios de reacción. La **Figura 12A** muestra que todas las mezclas al 30/70 (p/p) de acetato de anisilo/ILs-[C₁₂tma][NTf₂], [C₁₄tma][NTf₂] y [C₁₆tma][NTf₂] formaron sistemas monofásicos completamente monofásicos después de 15 min bajo una potencia de 4W de irradiación microondas (temperatura final de 50-52°C). Estas mezclas se volvieron sólidas al enfriarse a temperatura ambiente, excepto en el caso del IL-[C₁₂tma][NTf₂] que permaneció líquido (**Figura 12B**). Mediante el uso de un protocolo iterativo de centrifugación a temperaturas controladas de la mezcla de IL/acetato de geranilo (Lozano *et al.*, 2012), se diferenciaron claramente dos fases. Sin embargo, la separación física entre el acetato de geranilo y estos ILs, no sucedió adecuadamente por lo que se dificultó enormemente la recuperación del producto, debido a la baja consistencia de la fase sólida que se disolvía rápidamente de nuevo en la fase líquida de la fragancia. Para llevar a cabo eficientemente la separación de estas mezclas se propuso una nueva metodología basada en el uso de membranas de nylon (tamaño de poro de 0,2 μm) durante la etapa de centrifugación (10 min, 16.000 rpm, 0°C) (**Figura 12C**). El uso de este filtro en la etapa de centrifugación permitió la retención de la fase sólida del IL por encima de membrana de nylon, lo que permitió filtrar el acetato de anisilo líquido, y obtenerlo puro actuando la membrana así como una esponja (**Figura 12D**). La eficiencia de este proceso de separación se demostró también usando la espectroscopia de ¹⁹F RMN, donde se determinaba la cantidad de IL residual que pudiera quedar en la fase líquida donde se encontraba el éster. Los rendimientos para los ILs-[C₁₄tma][NTf₂] (52°C p.f. (Lozano *et al.*, 2013)) y [C₁₆tma][NTf₂] (64°C p.f. (Lozano *et al.*, 2013)) de acetato de anisilo obtenidos por filtración fueron del 95 y 93% de la cantidad inicial disuelta en cada IL, mientras que el contenido residual de IL fue del 4,1 y 3,1% (p/p), respectivamente.

Capítulo II

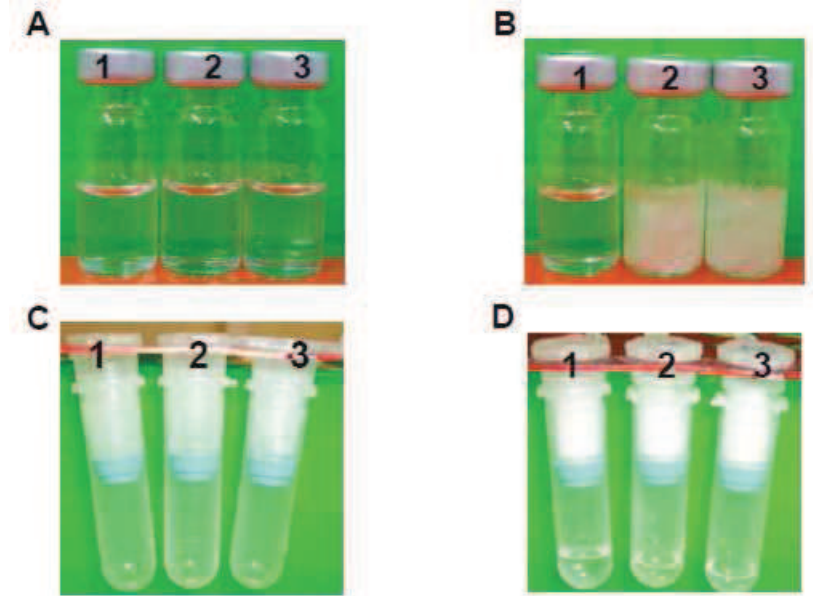


Figura 12. Comportamiento de fases de la mezcla al 30/70 (p/p) de acetato de anisilo/[C₁₂₋₁₆tma][NTf₂] después de la irradiación microondas (15 min, 4W de potencia) **(A)**, a 20°C **(B)** y a 0°C (colocados en un filtro centrífuga de 0,2 µm de tamaño de poro) **(C)**, respectivamente. **(D)** Separación de la mezcla SLIL/acetato de anisilo en una fase sólida (SLIL) y una fase líquida (acetato de anisilo) por centrifugación a 16.000 rpm (15 min) y a 0°C (Lozano *et al.*, 2014).

El rendimiento del producto de extracción de estos SLILs disminuyó con el aumento de la longitud de la cadena alquílica del catión. Así mismo, como resultado del aumento del punto de fusión del IL con la longitud de la cadena alquílica, la cantidad de IL residual que había en la fase líquida disminuyó. El bajo punto de fusión de los ILs con la cadena lateral alquílica más corta en el catión es una restricción importante, ya que debe centrifugarse a 0°C para una separación eficaz. Sin embargo, el punto de fusión del IL puede ajustarse en función del anión, de la cadena alquílica y/o utilizando mezclas de ILs de diferentes puntos de fusión (Dupont *et al.*, 2002; Welton, 2004; Lin *et al.*, 2011; Cassity *et al.*, 2013).

El uso de filtros centrífuga en este ejemplo mejoró la eficiencia de la esponja, comparando el rendimiento del producto resultante con respecto al proceso de centrifugación sin una filtración acoplada (Lozano *et al.*, 2012; Lozano *et al.*, 2013), abriéndose así nuevas vías de desarrollo para este nuevo tipo de procesos.

Capítulo II

Capítulo II

BIBLIOGRAFÍA

- Branco L. C., Crespo J. G., Afonso C. A. M., **2002**. *Chem. Eur. J.*, 8, 3866-3871.
- Cassity, C.G., Mirjafari, A.; Mobarrez, N., Strickland, K.J., O'Brien, R.A., Davis, J.H., **2013**. *Chem. Commun.*, 49, 7590-7592.
- De Diego T., Lozano P., Gmouh S., Vaultier M., Iborra J. L., **2004**. *Biotechnol. Bioeng.*, 88, 916-924.
- Dominguez P., **2008**. *Angew. Chem. Intl. Ed.*, 47, 6960-6968.
- Dupont, J.; de Souza, R.F.; Suarez, P.A.Z., **2002**. *Chem. Rev.*, 102, 3667-3691.
- Dupont J., **2011**. *Acc. Chem. Res.*, 44, 1223-1231.
- Cull, S. G.; Holbrey, J. D.; Vargas-Mora, V.; Seddon, K. R.; Lye, G., **2000**. *Biotechnol. Bioeng.*, 69, 227-233.
- Erbeldinger M., Mesiano A. J., Russell A. J., **2000**. *Biotechnol. Prog.*, 16, 1129-1131.
- Findrik Z., Nemeth G., Vasic-Racki D., Belafi-Bako K., Csanadi Z., Gubicza L., **2012**. *Process. Biochem.*, 47, 1715-1722.
- Gubicza L., Nemestothy N., Frater T., Belafi-Bako K., **2003**. *Green Chem.*, 5, 236-239.
- Gubicza L., Belafi-Bako K., Feher E., Frater T., **2008**. *Green Chem.*, 10, 1284-1287.
- Itoh T., Akasaki E., Nishimura Y., **2002**. *Chem. Lett.*, 154-155.
- Kaar J. L., Jesionowski A. M., Berberich J. A., Moulton R. Russell A. J., **2003**. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 4125-4131.
- Kaftzik N., Wasserscheid P., Kragl U., **2002**. *Org. Proc. Res. Dev.*, 6, 553-557.
- Lin, R. Y.; Taberna, P. L.; Fantini, S.; Presser, V.; Perez, C. R.; Malbosc, F.; Rupesinghe, N. L.; Teo, K. B. K.; Gogotsi, Y.; Simon, P., **2011**. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2, 2396-2401.
- Lozano P., De Diego T., Carrie D., Vaultier M., Iborra J.L., **2001**. *Biotechnol. Lett.*, 23, 1529-1533.
- Lozano P., Bernal J.M., Piamtongkam R., Fetzer D., Vaultier M., **2010**. *ChemSusChem.*, 3, 1359-1363.
- Lozano P., Bernal J.M., Vaultier M., **2011**. *Fuel*, 90, 3461-3467.
- Lozano P., Bernal J.M., Navarro A., **2012**. *Green Chem.*, 14, 3026-3033.
- Lozano P., Bernal J.M., Sánchez-Gómez G., López-López G., Vaultier M., **2013**. *Energy Environ. Sci.*, 6, 1328-1338.
- Lozano P., Bernal J M., Lajarin A., Romera D., Garcia-Verdugo E., Sanchez - Gomez G., Pucheault M., Vaultier M., Burguete M. I., Luis S. V., **2014**. *Curr. Green Chem.*, 1, 145-154.
- Lozano P., Bernal J. M., Garcia-Verdugo E., Sanchez-Gomez G., Vaultier M., Burguete M. I., Luis S. V., **2015**. *Green Chem.* 17, 3706-3717.
- Madeira-Lau R., Rantwijk F. van, Seddon K. R., Sheldon R. A., **2000**. *Org Lett.* 2, 4189-4191.
- Miyako E., Maruyama T., Kamiya N., Goto M., **2003**. *Chem. Commun.*, 2926-2927.
- Miyako E., T. Maruyama, N. Kamiya M.; Goto., **2005**, *Chem. Eur. J.*, 11, 1163-1170.
- Persson M., Bornscheuer U. T., **2003**. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 22, 21-27.
- Schofer, S.H., Kaftzik, N., Wasserscheid, P., Kragl, U., **2001**. *Chem. Commun.*, 425-426.
- Shao P., Huang R. Y. M., **2007**. *J. Membr. Sci.*, 287, 162-179.

Capítulo II

- Sheldon, R. A., **2016**. *Chem. Eur. J.* 22, 12983-12998.
- Shimomura K., Harami H., Matsubara Y., Nokami T., Katada N., Itoh T., **2015**. *Catal. Today*, 255, 41-48.
- Van Rantwijk F.; Sheldon R.A., **2007**. *Chem. Rev.* 107, 2757–85.
- Welton, T., **2004**. *Coordin. Chem. Rev.*, 248, 2459-2477.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

"La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje, nunca una llegada"

Karl R. Popper

Capítulo III

Capítulo III

El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral ha sido abundar en el diseño de protocolos operacionales sostenibles integralmente, que combinen la síntesis biocatalítica y la separación de los productos con alto valor añadido, utilizando una tecnología eficiente, limpia y verdes, en los cuales las etapas de recuperación y reutilización de los sistemas catalíticos y de reacción resultarán claves para la posible implementación final de los mismos en su posible aplicación industrial.

Para este objetivo principal, se han empleado diferentes ILs hidrofóbicos con sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena, siendo sólidos a temperatura ambiente pero con temperaturas de fusión por debajo de 100°C y que presentan un comportamiento tipo esponja (SLILs, del inglés “*Sponge-Like Ionic Liquids*”). Dichos SLILs han sido empleados como medios de reacción y separación para el desarrollo de bioprocesos catalíticos de obtención de MAGs (monoacilglicéridos) y biocombustibles oxigenados.

Estos ILs que se presentan como excelentes medios de reacción en sistemas que involucren el empleo de sustratos hidrofóbicos debido a su alta solubilidad en ellos, permitiendo mejorar así las limitaciones difusionales presentes en los sistemas multifásicos. Por otra parte, la modificación del medio de reacción para reducir el papel del agua en reacciones catalizadas por enzimas hidrolíticas, permite un claro desplazamiento del equilibrio termodinámico hacia las reacciones de síntesis en lugar de las de hidrólisis, mejorando además la estabilidad térmica y estructural de la enzima y fomentándose así un alto interés para una posible aplicación industrial de estos medios no convencionales en reacciones de transesterificación, esterificación, resoluciones cinéticas, amidaciones, etc.

El interés suscitado por el desarrollo de nuevos procesos limpios de síntesis de biocombustibles que sean sostenibles económica y medioambientalmente es consecuencia de los inconvenientes que los procesos actuales acarrear, entre los que cabe destacar la generación de un gran volumen de aguas residuales, la baja selectividad de las reacciones catalizadas por ácidos y bases fuertes, y los costes de los procesos de purificación de los productos. En este contexto, las enzimas son biocatalizadores que permiten llevar a cabo reacciones de síntesis con la máxima selectividad, permitiendo una fácil recuperación de los productos y sin generar ningún tipo de residuo. Los principales inconvenientes que presenta esta reacción son la baja actividad y estabilidad del biocatalizador, provocados principalmente por la inmiscibilidad entre sí de los sustratos (aceites vegetales (triacilglicéridos)) y el metanol, así como por el alto carácter

Capítulo III

desactivante del metanol, y la acumulación del glicerol, como subproducto de la reacción de transesterificación, sobre la superficie del catalizador provocando así su envenenamiento. De esta manera la ingeniería del medio de reacción se presenta como una herramienta clave para solventar todos estos problemas.

Por otro lado, los monoacilglicéridos son sustancias anfipáticas con gran capacidad para actuar como emulsionantes, que son comúnmente añadidas a los productos alimentarios en pequeñas cantidades, ayudando a mezclar ingredientes insolubles que de otro modo no se mezclarían. Esta aplicación es una de las estrategias más atractivas que se presentan para la obtención de productos que puedan ser clasificados como “productos naturales”, característica muy apreciada para productos destinados a uso alimentario, cosmético y farmacéutico. No obstante, la obtención de monoacilglicéridos mediante esterificación directa entre ácidos grasos libres y glicerol presenta el gran inconveniente de la inmiscibilidad entre ambos sustratos, ya que no solo dificulta enormemente la reacción, sino que también se induce una desactivación enzimática por el recubrimiento de las partículas de biocatalizador con una capa hidrofílica del glicerol. Es aquí donde los ILs hidrofóbicos juegan un papel fundamental, ya que permiten tanto la estabilización a las enzimas frente a la pérdida de actividad, como la miscibilidad entre los sustratos. En este contexto, se han ensayado ILs, basados en cationes con largas cadenas hidrofóbicas y aniones de diferente naturaleza, evaluándose la distinta solubilidad de los sustratos y productos de interés involucrados, y su eficacia en diversos procesos biocatalíticos, optimizándose los parámetros de relevancia de las reacciones, y finalmente, diseñando protocolos sencillos y eficaces de reacción y separación de los productos de cada uno de los sistemas, con la recuperación de los sistemas de reacción (biocatalizadores y líquidos iónicos) para su reutilización.

Por otro lado, el solketal (1,2-isopropilideno-*rac*-glicerol) es un derivado del glicerol de interés industrial, cuya incorporación a los procesos de fabricación de biodiesel permite la obtención de biocombustibles oxigenados, altamente valorados para su uso en los motores de explosión. Es por ello que la síntesis biocatalítica integral de biocombustibles oxigenados (producción *in situ* de biodiesel (FAMEs, ésteres metílicos de ácidos grasos, mezclados con ésteres solketílicos de ácidos grasos, FASEs) se llevará a cabo, tanto por esterificación directa de ácidos grasos libres con solketal o metanol, como por transesterificación de los triacilglicéridos presentes en los aceites vegetales, con los mismos alcoholes, utilizando líquidos iónicos hidrofóbicos (ILs) como medio de

Capítulo III

reacción. También, se emplearán aceites de desecho con objeto de sintetizar biodiesel de tercera generación, enriquecido con ésteres grasos oxigenados, que le conferirán al producto final un valor añadido adicional. Por último, se diseñarán protocolos eficientes de separación de los productos, y de reutilización tanto del biocatalizador como del SLIL, para hacer así un proceso integral verde.

Este objetivo amplio puede desglosarse en los siguientes objetivos subordinados:

1. Recopilar la información disponible en las bases de datos y en los artículos del grupo de investigación, revistas científicas, etc., para obtener un escenario general de los procesos operacionales integrales de reacción y separación que sirvan de base para el diseño de los experimentos que serán planteados a continuación. Se hará hincapié en utilizar una tecnología limpia y sostenible, que nos permita recuperar y reutilizar tanto el catalizador como el medio de reacción, en este caso el IL, obteniéndose así un producto puro de alto valor añadido. Este objetivo permitirá estudiar las propiedades de los diferentes ILs hidrofóbicos conteniendo sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena, con objeto de encontrar aquellos capaces de generar un medio homogéneo donde llevar a cabo la biocatálisis, y además aportar al derivado enzimático inmovilizado una alta actividad y estabilidad operacional (**Capítulo I y II**).
2. Estudiar la eficacia y adecuación de los ILs con sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena en la síntesis de monoacilglicéridos a través de esterificación directa entre diferentes ácidos grasos (i.e., ácido oleico, palmítico, mirístico, decanoico y láurico) con glicerol en diferentes líquidos iónicos (ILs) (i.e., 1-hexadecil-3-metilimidazolio bistriflimida $[C_{16}mim][NTf_2]$ y 1-dodecil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato $[C_{12}mim][BF_4]$) donde se propondrán protocolos sencillos y eficientes para llevar a cabo la separación de los productos, y la recuperación integral de los diferentes ILs, con objeto de poder llevar a cabo tanto la recuperación como la reutilización del sistema ILs/biocatalizador libre de ácidos grasos, y la preservación de la eficacia catalítica de los procesos (**Capítulo IV**).

Capítulo III

3. El desarrollo y aplicación de nuevos protocolos sencillos y eficaces para separación de los productos, y de recuperación y reutilización integral de los sistemas ILs/biocatalizador será de máxima prioridad en este objetivo.

Se estudiará la síntesis biocatalítica integral de biocombustibles oxigenados a partir de aceites vegetales y de desecho, mediante esterificación directa de los ácidos grasos libres con solketal o metanol y/o la transesterificación de los triacilglicéridos también con solketal y metanol, utilizando líquidos iónicos hidrofóbicos, como medio de reacción, y recuperando totalmente el sistema biocatalizador/IL para su posterior uso, sin pérdida de actividad enzimática después de varios ciclos de reacción (**Capítulo V**).

CAPÍTULO IV

“SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE MONOACILGLICÉRIDOS EN LÍQUIDOS IÓNICOS TIPO ESPONJA”

Capítulo IV

Capítulo IV

RESUMEN

La síntesis biocatalítica de monoacilglicéridos (MAGs) se llevó a cabo mediante esterificación directa entre ácidos grasos (i.e., cáprico, láurico, mirístico, palmítico y oleico) y glicerol, empleándose para ello diferentes líquidos iónicos tipo esponja (SLILs), basados en cationes imidazolio conteniendo una larga cadena alifática lateral (i.e., 1-hexadecil-3-metilimidazolio), y aniones de diferente naturaleza (i.e., bistriflimida), como por ejemplo $[C_{16}mim][NTf_2]$ y $[C_{12}mim][BF_4]$.

De los SLILs ensayados, el $[C_{12}mim][BF_4]$ resultó ser el medio más eficiente para llevar a cabo la síntesis enzimática mediante esterificación directa entre los diferentes ácidos carboxílicos empleados y el glicerol, obteniéndose prácticamente en todos los casos conversión y selectividad del 100%. La naturaleza hidrofóbica del catión y la hidrofiliidad del anión resultaron esenciales para conseguir sistemas de reacción monofásicos y homogéneos, que permitieron la verificación de la acción biocatalítica de modo selectivo hacia el producto deseado.

Por otro lado, y debido al carácter conmutable de estos SLILs, capaces de cambiar de estado sólido a líquido y viceversa con simples cambios de temperatura, fue posible el diseño de un protocolo sostenible de separación-reacción, permitiéndose así la fácil recuperación y la reutilización de estos SLILs y del biocatalizador.

