



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Sistemas (bio)catalíticos verdes para el desarrollo
de procesos químicos sostenibles de interés
industrial**

**D^a Rocío Villa Aroca
2021**

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Escuela Internacional de Doctorado

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e
Inmunología

**Sistemas (bio)catalíticos para el desarrollo de
procesos químicos sostenibles de interés industrial**

TESIS DOCTORAL

Rocío Villa Aroca

DIRECTOR: Pedro Lozano Rodríguez

MURCIA, 2021



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 "Sistemas (bio)catalíticos verdes para el desarrollo de procesos químicos sostenibles de interés industrial", realizada por D. Rocío Villa Aroca, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 10 de mayo de 2021

Firmante: PEDRO LOZANO RODRIGUEZ. Fecha-hora: 09/05/2021 17:59:16. Emisor del certificado: CN=AC FNMU Usuarios,OU=Ceres,O=FNMU-FCM,C=ES.



Mod:T-20

Código seguro de verificación: RUxFMiTi-pr1Iqbbv-YclC4IHl-HpetcSmq

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 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

Memoria presentada para acceder al grado de Doctor
en Química con mención internacional por la
Universidad de Murcia



Fdo: Rocío Villa Aroca

Durante su doctorado, Rocío Villa Aroca ha disfrutado de un contrato asociado al Proyecto: 3255-Nuevos procesos multi-catalíticos verdes basados en la tecnología de los líquidos iónicos desde las materias primas sencillas hasta los productos químicos con valor añadido.

Además, contó con la ayuda de una Beca para la realización de estancias breves en centros extranjeros para jóvenes investigadores de la Universidad de Murcia para el año 2019, proporcionada por la Escuela Internacional de Doctorado.

Los trabajos de investigación de esta Tesis Doctoral han sido parcialmente financiados por los siguientes Proyectos

2019-2022. Nuevos procesos multi-catalíticos basados en la tecnología de los líquidos iónicos: Desde las materias primas sencillas hasta los químicos con valor añadido. MICINN. RTI2018-098233-B-C21.

2019-2021. Procesos (Bio)catalíticos sostenibles en líquidos iónicos y su aplicación a la industria cosmética y farmacéutica. Fundación Seneca. Región de Murcia. Ref. 20790/PI/18.

Los resultados de investigación obtenidos en esta Tesis Doctoral han sido objeto de las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos tanto nacionales como internacionales:

Publicaciones:

-Artículos científicos:

- [1] **R. Villa**, R. Porcar, S. Nieto, A. Donaire, E. Garcia-Verdugo, S. V. Luis, P. Lozano. Sustainable chemo-enzymatic synthesis of glycerol carbonate (meth)acrylate from glycidol and carbon dioxide enabled by ionic liquids technologies. *Green Chem.*, **2021**.
- [2] S. Nieto, **R. Villa**, A. Donaire, P. Lozano. Ultrasounds-assisted enzymatic synthesis of xilitol fatty acid esters in solvent-free conditions. **2021**
- [3] **R. Villa**, E. Álvarez, S. Nieto, A. Donaire, E. Garcia-Verdugo, S. V. Luis, P. Lozano. Chemo-enzymatic Production of Omega-3 monoacylglycerides using Sponge-like Ionic liquids and Supercritical carbon dioxide. *Green Chem.*, **2020**, 22, 5701.
- [4] E. Alvarez, **R. Villa**, S. Nieto, A. Donaire, E. García-Verdugo, S.V. Luis, P. Lozano. The suitability of lipases for the synthesis of bioactive compounds with cosmeceutical applications. *Mini-Rev. Org. Chem.* **18**, **2021**, 1-14.
- [5] **R. Villa**, E. Álvarez, R. Porcar, E. Garcia-Verdugo, S. V. Luis, P. Lozano. Ionic liquids as a enabling tool to integrate reaction / separation processes. *Green Chem.*, **2019**, 21, 6257.
- [6] P. Lozano, E. Alvarez, S. Nieto, **R. Villa**, J.M. Bernal, A. Donaire. Biocatalytic synthesis of panthenyl monoacyl esters in ionic liquids and deep eutectic solvents. *Green Chem.*, **2019**, 21, 3353-3361.
- [7] E. Alvarez, J. Rodriguez, **R. Villa**, C. Gomez, S. Nieto, A. Donaire, P. Lozano. Clean enzymatic production of flavour esters in spongelike ionic liquids. *ACS Sust. Chem. Eng.*, **2019**, 7, 13307-13314.

-Capítulo de libro:

- [1] S. Nieto, **R. Villa**, A. Donaire, J. L. Serrano, P. Lozano. Ionic Liquids in Clean and Sustainable Biocatalytic Organic Reactions. S. Zhang (ed.), pp 1-13. **2019**. *Encyclopedia of Ionic Liquids*. Springer Nature Singapore Pte Ltd.

Congresos nacionales e internacionales:

- [1] **Rocío Villa**, Elena Álvarez, Susana Nieto, Antonio Donaire, Gregorio Sánchez-Gómez, Pedro Lozano. Green efficient tools for the catalytic synthesis of fatty acid esters (Póster). *International Symposium on Setting their Table: Women and the Periodic Table of Elements*. 11-13, Febrero, **2019**, Murcia (Spain).
- [2] Elena Álvarez, José Romera, Celia Gómez, Susana Nieto, **Rocío Villa**, Gregorio Sánchez-Gómez, Pedro Lozano. Beyond the element: Ionic liquids as reaction media for clean biocatalyst synthesis of cinnamyl esters (Póster). *International Symposium on Setting their Table: Women and the Periodic Table of Elements*. 11-13, Febrero, **2019**, Murcia (Spain).
- [3] Pedro Lozano, Elena Álvarez, **Rocío Villa**, Susana Nieto, Antonio Donaire, Eduardo Garcia-Verdugo, Santiago V. Luis. Sponge-like ionic liquids and supercritical carbon dioxide for clean biocatalytic processes (Comunicación oral). *17th European Meeting on Supercritical Fluids 7th European Meeting on High Pressure Technology*. 08-11, Abril, **2019**, Ciudad Real (Spain).
- [4] **Rocío Villa**, Pedro Lozano, Elena Álvarez, Susana Nieto, Antonio Donaire, Eduardo Garcia-Verdugo, Santiago V. Luis. Biocatalytic synthesis of Oxygenated Biofuels from Fatty Acids by using Ionic Liquids and Supercritical Fluids (Póster). *17th European Meeting on Supercritical Fluids 7th European Meeting on High Pressure Technology*. 08-11, Abril, **2019**, Ciudad Real (Spain).
- [5] Elena Álvarez, **Rocío Villa**, Susana Nieto, Antonio Donaire, Gregorio Sánchez-Gómez, Pedro Lozano. Sustainable enzymatic synthesis of panthenyl monoesters in ionic liquids (Póster). *International Symposium on Green Chemistry*. 13-17, Mayo, **2019**, La Rochelle (France).

- [6] Pedro Lozano, Susana Nieto, Elena Álvarez, **Rocío Villa**, Celia Gómez, Antonio Donaire, Gregorio Sánchez-Gómez, Eduardo García-Verdugo, Santiago V. Luis. Clean biocatalytic processes using sponge-like ionic liquids and supercritical carbon dioxide (Comunicación oral). *International Symposium on Green Chemistry*. 13-17, Mayo, **2019**, La Rochelle (France).
- [7] **Rocío Villa**, Elena Álvarez, Susana Nieto, Antonio Donaire, Eduardo García-Verdugo, Santiago V. Luis, Pedro Lozano. Biocatalytic synthesis of solketyl laurate by using ionic liquids and supercritical carbon dioxide technologies (Póster). *International Symposium on Green Chemistry*. 13-17, Mayo, **2019**, La Rochelle (France).
- [8] Elena Álvarez, Susana Nieto, **Rocío Villa**, Antonio Donaire, Gregorio Sánchez-Gómez, Pedro Lozano. Síntesis enzimática de ésteres de pantenilo en Líquidos iónicos y en sistemas libres de solvente (Póster). *V Jornadas Doctorales*. 29-31, Mayo, **2019**, Murcia (Spain).
- [9] **Rocío Villa**, Elena Álvarez, Susana Nieto, Antonio Donaire, Eduardo García-Verdugo, Santiago V. Luis, Pedro Lozano. Síntesis biocatalítica de ésteres de solketal de ácidos grasos utilizando líquidos iónicos y dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) (Póster). *V Jornadas Doctorales*. 29-31, Mayo, **2019**, Murcia (Spain).
- [10] Elena Álvarez, **Rocío Villa**, Susana Nieto, Antonio Donaire, Gregorio Sánchez-Gómez, Pedro Lozano (Póster). Sustainable enzymatic synthesis pathenyl monoesters in ionic liquids. *Congreso Nacional de Biotecnología*. 10-13, Junio, **2019**, Galicia (Spain).
- [11] Pedro Lozano, Elena Álvarez, **Rocío Villa**, Susana Nieto, Antonio Donaire, Gregorio Sánchez-Gómez (Comunicación Oral). Sustainable chemical processes in ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Congreso Nacional de Biotecnología*. 10-13, Junio, **2019**, Galicia (Spain).
- [12] **Rocío Villa**, Elena Álvarez, Susana Nieto, Antonio Donaire, Gregorio Sánchez-Gómez, Eduardo García-Verdugo, Santiago V. Luis, Pedro Lozano. Biocatalytic synthesis of oxygenated biofuels through the technologies of ionic liquids and supercritical carbon dioxide (Póster). Sustainable enzymatic synthesis pathenyl monoesters in ionic liquids. *Congreso Nacional de Biotecnología*. 10-13, Junio, **2019**, Galicia (Spain).
- [13] **Rocío Villa**, Susana Nieto, Antonio Donaire, Pedro Lozano. Sponge Like Ionic Liquids for clean biocatalytic processes (Póster). *IX Mediterranean Organic Chemistry Meeting*. 23, Octubre, **2019**, Murcia (Spain).
- [14] **Rocío Villa**, Elena Álvarez, Susana Nieto, Antonio Donaire, Pedro Lozano. Enzymatic synthesis of Fatty Acid Solketal Esters using Sponge Like Ionic Liquids (Comunicación oral Flash y Póster). *The I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers*. 22-23, Octubre, **2020**, Murcia (Spain).

AGRADECIMIENTOS

“La ciencia no solo es una disciplina de la razón, sino también del romance y de la pasión.”
Stephen Hawking

Esta Tesis Doctoral no habría sido posible sin el apoyo imprescindible e incondicional de algunas personas a las que me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, agradecer infinitamente a mi Director de Tesis D. Pedro Lozano Rodríguez. Gracias por confiar en mi desde el principio de mi formación doctoral, por ofrecerme todos los medios posibles en el laboratorio, por transmitir a todos los niveles tu inmensa generosidad, por ayudarme y animarme cada vez que lo he necesitado y por brindarme la oportunidad de hacerme formar parte de la ciencia que tanto amas. Nunca acabaría si tuviera que expresar lo enormemente privilegiada y agradecida que me siento hoy en día por todo lo que he aprendido gracias a tu enseñanza, no solo en el ámbito científico sino, además, a nivel personal desde que me dijiste, entre otras muchas sabias frases, algo como: *“Llegarás a donde quieras, porque tú defines los límites”*. Claramente, puedo afirmar que, gracias a ti, esta etapa tan importante marca un antes y un después en mi vida. Jamás lo olvidaré.

A Susana Nieto, por haber sido una excelente compañera de laboratorio y, a quien hoy en día, ya considero una gran amiga, siempre dispuesta a ayudar en lo que hiciera falta con una sonrisa y, animándome durante toda esta etapa tan importante para mí. Infinitas gracias, compañera. A Antonio Donaire, por ofrecerme su

ayuda cuando lo he necesitado, por enseñarme y apoyarme (incluso en mis momentos más tercos durante nuestros debates de RMN). Gracias de corazón. Nunca olvidaré nuestras fantásticas y divertidas comidas de los viernes. A David, por su disponibilidad incondicional, por su ofrecimiento para ayudar en cualquier actividad en el laboratorio y por su gran amabilidad. Y, en general, a todos los compañeros del departamento y a aquellos que están o han estado trabajando en el laboratorio (Andrés, Elena, Cris, Juana Mari, Esther, Gema, Rosalba, Julia, etc.) haciendo que esta etapa haya sido una auténtica maravilla.

Por supuesto, agradecer a todo el equipo de investigación de Castellón, a Santiago V Luis, Maribel, Belén y a Eduardo Garcia-Verdugo por su gran ayuda y aportación de brillantes ideas que han sido de valiosa ayuda durante la realización de esta Tesis Doctoral. A José Sánchez-Marcano y Marie Pierre por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y recibirme con los brazos abiertos en el equipo de investigación para la realización de mi estancia de formación predoctoral en *L' Institut Européen des Membranes* de Montpellier, Francia.

Gracias a mis familiares, a mis abuelos, a todas mis amigas y, en especial, a Marta María, mi compañera de vida, cómplice y gran amiga del alma.

A mi hermano, por apoyarme siempre y decirme lo orgulloso que se siente de mí. No cambies nunca esa nobleza que tanto abunda en tu corazón. Gracias a Isabel, por estar siempre que lo he necesitado

y tratarme como a una hija durante todos estos años. Eres muy especial para mí.

Pero mi más profundo agradecimiento va dirigido a mis padres, porque todo lo que soy se lo debo a ellos. Mi madre, que me ha acompañado en cada paso y etapa de mi vida, ha estado apoyándome y derrochando pura bondad, porque eso es lo que eres, pura bondad. Mamá, no tengo palabras para agradecer lo que has hecho por mí a lo largo de toda mi vida, por ofrecerme todo lo que he necesitado, y por enseñarme a ver siempre el lado bueno de todo. Mi padre, al que tantísimo le debo... Él me ha enseñado a vivir la vida de una forma honesta y humilde, inculcando y enseñándome sus valores, siempre a pie de cañón en todos los aspectos y preocupándose por mí, mostrando siempre su gran exigencia, la que hoy en día tantísimo agradezco. Gracias por apoyarme en todas mis etapas y por cuidarme, pero, sobre todo, gracias por enseñarme lo más importante de la vida al repetirme, una y otra vez, estas palabras que jamás olvidaré: *“Lo más importante en esta vida es ser persona”*.

*A mis padres, mis pilares fundamentales y
referentes de humildad y honestidad*

SUMMARY

The design of new sustainable chemical processes, based on the development of efficient catalytic syntheses with the appropriate combination of new reaction / separation protocols, are fundamental elements for the development of the chemical industry in the immediate future, since they entail significant savings in the production cost, as well as minimizing environmental impacts. Therefore, it is of utmost importance to replace volatile organic solvents with non-volatile and fully recoverable solvents (*i.e.* ionic liquids, scCO₂, DES, etc.), as well as the use of high-efficiency heterogeneous (bio)catalysts, which allow their reuse, providing high selectivities and minimal generation of by-products. Thus, it is possible to avoid additional product purification steps, as well as to improve and facilitate the integration of the transformation and separation steps.

Green Chemistry is a scientific philosophy that focuses on the design of processes and chemical reactions that reduce or minimize the generation of products that are harmful to humans and the environment as a whole. From the chemical sector point of view, the fundamental idea is to minimize or eradicate the use of dangerous substances and transform those that can already be generated into non-toxic compounds. It is clearly a goal that can not be easily achieved. In this sense, chemical processes include steps in which substances are progressively transformed to obtain the desired product. However, the process requires the use of traditional organic solvents that can be aggressive with the environment and secondary compounds are also generated, becoming highly toxic and difficult to treat.

Generally, solvents are used as auxiliary materials in chemical synthesis, since they act as a reaction medium and improve the transport and separation of the product. However, the vast majority of solvents used in laboratories are molecular liquids, which belong to the group of volatile organic compounds, and their recovery can never be total, and their reuse is usually associated with distillation processes that require a lot of Energy. For this main reason, their replacement and / or elimination is not an easy task, since due to their functionality they turn out to be key elements in most chemical processes.

In recent years, with the main objective of creating a more environmentally friendly chemical industry, focusing on the use of alternative reaction media and more sustainable synthetic strategies. These alternative solvents (that is, ionic liquids or supercritical

fluids), offer the possibility of being recovered and reused in their entirety, which is why their exploitation as an alternative to organic solvents is today at the forefront.

As an excellent alternative to volatile organic solvents, it is important to highlight supercritical fluids that are defined as a state of matter that is at a pressure and temperature higher than its critical point, but lower than the pressure necessary to condense it into a solid. Regarding their applications, these solvents have proven to have exceptional abilities in chemical reactions for extraction, fractionation and analysis processes through the correct manipulation of the physico-chemical properties and simple changes in the value of pressure or temperature. These systems have low viscosities and diffusivities similar to those of gases, which facilitates transport phenomena and improves the efficiency of catalytic processes. For this reason, they have been used as an excellent reaction media, extraction, processing and transformation of hydrophobic compounds as they are low polarity solvents. Within the different supercritical fluids, it is important to highlight supercritical carbon dioxide (scCO₂) as the most widely used supercritical solvent, not only because it is an inert gas, but also because of its low critical value.

On the other hand, Ionic liquids (ILs) are salts that are completely composed by ions and they are liquid at temperatures below 100°C. In contrast to conventional organic solvents, ILs have many genuine properties, including extremely low vapor pressure, low flammability, high ionic and thermal conductivity, good dissolving power towards many substrates with different nature, high thermal and chemical stability, and broad electrochemical properties. The physical and chemical properties can be modulated depending on the cation and anion, and it is possible to obtain numerous combinations. Among the most common cations are those of imidazolium, pyridinium, ammonium, pyrrolidinium and phosphonium, while the most common anions are: bis [(trifluoromethyl) sulfonyl] imide (NTf₂), hexafluorophosphate (PF₆), trifluoromethylsulfonate (CF₃SO₃) and halides. In this sense, ionic liquids and their technological developments (*e.g.* supported ionic liquids like phase, SILLPs) open up new opportunities in the context of sustainable technologies, as an excellent enabling tool to integrate reaction and separation processes. In addition, the exceptional function of many highly efficient biocatalysts such as enzymes, can be greatly improved in IL, scCO₂ environments and the combination of both with excellent synergies, allowing the development of green processes. These IL-based systems can contribute, not only to the stabilization and easy recovery of biocatalysts, but can also be implemented in flow

systems for downstream processes. The correct combination of efficient chemical biocatalysts / catalysts with advanced materials based on ILs (*e.g.* SILLPs, SLIL, etc.) offers new opportunities that directly point to the integration of several catalytic steps in organic synthesis, without the need to isolate intermediates.

Recently, Deep Eutectic Solvents (DESs) are a new generation of green solvents that have emerged as excellent alternatives to traditional solvents, whose use is constantly growing. These solvents are made up of a hydrogen bond acceptor and at least one hydrogen bond donor, linked together by hydrogen bonding. When a DES is generated, the viscous mixture obtained has a lower melting point than the individual components. Generally, these systems have low vapor pressure, bioavailability, biodegradability, low toxicity, etc., which makes them extremely interesting compounds for obtaining new processes and chemical products of industrial interest. From the point of view of Green Chemistry, these neoteric solvents can be considered more attractive than ILs since their synthesis is 100% atom economic, and no purification steps are required.

However, the objectives of Green Chemistry go far beyond replacing dangerous solvents with environmentally benign ones. The selectivity of the catalytic processes is just as important, due to the need to avoid unwanted reactions and by-products, and to facilitate the recovery of the products. The use of catalysts in chemical processes, instead of using stoichiometric reactions, is one of the principles of Green Chemistry. Catalysts are chemical agents that reduce the energy necessary for a process to occur, allowing it to take place in a shorter time scale, resulting the acceleratation of the reactions. Furthermore, a catalyst is used in substoichiometric concentrations and is not consumed in the process. Many catalysts of various natures are used in chemical processes, while in biological systems the catalysts are proteins, called enzymes.

Taking into account the concepts of sustainability and green processes, enzymes are the natural and biological catalysts to carry out the chemical processes that make life possible. These catalytic proteins evolved to perform their function in a medium compatible with life, such as water. In addition, they are catalysts that can also be used to accelerate and improve chemical reactions outside their biological environment, in non-aqueous media such as organic solvents, ionic liquids or supercritical fluids. That is why the concept of biocatalysis refers to the use of enzymes to carry out chemical biotransformations, where the selectivity levels provided are of the highest level. In this sense, its use offers other advantages over traditional

chemical methods, since it is possible to increase the speed of the chemical reaction with a lower amount of enzyme compared to that used with traditional catalysts, allowing to reduce energy expenditure and costs of the process. Currently, scientific developments are working on its implementation in different areas of chemical synthesis, such as the design of new drugs, food development, or obtaining more efficient, ecological and profitable chemical products and processes. However, the use of enzymes in chemical processes that use non-aqueous solvents requires knowing that they are active and stable under operating conditions. Among the most widely used enzymes, lipases have gained clear dominance, exhibiting broad specificity to recognize very different substrates.

The adequate combination of the different sustainable tools (ILs, supercritical fluids, biocatalysts, DESs, etc.) has generated important expectations for the development and design of new chemical processes in non-aqueous systems that are environmentally benign. For example, the phase behavior of the water / IL systems it deserves a special mention, since ILs can be considered as polar solvents, they cannot be considered similar to molecular solvents polar with respect to their miscibility with water (*i.e.*, ILs based on anions [NTf₂] or [PF₆] are immiscible with water). The ILs immiscible with water show a high hygroscopic character (*i.e.*, [Bmim][NTf₂] is capable of absorbing up to 1.4% w / w of water content), resulting in this key characteristic to carry out biocatalytic processes, since that allow to preserve the essential layer of water around the enzyme by means of which it maintains its active conformation.

Enzyme-catalyzed reactions in organic solvents is notably more efficient than conventional biocatalysis in aqueous solution. This phenomenon is mainly due to the fact that water is a better nucleophilic than alcohols, thiols or amines and, for this reason, in the presence of it, hydrolysis will be favored over any synthesis reaction. Specifically, lipases present high stability in non-aqueous media since in the presence of hydrophobic substrates, the lipase can adsorb them at its hydrophobic interface, promoting drastic changes in the structure of the enzyme, which trigger its "open" form, and thus allowing the possibility of accessing the substrate to the active center. Therefore, since 2000 and as a need to seek non-aqueous media to carry out synthesis reactions catalyzed by lipases, ILs have emerged as exceptional non-aqueous media to carry out this type of biotransformation due to their exceptional ability to maintain active enzymes in a stable conformational state. The polar character of ILs and the immiscibility

of some of them in water, allows the maintenance of the essential water layer to keep it active in non-aqueous environments. In this sense, the relationship between the structure and the stability of enzymes against deactivation in non-aqueous media such as ILs was the object of extensive study by our group, using various spectroscopic techniques (ie, fluorescence, CD, or FTIT) analyzed the conformational changes responsible for their stabilization or deactivation as a function of the surrounding microenvironment (*i.e.*, conventional media and hydrophobic ILs).

In this Doctoral Thesis, the concept of Sponge like ionic liquids (SLILs) is used, a term coined by our research group, being applied to obtaining omega-3 monoacylglycerides, flavour esters, monopanthenyl esters and cyclic carbonates. This term refers to hydrophobic ILs with long alkyl side chains that behave like phases switchable to solid liquids as a function of temperature. These ILs have previously proven to be excellent reaction media for carrying out clean comprehensive biocatalytic processes of synthesis and separation of pure products. In previous studies, it was evaluated how these ILs, such as [C₁₈tma][NTf₂], with melting points above room temperature, are capable of dissolving hydrophobic compounds (*i.e.*, triolein) in liquid state, providing excellent monophasic reaction media for carrying out lipase-catalyzed enzymatic transesterification reactions and / or esterification reactions with industrial interest. Flavour esters of short chain carboxylic acids (*e.g.* geranyl acetate) have fruity and floral fragrance properties and are of great interest in the cosmetic, pharmaceutical or food industry for the manufacture of deodorants, shampoos, body lotions, etc. However, the conventional chemical synthesis of this type of compound are based on the use of volatile organic solvents as reaction media, leaving the products obtained legally excluded as "natural product" labeling. A sustainable alternative for the production of these compounds is the study of the suitability of the combination of enzyme and SLILs, which has been successfully demonstrated in this doctoral thesis.

Furthremore, some compounds with interesting properties due to their application in the cosmetic industry (*i.e.*, vitamins, antioxidants, tocopherols, etc.) have been studied in detail, and therefore, the enzymatic synthesis of panthenol monoesters in SLILs and also the same reaction in the absence of solvents have been studied. Panthenol, also called provitamin B₅, is a bioactive molecule of great interest in the pharmaceutical and cosmetic industry. It is a very common component in creams, shampoos, hair conditioners, and skin treatment formulations, and is considered a cosmeceutical. As a

consequence of its high solubility in water, It has a relatively short interaction time when used directly in some cosmetic products. However, obtaining panthenol esters has aroused special interest in the cosmetic industry since the physicochemical properties are modified (*e.g.* hydrophobicity, amphiphilicity, etc.), improving interactions with the skin or hair.

In addition, it is worth noting the great interest of nutraceutical compounds, which are products that are very useful for both the food and pharmaceutical industries, obtained from natural sources. In this sense, the combination of supercritical fluids, enzymes and LIs has also been demonstrated for the synthesis of omega-3 monoglycerides from natural sources (fish oil and linseed oil) and solketal. On the other hand, the enzymatic synthesis of xilitol esters, using ultrasounds technologies to improve the process in absence of solvents, was also demonstrated.

ABREVIATURAS

ABS: Sistemas acuosos bifásicos termorreversibles (del inglés, Thermoreversible aqueous biphasic systems)

BSTFA: N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

CA: Anhidrasa Carbónica (del inglés, Carbonic Anhydrase)

CALA: Lipasa A de *Candida antártica*

CALB: Lipasa B de *Candida antártica*

COVs: compuestos orgánicos volátiles

DEP: Diéster de pantenol

DES: Disolvente eutéctico profundo (del inglés, Deep Eutectic Solvent)

FAMES: Ésteres metílicos de ácidos grasos (del inglés, Fatty Acid Methyl Esters)

FASEs: Ésteres solketílicos de ácidos grasos (del inglés, Fatty Acid Solketyl Esters)

GC: Glicerol carbonato

GCA: Glicerol carbonato acrilato

GCMA: Glicerol carbonato metacrilato

HBA: Aceptor de enlaces de hidrógeno (del inglés, Hydrogen Bond Acceptor)

HBD: Donador de enlaces de hidrógeno (del inglés, Hydrogen Bond Donnor)

HMF: Hidroximetilfurfural

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés, High Pressure Liquid Liquids)

LIs: Líquidos Iónicos

MA: Metilacrilato

MAGs: Monoacilglicéridos

MEP: Monoéster de pantenol

MMA: Metilmetacrilato

MNP: Nanopartículas de metales de transición (del inglés, metal nanoparticles)

MS: Molecular sieves

NADES: Disolvente eutéctico profundo natural (del inglés: Natural Deep Eutectic

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible

PCL: Lipasa de *Pseudomonas cepacia* (del inglés, Pseudomonas Cepacia Lipase)

PILM: Membranas de líquido poli(iónico) (del inglés, Poli(ionic) liquid Membranes)

RMN: Resonancia magnética nuclear

RTILs: Líquidos iónicos a temperatura ambiente (del inglés, Room Temperature Ionic)

scCO₂: Dióxido de Carbono Supercrítico

SILLPs: Líquidos iónicos soportados (del inglés, Supported Ionic Liquids Like Phase)

SILM: Membranas soportadas de líquido iónico (del inglés, Supported Ionic Liquids Membranes)

SLIL: Líquidos iónicos tipo esponja (del inglés, Sponge-Like Ionic Liquid)

TAGs: Triacilglicéridos

TGA: Técnicas de análisis gravimétrico (del inglés, thermogravimetric analysis)

TMSC: Trimetilclorosilano

VA: Vinilacrilato

VMA: Vinilmetacrilato

[Bmim][Cl]: Cloruro de 1-butil-3metilimidazolio

[C₁₀mim][NTf₂]: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-decil-3-metilimidazolio

[C₁₀tma][NTf₂]: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de deciltrimetilamonio

[C₁₂mim][BF₄]: Tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio

[C₁₂mim][NTf₂]: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-dodecil-3-metilimidazolio

[C₁₂tma][NTf₂]: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de dodeciltrimetilamonio

[C₁₄mim][NTf₂]: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-tetradecil-3-metilimidazolio

[C₁₄tma][NTf₂]: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de tetradeciltrimetilamonio

[C₁₆mim][NTf₂]: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-hexadecil-3-metilimidazolio

[C₁₆tma][NTf₂]: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de hexadeciltrimetilamonio

[C₁₆tma][PF₆]: Hexafluorofosfato de hexadeciltrimetilamonio

[C₁₈mim][NTf₂]: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-octadecil-3-metilimidazolio

[C₁₈tma][NTf₂]: Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de octadeciltrimetilamonio

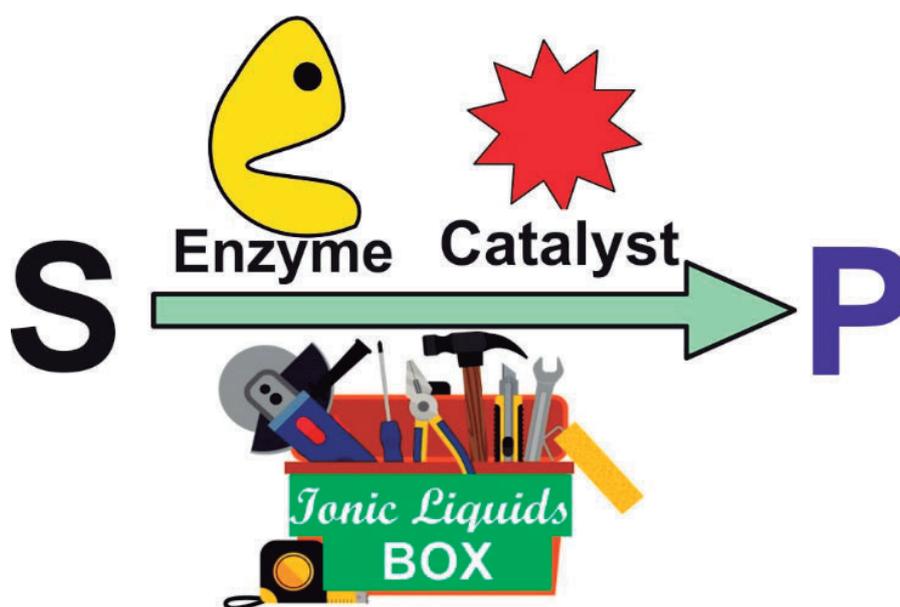
ÍNDICE

Summary.....	i
Abreviaturas.....	vii
CAPÍTULO I: Introducción: Sostenibilidad en las reacciones y procesos químicos.....	1
1.1. Química Sostenible: Ámbito y aplicaciones.....	3
1.1.1. Fluidos supercríticos.....	8
1.1.2. Disolventes perfluorados.....	9
1.1.3. Disolventes Eutécticos Profundos (DES).....	10
1.2. Líquidos Iónicos: estructura y propiedades.....	13
1.3. Biocatalizadores y líquidos iónicos.....	18
1.3.1. Lipasas: estructura y propiedades.....	18
1.3.2. Enzimas en líquidos iónicos: actividad enzimática y estabilidad.....	23
1.4. Líquidos iónicos en el desarrollo de procesos químicos sostenibles.....	25
1.4.1. Sistemas (bio)catalíticos multifase basados en la tecnología de los LIs.....	27
1.4.2. Nanopartículas metálicas en LIs.....	35
1.4.3. Reactores de membrana basados en la tecnología de LIs.....	36
1.4.4. Reactores de microfluidos basados en la tecnología de LIs.....	39
1.4.5. Desde LIs termosensibles hasta sistemas de LI tipo esponja (SLILs).....	41
1.5. Conclusiones.....	46
1.6. Bibliografía.....	48
CAPITULO II: Objetivos.....	57
CAPÍTULO III: Biocatálisis en líquidos iónicos: Diseño de procesos sostenibles basados en líquidos iónicos tipo esponja.....	63
3.1. Biocatálisis: una herramienta sostenible para síntesis eficientes.....	65
3.2. Biocatalizadores y líquidos iónicos: sinergia para realizar procesos químicos limpios.....	66
3.3. Ejemplos de reacciones orgánicas mediante biocatálisis en LIs.....	68
3.4. Líquidos Iónicos tipo esponja (SLIL) en procesos biocatalíticos.....	70
3.5. Nuevos desarrollos en la síntesis biocatalítica de fragancias en SLILs.....	74
3.6. Conclusiones.....	78
3.7. Bibliografía.....	80
CAPÍTULO IV: Procesos quimio-enzimáticos basados en la tecnología de los líquidos iónicos.....	83
4.1. Resumen.....	85
4.2. Síntesis quimio-enzimática de monoglicéridos omega-3 en LIs y scCO ₂	86
4.2.1. Introducción.....	86
4.2.2. Síntesis enzimática de FASEs en [C18tma][NTf ₂] e hidrólisis ácida del anillo ketal.....	90

4.2.3. Síntesis quimio-enzimática en continuo de MAGs omega-3 utilizando la tecnología del scCO ₂	92
4.2.4. Síntesis quimio-enzimática en discontinuo de MAGs omega-3 en SLIL.....	95
4.3. Síntesis quimio-enzimática de (met)acrilato de glicerol carbonato a partir de glicidol y CO ₂ mediante las tecnologías de los LIs.....	99
4.3.1. Introducción.....	99
4.3.2. Síntesis enzimática de (met)acrilato de glicidilo.....	103
4.3.3. Síntesis de (met)acrilato de glicerol carbonato catalizada por SILLP mediante cicloadición de CO ₂ a (met)acrilato de glicidilo.....	107
4.3.4. Síntesis quimio-enzimática de GCMA en ausencia de disolventes.....	109
4.4. Conclusiones.....	111
4.5. Bibliografía.....	114
CAPÍTULO V: Procesos biocatalíticos en sistemas libres de disolventes de interés en la industria cosmética.....	117
5.1. Resumen.....	119
5.2. Idoneidad de las lipasas para la obtención de compuestos bioactivos con aplicaciones en la industria cosmética.....	120
5.3. Síntesis biocatalítica de monoésteres de pantenol en LIs y DESs.....	124
5.4. Síntesis biocatalítica de monoésteres de xilitol en sistemas libres de disolventes asistida por ultrasonidos.....	131
5.4.1. Síntesis biocatalítica de laurato de xilitol.....	133
5.5. Conclusiones.....	138
5.6. Bibliografía.....	140
CAPÍTULO VI: Conclusiones / conclusions.....	143
6.1. Conclusiones.....	145
6.2. Conclusions.....	148
ANEXOS	

CAPÍTULO I:

Introducción: Sostenibilidad en las reacciones y los procesos químicos



Parte de este capítulo es una adaptación del siguiente artículo publicado:

Rocío Villa, Elena Alvarez, Raúl Porcar, Eduardo Garcia-Verdugo, Santiago V. Luis, Pedro Lozano. Ionic liquids as an enabling tool to integrate reaction and separation processes. *GreenChem.*, 2019, 21, 6527-6544. <https://doi.org/10.1039/C9GC02553G> (ANEXO I)

1.1. Química Sostenible: Ámbito y aplicaciones

Según el diccionario de la lengua de la Real Academia Española, *la química es la ciencia que estudia la estructura, propiedades y transformaciones de la materia a partir de su composición*. Desde el punto de vista aplicado, es la ciencia que más ha contribuido en la mejora continua de la calidad de vida y bienestar del hombre, aportando enormes avances en todos los ámbitos que incluyen la alimentación, higiene, energía, agricultura, agua potable, materiales y la obtención de fármacos. En este último aspecto, la química ha influido considerablemente en el desarrollo de nuevos medicamentos que han dado solución a innumerables problemas de salud, permitiendo que la esperanza de vida se haya incrementado desde los 35 años, que había a principios del siglo XX, hasta algo más de 80 años, que hay en la actualidad. Sin embargo, a lo largo de los años se ha generado una percepción social negativa de la química, debido esencialmente al impacto medioambiental producido por los malos usos de la misma, con una generación descontrolada de subproductos y desechos, y con importantes deterioros medioambientales, fundamentalmente como consecuencia de un incremento permanente en la demanda de productos de diversos sectores industriales (p.ej. materiales, farmacéutico, petroquímico etc.), impulsada por la globalización de los mercados y los hábitos de consumo de la sociedad actual.

La calidad de vida está directamente vinculada con los avances que la ciencia en general, y la química en particular, han podido aportar a lo largo de la historia de la humanidad. Sin embargo, las industrias de química fina y farmacéutica han sido identificadas como importantes fuentes de desechos químicos (Abou-Sehada *et al.*, 2016), debido, en gran parte, a que para la producción de moléculas complejas se requieren grandes cantidades de disolventes orgánicos volátiles durante su síntesis y purificación (Sheldon, 2005).

Desde mediados de los años 90 del pasado siglo, se ha incrementado día a día la concienciación social y política para revertir los deterioros medioambientales generados por las actividades industriales relacionadas con la química. Así, por ejemplo, en USA se promulgaron diversas leyes para disminuir las emisiones de disolventes volátiles y mejorar la calidad del aire (p. ej. Ley de Aire Limpio de 1990 en USA, Directiva de Emisiones de Disolventes de la UE en 1999; la creación sistema REACH de la UE, para del Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Productos Químicos (Kerton y

Marriott, 2013). Sin embargo, la mayoría de procesos químicos existentes en la actualidad continúan utilizando disolventes orgánicos volátiles y nocivos, debido a los bajos precios de mercado y su alta disponibilidad en el mercado globalizado. El cambio de modelo no será fácil mientras la competitividad de precios en los mercados sea el único parámetro que determine el control de la producción. “*Un producto químico sostenible debe suministrarse a un precio que permita que sus usuarios accedan a él y, al mismo tiempo, sea comercialmente viable para sus productores*” (Welton, 2015).

La Química Sostenible, o también llamada Química Verde, es un modo de entender y practicar la química, dirigido hacia el diseño de productos y procesos químicos que impliquen la reducción o eliminación de productos y procesos nocivos, tanto para el ser humano como el medioambiente. La sostenibilidad de los procesos químicos debe conllevar transformaciones químicas que sean altamente eficientes y selectivas mediante el empleo de catalizadores (químicos o biológicos), y mediante condiciones operacionales más seguras y que supongan la mínima generación de residuos. En este sentido, las limitaciones del agua como disolvente para las reacciones químicas y las operaciones básicas industriales (p. ej. extracción, solubilización, etc.), determina la necesidad de buscar y fomentar el uso de otros disolventes no acuosos, alternativos a los disolventes orgánicos volátiles tradicionales que, bien por su origen a partir de fuentes renovables, o bien por posibilidad de ser recuperados y reutilizados íntegramente, permitan el desarrollo de los procesos químicos sin deterioros medioambientales.

Fue en 1998 cuando la Química Verde emergió como disciplina científica dentro de la química con la definición de los **Doce Principios de la Química Verde** (ver **Tabla 1.1**), enunciados por Paul T. Anastas y John C. Warner (Anastas y Warner, 1998) que, posteriormente, han sido la base conceptual de revistas científicas del área JCR “*GREEN & SUSTAINABLE SCIENCE & TECHNOLOGY*” tales como *Green Chemistry*, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *ChemSusChem*, etc.

Atendiendo al concepto de Sostenibilidad y a Los Doce Principios de la Química Verde, el diseño adecuado de procesos y productos químicos respetuosos con el medioambiente implica el conocimiento multidisciplinar de numerosos ámbitos científicos. Así, los avances científicos basados en la Química Verde, y su posterior aplicación a nivel industrial, son pilares fundamentales para la construcción de una sociedad sostenible durante este siglo XXI (Poliakoff y Licence, 2007).

Tabla 1.1. Los Doce Principios de la Química Verde (Anastas y Warner, 1998).

1. Prevención	Evitar la producción de residuos y el posterior tratamiento para eliminarlo.
2. Economía Atómica	Diseño de métodos de síntesis que incorporen al máximo en el producto final todos los elementos empleados en el proceso, minimizando la generación de subproductos.
3. Síntesis segura	En la medida de lo posible, diseño de métodos sintéticos que generen productos de poca o nula toxicidad, tanto para el ser humano como el medio ambiente.
4. Productos seguros	Desarrollo de procesos con máxima eficiencia y mínima toxicidad.
5. Disolventes inocuos	Evitar el uso de sustancias que no sean imprescindibles, y en caso de usarlos, que sean lo más inocuas posibles.
6. Eficiencia energética	Reducción del consumo energético, llevando a cabo procesos químicos a temperaturas, presiones moderadas, etc.
7. Materias primas renovables	En la medida de lo posible, los materiales de partida deben ser no extinguidos y renovables.
8. Disminuir la derivatización	Evitar la generación de productos que requieran un proceso de derivatización.
9. Catalizadores	Los reactivos catalíticos son superiores a los estequiométricos.
10. Biodegradabilidad	Los productos químicos deben ser diseñados de tal forma que no persistan en el medio ambiente.
11. Polución	Desarrollo de metodologías analíticas que permitan el monitoreo a tiempo real, evitando cualquier tipo de sustancia peligrosa.
12. Prevención de accidentes	Deben elegirse sustancias de manera que eviten la posibilidad de accidentes.

Adicionalmente al empleo de disolventes con bajo o nulo impacto medioambiental, el concepto de sostenibilidad también implica fuertemente a los procesos catalíticos, ya que la selectividad y eficiencia en las transformaciones químicas también están relacionadas con algunos principios de la Química Verde (p. ej., la prevención, eficiencia atómica, síntesis de productos menos peligrosos, etc.). La generación descontrolada de subproductos y contaminantes en las reacciones y procesos químicos convencionales, donde se emplean cantidades estequiométricas de los reactivos, puede ser drásticamente reducida mediante el empleo de catalizadores eficientes, los cuales favorecen económicamente los rendimientos en la síntesis de productos de interés para la industria química, así como la minimización del impacto medio ambiental (Sheldon, 2007; Busacca *et al.*, 2011). Por otro lado, es importante destacar en el diseño de procesos sostenibles, otros aspectos que mejoran claramente la sostenibilidad de los procesos, tales como el empleo de materias primas obtenidas a partir de fuentes renovables (Farrán *et*

al., 2015), el uso de medios de reacción / extracción respetuosos con el medioambiente, la incorporación de técnicas de activación, por ejemplo, ultrasonidos, microondas, etc., capaces de mejorar la actividad catalítica, etc. (Luska *et al.*, 2015; Lozano *et al.*, 2010; de la Hoz *et al.*, 2005). De este modo, y atendiendo a estos conceptos, es posible llevar a cabo procesos selectivos de transformación / separación, ofreciendo la ventaja de obtención directa de productos puros mediante reacciones selectivas y eficientes en medios de reacción diseñados adecuadamente para permitir una fácil extracción de los productos, así como la recuperación y reutilización de todos los elementos del sistema de reacción (disolventes, catalizadores, etc.) (Villa *et al.*, 2019).

Las instituciones internacionales, los países y el conjunto de la sociedad mundial están determinados a realizar durante los próximos años un cambio histórico en nuestro modelo de sociedad que gire inequívocamente sobre el concepto de sostenibilidad. La Comisión Mundial de Medio Ambiente y Desarrollo, fundada en 1983 por las Naciones Unidas, dedicó sus esfuerzos a la preparación de un informe que abordaba las perspectivas de un desarrollo sostenible y respetuoso a largo plazo con el medio ambiente para el año 2000 y años posteriores. Unos años más tarde, un artículo conocido como *Our Common Future* o también como *Brundtland Report*, describió el desarrollo sostenible como: “Satisfacer las necesidades de la generación actual sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer las necesidades” (Brundtland, 1987). Desde entonces, el concepto de sostenibilidad ha cobrado mayor relevancia en las últimas décadas, y ha recibido una considerable atención por parte de la industria química y por la sociedad en su conjunto. En 2015, la ONU llevó a cabo un nuevo plan de desarrollo centrado en la sostenibilidad cuyo título es: “*Transforming Our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development*” (United Nations General Assembly, 2015). El plan consta de 17 objetivos de desarrollo sostenible (ODS) que abordan una amplia gama de cuestiones, la mayoría de las cuales reconocen la necesidad de una química e ingeniería química beneficiosas con el medio ambiente. Este ambicioso proyecto destaca el papel fundamental de los procesos sostenibles como impulsores y auténticos protagonistas de la investigación química, los cuales brindan nuevos desafíos y oportunidades.

Generalmente, los disolventes no acuosos tradicionales son empleados como materiales auxiliares en las reacciones químicas, y son los medios de reacción, transporte y separación más utilizados en la industria química. Ya en 1733, Hermannus Boerhave

declaró: “Además de los cuatro elementos fuego, agua, aire y tierra, debemos considerar un quinto, el disolvente, que es esencial para que los químicos lleven a cabo todas sus hermosas reacciones” (Keim, 2003). Sin embargo, como se ha indicado, la mayoría de los disolventes son líquidos moleculares pertenecientes al grupo de Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs), y que son los causantes, en gran escala, de los problemas medioambientales que la industria química ha ocasionado a lo largo de los años, debido a su naturaleza tóxica, corrosiva e inflamable. Además de su inevitable pérdida por evaporación, los procesos de recuperación y reutilización de los mismos requieren un alto gasto energético (p.ej. por destilación), y conducen a bajos rendimientos de recuperación. Sin embargo, reducir o erradicar el uso de los disolventes orgánicos en los procesos químicos industriales es una tarea enormemente difícil, ya que son líquidos moleculares que tienen la capacidad para solvatar y transportar a los reactivos, homogenizar el medio de reacción, pueden ser activadores de algunos catalizadores y, además, facilitan la separación de productos mediante simples cambios de solubilidad (Constable *et al.*, 2002). No obstante, existen ramas de la química que evitan el uso de cualquier tipo de disolventes, como las técnicas mecano-químicas, donde los reactivos sólidos se mezclan y, gracias a un proceso de molienda mediante bolas metálicas, se promueven las interacciones moleculares necesarias para las transformaciones químicas (Do y Friscic, 2017; James *et al.*, 2012), pero el desarrollo de esta tecnología está aún muy incipiente, y limitado por las lentas velocidades de reacción, alto costo y baja eficiencia. Sin embargo, es importante destacar las ventajas que ofrece esta rama de la química en el ámbito de los carbohidratos, siendo un campo actual en crecimiento para llevar a cabo nuevos desarrollos debido a su posible aplicación en metodologías más ecológicas y sostenibles. En este sentido, la combinación de las ventajas que ofrecen las técnicas mecano-químicas junto con las reacciones de los carbohidratos son de gran utilidad para establecer estrategias en la transformación de dichos compuestos cumpliendo los principios de la química verde (Perona *et al.*, 2020).

La necesidad de sustituir los disolventes orgánicos convencionales por disolventes con bajo o nulo impacto medioambiental, ha determinado no solo el incremento exponencial en el estudio de las propiedades de éstos últimos, sino también el empleo de técnicas para su selección. Así, se han propuesto modelos de selección de disolventes que incluyen, la identificación del disolvente convencional a reemplazar, la selección de potentes candidatos de reemplazo, la identificación de una ruta sintética “verde”, la evaluación del

rendimiento y toxicidad, etc. Dicha metodología se basa en una jerarquía de evaluaciones y pruebas diseñadas para identificar reemplazos de disolventes orgánicos y guiar hacia el desarrollo de nuevos disolventes alternativos (Jin *et al.*, 2017). El modelo utiliza parámetros solvatocrómicos y de solubilidad de Hansen, para facilitar la selección de nuevos disolventes.

En relación al desarrollo de procesos alternativos basados en el empleo de “disolventes verdes” ha permitido el diseño de nuevas estrategias para la obtención de productos químicos basadas en las cualidades de dichos disolventes “benignos”. Desde el punto de vista aplicado, el interés académico, científico e industrial se ha focalizado en cuatro grandes grupos de compuestos, a saber: *fluidos supercríticos*, *disolventes perfluorados*, *disolventes eutécticos profundos (Deep Eutectic solvents, DESs)* y *líquidos iónicos (LIs)*, ya que han demostrado un enorme potencial como herramientas sostenibles para el desarrollo de procesos químicos, debido a su fácil manejo en el laboratorio, su recuperación y posterior reutilización (Lozano, 2010).

1.1.1. Fluidos supercríticos

Un **fluido supercrítico** se define como un estado de la materia que se encuentra a una presión y temperatura superior a su punto crítico, pero inferior a la presión necesaria para condensarlo en un sólido. Estos fluidos se comportan como un híbrido entre un líquido y un gas, ya que pueden disolver sustancias como un líquido y difundir como un gas, lo que determina que tengan un gran poder solvente, y capacidad de transporte de materia disuelta. Su carácter verde radica en la facilidad para su recuperación y reutilización, ya que, basta con una simple despresurización para separar las sustancias que transporta, y el fluido en fase gas puede ser totalmente recuperado y reutilizado tras una simple presurización. Por sus propiedades, los fluidos supercríticos han demostrado tener habilidades excepcionales en las reacciones químicas para los procesos de extracción, fraccionamiento y análisis mediante la correcta manipulación de las propiedades físico-químicas y simples cambios en el valor de la presión o la temperatura (Jessop y Leitner, 1999). Además, estos sistemas presentan bajas viscosidades y difusividades similares a las de los gases, lo que facilita los fenómenos de transporte y la mejora de la eficacia de los procesos catalíticos. Es por ello, que los fluidos supercríticos han sido utilizados como medios de reacción, extracción, procesamiento y transformación de compuestos hidrofóbicos ya que son disolventes de baja polaridad. Dentro de los diferentes fluidos supercríticos, es importante destacar el dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) como el

disolvente supercrítico más utilizado, no sólo por ser un gas inerte y no tóxico, sino por sus bajos valores críticos (p. ej. $P_c = 73.8 \text{ bar}$; $T_c = 31.0 \text{ °C}$) (**Figura 1.1**), que son condiciones fácilmente adaptables a la tecnología industrial. En relación al empleo de biocatalizadores en fluidos supercríticos, las bajas viscosidades y difusividades que tienen estos sistemas mejoran el transporte de los reactivos al centro activo de las enzimas y, debido a la insolubilidad de los biocatalizadores en los fluidos supercríticos, es posible una fácil recuperación y reutilización (Mesiano *et al.*, 1999; Hobbs y Thomas, 2007; Knez, 2009, Lozano *et al.*, 2011, Lozano y Garcia-Verdugo, 2012). Además, cabe destacar que también existen otros fluidos supercríticos que resultan ser menos atractivos a escala industrial debido a su inflamabilidad (p. ej. SF_6), alto costo (p. ej. CHF_3) o bajo poder de solvatación y, por lo tanto, han sido menos utilizados en investigación (Lozano, 2010).

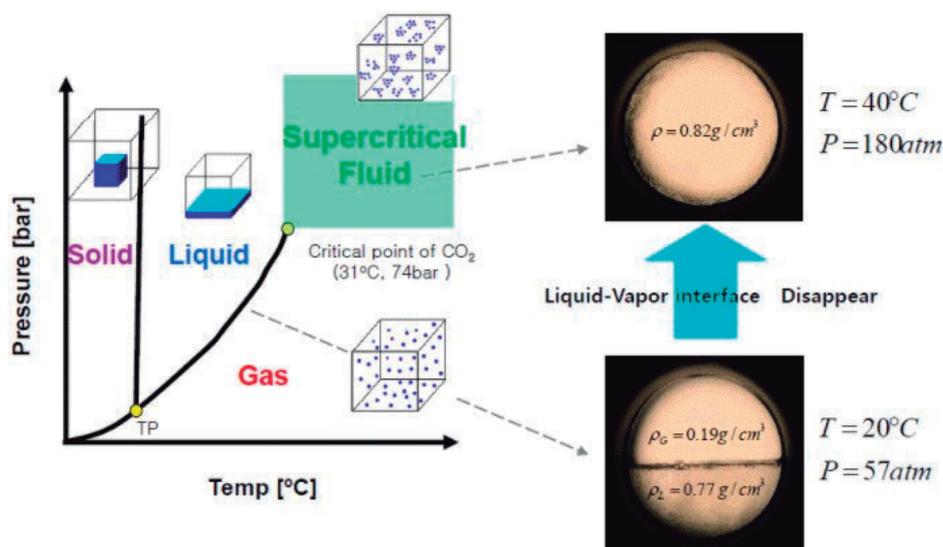


Figura 1.1. Diagrama de fases de presión y temperatura del CO₂. (Imagen obtenida de Extratex Supercritical Fluids Innovation).

1.1.2. Disolventes perfluorados

Los **disolventes perfluorados** son compuestos orgánicos (p. ej. alcanos, ésteres de dialquilo y las trialquilaminas, etc.) que están perfluorosustituidos, y que presentan un fuerte carácter hidrofóbico, además de ser apolares, químicamente inertes, no tóxicos, y fácilmente reciclables, ya que presentan una densidad más alta que los disolventes

orgánicos no fluorados (Hobbs y Thomas, 2007; Horvath y Rabai, 1994). Estos disolventes han sido considerados como “neotéricos”, ya que permiten el desarrollo de sistemas bifásicos no acuosos debido a la dependencia con la temperatura de su miscibilidad con los disolventes orgánicos tradicionales. Por ello, pueden utilizarse mezclas bifásicas de disolventes orgánicos / fluorados para generar un medio de reacción homogéneo a partir de uno heterogéneo, lo que facilita la extracción de los productos en la fase orgánica mediante simples cambios de temperatura. Sin embargo, su carácter volátil y la necesidad de emplearlos en combinación con disolventes orgánicos para las etapas de separación / extracción de los productos, suponen un gran inconveniente en el desarrollo y diseño de nuevos procesos químicos sostenibles y respetuosos con el medioambiente. Con el fin de superar esta principal desventaja, en diversas investigaciones se han diseñado estrategias sintéticas que utilizan la combinación de disolventes fluorados y fluidos supercríticos, dos disolventes moleculares que son clasificados como neotéricos (Hobbs y Thomas, 2007). No obstante, el interés por el uso y aplicaciones con los disolventes perfluorados ha sido desplazado en los últimos años hacia los Disolventes Eutécticos Profundos, y los Líquidos Iónicos, que se describen a continuación.

1.1.3. Disolventes Eutécticos Productos (DES)

Los disolventes eutécticos profundos (DES) están formados por la mezcla de sustancias sólidas a temperatura ambiente, normalmente ácidos y bases de Brønsted o Lewis, que al mezclarse constituyen un líquido viscoso y estable, cuyo punto de fusión es inferior al que presentan los componentes individuales por separado. (ver **Figura 1.2**). Dichos DESs constituyen mezclas eutécticas formadas por enlaces no iónicos entre un compuesto de naturaleza salina, que actúa como un aceptor de hidrógeno (HBA, del inglés Hydrogen Bond Acceptor) (p. ej. sal de amonio cuaternaria) y un metal o un donador de enlace de hidrógeno (HBD, del inglés, Hydrogen Bond Donnor). En este sentido, dos sustancias que son sólidas a temperatura ambiente, forman una fase líquida a la temperatura de su punto eutéctico, mediante un proceso de equilibrio térmico, generándose sustancia líquida puede ser usada como disolvente para diversas aplicaciones. La mezcla de colina y urea (ChCl:U) (1:2 mol:mol) constituye uno de los ejemplos más representativos de los DESs, ya que es líquida a temperatura ambiente (punto de fusión de 12 °C), mientras que ambos compuestos por separado presentan

puntos de fusión de 302 y 133 °C, respectivamente. Tal como se observa en la siguiente Figura, el diagrama de fases que presenta una mezcla de ChCl / urea permite observar una caída en el punto de congelación de la composición eutéctica, como consecuencia de la interacción mediante enlaces de hidrógeno entre el grupo amida de la urea y la sal de amonio cuaternaria de la colina. El descenso en el punto de fusión de las mezclas eutécticas es debido a la baja energía reticular generada por la asimetría de las especies HBD y HBA que las conforman, mientras que las interacciones mediante enlaces de hidrógeno son las responsables del estado líquido que presentan a temperatura ambiente (Smith *et al.*, 2014).

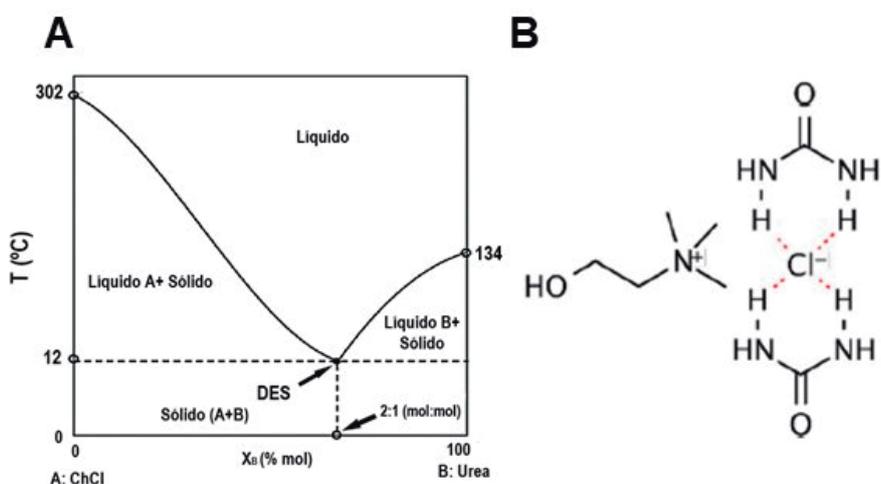


Figura 1.2. A) Diagrama de fases de una mezcla eutéctica profunda. B) Interacciones por enlace de hidrógeno entre ChCl y urea (1:2 mol:mol) en una mezcla eutéctica profunda (Patzold *et al* 2019).

La baja volatilidad y baja presión de vapor de los DESs son quizás las propiedades más importantes frente a los disolventes orgánicos convencionales, conjuntamente con su bajo punto de fusión, elevada estabilidad térmica y química, alta capacidad para disolver una gran variedad de sustratos, baja toxicidad y fácil biodegradabilidad, hace que se hayan convertido en objeto de estudio como medios de reacción y extracción sostenibles.

En función de los diferentes tipos y proporciones de los HBA y de HBD, han sido descritos una gran variedad de DESs con diferente composición y aplicaciones, destacando mayoritariamente aquellos constituidos por sales de amonio cuaternarias y ChCl. En la **Figura 1.3.** se muestran algunos ejemplos de HBA y HBD utilizados en la preparación de DESs, aunque también han sido descritos DES que contienen sales metálicas o hidratadas (Zhang *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2014).

Dado que, desde el punto de vista aplicado, los DES son considerados como excelentes disolventes verdes para una gran variedad de procesos químicos (p. ej. extracciones, catálisis, síntesis orgánica, etc.), la naturaleza renovable de sus constituyentes ha sido objeto de estudio (Ge *et al.*, 2017; Smith, 2013). En este sentido, el empleo de metabolitos primarios (p.ej. amino-azúcares) como HBDs en la preparación de DESs, ha permitido acuñar el término “disolventes eutécticos profundos naturales” (NADES, del inglés Natural Deep Eutectic Solvents), que se encuentran a alta concentración en los espacios confinados de los orgánulos subcelulares (About *et al.*, 2004). Este hecho ha permitido hacer hipótesis sobre el papel fisicoquímico de dichos constituyentes, pudiendo ser considerados como una fase líquida especial que participa activamente en fenómenos biológicos como la crioprotección, la resistencia a la deshidratación, etc. (Choi *et al.*, 2011). Tanto los DESs como los NADES son considerados como disolventes alternativos que mejoran la sostenibilidad de una gran cantidad de procesos químicos (Pena-Pereira y Namiesnik, 2014; Jenkin *et al.*, 2016), y biotecnológicos (Guajardo *et al.*, 2016, Gotor-Fernandez and Paul, 2019).

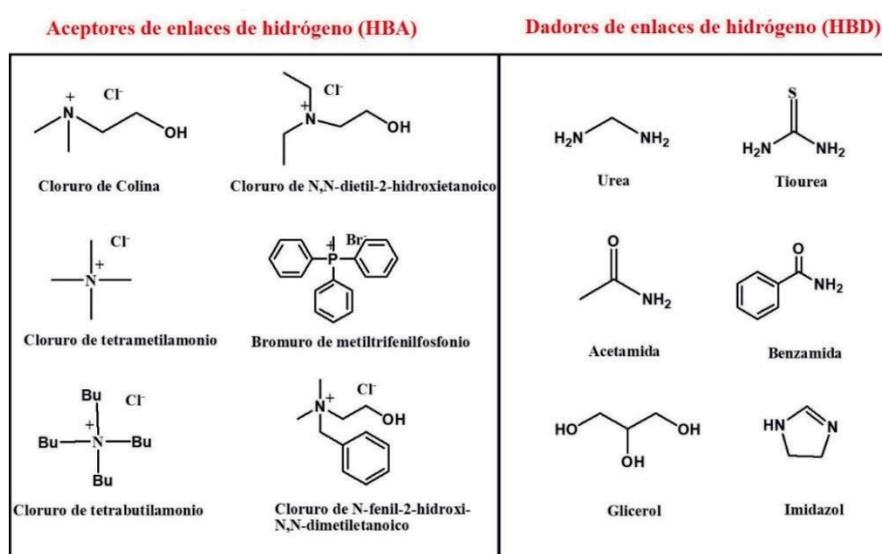


Figura 1.3. HBA y HBD comunes utilizados en la preparación de DES.

Sin embargo, tal como se ha explicitado anteriormente, el objetivo principal de la Química Verde va más allá de la sustitución de los disolventes nocivos por otros inocuos, ya que debe contemplar la correcta combinación de las diferentes “herramientas sostenibles” disponibles para llevar el concepto de sostenibilidad a su máxima expresión. Para ello, también es necesario que los procesos y transformaciones químicas se realicen

de modo eficiente, selectivo, minimizando la generación de subproductos, y teniendo en cuenta la facilidad para poder realizar el proceso de reciclado para la completa reutilización de todos los elementos que intervienen en una reacción química. En relación a la selectividad de las transformaciones químicas, la incorporación de (bio)catalizadores eficientes a estos sistemas neotéricos está siendo actualmente un campo de investigación fundamental para el desarrollo de procesos verdes de síntesis química (Lozano, 2010; Busacca *et al.*, 2011; Dominguez de Maria y Maugeri, 2011; Lozano *et al.*, 2015).

1.2. Líquidos Iónicos: Estructura y propiedades

Los líquidos iónicos son sales líquidas que presentan puntos de fusión inferiores a 100 °C, y que están constituidas exclusivamente por pares iónicos, normalmente con un catión de naturaleza orgánica y un anión de naturaleza inorgánica (Wasserscheid y Welton, 2008) (**Figura 1.4**). En función de la naturaleza de los iones que las constituyen, es posible modular sus propiedades físico-químicas como sustancias líquidas, ya que están diseñados de tal forma que dicha sal no quede empaquetada de un modo compacto, dificultando el proceso de cristalización, lo que permite su estado líquido en un amplio rango de temperatura, incluso a temperatura ambiente (Dupont *et al.*, 2002a, Dupont, 2004). En este punto es necesario distinguir entre los conceptos de “líquido iónico” y “disolución iónica”, ya que el primero hace referencia a sustancias iónicas en estado líquido, como son las sales fundidas (p.ej. NaCl calentado por encima de su temperatura de fusión a 801 °C), mientras que el segundo indica la disolución de sales (p.ej. NaCl) en disolventes moleculares (p. ej. H₂O).

Por su condición de compuestos iónicos, y no de compuestos moleculares, los líquidos iónicos han demostrado tener una combinación única de propiedades, por ejemplo, su baja presión de vapor, alta estabilidad térmica y gran capacidad solvente, lo que incide directamente en su carácter de disolventes medioambientalmente benignos, ya que no se evaporan nunca (Welton, 1999). Además, muchas de sus propiedades físico-químicas (p. ej. polaridad, solubilidad, miscibilidad, viscosidad, puntos de fusión, etc.) son fácilmente modulables en función de una adecuada selección de la naturaleza del catión y del anión. Por ello, son considerados como “disolventes verdes”, ya que el proceso de reciclado es posible mediante protocolos sencillos (Freemantle, 1998). Atendiendo a la estructura iónica, entre los cationes más utilizados se encuentran piridinio, imidazolio, amonio,

fosfonio y pirrolidonio, y algunos de los aniones más comunes son bis[(trifluorometil)sulfonyl]imida ($[\text{NTf}_2]^-$), trifluorometilsulfonato ($[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$), hexafluorofosfato ($[\text{PF}_6]^-$), tetrafluoroborato ($[\text{BF}_4]^-$) y haluros (p.ej. $[\text{Cl}]^-$, $[\text{Br}]^-$, etc), tal y como se puede observar en la **Figura 1.4**.

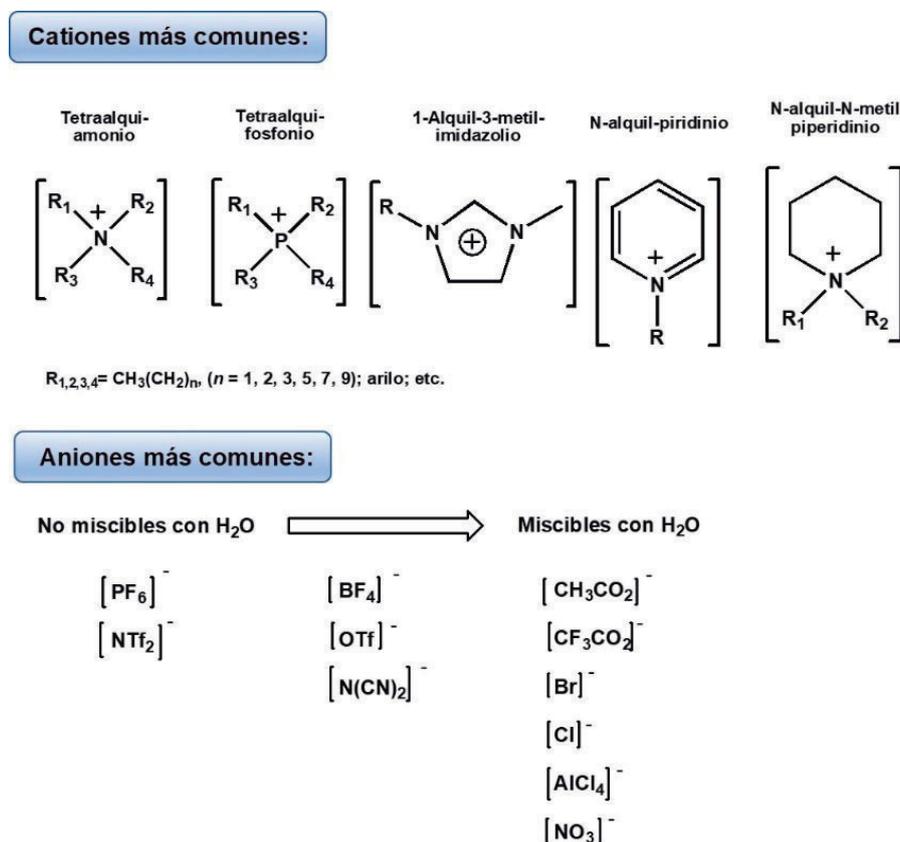


Figura 1.4. Algunas posibles combinaciones típicas de LIs

Además, es necesario destacar las propiedades genuinas que presentan los líquidos iónicos, ya que su estructura presenta un patrón de direccionalidad (“efecto entrópico”) debido a las interacciones por puente de hidrógeno y de apilamiento entre los iones, mientras que, en el caso de las sales tradicionales, éstas se encuentran formadas solo por enlaces iónicos (**Figura 1.5**) (Dupont, 2011). Para demostrar el patrón de dicho modelo estructural, existen diversos estudios de espectroscopía de rayos-X de sales de 1,3-dialquilimidazolio que han demostrado tener una tendencia típica, la cual consiste en la interacción iónica en las que las unidades monoméricas de catión imidazolio se encuentran rodeadas de al menos 3 aniones, y así sucesivamente. En concreto, los cationes orgánicos voluminosos, como es el caso del imidazolio, generan estructuras con disposiciones en 3D (Dupont, 2004).

En este mismo contexto, otros estudios centrados en la estructura de los LIs, a su vez, demuestran que algunos de ellos se encuentran como una nanoestructura continua de autoensamblaje, muy similar a una esponja anfífila. Un ejemplo representativo es el líquido iónico que tiene como catión el pirrolidinio, donde puede observarse un claro orden de la red nanoestructurada. Además, es importante destacar la influencia de la longitud de cadena alquílica de estos cationes, ya que cuanto mayor sea esta, los LIs presentan organización mediante la generación de bicapas, mientras que con cationes con menor longitud de cadena alquílica la disposición es mayoritariamente en monocapas (Smith *et al.*, 2013).

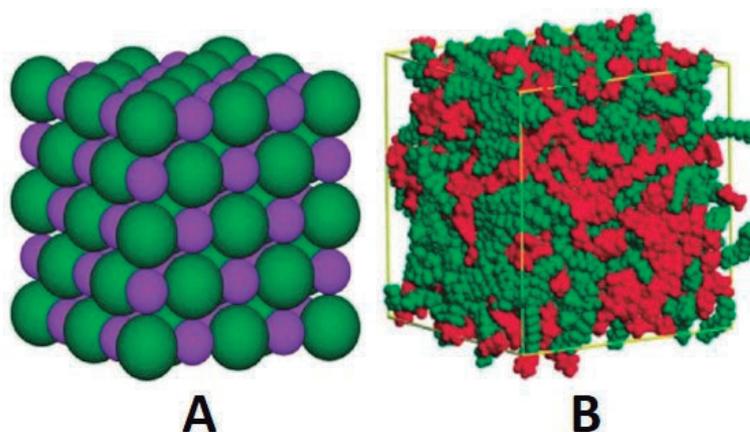


Figura 1.5. Representación esquemática de la estructura tridimensional de un cristal iónico que presenta orden estructural clásico (A) y un IL 1-alquil-3-metil-imidazolio (B) que muestra dominios apolares (verde) y polares (rojos) (Dupont, 2011).

A continuación, se describen las propiedades generales de los LIs:

a) Puntos de fusión: De forma general, los líquidos iónicos tienen puntos de fusión relativamente bajos, inferiores a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, y, en algunos casos, puntos de fusión inferiores a la temperatura ambiente. Este valor está directamente influenciado por el tamaño del anión y catión que constituye dicha sal, siendo el punto de fusión menor cuando mayor tamaño tenga el catión y anión. Otro factor importante a tener en cuenta es la simetría de los iones, ya que, como consecuencia de un mayor empaquetamiento entre especies iónicas, el punto de fusión aumenta. Un ejemplo relevante, donde el factor de la simetría se observa fácilmente, es el caso de las sales de 1,3-dietilimidazolio, en comparación con cationes análogos de sales asimétricas constituidas por 1-etil-3-metilimidazolio (Wasserscheid y Welton, 2008). Por otro lado, en los cationes imidazolio que tienen

sustituyentes alquilo, el incremento de la longitud de la cadena hidrocarbonada supone un aumento en el punto de fusión de ese líquido iónico como consecuencia, una vez más, del empaquetamiento entre las especies iónicas (Plechkova y Seddon, 2008).

b) Volatilidad: El punto de ebullición de los LIs no se puede determinar experimentalmente a presión atmosférica debido a su descomposición a temperaturas relativamente bajas. Sin embargo, ha sido posible demostrar que pueden ser destilados lentamente en torno a unos 200-300 ° C a presión reducida. Además de otras propiedades únicas que los convierte en disolventes neotéricos exclusivos, su baja volatilidad especialmente hace que sean una excelente herramienta alternativa al empleo de los disolventes orgánicos volátiles (Earle *et al.*, 2006).

c) Estabilidad térmica y química: Las técnicas de análisis gravimétrico (TGA) confirman que los LIs presentan una alta estabilidad térmica y química hasta temperaturas en torno a 350 °C, siendo dicho valor la temperatura inicial calculada para comienzo de la descomposición térmica. Además, los LIs también tienen elevada estabilidad electroquímica y química, la cual puede ser modulada en función de la naturaleza tanto del anión como del catión que conforman dicha sal (Poole, 2004).

d) Densidad: La densidad de los LIs es un parámetro que debe ser considerado a la hora de llevar a cabo su aplicación directa, ya sea como medio de reacción o como catalizador. Diversos estudios han demostrado que la gran mayoría de LIs tienen densidades superiores a los disolventes orgánicos tradicionales y al agua, oscilando su valor entre 1 a 1,6 g/mL (Wasserscheid y Welton, 2008). Una vez más, la influencia de la naturaleza iónica de estos disolventes neotéricos influye considerablemente, generando un aumento de densidad en aquellos líquidos iónicos en los que su estructura catiónica esté conformada por una mayor longitud de la cadena alquílica.

e) Viscosidad: Teniendo en cuenta los factores ingenieriles, el parámetro de viscosidad de los LIs puede afectar a las propiedades de transporte como la transferencia de masa o la difusión, lo que supone algunas dificultades operacionales en las reacciones catalíticas, por ejemplo, en sistemas de bombeo o mezclado. Generalmente, la viscosidad de casi todos los LIs es relativamente alta en comparación con cualquier otro disolvente clásico, cuyo valor oscila entre 66 hasta 1110 cP a 20-25 ° C (Wasserscheid y Welton, 2008). Además, este parámetro puede variar en función de la temperatura o la naturaleza de las especies iónicas, ya que, para el mismo catión y diferentes aniones ha sido posible

observar una variación relevante en el valor de medida de viscosidad (Bonhote *et al.*, 1996). Así, la disminución del tamaño del anión produce una disminución de las interacciones de Van der Waals, lo que aumenta la interacción electrostática mediante enlaces por puentes de hidrógeno. Sin embargo, la influencia del catión en la viscosidad es menor, donde es posible observar un aumento de la viscosidad a medida que aumenta la longitud de la cadena hidrocarbonada y las ramificaciones.

f) Polaridad: La polaridad se determina mediante los desplazamientos de los máximos de emisión de fluorescencia de un colorante solvatocrómico (rojo de Nilo), los cuales indican que los LIs tienen polaridad muy similar a la que presentan los disolventes orgánicos (p. ej. metanol, acetonitrilo, acetona, etc.) (Poole, 2004). Esta propiedad es una de las más relevantes que caracterizan a los LIs, convirtiéndolos en especies genuinas capaces de disolver una enorme variedad de compuestos químicos de diferente naturaleza. El concepto de polaridad asociada a los LIs es muy difícil de calcular con exactitud, y se trata de un estudio clave en diferentes investigaciones para determinar la influencia de estos compuestos en la solubilidad o velocidad de reacción. Por ello, los líquidos iónicos pueden describirse como sistemas nanoestructurados que tienen regiones polares y apolares capaces de disolver un amplio rango de solutos de diferente polaridad (Dupont *et al.*, 2002; Rantwikjk y Sheldon, 2007; Dupont, 2004).

g) Propiedades electroquímicas y conductividad: Los líquidos iónicos se pueden utilizar en procesos electroquímicos, ya que poseen propiedades como la estabilidad a la oxidación / reducción, buena conductividad eléctrica y altas ventanas electroquímicas (p. ej. la ventana electroquímica para los LIs suele ser de 5-6 V, mientras que para el agua es 1.23 V) (Koel, 2000).

h) Inflamabilidad: Los LIs son considerados como una “herramienta verde” alternativa al empleo de disolventes orgánicos volátiles, ya que estos compuestos no se evaporan y no son inflamables a temperatura ambiente o temperaturas superiores y pueden ser empleados como fuentes de calor (Wasserscheid y Welton, 2008).

i) Toxicidad y biodegradabilidad: Como se indica anteriormente, debido a las propiedades únicas que tienen los líquidos iónicos, estos son considerados como compuestos “benignos” sustituyentes a los disolventes moleculares convencionales. Sin embargo, su carácter verde y respetuoso con el medioambiente ha sido puesto en duda en diversas ocasiones, como consecuencia principalmente del riesgo sobre el ecosistema.

Además, se han llevado a cabo numerosos estudios de toxicidad de algunos LIs basados en cationes de imidazolio, los cuales demuestran que un aumento de la longitud de la cadena alquílica supone un aumento en la toxicidad, mientras que, la naturaleza aniónica apenas tenía influencia en la toxicidad de los LIs. Teniendo en cuenta los valores obtenidos, es importante considerar la velocidad de degradación de los mismos y la persistencia en el medioambiente y en los ecosistemas acuáticos (Romero-Salvador, 2008).

1.3. Biocatalizadores y Líquidos Iónicos

1.3.1. Lipasas: estructura y propiedades

Las enzimas constituyen claramente las herramientas ecológicas y sostenibles más poderosas y eficientes para catalizar una enorme cantidad de reacciones químicas debido a su actividad y selectividad (Klibanov, 2001; Patel, 2001). Sin embargo, sustituir los medios acuosos naturales por disolventes no acuosos como medio de reacción no es una tarea fácil, ya que la conformación nativa de las enzimas puede destruirse con relativa facilidad y provocar su desactivación. No obstante, el agua es el componente clave en todos los medios no convencionales debido a las interacciones enzima-agua, las cuales mantienen la conformación activa de la proteína en cuestión (Bommarius y Riebel, 2004).

Las enzimas son proteínas, macromoléculas poliméricas que tienen una secuencia única de aminoácidos que presentan una alta organización estructural en tres dimensiones conocida como conformación. La conformación nativa de una proteína se forma mediante interacciones intramoleculares (p. ej. enlaces por puentes de hidrógeno, enlaces Van der Waals, etc.), así como interacciones con otras moléculas como el agua (Li y Cirino, 2014). Las enzimas son polímeros de aminoácidos con una estructura tridimensional definida que le permite llevar a cabo funciones catalíticas en medios acuosos de los seres vivos en condiciones suaves de temperatura, pH o presión. Por ello, fuera de las condiciones de ambiente en las que se desarrolla la vida, las enzimas presentan una pérdida de su conformación estructural nativa que supone el despliegue de la proteína y, por lo tanto, la desactivación enzimática.

En medios totalmente anhidros, las proteínas son completamente inactivas y es necesario preservar una cantidad crítica de agua para que cumplan con su función.

Algunas investigaciones han demostrado que las proteínas solo alcanzan una actividad completa cuando la cantidad de agua que solvata a la proteína tiene aproximadamente la misma masa que la enzima en cuestión (Frauenfelder *et al.*, 2009). En este sentido, los disolventes hidrofóbicos ofrecen mayor actividad enzimática que los disolventes de naturaleza hidrofílica, ya que estos tienen tendencia a retirar algunas moléculas de agua esenciales para la enzima (Klibanov, 2001). Así, el parámetro actividad del agua (A_w) ha sido considerado como un parámetro clave para determinar el correcto grado de hidratación de las enzimas en los disolventes no acuosos (Halling, 1994).

Atendiendo a la estructura proteica, las enzimas suelen plegarse dejando los residuos no polares en un núcleo hidrofóbico, mientras que las regiones de la cadena polipeptídica rica en aminoácidos polares tienden a situarse en la superficie, en contacto directo con las moléculas de agua que la solvatan. En este sentido, ha sido descrito un fenómeno de “memoria”, que ocurre cuando una enzima es liofilizada en un entorno acuoso a un determinado pH. En dichas condiciones, la enzima adoptará una determinada conformación estructural que es mantenida cuando se la sitúa en un sistema hidrofóbico anhidro, ya que su estructura queda “atrapada” en la conformación inicial a la que fue liofilizada, como consecuencia de la baja constante dieléctrica del medio, y rodeada de una capa de hidratación residual de dicho proceso de liofilización, y que es esencial para su actividad catalítica en el entorno no acuoso. En un entorno hidrofóbico no miscible con agua, este hecho determina una intensificación de las interacciones electrostáticas intramoleculares que llevan a cabo el mantenimiento de la estructura tridimensional de la proteína, lo que aumenta considerablemente su estabilidad, y permite la verificación de nuevas actividades catalíticas (p. ej. las hidrolasas pueden catalizar reacciones de síntesis) (Klibanov, 2001; Fitzpatrick *et al.*, 1993).