Capítulo IV

INTRODUCCIÓN

El uso de fuentes energéticas tradicionales de origen fósil ha incidido de manera negativa sobre el medio ambiente causando un fuerte impacto en el denominado cambio climático, así como efectos en los ecosistemas y la salud asociados a las emisiones generadas, como consecuencia de la creciente demanda energética requerida para el desarrollo de las actividades humanas e industriales actuales. Desde hace aproximadamente una década, el descubrimiento de nuevas vías de aprovechamiento de la glicerina está suponiendo un enorme reto debido a la gran disponibilidad de la misma como consecuencia de ser un subproducto excedente en la industria del biodiesel. En este sentido, existe un gran interés en el aprovechamiento de la glicerina como materia prima para su valorización industrial en el desarrollo de otros productos, razón por la que está siendo objeto de estudio en diversos procesos químicos, con catalizadores clásicos o enzimáticos, así como por transformaciones empleando microorganismos (García *et al.*, 2014). Por esta razón, el uso de glicerol para producir monoacilglicéridos mediante esterificación con ácidos carboxílicos constituye una opción interesante para la valorización industrial de este desecho de la industria del biodiesel (Ciriminna *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2014).

Los monoacilglicéridos (MAGs) son sustancias anfipáticas no iónicas con propiedades emulsionantes, ampliamente utilizados en alimentación, en la industria farmacéutica y en la industria cosmética (Zhong *et al.*, 2014). Estos compuestos resultan de gran interés en la industria médica debido a su actividad biológica como agentes antimicrobianos (Zhang *et al.*, 2010), además de haberse utilizado en el tratamiento de la hiperplasia prostática (Shimada *et al.*, 1997), etc.), así como para el desarrollo de vectores portadores de medicinas en la industria farmacéutica (Vollhardt *et al.*, 2015). Hoy, los MAGs comerciales son fabricados por glicerólisis química de grasas/aceites y glicerol a altas temperaturas (220-250°C), mediante empleo de catalizadores alcalinos inorgánicos. Adicionalmente a la baja selectividad de dicho proceso, que genera mezclas incontroladas de diferentes MAGs y subproductos indeseados, el uso de tan alta temperatura también tiene otros inconvenientes, tales como un color oscuro del producto final, sabor a quemado, y alto consumo de energía. Así, esta glicerólisis química suele proporcionar mezclas del 35-60% MAGs, 35-50% de diacilglicéridos (DAGs), 1-20% de triacilglicéridos (TAGs), con contenido en ácidos grasos libres del

Capítulo IV

1-10% (AGLs), y todo esto junto con las sales metálicas alcalinas empleadas en el proceso catalítico (Damstrup *et al.*, 2006).

Por lo general, la técnica de destilación molecular, proceso de destilación a alta presión de vacío y a la menor temperatura posible, es la técnica usualmente utilizada para purificar el producto de reacción, a fin de obtener MAGs de una pureza no inferior al 70%, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud y la directiva de la Unión Europea (European Food Emulsifier Manufacturers Association, 2015).

La esterificación directa de glicerina con ácidos grasos libres es uno de los métodos más populares para la síntesis selectiva de MAGs (Figura 1A).

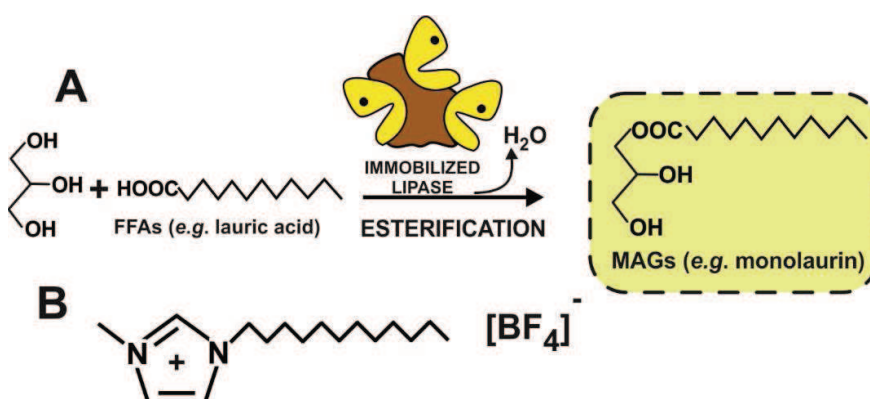


Figura 1. A. Esquema de la síntesis catalizada por lipasa inmovilizada de monoacilglicéridos (MAGs) por esterificación directa de ácidos grasos libres (i.e., ácido láurico con glicerol). B. Estructura del SLIL-[C₁₂mim][BF₄], como ejemplo de IL conmutable con la temperatura de fase líquida/sólida y utilizado para la síntesis selectiva de MAGs (Lozano *et al.*, 2017).

De esta manera, se han utilizado catalizadores tanto químicos (i.e., estructuras silíceas mesoporosas diseñadas con sitios ácidos activos) (Díaz *et al.*, 2000; Pérez-Pariente *et al.*, 2003) como enzimáticos (i.e., lipasas inmovilizadas) (Freitas *et al.*, 2007; Baum *et al.*, 2016). En los casos en los que se emplearon catalizadores mesoporosos, fueron necesarias altas temperaturas para que la reacción tuviera lugar (100-240°C), obteniéndose una síntesis selectiva de los MAGs (hasta el 96%) pero unos muy bajos niveles de conversión (5.8-31%) (Pérez-Pariente *et al.*, 2003). El aumento en el nivel de conversión hasta un 92% fue acompañado por una disminución en la selectividad de MAGs hasta un 62% (Díaz *et al.*, 2000). Resultados similares fueron obtenidos mediante el empleo de lipasas inmovilizadas. A modo de ejemplo, la lipozima IM20 catalizó la síntesis de monolaurina por esterificación de glicerol con ácido láurico en un

Capítulo IV

sistema libre de disolvente dando lugar a una conversión de 75% y una selectividad de monolaurina de hasta el 40% (Freitas *et al.*, 2007). Desde un punto de vista termodinámico, un aumento del contenido máximo de MAGs, con relación a la cantidad total de acilglicéridos sintetizados, puede ser alcanzado mediante el uso de un exceso de glicerol en el medio de reacción. Sin embargo, la solubilidad limitada de glicerol en TAGs y/o ácidos grasos libres conduce a la formación de sistemas bifásicos con baja eficiencia para desplazar el equilibrio de la reacción hacia un aumento de la formación de MAGs.

Han sido ensayadas varias estrategias basadas en la ingeniería del medio de reacción, tales como el uso de co-disolventes orgánicos (i.e., t-pentanol, t-butanol), (Damstrup *et al.*, 2006) o surfactantes anfóteros (i.e., cocamidopropil betaína, CAPB) (Baum *et al.*, 2016) con el fin de proporcionar medios de reacción monofásicos.

A través de estos enfoques, fue posible alcanzar una conversión cercana al 100 %, a pesar de que la selectividad en la síntesis de los MAGs fue similar a los enfoques anteriores. Un ejemplo de ello, fue el proceso de glicerolisis de trilaurina catalizada por Novozym 435, llevado a cabo en 500% v/v t-pentanol lo que permitió obtener un 76,4% de MAGs, 14,5% de DAGs y 9,1% de TAGs después de 2h de reacción a 50°C (Damstrup *et al.*, 2006). En comparación con el t-butanol, la adición de CAPB condujo a contenidos de MAGs similares para la síntesis enzimática de monolaurina, aunque este tensioactivo no necesitó ser eliminado de la mezcla de reacción, ya que es un aditivo interesante en productos de cosmética (Baum *et al.*, 2016).

Los líquidos iónicos (ILs) son excepcionales medios de reacción no acuosos para llevar a cabo procesos quimocatalíticos (Dupont *et al.*, 2002; Dupont *et al.*, 2010; Hallett *et al.*, 2011; Dupont *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013) y biocatalíticos (Cantone *et al.*, 2007; Lozano *et al.*, 2010; Itoh *et al.*, 2014; Lozano *et al.*, 2015; Matsubara *et al.*, 2015). Estas sales compuestas exclusivamente por iones, poseen puntos de fusión inferiores a 100°C. Su uso ha dado lugar a una revolución de la química verde debido a su gama única de propiedades físico-químicas, tales como una, baja presión de vapor, naturaleza no inflamable, alta conductividad iónica, un excelente poder de disolución hacia muchos sustratos, estabilidades química y térmica altas, etc. (Wasserscheid *et al.*, 2008). En cuanto a la síntesis biocatalítica de los MAGs en líquidos iónicos (**Figura 1B**), estudios anteriores han demostrado como el derivado enzimático inmovilizado Novozym 435 fue capaz de obtener hasta el 90% de rendimiento de MAGs y casi un

Capítulo IV

100% de conversión de triacilglicéridos para la glicerólisis de aceites comerciales en medio IL-metosulfato de cocosalkilpentaetoximetilamonio [CPMA][MS] (Guo *et al.*, 2005, 2006^a, 2006b). Estos resultados se pudieron atribuir a la estructura anfílica de este IL miscible en agua capaz de crear un sistema compatible para el glicerol, los aceites y las grasas. La existencia simultánea de un grupo alquílico de larga cadena lateral hidrófoba que contenía restos hidrófilos en el catión, resultó ser esencial para la disolución de los triacilglicéridos (TAGs), así como para inducir el cambio de equilibrio de la reacción hacia la formación de los MAGs. Además cabe destacar que aunque la síntesis fue muy eficiente, en ningún momento se diseñaron estrategias para la recuperación de los MAGs del medio de reacción (Guo *et al.*, 2006b).

Aunque la combinación de biocatalizadores con ILs dan como resultado sistemas sinérgicos para muchos procesos sintéticos (Cantone *et al.*, 2007; Lozano *et al.*, 2010a; Itoh *et al.*, 2014; Lozano *et al.*, 2015; Matsubara *et al.*, 2015), el desarrollo de enfoques sencillos, baratos y/o sostenibles para la extracción de productos es clave para implementar plenamente este tipo de tecnologías (Lozano *et al.*, 2015a). El carácter verde de los líquidos iónicos como medios/disolventes de reacción debe siempre ser demostrado por su eficiente recuperación y reutilización.

En este contexto, el presente capítulo aborda el estudio de la síntesis biocatalítica de MAGs en líquidos iónicos tipo esponja-SLILs, basados en cationes con largas cadenas laterales alquílicas (Lozano *et al.*, 2015a) (i.e., bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-octadecil-3-metilimidazolio [C₁₈mim][NTf₂]), que tan excelentes cualidades habían demostrado tanto como medios de reacción para esterificaciones y transesterificaciones catalizadas enzimáticamente, como por ser excelentes medios de separación (i.e., síntesis de biodiesel (Lozano *et al.*, 2013), en producción de ésteres alifáticos de terpenos (Lozano *et al.*, 2012), y de acetato de anisilo (Lozano *et al.*, 2014), etc.). Estos líquidos iónicos son capaces de disolver los sustratos del medio de reacción, y formar sistemas monofásicos líquidos a temperaturas superiores a sus puntos de fusión, pero compatibles con la actividad enzimática, y que han demostrado ser excelentes medios de reacción y separación.

Después de las reacciones, se observó también cómo estas soluciones totalmente claras se convertían en sólidas por enfriamiento a temperatura ambiente permitiendo extraer de la mezcla sólida el producto de la reacción por simple centrifugación a una temperatura inferior. Esto dio como resultado una fase líquida superior de producto prácticamente

Capítulo IV

puro, permitiendo así, disponer del líquido iónico para una nueva etapa catalítica (Lozano et al 2012, Ritter *et al.*, 2013), tal como se observa en la **Figura 2 (A-C)**. En dicha Figura también se presenta, una hipótesis de la organización estructural de dichos ILs en estado sólido, conteniendo los líquidos atrapados en el interior de la matriz (**Figura 2D**).

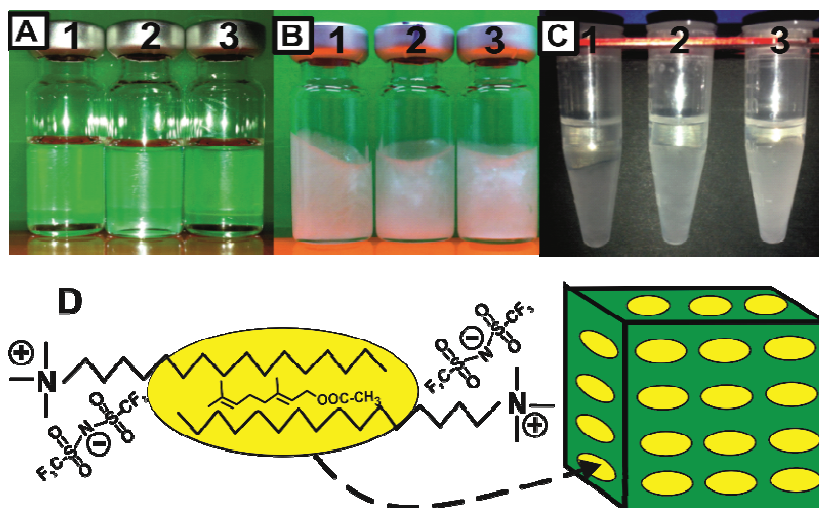


Figura 2. Comportamiento de fases de mezclas [C16tma][NTf2]/acetato de geraniol 50/50 (1), 60/40 (2) y 70/30 (3) (p/p) a 50 °C (A), 25 °C (B), y tras cuatro etapas consecutivas de centrifugación a 14 000 rpm (15 min) y a temperatura ambiente, 21, 10 y 4 °C (C), respectivamente. (D) Representación esquemática de la posible organización estructural de la red sólida de [C₁₆tma][NTf₂] (verde) con huecos hidrofóbicos conteniendo acetato de geraniol en estado líquido (Lozano *et al.*, 2017).

Este fenómeno, también se observó en la mezcla de líquidos iónicos basados en cationes imidazolio, tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio (Dullius *et al.*, 1998), y tetrafluoroborato de 1-octil-3-metilimidazolio (Dyson *et al.*, 2001), etc. Estos ILs en presencia de agua se comportaban como sistemas termosensibles que sufrían una transformación reversible de dos fases a una fase con cambios de temperatura. Esta propiedad ha sido aplicada con éxito en transformaciones organometálicas selectivas (i.e., hidrodimerización (Dullius *et al.*, 1998), hidrogenación (Dyson *et al.*, 2001)) en sistemas monofásicos IL/agua y donde mediante calentamiento, fue posible la fácil recuperación de los productos de la reacción por simple enfriamiento, debido a la formación de sistemas bifásicos.

Capítulo IV

Este trabajo muestra por primera vez un protocolo para la producción limpia de MAGs puros, basándonos en la combinación de la alta selectividad de Novozym-435 para la síntesis de esteres con las propiedades genuinas que han demostrado los SLILs, lo que podría permitir una separación sencilla del producto, así como la recuperación total del sistema SLIL-biocatalizador para su reutilización posterior. Los resultados demostraron por primera vez, la idoneidad de diferentes SLILs (i.e., bis[(trifluorometil)sulfonyl]imida de 1-hexadecil-3-metilimidazolio: $[C_{16}mim][NTf_2]$, tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio: $[C_{12}mim][BF_4]$) como medios de reacción catalizada por Novozym 435 para la síntesis de MAGs por esterificación directa de glicerina con diferentes ácidos grasos libres (i.e., ácidos oleico, palmítico, mirístico, láurico y cáprico) (**Figura 1**). Fueron objeto de estudio la optimización de las condiciones de reacción (i.e., relación molar AGLs-glicerol, naturaleza de los SLILs), así como el diseño de un protocolo de extracción de los productos de reacción mediante operaciones de enfriamiento/centrifugación haciendo uso del comportamiento tipo esponja que presentan estos líquidos iónicos.

Capítulo IV

PARTE EXPERIMENTAL

Productos químicos

El derivado enzimático inmovilizado de *Candida antarctica* B (Novozym 435, EC 3.1.1.3) se obtuvo de Novozymes S.A. (España). El glicerol (99% de pureza), ácido cáprico (98% de pureza), ácido láurico (98% de pureza), ácido mirístico (99% de pureza), ácido palmítico (99% de pureza), ácido oleico (99% de pureza), anhidro tert-butanol (99.5% de pureza), agente desecante 13X (MS13X; 10 Å de tamaño de poro, 270 mg de adsorción de H₂O/g), disolventes y otros productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich, Fluka (Madrid, España).

Los ILs: bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de octadeciltrimetilamonio ([C₁₈tma][NTf₂], 99% de pureza), bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de hexadeciltrimetilamonio ([C₁₆tma][NTf₂], 99% de pureza), bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de tetradeciltrimetilamonio ([C₁₄tma][NTf₂], 99% de pureza), bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de dodeciltrimetilamonio ([C₁₂tma][NTf₂], 99% de pureza), bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de deciltrimetilamonio ([C₁₀tma][NTf₂], 99% de pureza), bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-octadecil-3-metilimidazolio ([C₁₈mim][NTf₂], 99% de pureza), bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-hexadecil-3-metilimidazolio ([C₁₆mim][NTf₂], 99% de pureza), bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-tetradecil-3-metilimidazolio ([C₁₄mim][NTf₂], 99% de pureza), bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-dodecil-3-metilimidazolio ([C₁₂mim][NTf₂], 99% de pureza), bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-decil-3-metilimidazolio ([C₁₀mim][NTf₂], 99% de pureza), tetrafluoroborato de 1-hexadecil-3-metilimidazolio ([C₁₆mim][BF₄], 99% de pureza), tetrafluoroborato de 1-tetradecil-3-metilimidazolio ([C₁₄mim][BF₄], 99% de pureza) y tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio ([C₁₂mim][BF₄], 99% de pureza), se obtuvieron de IoLiTec GmbH (Alemania).

Esterificación directa entre glicerol y ácidos grasos libres catalizada por lipasa en SLILs

En viales de 3 mL con tapón de rosca y septum de silicona-teflón, se añadieron 0.3, 0.7 ó 2 mmoles de ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico o

Capítulo IV

ácido oleico, respectivamente, y se mezclaron con 2 mmoles de t-butanol y la cantidad correspondiente de glicerol para lograr finalmente una relación molar 1: 4 de ácido: glicerol. A continuación, se añadió la cantidad correspondiente del IL de estudio ($[C_{10}tma][NTf_2]$, $[C_{12}tma][NTf_2]$, $[C_{14}tma][NTf_2]$, $[C_{16}tma][NTf_2]$, $[C_{18}tma][NTf_2]$, $[C_{10}mim][NTf_2]$, $[C_{12}mim][NTf_2]$, $[C_{14}mim][NTf_2]$, $[C_{16}mim][NTf_2]$, $[C_{18}mim][NTf_2]$, $[C_{12}mim][BF_4]$, $[C_{14}mim][BF_4]$ o $[C_{16}mim][BF_4]$, respectivamente) hasta llegar a un 45% (p/p) de concentración final de IL con respecto a la masa total.

Las mezclas de reacción resultantes se pre-incubaron a 60°C durante 10 min, dando lugar a sistemas monofásicos, añadiéndose posteriormente 240mg de MS13x.

La reacción se inició mediante la adición de Novozym 435 (60 mg por mmol de ácido carboxílico) y se agitó la mezcla de reacción (200 rpm) a 60°C durante 8h bajo condiciones de vacío.