Entre las seis clases de enzimas reconocidas por las IUB (oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas), las hidrolasas son las que han recibido mayor atención debido a la posibilidad de catalizar una gran cantidad de reacciones (p. ej. hidrólisis de ésteres, amidas, epóxidos, etc.), y de nuevas reacciones de formación de enlaces reversibles (p. ej. esterificación, amidación, transesterificación, etc.), en función del medio de reacción y las condiciones seleccionadas.

Las lipasas pertenecen a la clase de enzimas hidrolasas y actúan sobre enlaces éster (E.C.3.1) de ésteres carboxílicos (E.C.3.1.1), siendo una de las enzimas más utilizadas en los procesos biocatalíticos debido a su elevada actividad, enantioselectividad y

regioselectividad de su centro activo en el reconocimiento de los sustratos. En este contexto, la gran mayoría de lipasas derivan de microorganismos (p. ej. *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor mihei*, etc) (Fernandez-Lafuente, 2010; Perez *et al.*, 2010), y se encuentran comercializadas a nivel industrial por diversas empresas (p.ej. Novo, Rohm GmbH, etc.), como consecuencia del elevado número de aplicaciones técnicas que permiten (p. ej. detergentes, combustibles, etc). Además, esta clase de enzimas ofrecen enormes ventajas en una gran cantidad de reacciones químicas, ya que son capaces de catalizar muchas de ellas en sistemas con una bajísima o nula concentración de agua. De manera satisfactoria, se ha demostrado la estabilidad de hidrolasas tanto libres como inmovilizadas en medio acuoso, pero también en disolventes orgánicos y neotéricos, incluyendo los LIs, los fluidos supercríticos y los DES.

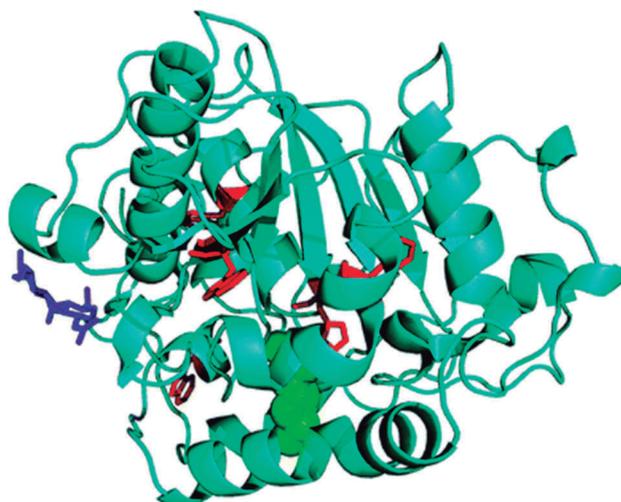


Figura 1.6. Modelado estructural basado en la estructura cristalina de CALB (Rabbania *et al.*, 2015)

La lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) es un biocatalizador muy eficiente para la hidrólisis de ésteres en presencia de agua, así como para la síntesis de ésteres, mediante esterificación o transesterificación, en medios no acuosos. Esta enzima es de gran interés para su uso en aplicaciones industriales debido a su alta enantioselectividad, amplio rango de reconocimiento de diferentes sustratos, elevada estabilidad frente a diversos tipos de disolventes no acuosos, y una alta estabilidad térmica. La levadura de *Candida antarctica* fue aislada en la Antártida y se demostró que era capaz de producir dos variantes de lipasa (CALA y CALB) (Anderson *et al.*, 1998; Kirk y Christensen, 2002). Su estructura fue resuelta por Uppenberg *et al.* (1994) y, como la mayoría de las lipasas posee una

estructura que sigue un patrón común, sobre la base de una lámina β central compuesta por más de 8 hebras β paralelas, unidas entre sí mediante 6 hélices α (**Figura 1.6**) (Lawson *et al.*, 1994). En el caso concreto de la CALB, esta pertenece a la clase de α/β hidrolasas-plegadas y está compuesta por 317 aminoácidos con un peso molecular de 33 kDa.

Las lipasas son enzimas que poseen un centro activo con un bolsillo hidrofóbico y un residuo catalítico que es esencial para su acción. Su mecanismo de reacción está basado en la formación de un complejo covalente de geometría tetraédrica entre dicho residuo de Ser y un acilo (Complejo acil-enzima), desde el cual se transfiere dicho acilo a un nucleófilo (p. ej. agua, alcohol, amina, etc.) que se encuentre alojado en su centro activo. Es por ello que, en función de la naturaleza de dicho nucleófilo, la reacción catalizada será la hidrólisis de un éster, una esterificación, una amidación, transesterificación, etc. (Ver **Figura 1.7**). Con la ruptura de intermedio covalente acil-enzima, la enzima queda lista para una nueva acción catalítica. Es necesario destacar, que el bolsillo hidrofóbico que constituye el centro activo de la CALB posee unas características tales que es capaz de alojar preferencialmente a uno de los dos isómeros de una mezcla racémica, razón por la que las reacciones anteriormente citadas pueden verificarse a modo de resolución cinética (Lozano *et al.*, 2017). En este sentido, el diseño apropiado del medio de reacción, la excelente idoneidad de las enzimas y las condiciones seleccionadas son fundamentales para llevar a cabo transformaciones biocatalíticas en medios no acuosos (Sheldon y Pereira, 2017). Por ello, en los últimos años y tras sucesivas investigaciones, se ha logrado una mejora en la actividad, estabilidad y especificidad de las enzimas, así como las aplicaciones industriales de las mismas (Perez-Sanchez *et al.*, 2013; Molina-Espeja *et al.*, 2016).

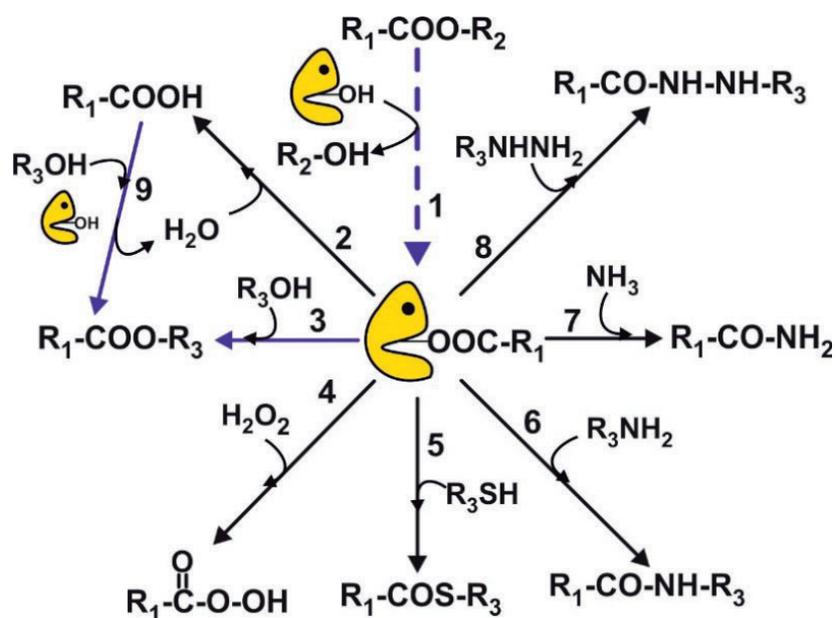


Figura 1.7. Reacciones químicas catalizadas por serina-hidrolasas. 1. Formación de la especie intermedia acil-enzima; 2. Hidrólisis; 3. Transesterificación; 4. Perhidrólisis; 5. Tíolisis; 6. Aminólisis; 7. Aminólisis; 8. Hidrazinólisis; 9. Esterificación (Lozano *et al.*, 2017).

No obstante, la sustitución del agua como medio de reacción por otro tipo de disolvente no acuoso, con el fin de llevar a cabo procesos biocatalíticos sintéticos catalizados por hidrolasas (p. ej. lipasas) de un modo eficientemente no es una tarea fácil. Tal como se representa en la **Figura 1.8**, generalmente los disolventes hidrofílicos miscibles con agua son capaces de eliminar la capa esencial de agua que envuelve a la estructura de la enzima, lo que genera un cambio en la estructura tridimensional de la proteína, que suele estar asociado a una pérdida de su función catalítica, lo que conlleva a la desactivación del biocatalizador. Sin embargo, los disolventes hidrofóbicos no miscibles con agua suelen permitir una mayor actividad enzimática, como consecuencia de la preservación de dicha capa esencial de agua que la enzima necesita para cumplir con su función de forma eficiente, quedando atrapada en su estado conformacional nativo (**Figura 1.8**) (Lozano *et al.*, 2013, 2015). En este contexto, las hidrolasas aceleran tanto la reacción directa como la inversa en el mismo grado debido a la reversibilidad del equilibrio, cambiando la velocidad. La posición del equilibrio determina por sí sola un enlace particular (p. ej. éster, tioéster, amida, etc.) que se genera o destruye preferentemente en una reacción catalizada por hidrolasa dada (Perez *et al.*, 2010).

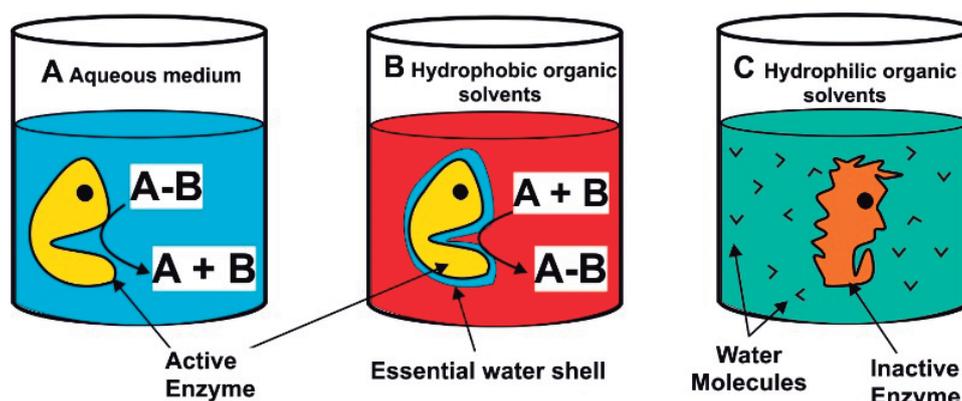


Figura 1.8. Representación esquemática del papel del agua en las transformaciones enzimáticas y en la estructura de las proteínas en diferentes medios de reacción. **A)** Medios acuosos; **B)** Disolventes orgánicos hidrofóbicos; **C)** Disolventes orgánicos hidrofílicos (Lozano *et al.*, 2017).

Sin embargo, con el fin de preservar la conformación nativa de las enzimas de la agresión en su estructura que suponen los medios no acuosos de reacción, es necesario indicar que la inmovilización enzimática es otro factor clave para llevar a cabo transformaciones biocatalíticas de forma eficiente y con alto rendimiento en los procesos de interés industrial. En este sentido, existen diferentes métodos para la inmovilización, siendo un ámbito ampliamente estudiado (p. ej. unión a soportes sólidos, atrapamiento en matrices poliméricas orgánicas o inorgánicas, hidrogeles, reticulación de moléculas enzimáticas, etc.), de manera que la unión de la enzima a los soportes proporcione un biocatalizador activo y estable para procesos operativos a largo plazo (Sheldon y van Pelt, 2013). Además, los procesos de inmovilización de enzimas también proporcionan otras ventajas, como la fácil separación del producto, evitando cualquier tipo de contaminación, además de una fácil recuperación del biocatalizador al estar incorporado en una fase diferente, permitiendo tanto su reutilización, como el desarrollo de procesos biocatalíticos en flujo. Es por todo ello que las enzimas son consideradas como herramientas muy poderosas y sostenibles, capaces de aportar una alta selectividad a las transformaciones químicas que catalizan, lo que constituye un importante impulso a la sostenibilidad de los procesos, en particular mediante su desarrollo en continuo (Lozano *et al.*, 2015; Garcia-Verdugo *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016; Lozano, 2010).

1.3.2. Enzimas en líquidos iónicos: actividad enzimática y estabilidad

En el año 2000, dos grupos de investigación demostraron por primera vez la idoneidad de los líquidos iónicos para llevar a cabo transformaciones químicas catalizadas por enzimas (Erbeldinger *et al.*, 2000; Madeira *et al.*, 2000), siendo desde entonces un punto

de atención clave en numerosas investigaciones. En este sentido, múltiples reacciones con diferentes enzimas (p. ej. lipasas, deshidrogenasas, glicosidasas, etc.) se han llevado a cabo en líquidos iónicos como medio de reacción, debido a la capacidad de estos para disolver numerosos compuestos de diferente polaridad (Rantwijk y Sheldon, 2007; Sureshkumar y Lee, 2009).

A modo de ejemplo, se ha demostrado la capacidad que tienen las lipasas inmovilizadas para llevar a cabo la transesterificación asimétrica de un alcohol alílico (*rac*-5-fenil-1-penten-3-ol) con acetato de vinilo en diferentes líquidos iónicos, demostrando la excelente idoneidad de los líquidos iónicos inmiscibles en agua para los procesos biocatalíticos (p. ej. [Bmim][NTf₂], [Bmim][PF₆], etc.). Por el contrario, se demostró que los líquidos iónicos miscibles en agua (p. ej. [Bmim][TFA], [Bmim][TfO], etc.) conducen a la desactivación de la enzima. La capacidad de estos sistemas nanoestructurados para retener a la enzima y anclarla en la red del líquido iónico, permite la reutilización de la misma, y la recuperación de los productos mediante la extracción líquido-líquido mediante el empleo de disolventes orgánicos como el éter etílico (Itoh *et al.*, 2001).

Así pues, diferentes investigaciones se centran en la idoneidad de los líquidos iónicos como medios de reacción para llevar a cabo transformaciones químicas de manera selectiva catalizadas por enzimas (Lozano, 2010; Dominguez de Maria, 2012; Lozano *et al.*, 2015), las cuales revelan la excelente actividad de los biocatalizadores en diferentes tipos de líquidos iónicos (Naushad *et al.*, 2012), y el desarrollo de nuevos procesos sostenibles integrados para llevar a cabo simultáneamente procesos de biotransformación y de separación de los productos (Villa *et al.*, 2019). Además, debido al carácter higroscópico de los líquidos iónicos no miscibles con agua es posible mantener la capa de hidratación esencial alrededor de las enzimas, generando una mejora de la estabilidad operacional y actividad catalítica (Kumar *et al.*, 2017). Este fenómeno de protección y estabilización fue demostrado en el estudio de diferentes enzimas (p. ej. quimiotripsina (De Diego *et al.*, 2004), CALB (Lau *et al.*, 2004), celulasa (Turner *et al.*, 2003), etc.) en varios líquidos iónicos (p. ej. [Bmim][NTf₂], [Bmim][Cl], etc.) mediante dicroísmo circular, FT-IR y estudios de fluorescencia. Sin embargo, el empleo de líquidos iónicos miscibles en agua genera la rápida desactivación de las enzimas, debido a la eliminación de las moléculas de agua esenciales que preservan la conformación nativa de la misma,

por lo que la concentración del LI se trata de un parámetro fundamental que va a influir enormemente en las reacciones catalizadas por enzimas (Shipovskov *et al.*, 2008).

Como se menciona anteriormente, la estabilización observada de las enzimas en los líquidos iónicos puede ser atribuida a la inclusión en los huecos hidrofílicos de la red, donde quedan rodeadas por una red iónica fuerte. Asimismo, la estructura molecular extremadamente ordenada que tienen los líquidos iónicos en fase líquida podría actuar como un “molde”, lo que promueve la permanencia de la estructura tridimensional de la enzima, favoreciendo de este modo su actividad catalítica.

Así, se han podido realizar estudios estructurales realizados sobre la enzima CALB suspendida en líquidos iónicos no miscibles con agua mediante dicroísmo circular y fluorescencia. Dichos estudios han permitido demostrar que dicha enzima mostró una conformación muy similar a la que presentaba en medio acuoso, aunque con una ligera disminución del porcentaje de hélice α y un ligero aumento del contenido en lámina β , mientras la cantidad de estructura desordenada permaneció prácticamente igual a la obtenida en medio acuoso. Esencialmente, los líquidos iónicos no miscibles con agua fueron capaces de mantener la conformación flexible de la enzima CALB, que le permitía realizar su actividad catalítica de un modo eficiente en dichos líquidos iónicos (De Diego *et al.*, 2005; Lozano, 2010).

1.4. Los líquidos iónicos en el desarrollo de procesos químicos sostenibles

La aplicación de los principios de la química verde y, especialmente, el desarrollo de nuevos biocatalizadores altamente eficientes ha impulsado a la mejora de los procesos químicos sostenibles, contribuyendo en la construcción de una industria más limpia (Scholten *et al.*, 2012; Dhakshinamoorthy *et al.*, 2018; Sheldon y Woodley, 2018; Lozano *et al.*, 2015). Estos enfoques no solo requieren la preparación de los productos, independientemente de su complejidad, sino también de todo el proceso en su conjunto, incluyendo la separación y purificación del producto, la recuperación y reutilización de los catalizadores y medios de reacción, el consumo de energía, la toxicidad de los disolventes y reactivos, etc. Los disolventes proporcionan una contribución muy importante al desempeño ambiental de los procesos químicos en términos de salud, seguridad o impacto en el aire, agua y la tierra, pero también definen el costo del proceso (Jiménez-González, 2019).

En este sentido, mediante la combinación de (bio)catalizadores selectivos para llevar a cabo transformaciones químicas, junto con las propiedades únicas que aportan las tecnologías de los LIs, se pueden generar sinergias para el desarrollo de procesos químicos más limpios, donde la completa recuperación de todos los elementos de reacción, incluido el LI es un factor clave (Lozano, 2018). Las propiedades genuinas de los LIs se han aprovechado para diseñar procesos que integran la transformación (bio)catalítica de sustrato con la separación eficiente y selectiva de los productos, así como la recuperación y reutilización completa del LI y del catalizador utilizado, mediante protocolos sencillos (**Figura 1.9**). No obstante, la bajísima volatilidad que tienen los LIs con respecto a la alta presión de vapor de muchos compuestos moleculares, se puede aprovechar para el diseño de sistemas integrados de reacción / separación basados en la tecnología de membranas (**Figura 1.9 A**) (Gubicza *et al.*, 2003). Además, su comportamiento de fase en presencia de disolventes moleculares en estados líquidos o supercríticos también han sido clave para el desarrollo de sistemas integrados con enfoques de separación basados en sistemas multifásicos. Como se menciona anteriormente, la inmiscibilidad de los LIs en muchos disolventes líquidos moleculares como el octano o hexano, se ha estudiado en el diseño de dispositivos de microfluidos (**Figura 1.9 B**) (Yao *et al.*, 2018) y las emulsiones Pickering (**Figura 1.9 C**) como herramientas que facilitan y mejoran los procesos reacción y separación integrados. Por otro lado, es importante destacar que los LIs y el scCO₂ forman sistemas bifásicos bajo un amplio rango de presión y temperatura. El scCO₂ es altamente soluble en la fase de LI, mientras que, el LI no es mensurablemente soluble en la fase supercrítica (Blanchard *et al.*, 1999; Blanchard *et al.*, 2001). Esta compatibilidad genuina de los LIs con el scCO₂ también pudo observarse en el caso de los LIs unidos a covalentemente a polímeros sólidos (Supported Ionic Liquids Like Phase, SILLPs) (Lozano *et al.*, 2010) utilizados para el diseño de sistemas catalíticos de flujo continuo los cuales integran etapas de transformación y separación (**Figura 1.9 D**) (García-Verdugo *et al.*, 2015). Por otro lado, los LIs hidrofóbicos basados en cationes con larga longitud de cadena alquílica son sólidos a temperatura ambiente y se comportan como sistemas similares a esponjas (SLIL). Estos LIs han demostrado ser excelentes medios de reacción para transformaciones biocatalíticas a temperaturas superiores a su punto de fusión, los cuales permiten la fácil separación de productos puros mediante protocolos sencillos de centrifugación / filtración para el sistema de reacción sólido obtenido después del enfriamiento (**Figura 1.9 E**) (Lozano *et al.*, 2015).

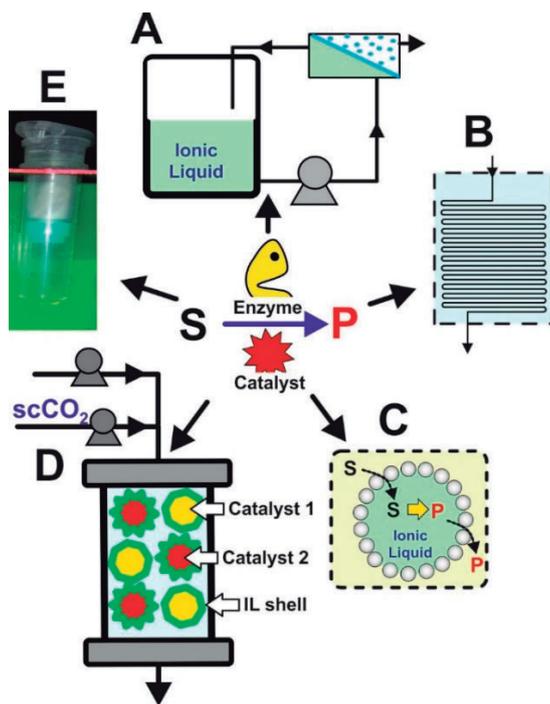


Figura 1.9. Representación esquemática de varios enfoques que utilizan IL como una herramienta habilitadora para integrar procesos de reacción / separación. A) reactores de membrana; B) dispositivos de microfluidos; C) microsistemas de emulsión Pickering de gotitas; D) reactores bifásicos IL / $scCO_2$ que utilizan fases IL admitidas; y E) LI de tipo esponja (Villa *et al.*, 2019).

1.4.1. Sistemas (bio)catalíticos multifase basados en la tecnología de los LIs

El concepto de sistemas (bio)catalíticos multifásicos se basa en el empleo de (bio)catalizadores inmovilizados, mientras que los sustratos y productos residen en gran parte en otra fase líquida, gaseosa o supercrítica. El enfoque de dos fases para llevar a cabo una transformación química determinada implica la suspensión de un (bio)catalizador inmovilizado sobre un soporte sólido en una fase líquida la cual contiene a los sustratos. La fase de catalizador se puede recuperar completamente mediante técnicas simples de decantación o filtración, lo que permite la separación y aislamiento del producto puro y la recuperación del catalizador utilizado (Altava *et al.*, 2018). En el caso de los LIs, sus propiedades disolventes y, en consecuencia, su miscibilidad / inmiscibilidad con sustancias y disolventes adicionales pueden ajustarse en función de la elección y la combinación adecuada del anión y catión que forman la estructura tridimensional del LI en cuestión. Esta interesante propiedad ha sido ampliamente utilizada para el desarrollo de sistemas bifásicos de LI, facilitando los procesos de reacción y separación. En este sentido, es importante destacar la relativa facilidad para obtener líquidos iónicos que no son miscibles con la gran mayoría de disolventes

orgánicos hidrofóbicos, como el hexano, octano, etc. A modo de ejemplo representativo, la oxidación selectiva de alcoholes a aldehídos y cetonas mediante el uso de un catalizador de rutenio en [Bmim][NTf₂] (Farmer y Welton, 2002), o la resolución cinética de 5-fenil-1-penten-3-ol catalizada por lipasa en [Bmim][PF₆] (Itoh *et al.*, 2002).

En los procesos de biocatálisis y separación de productos, el uso de sistemas bifásicos acuosos termorreversibles (ABS) representa una interesante alternativa (Passos *et al.*, 2016). En estos sistemas, la fase orgánica se reemplaza por un disolvente menos tóxico como el agua. Bajo ciertas condiciones, el ABS genera una mezcla homogénea con los reactivos y productos a la temperatura de reacción y se puede separar fácilmente de ellos a una temperatura diferente. Algunas mezclas de LI / disolventes acuosos tienen una temperatura de solución crítica superior, mientras que otras muestran una temperatura inferior (Silva *et al.*, 2017; Fukumoto *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que estas transiciones de fases dependientes de la temperatura son enormemente ventajosas en la preparación selectiva de proteínas, metales y catalizadores (Passos *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017). Por ejemplo, un ABS constituido por un LI *zwitteriónico* basados en amonio (p. ej. N, N, N-tripentil-3-sulfonil-1-propanoamonio) y polímeros como polietilenglicol, se comporta como un medio homogéneo a temperatura ambiente, adecuado para la oxidación del ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico catalizado por lacasas. En este experimento, se observó como un aumento de la temperatura hasta los 40 °C permitió cambios en el comportamiento de las fases, dando lugar a la formación de un sistema bifásico, lo que hizo posible la separación completa de la enzima de los productos obtenidos en una sola etapa. Así, los productos quedan en la fase de polietilenglicol, mientras que la fase de LI (fase inferior) contenía la enzima, y podría reutilizarse posteriormente en otro ciclo catalítico sin la pérdida de actividad (Ferreira *et al.*, 2018).

En este contexto, es importante mencionar las dos limitaciones para algunos de los ABS. En primer lugar, la eficacia de la recuperación completa del LI puede estar limitada por el reparto ineficaz de este y / o el catalizador entre las dos fases. Sin embargo, este proceso puede ser optimizado mediante el estudio de modelos termodinámicos y el diseño de sistemas acuosos de dos fases basados en LI, pero constituye una limitación que puede obstaculizar la recuperación cuantitativa del catalizador. Además, incluso cuando la separación de la fase acuosa del LI es altamente eficiente, este proceso podría implicar el empleo de disolventes orgánicos para la extracción adicional de los productos en la fase líquida, por lo que disminuye la sostenibilidad del proceso en general. En la búsqueda de

sistemas multifásicos más eficientes, cabe destacar las emulsiones de Pickering, las cuales erradican por completo el empleo de disolventes tradicionales y de tensioactivos (Pera-Titus *et al.*, 2015).

En el caso de los líquidos iónicos, Yang *et al.* han demostrado que es posible generar gotas de emulsión de LI en aceite mediante la emulsificación de disolventes no polares inmiscibles como fase oleosa (p. ej. alcanos o hidrocarburos aromáticos) y nanopartículas (p. ej. nano-esferas de sílice modificadas con dimetildiclorosilano) como emulsiones sólidas (Zhang *et al.*, 2017). De este modo, los LIs tanto hidrofóbicos como [Bmim][NTf₂] o hidrofílicos como [Bmim][BF₄], forman emulsiones de Pickering, donde cada gota se considera como un microrreactor con el LI atrapado en el interior, y las partículas emulsionantes cubriendo la superficie de las gotas (**Figura 1.10**). En este caso, las gotas de LI permanecen inalteradas sin agregarse, y se emplean como bloques de construcción para el diseño de un sistema de flujo continuo. Para ello, es necesario el empleo de una columna empaquetada con las gotas, con un filtro de poro de una micra instalado en la parte inferior de la columna, de modo que sea posible el desarrollo de este sistema de flujo continuo. Así, el producto disuelto en la fase oleosa fluye de forma continua a través de las “gotitas”, donde el catalizador queda encapsulado en la fase de LI (**Figura 1.10**.) A modo de ejemplo, un reactor de lecho compacto con gotas de LI se ha diseñado para la resolución cinética de diferentes aminas y alcoholes catalizada por CALB en la fase [Bmim][PF₆], proporcionando alcohol 1-feniletílico con una alta enantioselectividad (99% ee) y una actividad específica de 5,18 U mg⁻¹, que es significativamente mejor en comparación con la reacción discontinua (0,21 U mg⁻¹) y (16,5% ee después de 12 horas en [Bmim][PF₆]). Así, el sistema demostró una excelente estabilidad a largo plazo para la transesterificación enantioselectiva de alcohol 1-feniletílico, hasta 4000 horas sin ninguna pérdida de la fase LI.

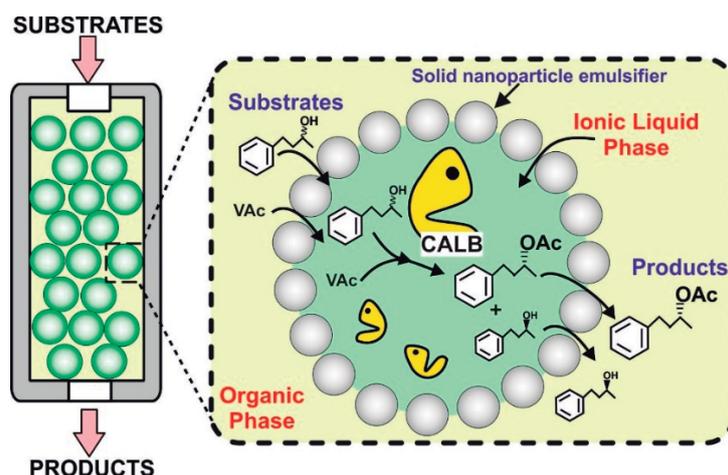


Figura 1.10. Representación esquemática de un flujo continuo basado en gotas de IL sistema en disolventes orgánicos, utilizado para la resolución cinética catalizada por lipasa de fenil-2-butanol (Zhang *et al.*, 2017).

Además, diferentes investigadores también han desarrollado sistemas basados en gotas de emulsión de Pickering mediante híbridos líquido-sólido con la preparación de una capa de sílice alrededor de cada gota de LI, lo que conlleva a la encapsulación de la fase de LI que contiene el catalizador libre. Este diseño ofrece la ventaja de la fácil recuperación del LI (Zhang *et al.*, 2019). Algunos ejemplos relevantes son la resolución cinética de alcoholes racémicos con enzimas, la apertura de epóxidos catalizada por complejos de Cr (III), etc., generando mejoras en las actividades catalíticas, así como un aumento de la estabilidad operacional.

No obstante, estos sistemas son considerados como una metodología novedosa para la separación y recuperación continua de la fase LI, pero desde el punto de vista de la sostenibilidad, existen algunas desventajas, entre las cuales se incluye nuevamente el empleo de disolventes orgánicos como el octano en grandes cantidades. Alternativamente, se ha utilizado agua como disolvente para la formación de las gotas de LI de tamaño nanométrico, similares a las microemulsiones de agua en aceite (Gao *et al.*, 2006). La microemulsión ([Bmim][PF₆] / H₂O) se empleó exitosamente como sistema de reacción para llevar a cabo la esterificación de fitoesteres con ácidos grasos utilizando la lipasa de *Candida rugosa* como sistema biocatalítico, quedando dicha enzima encapsulada en la microemulsión durante al menos 168 horas con una actividad catalítica sin ninguna alternación. Sin embargo, una vez más, fue necesario el empleo de un disolvente orgánico volátil para la separación del producto.

Como ya se ha comentado anteriormente, el empleo de $scCO_2$ como sustituyente a otros disolventes clásicos, permite el desarrollo de nuevos procesos de extracción de un modo sostenible (Keskin *et al.*, 2007). El dióxido de carbono en estado supercrítico es altamente soluble en la fase de LI, y es capaz de extraer los compuestos que previamente hayan sido disueltos en el mismo. Sin embargo, no es posible demostrar el mismo comportamiento del LI en el fluido supercrítico en cuestión (Blanchard *et al.*, 1999; Blanchard *et al.*, 2001). Este fenómeno único de fases de LI y $scCO_2$ proporciona sistemas bifásicos muy útiles para la (bio)catálisis, los cuales ofrecen nuevas oportunidades para el desarrollo de procesos verdes integrados de transformación química, así como la extracción de los productos y la reutilización del LI en una sola etapa (**Figura 1.11**).



Figura 1.11. Esquema general para procesos de separación de reacción integrados en sistemas bifásicos LI / $scCO_2$

Otro ejemplo representativo de alguno de los procesos catalíticos basados en LI / $scCO_2$, es la hidrobtoración de alquinos terminales e internos catalizados por complejos de Rutenio (Szyling *et al.*, 2018). Utilizando 1 % molar de catalizador en [EMPyrr][OTf] / $scCO_2$, la reacción de hidrobtoración de fenil-acetileno con pinacol-borano se lleva a cabo con una alta eficiencia y, el producto se extrae en la fase supercrítica directamente sin el uso de ningún disolvente orgánico. Así, el complejo metálico de Rutenio se mantuvo activo durante 8 ciclos a 40 °C, lo que lo convierte en uno de los sistemas más eficientes y mayormente empleado en la hidrobtoración de alquinos, a diferencia de otros protocolos estándares que emplean temperaturas en torno a 100 °C

Otro ejemplo importante es la reacción de acoplamiento y separación del sistema bifásico LI / $scCO_2$ para la síntesis de hidroximetilfurfural (HMF) a partir de fructosa (Shi *et al.*, 2016). En este estudio, la miscibilidad de una mezcla de LI y un disolvente orgánico

se pudo ajustar con CO₂ como un “interruptor de separación de fases”. De este modo, cuando se incorpora CO₂ en el reactor, la mezcla totalmente miscible de LI / disolvente orgánico se separa en dos fases, y el scCO₂ queda disuelto en ambas. Con respecto a los reactivos y el catalizador, estos permanecen mayoritariamente en la fase LI y el producto se extrae de forma continua en la fase orgánica, obteniendo hasta un 84% de rendimiento. En comparación con el diseño de otros sistemas análogos, este sistema de acoplamiento de reacción / separación bifásica conmutable es más eficiente para la síntesis de HMF (Hiraga *et al.*, 2018).

Los sistemas LI / scCO₂ se pueden combinar también con algunas plataformas catalíticas adicionales para el desarrollo de síntesis divergente, implementado en la preparación de α -cianoaminas y éteres de trimetilsililo de cianohidrina a partir del mismo alcohol alílico sin la necesidad de etapas purificación (Peris *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta la mejora de la separación de los productos y la recuperación del LI, la inmovilización del LI sobre un soporte recibe especial interés (Lozano, 2018). Dicha inmovilización se puede realizar mediante absorción del propio LI sobre la superficie de un material poroso (fases de LI soportadas, SILLP) mediante impregnación o, de forma alternativa, por encapsulación del LI durante la síntesis en un material poroso (ionogel) (Fehrmann *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017). Cabe destacar que los sistemas SILLP / scCO₂ permiten el desarrollo de procesos biocatalíticos totalmente verdes en sistemas no acuosos, donde las reacciones biocatalíticas se producen en la fase de LI soportado, mientras que los sustratos permanecen en la fase supercrítica (**Figura 1.12.**). Estos sistemas generan efectos sinérgicos entre el SILLP y el sistema supercrítico, ya que tienen las ventajas clásicas de los fluidos supercríticos para extraer, disolver y transportar sustancias, y la capacidad de los LI para estabilizar a la enzima (Lozano *et al.*, 2002; Itoh, 2017).



Figura 1.12. Representación de un sistema bifásico SILP / scCO₂ utilizado para la resolución cinética dinámica de rac-1-feniletanol realizada mediante el uso de propionato de vinilo (VPr) como donante de acilo, y la acción combinada de una lipasa inmovilizada y una zeolita ácida como catalizadores (Lozano *et al.*, 2009).

Sin embargo, los SILLPs tienen la limitación de la lixiviación potencial del LI, siendo la funcionalización covalente de superficies sólidas la que proporciona la solución directa para evitar este tipo de fenómeno. Así, las unidades similares al LI proporcionan el soporte modificado con algunas propiedades de los LIs (p. ej. estabilidad, nanoestructura, etc.) (Burguete *et al.*, 2007). El tipo de soporte y la porosidad se pueden adaptar en función de la metodología de síntesis, tamaño y forma del entorno dentro las cavidades o en la superficie del material, lo que genera una mejora de las propiedades físico-químicas. En cuanto a la obtención de los SILLPs, estos se pueden preparar mediante la funcionalización de un soporte ya obtenido, a través de la introducción de unidades tipo LI por protocolos de injerto, o por polimerización de un monómero que contiene LI (Figura 1.13) (Montolio *et al.*, 2019).

En este sentido, es posible obtener una gran variedad de SILLPs en función de la elección del catión y anión o la naturaleza y carga del soporte, los cuales van a influir en su estabilidad y polaridad. Por tanto, estos materiales podrían considerarse como “disolventes iónicos sólidos” o como materiales nanoestructurados basados en unidades similares a LI con microambientes de polaridad sintonizable, capaces de inmovilizar y

estabilizar un gran número de especies catalíticas (García-Verdugo *et al.*, 2015; Giacalone y Gruttadauria, 2016). A modo de ejemplo, algunos soportes nanoestructurados basados en diferentes cationes de 1-decil-metilimidazolio unidos covalentemente a una matriz porosa de poliestireno / divinilbenceno, se usaron como soportes para inmovilizar la enzima CALB. Esto condujo a la obtención de catalizadores enzimáticos más activos y estables y, además, permitió su uso en condiciones de flujo continuo. Por ello, estos sistemas biocatalíticos se han utilizado con gran éxito en la producción de biodiesel mediante metanolisis de trioleína en scCO_2 , proporcionando rendimientos hasta de un 95 % y una alta estabilidad operacional (Izquierdo *et al.*, 2013). Además, estos derivados de CALB-SILLP junto con zeolitas ácidas proporcionaron el diseño de un biorreactor de flujo en un solo recipiente para catalizar la resolución cinética dinámica continua de *rac*-1-feniletanol con vinil propionato en scCO_2 , obteniendo de nuevo rendimientos próximos al 100% (Lozano *et al.*, 2010).

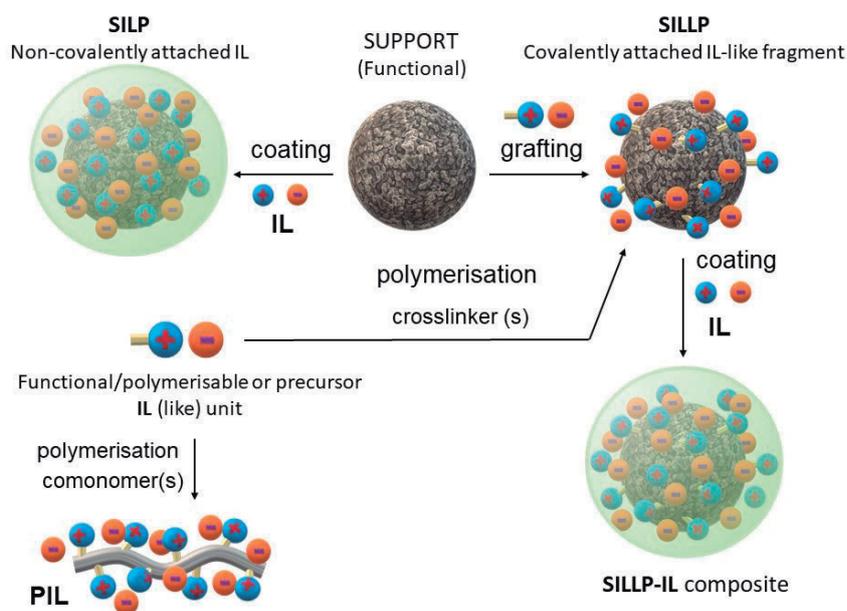


Figura 1.13. Enfoques generales para la preparación de materiales basados en LIs (Montolio *et al.*, 2019).

Por tanto, la inmovilización de una fase LI sobre un soporte o el desarrollo de materiales basados en LI constituye una metodología muy eficaz para la recuperación y reutilización de la fase LI, integrando la separación del producto, y aportando ventajas adicionales del proceso como la aplicación de condiciones de flujo, sintonización del

catalizador en términos de actividad y selectividad, estabilidad a largo plazo, escalado más simple, etc.

1.4.2. Nanopartículas metálicas en LIs

Las nanopartículas de metales de transición (MNP) se puede obtener en LIs mediante diferentes metodologías, como la reducción simple de cationes, la descomposición de complejos organometálicos en estado forma de oxidación cero, etc., dando acceso a la disponibilidad de MNP con diferente tamaños, formas y propiedades físico-químicas en función de la naturaleza del LI seleccionado (Dupont et al., 2002ab, Luska *et al.*, 2015; Scholten *et al.*, 2012; Dhakshinamoorthy *et al.*, 2018). En general, las reacciones catalizadas por MNP en LIs se llevan a cabo en condiciones de dos o tres fases, especialmente si intervienen especies en estado gaseoso (p. ej. la hidrogenación de olefinas sustituidas y compuestos aromáticos) (**Figura 1.14**) (Chacon y Dupont, 2019).