Para obtener perfiles cinéticos, se tomaron alícuotas de 15 μ L en intervalos regulares y se suspendieron en 485 μ L de solución de dodecano:isopropanol (95:5, v/v), donde las mezclas bifásicas resultantes se mezclaron fuertemente por agitación durante 3 min, para posteriormente centrifugar a 15.000 rpm durante 15 min a 6°C. Por último, se tomaron 300 μ L de la fase líquida dodecano/isopropanol (fase superior que contiene acilglicéridos) y se añadieron 200 μ L de tributirina 10 mM (patrón interno) en solución de dodecano/isopropanol (95:5, v/v), analizándose la solución final por cromatografía.

Análisis GC

El análisis GC se realizó con un cromatógrafo Shimadzu GC-2010 (Shimadzu Europa, Alemania) equipado con un detector FID y un inyector automático. Las muestras se analizaron en una columna capilar TRB-Biodiesel (10 m x 0.28 mm x 0.1 μ m, Teknokroma, España), utilizando tributirina como patrón interno, bajo las siguientes condiciones: Gas portador: He a 30.0 kPa (15 ml/min de flujo total); programa de temperatura: 100°C, 10°C/min, 200 °C, 15 °C/min, 370 °C, relación de separación variable (80: 1 a 10: 1); temperatura del detector, 370°C (Lozano *et al.*, 2013; Lozano *et al.*, 2012; Lozano *et al.*, 2014). Los tiempos de retención de los distintos picos (min) fueron los siguientes: tributirina, 5.5; ácido cáprico, 2.1; ácido láurico, 3.5; mirístico ácido, 5.4; ácido palmítico, 6.8; ácido oleico, 8.2; monocaprina,

Capítulo IV

5.8; monolaurina, 7.5; dilaurina, 14.4; trilaurina, 18.9, monomiristina, 9.0; monopalmitina, 10.4; monooleína, 11.6; dioleína, 19.8.

Recuperación de productos de los SLILs

La mezcla de reacción monooleína/[C₁₈mim][NTf₂] se incubó a 60°C hasta que se observó una fase homogénea totalmente monofásica. Entonces, se añadió agua caliente (1 ml, 60°C), y la mezcla multifásica resultante fue fuertemente agitada durante 30 min a 60 °C, siendo finalmente enfriada a temperatura ambiente.

Ésta se centrifugó consecutivamente tres veces a 15.000 rpm (60 min), a las siguientes temperaturas ambiente (no controlada), 23 y 15°C, respectivamente, lo que resultó en tres fases: una fase superior de acilglicéridos, una fase media acuosa y una fase inferior que contenía el sólido SLIL. La fase superior se aisló, y el SLIL se lavó de nuevo con 1 ml de agua a 60°C durante 15 min, y finalmente se centrifugó la mezcla (30 min a temperatura ambiente) para llegar a una plena separación entre la monooleína y el SLIL. La fracción extraída de acilglicérido (fase superior), se analizó mediante ¹⁹F RMN con objeto de determinar su pureza. La muestra se preparó, adicionando 80 µL del extracto en 450 µL de acetona-δ₆ que contenía TFA (80µL), como patrón interno.

Se analizaron muestras a 300 MHz por ¹⁹F RMN en un espectrómetro Bruker AC 200E, y el IL residual se cuantificó con respecto a una solución estándar de [C₁₈mim][NTf₂] en acetona-δ₆ que contenía TFA.

El protocolo que se diseñó para los casos en los que se emplearon SLIL de naturaleza aniónica hidrofílica con anión [BF₄], consistió en incubar a 60°C la mezcla de reacción hasta que se observó una fase homogénea totalmente clara. Entonces, se añadió 1 ml de dodecano a cada muestra, y las soluciones monofásicas completamente transparentes resultantes fueron fuertemente agitadas durante 3 min a temperatura ambiente, incubándose a continuación en un baño de hielo durante 15 minutos. La mezcla acilglicéridos /SLILs/dodecano fue centrifugada a 15.000 rpm (15 min) y a 6°C, lo que permitió con la precipitación completa del [C₁₂mim][BF₄]. Se recogió la fase superior, y el contenido residual de IL se analizó por ¹⁹F RMN, como se describe en el apartado anterior utilizando una solución de [C₁₂mim][BF₄] en acetona-δ₆ con TFA, como el estándar. La separación de los acilglicéridos del dodecano, se consiguió

Capítulo IV

incubando durante 5 min a -10°C, y con la posterior centrifugación a 15.000 rpm (15 min) y a 0 °C, resultando la precipitación de los acilglicéridos.

Identificación de acilglicéridos por GC / MS

El análisis por GC-MS de los medios de reacción se llevó a cabo mediante el uso de un instrumento GC-6890 (Agilent, EE.UU.) junto con un sistema MS-5973 (Agilent, EE.UU.). El GC estaba equipado con una columna HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 m, Agilent, EE.UU.). Se utilizaron las condiciones siguientes: gas portador: He a 1 mL / min; split de: 1: 1; programa de temperatura: 60°C, 1 min; 10°C / min, 300°C, 5 min; MS energía de la fuente de ionización, 70 eV; el tiempo de exploración fue de 0.5 s, cubriendo un rango de masas de 40-800 uma. Cada pico de FAMES y FASEs fue identificado para su comparación con los espectros de masas obtenidos de la base “Biblioteca NIST”. La **identificación de los compuestos** fue la siguiente: monocaprina, tiempo de retención (Rt, min): 16.8; ión positivo (M/z): 57.1, 74.1, 98.1, 134.1, 155.1, 173.1, 215.2. monolaurina, Rt: 18.5; (M/z): 57.1, 74.1, 98.1, 117.2, 134.1, 157.1, 183.2, 201.2, 243.2. Dilaurina, Rt: 22.7; (M/z): 57.1, 74.1, 98.1, 117.1, 134.0, 183.2, 201.2, 243.2. Trilaurin, Rt: 27.0; (M/z): 57.1, 74.1, 98.1, 129.1, 183.2, 243.2. Monomiristina, Rt: 17.5; (M/z): 57.1, 73.1, 97.1, 134.1, 173.1, 199.2, 229.2. Monopalmitina, Rt: 19.0; (M/z): 57.1, 74.1, 97.1, 129.1, 173.1, 199.2, 239.3, 257.3. Monooleina, Rt: 20.6; (M/z): 55.1, 97.1, 123.1, 151.1, 180.2, 222.2, 265.3, 338.3. Dioleína, Rt: 23.4; (M/z): 55.1, 74.1, 101.1, 131.1, 152.1, 172.1, 203.1, 264.3, 339.3.

Capítulo IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de monoacilglicéridos catalizada por lipasa mediante esterificación directa de glicerol

Se estudió la idoneidad de la lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* B para llevar a cabo la síntesis biocatalítica de MAGs por esterificación directa de ácidos grasos libres (i.e., ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico y ácido oleico) con glicerol en trece SLILs diferentes ($[C_{10}tma][NTf_2]$, $[C_{12}tma][NTf_2]$, $[C_{14}tma][NTf_2]$, $[C_{16}tma][NTf_2]$, $[C_{18}tma][NTf_2]$, $[C_{10}mim][NTf_2]$, $[C_{12}mim][NTf_2]$, $[C_{14}mim][NTf_2]$, $[C_{16}mim][NTf_2]$, $[C_{18}mim][NTf_2]$, $[C_{12}mim][BF_4]$, $[C_{14}mim][BF_4]$ y $[C_{16}mim][BF_4]$) a 60 °C. Teniendo en cuenta que la reacción de esterificación se puede controlar termodinámicamente, la presencia de tamices moleculares, un agente deshidratante, así como el uso de condiciones de vacío, permiten el desplazamiento del equilibrio de la reacción hacia la formación de los productos, debido a la eliminación total del agua producida en ella (Lozano *et al.*, 2012).

En base a estas premisas, se ensayó la síntesis de monooleato de glicerilo en presencia del SLIL- $[C_{18}tma][NTf_2]$, pero teniendo en cuenta las elevadas limitaciones difusionales de los sustratos al centro activo de la enzima debido a la inmiscibilidad de los mismos entre sí, y la del glicerol en estos nuevos ILs tipo esponja con carácter hidrofóbico, se decidió evaluar la influencia de la adición de diferentes cosolventes (i.e., acetona, acetonitrilo y *tert*-butanol), como puede verse en la **Figura 3**. Los resultados mostraron como el *tert*-butanol fue el disolvente que mejor ayudó a la homogenización del medio, aumentándose así la conversión y selectividad obtenidas tras 24h de reacción.

Capítulo IV

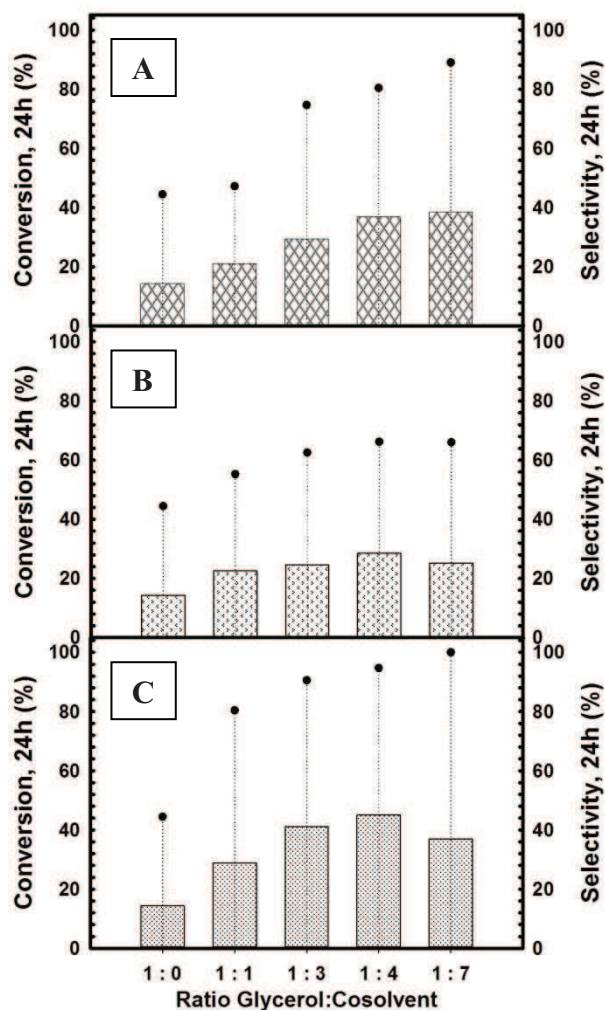


Figura 3. Conversión y selectividad en la síntesis enzimática de monooleato de glicerilo mediante esterificación directa de glicerol y ácido oleico, catalizada por el derivado inmovilizado Novozym 435, en SLIL-[C₁₈tma][NTf₂] y empleándose como cosolventes: acetona (A), acetonitrilo (B) y terc-butanol (C) a 60°C.

Con objeto de alcanzar mejores conversiones y selectividades, se decidió realizar un cribado con 12 ILs de carácter ligeramente más hidrofílico (i.e., [C₁₀mim][NTf₂], [C₁₄mim][NTf₂], [C₁₆mim][NTf₂], [C₁₈mim][NTf₂], [C₁₂mim][BF₄], [C₁₄mim][BF₄], [C₁₆mim][BF₄], [C₁₀tma][NTf₂], [C₁₂tma][NTf₂], [C₁₄tma][NTf₂], [C₁₆tma][NTf₂], [C₁₈tma][NTf₂]) (**Figura 4**) para favorecer así el aumento de la solubilidad del sustrato más polar (glicerol). Los resultados mostraron como por regla general, cuando aumentaba el número de carbonos en la cadena lateral del IL hidrofóbico se obtenía una mejor conversión de monooleato de glicerilo tras 24h de reacción, con selectividades prácticamente del 100% en los casos donde se emplearon ILs con catión amonio y selectividades alrededor del 60% en los casos con catión imidazolio. Sin embargo, no

Capítulo IV

mostró la misma tendencia los SLILs- $[C_x\text{mim}][\text{BF}_4]$, siendo $x=12, 14$ y 16 , ya que en este caso a menor número de carbonos en la cadena lateral, aumentó la conversión manteniéndose la selectividad 100% en todos los casos. Fue por tanto el SLIL- $[C_{12}\text{mim}][\text{BF}_4]$ el que logró el mejor valor de conversión y selectividad para la síntesis de monooleato de glicerilo tras 24h de reacción a 60°C de todos los ILs ensayados. Las características genuinas de este IL, que tiene de base un catión hidrófobo (i.e., $[C_{12}\text{mim}]$) y un anión (i.e., $[\text{BF}_4]$) miscible en agua, fue capaz de proporcionar un medio de reacción iónico anfílico, que permitió el transporte del ácido oleico y el glicerol como sustratos (que son mutuamente inmiscibles) al sitio activo de la enzima, así como la salida de los MAGs formados al medio de reacción.

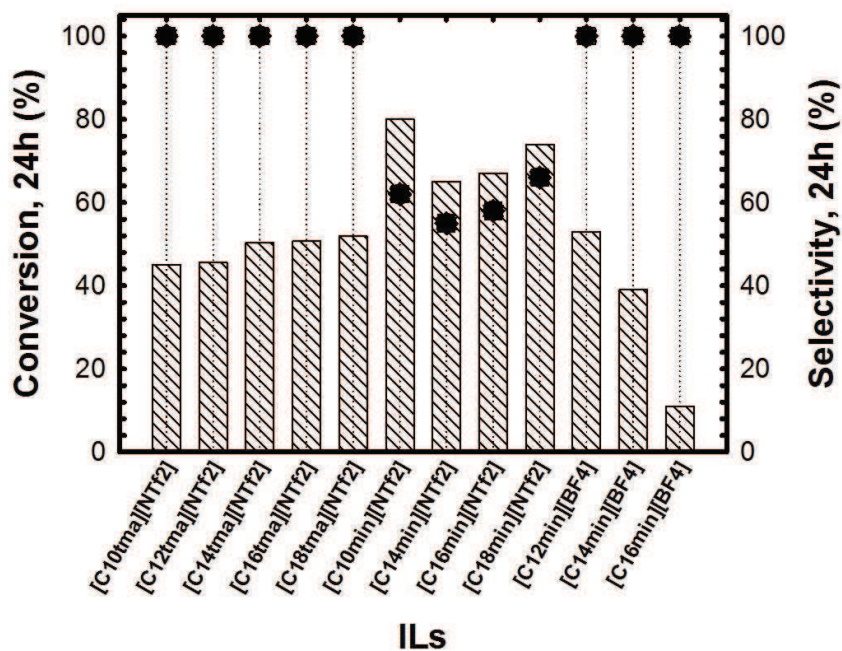


Figura 4. Síntesis enzimática de monooleato de glicerilo mediante esterificación directa de glicerol y ácido oleico catalizada por el derivado inmovilizado Novozym 435, donde se representa la conversión y selectividad (%) del monooleato de glicerilo en diferentes ILs después de 24h de reacción a 60°C y utilizando como cosolvente terc-butanol (2 mmol).

Uno de los parámetros más importantes en las reacciones químicas y enzimáticas que además es necesario controlar en éstas últimas para evitar fenómenos de desactivación, es la temperatura. Por esta razón, se decidió evaluar este parámetro en la síntesis enzimática de monooleato de glicérido en SLIL- $[C_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ a las temperaturas de

Capítulo IV

50, 60 y 70 °C (**Figura 5**). Los resultados mostraron como la temperatura de 60°C, fue la óptima para llevar a cabo esta síntesis biocatalítica, con los mejores valores tanto de conversión como de selectividad. Estos hechos se pueden justificar en base a que el incremento de temperatura favoreció la reacción enzimática por el aumento tanto de la constante de Arrhenius como por el incremento de la solubilidad de los sustratos en el medio de reacción, pero al aumentarse demasiado la temperatura empezaron a tener más influencia los fenómenos de desactivación enzimática que los cinéticos. Por esta razón, se seleccionó esta temperatura para los demás ensayos realizados en este trabajo.

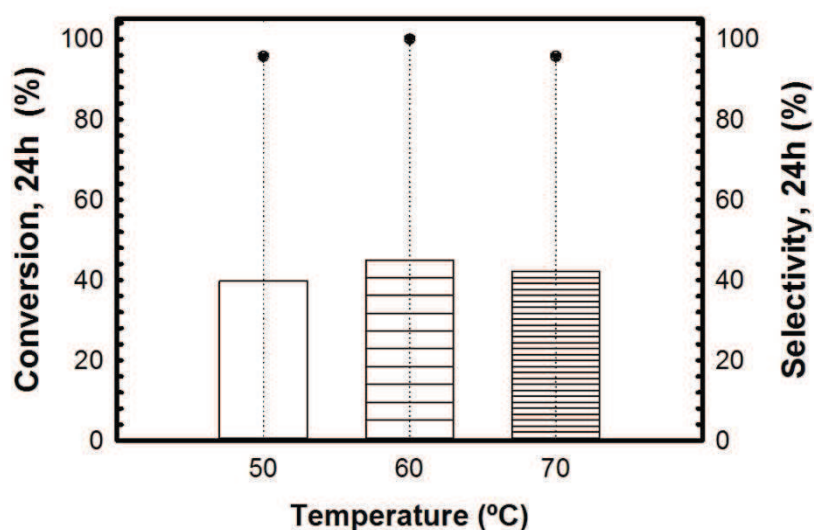


Figura 5. Síntesis de monooleato de glicerilo mediante esterificación directa de glicerol y ácido oleico (razón molar 1:1/3) en medio SLIL-[C₁₈tma][NTf₂] durante 24h de reacción y a 50, 60, 70°C, catalizada por Novozym 435.

Como la enzima es capaz de catalizar la esterificación tanto de uno, como de dos o tres grupos hidroxilo presentes en la molécula de glicerol (Producción de MAGs, DAGs o TAGs, respectivamente), es necesario llevar a cabo la síntesis selectiva de MAGs, la cual está estrechamente relacionada con los fenómenos de transferencia de masa (difusión) alrededor del centro activo de la enzima, siendo éstos determinados por la ingeniería del medio de reacción.

Por tanto, la adición de una pequeña cantidad de cosolvente polar, como puede ser el *tert*-butanol, permitió la reducción de la viscosidad del medio favoreciendo así la transferencia de masa, además el empleo de un IL hidrófobo logró estabilizar la enzima, pero sin embargo dificultó la difusión de las moléculas de glicerol hidrófilas al sitio activo de la enzima, causa a la cual se le atribuyó la multiesterificación de la molécula

Capítulo IV

de glicerol. Este último factor podría explicar la pérdida que se observó en la selectividad de la monolaurina (**Figura 6A**). Además esta hipótesis se confirmó cuando el IL- $[C_{16}mim][NTf_2]$ fue utilizado como medio de reacción (**Figura 6B**). Para este IL, aunque la enzima también proporcionó una transformación completa del ácido láurico, el aumento de la longitud de cadena alquílica del catión imidazolio, causó una pérdida en la selectividad para la síntesis de monolaurina en SLIL- $[C_{12}mim][NTf_2]$ (i.e., 48% monolaurina, 45% dilaurina y 7% trilaurina), a pesar del empleo de una menor proporción de glicerol/AGLs que debería haber favorecido la selectividad hacia los MAGs.