En estos sistemas, los LIs tienen una doble función de forma simultánea: (1) disolvente y (2) estabilizador de las MNP. Además, mediante la incorporación de una fina película de LI alrededor del MNP, es posible evitar la pérdida de actividad catalítica. En estos sistemas, el contacto directo del LI con las MNP coloidales evita las interacciones entre partículas, lo que limita los fenómenos de agregación.

Cabe destacar que, mediante la inmovilización de LIs es posible generar sistemas catalíticos multifuncionales con una reactividad determinada para transformaciones catalíticas específicas, como es el caso de la reducción selectiva de cetonas aromáticas (Offner-Marko *et al.*, 2018). Por ejemplo, en la reacción de Heck, el uso de un polímero que contiene un SILLP básico y nanopartículas de Paladio en LI, permitió el diseño de un reactor de lecho compacto, que proporcionó el producto directamente puro a la salida del reactor (Sans *et al.*, 2010).

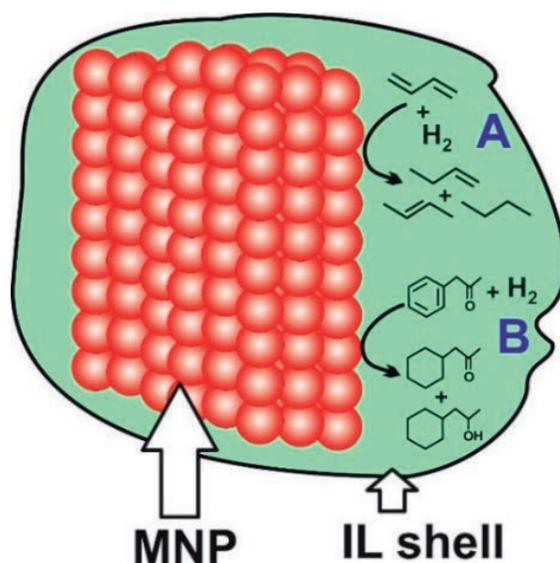


Figura 1.14. Representación esquemática de reacciones de hidrogenación catalizadas por MNP recubiertas de LI. **A.** Hidrogenación de olefinas por PtNP en [Bmim][BF₄] (Umpierre *et al.*, 2005) **B.** Hidrogenación de bencil metil cetona catalizada por nanopartículas de Iridio recubiertas por [Bmim][PF₆] (Fonseca *et al.*, 2004).

1.4.3. Reactores de membrana basados en tecnologías de LIs

Las tecnologías de membranas aportan numerosas ventajas en cuanto a la integración de sistemas de reacción / separación, entre las cuales destacan: (I) mejoras en la reacción que permiten cambios en la dirección deseada de las reacciones limitadas por el equilibrio químico mediante la eliminación continua de uno de los productos (p. ej. agua, metanol, etc.). (II) Ahorro de energía mediante procesos de separación sencillos a bajas temperaturas y bajo coste energético. (III) Mejora de la selectividad de las reacciones mediante la eliminación de productos intermedios. (IV) Vida útil de los catalizadores ya que pueden separarse y reutilizarse con relativa facilidad. Es por ello que, la combinación de membranas y LIs puede emplearse tanto para la separación de productos, como para la recuperación de los sistemas catalíticos. Tal y como se puede observar en la **Figura 1.15 A**, la reacción y separación de productos en un solo proceso para la síntesis enzimática de aromas (p. ej. acetato de etilo) a través de la esterificación en LI como medio de reacción (Gubicza *et al.*, 2003; Belafi-Bako *et al.*, 2002). La esterificación de ácido acético y alcohol isoamílico fue realizada en un reactor de tanque agitado que contiene [Bmim][PF₆] usando la enzima CALB inmovilizada como catalizador. El acoplamiento de dos unidades de membrana al reactor permitió la eliminación secuencial tanto del agua como del producto (acetato de isoamilo), desplazando el equilibrio a la formación del éster gracias a una doble per-vaporación. De este modo, el empleo de una

membrana hidrofílica y otra hidrófoba, permitió que el sistema estuviera en funcionamiento continuo durante 72 horas sin pérdida de actividad catalítica.

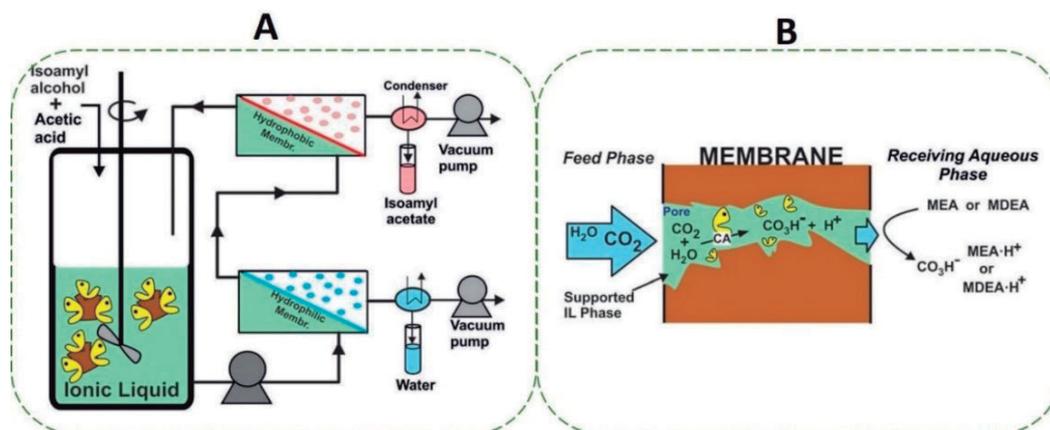


Figura 1.15. A. Síntesis de acetato de isoamilo catalizada por lipasa inmovilizada en Bmim][PF₆] utilizando un reactor de tanque agitado acoplado a unidades de pervaporación para la separación del producto (Gubicza *et al.*, 2003). B. Representación esquemática de una membrana hidrófoba modificada con PIL que contiene Zn[NTf₂]₂ y CA inmovilizada para la conversión de CO₂ a baja presión (1,3 bar) con una composición de gas de alimentación de 15% de CO₂ en N₂ (Kim *et al.*, 2017).

Más allá de la aplicación de las membranas en procesos de separación, los propios LIs pueden ser utilizados para desarrollar sistemas de membrana avanzados que sirvan como separadores entre fases. En estos sistemas, se minimiza la concentración de LI necesaria para un proceso dado y se favorece su recuperación y reutilización. Así, se han desarrollado diferentes tipos de membranas basadas en LIs (p. ej. membranas de LI soportadas (SILM), membranas de polímero compuestas de LI (ILPM), membranas de matriz mixta de LI, membranas de líquido poli(iónico) (PILM), membranas de gel de LI y contactores de membrana de LI), etc.

Sus aplicaciones han sido discutidas y, en resumen, los SILM son sistemas en los que un LI se mantiene unido a los poros del material del soporte mediante fuerzas capilares. Alternativamente, los LIs se pueden “atrapar” en un material para formar una película delgada solidificada y estable para producir ILPM. Así, las membranas obtenidas por polimerización de los monómeros basados en LI, o por modificación química del precursor polimérico con fragmentos relacionados con el LI conducen a la formación de PIL, que pueden alcanzar una alta densidad de grupos funcionales para proporcionar materiales con la estabilidad mecánica apropiada para su uso como membranas. En este

sentido, los múltiples enfoques para incorporar los LI en el ámbito de los materiales avanzados, ofrecen posibilidades sintéticas casi ilimitadas en este sector.

Generalmente, las membranas que contienen LIs se han empleado para la separación de gases (p. ej. H_2 , CO_2 , CH_4 , etc.) (Rynkowska *et al.*, 2018), pero algunas de ellas también tienen especial interés para la integración de procesos de reacción / separación, especialmente para aquellas transformaciones que involucran sistemas en estado gaseoso. En la **Figura 1.15 B** se muestra el uso de una membrana PIL que contiene $Zn[NTf_2]_2$ y anhídrida carbónica (CA) para facilitar de forma simultánea la adsorción selectiva de CO_2 , su conversión catalítica a HCO_3^- y la liberación selectiva del producto de transformación en una disolución acuosa de etanolamina o N-metildietanolamina (Kim *et al.*, 2017). De este modo, la combinación del LI y la membrana junto con la presencia de la enzima (CA), condujo a una concentración aproximadamente del doble en la adsorción de CO_2 , en comparación con un sistema sin enzima o con una capa de LI en la superficie de la membrana (Bednar *et al.*, 2016).

Estos sistemas también fueron preparados mediante un proceso de foto-injerto con monómeros de LI basados en catión imidazolio como agente modificador y una membrana de soporte, donde el LI es utilizado como estabilizador para las especies catalíticas de PdNPs (Gu *et al.*, 2015). No obstante, su aplicación para la reacción de Suzuki-Miyaura en una disposición de flujo continuo, se convirtió en un sistema que integra la reacción y la separación, de manera que el producto se obtuvo directamente en el permeado. Además, la alta eficacia de la membrana catalítica favoreció una mejor quimio-selectividad, que proporcionó la conversión completa en condiciones suaves, junto con una mejora del rendimiento en comparación con el uso de nanopartículas del Paladio coloidales. Otro ejemplo es el uso de una membrana PIL obtenida por copolimerización por injerto de un LI y PVA ácidos que muestran el potencial de la fase de LI para integrar la reacción y la separación en la esterificación de ácido acético con alcohol etílico en un reactor de membrana catalítica de per-vaporación (Zhang *et al.*, 2019). En la membrana, la actividad catalítica es el resultado de la presencia específica de los grupos funcionales ácidos presentes en el LI, mientras que el PVA proporciona una buena permeabilidad. La conversión entre ácido acético y etanol alcanzó el 93% después de 12 horas a $75\text{ }^\circ\text{C}$, lo que representa una mejora del 19% aproximadamente en comparación con los resultados obtenidos para la conversión en equilibrio en un reactor discontinuo en las mismas condiciones.

Además, los materiales funcionales monolíticos porosos basados en SILLPs se han utilizado para la preparación de membranas hidrofóbicas, y se han probado, por ejemplo, como membranas para la separación de agua y aceite (Porcar *et al.*, 2018). Así, las propiedades macroscópicas de estas membranas tubulares monolíticas porosas podrían ser adaptadas en función de la composición monomérica y con la incorporación de diferentes fragmentos de LI, lo que permite la separación eficiente de estos dos compuestos. El producto correspondiente se obtuvo en un proceso de flujo continuo que integra la reacción y separación simultáneamente con un rendimiento próximo al 90 %.

1.4.4. Reactores de microfluidos basados en las tecnologías de LIs

Los reactores de microfluidos representan enfoques muy prometedores para los procesos (bio)químicos ya que hace posible el desarrollo de procesos quimio-enzimáticos de múltiples etapas para la producción continua de un gran número de productos químicos de interés industrial (p. ej. antibióticos, fármacos antitumorales, agentes de administración de fármacos, etc.) (Shi *et al.*, 2019). Las dimensiones de estos sistemas permiten una transferencia de masa altamente eficiente a través de la mezcla de los diferentes componentes, y el intercambio de calor controlable como consecuencia de la mayor relación superficie-volumen, que proporciona mejores rendimientos y velocidades de reacción en comparación con los reactores tradicionales. Esto es esencial, por ejemplo, para controlar reacciones exotérmicas (Yao *et al.*, 2018). Además, nuevamente es posible separar fácilmente los productos de reacción con un menor impacto medioambiental (Suryawanshi *et al.*, 2018).

La combinación de los LIs y los microrreactores abre nuevas oportunidades para la intensificación de los procesos químicos, ya que puede mejorar y reducir el uso eficiente de LI. Así, el control fluidodinámico en sistemas multifásicos se puede utilizar para mejorar la selectividad y los rendimientos de reacción, por ejemplo, mediante el control en el tamaño de las burbujas y las gotas en los flujos segmentados o mediante el aumento del número de microrreactores (Kumar y Nigam, 2012). En 2013, Zhao *et al.* describieron una notable mejora en el proceso de síntesis de carbonato cíclico utilizando la tecnología de microrreactores, mediante el empleo de un LI funcionalizado como catalizador. En este experimento, se redujo el tiempo de residencia de varias horas a pocos segundos y, los rendimientos fueron mucho mayores que en el caso del proceso realizado de modo convencional. Sin embargo, aunque el rendimiento de transferencia de masa del

CO₂ y el óxido de propileno mejoró en el microrreactor en comparación con los reactores convencionales, la reacción aún se vio afectada por la transferencia de masa gas-líquido.

Otro ejemplo representativo es la síntesis de cinamato de butilo mediante la reacción de Mizoroki-Heck en [Bmim][NTF₂], que contiene un catalizador de Paladio. Dicha reacción tiene lugar mezclando esta fase catalítica con un segundo fluido que contiene los reactivos. Después de la reacción, el LI que contiene el catalizador de Pd podría ser reutilizado después del lavado con una disolución de NaOH y extrayendo el producto en hexano (Liu *et al.*, 2004). A pesar de que este protocolo tiene el inconveniente de incorporar un disolvente orgánico para la separación del producto, la separación del catalizador fue simple y, además, no se observó ninguna disminución en el rendimiento del producto durante varias reacciones consecutivas.

Adicionalmente, la eficacia de las reacciones biocatalíticas también puede ser mejorada mediante el empleo de estos sistemas, ya que se puede minimizar la contaminación de los productos por la enzima, facilitando la recuperación y reutilización del biocatalizador (Keil, 2018). En este sentido, sistemas porosos, previamente funcionalizados con enzimas pueden ser también empleados para llenar los canales de un dispositivo de microfluidos. Así, la combinación de las tecnologías miniaturizadas y de los microfluidos ha permitido la optimización del tiempo de reacción y, además, la intensificación de los (bio)procesos. Sin embargo, el acoplamiento de microrreactores y los sistemas biocatalíticos es una tarea compleja, ya que se requiere un enfoque integrado de múltiples conocimientos que aborden las características del biocatalizador, la cinética de la reacción y transferencia de masa (Karande *et al.*, 2016).

La tecnología de microrreactores también se ha aplicado para llevar a cabo biotransformaciones catalíticas en LI (Novak y Znidarsic-Plazl, 2013; Pohar *et al.*, 2009). En la siguiente figura se puede observar una reacción de acoplamiento de un sistema de microrreactores biocatalíticos de flujo segmentado con separación, donde se utiliza un disolvente tampón-LI para la síntesis de isoquercitrina mediante hidrólisis selectiva catalizada por hesperidinasas de rutina (R) (Gong *et al.*, 2015). Para ello se utilizó triacetato de glicerol como segunda fase en un patrón de flujo segmentado, de tal forma que podía extraerse el producto (Q) de modo continuo. Este sistema condujo a una mejora de la transferencia de calor y masa, y optimizó el tiempo de reacción enzimática (**Figura 1.16**).

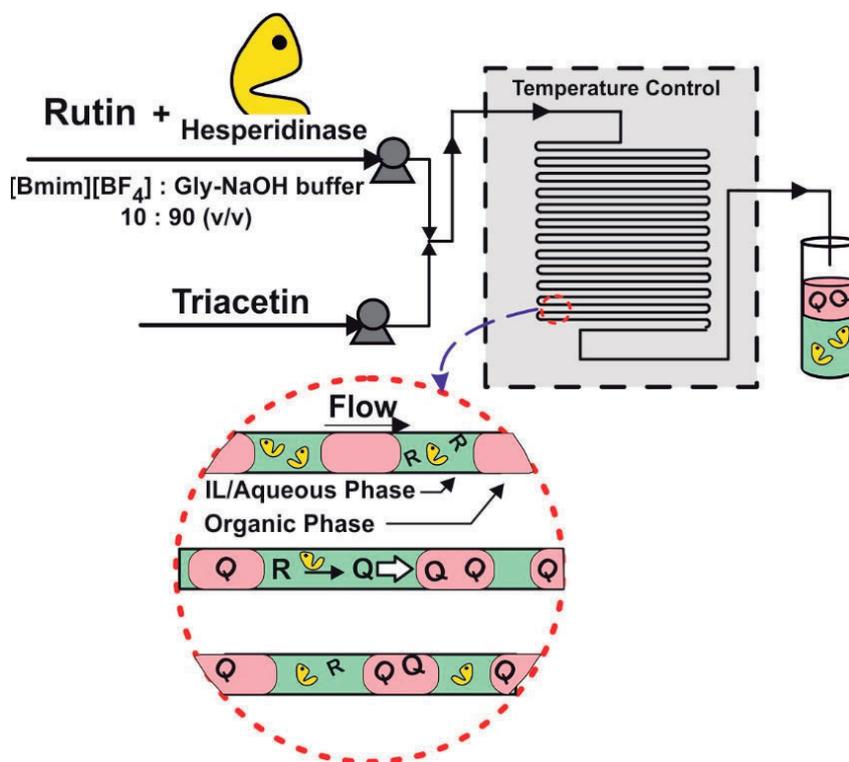


Figura 1.16. Representación esquemática de microrreactor y flujo segmentado en microcanales para la síntesis biocatalítica integrada y la separación de quercetina (Q) mediante la hidrólisis de rutina (R) catalizada por hesperidinasa. La fase catalítica (verde) fue una solución al 10% (v/v) de [Bmim][BF₄] en tampón de glicina / NaOH (pH 9), y la fase de extracción (rosa) fue triacetato de glicerol (Gong *et al.*, 2015).

1.4.5. Desde LIs termosensibles hasta sistemas de LI tipo esponja (SLILs)

Los líquidos iónicos pueden formar mezclas homogéneas con los reactivos y productos en función de la temperatura y, posteriormente, ser separados de los mismos dando lugar a diferentes fases a temperatura ambiente. Este comportamiento ofrece un enfoque muy prometedor para mejorar los procesos de separación de productos, así como la recuperación de todos los elementos de reacción que intervienen en los procesos biocatalíticos en LIs (Qiao *et al.*, 2017). Generalmente, estos sistemas se basan en medios bifásicos orgánicos acuosos a temperatura ambiente. Cuando el medio de reacción se calienta, el catalizador se transfiere de la fase acuosa al sustrato contenido la fase orgánica donde se lleva a cabo la reacción. Transcurrido el tiempo de reacción, se enfría el medio y el catalizador se transfiere de nuevo a la fase acuosa, quedando los productos en la fase orgánica y, además, facilitando la separación del catalizador y la obtención de los productos puros.

A modo de ejemplo representativo de sistemas de LI que contienen metales, se han utilizado para la hidroesterificación las sales de tetracarbonilo de cobalto de imidazolio sustituido con poliéter termorresistente con CO₂ y metanol. A temperatura ambiente, el sistema es bifásico y los catalizadores / LI son insolubles en una mezcla de THF / heptano, la cual contiene a los sustratos. Cuando la mezcla de reacción se calienta, los catalizadores se solubilizan en la mezcla de disolventes orgánicos. De este modo, el sistema se vuelve homogéneo e idóneo para llevar a cabo la transformación catalítica y, transcurrido el tiempo de reacción, se enfría la mezcla, y el sistema vuelve a presentar dos fases, permitiendo la separación del LI de los productos que quedan retenidos en la fase orgánica (Lv *et al.*, 2016).

Por otro lado, el término de líquido iónico tipo esponja, (SLIL por sus siglas en inglés (Sponge Like Ionic Liquid), fue acuñado para describir a los LI hidrofóbicos basados en una larga cadena lateral alquílica en el catión, con puntos de fusión superiores a temperatura ambiente y, que se comportan como fases sólidas conmutables (p. ej. 1-octadecil-3-metilimidazolio bistrifilimida, [C₁₈mim][NTf₂]) (Lozano *et al.*, 2011). A temperaturas superiores al punto de fusión, estos SLILs son líquidos y muestran una excelente capacidad para disolver compuestos hidrofóbicos como oletato de metilo, geraniol o nerol, generando sistemas totalmente homogéneos. Sin embargo, cuando el medio de reacción se enfría a temperatura ambiente, el sistema solidifica, y el soluto queda atrapado en la red sólida del líquido iónico. Una de las características únicas de estos sistemas es que, sorprendentemente, cuando las mezclas sólidas se centrifugan a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, el LI se comporta como una esponja que libera el soluto en estado líquido (“esponja exprimida”) a la fase superior, mientras que el líquido iónico sólido permanece en la fase inferior. Atendiendo a este fenómeno y mediante el uso de filtros centrífugos para mejorar la estrategia, la fase sólida de LI puede ser retenida por la membrana, mientras que la fase líquida se deposita en el fondo del filtro como consecuencia de la acción de fuerza centrífuga. Por ejemplo, usando un 50% en peso de LI [C₁₆tma][NTf₂] con respecto al producto de acetato de geraniol, la fracción de dicho compuesto se pudo obtener siguiendo el protocolo de centrifugación (**Figura 1.17**). Sin embargo, cabe destacar que en ningún caso se observó una liberación completa del aroma después de la centrifugación. Por ejemplo, al usar el mismo protocolo de separación en cuatro mezclas 50 / 50 [C₁₆tma][NTf₂] / aroma, el producto liberado disminuyó a medida que aumentaba el tamaño del fragmento de cadena de alquilo en el

aroma: acetato de isoamilo (82 %), acetato de nerilo (60%), acetato de citronelilo (59%), acetato de geranilo (51%), probablemente como resultado de la interacción más fuerte con la cadena de alquilo del LI. Estos resultados no mejoraron al aumentar el tiempo de centrifugación y / o la velocidad de centrifugación (Lozano *et al.*, 2012). Además, estos SLILs mostraron un comportamiento de "esponja húmeda" durante la reutilización después de cada ciclo de operación.

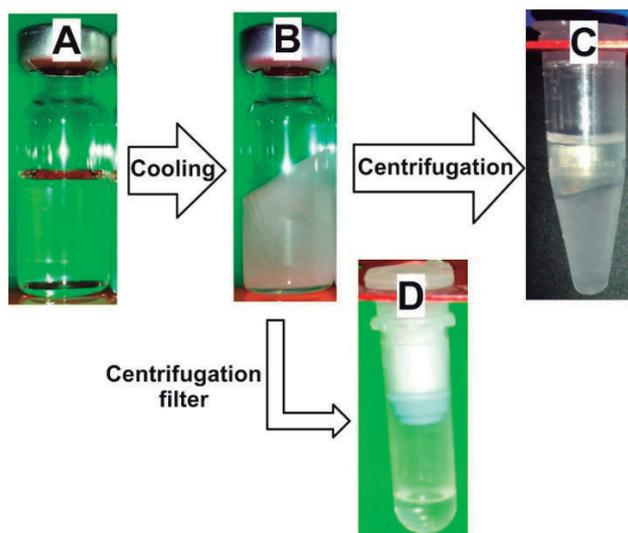


Figura 1.17. Comportamiento esponjoso de una mezcla 50/50 (p / p) de acetato de geranilo / [C₁₈mim][NTf₂]: 60 ° C (líquido, **A**), 25 ° C (sólido, **B**), después de cuatro pasos de centrifugación consecutivos (p. ej. temperatura ambiente, 21, 10 y 4 ° C) (dos fases, **C**), y después de la filtración a través de filtros de nailon centrífugos (Lozano *et al.*, 2015; Lozano *et al.*, 2012; Alvarez *et al.*, 2019).

Esta propiedad única de los SLIL fue explicada en función de la organización estructural sólido / líquido de los LIs y las interacciones con las moléculas de soluto inducidas por estas características estructurales. De hecho, los compuestos hidrofóbicos pueden considerarse incluidos en lugar de disueltos en las fases, y la disminución del volumen libre de la red iónica producida por el enfriamiento y la centrifugación dio lugar a la liberación del producto. No obstante, la matriz iónica del LI puede considerarse como una nanoesponja con agujeros de volumen variable, que son idóneos para albergar o liberar moléculas hidrofóbicas en función de su fase líquida o sólida y de la fuerza de una acción centrífuga. Además, la excelente idoneidad de los SLIL para llevar a cabo procesos biocatalíticos es otra de las características más importantes a destacar. Los LI inmiscibles en agua, como el caso de estos SLIL, han demostrado ser excelentes medios de reacción idóneos para reacciones catalizadas por enzimas, probablemente debido a su carácter

higrosópico, capaces de absorber hasta 1,4 % en peso de agua (Bonhote *et al.*, 1996), que proporciona el grado esencial de hidratación alrededor de las moléculas de enzima. En este sentido, se demostró que la lipasa inmovilizaba era adecuada para catalizar la síntesis de diferentes aromas (p. ej. acetato de geranilo (Lozano *et al.*, 2012), acetato de anisilo (Lozano *et al.*, 2014)) mediante la esterificación directa de ácido acético y el alcohol correspondiente en SLIL. Así, la reacción fue muy eficiente y dio como resultados rendimientos superiores al 80% a 50 °C en tan solo 2 horas de reacción. Además, este resultado fue optimizado con la ayuda de irradiación microondas, obteniendo resultados del 100% en 30 minutos. Por otro lado, es importante destacar el efecto protector de los SLIL en las enzimas contra la desnaturalización, tanto por la temperatura como por la alta concentración de ácido, manteniendo la actividad catalítica en el nivel máximo de eficiencia durante varios ciclos de reutilización. No obstante, se podría atribuir la capacidad del SLIL de actuar como un “molde” que mantiene la conformación activa de la enzima.

Por otro lado, la síntesis biocatalítica de biodiesel en SLILs como ejemplo sostenible para llevar a cabo un proceso limpio con la tecnología termosensible. Los LIs clásicos empleados en biocatálisis (p.ej. [Bmim][NTf₂]) no son capaces de superar el principal problema de inmiscibilidad entre los aceites vegetales y el metanol. Sin embargo, un SLIL como el [C₁₈mim][NTf₂] es capaz de disolver tanto el metanol como el aceite, dando lugar a un sistema de reacción de una única fase (Lozano *et al.*, 2010), con un microambiente adecuado para llevar a cabo la síntesis biocatalítica de biodiesel, con rendimientos próximos al 100% después de 8 horas de reacción. Además, se demostró la idoneidad de los LI basados en anión [NTf₂] y catión imidazolio con larga longitud de cadena alquílica para formar sistemas líquidos monofásicos para disolver el aceite vegetal y el metanol (Lozano *et al.*, 2011). Finalmente, cabe destacar que los SLIL son capaces de generar una excelente estabilización de las enzimas inmovilizadas frente a la temperatura, observándose una minúscula disminución de la actividad después de 100 días de incubación en un 50% (p/p) de trioleína / [C₁₈tma][NTf₂] mezcla a 60 °C (Lozano *et al.*, 2013).

Atendiendo a las propiedades genuinas de los SLILs, la integración de las etapas de reacción biocatalítica y separación del producto se llevó a cabo mediante un protocolo sencillo, adecuado para mejorar la producción de biodiésel. Teniendo en cuenta que el biodiesel y el glicerol son los productos de reacción, el procedimiento general

desarrollado para separar ambos compuestos de los SLIL se optimizó con la introducción de agua como nuevo disolvente verde en el sistema con el fin de proporcionar una nueva fase hidrófila para extraer el glicerol. Tal y como se puede observar en la **Figura 1.18**, la adición de agua a 60 °C al sistema monofásico resultante después del paso biocatalítico, seguido de enfriamiento a temperatura ambiente, condujo a una mezcla heterogénea, que luego se separó siguiendo un protocolo consecutivo de enfriamiento / centrifugación. Mediante este protocolo, la mezcla heterogénea se separó en tres fases: (I) una fase superior de biodiésel libre de LI, (II) una fase acuosa líquida media libre de LI que contiene el glicerol y (III) un sólido en la parte inferior que contiene el SLIL (Lozano *et al.*, 2014; Lozano *et al.*, 2013). Además, el sistema biocatalizador / SLIL se recuperó y reutilizó íntegramente, destacando la idoneidad de esta metodología sostenible para la producción de biodiesel de fácil implementación a nivel industrial. Se puso de manifiesto la idoneidad de este enfoque para la síntesis biocatalítica de biocombustibles a partir de triacilglicéridos obtenidos de diferentes fuentes (p. ej. residuos de aceites de cocina o semillas de algodón).

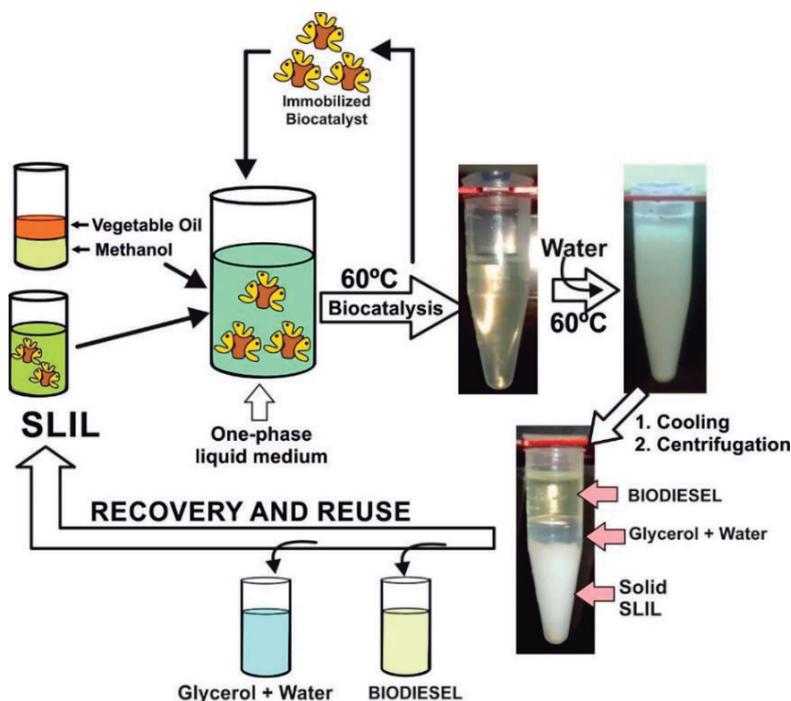


Figura 1.18. Protocolo limpio para la producción biocatalítica de biodiesel utilizando SLILs, integrando tanto el biocatalítico como los pasos de separación con la recuperación y reutilización total del sistema SLIL / biocatalizador (Lozano *et al.*, 2013; Lozano *et al.*, 2016).

En un intento por desarrollar un proceso integral sostenible para la producción de biocombustibles, se han utilizado mezclas binarias de LI para desarrollar sistemas adecuados para la extracción directa de aceite de algas de la materia prima (*Chlorella vulgaris*), seguido de su transformación biocatalítica en biodiesel y una etapa de extracción final. Estas mezclas se basaron en la combinación de SLIL con [Bmim][Cl], teniendo en cuenta la capacidad para realizar la síntesis biocatalítica de biodiésel del primer LI, y el poder disolvente de la biomasa de celulosa del segundo. La extracción de aceites se realizó incubando las microalgas secas en la mezcla binaria de LI a 110 °C que, tras el enfriamiento a 60 °C, permitió la transformación en biodiesel por una lipasa inmovilizada. Esto resultó en una síntesis de biodiesel rápida y eficiente, con un rendimiento de hasta el 100% en 2 horas a 60 °C. El posterior enfriamiento a temperatura ambiente y la centrifugación de los sistemas semisólidos resultantes a 20 y 18 °C, condujo a la separación del biodiésel líquido a base de algas de la mezcla sólida de LI, que se recuperó y reutilizó en un ciclo de operación adicional (Lozano *et al.*, 2020).

1.5. Conclusiones

La Ciencia en general, y la Química en particular, ha jugado un papel clave en la mejora continua de nuestra calidad de vida, y no cabe duda de que las soluciones necesarias para paliar el impacto medioambiental de las industrias químicas se encuentran albergadas en los términos de sostenibilidad. Si bien el uso de fuentes renovables de energía o materia es clave en este ámbito, los nuevos logros en química e ingeniería química están centrados en la mejora continua de la eficiencia de las transformaciones y procesos químicos, en especial en la recuperación de productos y catalizadores, siendo estos fundamentales para brindar nuevas oportunidades a las generaciones futuras. Así, la naturaleza debe tomarse como una fuente de inspiración para los químicos para proporcionar herramientas y enfoques experimentales que alcancen la máxima eficiencia catalítica en la síntesis de los productos deseados con una mínima generación de subproductos, junto con la integración de etapas de transformación y separación.

Los líquidos iónicos y sus desarrollos tecnológicos abren nuevas vías en el contexto de las tecnologías sostenibles, como una excelente herramienta habilitadora para integrar los procesos de reacción y separación. Así, la excepcional función de muchos catalizadores eficientes como las enzimas, se pueden mejorar enormemente en entornos LI, scCO_2 y la combinación de ambos con excelentes sinergias, lo que permite el

desarrollo de procesos limpios. Estos sistemas basados en LI pueden contribuir, no solo a la estabilización a la estabilización y fácil recuperación de los biocatalizadores, sino que además pueden implementarse en sistemas de flujo para procesos posteriores.

No obstante, surgen diferentes enfoques para este propósito: reactores de membrana, dispositivos de microfluidos, microsistemas de emulsión, reactores bifásico LI / scCO₂, etc. Estos sistemas permiten la integración de las etapas de reacción y separación en la producción química, en particular en condiciones de flujo continuo. La correcta combinación de los biocatalizadores / catalizadores químicos eficientes con materiales avanzados basados en LIs (SILLPs, SLIL, etc.) ofrece nuevas oportunidades que apuntan directamente a la integración de varias etapas catalíticas en síntesis orgánicas, sin la necesidad de aislar intermedios. Asimismo, las tecnologías termosensibles basadas en LIs, especialmente los LIs con comportamiento tipo esponja, permiten el desarrollo y diseño de nuevos enfoques sencillos y sostenibles para separar de forma eficaz un compuesto orgánico e hidrofóbico en estado líquido (p. ej. biodiesel, aromas, etc.) de mezclas homogéneas de compuestos orgánicos y LI, mediante un fácil protocolo de enfriamiento y centrifugación.

Sin embargo, las ventajas de los LIs para el desarrollo integrado de procesos de reacción / separación se ven distorsionados por su posible toxicidad al emplear grandes cantidades. Como solución a este problema, se están desarrollando nuevas estrategias sintéticas, basadas en el uso de compuestos “más ecológicos”, seguros y menos nocivos para producir nuevos Bio-LIs no tóxicos y biodegradables, adecuados para conservar las propiedades excepcionales de los LIs (p. ej. presión de vapor baja, gran potencial como disolvente, etc.).

La combinación de las tecnologías de líquidos iónicos y (bio)catalizadores ha abierto el camino a una amplia gama de enfoques sostenibles que permiten la integración de transformaciones químicas y procesos de separación de productos, adecuados para su implementación a escala industrial. De la Química Verde a la “Química de ensueño” hay un camino en permanente construcción.

1.6. Bibliografía

Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K. Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9142–9147.

Abou-Shehada, S., Clark, J. H., Paggiola, G., Sherwood, J. Tunable Solvents: Shades of Green. *Chem. Eng. Process.* **2016**, 99, 88–96.

Altava, B., Burguete, M. I., Garcia-Verdugo E., Luis, S. V. Chiral catalysts immobilized on achiral polymers: effect of the polymer support on the performance of the catalyst. *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, 47, 2722–2771.

Alvarez, E., Rodriguez, J., Villa, R., Gomez, C., Nieto, S., Donaire, A., Lozano, P. Clean Enzymatic Production of Flavor Esters in Spongelike Ionic Liquids. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **2019**, 7, 13307–13314.

Anastas, P., Warner, T. J. C. *Green chemistry: Theory and practice*. Oxford University Press, **1998**.

Anderson, E. M., Larsson, K. M., Kirk, O. One Biocatalyst–Many Applications: The Use of Candida Antarctica B-Lipase in Organic Synthesis. *Biocatal. and Biotransform.*, **1998**, 16(3):181-204.

Bednar, A., Nemestóthy N., Bakonyi P., Fulop L., Zhen, G., Lu, X., Kobayashi, T., Kumar, G., Xu, K., Belafi-Bako, K. Enzymatically-boosted ionic liquid gas separation membranes using carbonic anhydrase of biomass origin. *Chem. Eng. J.*, **2016**, 303, 621–626.

Belafi-Bako, K., Dormo, N., Ulbert, O., Gubicza, L. Application of pervaporation for removal of water produced during enzymatic esterification in ionic liquids. *Desalination*, **2002**, 149, 267–268.

Blanchard, L. A., Gu, Z. Y., Brennecke, J. F. High-Pressure Phase Behavior of Ionic Liquid / CO₂ Systems. *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, 2437–2444.

Blanchard, L. A., Hancu, D., Beckman, E. J., Brennecke, J. F. Green processing using ionic liquids and CO₂. *Nature*, **1999**, 399, 28–29

Bommarius, A. S., Riebel, B. R. *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.

Bonhote, P., Dias, A. P., Papageorgiou, N., Kalyanasundaram, K., Grätzel, M. Hydrophobic, Highly Conductive Ambient-Temperature Molten Salts. *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 1168–1178.

Brundtland, C. G. *Our Common Future, The World Commission on Environmental Development*, Oxford University Press, Oxford, **1987**.

Burguete, M. I., Galindo, F., Garcia-Verdugo, E., Karbass, N., Luis, S. V. Polymer supported ionic liquid phases (SILPs) versus ionic liquids (ILs): How much do they look alike. *Chem. Commun.*, **2007**, 3086–3088.

Busacca, C. A., Fandrick, D. R., Song, J. J., Senanayake, C. H. The Growing Impact of Catalysis in the Pharmaceutical Industry. *Adv. Synth. Cat.*, **2011**, 353, 1825-1864.

Chacon, G., Dupont, J. Arene Hydrogenation by Metal Nanoparticles in Ionic Liquids. *ChemCatChem*, **2019**, 11, 333–341.

Choi, Y.H., van Spronsen, J., Dai, Y.T., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I.W.C.E., Witkamp, G.J., Verpoorte, R. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology. *Plant. Physiol.* **2011**, 156, 1701-1705.

Constable, D. J. C., Curzonsb, A. D., Cunningham, V. L. Metrics to ‘green’ chemistry—which are the best?. *Green Chem.*, **2002**, 4, 521–527.

De Diego, T., Lozano, P., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L. Fluorescence and CD spectroscopic analysis of the Alpha chymotrypsin stabilization by the ionic liquid, 1-ethyl-3- methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide. *Biotechnol. Bioeng.*, **2004**, 88, 916-924.

De Diego, T., Lozano, P., Gmöh, S., Vaultier, M., Iborra, J. L. Understanding Structure-Stability Relationship of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Biomacromolecules*. **2005**, 6, 1457-1464.

De la Hoz, A., Diaz-Ortiz, A., Moreno, A. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, 34, 167-178.

Dhakshinamoorthy, A., Asiri, A. M., Alvaro, M., Garcia, H. Metal organic frameworks as catalysts in solvent-free or ionic liquid assisted conditions. *Green Chem.*, **2018**, 20, 86-107.

Dominguez de Maria, P., Maugeri, Z. Ionic liquids in biotransformations: from proof-of-concept to emerging deep-eutectic-solvents. *Current Opinion in Chemical Biology*. **2011**, 15, 220-225.

Dominguez de Maria, P. (Ed.) Ionic Liquids in biotransformations and organocatalysis: Solvents and beyond. *Wiley-VCH*. **2012**.

Dupont, J.; Souza, R. F. De; Suarez, P. A. Z. Ionic Liquids (Molten Salts) Phase Organometallic Catalysis. *Chem. Rev.* **2002a**, 102, 3667-3692.

Dupont, J.; Fonseca, G S; Umpierre, A P; Fichtner, P F P; Texeira, S R. Transition-Metal Nanoparticles in Imidazolium Ionic Liquids: Recyclable Catalysts for Biphasic Hydrogenation Reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002b**, 124, 4228-4229

Dupont, J., de Souza, R. F., Rech, V. Alternative synthesis of a dialkylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid mixture and its use in poly (acrylonitrile-butadiene) hydrogenation Suarez. *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 3667-3369

Dupont, J. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. *J Braz. Chem. Soc.*, **2004**, 15, 341-350.

Dupont, J. From Molten Salts to Ionic Liquids: A "Nano" Journey. *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44, 1223-1231.