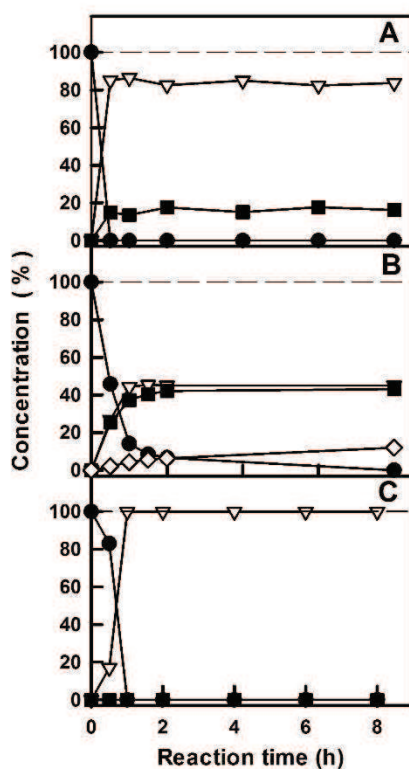


Figura 6. Síntesis enzimática de laurato de glicerilo mediante esterificación directa de glicerol y ácido láurico, catalizada por el derivado inmovilizado Novozym 435, donde se representan los diferentes sustratos intermedios y productos de la reacción; ácido láurico (●), monolaurina (Δ), dilaurina (■) y trilaurina (◇) en $[C_{12}mim][NTf_2]$ (A), $[C_{16}mim][NTf_2]$ (B) y $[C_{12}mim][BF_4]$ a 60°C (C) (Lozano *et al.*, 2017).

Capítulo IV

Se probó también el IL-[C₁₂mim][BF₄] como medio de reacción, con objeto de favorecer el transporte de moléculas de glicerol hacia las partículas de enzima mediante la mejora de la hidrofilia del microambiente del biocatalizador. En este caso, la enzima fue capaz de transformar completamente el ácido láurico a un solo producto de esterificación (MAGs), lográndose la síntesis plenamente selectiva de monolaurina después de 8 horas de reacción (**Figura 6C**).

La **Tabla 1** muestra la conversión de AGLs y los rendimientos para los diferentes productos resultantes de la esterificación directa para diversos ácidos carboxílicos (cáprico, láurico, mirístico, palmítico o ácido oleico) con glicerol en ocho diferentes SLILs después de 4h de reacción a 60°C. Aunque la enzima fue capaz de catalizar la reacción de esterificación en ausencia de ILs (entradas 1 y 2), la selectividad hacia la síntesis de los MAGs resultó extremadamente muy baja. La presencia de líquidos iónicos hidrófobos basados en largas cadenas alifáticas (entradas 3-10) no proporcionó mejoras en la selectividad hacia la síntesis de MAGs en la mayoría de los casos, además se observaron cantidades significativas de DAGs. El cambio del anión [NTf₂] del IL por otro menos hidrofóbico [BF₄], y manteniendo los cationes de [C₁₂mim], permitió la síntesis más selectiva de MAGs, aunque la conversión se redujo (entrada 11), hecho que fue solventado reduciendo la relación molar AGLs/glicerol (entradas 12-18). En estas nuevas condiciones, fue posible lograr conversiones y selectividades próximas al 100% como medio de reacción para los ácidos cáprico, láurico, mirístico, palmítico y oleico en una relación molar AGL/glicerol 0.3 (entradas 12-14). Para el ácido palmítico, la conversión fue ligeramente inferior (entrada 15), mientras que para el ácido oleico, sólo fue posible lograr una conversión moderada después de 4 horas de reacción (53%, entrada 16). El uso de los ILs-[C₁₄mim][BF₄] y [C₁₆mim][BF₄] (entradas 17 y 18) no lograron mejorar los resultados de conversión del ácido oleico, muy probablemente debido a las altas viscosidades de los medios de reacción, mostrándose sin embargo selectividad para la síntesis de MAG en todos los casos del 100%. Estos resultados mostraron claramente la excelente aptitud de estos nuevos líquidos iónicos basados en cationes con larga longitud de cadena y anión [BF₄] para la síntesis selectiva biocatalítica de los MAGs, con independencia de la naturaleza de los AGLs. Las cualidades demostradas por estos ILs se justifican por su naturaleza de red nano-estructurada que permite a las moléculas hidrofóbicas someterse a una

Capítulo IV

difusión más rápida (Dupont *et al.*, 2002, 2010, 2013; Hallett *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2013; Lozano *et al.*, 2015a).

Tabla 1. Distribución de productos y conversión tras 4h de reacción a 60°C para la síntesis biocatalítica de acilglicéridos por esterificación directa de ácidos carboxílicos con glicerol en diferentes líquidos iónicos (*Véase la sección experimental para detalles*) (Lozano *et al.*, 2017).

Entrada	IL	AGL	mmol	Conv. (%)	MAG (%)	DAG (%)	TAG (%)
1	Ninguno	Ácido Láurico	2.0 ^b	98	65	29	6
2	Ninguno	Ácido Oleico	2.0 ^e	77	59	41	0
3	[C ₁₀ min][NTf ₂]	Ácido Láurico	2.0 ^b	91	62	33	5
4	[C ₁₀ min][NTf ₂]	Ácido Oleico	2.0 ^e	80	62	38	0
5	[C ₁₂ min][NTf ₂]	Ácido Láurico	2.0 ^b	100	85	15	0
6	[C ₁₄ min][NTf ₂]	Ácido Oleico	2.0 ^e	65	55	45	0
7	[C ₁₆ min][NTf ₂]	Ácido Láurico	0.7 ^b	93	48	45	7
8	[C ₁₆ min][NTf ₂]	Ácido Oleico	2.0 ^e	67	58	42	0
9	[C ₁₈ min][NTf ₂]	Ácido Láurico	2.0 ^b	91	68	26	6
10	[C ₁₈ min][NTf ₂]	Ácido Oleico	2.0 ^e	74	66	34	0
11	[C ₁₂ min][BF ₄]	Ácido Láurico	0.7 ^b	66	100	0	0
12	[C ₁₂ min][BF ₄]	Ácido Cáprico	0.3 ^a	100	100	0	0
13	[C ₁₂ min][BF ₄]	Ácido Láurico	0.3 ^b	100	100	0	0
14	[C ₁₂ min][BF ₄]	Ácido Mirístico	0.3 ^c	100	100	0	0
15	[C ₁₂ min][BF ₄]	Ácido Palmítico	0.3 ^d	80	100	0	0
16	[C ₁₂ min][BF ₄]	Ácido Oleico	0.3 ^e	53	100	0	0
17	[C ₁₄ min][BF ₄]	Ácido Oleico	0.3 ^e	39	100	0	0
18	[C ₁₆ min][BF ₄]	Ácido Oleico	0.3 ^e	11	100	0	0

La cadena alifática del catión fue capaz de ofrecer un entorno adecuado para la transferencia de masa de los ácidos grasos libres al sitio activo de la enzima, mientras que la naturaleza menos hidrófoba del anión [BF₄] permitió facilitar el transporte del glicerol (aceptor de acilo) al microentorno de la enzima. Por lo tanto, después de la primera reacción de esterificación con una molécula de glicerol, el producto MAGs se pudo transportar fácilmente al medio de reacción, obteniéndose una elevada selectividad. Por el contrario, mediante el uso de ILs más hidrófobos, el transporte de moléculas de glicerol (que actúa como acepto de acilo) al microentorno de la enzima se redujo enormemente. En estas condiciones, el producto MAGs fue reutilizado por la enzima para una segunda reacción de esterificación, lo que resultó en la síntesis de los DAGs (menor selectividad hacia el producto de interés). En trabajos similares, ya se vio el efecto de los ILs miscibles en agua, un estudio relevante donde se empleó el IL-[CPMA][MS] permitió mejorar la síntesis enzimática de MAGs por glicérolisis, donde

Capítulo IV

la estructura anfílica, resultó clave para disolver sustratos tanto hidrófobos (i.e., TAGs) como hidrófilos (i.e., glicerol) y favorecer el desplazamiento del equilibrio hacia los productos de interés (Guo *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006a; Guo *et al.*, 2006b). En nuestro caso, el catión hidrófobo [C₁₂mim] y el anión [BF₄] miscible en agua proporcionan un ambiente apropiado para la disolución de ambos, ácidos grasos libres y glicerol, respectivamente.

Diseño de un protocolo integral de reacción y separación para la obtención biocatalítica de MAGs en Líquidos Iónicos Tipo Esponja

Para poder llevar a cabo un proceso integral verde y sostenible es necesario desarrollar de forma eficiente un protocolo de separación de los productos de reacción, que nos permita a su vez la reutilización del biocatalizador y del IL, para poder garantizar así el verdor y la sostenibilidad del mismo. A su vez, demostrar la estabilidad operacional de la enzima, es clave para poder llevar a cabo la extrapolación del proceso a escala industrial. La **Figura 7** muestra el perfil de estabilidad operacional del biocatalizador Novozym 435 frente a la reutilización, tanto para [C₁₂mim][NTf₂] (**Figura 7A**) como para [C₁₂mim][BF₄] (**Figura 7B**) como medios de reacción a 60 °C. Como puede verse, los rendimientos y selectividades de los MAGs (para el caso del ácido láurico) se mantuvieron sin cambios después de 8 ciclos consecutivos de reutilización. La excelente capacidad de los líquidos iónicos para estabilizar las enzimas en condiciones no acuosas para su reutilización continua ha sido ampliamente estudiada (Lozano *et al.*, 2001, 2003; De Diego *et al.*, 2005; Feher *et al.*, 2007; Lozano *et al.*, 2012, 2013, 2014, 2015a, 2015c), incluso en condiciones extremadamente duras (i.e., scCO₂ a 120 bar y a 150°C) (Lozano *et al.*, 2003). En este contexto, los sistemas basados en ILs con cationes con sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena resultaron excelentes medios para preservar la actividad catalítica de la enzima, demostrándose en algunos casos que era posible preservar su vida media hasta 1370 d en las condiciones operacionales de máxima actividad durante la síntesis del biodiesel (Lozano *et al.*, 2013). Por otra parte, se postuló que la estructura supramolecular ordenada de los líquidos iónicos en fase líquida también podría ser capaz de actuar como un "molde", estabilizando la estructura activa 3-D de la enzima en estos microambientes no acuosos (De Diego *et al.*, 2005; Lozano *et al.*, 2015a, 2015c).

Capítulo IV

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de procesos de transformación y separación selectiva, capaz de proporcionar directamente productos puros y la plena recuperación de disolventes y catalizadores, es un objetivo clave en la química verde. Las propiedades únicas de los líquidos iónicos basados en cationes con largas cadenas laterales alquílicas, (i.e., $[C_{18}mim][NTf_2]$), conmutables de fase líquida/sólida con la temperatura permiten comportarse como sistemas similares a las esponjas (SLILs), esto ha sido recientemente aplicado con éxito para lograr estos objetivos en la síntesis biocatalítica de los ésteres terpénicos (Lozano *et al.*, 2012, 2014), y biodiesel (Lozano *et al.*, 2013), etc.).

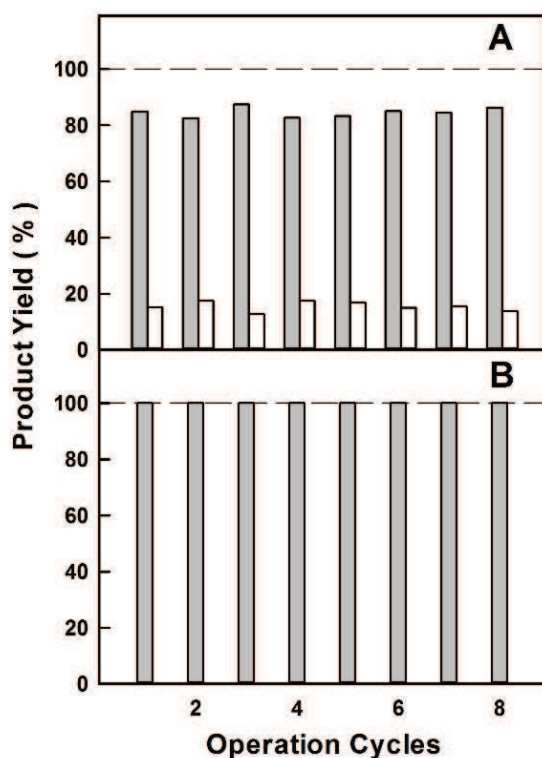


Figura 7. Estabilidad operacional del sistema Novozym 435 y SLILs- $[C_{12}mim][NTf_2]$ (A) y $[C_{12}mim][BF_4]$ (B), evaluada sobre los rendimientos de los productos MAGs (gris) y DAGs (blanco) durante ciclos continuos de operación para la esterificación del ácido láurico con glicerol a 60°C (Lozano *et al.*, 2017).

Capítulo IV

Para poder diseñar un protocolo eficiente de separación fue necesario tener en cuenta los puntos de fusión de los líquidos iónicos ensayados en la **Tabla 1** (Feher *et al.*, 2007), en base a éstos, se desarrolló un protocolo sencillo para la extracción de acilglicéridos, basado en el comportamiento tipo esponja de los mismos (Lozano *et al.*, 2015a). Para ello, se seleccionaron los ILs-[C₁₈mim][NTf₂] (entrada 10) y ([C₁₂mim][BF₄] (entrada 13) como ejemplos representativos. Como se puede ver en la **Figura 8A**, el medio de reacción monooleína/[C₁₈mim][NTf₂] resultó ser un sistema monofásico totalmente traslucido a 60°C, que se convirtió en sólido después de enfriarse a temperatura ambiente. La adición de agua dio como resultado una mezcla heterogénea (**Figura 8B**) y después de una agitación vigorosa durante 30 min a 60°C y enfriando a temperatura ambiente, se obtuvo una mezcla heterogénea semisólida. Llevar a cabo un protocolo iterativo de enfriamiento/centrifugación (*véase la sección experimental para detalles*), se obtuvieron tres fases separadas: una fase superior líquida que contenía la monooleína, una fase acuosa líquida media con el exceso de glicerol no reaccionado (Lozano *et al.*, 2013) y una sólida con el IL y con la fracción de producto no extraído (**Figura 8C**).

La presencia de agua, un disolvente verde molecular no miscible con monooleína ni con [C₁₈mim][NTf₂], mejoró la separación entre fases, que tuvo lugar a la diferencia de densidades entre las distintas fases (monooleína<agua<IL). Mediante ¹⁹F RMN, se determinó la pureza del extracto MAGs (97%), con un 3 % (p/p) de contenido de IL residual, el cual podría haber sido eliminado con una etapa adicional de lavado (Lozano *et al.*, 2013). Para el sistema monooleína/[C₁₂mim][BF₄], la aplicación del mismo protocolo descrito anteriormente presentó algunas dificultades que hizo imposible el diseño de un protocolo de extracción similar al descrito anteriormente, ya que la adición de agua caliente al medio de reacción y la agitación posterior produjo un gel, que imposibilitaba cualquier tipo de separación por centrifugación (**Figura 8D**).

Capítulo IV

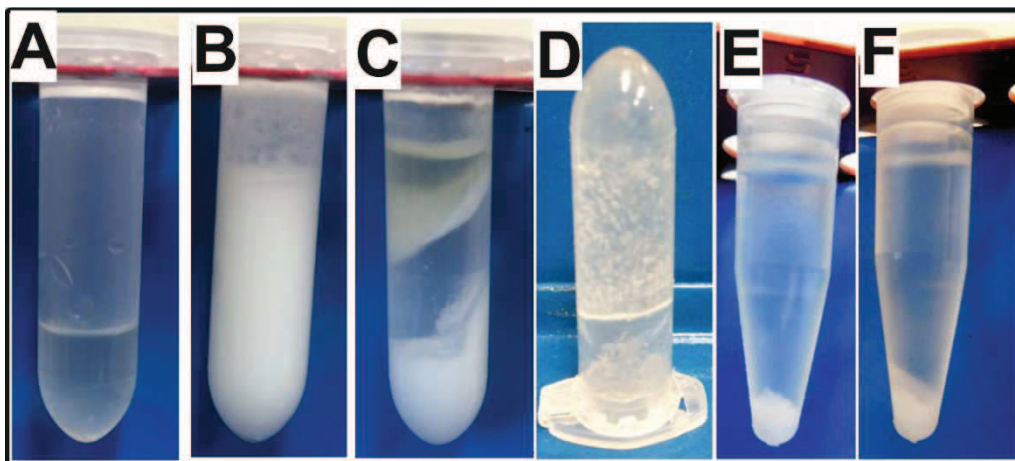


Figura 8. Comportamiento de fases de la mezcla de reacción de monooleína/[C₁₈mim][NTf₂] (Tabla 1, entrada 10) a 60 °C (A), después de la adición de H₂O a 60 °C (B) y tras tres etapas consecutivas de centrifugación a 15.000 rpm (1h) y a temperatura ambiente, 23°C y 15 °C (C). Comportamiento de fases de la mezcla de reacción monolaurina/[C₁₂mim][BF₄] (Tabla 1, entrada 13) después de la adición de H₂O a 60 °C (D), dodecano (1ml) y de centrifugarla a 10°C (E). La imagen F muestra la precipitación de los MAGs presentes en la fase superior (Figura E) por centrifugación a 0°C (ver la sección experimental para más detalles) (Lozano et al., 2017).

La adición de codisolventes polares (i.e., etanol, acetona) no logró mejorar la separación. Sin embargo, se observó cómo el IL-[C₁₂mim][BF₄] soluble en dodecano a temperatura ambiente, permitió precipitar a temperaturas inferiores el IL. En base a esto, fue posible diseñar un protocolo de separación donde la mezcla de reacción monooleína/[C₁₂mim][BF₄] tras disolverse en dodecano y centrifugarse a 6°C, permitió la completa precipitación del IL (Figura 8E), y la extracción de una fase de MAG/dodecano libre de IL, tal como se determinó mediante ¹⁹F RMN. Esta fase de dodecano libre de IL también se obtuvo para medios de reacción mostrados en la Tabla I en las entradas 12-16.

La monooleína como producto se separó por incubación durante 5 min a -10°C, y luego se centrifugó a 15.000 rpm (15 min) y a 0°C, lo que resultó en la precipitación del MAG libre de IL (Figura 8F), y la recuperación del dodecano para su posterior reutilización. Como pudo verse, la metodología propuesta para la producción de MAGs puros también incluyó una forma sencilla de separación y aislamiento de todos los componentes de la mezcla de reacción.

Capítulo IV

CONCLUSIONES

Este trabajo muestra por primera vez un método “verde” para la síntesis altamente selectiva de MAGs por esterificación directa de ácidos grasos libres con glicerol mediante el uso de dos herramientas clave para la química verde, como son los biocatalizadores y los SLILs. Las enzimas son uno de los catalizadores más selectivos, capaces de proporcionar transformaciones químicas en sistemas vivos. Los líquidos iónicos, y sobre todo los que tienen larga longitud de cadena alquílica, son medios de reacción no acuosos ampliamente reconocidos por su capacidad de preservar las propiedades catalíticas de las enzimas (Lozano *et al.*, 2011, 2015a).

El comportamiento tipo esponja de algunos de ellos, así como el carácter conmutable en función de la temperatura (fase sólida/líquida), permitió el desarrollo de protocolos de reacción/separación eficientes para llevar a cabo la síntesis enzimática de MAGs y su posterior purificación. Una selección adecuada de las estructuras del catión y el anión en estos SLILs permitió controlar los procesos de transferencia de masa desde el centro activo de la enzima, favoreciendo la consecución de los procesos selectivos para la síntesis de los MAGs.

De esta manera, los SLILs basados en el anión $[BF_4]$ se mostraron como medios de reacción excepcionales para la síntesis selectiva de MAGs (100% de selectividad, sin ninguna pérdida en la actividad catalítica con la reutilización). Su comportamiento tipo esponja facilitó el desarrollo de protocolos sencillos, basado en etapas de enfriamiento y centrifugación que permitieron una fácil y completa recuperación de los MAGs puros, de los SLILs y de los disolventes utilizados. La sinergia entre las enzimas y los líquidos iónicos tipo esponja (SLILs) abren el camino a nuevas plataformas sostenibles para el desarrollo de procesos de interés industrial en la química verde.

Capítulo IV

Capítulo IV

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson EM, Larsson KM, Kirk O., **1998**. *Biocatal. and Biotransform.* 16(3):181 - 204.
- Balcão VM, Paiva AL, Xavier Malcata F., **1996**. *Enzyme Microb. Technol.* 18(6):392-416.
- Baum S., Ritter E., Smirnova I., Schilling M., Liese A., **2016**. *RSC Adv.*, 6, 32422-32429.
- Cantone S., Hanefeld U., Basso A., **2007**. *Green Chem.*, 9, 954- 971.
- Ciriminna R., Della Pina C., Rossi M., Pagliaro M., **2014**. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 116, 1432-1439.
- Damstrup M. L., Jensen T., Sparso F. V., Kiil S.Z., Jensen A. D., Xu X., **2006**. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 83,27-33.
- De Diego T., Lozano P., Gmouh S., Vaultier M., Iborra J. L., **2005**. *Biomacromolecules*, , 6, 1457-1464.
- Díaz I., Marquez-Alvarez C., Mohino F., Perez-Pariente J., Sastre E., **2000**. *J. Catal.*, 193, 295-302.
- Dullius J. E. L., Suarez P. A. Z., Einloft S., De Souza R. F., Dupont J., **1998**. *Organometallics*, 17, 815-819.
- Dupont J., De Souza R. F., Suarez P. A. Z., **2002**. *Chem. Rev.*, 102, 3667-3699.
- Dupont J., Scholten J. D., **2010**. *Chem. Soc. Rev.*, 39, 1780-1804.
- Dupont J. , Meneghetti M. R., **2013**. *Curr. Opin. Colloid In.*, 18, 54-60.
- Dyson P. J., Ellis D. J., Welton T., **2001**. *Can. J. Chem.*, 79, 705-708.
- European Food Emulsifier Manufactures Association, e.V. E 471, **2015**. In *EFEMA Index of Food Emulsifiers*, Ed., pp. 51-56 (see <http://www.emulsifiers.org>).
- Feher E., Major B., Belafi-Bako K., Gubicza L., **2007**. *Biochem Soc. T.*, 35, 1624-1627.
- Freitas L., Perez V. H., Santos J. C., De Castro H. F., **2007**. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18, 1360-1366.
- Garcia J. I., Garcia-Marin H., Pires E., **2014**. *Green Chem.*, 16, 1007-1033.
- Guo Z., Xu X. B., **2005**. *Org. Biomol. Chem.*, 3, 2615-2619.
- Guo Z., Xu X. B., **2006a**. *Green Chem*, 8, 54-62.
- Guo Z., Chen B. Q., Murillo R. L., Tan T. W., Xu X. B., **2006b**. *Org. Biomol. Chem.*, 4, 2772-2776.
- Hallett J. P., Welton T., **2011**. *Chem. Rev.*, 111, 3508-3576.
- Itoh T., **2014**. *J. Synth. Org. Chem Japan*, 72, 518-528.
- Kirk O, Christensen MWR., **2002**. *Org. Proc. Res. Develop* 6(4):446-451.
- Lawson DM, Brzozowski AM, Rety S, Verma C, Dodson GG., **1994**. *Protein Eng.* 7(4):543-550.
- Li L, Du W, Liu D, Wang L, Li Z., **2006**. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 43(1-4):58-62.
- Lozano P., De Diego T., Carrie D., Vaultier M., Iborra J. L., **2001**. *Biotechnol. Lett.*, 23, 1529-1533.
- Lozano P., De Diego T., Gmouh S., Vaultier M., Iborra J. L., **2003**. *Biotechnol. Prog.*, 19, 380- 382.
- Lozano P., *Green Chem.* **2010**, 12, 555-569.
- Lozano P., Bernal J. M., Vaultier M., **2011**. *Fuel*, 90, 3461-3467.
- Lozano P., Bernal J. M., Navarro A., **2012**. *Green Chem.*, 14, 3026-3033.

Capítulo IV

- Lozano P., Bernal J. M., Sánchez-Gómez G., López-López G., Vaultier M., *Energy Environ. Sci.*, **2013**, 6, 1328-1338.
- Lozano P., Bernal J. M., Lajarin A., Romera D., Garcia-Verdugo E., Sanchez-Gomez G., Pucheault M., Vaultier M., Burguete M. I., Luis S. V., **2014**. *Curr. Green Chem.*, 1, 145-154.
- Lozano P., Bernal J. M., Gomez C., García-Verdugo E., Burguete M. I., Sánchez G., Vaultier M., Luis S. V., **2015b**. *Catal. Today*, 255, 54-59.
- Lozano P., Bernal J. M., Garcia-Verdugo E., Sánchez-Gómez G., Vaultier M., Burguete M. I., Luis S. V., **2015a**. *Green Chem.*, 17, 3706-3717.
- Lozano P., Bernal J. M., Nieto S., Gomez C., Garcia-Verdugo E., Luis S. V., **2015c**. *Chem. Commun.*, 51, 17361-17374.
- Matsubara Y., Kadotani S., Nishihara T., Hikino Y., Fukaya Y., Nokami T., Itoh T., **2015**. *Biotechnol. J.*, 10, 1944-1951.
- Modi MK, Reddy JRC, Rao BVSK, Prasad RBN., **2007**. *Biores. Technol.* 98(6):1260-1264.
- Nie K, Xie F, Wang F, Tan T., **2006**. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 43(1-4):142-147.
- Ollis DL CE, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J., **1992**. *The Protein Eng.* 5(3):197-211.
- Perez-Pariente J., Díaz I., Mohino F., Sastre E., **2003**. *Appl. Catal. A: Gen.*, 254, 173-188.
- Ritter S. K., **2013**. *Chem. Eng. News*, 91, 34-35.
- Salis A, Svensson I, Monduzzi M, Solinas V, Adlercreutz P., **2003**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics.* 1646(1-2):145-151.
- Salis A, Pinna M, Monduzzi M, Solinas V., **2008**. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 54(1-2):19-26.
- Shimada H., Tyler V. E., McLaughlin J. L., **1997**. *J. Nat. Prod.*, 60, 417-418.
- Smith A. M., Lovelock K. R. J., Gosvami N. N., Licence P., Dolan A., Welton T., Perkin S., **2013**. *J. Phys. Chem. Lett.*, 4, 378-382.
- Uppenberg J, Oehrner N, Norin M, Hult K, Kleywegt GJ, Patkar S, Waagen V, Anthonsen T, Jones TA., **1995**. *Biochemistry*, 34(51):16838-16851.
- Verger R., **1997**. *Trends Biotechnol.* 15(1):32-38.
- Vollhardt D., Brezesinski G., **2015**. *J. Phys. Chem. C*, 119, 9934- 9946.
- Wasserscheid P, Welton, T., **2008**. (Eds) *Ionic Liquids in Synthesis.*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Zhang H., Cui Y. A., Zhu S. M., Feng F. Q., Zheng X. D. **2010**. *IntJ. Pharm.*, 395, 154-160.
- Zhong N. J., Cheong L.Z., Xu X. B., **2014**. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116, 97-107.

CAPÍTULO V

**“SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE BIOCOMBUSTIBLES
OXIGENADOS A PARTIR DE ACEITES
VEGETALES DE DESECHO EN LÍQUIDOS
IÓNICOS TIPO ESPONJA”**

Capítulo V

Capítulo V

RESUMEN

Se llevó a cabo la síntesis biocatalítica de biocombustibles oxigenados (mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos, FAMEs con ésteres solketílicos de ácidos grasos, FASEs) mediante transesterificación de aceites vegetales (i.e., aceite de girasol, aceite de oliva, aceite de semillas de algodón, y aceite de cocina usado) y/o esterificación directa de ácidos grasos (i.e., ácido láurico, mirístico, palmítico, y oleico, respectivamente) con solketal y metanol en líquidos iónicos hidrófobos (ILs) basados en cationes de amonio con largas cadenas laterales alquílicas (i.e., bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de octadeciltrimetilamonio [C₁₈tma][NTf₂]). Estos ILs hidrofóbicos son capaces de conmutar de fase líquida a sólida y viceversa con la temperatura, comportándose como un sistema parecido a una esponja. En fase líquida, los ILs son excelentes medios de reacción monofásicos para llevar a cabo biotransformaciones, obteniéndose cerca del 100% de conversión de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) enriquecidos con ésteres solketílicos de ácidos grasos (FASEs) en 6h a 60°C.

Utilizando aceite de cocina usado con ácidos grasos libres como sustrato, se pudieron obtener biocombustibles procedentes de una fuente de triacilglicéridos sostenibles (i.e., 100% conversión en relación FAMEs al 80% y FASEs al 20%). Además, la mezcla de reacción pudo ser separada fácilmente por sucesivas centrifugaciones en tres fases modificando la temperatura: IL, agua, y mezcla de FAMEs y FASEs, permitiendo la completa recuperación del sistema biocatalizador/IL para su posterior reutilización sin pérdida de actividad durante seis ciclos de operación.

Capítulo V

INTRODUCCIÓN

Los grandes excedentes de producción de glicerol como subproducto de la industria de síntesis de biodiesel, que se ha generado en los últimos años, son objeto de un gran interés para otros desarrollos industriales, dado su bajo precio y un mercado potencialmente creciente en la demanda de nuevos productos sostenibles de aplicación energética. El biodiesel es generalmente sintetizado por transesterificación de los triglicéridos procedentes de aceites vegetales y/o grasas animales con alcoholes de cadena corta (i.e., metanol), generándose ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) y glicerol como subproducto (Tsoutsos *et al.*, 2016). La conversión completa de una molécula de triglicérido para producir biodiesel necesita tres reacciones de transesterificación consecutivas, siendo necesario catalizadores químicos o enzimáticos, así como un exceso del alcohol para desplazar el equilibrio hacia el lado del producto. En el caso de la síntesis enzimática, la transesterificación es un proceso cinéticamente controlado, donde los rendimientos dependerán de las propiedades catalíticas de las enzimas que se empleen (i.e., fuente enzimática, tipo de inmovilización o modificación química de la enzima) (Rodrigues *et al.*, 2013).

No obstante, los FAMEs que constituyen el biodiesel también pueden ser sintetizados por vía enzimática mediante una reacción de esterificación directa entre el ácido graso y el alcohol. La reacción de esterificación es una síntesis controlada termodinámicamente, siendo necesaria la eliminación continua de las moléculas de agua como subproducto de dicha reacción. Este hecho determina que los rendimientos del producto de síntesis sean controlados por la constante termodinámica de la reacción, mientras que el catalizador solamente marca la viabilidad del proceso (i.e., la enzima puede ser inactivada o inhibida y no se alcanza el rendimiento termodinámico). Es por ello, que la eliminación de las moléculas de agua como subproducto durante la síntesis del biocombustible es crucial a la hora de desplazar el equilibrio termodinámico hacia la formación del producto de interés (i.e., mediante el uso de agentes deshidratantes, y/o condiciones de vacío) (Poppe *et al.*, 2015).

Desde el punto de vista socioeconómico, el biodiesel es considerado como un combustible verde, en tanto que el dióxido de carbono fruto de su combustión procede originariamente de la atmósfera, y su uso no incrementa la concentración de dióxido de carbono atmosférico. Por esta razón, el uso de dicho combustible tiene una gran

Capítulo V

aceptación social y se produce con éxito a escala industrial. No obstante, el proceso industrial que actualmente se utiliza en la producción de biodiesel no es verde, ni sostenible, ni limpio. Este proceso industrial se basa en el uso de catalizadores químicos, mayoritariamente catalizadores alcalinos principalmente homogéneos como KOH, que es necesario retirar del biodiesel antes de su comercialización mediante abundantes lavados con agua. Además, en este proceso industrial es imposible controlar las reacciones secundarias no deseadas como por ejemplo, formación de jabón cuando se emplean como sustrato aceites con alto contenido en ácidos grasos libres, además, es necesario tener en cuenta las dificultades para la recuperación y purificación del glicerol obtenido y la necesidad de eliminar las sales inorgánicas. Todas estas características determinan que el proceso industrial de obtención del biodiesel no es sostenible y presenta problemas importantes que afectan al rendimiento de la reacción, e implican la necesidad del consumo de grandes cantidades de energía y agua (Ruhul *et al.*, 2015).

Por otra parte, la sostenibilidad de la industria del biodiesel en un futuro cercano estará directamente vinculada tanto con el uso de fuentes de ácidos grasos no comestibles como sustratos (i.e. aceites de desecho alimentario) (Takase *et al.*, 2015) como con la aplicación de estrategias de valorización del subproducto glicerol generado (García *et al.*, 2014; Anitha *et al.*, 2016).

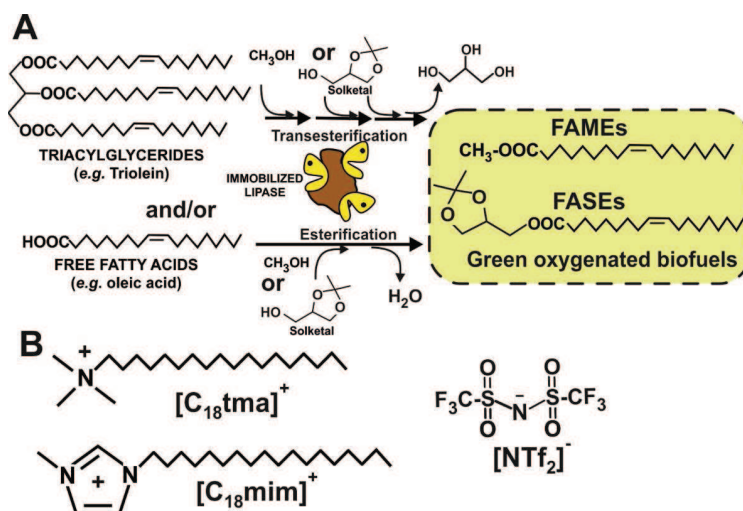


Figura 1. (A) Síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) y ésteres solketílicos de ácidos grasos (FASEs) con lipasa inmovilizada como biocombustibles oxigenados a partir de ácidos grasos y metanol o solketal y reacciones de transesterificación o esterificación. **(B)** SLILs, [C₁₈tma][[NTf₂]] y [C₁₈mim][[NTf₂]] conmutables de fase líquida/sólida con la temperatura usados para la síntesis y purificación de FAMES y FASEs (Lozano *et al.*, 2016).

Capítulo V

En este contexto, hay varios derivados de glicerol, tales como el 1,2-isopropilidenglicerol o el solketal, obtenido por reacción de ketalización entre glicerol y acetona mediante el uso de catalizadores ácidos (Esteban *et al.*, 2015), que se utilizan como aditivos oxigenados sostenibles en combustibles para mejorar el índice de octano en la gasolina (Nanda *et al.*, 2016).

Los ketales son moléculas con un amplio abanico de aplicaciones, las cuales se obtienen a partir de glicoles como el glicerol. De entre todos ellos, el solketal es el producto más ampliamente estudiado, y se obtiene por acetalización (o ketalización) de la glicerina con acetona, obteniéndose la cetona más sencilla. Al igual que el carbonato de glicerina, los ketales también han visto un notable auge en su investigación durante los últimos años y, aunque aún no hay ninguna revisión exclusivamente dedicada a estos compuestos, se mencionan en una revisión dedicada a disolventes procedentes de transformaciones de glicerina.

El solketal, a presión atmosférica y temperatura ambiente, es un líquido incoloro, soluble en agua e inodoro debido a su relativamente baja presión de vapor. Su estructura molecular y su grupo funcional hidroxilo le confieren la posibilidad de poder establecer puentes de hidrógeno intermoleculares similares a los que podrían establecer los alcoholes alifáticos. Su punto de ebullición, sin embargo, es mucho más alto que el de alcoholes de cadena corta. Además, a pesar de su estructura molecular relativamente similar a la del carbonato de glicerina, su viscosidad es notablemente menor, aunque su toxicidad parece ser mayor.

Tabla 1. Propiedades físicas del solketal.

Propiedad	Valor
Peso molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	132.16
Densidad, 20 °C ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1.066
Punto de ebullición, 760 mm (°C)	188
Punto de fusión (°C)	-27
Presión de vapor, 25°C (mm Hg)	107
Punto de inflamabilidad (°C)	80
Viscosidad, 20 °C (cP)	11
LD50 ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ rata)	7

Estas características físicas y estructurales le proporcionan buenas propiedades como disolvente (**Tabla 1**). La mayor parte de los estudios encontrados de la utilización

Capítulo V

directa del solketal, así como de otros ketales, es sobre su empleo como aditivos de carburantes y biocarburantes. Esta utilización sin duda tiene que ver con el hecho de tratarse de una molécula oxigenada, ya que con anterioridad determinados éteres como el metil-tert-butil éter (MTBE) o el etil-tert-butil éter (ETBE) se han empleado como potenciadores de determinadas propiedades de las gasolinas. Así pues, se ha llevado a cabo la modificación por reacción de cetonas con polioles como el xilitol o la xilosa, con glicerol formal o carbonato de glicerina para proporcionar los correspondientes ketales, así como la reacción de acetona con glicerol para dar solketal. El empleo del solketal ha repercutido en la mejora de determinados parámetros y especificaciones de los carburantes, tales como una reducción en la formación de gomas y mejora del índice de octano empleando volúmenes de hasta el 5% de solketal en gasolinas. Como aditivo de biodiesel, el solketal ha reducido la viscosidad y aumentado la estabilidad de la oxidación cuando se usó como aditivo al tiempo que se logra cumplir con el resto de especificaciones en Europa y Estados Unidos.

Por otro lado, se han estudiado también como aditivos los productos de otras reacciones de solketal con alcohol bencílico para obtener éteres o la síntesis de metilésteres con carbonatos de dialquilo. Aparte de su prometedor uso como aditivo de carburantes, el solketal se ha empleado como disolvente verde en varias aplicaciones como en pinturas y tintas, refrigerantes, productos de limpieza, pesticidas, como agente de suspensión en preparados farmacéuticos o como surfactante. Como medio de reacción, su uso está limitado a condiciones neutras o básicas debido a la escasa estabilidad del solketal en condiciones ácidas, ya que en un medio ácido y en presencia de agua, tendría lugar la reacción inversa para dar glicerina y acetona. Además de los usos directos mencionados, se puede también utilizar como bloque sintético para la producción de otros productos de interés debido a la reactividad que le confiere su grupo hidroxilo. Así, se ha empleado en la obtención de productos de interés farmacéutico como prostaglandinas, glicerofosfolípidos o β -bloqueantes como el (S)-propranolol, ampliamente utilizado en tratamientos contra la hipertensión y las migrañas.

Para poder llevar a cabo un desarrollo sintético sostenible de biocombustibles, los biocatalizadores y los líquidos iónicos se presentan como herramientas clave (Dupont *et al.*, 2009; Lozano *et al.*, 2015). Debido a su alta actividad catalítica y selectividad, el uso de enzimas como catalizadores para la síntesis de biodiesel puede

Capítulo V

ser considerado como una perfecta solución a los problemas asociados en la síntesis convencional de biodiesel (Gog *et al.*, 2012). Además otra ventaja del uso de ILs combinados con enzimas es la posibilidad de poder reemplazar los disolventes orgánicos volátiles tradicionales, altamente contaminantes con el medio ambiente, por estos nuevos medios de reacción que sean capaces de solventar todos estos inconvenientes (Sheldon, 2016). La síntesis de biodiesel por transesterificación y/o esterificación catalizada por lipasa inmovilizada se puede llevar a cabo utilizando como sustratos aceites vegetales refinados y crudos, ácidos grasos libres (FFA), grasas residuales de frituras, sebo, y otras grasas de desecho. Además un pequeño exceso de alcoholes (i.e., metanol, etanol o propanol) proporciona un alto rendimiento de biodiesel en condiciones suaves (20-60°C). Finalmente, tras la finalización del proceso de transesterificación, el glicerol (fase inferior) puede ser fácilmente recuperado y separado del biodiesel (fase superior). Por lo tanto, la sostenibilidad del proceso está claramente mejorada, reduciendo así al mínimo el consumo de energía y la generación de residuos, mejorando los costos generales mediante la posible comercialización del glicerol que se obtiene de alta calidad.