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. The distillation and volatility of ionic liquids. *Nat.*, **2006**, 439, 831-4.

Erbeldinger, M., Mesiano, A. J., Russell, A. J. Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid-an alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. *Biotechnol. Prog.*, **2000**, 16, 1129-1131.

Farmer, V., Welton, T. The oxidation of alcohols in substituted imidazolium ionic liquids using ruthenium catalysts. *Green Chem.*, **2002**, 4, 97-102.

Farran A., Cai, C., Sandoval, M., Xu, Y. M., Liu, J., Hernaiz, M. J., Linhardt, R. J. Green solvents in carbohydrate chemistry: from raw materials to fine chemicals. *Chem. Rev.*, **2015**, 115, 6811-6853

Fehrmann, R., Riisager, A., Haumann, M. Supported Ionic Liquids: Fundamentals and Applications, *Wiley-VCH Verlag, Weinheim*, **2014**.

Fernandez-Lafuente, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial Biocatalyst. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2010**, 62, 197-212.

Ferreira, A. M., Passos, H., Okafuji, A., Tavares, A. P. M., Ohno, H., Freire, M. G., Coutinho, J. A. P. An integrated process for enzymatic catalysis allowing product recovery and enzyme reuse by applying thermoreversible aqueous biphasic systems. *Green Chem.*, **2018**, 20, 1218-1223.

Fitzpatrick, P. A., Steinmetz, A. C. U., Ringe, D., Klibanov, A. M. Enzyme crystal structure in a neat organic Solvent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1993**, 90, 8653-8657.

Fonseca, S. G., Scholten J. D., Dupont, J. Iridium Nanoparticles Prepared in Ionic Liquids: An Efficient Catalytic -System for the Hydrogenation of Ketones. *Synlett*, **2004**, 1525-1528.

Frauenfelder, H., Chen, G., Berendzen, J., Fenimore, P. W., Jansson, H., McMahon, B. H., Stroer, I. R., Swenson, J., Young, R. D. A unified model of protein dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2009**, 106, 5129-5134.

Freemantle, M. Green solutions for ionic liquids. *C&E News, August*, **1998**, 24, 32-37.

Fukumoto, K., Ohno, H. LCST-Type Phase Changes of a Mixture of Water and Ionic Liquids Derived from Amino Acids. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2007**, 46, 1852–1855.

Gao, Y., Li, N., Zheng, L. Q., Zhao, X. Y., Zhang, S. H., Han, B. X., Hou, W. G., Li, G. Z. High-internal-ionic liquid-phase emulsions. *Green Chem.*, **2006**, 8, 43–49.

Garcia-Verdugo, E., Altava, B., Burguete, M. I., Lozano, P., Luis, S. V. Ionic liquids and continuous flow processes: a good marriage to design sustainable processes. *Green Chem.*, **2015**, 17, 2693–2713.

Ge, X., Gu, C., Wang, X., Tu, J. Deep Eutectic Solvents (DESs)-Derived Advanced Functional Materials for Energy and Environmental Applications: Challenges, Opportunities, and Future Vision. *J. Mater. Chem. A* **2017**, 5, 8209–8229.

Giacalone, F., Gruttadauria, M. Covalently Supported Ionic Liquid Phases: An Advanced Class of Recyclable Catalytic System. *ChemCatChem*, **2016**, 8, 664–684.

Gong, A., Gu, S., Wang, J., Sheng, S., Wu, F. An effective biphasic system accelerates hesperidinase-catalyzed conversion of rutin to isoquercitrin. *Bioresour. Technol.*, **2015**, 193, 498–506.

Gu, Y., Favier, I., Pradel, C., Gin, D. L., Lahitte, J. F., Noble, R. D., Gomez, M., Remigy, J. C. High catalytic efficiency of palladium nanoparticles immobilized in a polymer membrane containing poly (ionic liquid) in Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction. *J. Membr. Sci.*, **2015**, 492, 331–339.

Gubicza, L., Nemestothy, N., Frater, T., Belafi-Bako, K. Enzymatic esterification in ionic liquids integrated with pervaporation for water removal. *Green Chem.*, **2003**, 5, 236–239.

Halling, P. J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb. Technol.*, **1994**, 16, 178–206.

Hiraga, Y., Duereh, A., Smith, R. L. Aspects of solvent polarity and solvent properties in developing efficient systems for processing biomass with ionic liquid mixtures and supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids*, **2018**, 134, 12–20.

Hobbs H. R., Thomas, N. R. Biocatalysis in Supercritical Fluids, in Fluorous Solvents, and under Solvent-Free Conditions. *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 2786–2820.

Horvath, T., Rabai, J. Facile catalyst separation without water: fluoros biphasic hydroformylation of olefins. *Science*, **1994**, 266, 72–75.

Itoh, T., Akasaki, E., Kudo, K., Shirakami, S. Lipase-catalyzed enantioselective acylation in the ionic liquid solvent system: Reaction of enzyme anchored to the solvent. *Chem. Lett.*, **2001**, 3, 262–263.

Itoh, T., Akasaki, E., Nishimura, Y. Lipase-catalyzed enantioselective acylation in the ionic liquid solvent system: reaction of enzyme anchored to the Solvent. *Chem. Lett.*, **2002**, 154–155.

Izquierdo, D. F., Bernal, J. M., Burguete, M. I., Garcia-Verdugo, E., Lozano, P., Luis, S. V. An efficient microwave-assisted enzymatic resolution of alcohols using a lipase immobilised on supported ionic liquid-like phases (SILLPs). *RSC Adv.*, **2013**, 3, 13123–13126.

Jenkin, G. R. T., Al-Bassam, A. Z. M., Harris, R. C., Abbott, A. P., Smith, D. J., Holwell, D. A., Chapman, R. J., Stanley, C. J. The Application of Deep Eutectic Solvent Ionic Liquids for Environmentally-Friendly Dissolution and Recovery of Precious Metals. *Miner. Eng.*, **2016**, 87, 18–24.

Jessop, P. J., Leitner, W. *Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids*- Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.

Jimenez-Gonzalez, C. Life cycle considerations of solvents. *Curr. Opin. Green Sustainable Chem.*, **2019**, 18, 66–71

Jin, S., Byrne, F., McElroy, C. R., Sherwood, J., Clark, J. H., Hunt, A. J. Challenges in the Development of Bio-Based Solvents: A Case Study on methyl(2,2-Dimethyl-1,3-Dioxolan-4-Yl) methyl Carbonate as an Alternative Aprotic Solvent. *Faraday Discuss.* **2017**, 202, 157–173.

Karande, R., Schmid, A., Buehler, K. Applications of Multiphasic Microreactors for Biocatalytic Reactions. *Org. Process Res. Dev.*, **2016**, 20, 361–370.

Keil, F. J. Process intensification. *Rev. Chem. Eng.*, **2018**, 34, 135–200.

- Keim, W. Multiphase catalysis and its potential in catalytic processes: the story of biphasic homogeneous catalysis. *Green Chem.*, **2003**, 5, 105–111.
- Kerton, F., Marriott, R. Chapter 2. Green Solvents - Legislation and Certification. *GreenChem.*, The Royal Society of Chemistry: UK, **2013**, 31–50.
- Keskin, S., Kayrak-Talay, D., Akman, U., Hortaçsu, O. A Review of Ionic Liquids Towards Supercritical Fluid Applications. *J. Supercrit. Fluids*, **2007**, 43, 150–180.
- Kim, T. J., Lang, A., Chikukwa, A., Sheridan, E., Dahl, P. I., Leimbrink, M., Skiborowski, M., Roubroeks, J. Enzyme Carbonic Anhydrase Accelerated CO₂ Absorption in Membrane Contactor. *Energy Procedia*, **2017**, 114, 17–24.
- Kirk, O., Christensen, M. W. Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. *Org. Process Res. Dev.*, **2002**, 6, 446–451.
- Klibanov, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, **2001**, 409, 241–246.
- Knez, Z. Enzymatic reactions in dense gases. *J. Supercrit. Fluids*, **2009**, 47, 357–372.
- Koel, M. Physical and Chemical properties of ionic liquids based on dialkylimidazolium cation. *Sci. Chem.*, **2000**, 49, 3, 145–155.
- Kumar, A., Bisht, M., Venkatesu, P. Biocompatibility of ionic liquids towards protein stability: A comprehensive overview on the current understanding and their implications. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2017**, 96, 611–651.
- Kumar, V., Nigam, K. D. P. Process intensification in green synthesis. *Green Process. Synth.*, **2012**, 79–107.
- Lau, R. M., Sorgedraeger, M. J., Carrea, G., van Rantwijk, F., Secundo, F., Sheldon, R.A. Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: Effects on structure and activity. *Green Chem.*, **2004**, 6, 483–487.
- Lawson, D. M., Brzozowski, A. M., Rety, S., Verma, C., Dodson, G. G. Probing a functional role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase through transesterification reactions in organic Solvent. *Protein Eng.* **1994**. 7(4), 543–550.
- Li, Y., Cirino, P. Recent Advances in Engineering Proteins for Biocatalysis. *Biotechnol. Bioeng.*, **2014**, 111, 1273–1287.
- Liu, R. X., Zhang, P., Zhang, S. J., Yan, T., Xin, J., Zhang, X. P. Ionic liquids and supercritical carbon dioxide: Green and alternative reaction media for chemical processes. *Rev. Chem. Eng.*, **2016**, 32, 587–609.
- Liu, S., Fukuyama, T., Sato, M., Ryu, I. Continuous Microflow Synthesis of Butyl Cinnamate by a Mizoroki–Heck Reaction Using a Low-Viscosity Ionic Liquid as the Recycling Reaction Medium. *Org. Process Res. Dev.*, **2004**, 8, 447–481.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J. L. Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Chem. Commun.*, **2002**, 692–693.
- Lozano, P., De Diego, T., Mira, C., Montague, K., Vaultier, M., Iborra, J. L. Long term continuous chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of rac-1-phenylethanol using ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Green Chem.*, **2009**, 11, 538–542.
- Lozano, P. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. *Green Chem.* **2010**, 12, 555–569.
- Lozano, P., Garcia-Verdugo, E., Karbass, N., Montague, K. K., De Diego, T., Burguete, M. I., Luis, S. V. Supported Ionic Liquid-Like Phases (SILLPs) for enzymatic processes: Continuous KR and DKR in SILLP–scCO₂ systems. *Green Chem.*, **2010**, 12, 1803–1810.
- Lozano, P., Bernal, J. M., Piamtongkam, R., Fetzer, D., Vaultier, M. One-Phase Ionic Liquid Reaction Medium for Biocatalytic Production of Biodiesel. *ChemSusChem*, **2010**, 3, 1359–1363.

Lozano, P., Garcia-Verdugo, E., Luis, S.V., Pucheault, M., Vaultier, M. (Bio)catalytic continuous flow processes in scCO₂ and / or ILs: Towards Sustainable (Bio)catalytic Synthetic Platforms. *Curr. Org. Synth.* **2011**, 8, 810-823.

Lozano, P., Bernal, J. M., Vaultier, M. Towards continuous sustainable processes for enzymatic synthesis of biodiesel in hydrophobic ILs / scCO₂ biphasic systems. *Fuel*, **2011**, 90, 3461–3467.

Lozano, P., Bernal, J. M., Navarro, A. A clean enzymatic process for producing flavour esters by direct esterification in switchable ionic liquid / solid phases. *Green Chem.*, **2012**, 14, 3026–3033.

Lozano, P., Garcia-Verdugo, E. Non-conventional solvents in Biotransformations: Medium Engineering & Process Development. En “Ionic Liquids in Biotransformations & Organocatalysis: Solvents and Beyond” (Ed. P. Dominguez de Maria). Chapter 4. pp. 103-149. John WILEY & Sons, **2012**. ISBN-10: 0-470-56904-2.

Lozano, P., Bernal, J. M., Sánchez-Gómez, G., López, G., Vaultier, M. How to produce biodiesel easily using a green biocatalytic approach in sponge-like ionic liquids. *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. A Green Approach for Producing Solvent-free Anisyl Acetate by Enzyme-catalyzed Direct Esterification in Sponge-like Ionic Liquids Under Conventional and Microwave Heating. *Curr. Green Chem.*, **2014**, 1, 145–154.

Lozano, P., Bernal, J. M., Garcia-Verdugo, E., Sanchez-Gomez, G., Vaultier, M. Sponge-like ionic liquids: a new platform for green biocatalytic chemical processes. *Green Chem.*, **2015**, 17, 3706–3717.

Lozano, P., Bernal, J. M., Nieto, S., Gomez, C., Garcia-Verdugo, E., Luis, S. V. Active biopolymers in green non-conventional media: a sustainable tool for developing clean chemical processes. *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 17361–17374.

Lozano, P., Gomez, C., Nicolas, A., Polo, R., Nieto, S., Bernal, J. M., Garcia-Verdugo, E., Luis, S. V. Clean Enzymatic Preparation of Oxygenated Biofuels from Vegetable and Waste Cooking Oils by Using Sponge like Ionic Liquids Technology. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2016**, 4, 6125–6132.

Lozano, P., Alvarez, E., Bernal, J. M., Nieto, S., Gomez, C., Sanchez-Gomez, G. Ionic liquids for clean biocatalytic Processes. *Curr. Green Chem.*, **2017**, 4, 116-129.

Lozano, P. Sustainable Catalysis in Ionic Liquids, *CRC Press*, New York, **2018**.

Lozano, P., Bernal, J. M., Gomez, C., Alvarez, E., Markiv, B., Garcia-Verdugo, E., Luis, S. V. Green biocatalytic synthesis of biodiesel from microalgae in one-pot systems based on sponge-like ionic liquids. *Catal. Today*, **2020**, 346, 87-92.

Luska, K. L., Migowski, P., Leitner, W. Ionic liquid-stabilized nanoparticles as catalysts for the conversion of biomass. *Green Chem.*, **2015**, 17, 3195-3206.

Ly, Z. G., Jiang, Y. F., Zhou, C., Guo, Z. M., Ma, X. L., Chen, Q., Nie, T., Song, H. B. Synthesis and evaluation of stable, efficient, and recyclable carbonylation catalysts: Polyether-substituted Imidazolium carbonyl cobalt ionic liquids. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **2016**, 415, 89–95.

Madeira, L. R., van Rantwijk, F., Seddon, K. R., Sheldon, R. A. Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. *Org. Lett.*, **2000**, 2, 4189-4191.

Mesiano, A. J., Beckman, E. J., Russel, A. J. Supercritical Biocatalysis. *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 623–633.

Molina-Espeja, P., Vina-Gonzalez, J., Gomez-Fernandez, B. J., Martin-Diaz, J., Garcia-Ruiz, E., Alcalde, M. Beyond the outer limits of nature by directed evolution. *Biotechnol. Adv.*, **2016**, 34, 754-767.

Montolio, S., Altava, B., Garcia-Verdugo, E., Luis, S. V. *Current in Green Synthetic Processes and Procedures*, ed. R. Ballini, RSC Green Chemistry Series, Cambridge. **2019**, 13, 289–318

Naushad, M., Al Othman, Z. A., Khan, A. B., Ali, M. Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2012**, 51(4), 555-560.

Niedermeyer, H., Hallett, J. P., Villar-Garcia, I. J., Hunt, P. A., Welton, T. Mixtures of ionic liquids. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 7780–7802.

- Novak, U., Znidarsic-Plazl, P. Integrated lipase-catalyzed isoamyl acetate synthesis in a miniaturized system with enzyme and ionic liquid recycle. *Green Process. Synth.*, **2013**, 2, 561–568.
- Offner-Marko, M. L., Bordet, A., Moos, G., Tricard, S., Rengshausen, S., Chaudret, B., Luska, K. L., Leitner, W. Bimetallic Nanoparticles in Supported Ionic Liquid Phases as Multifunctional Catalysts for the Selective Hydrodeoxygenation of Aromatic Substrates. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2018**, 57, 12721–12726.
- Passos, H., Luis, A., Coutinho, J. A. P., Freire, M. G. Thermoreversible (Ionic-Liquid- Based) Aqueous Biphasic Systems. *Sci. Rep.*, **2016**, 20276
- Patel, R. N. Enzymatic Synthesis of Chiral Intermediates for Drug Development. *Adv. Synth. Catal.*, **2001**, 343, 527-546.
- Pena-Pereira, F., Namiesnik, J. Ionic Liquids and Deep Eutectic Mixtures: Sustainable Solvents for Extraction Processes. *ChemSusChem* **2014**, 7, 1784–1800.
- Pera-Titus, M., Leclercq, L., Clacens, J. M., De Campo, F., Nardello-Rataj, V. Pickering interfacial catalysis for biphasic systems: from emulsion design to green reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2015**, 54, 2006–2021
- Perez, M., Sinisterra, J. V., Hernaiz, M. J. Hydrolases in green solvents. *Curr. Org. Chem.*, **2010**, 14, 20, 2366-2383.
- Perez-Sanchez, M., Sandoval, M., Hernaiz, M. J., De Maria, P. D. Biocatalysis in Biomass-derived Solvents: The Quest for Fully Sustainable Chemical Processes. *Curr. Org. Chem.*, **2013**, 17, 1188-1199.
- Peris, E., Porcar, R., Garcia-Alvarez, J., Burguete, M. I., Garcia-Verdugo, E., Luis, S. V. Divergent multistep continuous synthesis enabled by immobilised catalysts on IL-phases. *ChemSusChem*, **2019**, 12, 1684–1691.
- Perona, A., Hoyos, P., Farrán, A., Hernaiz, M. J. Current challenges and future perspectives in sustainable mechanochemical transformations of carbohydrates. *Green Chem.*, **2020**, 22, 5559.
- Plechkova, N.V., Seddon, K. R. Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 123–50.
- Pohar A., Plazl, I., Znidarsic-Plazl, P. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl acetate in an ionic liquid / n-heptane two-phase system at the microreactor scale. *Lab Chip*, **2009**, 9, 3385–3390.
- Poliakoff, M., Licence, P. Green Chemistry. *Nature*, **2007**.
- Poole, C. F. Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1037, 49-82.
- Porcar, R., Nuevo, D., Garcia-Verdugo, E., Lozano, P., Sanchez-Marcano, J., Burguete, M. I., Luis, S. V. New porous monolithic membranes based on supported ionic liquid-like phases for oil / water separation and homogenous catalyst immobilisation. *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 2385–2388.
- Qiao, Y. X., Ma, W. B., Theyssen, N., Chen, C., Hou, Z. S. Temperature-Responsive Ionic Liquids: Fundamental Behaviors and Catalytic Applications. *Chem. Rev.*, **2017**, 117, 6881–6928.
- Rabbania, G., Ahmadd, E., Khana, M.V., Mohd, T., Ashrafb, Bhatc, R., Khan, R.H. Impact of structural stability of cold adapted *Candida antarctica* lipase B (CaLB): in relation to pH, chemical and thermal denaturation. *RSC Adv.* **2015**, 5, 20115-20131.
- Romero-Salvador, A. Líquidos iónicos a temperatura ambiente: un nuevo medio para las reacciones químicas. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat., Esp.* **2008**, 102,79-90.
- Rynkowska, E., Fatyeyeva, K., Kujawski, W. Application of polymer-based membranas containing ionic liquids in membrane separation processes: a critical review. *Rev. Chem. Eng.*, **2018**, 34, 341–363.
- Sans, V., Gelat, F., Karbass, N., Burguete, M. I., Garcia-Verdugo, E., Luis, S. V. Polymer Cocktail: A Multitask Supported Ionic Liquid-Like Species to Facilitate Multiple and Consecutive CC Coupling Reactions. *Adv. Synth. Catal.*, **2010**, 352, 3013–3021.

Scholten, J. D., Leal, B. C., Dupont, J. Transition Metal Nanoparticle Catalysis in Ionic liquids. *ACS Catal.*, **2012**, 2, 184–200.

Sheldon, R. A. E factors, green chemistry and catalysis: an odyssey. *Chem. Comm.*, **2008**, 3352-3365.

Sheldon, R. A. Green Solvents for Sustainable Organic Synthesis: State of the Art. *Green Chem.* **2005**, 7, 267–278.

Sheldon, R. A., Pereira, P. C. Biocatalysis engineering: The big picture. *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, 46, 10, 2678-2691.

Sheldon, R. A., van Pelt, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chem. Rev. Soc.*, **2013**, 42(15), 6223- 6235.

Sheldon, R. A., Woodley, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.*, **2018**, 118, 801–838

Shi, C. Y., Xin, J. Y., Liu, X. M., Lu, X. M., Zhang, S. J. Using Sub / Supercritical CO₂ as “Phase Separation Switch” for the Efficient Production of 5-Hydroxymethylfurfural from Fructose in an Ionic Liquid/Organic Biphasic System. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **2016**, 4, 557–563.

Shi, H. H., Nie, K. X., Dong, B., Long, M. Q., Xu, H., Liu, Z. C. Recent progress of microfluidic reactors for biomedical applications. *Chem. Eng. J.*, **2019**, 361, 635–650.

Shipovskov, S., Gunaratne, H. Q. N., Seddon, K. R., Stephens, G. Catalytic activity of laccases in aqueous solutions of ionic liquids. *Green Chem.*, **2008**, 10, 806-810.

Silva, F. A. E., Pereira, J. F. B., Kurnia, K. A., Ventura, S. P. M., Silva, A. M. S., Rogers, R. D., Coutinho, J. A. P., Freire, M. G. Temperature dependency of aqueous biphasic systems: an alternative approach for exploring the differences between Coulombic-dominated salts and ionic liquids. *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 7298–7301.

Smith, A. M., Lovelock, K. R. J., Gosvami, N. N., Licence, P., Dolan, A., Welton, T. Quantized friction across ionic liquid thin films. Perkin, S. *J. Phys. Chem. Lett.*, **2013**, 4, 378-382.

Smith, E. L. Deep Eutectic Solvents (DESs) and the Metal Finishing Industry: Where Are They Now? *Trans. Inst. Met. Finish.*, **2013**, 91 (5), 241–248.

Smith, E. L., Abbott, A. P., Ryder, K. S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.*, **2014**, 114, 11060–11082.

Sureshkumar, M., Lee, C. K. Biocatalytic reactions in hydrophobic ionic liquids. *J. Mol. Cat. B Enzym.*, **2009**, 60, 1-12.

Suryawanshi, P. L., Gumfekar, S. P., Bhanvase, B. A., Sonawane, S. H., Pimplapure, M. S. Review on microreactors: Reactor fabrication, design, and cutting-edge applications. *Chem. Eng. Sci.*, **2018**, 189, 431–448.

Szyling, J., Franczyk, A., Stefanowska, K., Maciejewski, H., Walkowiak, J. Recyclable Hydroboration of Alkynes Using RuH@IL and RuH@IL / scCO₂ Catalytic Systems. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **2018**, 6, 10980–10988.

Itoh, T. Ionic Liquids as Tool to Improve Enzymatic Organic Synthesis. *Chem. Rev.*, **2017**, 117, 10567–10607.

Turner, M. B., Spear, S. K., Huddleston, J. G., Holbrey, J. D., Rogers, R. D. Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from *Trichoderma reesei*. *Green Chem.*, **2003**, 5, 443-447.

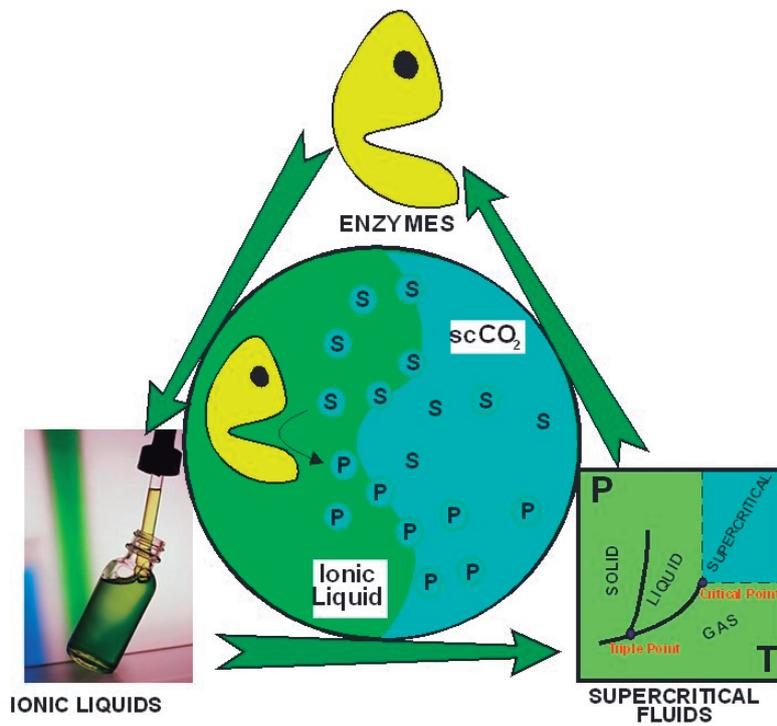
Umpierre, A. P., Machado, G., Fecher, G. H., Morais, J., Dupont, J. Selective hydrogenation of 1,3-butadiene to 1-butene by Pd(0) nanoparticles embedded in imidazolium ionic liquids. *Adv. Synth. Catal.*, **2005**, 347, 1404-1412.

United Nations General Assembly. Transforming Our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development; **2015**.

- Uppenberg, J., Patkar, S., Bergfors, T., Jones, T. A. Crystallization and Preliminary X-Ray Studies of Lipase B from *Candida antarctica*. *J. Mol. Biol.* **1994**, 235, 790–792.
- Van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. Biocatalysis in ionic liquids. *Chem. Rev.*, **2007**, 107(6), 2757–2785.
- Villa, R., Alvarez, E., Porcar, R., Garcia-Verdugo, E., Luis, S.V., Lozano, P. Ionic liquids as an enabling tool to integrate reaction and separation processes. *Green Chem.*, **2019**, 21, 6527–6544.
- Wasserscheid, P., Welton, T. (Eds.) Ionic liquids in synthesis, 2nd Edition. *Wiley-VCH*, Weinheim, **2008**.
- Welton, T. Room-temperature ionic liquids: Solvents for synthesis and catalysis. *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2071–2083.
- Welton, T. Solvents and Sustainable Chemistry. *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **2015**, 471, 1–26.
- Yao, C. Q., Zhao, Y. C., Chen, G. W. Multiphase processes with ionic liquids in microreactors: hydrodynamics, mass transfer and applications. *Chem. Eng. Sci.*, **2018**, 189, 340–359
- Yao, C., Zhao, Y., Chen, G. Multiphase processes with ionic liquids in microreactors: hydrodynamics, mass transfer and applications. *Chem. Eng. Sci.*, **2018**, 189, 340–359.
- Zhang, L., Li, Y., Liu, Q., Li W., Xing, W. Fabrication of ionic liquids-functionalized PVA catalytic composite membranes to enhance esterification by pervaporation. *J. Membr. Sci.*, **2019**, 584, 268–281.
- Zhang, M., Ettelaie, R., Yan, T., Zhang, S. J., Cheng, F. Q., Binks, B. P., Yang, H. Q. Compartmentalized Droplets for Continuous Flow Liquid–Liquid Interface Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139, 17387–17396
- Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., Jérôme, F. Deep Eutectic Solvents: Syntheses, Properties and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 7108–7146.
- Zhang, S. G., Zhang, J. H., Zhang, Y., Deng, Y. Q. Nanoconfined Ionic Liquids. *Chem. Rev.*, **2017**, 117, 6755–6833.
- Zhang, X., Hou, Y., Ettelaie, R., Guan, R., Zhang, M., Zhang, Y., Yang, H. Pickering Emulsion-Derived Liquid–Solid Hybrid Catalyst for Bridging Homogeneous and Heterogeneous Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, 141, 5220–5230.
- Zhao, Y., Yao, C., Chen, G., Yuan, Q. Highly efficient synthesis of cyclic carbonate with CO₂ catalyzed by ionic liquid in a microreactor. *Green Chem.*, **2013**, 15, 446–452.

CAPÍTULO II:

Objetivos



El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha estado centrado en el ámbito de la Química Sostenible, siendo tendente al diseño de nuevos protocolos integrados de reacción y separación. Mediante diversos ejemplos de nuevos productos de alto valor añadido, el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral se ha centrado en la combinación integrada de los procesos de transformación catalítica y de separación, gracias al empleo de herramientas sostenibles y limpias, demostrando la recuperación de todos los componentes que intervienen en el sistema de reacción. Para cumplir con el desarrollo de este objetivo principal, diferentes herramientas sostenibles, como los líquidos iónicos, los fluidos supercríticos, los DES y biocatalizadores, junto con la correcta combinación de todas ellas, han sido utilizadas en el desarrollo de los procesos biocatalíticos planteados al comienzo de esta Tesis Doctoral.

El empleo de $scCO_2$ como disolvente para el transporte de los sustratos y productos ha permitido el desarrollo de nuevos procesos de extracción de un modo sostenible. Además, se pone de manifiesto la excelente combinación del $scCO_2$ con los LIs y el comportamiento único que tienen estos sistemas, ya que dan lugar a la formación de sistemas bifásicos ampliamente utilizados para la catálisis enzimática, los cuales proporcionan nuevas oportunidades no solo para el diseño de procesos sostenibles integrados de transformación química, sino que, además, permite la extracción de los productos puros y la reutilización del LI en una sola etapa.

Como consecuencia principal de las propiedades genuinas que ofrecen los LIs, estos también pueden resultar excelentes medios de reacción en aquellas reacciones que involucren en empleo de sustratos con diferente polaridad, ya que estos sistemas capaces de disolver una gran cantidad de sustratos de diferente naturaleza. Por otro lado, la modulación del medio de reacción para minimizar el papel del agua en reacciones catalizadas por las hidrolasas, permite un claro desplazamiento del equilibrio termodinámico hacia la formación de productos y, además, mejora la actividad y estabilidad térmica de la enzima, lo que genera un alto interés en aplicaciones industriales en reacciones de esterificación, transesterificación, aminólisis, resoluciones cinéticas, etc. Otra alternativa es el empleo de Disolventes Eutécticos Profundos (DES) como medios de reacción para la síntesis biocatalítica de interés industrial.

En la actualidad hay un enorme interés por el desarrollo y diseño de nuevos procesos sostenibles de síntesis biocatalítica de compuestos con aplicaciones en la industria cosmética y farmacéutica (p. ej. ésteres de aromas, monoésteres de pantenol, surfactantes

no iónicos, nutracéuticos como monoglicéridos omega-3, etc), utilizando sustratos obtenidos a partir de fuentes naturales (p. ej. aceite de linaza y aceite de pescado, terpenos de origen vegetal, etc). No menos importante es el desarrollo de procesos químicos que ayuden a mitigar el impacto del CO₂ en el medioambiente, así como el desarrollo de nuevos materiales poliméricos que sean menos recalcitrantes. La obtención de monómeros de carbonatos cíclicos, como compuestos de partida idóneos para la producción de poliuretanos libres de isocianatos, es un buen ejemplo, ya que pueden ser sintetizados a partir de dióxido de carbono de un modo sostenible y en condiciones de reacción suaves, acudiendo una vez más a las ventajas tecnológicas que ofrecen los líquidos iónicos. En este último protocolo, no sólo se utilizan herramientas poderosas y sostenibles, sino que, además, se utiliza el CO₂ como sustrato, lo que lo convierte en un protocolo excelente para la incorporación de dicho gas en la obtención de compuestos de alto valor añadido en el sector de los plásticos.

Por todo ello, esta Tesis Doctoral aborda, mediante múltiples ejemplos prácticos, dicho objetivo principal de desarrollar nuevos procesos químicos altamente eficientes basados en transformaciones enzimáticas y quimio-enzimáticas, y en combinación con diferentes herramientas verdes, como son líquidos iónicos tipo esponja (SLIL), dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) y Disolventes Eutécticos Profundos (DES). Además, para abordar este objetivo de un modo global, se han empleado sustratos procedentes de fuentes renovables, y preferencialmente sin ningún tipo de modificación química, y con desarrollos experimentales basados en protocolos sencillos y eficientes de transformación química. Adicionalmente, se han combinado con operaciones sencillas para la separación y extracción de los productos puros, así como la recuperación y reutilización de todos los elementos que forman parte del sistema de reacción.

Este objetivo global ha sido dividido en diversos objetivos parciales, que son abordados individualmente en cada uno de los capítulos de esta Tesis Doctoral, del siguiente modo:

1. Análisis bibliográfico de revisión para aportar una visión global de los procesos catalíticos, biocatalíticos y multicatalíticos asociados a los procesos sostenibles en medios no acuosos (p. ej. fluidos supercríticos, líquidos iónicos, DES, etc.), así como su integración con procesos de separación de los productos, que permitieron definir el entorno experimental y los fundamentos científico-técnicos y

metodológicos sobre los que se sustenta la presente Tesis Doctoral. Dichos trabajos son presentados en el capítulo I, y en el anexo I.

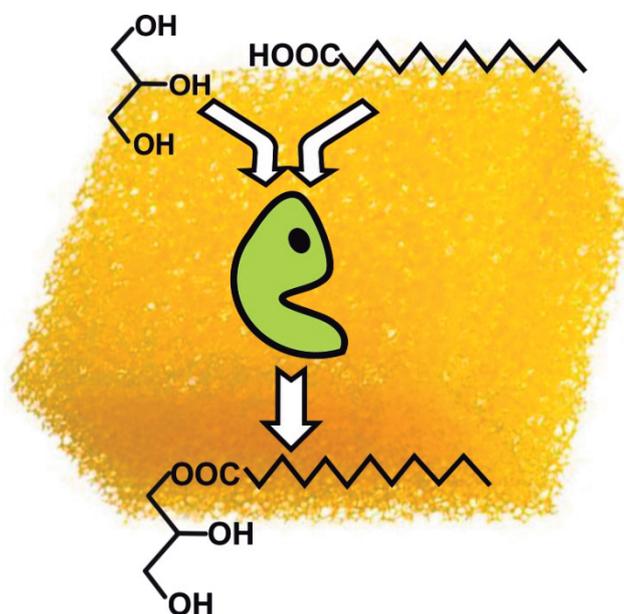
2. Las cualidades de los líquidos iónicos para el desarrollo de transformaciones enzimáticas, y el diseño de diversos sistemas de reacción / separación han sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral en relación a las propiedades fisicoquímicas de dichos solventes neotéricos, prestando especial atención a los líquidos iónicos hidrofóbicos con comportamiento tipo esponja. Estos últimos permiten el diseño de procesos sostenibles e integrados de biotransformación y de separación de los productos. Este objetivo se aborda de modo práctico mediante el estudio de la síntesis enzimática de ésteres de fragancias y aromas por esterificación directa de ácidos carboxílicos con los correspondientes alcoholes, utilizando SLILs como medios de reacción. Este estudio contempla la separación de los productos obtenidos mediante filtración, así como la recuperación y reutilización de todos los elementos que intervienen en la reacción química (enzima, SLIL, etc). Dichos trabajos son presentados en el Capítulo III, y los Anexos II y III).
3. Desarrollo de un proceso multicatalítico para la obtención monoglicéridos de ácidos grasos omega-3, que son productos nutraceuticos de gran interés en la industria farmacéutica y alimentaria. Partiendo de aceites de linaza y de pescado, como fuentes de triacilglicéridos ricos en ácidos grasos omega-3, y de solketal, se ha desarrollado un proceso quimioenzimático basado en dos etapas consecutivas, a saber, la transesterificación enzimática de los ácidos grasos con solketal, y posterior apertura del anillo del solketal mediante hidrólisis ácida controlada, para rendir los monoacilglicéridos de omega-3. Dicho objetivo fue abordado tanto mediante un sistema continuo con dos reactores en serie, que combinaba los SLILs y el $scCO_2$, así como por un proceso en discontinuo con las dos etapas catalíticas por separado. Los trabajos experimentales de este objetivo se presentan en el Capítulo IV y en el Anexo IV.
4. Diseño y desarrollo de un proceso multi-catalítico basado en la tecnología de los líquidos iónicos (p. ej. SILL, SILLPs) capaz de generar carbonatos cíclicos derivados del ácido acrílico, de gran interés para la síntesis de polímeros no isocianatos, a la vez que se contribuye a la reducción de la concentración de CO_2 en la atmósfera mediante la captura de dicho gas y su incorporación en productos de valor añadido. Dicho proceso está basado en dos etapas consecutivas, a saber, la transesterificación enzimática de ésteres del ácido acrílico con glicidol, la

posterior cicloadición quimiocatalítica de CO₂ sobre el anillo de glicidol, para rendir el correspondiente carbonato cíclico (p. ej. glicerol carbonato acrilato). La utilización de la tecnología SILLPs permitió desarrollar partículas multi-calíticas con el fin de abordar ambas transformaciones en un sistema one-pot. Los trabajos experimentales de este objetivo se presentan en el Capítulo IV y en el Anexo V.

5. Estudio del papel de las lipasas en la síntesis de compuestos bioactivos de interés para la industria cosmética, tales como los antioxidantes, las vitaminas, etc., así como el diseño de una estrategia de síntesis biocatalítica que permita su obtención directa y libres de toda traza de disolvente. Para este estudio se utilizó como ejemplo práctico la síntesis de monoésteres alifáticos de pantenol para su uso directo de uso en la industria cosmética. En dicho estudio se emplearon, tanto medios de reacción basados en líquidos iónicos tipo esponja con la implementación de la estrategia de separación de productos por filtración, como en sistemas de reacción libres de disolvente, basados en la formación de DES entre las mezclas de los sustratos (p.ej. ácido láurico y pantenol). Estos trabajos son presentados en el Capítulo V y los Anexos VI y VII.
6. Desarrollo de un proceso de enzimático de síntesis de surfactantes no iónicos (p.ej. ésteres de xilitol) en sistemas libres de disolvente, y asistidos por ultrasonidos. El empleo de sustratos procedentes de fuentes renovables, como son los ácidos grasos de diferente longitud de cadena y el xilitol, combinados con la eficiencia de la catálisis enzimática, la ausencia de disolventes, y la asistencia por los ultrasonidos, son elementos inequívocos en materia de sostenibilidad para las transformaciones químicas, que permiten abordar nuevas estrategias de síntesis con la obtención directa de productos de gran interés industrial, y de un modo rápido y sencillo. Los trabajos experimentales de este objetivo se presentan en el Capítulo V y en el Anexo VIII.

CAPÍTULO III:

Biocatálisis en Líquidos Iónicos: Diseño de procesos sostenibles basados en líquidos iónicos tipo esponja



Parte de este capítulo es una adaptación de los siguientes trabajos publicados:

- (1) Susana Nieto, **Rocío Villa**, Antonio Donaire, José L. Serrano, Pedro Lozano. Ionic Liquids in Clean and Sustainable Biocatalytic Organic Reactions. En *Encyclopedia of Ionic Liquids*. S. Zhang (ed.), pp. 1-13. 2019. Springer Nature Singapore Pte Ltd. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6739-6_30-1. (ANEXO II)
- (2) Elena Alvarez, Jose Rodriguez, **Rocío Villa**, Celia Gómez, Susana Nieto, Antonio Donaire, Pedro Lozano. Clean Enzymatic Production of Flavor Esters in Spongelike Ionic Liquids. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2019, 7 (15), 13307–13314. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b02537> (ANEXO III)

3.1. Biocatálisis: una herramienta para síntesis eficientes

El término biocatálisis hace referencia al empleo de catalizadores de origen natural o renovable, como las enzimas o microorganismos vivos capaces de llevar a cabo transformaciones químicas. Las reacciones en las que los biocatalizadores llevan a cabo una transformación química, son los ejemplos más claros de procesos limpios y sostenibles, ya que ocurren en condiciones de temperatura suave y proporcionan una alta actividad y enantioselectividad (p. ej. la síntesis de fármacos quirales). No obstante, los biocatalizadores superan los inconvenientes asociados a los catalizadores químicos tradicionales, que incluyen el alto costo, la demanda energética, bajos rendimientos, obtención de productos no deseados y reacciones inespecíficas que conllevan a la generación de residuos (Kumar *et al.*, 2016). Generalmente, los biocatalizadores simplifican los procesos, ya que no necesitan etapas de activación o desprotección de grupos funcionales, además de su origen natural, biodegradabilidad, no toxicidad y rentabilidad, entre otras propiedades, que encajan perfectamente con el objetivo principal de la Química Verde para el diseño de procesos sostenibles (Sheldon y Woodley, 2018).