La aplicación de técnicas de inmovilización de enzimas en soportes sólidos conduce a obtener biocatalizadores heterogéneos activos y estables, adecuados para la síntesis de biodiesel que permite su fácil separación y su reciclaje. (Rodrigues *et al.*, 2010; Gog *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2016). La inmovilización de enzimas puede producir alteraciones en su actividad, especificidad o selectividad como resultado de las interacciones enzima-soporte, pero en la mayoría de los casos conduce a la mejora de su comportamiento catalítico y permite su más fácil recuperación y reutilización (Mateo *et al.*, 2007; García-Galán *et al.*, 2011).

Además, en el caso de la síntesis de biodiesel, la naturaleza del propio sistema de reacción (bifásico debido a la inmiscibilidad de los sustratos, triglicéridos y metanol) resulta el factor limitante de la eficiencia del proceso catalítico. Además, en los procesos de biocatálisis, nos encontramos con una completa y rápida desactivación enzimática como resultado de la interacción directa entre la proteína catalítica y la alta concentración localizada de metanol (Lotti *et al.*, 2015). Por otra parte, y debido a la inmiscibilidad de los productos de reacción (glicerol y biodiesel), también nos encontramos con una baja eficiencia catalítica como consecuencia del rápido envenenamiento del biocatalizador inmovilizado por la adherencia del glicerol sobre la

Capítulo V

superficie del soporte. En este sentido, el uso de ultrasonido se presenta como una técnica útil para evitar la adsorción de los subproductos no deseados sobre las partículas de enzima (Paludo *et al.*, 2015).

Sin embargo, también se demostró que la actividad catalítica de las enzimas inmovilizadas después de un ciclo de síntesis de biodiesel puede recuperarse completamente mediante el lavado de las partículas de enzima con una pequeña cantidad de tert-butanol. Este agente de lavado fue capaz de eliminar las moléculas de glicerol adsorbidas en el microambiente de la enzima sin ninguna pérdida en su actividad (Lozano *et al.*, 2012a). En este contexto, se ha demostrado como los líquidos iónicos hidrófobos basados en cationes con una larga cadena lateral alquílica (i.e., bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-octadecil-3-metilimidazolio [C₁₈mim][NTf₂]; bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de octadeciltrimetilamonio [C₁₈tma][NTf₂]) fueron capaces de disolver tanto trioleína como el metanol a cualquier concentración de ambos, proporcionando medios de reacción monofásicos y homogéneos. Además fue demostrada su excelente idoneidad como medio para llevar a cabo la síntesis enzimática de biodiesel por metanólisis de aceites vegetales (i.e., trioleína como estándar) ,con rendimientos en biodiesel cercanos al 100% después de reacción 6 h en [C₁₈mim][NTf₂] a 60°C (Lozano *et al.*, 2010; Lozano *et al.*, 2015a), preservándose además la actividad catalítica tras varios ciclos de reutilización (i.e., tiempo de vida media estimado para el derivado enzimático inmovilizado Novozym 435 fue de 1370 días en [C₁₈tma][NTf₂] a 60°C) (Lozano *et al.*, 2013).

Adicionalmente, una característica única de estos líquidos iónicos hidrófobos con largas cadenas laterales alquílicas es la posibilidad de cambiar de fase líquida a sólida, o viceversa, por enfriamiento o calentamiento a temperaturas moderadas (Lozano *et al.*, 2012b). Aprovechando este fenómeno, enfriando el medio, puede ser fácilmente fraccionado por centrifugaciones sucesivas a temperatura controlada, extrayéndose finalmente el producto puro de la fase IL, que podrá posteriormente ser reutilizado (Lozano *et al.*, 2013). Estos líquidos iónicos con comportamiento tipo esponja (SLILs) fueron capaces de "empaparse" de oleato de metilo como fase líquida y, a continuación, ser "escurridos" por centrifugación en la fase sólida, desarrollando un método sencillo y sostenible para la producción de biodiesel puro, así como la completa recuperación y reutilización del sistema biocatalizador/IL para sucesivos ciclos (Lozano *et al.*, 2015b).

Capítulo V

El objetivo de este trabajo fue demostrar la idoneidad de dos SLILs diferentes (i.e., [C₁₈tma][NTf₂] y [C₁₈mim][NTf₂]), como medios de reacción para la síntesis de FAMES y ésteres de ácidos grasos de solketal (FASEs), mediante esterificación y transesterificación catalizada por Novozym 435, con independencia de la fuente de ácidos grasos, y mediante el uso de metanol o solketal como nucleófilos (**Figura 1**).

Con el fin de desplazar el equilibrio termodinámico y cinético de la reacción hacia la producción de biodiesel oxigenado, se ensayaron medios de reacción que contenían exceso de aceptores de acilo (metanol y/o solketal), así como agente de desecación, y bajo condiciones de vacío. De esta manera, se llevó a cabo la reacción de esterificación enzimática mediante el uso de diferentes ácidos grasos libres (AGL) (láurico, mirístico, palmítico y oleico) como donadores de acilo, mientras que para la ruta de transesterificación se emplearon diversos aceites vegetales (aceite de girasol y de oliva), aceite de semilla de algodón, y el aceite de cocina usado (fuente importante de triacilglicéridos y ácidos grasos libres).

Finalmente, las formulaciones de biodiesel con diferente contenido en FAMES/FASEs se prepararon a partir de aceite de semilla de algodón y aceite de cocina usado con ácidos grasos libres. Los productos obtenidos se separaron mediante un protocolo sencillo de centrifugación basado en el comportamiento tipo esponja de estos líquidos iónicos.

Capítulo V

PARTE EXPERIMENTAL

Productos químicos

El derivado enzimático inmovilizado de *Candida antarctica* B (Novozym 435, EC 3.1.1.3) fue suministrado por Novozymes S.A. (España). La trioleína (65% de pureza), el aceite de semilla de algodón, el solketal (1,2-isopropilidenglicerol, el 99% pureza), agente desecante 13X (MS13X; 10 Å de tamaño de poro, 270 mg de adsorción de H₂O/g), disolventes y otros productos químicos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich-Fluka (Madrid, España). Los aceites de oliva, girasol y el aceite de cocina usado se obtuvieron de proveedores locales. Los ILs: bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-octadecil-3-metilimidazolio ([C₁₈mim][NTf₂], 99% pureza) y bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de octadeciltrimetilamonio ([C₁₈tma][NTf₂], 99% pureza) se obtuvieron de IoLiTec GmbH (Alemania).

Síntesis de FAMEs y FASEs en SLILs catalizada por Novozym 435

Para las reacciones de esterificación, se añadió en diferentes tubos de ensayo a vacío (5 ml capacidad total) ácido oleico, láurico, mirístico, o palmítico (1.5 mmol), 0.5 g de SLIL-[C₁₈mim] [NTf₂] ó [C₁₈tma] [NTf₂], 80 mg MS13×, y 3 mmol de metanol o solketal, respectivamente.

Para llevar a cabo las reacciones de transesterificación, se añadieron en diferentes tubos de ensayo a vacío (5 ml capacidad total) 443 mg de aceite de oliva (cantidad equivalente a 0.5 mmol trioleína), aceite de girasol, aceite de semilla de algodón o aceite de cocina usado, [C₁₈tma][NTf₂] (0,443 g), 80 mg MS13×, y 3 mmol de metanol o solketal, respectivamente. En todos los casos, fue ensayada una relación molar final de 1: 2 de acilo: alcohol en los medios de reacción.

Para cada reacción, la mezcla de aceite/alcohol/SLIL se incubó previamente en un agitador orbital (IKA KS4000i, Alemania) durante 30 min a 200 rpm y a 60°C hasta mezclar bien el SLIL, convirtiéndose en un medio líquido monofásico totalmente claro. La reacción se inició mediante la adición de Novozym 435 (18% p/p con respecto a la cantidad de FFA), y el sistema de reacción se selló bajo vacío y se incubó a 60°C durante 6 h. A intervalos regulares, se tomaron alícuotas de 25 µl y se suspendieron en

Capítulo V

475 μl de disolución de dodecano/isopropanol (95:5, v/v). Las mezclas bifásicas resultantes se agitaron fuertemente durante 3 min y se centrifugaron a 15.000 rpm durante 10 min para extraer completamente los aceites, ácidos grasos y/o el producto de la fase SLIL. Finalmente se añadieron 350 μl del extracto de dodecano/isopropanol a 150 μl de disolución de tributirina 100 mM (patrón interno) en dodecano/isopropanol (95:5 v/v), y se analizó por CG.

Síntesis biocatalítica de Biodiesel en $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$

En esta síntesis se utilizaron como sistemas modelo para la síntesis de diferentes formulaciones oxigenadas de biodiesel que contienen FAMES y FASEs, medios de reacción a base de mezclas de ácidos grasos libres de aceite de cocina usado, o aceite de semillas de algodón. En un tubo de ensayo de 5 ml y a vacío se mezclaron aceite de cocina usado o aceite de semillas de algodón (885 mg, equivalente a 1 mmol trioleína) con ácido láurico, mirístico, palmítico (hasta 0,1 mmol por cada FFA), y a continuación, se añadió una cantidad apropiada de metanol y/o solketal para finalmente llegar a una relación molar 1:2 de acilo:alcohol. Los medios de reacción se completaron por la adición de $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ (45% p/p) y 80 mg MS13 \times , respectivamente, y luego se incubaron en un agitador orbital (IKA KS4000i, Alemania) durante 30 min a 200 rpm y a 60°C para obtener un sistema monofásico totalmente claro.

Se inició la reacción mediante la adición de Novozym 435 (18% p/p con respecto al donador de acilo), y el sistema de reacción se selló bajo vacío y se incubó a 60°C durante 8h. A intervalos regulares, se tomaron alícuotas de 30 μl y se suspendieron en 470 μl de disolución de dodecano/isopropanol (95:5, v/v) que se analizaron por cromatografía.

Análisis GC

El análisis GC se realizó con un cromatógrafo Shimadzu GC-2010 (Shimadzu Europa, Alemania) equipado con un detector FID y un inyector automático. Las muestras se analizaron en una columna capilar TRB-Biodiesel (10m x 0.28mm x 0.1m, Teknokroma, España), utilizando la tributirina como patrón interno, bajo las siguientes condiciones: gas portador (He) a 30.0 kPa (15 ml/min flujo); programa de temperatura

Capítulo V

100°C, 10°C/min, 200°C, 15°C/min, 370°C, relación de separación variable (80:1 a 10:1); temperatura del detector, 370°C.

Los tiempos de retención de los distintos picos (min) fueron los siguientes: tributirina, 6.7; ácido láurico, 4.6; ácido mirístico, 6.4; ácido palmítico, 8.2; ácido oleico, 9.7; laurato de metilo, 3.6; miristato de metilo, 5.5; palmitato de metilo, 7.4; oleato de metilo, 9.0; laurato de solketilo, 8.8; miristato de solketilo, 10.4; palmitato de solketilo, 11.8; oleato de solketilo, 12.8.

Estabilidad operacional de la enzima inmovilizada

Para llevar a cabo los estudios de reutilización del biocatalizador se preparó una mezcla con tres ácidos grasos libres (láurico, mirístico y palmítico, respectivamente) y aceite de semillas de algodón, como ejemplo representativo de los sistemas modelo ensayados para la síntesis biocatalítica de FAMEs y FASEs. Para el primer ciclo de reacción se mezcló aceite de semillas de algodón (350 mg, equivalente a 0.395 mmol trioleína), ácido láurico (50 mg, 0.25 mmol), ácido mirístico (50 mg, 0.21 mmol), y ácido palmítico (50 mg, 0.18 mmol) en un tubo de ensayo de 5 ml a vacío. A la mezcla se le adicionó metanol (82 mg, 2.55 mmol) y solketal (145 mg, 1.1 mmol), en una relación molar 1:2, acilo: alcohol. El medio de reacción se completó añadiendo $[C_{18}tma][NTf_2]$ (45% w / w) y la reacción se inició adicionando Novozym 435 (18% w/w con respecto al donador de acilo), haciéndose vacío e incubándose a 60°C durante 24 h sin la presencia de MS13×. Tras finalizar cada ciclo, se fueron tomando alícuotas de 30 µl en 470 µl de dodecano/isopropanol (95:5, v/v) para analizarse por GC como se ha descrito anteriormente.

Después del ciclo catalítico, la fracción líquida del medio de reacción se recogió en un vial por separado, mientras que las partículas de enzimas inmovilizadas restantes se lavaron con t-butanol (0.2 ml) y, se volvieron a reutilizar para un nuevo ciclo de operación.

Capítulo V

Recuperación de FAMES y FASEs de los SLILs

Las mezclas de reacción obtenidas a partir de la síntesis biocatalítica de FAMES y/o FASEs se colocaron en viales de 2 ml, y se incubaron a 60°C hasta que se observó una fase totalmente clara y homogénea. En ese momento fue cuando se añadió agua caliente (0.5 ml, 60°C) a cada muestra, y las fases obtenidas se agitaron vigorosamente durante 10 min a 60°C, siendo finalmente enfriadas a temperatura ambiente.

Las mezclas multifásicas de FAMES-FASEs/agua/SLIL se centrifugaron de forma iterativa tres veces a 15.000 rpm (50 min) a temperatura ambiente, 25 y 20°C, respectivamente, lo que resultó en tres fases: una fase líquida superior de FAMES/FASEs, una fase media acuosa, y una fase inferior que contenía el SLIL.

Las fases de arriba fueron recogidas, lavadas de nuevo con 1 ml de agua a 60°C durante 15 min, y finalmente se centrifugaron (30 min a temperatura ambiente) para llegar a una total separación entre los biocarburantes y cualquier traza de SLIL residual que pueda quedar. Los FAMES/FASEs (fase superior) resultantes fueron recogidos y analizados por GC/MS. El contenido de IL residual en esta fase de FAMES/FASEs se determinó por RMN, de forma que: para cada caso, se preparó una muestra de 80µl de la fase superior disuelta en 340µl de acetona-δ6 que contenía TFA (80 µl) como estándar interno. Las muestras se analizaron por ¹⁹F RMN a 188 MHz en un espectrómetro Bruker AC 200E, y el IL residual se cuantificó con respecto a la disolución estándar [C₁₈tma][NTf₂] en acetona-δ6 con TFA.

Identificación de FAMES y FASEs por GC/MS

Los análisis por GC/MS se llevaron a cabo mediante un cromatógrafo GC-6890 (Agilent, EE.UU.) junto con un sistema MS-5973 (Agilent, EE.UU.). El GC estaba equipado con una columna HP-5MS (30m x 0.25mm x 0.25m, Agilent, EE.UU.). Para la **identificación de FAMES**, se utilizaron las condiciones siguientes: gas portador (He) a 1 ml/min; relación de separación variable; programa de temperatura: 125°C, 8°C/min, 145°C, 26 min; 2°C/min, 220°C, 2 min. Para la **identificación de FASEs**, se utilizaron las condiciones siguientes: gas portador (He) a 1 ml/min; relación de separación variable, 1:1; programa de temperatura: 60°C, 1 min; 10°C/min, 290°C, 5 min; MS energía de la fuente de ionización, 70 eV; el tiempo de exploración fue de 0,5 s,

Capítulo V

cubriendo un rango de masa de 40-800 uma. Cada pico de FAMEs y FASEs fue identificado para su comparación con los espectros de masas obtenidos de la base “Biblioteca NIST”.

La identificación de los compuestos fue la siguiente: Laurato de metilo, tiempo de retención (Rt, min): 8.6; ion positivo (M / z): 55.1, 74.1, 87.1, 143.1, 171.2, 183.2. Miristato de metilo, Rt: 19.1; (M / z): 55.1, 74.1, 87.1, 143.1, 199.2, 242.2. Palmitato de metilo, Rt: 36.9; (M / z): 55.1, 69.1, 83.1, 97.1, 137.1, 152.1, 180.2, 194.2, 236.2, 268.3. Palmitato de metilo, Rt: 39.3; (M / z): 55.1, 74.1, 87.1, 143.1, 227.2, 241.2, 270.3. Linoleato de metilo, Rt: 50.1; (M / z): 55.1, 81.1, 109.1, 150.1, 263.3, 294.3. Oleato de metilo, Rt: 50.5; (M / z): 55.1, 74.1, 97.1, 123.1, 152.1, 180.2, 222.2, 264.2, 296.3. Estearato de metilo, Rt: 51.8; (M / z): 55.1, 74.1, 87.1, 143.1, 199.1, 255.2, 298.3. Laurato de solketylo, Rt: 18.5; (M / z): 101.0, 129.1, 299.2. Miristato de solketylo, Rt: 20.4; (M / z): 101.0, 129.1, 327.3. Palmitoleato de solketylo, 22.00; (M / z): 101.1, 129.1, 129.1, 355.3. Palmitato solketylo, Rt: 22.1; (M / z): 101.1, 129.1, 355.3. Oleato de solketylo, Rt: 23.4; (M / z): 101.1, 129.1, 185.2, 338.3, 381.0. Estearato de solketylo, Rt: 23.6; (M / z): 101.1, 129.1, 340.4, 383.4.

Capítulo V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de FAMEs y FASEs a partir de aceites vegetales en SLILs

La síntesis biocatalítica de FAMEs y FASEs se realizó empleando dos SLILs diferentes ($[C_{18}tma][NTf_2]$ y $[C_{18}mim][NTf_2]$) como medios de reacción, la cual se llevó a cabo a 60°C mediante transesterificación catalizada por el derivado enzimático inmovilizado lipasa B de *Candida antártica*.

De esta manera, se evaluaron cuatro aceites vegetales diferentes (i.e., aceite de girasol, de oliva, de semillas de algodón y aceite de cocina usado), los cuales se emplearon como donantes de acilo, mientras que como aceptores se emplearon metanol o solketal.

Como ejemplo representativo, la **Figura 2** muestra la cinética de producción de FAMEs y FASEs, así como la de productos intermedios y el consumo del sustrato limitante (en este caso aceite de semillas de algodón), mediante la transesterificación catalizada por Novozym 435 de aceite de semillas de algodón con metanol (**Figura 2A**) y solketal (**Figura 2B**) como aceptores de acilo, para producir FAMEs (biodiesel) o FASEs (biocombustibles oxigenados), respectivamente, en $[C_{18}tma][NTf_2]$ a 60°C. Como puede verse, se obtuvieron rendimientos cercanos al 98% en FAMEs (Biodiesel) tras solo 6 h de reacción, de este aceite de semilla de algodón, con un perfil similar al observado anteriormente para el caso de la trioleína (Lozano *et al.*, 2010).

De esta forma se pudo concluir que el sistema Novozym 435/ $[C_{18}tma][NTf_2]$ mostró nuevamente una excelente idoneidad para llevar a cabo la transformación de acilglicéridos procedentes esta vez de aceite de semillas de algodón para la síntesis de FASEs con un 98% de rendimiento, donde el perfil cinético obtenido resultó similar al del metanol.