Como se argumenta en el Capítulo I, entre todos los biocatalizadores, las lipasas han ganado mayor atención debido a su amplia versatilidad catalítica, y a su capacidad para mostrar una alta especificidad de sustrato, regioselectividad y reconocimiento de un determinado enantiómero en una mezcla racémica. Atendiendo a los fenómenos de desactivación enzimática, las lipasas no solo son estables en medios orgánicos, sino que además tienen actividades catalíticas distintas de la hidrolítica, por ejemplo, su capacidad para formar enlaces C-C, o C-heteroátomos. Además, la promiscuidad catalítica, junto con su alta estabilidad en disolventes orgánicos, hace que sean muy atractivas para reemplazar los catalizadores tradicionales en reacciones orgánicas, por ejemplo, en la síntesis de fármacos o biodiesel (Solano *et al.*, 2012; Perez-Sanchez *et al.*, 2013).

Sin embargo, el principal inconveniente de las enzimas en la industria química es su alto costo de producción y aislamiento y, por ello, se está realizando un gran esfuerzo en su recuperación y reutilización. Con el fin de solventar estos inconvenientes, un posible enfoque utilizado con éxito es la inmovilización de enzimas sobre diferentes soportes para catálisis heterogénea.

3.2. Biocatalizadores y líquidos iónicos: sinergia para realizar procesos químicos limpios

El agua es el disolvente natural de las enzimas, su uso es muy limitado y se descarta para la mayoría de las reacciones orgánicas debido a la escasa solubilidad de los sustratos no polares, aumento de reacciones secundarias no deseadas (p. ej. hidrólisis de productos, racemización, polimerización, etc.), y los complejos procesos de purificación. Los disolventes orgánicos, a diferencia de los medios acuosos, aumentan la solubilidad de los sustratos apolares, desplazando el equilibrio químico hacia la formación de productos. No obstante, los disolventes orgánicos representan un inconveniente importante en cuanto a la solubilidad de los sustratos polares y, lo que es más importante, van en contra de las reglas de la sostenibilidad. En este sentido, existe un creciente interés por el empleo de los disolventes neotéricos no acuosos para optimizar las biotransformaciones catalizadas por enzimas.

Como se explica en el Capítulo I, los LIs son medios no acuosos con puntos de fusión por debajo de 100 °C constituidos íntegramente por iones. Así, una de las propiedades más relevantes de los LIs para la biocatálisis es su alta polaridad, lo que explica su gran capacidad para disolver una gran variedad de sustratos, (Reichardt, 2005) ya sean orgánicos, inorgánicos, poliméricos o incluso recalcitrante, permitiendo la explotación de cualquier recurso y el manejo de los residuos resultantes (Cevasco y Chiappe, 2014). Hasta la fecha, se han realizado diferentes reacciones de síntesis orgánica en líquidos iónicos, tales como hidroformilación, hidrogenación, epoxidación, alquilaciones de Friedel-Crafts, cicloadiciones de Diels-Alder y reacciones catalizadas por metales. En algunos casos, los LIs asumen un papel más relevante en la catálisis, ya sea mejorando la velocidad, la selectividad o la enantioselectividad o mimetizando una actividad biocatalítica (Tao *et al.*, 2016).

El concepto de sostenibilidad en los procesos biocatalíticos en LIs tiene especial relevancia debido a varias propiedades relevantes a ellos. En primer lugar, su excelente poder de solvatación, que permite el acceso del sustrato al centro activo del biocatalizador, generando una mejora significativa en el rendimiento del proceso. Tradicionalmente, el uso de sustratos con diferente polaridad ha dificultado la posibilidad de obtener medios homogéneos, pero los LIs son capaces de disolver sustratos de diferente naturaleza de manera eficaz. En segundo lugar, su capacidad para actuar sobre

sustratos poliméricos recalcitrante ofrece el desarrollo de nuevos procesos biocatalíticos para la síntesis de productos de alto valor añadido. En tercer lugar, el hecho de que los LIs son medios no acuosos permite llevar a cabo otras actividades catalíticas en condiciones anhidras (p. ej. reacciones de (trans)esterificación o amidación cuyos productos se hidrolizan en medio acuoso). En cuarto lugar, los LIs influyen en el rendimiento del biocatalizador, mejorando su estabilidad y (enantio)selectividad. En quinto lugar, su alta densidad y su amplio rango de miscibilidad los convierte en sistemas adecuados para desarrollar estrategias de síntesis y extracción / separación de productos. Finalmente, los LIs inmiscibles en agua permiten la estabilización térmica de los biocatalizadores y su uso en varios ciclos de operación (Lozano, 2010).

Aunque el agua es un requisito fundamental para mantener la estructura activa de las enzimas, se ha demostrado que solo un contenido de agua de un 10% en peso aproximadamente es suficiente para asegurar la actividad de la misma (Tsuzuki *et al.*, 2003) y, debido al carácter higroscópico de los LIs, estos promueven la estabilización de la enzima y su actividad. Sin embargo, es necesario conocer en detalle la estructura de la red iónica para comprender la capacidad de estos LIs hidrofóbicos para incorporar macromoléculas, sustratos polares e incluso moléculas de agua. En este sentido, los LIs basados en catión imidazolio han mostrado tener una organización estructurada con secciones polares y no polares en un alto grado de direccionalidad en la red, lo que ha llevado a concluir que son sistemas nanoestructurados (Consorti *et al.*, 2005). La existencia de huecos de diferentes polaridades permite la acomodación y una fuerte unión de las moléculas. Si dichas moléculas son biocatalizadores, ello conlleva su inmovilización en la fase LI, permitiendo su recuperación y la fácil extracción de los productos mediante extracción líquido-líquido con disolventes inmiscibles, ultrafiltración, presión reducida o fluidos supercríticos. Además, el entorno fuertemente hidrófobo de los LIs contribuye en la actividad enzimática y la estabilización frente a la desactivación térmica. De hecho, las enzimas en LIs hidrófobos quedan rodeadas por una capa de moléculas de agua que se conservan en la red del LI (**Figura 3.1**). No obstante, esta red dificulta el aumento de la energía cinética de las moléculas de agua con la temperatura, lo que permite utilizar temperaturas por encima de la temperatura óptima del biocatalizador en medio acuoso, favoreciendo la solubilización y difusión de los sustratos.

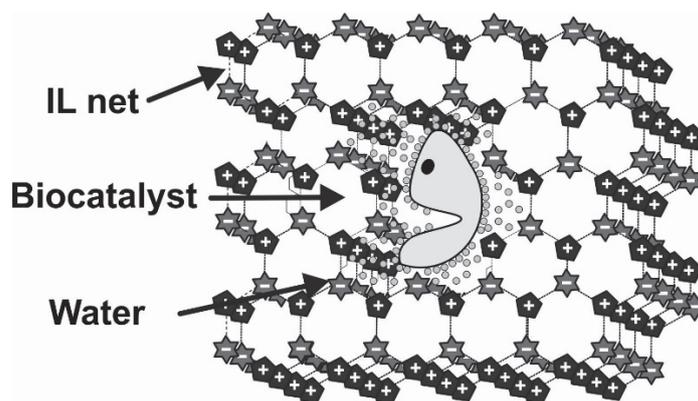


Figura 3.1. Esquema de la estructura supramolecular 3D de las IL de imidazolio, donde un catión de imidazolio está rodeado por al menos tres aniones y viceversa. La estructura se mantiene mediante interacciones de enlaces de hidrógeno. Dentro de un espacio de una red de LI hidrófobo hay una enzima hidratada en conformación nativa.

3.3. Ejemplos de reacciones orgánicas mediante biocatálisis en LIs

En el año 2000, la síntesis de *Z*-aspartamo catalizada por termolisina fue la primera reacción biocatalítica utilizando un LI como medio de reacción (Erbeldinger *et al.*, 2000). Años posteriores, el grupo de investigación de Sheldon estudió la actividad catalítica de lipasa en $[C_4mim][BF_4]$ y $[C_4mim][PF_6]$, en la reacción de transesterificación de 1-butanol, la aminólisis de octanoato de etilo y la regeneración de ácido per-octanoico durante la síntesis de ácidos peroxicarboxílicos, obteniendo resultados muy similares en medios orgánicos. Desde entonces, la idoneidad de los LIs como disolventes alternativos para las biotransformaciones catalizadas por enzimas ha sido ampliamente estudiada en sistemas monofásicos y multifásicos, los cuales utilizan disolventes inmiscibles o fluidos supercríticos. En este sentido, la gran estabilidad, fácil disponibilidad y promiscuidad de las lipasas han despertado especial interés por parte de la industria química para el desarrollo de nuevos procesos sostenibles. En la siguiente tabla se resumen algunos ejemplos representativos de reacciones orgánicas catalizadas por enzimas en LIs como medios de reacción.

Cabe destacar que la reacción de (trans)esterificación catalizada por lipasas es la más ampliamente utilizada en la síntesis de productos químicos industriales, donde los LIs han contribuido en la solubilización eficiente de sustratos y en la reutilización de todos los elementos que intervienen en una reacción determinada. A modo de ejemplo, se han utilizado LIs con catión imidazolio para la transesterificación de alcoholes primarios por lipasa y α -quimiotripsina, mejorando la estabilidad de la enzima en comparación con la misma reacción en disolventes orgánicos. Por otro lado, la síntesis de fragancias para su

uso en aplicaciones cosméticas, utilizando [Bmim][PF₆] como medio de reacción, y un sistema de doble per-vaporación con membranas hidrofóbicas e hidrofílicas para la recuperación del producto y la eliminación de agua respectivamente (Gubicza *et al.*, 2008).

Tabla 3.1. Ejemplos de reacciones orgánicas realizadas por enzimas en líquidos iónicos

Enzima	Líquido Iónico	Reacción	Referencia
Termolisina	[Bmim][PF ₆], [Z-Asp][TBP]	Síntesis de Z- aspartamo	(Erbeldinger <i>et al.</i> , 2000; Furukawa <i>et al.</i> , 2013)
Lipasa	[C ₁₂ mim][NTf ₂], [Bmim][PF ₆], [C ₅ CNtma][NTf ₂]	Esterificación de alcoholes	(Gubicza <i>et al.</i> , 2008; Lozano <i>et al.</i> , 2003; Lozano <i>et al.</i> , 2012; Lozano <i>et al.</i> , 2017)
Lipasa	[Bmim][NTf ₂]	Resolución cinética de rac-ibuprofeno	(Miyako <i>et al.</i> , 2003)
Lipasa	[Btma][NTf ₂]	Resolución cinética dinámica de feniletanol	(Lozano <i>et al.</i> , 2007)
α- Quimiotripsina	[Omim][PF ₆]	Transesterificación de N-acetil-L- fenilalanina	(Laszlo y Compton, 2001)
Lacasa	[Emim][EtSO ₄]	Degradación de lignina	(Wallraf <i>et al.</i> , 2018)
Anhidrasa Carbónica	[Bmim][NTf ₂]	Síntesis de HCO ₃ ⁻	(Neves <i>et al.</i> , 2012)

Teniendo en cuenta la enantioselectividad que presentan los procesos biocatalíticos, la resolución cinética de mezclas racémicas para su purificación es de gran importancia en la industria farmacéutica. Un ejemplo es la resolución cinética de S-ibuprofeno, que fue posible gracias al acoplamiento de dos transformaciones catalizadas por lipasas en un reactor de membrana con LI [Bmim][NTf₂] soportado. Esta estrategia permite un transporte enantioselectivo de compuestos orgánicos, posterior a su hidrofobización (p. ej. por esterificación enantioselectiva mediante una lipasa). Tal como se muestra en la siguiente Figura, el isómero esterificado atraviesa selectivamente la membrana hidrofóbica con permeabilidad selectiva soportada por el LI. La posterior intervención de una segunda lipasa se hidroliza el enantiómero S (**Figura 3.2**) (Miyako *et al.*, 2003).

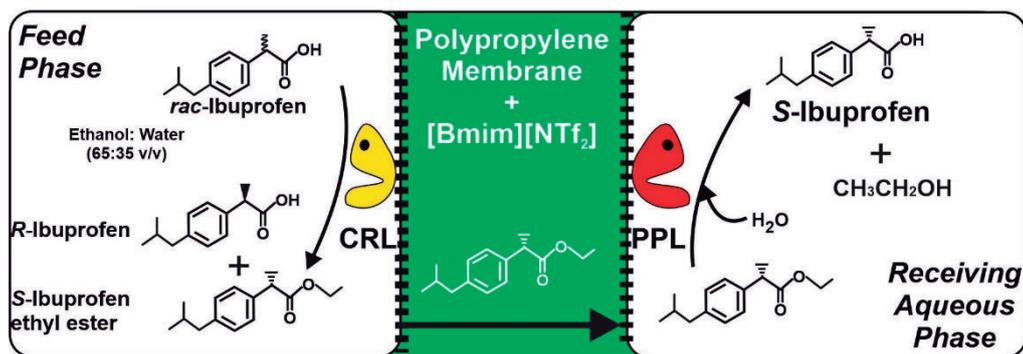


Figura 3.2. Resolución de S-ibuprofeno mediante LI soportado en membranas de polipropileno. El compartimento izquierdo contiene una mezcla de moléculas racémicas de R, S-ibuprofeno en metanol-agua. La acción de la lipasa de *Candida rugosa* solo produce el éster S, que atraviesa la membrana de polipropileno. En el compartimento derecho, la hidrólisis del S-éster catalizada por la lipasa del páncreas porcino (PPL) lleva al producto exclusivo S-ibuprofeno.

3.4. Líquidos iónicos tipo esponja (SLIL) en procesos biocatalíticos

Los procesos de síntesis biocatalítica en LIs no pueden considerarse totalmente sostenibles cuando la extracción del producto necesite el empleo de disolventes orgánicos. En este sentido, los líquidos iónicos tipo esponja han surgido como una alternativa que proporciona la síntesis y extracción de los productos de un modo limpio, sencillo y de bajo costo, simplificando en general los procesos. Como se indica brevemente en el Capítulo I, este tipo de LIs es capaz de absorber los componentes de una reacción y liberar los productos “exprimiéndolos” como una esponja. Para que este fenómeno sea posible, los LIs que presentan este comportamiento deben cumplir dos requisitos imprescindibles. En primer lugar, deben tener carácter hidrofóbico y, en segundo lugar, la temperatura de fusión tiene que ser superior a la temperatura ambiente. La combinación de ambas propiedades es posible cuando se emplean cationes de larga longitud de cadena alquílica, y combinados con aniones hidrofóbicos, por ejemplo [NTf₂] (Lozano et al., 2015). En este sentido, las cadenas laterales alquílicas se disponen en paralelo y quedan rodeadas por los aniones, por lo que se genera un microambiente con diferentes polaridades que se asemeja a la distribución de una bicapa lipídica. Esta estructura se genera mediante la formación de enlaces por puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals entre las cadenas alquílicas, así como mediante interacciones por apilamiento π - π entre los anillos heterocíclicos adyacentes, tal como se observó en el estudio de la nanoestructura de la bicapa de LI de alquil metilimidazolio (Iwashashi et al., 2009). Por otro lado, también ha sido descrito el dinamismo de los

agujeros hidrofóbicos debido a la flexibilidad de la estructura de la red iónica. Dicha flexibilidad supone un factor clave para albergar moléculas de distinta polaridad en los huecos del LI (Hayes *et al.*, 2015).

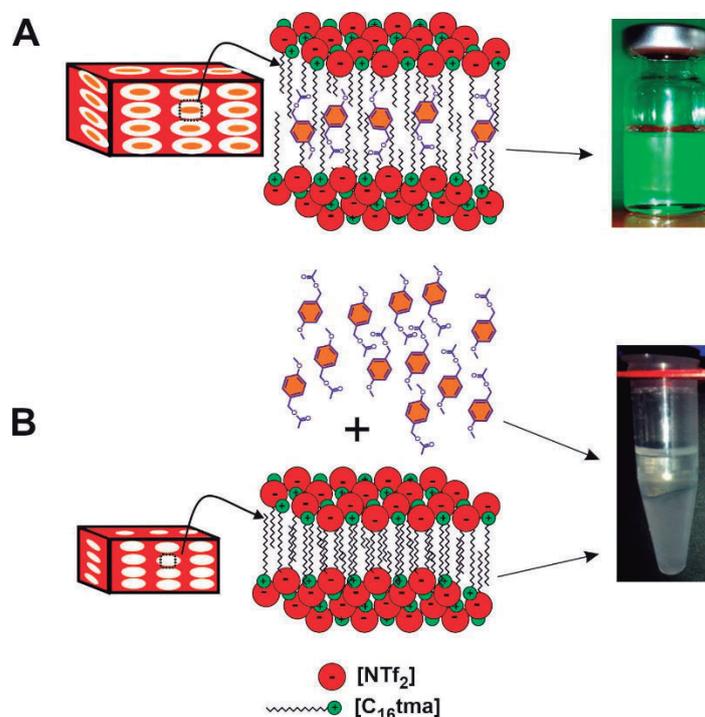


Figura 3.3. Comportamiento tipo esponja de $[C_{18}tma][NTf_2]$ en la síntesis biocatalítica de acetato de anisilo. (a) La distribución de cadenas laterales alquílicas distribuidas de forma paralela de los cationes da como resultado agujeros hidrofóbicos capaces de alojar el acetato de anisilo y empujar la red iónica con el producto. (b) Las centrifugaciones consecutivas a temperaturas decrecientes expulsan el éster de aroma y compactan la red iónica, donde los espacios hidrofóbicos están rodeados por los aniones $[NTf_2]$ como en una bicapa lipídica.

Atendiendo a las propiedades excepcionales de estos sistemas nanoestructurados, ha sido posible desarrollar diversos enfoques sostenibles para la síntesis y purificación de una gran cantidad de productos de alto valor añadido en función de sus puntos de fusión mediante variaciones de temperatura. A temperaturas superiores a las del punto de fusión del SLIL, este absorbe los componentes de la reacción como una esponja (**Figura 3.3**), quedando estos incluidos en su nanoestructura hidrofóbicos hasta generar un medio de reacción totalmente homogéneo. Posteriormente, mediante descensos leves y sucesivos de temperatura, combinados con etapas de centrifugación, se compacta la matriz iónica en forma de sólido mientras se expulsan los productos, dando lugar a la formación de un sistema bifásico que contiene el LI en la parte inferior en estado sólido como consecuencia del enfriamiento y, el producto líquido puro en la fase superior. Este protocolo de extracción, basado en la combinación de rápidas etapas de enfriamiento y

centrifugación aparenta ser proceso más económico y sostenible, en comparación con otros procedimientos que requieren el empleo de técnicas convencionales como la destilación o técnicas que implican un alto gasto energético.

Este comportamiento similar a una esponja se describió por primera vez en la esterificación de aromas catalizada por lipasas en SLIL [C₁₆mim][NTf₂] (Lozano *et al.*, 2012). Al comienzo de esta investigación, el objetivo de utilizar LIs con cationes imidazolio de con larga longitud de cadena alquílica era solventar los problemas relacionados con la solubilidad y miscibilidad de los ácidos carboxílicos y los alcoholes, así como evitar la desactivación enzimática como consecuencia de la alta concentración de los sustratos. De este modo, fue posible obtener rendimientos del producto del 100 %, y, simultáneamente, generar un efecto estabilizador sobre el biocatalizador en estas condiciones tan adversas de alta concentración de ácido. En esta investigación, el comportamiento inesperado de esponja permitió la generación de un sistema de dos fases con el producto puro en estado líquido extraído en la fase superior, y los LI precipitados en la parte inferior, lo que permitió el desarrollo de un protocolo sostenible para las reacciones de síntesis de aromas en SLIL como medio de biotransformación / extracción de los ésteres de terpenos obtenidos (**Figura 3.4 A**). Además, es muy importante destacar que los productos obtenidos se analizaron mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (¹⁹F-RMN), confirmando su pureza (productos libres de trazas de LI). En este sentido, la sostenibilidad de este protocolo radica en la economía atómica y eficiencia energética relacionada con la extracción de los productos, la ausencia de disolventes orgánicos volátiles en el proceso y la recuperación y reutilización del LI y biocatalizador.

Desde el punto de vista aplicado, esta estrategia ha sido estudiada en detalle en la síntesis de otros compuestos de alto añadido como son biodiesel y los monoglicéridos. En el caso de la síntesis de biodiesel, el protocolo desarrollado con SLIL proporcionó rendimientos cercanos al 100%, donde el [C₁₈tma][NTf₂] muestra un comportamiento muy interesante, ya que su interacción con los triacilglicéridos (TAGs) y el biodiesel genera un medio líquido a 60 °C, una temperatura inferior a la del punto de fusión del propio LI (Lozano *et al.*, 2013). En este sentido, la idoneidad de los SLILs para la síntesis de biodiesel se ha examinado a un mayor nivel en la síntesis de FAMEs (ésteres metílicos de ácidos grasos) y FASEs (ésteres solketílicos de ácidos grasos, un aditivo de biodiesel) a partir de mezclas de alcoholes (metanol o solketal), y diferentes fuentes de

partida (TAGs o ácidos grasos libres). Así, los mejores resultados obtenidos en la síntesis biocatalítica del biodiesel fueron con el LI $[C_{18}tma][NTf_2]$, que dio como resultado rendimientos cercanos al 100% y alta selectividad (aprox. 80% para FAME y 20% para FASE) (Lozano *et al.*, 2016). Además, dado que la mezcla de reacción es inmiscible con agua, la adición de agua al medio permite la obtención de un sistema trifásico, con la recuperación del subproducto glicerol en la fase acuosa. Así, la adición de agua al medio resultante genera un medio heterogéneo que tras enfriamiento y centrifugación se separa en tres fases diferentes: (1) SLIL sólido en la parte inferior, (2) una fase acuosa intermedia que contiene los componentes hidrofílicos (glicerol y alcohol), y (3) una fase de biodiesel puro en estado líquido en la parte superior (**Figura 3.4 B**).

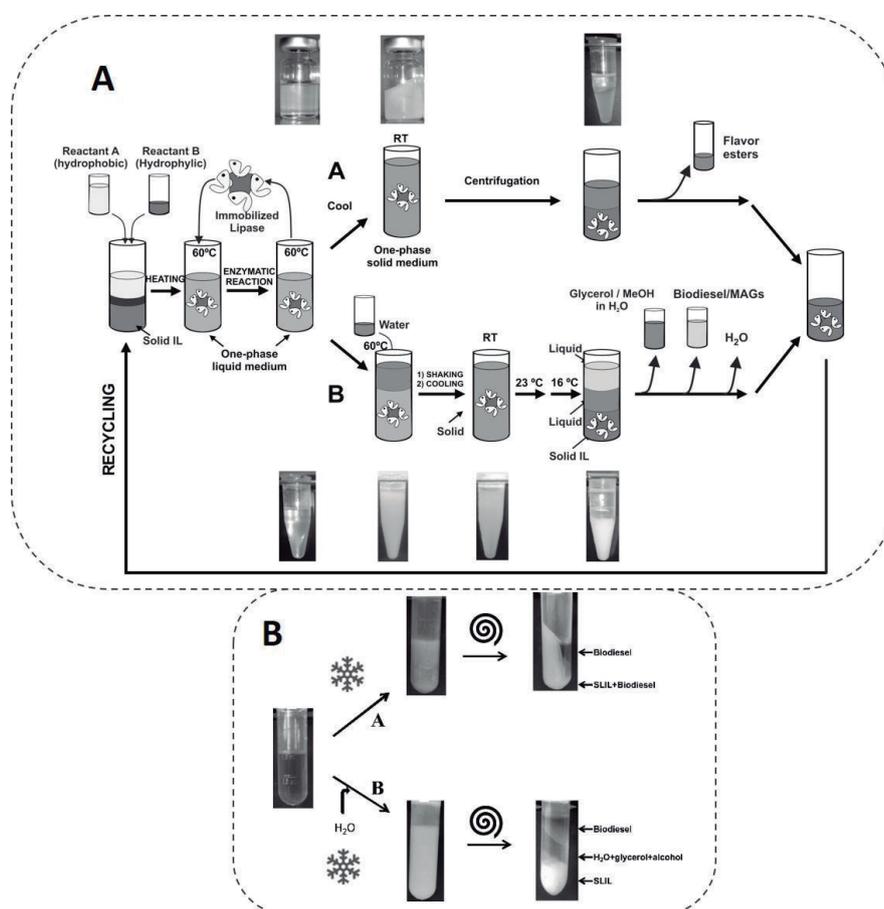


Figura 3.4. (A) Esquema de biosíntesis y extracción de producto en SLILs. En este protocolo se modula la temperatura para proporcionar medios líquidos homogéneos en la biosíntesis y extracción de productos puros. Se muestran dos estrategias basadas en las características de la reacción. (A) Centrifugaciones iterativas directas a temperaturas decrecientes para expulsar los productos. (B) Etapas de lavado con agua seguidas de centrifugación. (B) Extracción de combustibles oxigenados de residuos de aceite de cocina. Se ensayaron dos estrategias diferentes para la recuperación de biodiesel de los medios de reacción homogéneos. (a) Enfriamiento y centrifugación, que permiten una liberación limitada de biodiesel (b) Adición de agua y enfriamiento, que condujo a un medio sólido heterogéneo que, cuando se sometió a centrifugaciones iterativas a temperaturas decrecientes, dio como resultado tres fases separadas con el biodiesel en la parte superior.

La idoneidad de los SLILs también se ha demostrado en la síntesis quimio-enzimática de monoglicéridos (MAGs, emulsionantes y tensioactivos de alto valor añadido en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, textil, etc. (Villa *et al.*, 2019). Los requisitos y los costos resultantes de la ineficiencia de los catalizadores inorgánicos, el enfoque tradicional de la síntesis orgánica de MAGs también debe ser rediseñado atendiendo a los conceptos de sostenibilidad. Sin embargo, los MAGs muestran polaridades diferentes a las de sus precursores, los triacilglicéridos (TAGs), lo que dificulta la elección de un disolvente que solubilice ambas especies. Este problema se solventó mediante el uso de LIs anfífilicos (p. ej. metosulfato de cocosalquil pentaetoxi metil amonio, CPMA.MS), que interactúan con los hidroxilos libres de los MAGs, permitiendo su solubilización con rendimientos del 90% aproximadamente (Zuo y Xu, 2005). Sin embargo, la dificultad para extraer los productos con un enfoque verde y limpio es la principal desventaja de esta estrategia. Adicionalmente, cabe destacar la esterificación directa de glicerol con ácidos grasos libres en SLIL, considerada como una excelente alternativa a este proceso. Como se menciona anteriormente, adaptar la hidrofobicidad de SLIL es un factor clave para asegurar la solubilización de todas las especies que intervienen en la reacción química. Así, las diferentes combinaciones de cationes con larga longitud de cadena alquílica y aniones como [NTf₂] y [BF₄], demuestran la idoneidad y la correcta elección del medio de reacción para llevar a cabo el proceso biocatalítico de forma eficiente. El mejor resultado se obtiene cuando el catión del LI se asemeja a la longitud de la cadena alquílica del ácido graso libre de partida, y la mayor especificidad se obtiene con el anión menos hidrófobo, [BF₄] (Lozano *et al.*, 2017). Estos resultados demuestran, una vez más, la importancia del disolvente utilizado en los procesos biocatalíticos.

3.5. Nuevos desarrollos en la síntesis biocatalítica de fragancias en SLILs

Con el objetivo de demostrar la idoneidad de los líquidos iónicos tipo esponja como medios de reacción / extracción, se realizó la síntesis biocatalítica de 16 ésteres distintos de fragancias mediante la esterificación directa entre ácidos carboxílicos alifáticos (p. ej., ácido acético, propiónico, etc.) con un alcohol (p. ej. alcohol cinamílico, alcohol bencílico, anisílico, *rac*-1-feniletanol o *rac*-sulcatol). Para ello se utilizaron LIs hidrofóbicos basados en cationes de amonio o de imidazolio

de cadena alquílica como medios de reacción (p. ej. $[C_{16}tma][NTf_2]$), obteniendo resultados notables con rendimientos cercanos al 100% para todos los ésteres sintetizados (Figura 3.5).

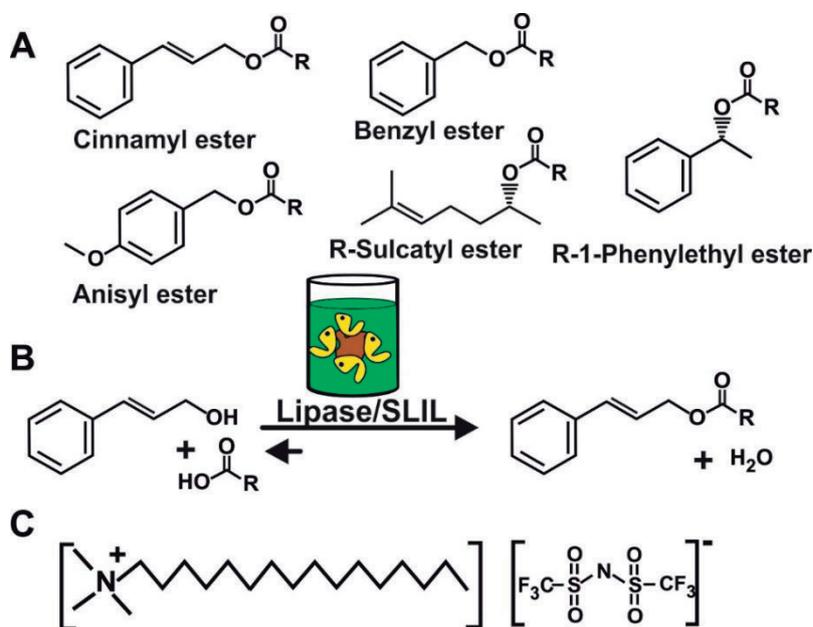


Figura 3.5. (A) Estructura de los ésteres de fragancias obtenidos en este capítulo mediante esterificación directa catalizada por la lipasa inmovilizada. (B) Esquema de la reacción enzimática de esterificación del alcohol cinámico con ácidos carboxílicos en SLILs. (C). Estructura del $[C_{16}tma][NTf_2]$, como ejemplo de líquido iónico tipo esponja (SLILs), utilizado como medio de reacción para la síntesis enzimática de ésteres de fragancias.

Los ésteres de ácidos carboxílicos de cadena corta con alcoholes terpénicos y fragancias aromatizantes (p. ej. acetato de geranilo) tienen gran interés en la industria cosmética, farmacéutica o alimentaria, para la fabricación de desodorantes, champús, lociones corporales, etc (Khan y Rathod, 2015). En este sentido, es necesario destacar que la síntesis química convencional de este tipo de compuestos está basada en el empleo de disolventes orgánicos volátiles como medios de reacción, y los productos obtenidos quedan legalmente excluidos para su etiquetado como “producto natural” (Sa *et al.*, 2017).

En un intento por desarrollar protocolos sencillos y sostenibles para la producción de ésteres de aromas, se ha estudiado la excelente idoneidad de las lipasas inmovilizadas combinadas con SLILs para llevar a cabo procesos integrados de transformación y separación de productos puros. En esta investigación, se analizó también la influencia de la naturaleza y la concentración de SLIL durante el proceso catalítico, así como la tecnología de separación por membranas para la obtención de un producto libre de ILs

mediante el estudio de la influencia del tamaño de los poros de la membrana de filtración y la temperatura de enfriamiento durante la etapa de separación, con el fin de mejorar la eficiencia del proceso.

Las reacciones de síntesis enzimática de ésteres de aromas se llevaron a cabo en diferentes medios de reacción a una relación molar alcohol / ácido 3:2 a 50 °C. Así, la reacción en ausencia de disolvente dio como rendimiento un 5,6% a las 4 horas de reacción, que aumentó a un 20,6% en presencia de un agente desecante para retirar las moléculas de agua formadas y, desplazar el equilibrio químico hacia la formación del producto. Estos resultados no mejoraron a tiempos de reacción más largos, probablemente debido a la desactivación enzimática por la presencia de la alta concentración de ácido (3,7 M). Sin embargo, cuando el medio de reacción contenía el SLIL [C₁₆tma][NTf₂] y la presencia de un agente deshidratante, el rendimiento obtenido después de 4 horas de reacción fue muy próximo al 100%, tal como se destaca en la Figura 3 del anexo III. Además, es muy importante mencionar la excelente estabilidad de las enzimas en LI inmiscibles en agua, que se ha atribuido al mantenimiento de la conformación nativa de las proteínas. Otros grupos de investigación demostraron la reacción de esterificación ácido propiónico y alcohol bencílico en ausencia de disolvente y en *tert*-butanol después de 24 horas a 50 °C (Sa *et al.*, 2018). Al utilizar tamices moleculares como agentes capturadores de agua, y con un aumento de la temperatura a 65 °C, se observó un incremento en el rendimiento (65 %) después de 24 horas de reacción (Meneses *et al.*, 2019).

Además, en el estudio de la síntesis enzimática de los ésteres de aromas en SLIL, fue posible observar la mejor actividad de Novozym 435 para la síntesis de propionato de cinamilo con respecto a otras lipasas inmovilizadas (p. ej. Lypozyme TL, Lypozyme RM). Estas dos últimas lipasas dieron en torno a un 7% de rendimiento de producto después de 24 horas de reacción, mientras que la actividad catalítica de Novozym 435 llevó a rendimientos próximos al 100% en las mismas condiciones. De este modo, se obtuvieron resultados muy similares para la síntesis de propionato de bencilo, y acetato de isoamilo (Yadav *et al.*, 2012), donde se propusieron algunos factores influyentes para explicar esta diferencia en la eficacia de las lipasas con respecto a Novozym 435, siendo la fuente de enzima y el método de inmovilización y soporte probablemente los causantes de la modificación de las propiedades y actividades de las mismas. Por otro lado, cabe destacar que el uso de LIs constituidos por aniones como [BF₄] o [PF₆] dieron como

resultado un rendimiento en torno al 10%, mientras que LIs con aniones como más hidrofóbicos, como [NTf₂], mostraron ser excelentes medio de reacción para la síntesis de propionato de cinamilo. Además, los LIs basados en cationes con mayor longitud de cadena alquílica mejoraron los rendimientos del producto.

Adicionalmente, también se estudió la influencia de la concentración de LI [C₁₆tma][NTf₂] (10, 20, 30, 40 y 50 % p/v) en la síntesis de propionato de cinamilo catalizada por Novozym mediante la esterificación directa de ácido propiónico y alcohol de cinamilo después de 1 hora de reacción a 50 °C. En este estudio, tanto la actividad sintética como el rendimiento del producto mejoraron con el aumento en el contenido de LI, obteniendo los mejores resultados (90% de rendimiento de propionato de cinamilo y 1004 U / g de IME) al 50% (p/v). Una vez más, estos resultados podrían estar relacionados con el efecto protector excepcional de los SLILs sobre las enzimas en ambientes no acuosos frente a los fenómenos de desactivación promovidos por algunos disolventes orgánicos (Lozano *et al.*, 2015). Por otro lado, se evaluó la influencia de la relación molar ácido / alcohol sobre el rendimiento de propionato de cinamilo obtenido por Novozyme 435 en [C₁₆tma][NTf₂] al 50% a 50°C. Usando una mezcla de sustrato de ácido propiónico / alcohol cinámico 1: 1 (mol / mol), se obtuvo un rendimiento de producto del 89% después de 4 horas de reacción, que no aumentó a tiempos de reacción más largos. Sin embargo, el uso de relaciones molares 2:3, 1:2 y 1:3 de ácido propiónico / alcohol cinámico condujo a rendimientos de producto del 99% después de 4 horas. Además, cabe destacar la excelente enantioselectividad mostrada por Novozym 435 para la resolución cinética de *rac*-1-feniletanol y *rac*-surcatol con rendimientos cercanos al 50% de exceso enantiomérico.

En este contexto, se mostró por primera vez un enfoque novedoso y sostenible que, mediante la incorporación de la tecnología de filtración por membrana, permitió la síntesis y separación de 16 ésteres de aromas distintos mediante esterificación directa de diferentes ácidos carboxílicos y alcoholes utilizando una lipasa como biocatalizador y diferentes SLILs como medio de reacción. Dicho enfoque proporcionó productos puros y libres de LI (pureza > 99,5%) y rendimientos superiores al 95 % en todos los casos.

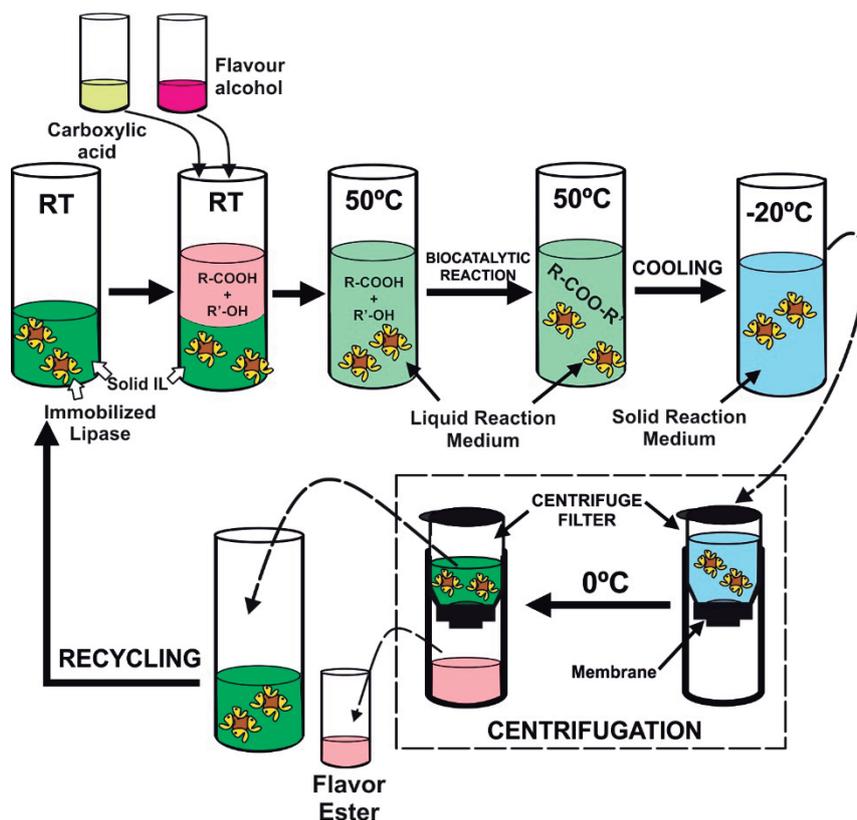


Figura 3.6. Esquema del protocolo cíclico para la producción de propionato de cinámico mediante la esterificación de ácido propiónico catalizada por Novozym 435 con alcohol cinámico en 50% (p/p) $[C_{16}tma][NTf_2]$ a 50 ° C, incluida la recuperación y reutilización de la enzima y SLIL (Alvarez *et al.*, 2019).

Una vez más, se ha podido poner de manifiesto las excelentes propiedades de los LIs para proporcionar un microambiente idóneo en la actividad catalítica de la lipasa B de *Candida antarctica*, cuyo sistema se mantuvo activo e inalterado durante varios ciclos operacionales. Por otro lado, el comportamiento tipo esponja permitió la separación sencilla y limpia de los productos mediante protocolos de enfriamiento / centrifugación y, mejorando los resultados con el uso de filtros de membrana (**Figura 3.6**). Mediante este protocolo, se garantiza una recuperación total del SLIL y de la enzima inmovilizada, para su posterior reutilización, abundando en la sostenibilidad de la estrategia descrita.

3.6. Conclusión

Como una estrategia alternativa a la síntesis orgánica tradicional, los procesos biocatalíticos surgen como una excelente herramienta habilitadora para mejorar las reacciones orgánicas, teniendo en cuenta el concepto de sostenibilidad. Además, resulta decisivo el empleo de disolventes verdes para llevar a cabo dichas reacciones sin comprometer la actividad del biocatalizador.