Capítulo V

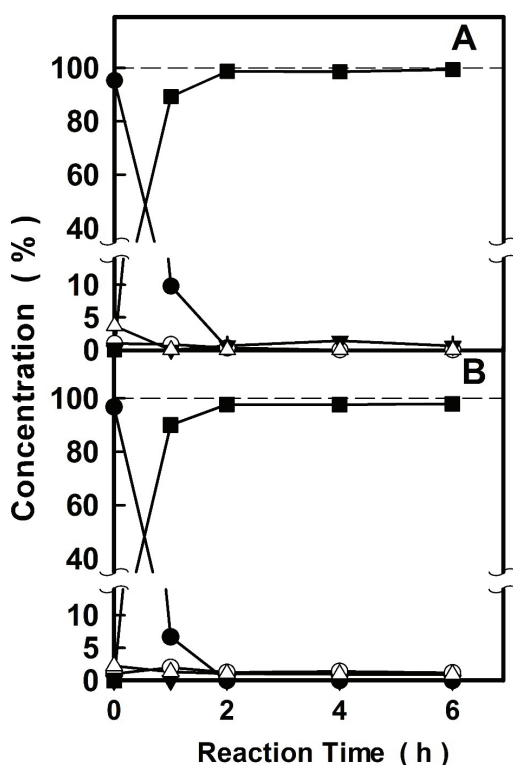


Figura 2. Perfiles de reacción de los TAGs (●), DAGs (Δ), MAGs (▼), FFAs (○) y FAMES / FASEs (■) para la síntesis catalizada por Novozym 435 de FAMES (A) y FASEs (B) por transesterificación de aceite de semillas de algodón con metanol o solketal, respectivamente, al 45% p/p de $[C_{18}tma][NTf_2]$ a 60 °C (Lozano *et al.*, 2016).

Este hecho pudo estar relacionado con la capacidad de los líquidos iónicos hidrófobos basados en cationes con larga cadena alquílica lateral (i.e., $[C_{18}tma][NTf_2]$, $[C_{18}mim][NTf_2]$) para disolver simultáneamente tanto el aceite vegetal como los alcoholes y proporcionar medios homogéneos para llevar a cabo la reacción catalítica.

El medio de reacción monofásico resultante permitió aumentar la eficiencia de la reacción con excelentes tasas de transporte de sustratos y productos en el micro-entorno de la enzima inmovilizada (Lozano *et al.*, 2010; Lozano *et al.*, 2015a).

Para demostrar esta excelente idoneidad, con independencia de la naturaleza de la fuente donadora de acilglicéridos, la **Figura 3** mostró los rendimientos de FAMES y

Capítulo V

FASEs resultantes de la reacción de transesterificación catalizada por Novozym 435 entre los aceites vegetales (aceite de girasol, de oliva, de semilla de algodón, o los aceites usados de cocina, respectivamente), y metanol o solketal, como sustratos, y mediante el uso de SLILs-[C₁₈tma][NTf₂] (**Figura 3A**) o [C₁₈mim][NTf₂] como medios de reacción (**Figura 3B**). Como puede verse, la combinación del biocatalizador Novozym 435 con estos SLILs condujo a sistemas de alta eficiencia para la producción en una sola etapa de FAMEs y FASEs. Independientemente de la naturaleza de la fuente de aceite vegetal o aceptor de acilo nucleófilo (metanol o solketal), los rendimientos de los productos fueron en todos los casos ensayados mayores del 93%, transcurridas 6h de reacción. Los mejores resultados (99% de rendimiento de FASEs y FAMEs) se obtuvieron utilizando el aceite de semillas de algodón en [C₁₈tma][NTf₂] como medio de reacción.

Estos excelentes resultados están en concordancia con los obtenidos por el grupo para la síntesis de biodiesel a partir de trioleína en los SLILs [C₁₈mim][NTf₂] (Lozano *et al.*, 2010; Lozano *et al.*, 2011) y [C₁₈tma][NTf₂] (Lozano *et al.*, 2015a), donde se observó cómo estos medios de reacción resultaron excepcionales (i.e., 100% de rendimiento en 8 horas a 60°C) preservando la estabilidad enzimática a altas temperaturas (Lozano *et al.*, 2013).

Síntesis de FAMEs y FASEs a partir de Ácidos Grasos Libres (AGL) en SLILs

Una diferencia importante entre los aceites vegetales obtenidos a partir de diferentes fuentes de biomasa es el contenido y la naturaleza de los ácidos grasos libres presentes en ellos. Este hecho es clave para el proceso industrial clásico de producción de biodiesel, basado en la catálisis homogénea alcalina o ácida, debido a la generación de jabones no deseados (Takase *et al.*, 2015) en el caso de la alcalina.

En este contexto, se estudió la idoneidad de los sistemas Novozym 435/SLILs para sintetizar FAMEs y FASEs por esterificación directa de diferentes ácidos grasos libres (i.e., ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico y ácido oleico) con metanol o solketal, mediante el uso de diferentes SLILs: [C₁₈tma][NTf₂] o [C₁₈mim][NTf₂] como medios de reacción a 60°C.

Capítulo V

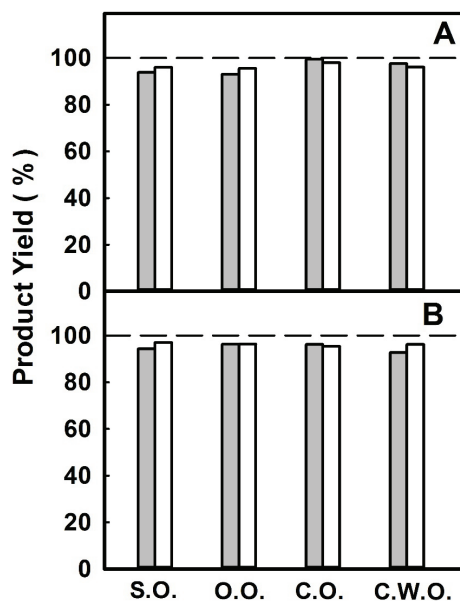


Figura 3. Rendimientos obtenidos de FAMEs (barras oscuras) y FASEs (barras blancas) por transesterificación enzimática catalizada por Novozym 435, con aceite de girasol (S. O.), aceite de oliva (O.O.) aceite de semillas de algodón (C.O.) y aceite de cocina usado (W.C.O.) empleando como aceptores de acilo con metanol o solketal, respectivamente al 45% p/p $[C_{18}tma][NTf_2]$ (A) o $[C_{18}mim][NTf_2]$ (B) después de 6 h de reacción a 60°C (Lozano *et al.*, 2016).

Como se puede ver en la **Tabla 2**, todos los sistemas Novozym 435/SLILs resultaron excepcionales sistemas para llevar a cabo este tipo de procesos biocatalíticos, alcanzando rendimientos de producto cercanos al 100% en todos los casos.

Tabla 2. Síntesis biocatalítica de FAMEs y FASEs por esterificación directa de ácidos grasos libres con metanol o solketal en SLILs a 60°C (Lozano *et al.*, 2016).

Rendimiento esterificación a las 6h (%)					
SLIL	Alcohol	Ác.Láurico	Ác.Mirístico	Ác.Palmítico	Ác.Oleico
$[C_{18}tma][NTf_2]$	Metanol	98	99	99	99
$[C_{18}tma][NTf_2]$	Solketal	98	95	99	99
$[C_{18}min][NTf_2]$	Metanol	99	99	99	99
$[C_{18}min][NTf_2]$	solketal	95	95	97	96

Capítulo V

Aunque la capacidad de la enzima inmovilizada para sintetizar FAMES o FASEs con los diferentes alcoholes (metanol o solketal), se mostró excepcional en estos dos SLILs, el [C₁₈tma][NTf₂] fue seleccionado para posteriores experimentos debido a su mayor punto de fusión (74°C), superior al del [C₁₈mim][NTf₂] (53°C), ya que este parámetro resultó clave para facilitar la separación del producto por centrifugación (Lozano *et al.*, 2013).

Producción de biocombustibles oxigenados en SLILs

Para evaluar la idoneidad del sistema catalítico Novozym 435/[C₁₈tma][NTf₂] se ensayaron dos aceites (i.e., aceite de semillas de algodón y de cocina usado) mezclados con diferentes ácidos grasos libres (i.e., ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico de hasta un 30% p/p) para proporcionar directamente los biocombustibles oxigenados, compuestos por mezclas de FAMES y FASEs, y con independencia de la fuente utilizada como sustrato.

También se realizaron varios ensayos con el fin de evaluar la producción simultánea de FAMES y FASEs (**Tabla 3**) utilizando metanol, solketal, o mezclas de metanol/solketal a diferentes proporciones molares. Como puede verse, se obtuvieron excelentes rendimientos (mayor del 94%) para todas las mezclas de reacción ensayadas. Se observó como en las mezclas de aceite de cocina usado con AGLs (viales 1-6), había una mejora en el rendimiento de FAMES y FASEs (rendimientos cercanos al 100%). De la misma manera, en los casos donde se usaron aceite de semillas de algodón con ácidos grasos libres (viales 7-12) también se produjo una mejora en los rendimientos de FAMES y FASEs debido al elevado contenido de ácidos grasos libres (99,6% de rendimiento para el caso donde se empleó solketal como aceptor de acilo). Así, las mezclas de metanol y solketal en los medios de reacción con las mezclas de aceite de cocina usado-AGL o aceite de semillas de algodón-AGL como fuentes dadoras de grupos acilo (viales 13-14) también proporcionaron excelentes resultados (98,9% de rendimiento del producto, vial 14).

De esta forma se demostró cómo fue posible sintetizar en una sola etapa un biocombustible oxigenado con contenido 80% en FAMES y 20% en FASEs directamente usando metanol y solketal en el medio de reacción.

Capítulo V

Estos resultados mostraron claramente la excelente idoneidad del sistema Novozym 435/[C₁₈tma][NTf₂] para sintetizar FAMES y/o FASEs con independencia de la naturaleza de la fuente de aceite vegetal (es decir, la composición de triacilglicéridos, contenido de ácidos grasos libres, la naturaleza de los ácidos grasos libres, etc.), lo que resultó en un excelente modelo de reacción para llevar a cabo la producción de biocombustibles oxigenados. Sin embargo, para poder proponer un protocolo eficiente y sostenible de síntesis de biocombustibles oxigenados, es necesario plantear además del modelo cinético, protocolos de recuperación y reutilización de la enzima inmovilizada y los SLILs (Lozano *et al.*, 2015; Lozano *et al.*, 2015b).

La eficiencia del SLIL-[C₁₈tma][NTf₂] para proteger al derivado enzimático inmovilizado y permitir así su reutilización se evaluó mediante estudios de estabilidad térmica a 60°C, donde los resultados mostraron una vida media del derivado enzimático inmovilizado de 1370 días, mientras que su capacidad para hacer frente a la reutilización se evaluó la pérdida de actividad en sucesivos ciclos de uso, donde se vio como tras 15 ciclos, la pérdida de actividad fue prácticamente nula (Lozano *et al.*, 2013).

En cuanto a la separación de los productos (FAMES y/o FASEs), y la recuperación del SLIL-[C₁₈tma][NTf₂] para su posterior reutilización, se desarrolló un protocolo similar al anterior, basado en las propiedades de los ILs tipo esponja (Lozano *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta la mezcla de reacción del vial 13 (**Tabla 3**) como ejemplo representativo de medio de reacción monofásico (**Figura 4A**) que resultó tras el proceso de síntesis biocatalítica a 60°C. A esta mezcla monofásica de FASEs/FAMES/[C₁₈tma][NTf₂] se le adicionó agua para favorecer la desorción de los productos y reactivos sin reaccionar (**Figura 4B**), debido a su efecto anti-disolvente. Esta mezcla heterogénea se agitó fuertemente durante 60 min a 60°C y, a continuación, se enfrió a temperatura ambiente. La suspensión resultante fue centrifugada consecutivamente tres veces (15.000 rpm, 50 min) a temperatura ambiente, 25° y 20° C, respectivamente, lo que permitió formar tres fases: una fase líquida superior de la mezcla de FAMES / FASEs, una fase acuosa intermedia, y una fase inferior con el IL sólido [C₁₈tma][NTf₂], fases separadas en base al parámetro de densidad (FAMES/FASEs < agua < SLIL) (**Figura 4C**). Cabe señalar cómo la centrifugación directa (sin adición previa de agua, **Figura 4D**) de la mezcla de reacción semisólida a

Capítulo V

temperatura ambiente también permitió la separación de FAMES /FASEs y el sólido IL- $[C_{18tma}][NTf_2]$, a causa del carácter similar a una esponja (**Figura 4E**).

Tabla 3. Rendimiento de FAMES y FASEs en la síntesis biocatalítica entre aceites vegetales de distinta naturaleza con ácidos grasos libres como fuente donante de grupos acilo (500 mg) y metanol y/o solketal como fuente aceptor de acilo (3 mmoles) en SLIL- $[C_{18tma}][NTf_2]$ al 45% después de 6h de reacción a 60°C (Lozano *et al.*, 2016).

Vial	Aceite vegetal (%, p/p)		Ácidos grasos libres añadidos (%, p/p)			Alcohol (%, p/p)		Rendimiento de producto (%)	
	Aceite de semillas de algodón	Aceite de cocina usado	Ácido Láurico	Ácido Mirístico	Ácido palmítico	Metanol	Solketal	FAMES	FASEs
1		90	5	5		100		94	Nd ^b
2		80	5	5	10	100		97	Nd ^b
3		70	10	10	10	100		98	Nd ^b
4		90	5	5			100		97
5		80	5	5	10		100		98
6		70	10	10	10		100		99
7	90		5	5		100		95	Nd
8	80		5	5	10	100		96	Nd
9	70		10	10	10	100		97	Nd
10	90		5	5			100		97
11	80		5	5	10		100		98
12	70		10	10	10		100		99
13		70	10	10	10	70	30	78 ^c	22 ^c
14	70		10	10	10	70	30	80 ^d	20 ^d

^bNo detectado. ^cCon respecto al 98% del rendimiento global del producto. ^dCon respecto al 99% del rendimiento global del producto.

La extracción directa sin la adición de agua al protocolo de separación, no proporcionó una separación apropiada, ya que el producto mostró trazas de líquido iónico residual (Lozano *et al.*, 2012b; Lozano *et al.*, 2013). Por otra parte, el efecto “anti disolvente” del agua no sólo favoreció la separación de FAMES /FASEs del SLIL- $[C_{18tma}][NTf_2]$, sino que también proporciona una fácil y sostenible forma para separar el glicerol y alcoholes sin reaccionar (Lozano *et al.*, 2015a).

Las fracciones de FAMES/FASEs recuperados después de la adición de agua, enfriamiento y centrifugación estuvieron exentos de IL, según lo determinación realizada por ¹⁹F RMN, en concordancia con los resultados estudiados anteriormente para la síntesis biocatalítica de oleato de metilo en $[C_{18tma}][NTf_2]$ (Lozano *et al.*, 2013). La bondad de estos resultados se justificó nuevamente debido a las propiedades genuinas que presentan estos líquidos iónicos tipo esponja para disolver compuestos hidrófobos (i.e., aceites vegetales, AGL, FAMES, FASEs) a temperaturas relativamente

Capítulo V

bajas (lo que permitió disponer de sistemas líquidos transparentes monofásicos), permitiendo a continuación poder aplicar una metodología sencilla para la extracción del producto/s mediante refrigeración y centrifugación.

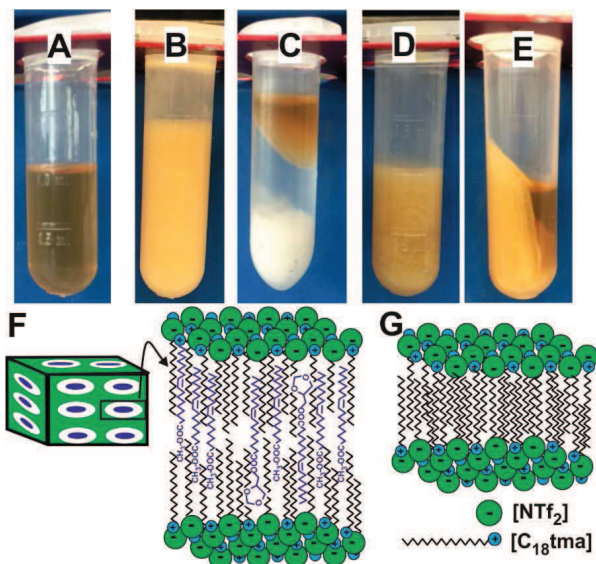


Figura 4. Comportamiento de fases de la mezcla de reacción resultante de la síntesis biocatalítica de FAMES y FASEs mediante el empleo de mezclas de aceite de cocina usado con ácidos grasos: láurico, mirístico y palmítico (**Tabla 2**, vial 13) en [C₁₈tma][NTf₂] después de 6h de reacción a 60°C (**A**), después de la adición de agua (**B**), y tras un protocolo posterior de centrifugación (15000 rpm, 50 min a temperatura ambiente, 25° y 20°C, respectivamente) (**C**). Comportamiento de fases de la mezcla de reacción a 20°C (**D**) y después de las etapas de centrifugación posterior mediante el empleo del mismo protocolo (**E**). Hipótesis esquemática de la organización estructural del SLIL-[C₁₈tma][NTf₂] sólido, que muestra las capas iónicas interactuando con FAMES/FASEs a través de las cadenas de alquilo hidrofóbicas, como una esponja empapada (**F**) y la nanoestructura de la esponja seca resultante después de ser escurrida por centrifugación simultáneamente a la etapa de lavado (**G**) (Lozano *et al.*, 2016).

Este comportamiento se explicó por la organización estructural sólida del SLIL. La organización nanoestructural de estos SLILs en la fase líquida ó sólida que puede conmutarse con la temperatura (i.e., [C₁₈tma][NTf₂]) puede ser descrita en términos de capas en las que las cadenas laterales alquílicas de los cationes proporcionan agujeros hidrófobos capaces de albergar las moléculas en fase sólida de FAMES/FASEs (**Figura 4F**). Debido a esto, durante la etapa de centrifugación, la mezcla semisólida pudo ser exprimida de la esponja “empapada”, lo que conduce a la separación de FAMES /FASEs del IL (**Figura 4G**).

Capítulo V

Esta característica única puede ser explotada para lograr un método sencillo y limpio que permitió la recuperación completa del sistema biocatalizador/IL para su posterior reutilización y el aislamiento de FAMES/FASEs. A pesar de la existencia en la literatura de muchos protocolos para llevar a cabo la síntesis de FAMES, las metodologías sostenibles para la síntesis de FASEs son escasas.

Perosa y colaboradores (2016) han descrito recientemente la síntesis de ésteres grasos de solketal (FASEs) mediante ácidos cáprico, láurico y plamítico utilizando p-toluenosulfónico como catalizador ácido. Aunque es un proceso muy eficiente con rendimientos de reacción de FASEs del 80-92% después de 4 horas a 60°C, con medios libres de disolvente, es necesario un paso adicional para llevar a cabo la etapa de purificación de los biocombustibles a fin de eliminar el catalizador ácido (hasta 5% w/w de contenido). Este protocolo de purificación implica una etapa inicial de neutralización con una solución saturada de carbonato sódico, seguido de una etapa de filtración, y una extracción final con disolventes orgánicos (un sistema bifásico cloroformo: agua). Sin embargo esta metodología permitió la recuperación del IL y el catalizador enzimático inmovilizado, así como el aislamiento directo del producto, mediante la adición de agua y sin la necesidad del empleo de ningún disolvente orgánico.