En este contexto, los LIs han demostrado ser idóneos para procesos biocatalíticos mejorando la eficiencia de las reacciones de esterificación catalizadas por lipasas. Esta excepcional combinación de LIs y enzimas ofrece propiedades sinérgicas importantes para el desarrollo de procesos sostenibles de síntesis y purificación y, además, una alta economía atómica de los procesos a través de la síntesis más específica y la recuperación del medio de reacción y biocatalizador para su posterior reutilización. Además, el comportamiento tipo esponja mostrado por algunos LIs, ha supuesto una revolución para el diseño de nuevos procesos orgánicos sostenibles, proporcionando mejores rendimientos y metodologías más económicas para la extracción de los productos puros. No obstante, la ausencia de disolventes para la extracción de los mismo junto con la reutilización de todos los elementos que intervienen en la reacción (biocatalizador, SLIL, etc.) mejoran el “verdor” y la competitividad económica de las reacciones orgánicas.

Una aplicación de gran interés en la industria química alimentaria, cosmética y farmacéutica es la síntesis biocatalítica de ésteres de aromas mediante esterificación directa de ácidos carboxílicos con alcoholes en SLILs, con rendimientos de productos puros muy próximos al 100%. Además, el comportamiento tipo esponja permitió un enfoque sencillo para la separación limpia de los productos de éster de sabor mediante enfriamiento / centrifugación utilizando filtros de membrana. Los resultados obtenidos apuntaron claramente a una forma sostenible de preparar aromas y fragancias "naturales" a partir de sustratos sencillos obtenidos de fuentes "naturales", lo que podría estimular el desarrollo de procesos químicos verdes a nivel industrial.

La parte experimental de los resultados presentados se pueden consultar en el **ANEXO III**.

3.7. Bibliografía

Alvarez, E., Rodriguez, J., Villa, R., Gomez, C., Nieto, S., Donaire, A., Lozano, P. Clean Enzymatic Production of Flavor Esters in Spongelike Ionic Liquids. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2019**, 7, 15, 13307–13314.

Cevasco, G., Chiappe, C. Are ionic liquids a proper solution to current environmental challenges? *Green Chem.*, **2014**, 16, 2375–2385.

Consorti, S., Suarez, P. A. Z., de Souza, R. F., Burrow, R. A., Farrar, D. H., Lough, A. J., Loh, W., da Silva, L. H. M., Dupont, J. Identification of 1,3-dialkylimidazolium salt supramolecular aggregates in solution. *J Phys Chem B.*, **2005**, 109:4341–4349

De Meneses, A. C., Almeida Sa, A. G., Lerin, L. A., Corazza, M. L., de Araujo, P. H. H., Sayer, C., de Oliveira, D. Benzyl butyrate esterification mediated by immobilized lipases: Evaluation of batch and fed-batch reactors to overcome lipase-acid deactivation. *Process Biochem.* **2019**, 78, 50–57.

Furukawa, S., Hasegawa, K., Fuke, I., Kittaka, K., Nakakoba, T., Goto, M., Kamiya, N. Enzymatic synthesis of *Z*-aspartame in liquefied amino acid substrates. *Biochem Eng J.*, **2013**, 70, 84–87.

Gubicza, L., Belafi-Bako, K., Feher, E., Frater, T. Waste-free process for continuous flow enzymatic esterification using a double pervaporation system. *Green Chem.*, **2008**, 10, 1284–1287.

Guo, Z., Xu, X.B. New opportunity for enzymatic modification of fats and oils with industrial potentials. *Org Biomol Chem.*, **2005**, 3, 2615–2619.

Hayes, R., Warr, G. G., Atkin, R. Structure and nanostructure in ionic liquids. *Chem Rev.*, **2015**, 115, 6357–6426.

Iwahashi, T., Nishi, T., Yamane, H., Miyamae, T., Kanai, K., Seki, K., Kim, D., Ouchi, Y. Surface structural study on ionic liquids using metastable atom electron spectroscopy. *J Phys Chem.*, **2009**, 113, 19237-19243.

Khan, N. R., Rathod, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. *Process Biochem.* **2015**, 50, 1793–1806.

Kumar, A., Dhar, K., Kanwar, S. S., Arora, P. K. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. *Biol Proced Online.* **2016**, 18:1

Laszlo, J. A., Compton, D. L. Alpha-chymotrypsin catalysis in imidazolium-based ionic liquids. *Biotechnol Bioeng.*, **2001**, 75, 181–186.

Lozano, P., De Diego, T., Guegan, J. P., Vaultier, M., Iborra, J. L. Stabilization of alpha-chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions. *Biotechnol Bioeng.*, **2001**, 75:563–569.

Lozano, P., De Diego, T., Carrie, D., Vaultier, M., Iborra, J. L. Enzymatic ester synthesis in ionic liquids. *J Mol Catal B Enzym.*, **2003**, 21, 9–13.

Lozano, P., De Diego, T., Mira, C., Montague, K., Vaultier, M., Iborra, J. L. Long term continuous chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of rac-1- phenylethanol using ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Green Chem.*, **2009**, 11, 538–542.

Lozano, P. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. *Green Chem.*, **2010**, 12, 555–569

Lozano, P., Bernal J. M., Navarro, A. A clean enzymatic process for producing flavour esters by direct esterification in switchable ionic liquid / solid phases. *Green Chem.*, **2012**, 14, 3026–3033

Lozano, P., Bernal, J. M., Sanchez-Gomez, G., Lopez-Lopez, G., Vaultier, M. How to produce biodiesel easily using a green biocatalytic approach in sponge-like ionic liquids. *Energ. Environ. Sci.* **2013**, 6, 1328-1338.

Lozano, P., Bernal, J. M., Nieto, S., Gomez, C., Garcia-Verdugo, E., Luis, S. V. Active biopolymers in green non-conventional media: a sustainable tool for developing clean chemical processes. *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 17361–17374.

Lozano, P., Gomez, C., Nicolas, A., Polo, R., Nieto, S., Bernal, J. M., Garcia-Verdugo, E., Luis, S.V. Clean enzymatic preparation of oxygenated biofuels from vegetable and waste cooking oils by using sponge-like ionic liquids technology. *ACS Sust Chem Eng.*, **2016**, 4, 6125–6132.

Lozano, P., Gomez, C., Nieto, S., Sanchez-Gomez, G., Garcia-Verdugo, E., Luis, S. V. Highly selective biocatalytic synthesis of monoacylglycerides in sponge-like ionic liquids. *Green Chem.*, **2017**, 19, 390–396

Miyako, E., Maruyama, T., Kamiya, N., Goto, M. Enzyme-facilitated enantioselective transport of (S)-ibuprofen through a supported liquid membrane based on ionic liquids. *Chem Commun.*, **2003**, 39, 2926–2927.

Neves, L. A., Afonso, C., Coelho, I. M., Crespo, J. G. Integrated CO₂ capture and enzymatic bioconversion in supported ionic liquid membranes. *Sep Purif Technol.*, **2012**, 97, 34–41.

Patzold, M., Siebenhaller, S., Kara, S., Liese, A., Syldatk, C., Holtmann, D. Deep Eutectic Solvents as efficient solvents in biocatalysis. *Trends Biotechnol.* **2019**, 37, 943-959.

Perez-Sanchez, M., Sandoval, M., Hernaiz, M. J., De Maria, P. D. Biocatalysis in Biomass-derived Solvents: The Quest for Fully Sustainable Chemical Processes. *Curr. Org. Chem.*, **2013**, 17, 1188-1199.

Reichardt, C. Pyridinium N-phenoxide betaine dyes and their application to the determination of solvent polarities part 29 – polarity of ionic liquids determined empirically by means of solvatochromic pyridinium N-phenolate betaine dyes. *Green Chem*, **2005**, 7, 339–351

Sa, A. G. A., de Meneses, A. C., de Araujo, P. H. H., de Oliveira, D. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, 69, 95–105.

Sa, A. G. A., de Meneses, A. C., Lerin, L. A., de Araujo, P. H. H., Sayer, C., de Oliveira, D. Biocatalysis of aromatic benzyl propionate ester by different immobilized lipases. *Bioprocess Biosyst., Eng.* **2018**, 41, 585–591.

Sheldon, R. A., Woodley, J. M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. *Chem Rev.*, **2018**, 118, 801–838.

Solano, D. M., Hoyos, P., Hernaiz, M. J., Alcantara, A. R., Sanchez-Montero, J. M. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresour. Technol.*, **2012**, 115, 196-207.

Tao, Y., Dong, R., Pavlidis, I. V., Chen, B., Tan, T. Using imidazolium-based ionic liquids as dual solvent-catalysts for sustainable synthesis of vitamin esters: inspiration from bio- and organocatalysis. *Green Chem.*, **2016**, 18, 1240–1248

Tsuzuki, W., Ue, A., Nagao, A. Polar organic solvent added to an aqueous solution changes hydrolytic property of lipase. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **2003**, 67, 1660–1666.

Villa, R., Álvarez, E., Nieto, S., Donaire, A., Garcia-Verdugo, E., Luis, S. V., Lozano, P. Chemo-enzymatic production of omega-3 monoacylglycerides using sponge-like ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *GreenChem.*, **2020**, 22, 5107.

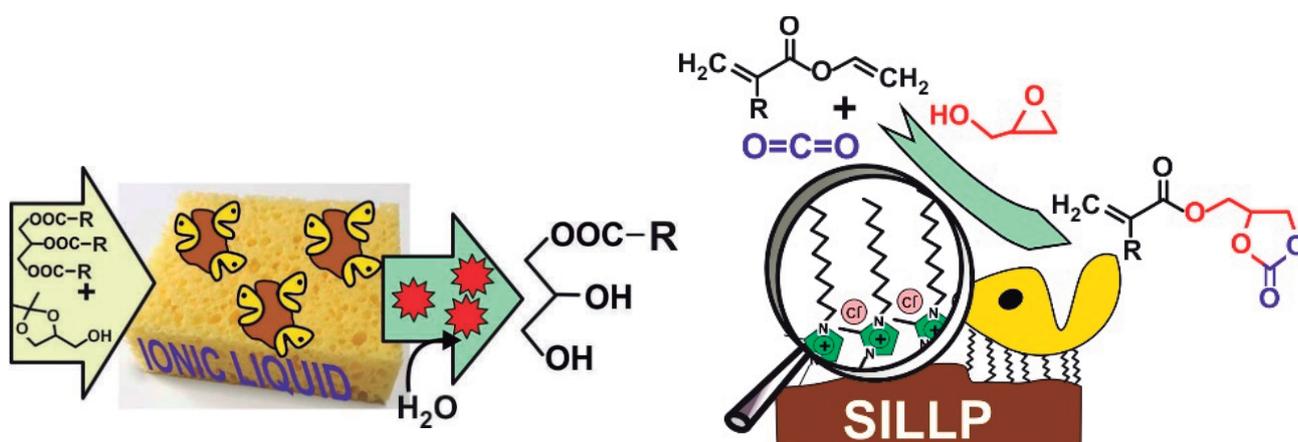
Waghmare, G. V., Chatterji, A., Rathod, V. K. Kinetics of enzymatic synthesis of cinnamyl butyrate by immobilized lipase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2017**, 183, 792–806.

Wallraf, A. M., Liu, H. F., Zhu, L. L., Khalfallah, G., Simons, C., Alibiglou, H., Davari, M. D., Schwaneberg, U. A loop engineering strategy improves laccase lcc2 activity in ionic liquid and aqueous solution. *Green Chem.*, **2018**, 20, 2801–2812.

Yadav, G. D., Devendran, S. Lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification in non-aqueous medium. *Process Biochem.* **2012**, 47, 496–502.

CAPÍTULO IV:

Procesos quimio-enzimáticos basados en la tecnología de los líquidos iónicos



Parte de este capítulo es una adaptación de las siguientes publicaciones:

- (1) **Rocio Villa**, Elena Alvarez, Susana Nieto, Antonio Donaire, Eduardo Garcia-Verdugo, Santiago V Luis, Pedro Lozano. Chemo-enzymatic Production of Omega-3 monoacylglycerides using Sponge-like Ionic liquids and Supercritical carbon dioxide. *Green Chem.*, **2020**, *22*, 5701-5710. <https://doi.org/10.1039/D0GC02033H>. (ANEXO IV)
- (2) **Rocio Villa**, Raul Porcar, Susana Nieto, Antonio Donaire, Eduardo Garcia-Verdugo, Santiago V Luis, Pedro Lozano. Sustainable chemo-enzymatic synthesis of glycerol carbonate (meth)acrylate from glycidol and carbon dioxide enabled by ionic liquids technologies. *Green Chem.*, **2021**, <https://doi.org/10.1039/D1GC01096D>. (ANEXO V)

4.1. Resumen

Los procesos multi-catalíticos son del máximo interés en el desarrollo de la química sostenible, ya que permiten abordar diversas transformaciones químicas en una sola etapa sin necesidad de operaciones intermedias de purificación. Las ventajas inherentes de los líquidos iónicos tipo esponja y de los líquidos iónicos soportados covalentemente (SILLPs), combinados o no con los fluidos supercríticos, permite diseñar procesos multicatalíticos donde se combinen las enzimas con catalizadores químicos (p. ej. zeolitas), y rendir en una sola etapa productos de interés.

La síntesis quimio-enzimática de monoacilglicéridos omega-3 se llevó a cabo en dos etapas catalíticas consecutivas, la transesterificación enzimática de aceite de pescado o aceite de linaza con solketal para producir ésteres solketílicos de ácidos grasos, seguida de la hidrólisis de estos derivados de solketal catalizados por ácidos sólidos (p. ej. zeolitas) en dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) o, alternativamente, en líquidos iónicos tipo esponja (SLIL). Mediante el uso de scCO₂ como medio de reacción / extracción, se observó un excelente acoplamiento de ambas etapas catalíticas cuando se usó t-butanol como codisolvente, lo que resultó en un rendimiento de monoacilglicérido del 100% en siete días en operación continua y sin ninguna pérdida de actividad catalítica. Para el protocolo en discontinuo, el proceso involucró dos etapas separadas en SLIL y agua, respectivamente, lo que condujo a un rendimiento del producto del 100% y un producto monoacilglicérido libre de LI siguiendo un protocolo de enfriamiento y centrifugación. Este protocolo discontinuo permite la recuperación completa de la enzima / SLIL / componentes de zeolita del sistema de reacción y la reutilización de todos ellos durante al menos 6 ciclos operacionales sin modificación del rendimiento catalítico.

Por otro lado, en este Capítulo también se aborda un ejemplo de aplicación de la tecnología de los líquidos iónicos en la obtención de monómeros de interés en la preparación de materiales plásticos biodegradables. Concretamente, se ha diseñado un proceso quimio-enzimático sostenible para la producción de glicerol carbonato acrilato (GCA) y glicerol carbonato metacrilato (GCMA). El proceso se llevó a cabo en dos etapas catalíticas consecutivas mediante enfoques experimentales secuenciales o en un único sistema. En primer lugar, el (met)acrilato de glicidilo se obtuvo mediante transesterificación enzimática de vinil (met)acrilato con glicidol en líquido iónico tipo esponja (SLIL) como medio de reacción, que dio como resultado un 100% tras 5 horas de reacción a 60 °C. En este sentido, los SLILs no solo actúan como medio de reacción

adecuado, sino que también permiten el simple aislamiento y separación de los ésteres de glicidilo obtenidos puros a través de un protocolo sencillo de enfriamiento / centrifugado. La segunda etapa consistió en la síntesis de GCA, o GCMA mediante la reacción de cicloadición de CO₂ al glicidil acrilato o glicidil metacrilato respectivamente obtenido catalizada por 1-decil-3-metilimidazolio unido covalentemente (SILLP) en un sistema libre de disolventes y condiciones suaves (60 °C, 1-10 bar), lo que lleva a un rendimiento hasta del 100 % a las 6 horas. Una vez más, todos los componentes del sistema de reacción (biocatalizador / SLIL / SILLP) se pueden recuperar completamente y reutilizar durante al menos seis ciclos operacionales sin la modificación de la actividad catalítica.

4.2. Síntesis quimio-enzimática de monoglicéridos omega-3 en LIs y scCO₂

4.2.1. Introducción

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés Poliunsaturated Fatty Acids), como el ácido α -linolénico (ALA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosohexaenoico (DHA) son moléculas bioactivas esenciales en la nutrición humana con numerosos efectos beneficiosos para la salud (p. ej. como agentes cardioprotectores) y capacidad de prevención de enfermedades (p. ej. efectos antiinflamatorios) (Perez-Martinez *et al.*, 2020). Sin embargo, la biodisponibilidad de PUFAs después de su consumo como TAGs generan una mala digestión y absorción (p. ej. pancreatitis crónica, enfermedad de Crohn, fibrosis quística, etc.) (Siener *et al.*, 2010). Para combatir estos inconvenientes, existen suplementos dietéticos que contienen monoacilglicéridos (MAGs) basados en ácidos grasos poliinsaturados (**Figura 4.1 A**), ya que se absorben mejor que los administrados como triacilglicéridos (Perez-Martinez *et al.*, 2020; Valenzuela *et al.*, 2005). Además, entre los diferentes tipos de derivados lipídicos que contienen ácidos grasos omega-3, los MAGs han mostrado tener mejor estabilidad frente a la oxidación (Solaesa *et al.*, 2017). En este sentido, la síntesis de estos compuestos es de gran interés a nivel industrial, ya que son emulsiones no iónicas de gran utilidad en productos cosméticos y alimentarios, así como componentes bioactivos en medicina (p. ej. como antimicrobianos) (Zhang *et al.*, 2010).

En general, los MAGs comerciales se obtienen mediante glicerólisis química de aceites con glicerol a una temperatura en torno a 250 °C en atmósfera inerte con catalizadores alcalinos inorgánicos (Perez-Pariente *et al.*, 2003). Sin embargo, la alta temperatura

presenta algunos inconvenientes que dan lugar a la generación de reacciones secundarias no controladas (p. ej. color oscuro, sabor a quemado, reacciones de oxidación, etc.), así como el alto gasto energético que conlleva. Además, la glicerólisis química proporciona entre un 35 y 60% de MAGs, de 35 a 50 % de diacilglicérido (DAG), de 1 a 20% de triacilglicérido (TAG) y 1 a 10% de ácidos grasos libres y, por lo tanto, los MAGs deben aislarse de la mezcla de reacción con técnicas convencionales como la destilación para alcanzar en torno a un 70% de pureza (European Food Emulsifier Manufacturers Association, 2015).

La glicerólisis de aceites de pescado (p. ej. sardina, atún, etc) o aceites vegetales (p. ej. Linaza) catalizada por lipasas es un enfoque clásico para la producción de MAGs omega-3 debido a la alta selectividad que ofrecen las enzimas en condiciones suaves que, a su vez, evitan las reacciones secundarias no deseadas. Sin embargo, la inmiscibilidad de los TAGs y el glicerol da lugar a la formación de sistemas bifásico de baja eficiencia para el proceso biocatalítico en cuestión (Feltes *et al.*, 2013). En este sentido, diferentes estrategias enfocadas en el estudio del medio de reacción, como el uso de codisolventes orgánicos (p. ej. *t*-pentanol, *t*-butanol, etc.) (Solaesa *et al.*, 2016), enfoques de emulsificación (Baum *et al.*, 2016), o la adsorción previa de glicerol sobre soportes sólidos tales como el gel de sílice (Castillo *et al.*, 1997), se han estudiado con el fin de proporcionar medios de reacción monofásicos eficientes. Mediante estos enfoques, se obtienen conversiones de TAGs hasta de un 90%, pero con una selectividad que proporciona MAGs con un rendimiento del 80%. Por ejemplo, la glicerólisis de aceite de sardina catalizada con Novozym 435 en *t*-pentanol al 50% en peso, dio como resultado en torno a un 80% de MAGs después de 3 horas de reacción a 50 °C (Solaesa *et al.*, 2016). Sin embargo, es importante tener en cuenta que los aditivos añadidos al medio de reacción para mejorar el rendimiento deben ser eliminados antes de su uso como nutracéutico. Asimismo, se obtuvieron resultados similares para la síntesis de MAGs ricos en ácidos grasos omega-3 utilizando scCO₂ como medio de reacción para mejorar la reacción de glicerólisis de aceite de sardina (Solaesa *et al.*, 2017). Otra estrategia es la etanolisis de TAGs catalizada por lipasa regioespecífica, aunque la inmiscibilidad del etanol y los TAGs proporcionó una vez más un sistema bifásico de poca eficiencia (Castejon y Senorans, 2019). En este enfoque, se generó un aumento continuo en los productos de éster etílicos, mientras que el perfil de 2-MAG mostró un máximo de conversión del 27% a las 2 horas de reacción. Además, la separación de MAGs se realizó con disolventes

orgánicos volátiles como el hexano. Alternativamente, el scCO₂ también se ha empleado como disolvente para etanólisis de aceite de pescado rico en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 catalizada por Novozym 435, dando como resultado en torno a un 15% después de 90 minutos de reacción. El posterior fraccionamiento de los productos de reacción mediante la extracción con fluido supercrítico (100-280 bar, 25-60 °C) produjo un extracto rico en ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) hasta 99,46% en peso y 82,25% en peso de MAGs (Melgosa *et al.*, 2019). Otro ejemplo relevante es la síntesis de MAGs mediante la glicerólisis de aceite de girasol, que proporcionó un rendimiento del 69% utilizando LIs alcalinos (p. ej. 1-butil-3-metilimidazolio imidazolato [Bmim][Im]) a 200 °C utilizando disolventes orgánicos como el tolueno para la extracción de los productos (Luo *et al.*, 2015).

El descubrimiento del comportamiento tipo esponja de los LIs basados en cationes con largas cadenas laterales alquílicas, ha abierto nuevas oportunidades para el desarrollo de procesos biocatalíticos sostenibles (Lozano *et al.*, 2010). En este contexto, la síntesis biocatalítica de MAGs se ha llevado a cabo mediante la esterificación directa de ácidos grasos (p. ej. Ácido láurico, palmítico, oléico, etc.) con glicerol en diferentes SLIL, obteniendo hasta 100% de selectividad y 100% de rendimientos de MAGs. Sin embargo, aunque la monooleína se separaba fácilmente del SLIL con agua, sí fue necesario el empleo de dodecano para la separación de monolaurina (Lozano *et al.*, 2017).

El solketal (1,2-isopropilidenglicerol) es un derivado de glicerol obtenido por condensación catalizada por ácido en condiciones anhidras, y es un compuesto nucleófilo útil para la síntesis biocatalítica de biocombustibles oxigenados (p. ej. ésteres solketílicos, FASEs) mediante transesterificación de aceites vegetales en SLIL (Lozano *et al.*, 2016). Este compuesto se puede hidrolizar en medio acuoso con catalizadores ácidos para dar glicerol y acetona (Ozorio *et al.*, 2012).

En este sentido, se demostró por primera vez un protocolo sencillo y sostenible para producir MAGs omega-3 mediante un proceso quimio-enzimático asistido por las tecnologías de scCO₂ o SLIL en operación continua o discontinua, respectivamente. Así, la transesterificación enzimática de aceite de linaza y pescado, que contienen TAGs omega-3, con solketal en SLILs y scCO₂ como medios de reacción y en condiciones anhidras se ha llevado a cabo. Posteriormente, la hidrólisis de los derivados solketílicos obtenidos mediante el empleo de una zeolita ácida en presencia de agua. La excelente idoneidad de este enfoque puso de manifiesto tanto el alto rendimiento como la pureza de

los MAGs omega-3 obtenidos, así como la recuperación y posterior reutilización de todos los elementos del sistema de reacción (biocatalizador, catalizador ácido, SLIL, etc.)

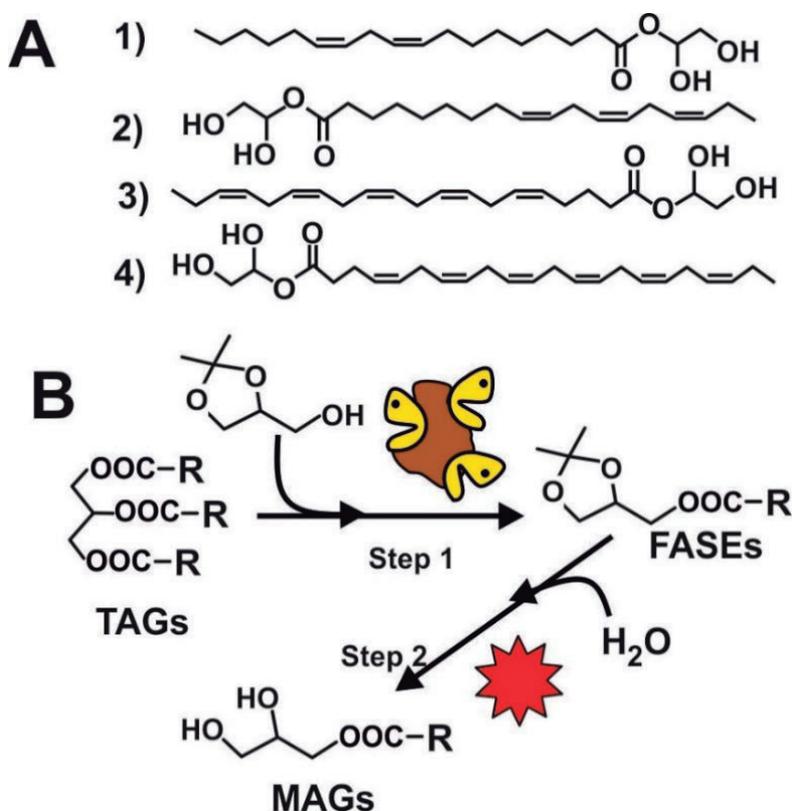


Figura 4.1. (A) Ácidos grasos poliinsaturados: (1) ácido linoleico; (2) ácido alfa-linolénico; (3) ácido eicosapentaenoico; (4) ácido docosahexaenoico. (B). Síntesis quimio-enzimática de MAGs en dos etapas. Etapa 1: transesterificación de TAGs con solketal catalizada por lipasa en condiciones anhidras; Etapa 2: hidrólisis selectiva mediante un catalizador ácido sólido del derivado solketílico.

En un intento por desarrollar protocolos sostenibles para la producción de monoacilglicéridos omega-3 a partir de fuentes naturales (aceite de pescado o linaza), se han probado las ventajas sinérgicas que ofrecen la combinación de enzimas inmovilizadas con SLIL / scCO₂. Tanto este efecto sinérgico como los procesos integrados para las transformaciones (bio)catalíticas, así como la separación de los productos puros se puede adaptar fácilmente en procesos continuos o discontinuos con la recuperación completa de los sistemas catalíticos para su posterior reutilización (Lozano *et al.*, 2002). El enfoque (bio)catalítico propuesto para la síntesis de MAGs omega-3 (**Figura 4.1 B**) requiere dos etapas fundamentales. En primer lugar, la síntesis de FASEs mediante transesterificación de triglicéridos omega-3 procedentes de fuentes naturales (aceite de pescado o aceite de linaza) con solketal catalizada por Novozym 435 en SLIL. Posteriormente, se estudió la

idoneidad de la hidrólisis selectiva catalizada por una zeolita ácida para la apertura del anillo ketal y la conservación del enlace éster en medio acuoso. Así, ambas etapas catalíticas se incorporaron en un proceso continuo o discontinuo, diseñados para la obtención de MAGs omega-3. En el caso del proceso en continuo, el sistema de reacción se llevó a cabo bajo un flujo de scCO₂ para el transporte de masa a través de dos reactores catalíticos conectados de forma consecutiva.

4.2.2. Síntesis enzimática de FASEs en [C₁₈tma][NTf₂] e hidrólisis ácida del anillo ketal

Como se menciona anteriormente, la idoneidad de la lipasa B de *Candida antartica* para llevar a cabo la síntesis biocatalítica de FASEs se estudió mediante la transesterificación de aceite de linaza o aceite de pescado con solketal en [C₁₈tma][NTf₂] a 60 °C. Como ejemplo representativo, la **Figura 4.2** muestra el transcurso de la reacción para la síntesis de estos derivados solketílicos en una relación molar aceite:solketal 1:3,5 a 60°C. Tal y como se puede observar, el sistema biocatalítico puede proporcionar FASEs con rendimientos muy próximos al 100% a las 6 horas de reacción. Cabe destacar que esta excelente capacidad de las lipasas para llevar a cabo la transesterificación de aceites puede estar relacionada con la capacidad de los SLILs para disolver tanto el aceite como el alcohol, lo que proporciona un medio monofásico, que conlleva a una mejora de la velocidad de transporte de los sustratos hacia el centro activo de la enzima (Lozano *et al.*, 2013). Además, se observó cómo la relación molar de aceite:solketal era un parámetro importante para alcanzar la conversión completa de los TAGs en FASEs, lo cual se logró cuando la concentración de solketal era al menos 3,5 veces superior a la concentración de TAGs.

Sin embargo, teniendo en cuenta la diferencia de hidrofiliidad de los productos FASEs y MAGs, se seleccionó una relación molar TAG:Solketal de 1:3,5 (mol:mol) como la relación óptima para la reacción biocatalítica, ya que los procesos de transporte de masas de FASEs hidrofóbicos se ven favorecidos con respecto a MAGs por el flujo de scCO₂ (Lozano *et al.*, 2012). En este sentido, la extracción de los compuestos hidrofóbicos en SLILs como consecuencia de carácter esponjoso de los mismos, implica la adición de agua para la separación de los compuestos hidrofílicos en una fase acuosa intermedia, mientras que los compuestos hidrofóbicos puros permanecen en la fase superior (Lozano *et al.*, 2015).

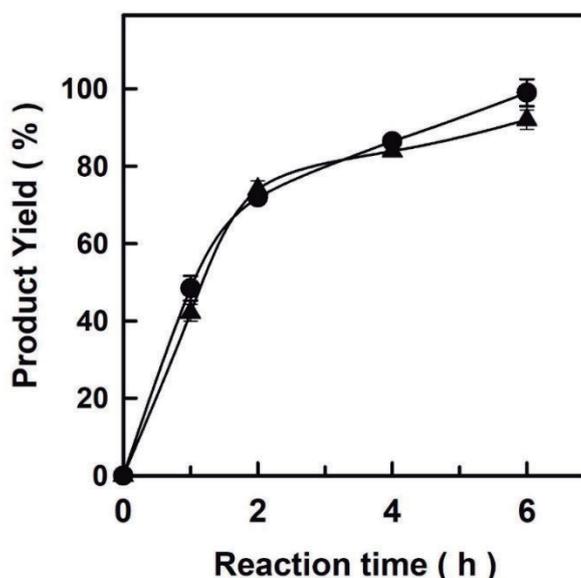


Figura 4.2. Rendimientos obtenidos para la síntesis de FASE catalizada por Novozym-435 mediante la transesterificación de triacilglicéridos de linaza (●) o aceite de pescado (▲) con solketal en 40% de $[C_{18}ma][NTf_2]$ a $60^{\circ}C$.

La apertura del anillo ketal para la síntesis del correspondiente glicol puede realizarse mediante hidrólisis controlada catalizada por un ácido (Ozorio *et al.*, 2012). En el caso de los ésteres solketílicos, es necesario considerar la fortaleza ácida para obtener MAGs omega-3 mediante la hidrólisis selectiva del anillo ketal, sin que afecte al enlace éster, por lo que fue necesaria la evaluación de la idoneidad de tres zeolitas ácidas (CBV400, CBV720 y CP811-C) para catalizar la hidrólisis del solketal y decanoato de etilo, como éster modelo, en un medio de reacción agua/*t*-butanol a 50 y 80 °C, respectivamente. La **Figura 4.3 A**. muestra el perfil de concentraciones de decanoato de etilo y solketal en presencia de la zeolita CBV720 a 50 °C. En este experimento, la concentración del éster permaneció inalterada durante 2 horas de reacción, mientras que la concentración de solketal disminuyó rápidamente. Por otro lado, la **Figura 4.3 B** representa el perfil de las concentraciones de solketal y decanoato de etilo después de 2 horas de reacción, pero a 80 °C. Como puede observarse, todas las zeolitas son capaces de hidrolizar rápidamente el solketal después de 2 horas de reacción, mientras que se observó una disminución en la concentración del éster como consecuencia de una mayor fortaleza ácida (CBV400 < CBV720 < CP811-C). Tanto las zeolitas CBV720 como CP811-C no son apropiadas para llevar a cabo el proceso de hidrólisis selectiva para la obtención de MAGs a partir de FASEs a 80 °C, debido a la hidrólisis del enlace éster que produce simultáneamente con la hidrólisis de solketal. Alternativamente, las mismas reacciones

realizadas a 50 °C (**Figura 4.3 C**), solo la zeolita CBV720, con fortaleza ácida intermedia, proporcionó la hidrólisis completa del solketal, mientras que la concentración de decanoato de etilo permaneció constante a lo largo de la reacción catalítica. Sin embargo, este resultado fue muy similar al obtenido cuando se utilizó zeolita CBV400 a 80 °C, pero se seleccionó CBV720 y la temperatura de 50 °C, debido a la mejor idoneidad del procesamiento industrial de aceites omega-3 a bajas temperaturas (Turek *et al.*, 2013). Es importante destacar que otros catalizadores ácidos potentes como Amberlyst-15 se ensayaron, y dieron como resultado la hidrólisis no deseada del enlace éster.

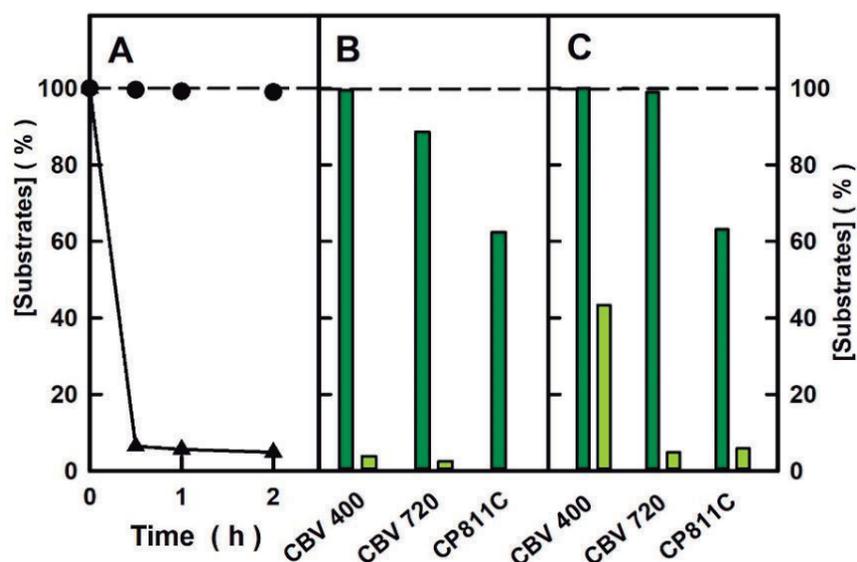


Figura 4.3. (A) Perfil del curso temporal de la concentración de solketal (▲) y decanoato de etilo (●) en un medio agua / t-butanol en presencia de zeolita ácida CBV720 a 50 °C. Concentración de decanoato de etilo (oscuro) y solketal (claro) en un medio de agua / t-butanol después de 2 horas en presencia de una zeolita ácida (es decir, CBV400, CBV720 o CP811-C) a 80 °C (B) y 50 °C (C).

4.2.3. Síntesis quimio-enzimática en continuo de MAG omega-3 utilizando la tecnología del scCO₂

La excelente idoneidad de los sistemas bifásicos, basados en la combinación de scCO₂ y LIs con enzimas, ha sido estudiada como una excelente herramienta verde para el desarrollo de procesos químicos sostenibles de interés industrial, incluso en etapas multicatalíticas (Lozano *et al.*, 2011). En este sentido, se desarrolló un sistema de dos reactores acoplados en serie para llevar a cabo la síntesis de MAGs omega-3 a partir de TAGs procedentes de aceite de linaza o pescado y solketal en scCO₂. (**Figura 4.4**) Como

se puede observar, el primer reactor contenía la enzima Novozym 435 recubierta con el LI $[C_{18}tma][NTf_2]$, debido al efecto protector de este LI frente al posible efecto de desnaturalización de la enzima, causado por el $scCO_2$ (Lozano *et al.*, 2011). El segundo reactor contenía en su interior la zeolita ácida CBV720. De este modo, el diseño de este sistema de reactores acoplados en serie permitió la operación continua para la obtención de los productos. Así, ambos sustratos (aceite omega-3 y solketal) se incorporaron en el primer reactor enzimático directamente por la fase $scCO_2$ y los ésteres solketílicos fueron posteriormente transportados por el fluido supercrítico a la salida de este reactor biocatalítico. A continuación, el flujo de fases FASEs- $scCO_2$ se mezcló con agua/t-butanol usando una bomba de HPLC, y se alimentó el segundo reactor que contenía la zeolita ácida CBV720 para llevar a cabo la hidrólisis selectiva del ketal y producir MAGs omega-3 de forma continua.

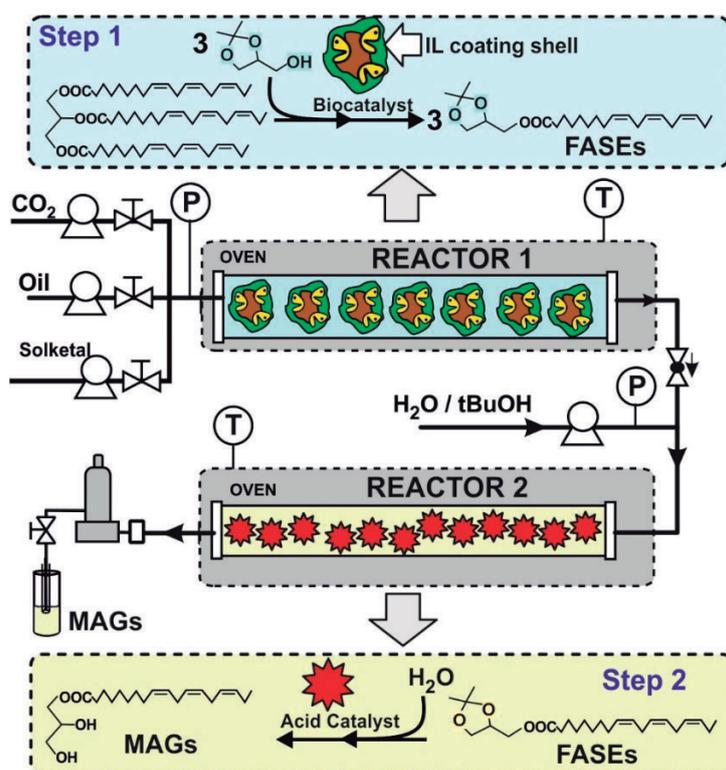


Figura 4.4. Esquema experimental para el sistema de birreactor $scCO_2$ continuo que contiene Novozym 435 recubierta con $[C_{18}tma][NTf_2]$ (Reactor 1) y la zeolita ácida CBV720 (Reactor 2), para la transformación de TAG en MAG omega-3.

En este sentido, es importante destacar que el carácter hidrófobo del $scCO_2$ impide la extracción y transporte de los componentes hidrofílicos (p. ej. glicerol o agua), por lo que es necesaria la incorporación de un codisolvente hidrofílico como el t-butanol en la

mezcla de sustratos inicial para mejorar la extracción (Gucñu-Ustundag y Temelli, 2005). Así, la alimentación pura de agua en el segundo reactor ácido dio como resultado una zeolita completamente empapada que condujo a la obstrucción del reactor catalítico. Sin embargo, para evitar este inconveniente y mantener el transporte de masa de FASEs al reactor ácido bajo flujo supercrítico, se introdujo una mezcla:t-butanol al 50 % como codisolvente adecuado para disolver a los MAGs obtenidos (Royon *et al.*, 2006).