Producción enzimática cíclica de biocombustibles oxigenados en SLILs

Además de la fácil separación de los productos mediante una técnica limpia, así como la sencilla recuperación y reutilización de los SLILs, otro criterio clave para llevar a mayor escala cualquier proceso biocatalítico anteriormente descrito para la producción de biocombustibles oxigenados es la estabilidad operativa del biocatalizador inmovilizado. Para evaluar su estabilidad frente a la reutilización se utilizó como medio de reacción modelo la síntesis biocatalítica simultánea de FAMES y FASEs usando aceite de semillas de algodón con ácidos grasos libres (i.e., ácido láurico, ácido mirístico, y ácido palmítico, 30% w/w) y la mezcla metanol/solketal como aceptores finales de grupos acilo (**Tabla 3, vial 14**).

La **Figura 5** muestra el perfil de estabilidad operativa del biocatalizador Novozym 435 después de 6 ciclos de reutilización en $[C_{18}tma][NTf_2]$ como medio de reacción. Como puede observarse, el rendimiento en FAMES y FASEs se mantuvo sin cambios después de los diferentes ciclos consecutivos de reutilización avalándose

Capítulo V

nuevamente la idoneidad de este medio de reacción, para llevar a cabo la síntesis enzimática de biocombustibles oxigenados.

Cabe señalar que después de cada ciclo catalítico para la síntesis de biocombustibles, las partículas de biocatalizador se lavaron con t-butanol para eliminar cualquier residuo de glicerol adsorbido sobre la superficie del soporte, de acuerdo con trabajos anteriores (Lozano *et al.*, 2012a; Lozano *et al.*, 2013). Estos resultados están en concordancia con numerosos estudios que demuestran la excelente capacidad de los líquidos iónicos para estabilizar las enzimas en condiciones no acuosas, permitiendo así su reutilización continua (Lozano *et al.*, 2001, 2010, 2012b, 2015, 2015b), incluso bajo condiciones extremadamente duras (i.e., scCO_2 a 120 bares y 150°C) (Lozano *et al.*, 2003).

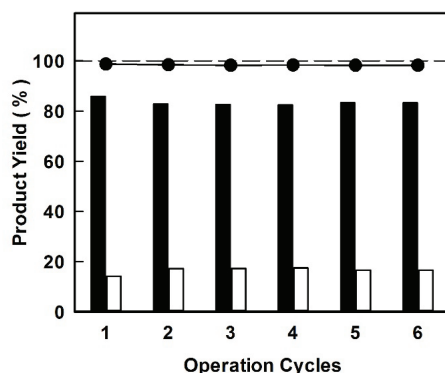


Figura 5. Rendimientos de los biocombustibles (●), FAMEs (barras oscuras), y FASEs (barras blancas) obtenidos enzimáticamente a partir de aceite de semillas de algodón con ácido láurico, ácido mirístico y ácido palmítico, y la cantidad apropiada de metanol y solketal, como sustratos, en $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ como medio de reacción y Novozym 435 como biocatalizador durante sucesivos ciclos de 24 horas a 60°C . Ver la sección experimental para más detalles (Lozano *et al.*, 2016).

En este contexto, los SLILs se muestran como medios excelentes para preservar la actividad catalítica de la enzima bajo condiciones operacionales durante la síntesis de biodiesel (Lozano *et al.*, 2010, 2013). Además, debido a su estructura supramolecular extremadamente ordenada en fase líquida, pueden ser capaces de actuar como un "molde" estabilizando la estructura activa 3D de las enzimas en ambientes no acuosos (De Diego *et al.*, 2005; Lozano *et al.*, 2015, 2015b).

Capítulo V

CONCLUSIONES

Este capítulo muestra por primera vez una estrategia verde y sencilla para llevar a cabo la producción de biocombustibles oxigenados a base de mezclas de FAMES/FASEs obtenidos por transesterificación de varios aceites vegetales y catalizada por el derivado enzimático inmovilizado Novozym 435 y/o esterificación directa de ácidos grasos libres con metanol y/o solketal en SLIL-[C₁₈tma][NTf₂], obteniéndose rendimientos mayores del 94% de los productos en todos los casos.

Se demuestra así la excelente idoneidad de estos SLILs para llevar a cabo procesos cíclicos de reutilización del derivado enzimático inmovilizado debido a la alta estabilidad que presenta en estos nuevos medios de reacción. Además, se desarrolló un protocolo sencillo y verde para la separación fácil y limpia de los productos. El producto de reacción libre de IL se separó fácilmente, permitiendo la recuperación directa del SLIL para su posterior reutilización.

Una vez más, se demostró claramente como el comportamiento tipo esponja de estos ILs hidrófobos basados en cationes con largas cadenas laterales alquílicas (i.e., [C₁₈tma][NTf₂]) resultó ser una herramienta clave para llevar a cabo procesos de reacción/separación sencillos y limpios.

Estos resultados abren una nueva forma sostenible de obtener biocombustibles oxigenados verdes a través de diferentes fuentes de aceites vegetales o de desecho.

Capítulo V

BIBLIOGRAFÍA

- Anitha M., Kamarudin S. K., Kofli N. T., **2016**. *Chem. Eng. J.*, 295, 119–130.
- De Diego T., Lozano P., Gmouh S., Vaultier M., Iborra J. L., **2005**. *Biomacromolecules*, 6, 1457–1464.
- Dupont J., Suarez P. A. Z., Meneghetti M. R., Meneghetti S. M. P., **2009**. *Sci.*, 2, 1258–1265.
- Esteban J., Ladero M., Garcia-Ochoa F., **2015**. *Chem. Eng. J.*, 269, 194–202.
- Garcia-Galan C., Berenguer-Murcia A., Fernandez-Lafuente R., Rodrigues R. C., **2011**. *Adv. Synth. Catal.*, 353, 2885–2904.
- Garcia J. I., Garcia-Marin H., Pires E., **2014**. *Green Chem.*, 16, 1007–1033.
- Gog A., Roman M., Tosa M., Paizs C., Irimie F., **2012**. *Renewable Energy*, 39, 10–16.
- Lapuerta M., Rodriguez-Fernandez J., Estevez C., Bayarri N., **2015a**. *Biomass Bioenergy*, 76, 130–140.
- Lapuerta M., Rodriguez-Fernandez J., Garcia-Contreras R., **2015b**. *Energy*, 93, 568–579.
- Lotti M., Pleiss J., Valero F., Ferrer P., **2015**. *Biotechnol. J.*, 10, 22–30.
- Lozano P., De Diego T., Carrie D., Vaultier M., Iborra J. L., **2001**. *Biotechnol. Lett.*, 23, 1529–1533.
- Lozano P., De Diego T., Carrie D., Vaultier M., Iborra J. L., **2003**. *Biotechnol. Prog.*, 19, 380–382.
- Lozano P., Bernal J. M., Piamtongkam R., Fetzer D., Vaultier M., **2010**. *ChemSusChem*, 3, 1359–1363.
- Lozano P., Bernal J. M., Vaultier M., **2011**. *Fuel*, 90, 3461–3467.
- Lozano P., Garcia-Verdugo E., Bernal J. M., Izquierdo D. F., Burguete M. I., Sanchez-Gomez G., Luis S. V., **2012a**. *ChemSusChem*, 5, 790–798.
- Lozano P., Bernal J. M., Navarro A., **2012b**. *Green Chem.*, 14, 3026–3033.
- Lozano P., Bernal J. M., Sanchez-Gomez G., Lopez-Lopez G., Vaultier M., **2013**. *Energy Environ. Sci.*, 6, 1328–1338.
- Lozano P., Bernal J. M., Nieto S., Gomez C., Garcia-Verdugo E., Luis S. V., **2015**. *Chem. Commun.*, 51, 17361–17374.
- Lozano P., Bernal J. M., Gomez C., Garcia-Verdugo E., Burguete M. I., Sanchez G., Vaultier M., Luis S. V., **2015a**. *Catal. Today*, 255, 54–59.
- Lozano P., Bernal J. M., Garcia-Verdugo E., Sanchez-Gomez G., Vaultier M., Burguete M. I., Luis S. V., **2015b**. *Green Chem.*, 17, 3706–3717.
- Mateo C., Palomo J. M., Fernandez-Lorente G., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R., **2007**. *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 1451–1463.
- Nanda M. R., Zhang Y. S., Yuan Z. S., Qin W. S., Ghaziaskar H. S., Xu C. B., **2016**. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 56, 1022–1031.
- Paludo N., Alves J. S., Altmann C., Ayub M. A. Z., Fernandez-Lafuente R., Rodrigues R. C., **2015**. *Ultrason. Sonochem.*, 22, 89–94.
- Perosa A., Moraschini A., Selva M., Noe M., **2016**. *Molecules*, 21, 170.
- Poppe J. K., Fernandez-Lafuente R., Rodrigues R. C., Ayub M. A. Z., **2015**. *Biotechnol. Adv.*, 33, 511–525.
- Rodrigues R. C., Fernandez-Lafuente R., **2010**. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 66, 15–32.
- Rodrigues R. C., Ortiz C., Berenguer-Murcia A., Torres R., Fernandez-Lafuente R., **2013**. *Chem. Soc. Rev.*, 42, 6290–6307.

Capítulo V

Ruhul A. M., Kalam M. A., Masjuki H. H., Fattah I. M. R., Reham S. S., Rashed M. M., **2015**. *RSC Adv.*, 5, 101023–101044.

Sheldon, Roger A., **2016**. ChemPubSoc Europe, *Chemistry*, 22, 12984-12999.

Takase M., Zhao T., Zhang M., Chen Y., Liu H. Y., Yang L. Q., Wu X. Y., **2015**. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 43, 495–520.

Tsoutsos T. D., Tournaki S., Paraiba O., Kaminaris S. D., **2016**. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 54, 74–83.

Verma M. L., Puri M., Barrow C. J., **2016**. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 36, 108–119.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN FINAL Y CONCLUSIONES

Capítulo VI

Capítulo VI

INTRODUCCIÓN

A lo largo de los sucesivos capítulos de esta Tesis Doctoral se han abordado los aspectos necesarios para poder llevar a cabo el desarrollo de bioprocesos integrales de reacción/separación, en concreto el desarrollo de dos protocolos, uno de ellos para la producción de monoacilglicéridos (MAGs), moléculas anfipáticas con un importante valor añadido para la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, y el otro protocolo, está centrado en la coproducción combinada de biodiesel y ésteres solkeketílicos de ácidos grasos, capaces de aportarle a este biocombustible un valor añadido adicional por el carácter oxigenado de estas moléculas.

En el *Primer Capítulo* de esta Tesis se introduce el papel de la Química Verde en nuestra sociedad, así como una descripción de la estructura y propiedades de los líquidos iónicos, sus aplicaciones en la tecnología del ADN y la estrecha relación que guardan con las lipasas. Además se hace una pequeña introducción de los desarrollos realizados por nuestro grupo de investigación en diversos procesos biocatalíticos estudiados en fluidos supercríticos y en líquidos iónicos, donde la combinación biotransformación/separación es el eje principal.

En el *Segundo Capítulo* se abordó más concretamente los distintos bioprocesos en “Líquidos Iónicos Tipo Esponja”, un concepto acuñado, desarrollado y aplicado por nuestro grupo de investigación, que incluye desde el proceso de reacción hasta el proceso de separación y obtención del producto puro, utilizando una tecnología limpia y eficiente, y además recuperando y reutilizando los sistemas catalíticos y de reacción.

Estas premisas sirvieron para aplicar con éxito este tipo de ILs al desarrollo de procesos para la obtención de productos con un gran interés y creciente aplicabilidad en el campo de la industria cosmética, farmacéutica, alimentaria, biotecnológica y médica, como son los **monoésteres grasos de glicerol** (MAGs). Estos estudios se abordaron en el *Capítulo IV*, utilizando diferentes ácidos grasos y glicerol. Los ésteres grasos de glicerol con reconocidas aplicaciones como emulsionantes en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos debido a su estructura consistente en una cabeza hidrófila y una cola hidrófoba. Así mismo, se está contemplando la posibilidad de su utilización como surfactante biodegradable. En concreto, el monooleato de glicerilo (monooleína) es el emulsionante más ampliamente utilizado en las industrias farmacéutica y alimentaria. Durante la última década, se han realizado muchas investigaciones para identificar y estudiar rutas de reacción que dieran altos rendimientos de MAGs, ya sea

Capítulo VI

por catálisis química o enzimática. En consecuencia, se han desarrollado varias estrategias dirigidas a incrementar también la selectividad de MAGs. Algunos estudios incluyen el uso de cosolventes tales como terc-butanol o solvatación por líquidos iónicos.

En el último capítulo experimental (*Capítulo V*), ya con una imagen más clara del papel de los líquidos iónicos tipo esponja en distintos bioprocesos, se aborda el estudio de la producción enzimática de **biodiesel oxigenado**, llevándose a cabo la síntesis enzimática conjunta de FAMES y FASEs, mediante el empleo de diferentes alimentaciones (distintas fuentes de ácidos grasos), con adición fija de ácidos grasos. Una vez evaluada la eficiencia del SLIL-[C₁₈tma][NTf₂] hidrofóbico para llevar a cabo la síntesis de oleato de solketilo, se extrapoló el sistema a la obtención simultánea de biodiesel con ésteres grasos de solketilo destacándose nuevamente las propiedades genuinas de los SLILs (Líquido Iónicos con comportamiento esponja) para llevar a cabo reacciones enzimáticas de esterificación y transesterificación. Además de esto, se diseñó una estrategia de separación/reutilización del sistema SLIL/biocatalizador pudiendo catalogar al proceso desarrollado como sostenible con el medio ambiente.

Esta Tesis Doctoral puede constituir una pieza de enorme importancia en la construcción de desarrollos químicos sostenibles que han de configurar el tejido industrial de nuestra sociedad en el futuro inmediato.

Capítulo VI

DISCUSIÓN

La síntesis de productos puros con alto valor añadido de manera verde y sostenible con el medio ambiente es uno de los principales retos de esta Tesis Doctoral. Debido a las reservas limitadas de energía y la creciente presión medioambiental sobre los gases de efecto invernadero procedentes de los combustibles fósiles, el biodiesel se está convirtiendo en uno de los temas candentes de la agenda política de un gran número de países. El biodiesel ha llamado la atención como fuente de combustible y energía no-tóxica, biodegradable y renovable con significativamente menores emisiones de partículas de escape y gases de efecto invernadero como el CO, CO₂ y SO_x, además de ser beneficioso para el medio ambiente y tener un gran potencial como combustible líquido alternativo.

Las materias primas empleadas para la síntesis de biodiesel (FAMES) son aceites o grasas de origen animal o vegetal y un donador de metilo. Por lo tanto en principio, cualquier forma de aceites y grasas procedentes de los animales, plantas o incluso de los microorganismos pueden ser utilizados como materia prima para la producción de biodiesel. Actualmente, debido a la enorme controversia de emplear materias primas de origen alimentario, el empleo de lípidos obtenidos de microalgas vegetales y celulosa, está cada vez más en auge.

Por otro lado, el crecimiento exponencial que ha sufrido la industria de biodiesel en los últimos años es una de las principales causas de la producción en grandes cantidades de glicerol como subproducto de esta reacción, lo que ha planteado la necesidad de ser valorizado para favorecer la sostenibilidad de la industria del biodiesel. Por esta razón el uso de glicerol para producir MAGs puede ser claramente un punto clave en este hecho.

En el *capítulo IV* se explica una manera de revalorizar el glicerol excedente de la industria del biodiesel, obteniendo monoacilglicéridos de manera selectiva y sostenible y con 100% de conversión en la reacción de esterificación.

También en el *capítulo V* hemos visto una manera de obtener biocombustibles oxigenados utilizando como base los ILs con comportamiento esponja en reacciones catalizadas por Novozym 435 y obteniendo conversiones cercanas al 100% mediante un protocolo cíclico y limpio con reutilización del biocatalizador y del SLIL empleado.

En resumen, a lo largo de los capítulos anteriores se han diseñado nuevas estrategias para la producción de MAGs y biocombustibles oxigenados, apoyándonos en

Capítulo VI

resultados experimentales (*Capítulos I y II*), utilizando una Química Sostenible y respetuosa con el medio ambiente, a partir de materiales de desecho y de fuentes vegetales y utilizando glicerol como excedente de la industria del biodiesel.

Capítulo VI

CONCLUSIONES

Aunque en el último capítulo se han resumido los resultados expuestos a lo largo de esta Tesis, a continuación se exponen las principales conclusiones alcanzadas para una mayor claridad:

1. Los líquidos iónicos hidrofóbicos son excelentes medios de reacción tanto para la síntesis de monoacilglicéridos como de biocombustibles oxigenados, obteniendo un producto puro con alto valor añadido en ambos casos y con 100% de rendimiento. Además estos SLILs permitieron el diseño de un proceso cíclico de síntesis biocatalítica sostenible con recuperación del sistema IL/biocatalizador. Una vez más por tanto, se ha demostrado claramente como el comportamiento tipo esponja de estos ILs hidrófobos basados en cationes con largas cadenas laterales alquílicas (i.e., [C₁₈tma] [NTf₂]) ha resultado ser una herramienta clave para llevar a cabo procesos de reacción/separación sencillos y limpios.
2. Esta Tesis Doctoral muestra por primera vez un método “verde” para la síntesis altamente selectiva de MAGs por esterificación directa de ácidos grasos libres con glicerol mediante el uso de los biocatalizadores y los SLILs como dos herramientas clave para la química verde.
3. El comportamiento tipo esponja de los ILs, así como el carácter conmutable en función de la temperatura (fase sólida/líquida), ha permitido el diseño de estrategias de reacción/separación eficientes para llevar a cabo la síntesis enzimática de MAGs y su posterior purificación.
4. Una selección adecuada de las estructuras del catión y el anión en estos SLILs ha permitido también controlar los procesos de transferencia de masa desde el centro activo de la enzima, favoreciendo la consecución de los procesos selectivos para la síntesis de los MAGs. De esta manera, los SLILs basados en el anión [BF₄] se han mostrado como medios de reacción inmejorables para la síntesis selectiva de MAGs (100% de selectividad, sin pérdida en la actividad catalítica con los ciclos de reutilización). Su comportamiento tipo esponja ha facilitado el desarrollo de protocolos sencillos, basados en etapas de enfriamiento y centrifugación que han permitido una fácil y completa recuperación de los MAGs puros, de los SLILs y de los disolventes utilizados.

Capítulo VI

5. También se ha demostrado un método verde y sencillo para llevar a cabo la producción de biocombustibles oxigenados a base de mezclas de FAMES/FASEs obtenidos por transesterificación de varios aceites vegetales y catalizada por el derivado enzimático inmovilizado Novozym 435 y/o esterificación directa de ácidos grasos libres con metanol y/o solketal en SLIL-[C₁₈tma][NTf₂], obteniéndose rendimientos mayores del 94% de los productos en todos los casos.
6. Se pone de manifiesto la excelente idoneidad de estos SLILs para llevar a cabo procesos cíclicos de reutilización del derivado enzimático inmovilizado debido a la alta estabilidad que presenta en estos nuevos medios de reacción. Además, se ha desarrollado un protocolo sencillo y verde para la separación limpia de los productos. El producto de reacción libre de IL se separó fácilmente, permitiendo la recuperación directa del SLIL para su posterior reutilización. Estos resultados abren una nueva forma sostenible de obtener biocombustibles oxigenados verdes a través de diferentes fuentes de aceites vegetales o de desecho.