La **Figura 4.5 A**. muestra el perfil de actividad enzimática en la síntesis de MAGs omega-3 obtenidos utilizando el sistema de dos reactores acoplados en serie a partir de aceite de pescado. El sistema dio como resultado un 100 % de rendimiento a las 2 horas de funcionamiento, pero al cabo de unas horas se produce una considerable disminución en el rendimiento del producto, probablemente como consecuencia de la desactivación del biocatalizador (Lozano, 2010). Por ello, se procedió al lavado del sistema catalítico Novozym 435 / [C₁₈tma][NTf₂] con t-butanol después de 14 horas de funcionamiento, obteniendo una recuperación completa de la actividad biocatalítica y, de nuevo, en un 100% de rendimiento de MAGs omega-3. Otras investigaciones han demostrado que esta disminución de actividad podría atribuirse a la baja eficiencia de la fase supercrítica hidrófoba para transportar el glicerol desde el primer reactor al flujo de scCO₂, quedando este compuesto retenido en la capa de LI que recubre la enzima (Lozano *et al.*, 2012). Este fenómeno conduce al “envenenamiento” continuo del biocatalizador, lo que dificulta la entrada del sustrato al centro activo de la enzima. Así, la idoneidad del sistema supercrítico en continuo se mejoró mediante la adición de un 10% de *t*-butanol en los aceites de pescado (**Figura 4.5 B**) y de linaza (**Figura 4.5 C**) utilizados como sustratos. Como se puede observar, la actividad catalítica mostrada por la enzima no varió prácticamente en todos los ciclos de operación realizados, siendo el rendimiento de MAGs omega-3 cercano al 100% en todos los ciclos. Además, la incorporación de t-butanol como codisolvente mejoró el funcionamiento de la bomba HPLC que suministraba los sustratos, como consecuencia de la disminución de la viscosidad de la mezcla.

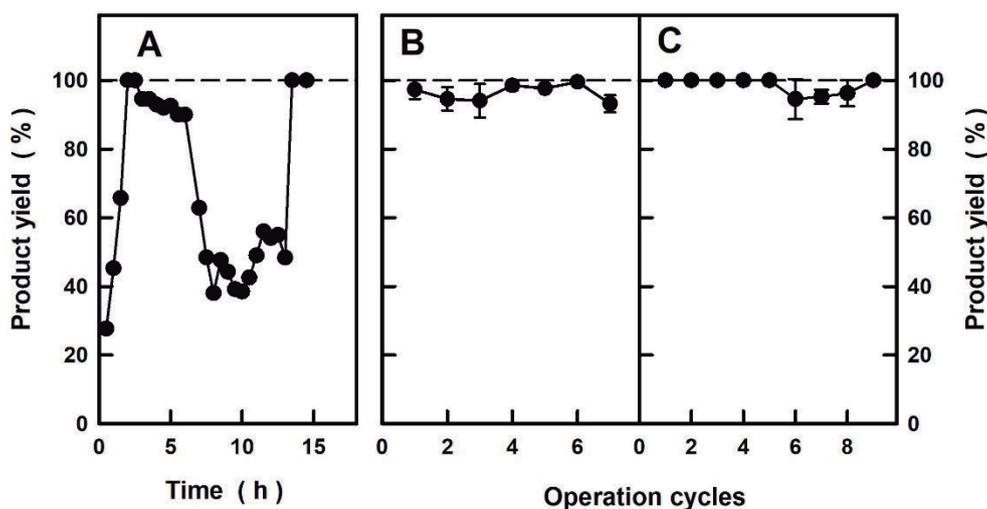


Figura 4.5. A. Perfil de la evolución temporal de la síntesis continua de omega-3 MAG catalizada por dos reactores consecutivos, que contienen Novozym-435 recubierto con $[C_{18}tma][NTf_2]$ y zeolita ácida CBV720, respectivamente, bajo un flujo de $scCO_2$ ($1,5 \text{ ml min}^{-1}$, 18 MPa) a 60°C . El reactor biocatalítico se alimentó con aceite de pescado ($0,076 \mu\text{L min}^{-1}$; $8 \mu\text{mol min}^{-1}$) y solketal ($36 \mu\text{L min}^{-1}$; $28,8 \mu\text{mol min}^{-1}$). Estabilidad operativa del sistema de birreactor de zeolita Novozym 435-IL / CBV720 propuesto en las condiciones descritas anteriormente, a partir de pescado (B) y de linaza (C), respectivamente, que contienen 10% (v / v) de t-butanol. Cada punto corresponde al valor medio de todas las muestras obtenidas durante cada ciclo de 6 horas.

Cabe destacar que, aunque los LIs no son miscibles con el $scCO_2$, el contenido residual de LI fue en torno a un 0,2% (determinado por ^{19}F -RMN), probablemente como consecuencia de la capacidad tanto del solketal como del t-butanol para disolver una pequeña cantidad del LI adsorbido sobre las partículas de enzima. En este sentido, el empleo de lipasas inmovilizadas covalentemente sobre soportes poliméricos (SILLPs), ha mostrado ser una excelente alternativa para evitar la pérdida de actividad catalítica (Lozano *et al.*, 2002).

4.2.4. Síntesis quimio-enzimática en discontinuo de MAGs omega-3 en SLIL

Con el fin de obtener directamente los productos MAGs omega-3 puros a través de la etapa catalítica descrita anteriormente, y sin el uso de codisolventes como t-butanol, se desarrolló un protocolo experimental alternativo en modo discontinuo. Este enfoque se basó en la excelente idoneidad de los líquidos iónicos tipo esponja para llevar a cabo biotransformaciones de sustratos hidrófobos y la siguiente separación de los productos puros del LI mediante un protocolo sencillo, que permite la fácil recuperación y reutilización de todos los elementos que intervienen en la reacción (Lozano *et al.*, 2015). Este sistema se basó en tres etapas experimentales (Figura 4.6).

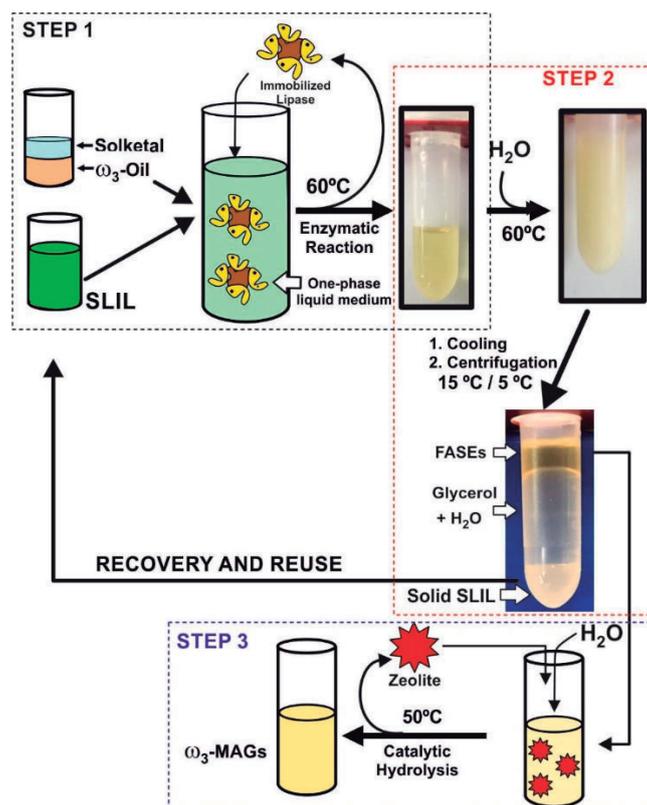


Figura 4.6. Esquema del protocolo cíclico para la producción de MAG omega-3 en etapas. Etapa 1: Síntesis de FASE catalizada por Novozym-435 mediante transesterificación de aceites omega-3 con solketal en un 40% en peso de $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ a 60°C . Etapa 2: Separación de las mezclas de reacción de FASE / $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ mediante la adición de agua caliente (60°C), agitando y centrifugando dos veces (15 000 rpm, 15 minutos, 15°C ; 15 000 rpm, 15 min, 5°C). Etapa 3: síntesis de omega-3 MAGs catalizada por zeolita ácida CBV720 mediante hidrólisis de FASEs omega-3 (24% v / v de concentración final) a 50°C .

La primera etapa consistió en la transesterificación de TAGs con solketal catalizada por Novozym 435 en LI $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ como medio de reacción a 60°C para producir FASEs. A las seis horas de reacción, las partículas de enzima se separaron fácilmente por centrifugación. La **Figura 4.7.** muestra la actividad enzimática para síntesis de FASEs omega-3 mediante transesterificación de aceite de pescado y aceite de linaza con solketal durante 7 ciclos catalíticos consecutivos sin ninguna modificación. Así, la enzima mostró un nivel de actividad constante con solo una pequeña disminución en los dos últimos ciclos, probablemente debido a la pérdida de algunas partículas de enzima durante la etapa de lavado. Una vez más, la excepcional tecnología basada en líquidos iónico con comportamiento tipo esponja proporcionó un microambiente idóneo para la actividad catalítica de la lipasa B de *Candida antarctica* (Lozano *et al.*, 2010; Lozano *et al.*, 2015).

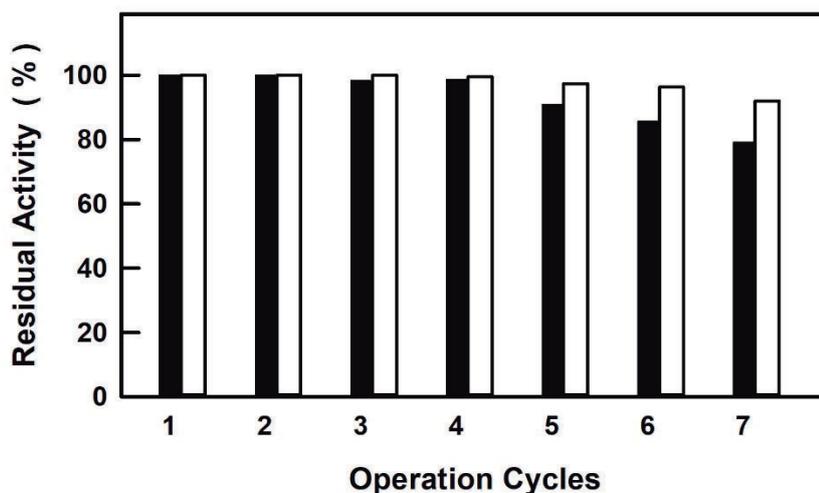


Figura 4.7. Estabilidad operacional del sistema Novozym 435 / [C₁₈tma] [NTf₂] para la obtención de FASE mediante la transesterificación de aceites de linaza (blanco) o pescado (negro) con solketal durante 6 h de reacción a 60 ° C

La segunda etapa se basó en la separación fraccionada de los componentes del medio de reacción: FASEs, SLILs, glicerol y solketal (en exceso). Como se muestra en la **Figura 4.6** (“step 2”), la adición de agua a 60 °C en el medio de reacción monofásico obtenido en la etapa enzimática condujo a la formación de un sistema heterogéneo, como consecuencia de la precipitación del LI. Dicha mezcla se separó mediante un protocolo iterativo de enfriamiento / centrifugación, que dio como resultado un sistema trifásico: una fase superior con los productos (FASEs), una fase intermedia acuosa con los componentes hidrofílicos (glicerol y solketal en exceso), y una fase sólida en la parte inferior que contiene el SLIL. En este sentido, el lavado con agua, que es inmisible con los ésteres solketílicos y el LI, mejoró la etapa de separación de los componentes, proporcionando un enfoque sencillo y sostenible para la separación limpia de los derivados de solketal puros. Es importante mencionar que, tanto la insolubilidad de los SLILs en agua, así como los puntos de fusión superiores a la temperatura ambiente de estos LIs, permiten su fácil precipitación como sólidos y su fácil recuperación (Lozano *et al.*, 2015). Además de una posible optimización de la etapa de lavado por agua, estas características también permiten que la fase acuosa intermedia se considere como una disolución de glicerol libre de LI en agua que podría recuperarse, en lugar de su definición como aguas residuales.

La tercera y última etapa consistió en la hidrólisis del anillo ketal de los FASEs catalizada por la zeolita ácida CBV720 a 50 °C. Teniendo en cuenta la solubilidad limitada del agua en los productos, así como el carácter higroscópico de las zeolitas, se evaluó una relación molar FASEs:agua de 1/7.5, lo que proporcionó la suficiente concentración de agua para la reacción catalítica y, además, un medio de reacción completamente transparente y monofásico antes de adicionar la zeolita. De este modo, fue posible la obtención de un rendimiento de MAGs omega-3 cercano al 100 % en el caso de los FASEs procedentes del aceite de linaza, durante al menos 6 ciclos operacionales de reutilización de la zeolita ácida. En los últimos ciclos se produce una pequeña disminución de la conversión que podría atribuirse a la pequeña pérdida de las partículas de catalizador durante la etapa de lavado. Para el caso del aceite de pescado, el rendimiento obtenido fue en torno al 70%, ya que el aceite de pescado contiene compuestos distintos a los TAGs que podrían quedar adsorbidos en la zeolita limitando su actividad catalítica.

Finalmente, para evaluar la idoneidad práctica del proceso quimio-enzimático para la obtención de MAGs omega-3 a partir de aceites comestibles de pescado o linaza, se llevó a cabo su ampliación en un factor de 20. Como se puede ver en la **Figura 4.8 A.**, el medio de reacción transparente y homogéneo obtenido después de la reacción enzimática (Etapa 1) pasó a ser turbio tras la adición de agua a 60 °C y agitación a temperatura ambiente. Esta etapa fue clave para la extracción del subproducto glicerol y el exceso de solketal (**Figura 4.8 B**). Siguiendo el protocolo descrito para la Etapa 2, la separación de todos los componentes del sistema de reacción se llevó a cabo fácilmente (**Figura 4.8 C**), y los rendimientos de los productos fueron aproximadamente del 99 % para ambos aceites. La tercera etapa de hidrólisis ácida se realizó para ambos derivados solketílicos, dando como resultado un 98 y 70 % de rendimiento para los FASEs obtenidos a partir del aceite de linaza y aceite de pescado respectivamente. La idoneidad del protocolo propuesto se podría atribuir no solo al alto rendimiento de los productos puros obtenidos, sino también a la eficiente recuperación de todos los elementos de reacción.

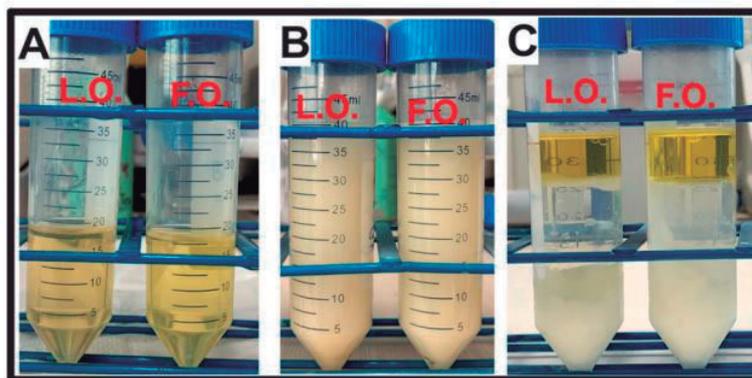


Figura 4.8. A. Medio de reacción obtenido después de la síntesis biocatalítica de FASEs omega-3 a partir de aceites de linaza (L.O.) y pescado (F.O.) en $[C_{18}tma][NTf_2]$. B. Mezclas heterogéneas formadas por la adición de agua caliente al medio de reacción. C. Separación de los FASEs omega-3 (fase superior) y el LI $[C_{18}tma][NTf_2]$ (fase inferior) mediante el protocolo de enfriamiento / centrifugación.

4.3. Síntesis quimio-enzimática de (met)acrilato de glicerol carbonato a partir de glicidol y CO_2 mediante las tecnologías de LIs.

4.3.1 Introducción

Uno de los principales desafíos a nivel mundial es la reducción de la concentración de CO_2 en la atmósfera, lo que requiere el desarrollo de nuevas tecnologías que capturen el CO_2 (Tomkins y Muller, 2019) para convertirlo en productos de valor añadido (p. ej. ácido fórmico (Ahn *et al.*, 2019), metanol (Xie *et al.*, 2020), etc.). Otro desafío global importante es la sustitución de plásticos recalcitrantes (p. ej. poliuretanos) que generan grandes amenazas ecológicas como consecuencia de su elevada acumulación en el medio ambiente (da Costa *et al.*, 2016), por materiales poliméricos de origen biológico y biodegradables (p. ej. poliuretanos libres de isocianato) (Bizet *et al.*, 2020). Así, la Química Verde podría dar soluciones sostenibles para resolver estos desafíos globales, contribuyendo en la mejora de la calidad de vida.

El glicerol es un compuesto químico renovable de gran interés industrial por su gran disponibilidad como subproducto en la obtención de biodiesel, y se puede utilizar como materia prima en la síntesis de nuevos productos (p. ej. polímeros, disolventes, aditivos para combustibles, etc.) (Guo *et al.*, 2021). Entre sus derivados, el glicerol carbonato (GC), obtenido por la incorporación de una molécula de dióxido de carbono en la molécula de glicerol (Fiorani *et al.*, 2018), es un compuesto muy versátil que permite una mayor funcionalización, ya que posee un grupo hidroxilo y un grupo carbonato cíclico

que hace posible su uso como monómero en la síntesis de nuevos polímeros (Yadav *et al.*, 2019). Además, puede ser modificado mediante la incorporación de otros grupos reactivos (p. ej. derivados acrílicos) para la síntesis de nuevos monómeros funcionalizados útiles en industria de polímeros (Morales-Cerrada *et al.*, 2021).

En este sentido, el glicerol carbonato acrilato (GCA) y glicerol carbonato metacrilato (GCMA) se han descrito como monómeros ampliamente utilizados para la síntesis de materiales poliméricos de especial relevancia para revestimiento de superficies (p. ej. copolímeros de acrilato de hidroxietileno son utilizados para la impresión 3D (Schimpf *et al.*, 2019), adhesivos sensibles (Beharaj *et al.*, 2019), poliuretanos libres de isocianatos (NIPUs) con amplia gama de propiedades mecánicas (Chen *et al.*, 2020), electrolitos poliméricos basados en glicerol carbonato (met)acrilato para baterías de litio (An *et al.*, 2018), etc. Debido al interés por la obtención de nuevos poliuretanos fácilmente degradables, la combinación de diaminas y GCMA o GCA para obtener NIPUs de base biológica a través de reacciones de aza-Michael o aminólisis, representa un enfoque más respetuoso con el medio ambiente ya que no requiere el uso de fosgeno o isocianato como reactivo de partida (Bassam *et al.*, 2013).

Generalmente, tanto los monómeros de GCMA como de GCA se obtienen por métodos clásicos de síntesis química (p. ej. reacción de glicerol carbonato con cloruro de acróilo (Bassam *et al.*, 2013; Zanoni *et al.*, 2020), la transesterificación de metacrilato de metilo con glicerol carbonato (Schmitt y Caspari, 2007), o la cicloadición de CO₂ a metacrilato de glicidilo (Schimpf *et al.*, 2019)). Todas estas reacciones se llevan a cabo en disolventes orgánicos y requieren varias horas de reacción a altas temperaturas (80-100 °C), y etapas adicionales para la purificación de los productos, reduciendo la sostenibilidad del proceso. Adicionalmente, la síntesis de GCMA o GCA catalizada por la lipasa ha sido descrita previamente mediante la transesterificación de metacrilato de vinilo o acrilato de vinilo, respectivamente, con glicerol carbonato en disolventes orgánicos como t-butanol o 2-metil-2-butanol como medios de reacción, proporcionando hasta un 95 % de rendimiento a las 24 horas (Youichi 2013). Alternativamente, también se ha demostrado la reacción de cicloadición de CO₂ del metracrilato de glicidilo para la obtención de GCA, catalizada por derivados de amonio bifuncionales inmovilizados, que dio como resultados rendimientos del 88 % después de 18 horas a 10 bares y 90 ° C (Buttner *et al.*, 2019).

Como se explica en capítulos anteriores, el mecanismo de reacción de las serinohidrolasas, como las lipasas, se produce a través de un intermedio de acil-enzima unido

covalentemente, que se desacila mediante el ataque nucleofílico de un alcohol que conduce al producto éster correspondiente. En medios de reacción anhidros, este proceso se ve favorecido cuando el dador de acilo es un derivado activado, como ésteres de vinilo, ya que el alcohol vinílico obtenido como producto de la transesterificación, tautomeriza rápidamente a acetaldehído, que no actúa como sustrato para la enzima y, por tanto, resulta la conversión completa del dador de acilo en el éster (**Figura 4.9 A**).

El concepto de sostenibilidad asociado a los procesos químicos se mantiene mediante dos pilares fundamentales: (1) la selectividad de las transformaciones catalíticas, y (2) la fácil separación de los productos puros de los medios de reacción reutilizables. En este sentido, tanto las tecnologías de los LIs como las excepcionales eficiencias catalíticas que ofrecen las enzimas en las transformaciones químicas, son consideradas como herramientas sinérgicas con propiedades genuinas para desarrollar procesos integrados de reacción y separación, capaces de proporcionar directamente productos puros mediante enfoques sencillos (Lozano *et al.*, 2015; Villa *et al.*, 2019). Como se argumenta detalladamente en capítulos anteriores, los LIs basados en cationes de larga cadena alquílica (p. ej. bis(trifluorometilsulfonil) imida de 1-hexadecil-3-metilimidazolio, [C₁₆mim][NTf₂]), son LIs sólidos de temperatura conmutable que se comportan como sistemas similares a esponjas, y son idóneos como medios de reacción para transformaciones químicas catalizadas por enzimas (Lozano *et al.*, 2015). Además, los LIs unidos covalentemente representan una herramienta que proporciona el microambiente adecuado para el desarrollo de procesos biocatalíticos en continuo (Lozano *et al.*, 2007; Lozano *et al.*, 2013), y con el potencial de catalizadores heterogéneos en numerosas reacciones (Martin *et al.*, 2014; Valverde *et al.*, 2019).

Mediante el empleo de las “herramientas sostenibles” mencionadas anteriormente, se ha demostrado, por primera vez, la síntesis de (met)acrilato de glicerol carbonato (GCMA o GCA) a través de un enfoque sostenible basado en las sinergias de la biocatálisis y las tecnologías de los LIs, mediante dos etapas catalíticas consecutivas (ver **Figura 4.9**). En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis enzimática de (met)acrilato de glicidilo mediante transesterificación de (met)acrilato de vinilo con glicidol en [C₁₆mim][NTf₂], lo que permitió la fácil separación del derivado de glicidilo mediante un protocolo sencillo de enfriamiento / centrifugación. A continuación, se llevó a cabo la reacción de cicloadición de CO₂ sobre el anillo epóxido que contenía el (met)acrilato de glicidilo, catalizada por

SILLP de 1-alkil-3 metilimidazolio unido covalentemente, dando el correspondiente (met)acrilato de glicerol carbonato en ausencia de disolventes.

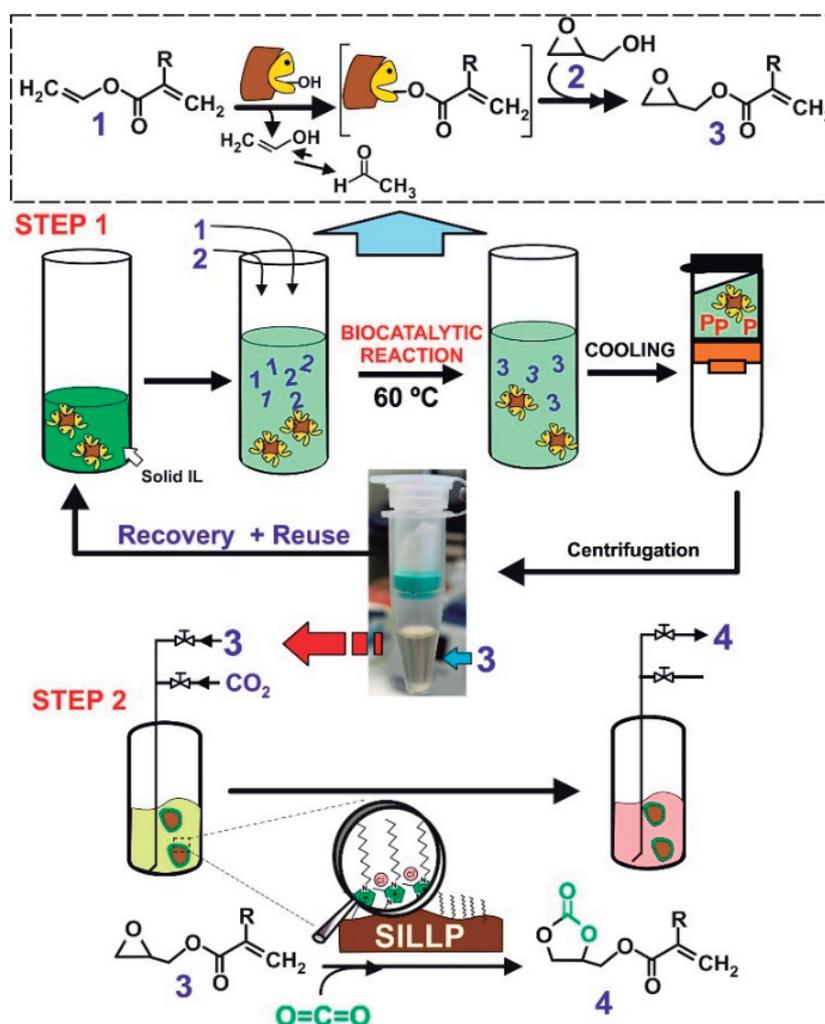


Figura 4.9. Síntesis químio-enzimática de GCA o GCMA (4) mediante dos reacciones catalíticas consecutivas. Etapa 1. Síntesis catalizada por Novozym 435 de (met)acrilato de glicidilo (3) mediante transesterificación de (met)acrilato de vinilo (1) con glicidol (2) en $[\text{C}_{16}\text{mim}][\text{NTf}_2]$ SLIL como medio de reacción, y posterior separación de (3) del LI mediante enfriamiento y centrifugación. Etapa 2. SILLP basados en 1-alkil-3-metilimidazolio catalizaron la síntesis de GCMA / GCA (4) mediante la cicloadición de CO_2 en el anillo epóxido de (3). Acrilato de vinilo ($\text{R} = -\text{H}$); metacrilato de vinilo ($\text{R} = -\text{CH}_3$).

Alternativamente, la inmovilización de la lipasa B de *Candida antarctica* en SILLP basado en 1-alkil-3 metilimidazolio se estudió con éxito en un sistema combinado en una sola etapa, donde las dos etapas catalíticas se llevan a cabo simultáneamente bajo presión de CO_2 . La idoneidad del diseño de estos dos enfoques quedó demostrada por la obtención de altos rendimientos y pureza de los productos GCMA y GCA, así como por la recuperación y reutilización de todos los elementos del sistema de reacción.

4.3.2. Síntesis enzimática de (met)acrilato de glicidilo

La síntesis de GCMA y GCA fue llevada a cabo con lipasas inmovilizadas (Novozym 435, Lypozyme TL o Lypozyme RM), capaces de catalizar la transesterificación de dadores de acilo (acrilato de vinilo, metacrilato de vinilo o metacrilato de metilo) con glicidol. La reacción se realizó utilizando el LI [C₁₆mim][NTf₂] como medio de reacción, o alternativamente, en condiciones libres de disolventes a 60 °C (**Tabla 4.1**)

Tabla 4.1. Resultados obtenidos de la síntesis de (met)acrilato de glicidilo catalizada por diferentes lipasas mediante transesterificación de varios dadores de acilo con glicidol en [C₁₆mim][NTf₂] o en medio sin disolvente a 60 °C.

Experimento	Enzima ^a	Medio de reacción	Dador de acilo ^b	Conversión ^c (%)
1	-	[C ₁₆ mim][NTf ₂]	VMA	0
2	TL IM	[C ₁₆ mim][NTf ₂]	VMA	36,9
3	TL IM	[C ₁₆ mim][NTf ₂]	MMA	0
4	TL IM	[C ₁₆ mim][NTf ₂]	MA	6
5	RM IM	[C ₁₆ mim][NTf ₂]	VMA	89,9
6	RM IM	[C ₁₆ mim][NTf ₂]	MMA	2
7	RM IM	[C ₁₆ mim][NTf ₂]	MA	12
8	Novozym 435	[C ₁₆ mim][NTf ₂]	VMA	100,0
9	CALB	[C ₁₆ mim][NTf ₂]	VMA	0
10	Novozym 435	[C ₁₆ mim][NTf ₂]	VA	100,0
11	Novozym 435	[C ₁₆ mim][NTf ₂]	MA	40,0
12	Novozym 435	[C ₁₆ mim][NTf ₂]	MMA	36,1
13	-	Sin disolvente	VA	0
14	TL IM	Sin disolvente	VA	12,4
15	TL IM	Sin disolvente	MA	4
16	TL IM	Sin disolvente	MMA	0
17	RM IM	Sin disolvente	VA	22,1
18	RM IM	Sin disolvente	MA	10
19	RM IM	Sin disolvente	MMA	2
20	Novozym 435	Sin disolvente	VA	97,2
21	Novozym 435	Sin disolvente	VMA	46,1
22	Novozym 435	Sin disolvente	MMA	0
23	Novozym 435	Sin disolvente	MA	16

^aTL IM, lipasa inmovilizada de *Thermomyces lanuginosus* (Lypozyme TL); RM IM, *Rhizomucor miehei* inmovilizada (Lypozyme RM); Novozym 435, lipasa B inmovilizada de *Candida antarctica*; CALB: lipasa B de *Candida antarctica* no inmovilizada; Dadores de acilo^b: VMA, metacrilato de vinilo; VA, acrilato de vinilo; MMA, metacrilato de metilo; MA, acrilato de metilo. Tiempo de reacción^c: 1 h (para VA); 5 h (para VMA y MM).

A continuación, en la **Figura 4.10** se muestra el perfil de actividad obtenido para la síntesis de metacrilato de glicidilo y acrilato de glicidilo catalizada por Novozym 435 en [C₁₆mim][NTf₂] a 60 °C. Tal y como se puede observar, se obtuvo un rendimiento del 100 % para ambos productos, aunque el acrilato de glicidilo fue obtenido más rápido que el metacrilato de glicidilo. Estos resultados demostraron la excelente idoneidad de este sistema biocatalizador / LI para la síntesis de estos compuestos en condiciones suaves. La **Tabla 4.1** muestra la influencia del uso de diferentes lipasas inmovilizadas y medios de reacción sobre la síntesis de ambos productos a partir de diferentes dadores de acilo. Es importante destacar que la reacción no se produjo en ausencia de enzima (**Tabla 4.1**, Experimentos **1** y **13**), o utilizando la lipasa B de *Candida antarctica* libre (Experimento **12**). Cuando se utilizó metacrilato de vinilo como dador de acilo para la síntesis de metacrilato de glicidilo en LI como medio de reacción (Experimentos **2**, **5**, **8**), el mejor resultado obtenido con Novozym 435, que proporcionó un 100 % de rendimiento a las 5 horas de reacción. Sin embargo, otras enzimas inmovilizadas dieron como resultados rendimientos más bajos, especialmente cuando se empleó Lypozyme TL. El resultado obtenido fue considerablemente menor cuando se utilizaron ésteres metílicos y lipasa TL como biocatalizador (ver experimentos **3-4**, **Tabla 4.1**), un comportamiento también observado para el caso de la lipasa RM (experimentos **6-7**, **Tabla 4.1**) y Novozym 435 (**8** y **10**, **Tabla 4.1**). En todos los casos, se puso de manifiesto que la lipasa Novozyme 435 es mejor biocatalizador para realizar la síntesis de (met)acrilato de glicidilo. Además, se estudió la naturaleza del dador de acilo en la síntesis de (met)acrilato de glicidilo en el LI [C₁₆mim][NTf₂] (experimentos **8-11**). No obstante, estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en la síntesis de propionato de cinamilo utilizando SLIL como medios de reacción (Alvarez *et al.*, 2019). Además, cabe destacar el papel clave que desempeña el LI en estas reacciones, ya que la misma reacción enzimática llevada a cabo en t-butanol da como resultado un 95% después de 24 horas (Schmitt y Caspari 2007).

Teniendo en cuenta la influencia de la naturaleza del dador de acilo seleccionado para la síntesis de metacrilato de glicidilo utilizando Novozym 435 y LI como medio de reacción (**Tabla 4.1**, Experimentos **6-8**), los mejores resultados fueron obtenidos cuando se utilizaron ésteres de vinilo como sustratos, ya que la tautomerización del alcohol vinílico producido a acetaldehído desplaza el equilibrio químico hacia la formación de productos (Lozano *et al.*, 2007).

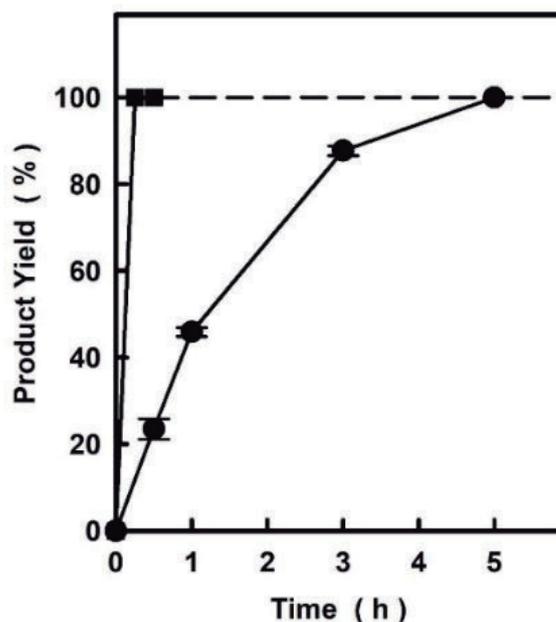


Figura 4.10. Perfil de actividad para la síntesis catalizada por Novozym 435 de metacrilato de glicidilo (●) o acrilato de glicidilo (■) mediante la transesterificación de (met)acrilato de vinilo con glicidol utilizando una relación de 1: 1,2 (mol / mol, respectivamente) en 50 % en peso de $[C_{16}mim][NTf_2]$ a 60 °C.

Además, también se estudió las transformaciones biocatalíticas en sistemas sin disolventes (Tabla 4.1, experimentos 13-23). Como se puede observar, la lipasa Novozym 435 proporcionó el mejor resultado. Es importante destacar que, en condiciones libres de disolventes, los rendimientos obtenidos fueron inferiores a los obtenidos cuando el SLIL se utilizó como medio de reacción, destacando una vez el importante efecto positivo de estos LIs para llevar a cabo transformaciones biocatalíticas. Asimismo, la Figura 4.11 muestra el rendimiento obtenido para la síntesis de metacrilato de glicidilo en diferentes ciclos consecutivos de recuperación y posterior reutilización del biocatalizador Novozym 435 en ausencia de disolvente y en $[C_{16}mim][NTf_2]$ como medio de reacción. No obstante, la recuperación del SLIL mostró un sistema muy estable en comparación con la reacción en condiciones libres de disolventes, lo que proporciona una excelente actividad durante al menos seis ciclos operacionales consecutivos. Así, el uso de LI ofrece importantes ventajas para la enzima inmovilizada, destacando una vez más su idoneidad con respecto al sistema libre de disolventes en los procesos biocatalíticos (Lozano *et al.*, 2015).

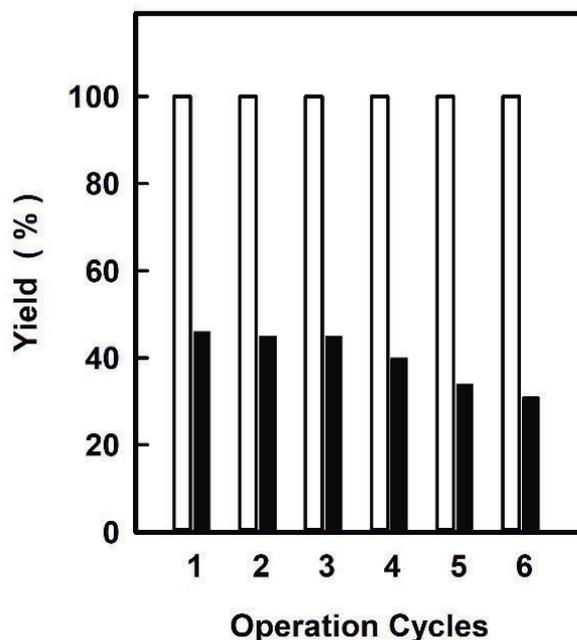


Figura 4.11. Rendimiento de metacrilato de glicidilo obtenido durante ciclos de operación continua para la transesterificación de metacrilato de vinilo con glicidol catalizada por Novozym 435 en 50% de $[C_{16}mim][NTf_2]$ (barras blancas), o sistema sin solvente (barras negras), durante 5 horas de reacción a 60 °C.

La mayor eficiencia catalítica obtenida cuando el medio de reacción es el SLIL probablemente sea como consecuencia del microambiente idóneo que se genera en torno al biocatalizador, manteniendo su capa esencial de agua que mantiene la conformación nativa de la enzima inalterada (Lozano *et al.*, 2015). Atendiendo a los resultados obtenidos, se seleccionó el sistema Novozym 435 / $[C_{16}mim][NTf_2]$ como medio de reacción para la síntesis de acrilato de glicidilo y metacrilato de glicidilo utilizando ésteres de vinilo como dadores de acilo, obteniendo un enfoque sencillo para la separación y recuperación de los dos productos mediante enfriamiento a -20 °C de la mezcla de reacción y su posterior centrifugación (-10 °C, 15.000 rpm) a través de membranas de filtración de nailon (0,2 μm de tamaño de poro) (ver **Figura 4.9**). Después de la aplicación de tres etapas consecutivas de enfriamiento y centrifugación, se detectó en torno a un 2 % de LI residual en la fracción del producto filtrado (analizado mediante ^{19}F -RMN).

4.3.3. Síntesis de (met)acrilato de glicerol carbonato catalizada por SILLP mediante cicloadición de CO₂ a (met)acrilato de glicidilo

La síntesis de carbonatos cíclicos mediante la reacción de cicloadición de dióxido de carbono a epóxidos, siguiendo protocolos de reacción sencillos y sostenibles, es de gran interés ya que implica la utilización de CO₂ como fuente de carbono (Guo *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2020). En este sentido, los LIs inmovilizados covalentemente (SILLPs) obtenidos mediante funcionalización de superficies poliméricas, proporcionan sistemas que tienen las características fundamentales de los LIs libres (p. ej. estabilidad, polaridad sintonizable, nanoestructura, etc.) (Giacalone *et al.*, 2016).

La estructura polimérica reticulada proporciona propiedades similares a los de LIs pero simplifican el aislamiento del producto, minimizan en gran medida el empleo de grandes cantidades de LI y, además, se facilita la completa recuperación y reutilización en procesos químicos verdes continuos (García-Verdugo *et al.*, 2015). Del mismo modo, los SILLPs también puede conducir a la mejora de la actividad del catalizador ya que, en algunos casos, contribuye en la activación del mismo y mejora la estabilidad y selectividad. En la **Tabla 4.2** se muestran los soportes que actúan como catalizador para la síntesis de los correspondientes carbonatos cíclicos a partir de acrilato de glicidilo o metacrilato de glicidilo. Los primeros SILLPs utilizados se basaron en polímeros tipo gel, que han demostrado tener buena accesibilidad de los sitios funcionales (Valverde *et al.*, 2021) y una buena actividad y estabilidad en reacciones de cicloadición de CO₂ a epóxidos en condiciones libres de disolventes a 0,2 MPa y 60 °C.

Tabla 4.2. Influencia de la naturaleza de los SILLPs en la síntesis de metacrilato de carbonato de glicerol obtenido por cicloadición de dióxido de carbono (0,2 MPa) a metacrilato de glicidilo (6 horas, 60 °C).

Experimento	SILLP ^a	Catión	Anión	Carga de LI (meq/g _{soporte}) ^b	Rendimiento (%)
1	SILLP-1	[1-metilimidazolio]	[Cl]	1,01	52
2	SILLP-2	[1-metilimidazolio]	[Cl]	3,18	74
3	SILLP-3	[1-butimidazolio]	[Cl]	2,80	100
4	SILLP-4	[1-butimidazolio]	[NTf ₂] ^c	1,46	4
5	SILLP-5	[1-decil-2-metilimidazolio]	[Cl]	0,88	44
6	SILLP-6	[1-decil-2-metilimidazolio]	[Cl]	2,20	100

^aPreparado a partir de polímeros tipo gel (microporosos) de 4,3 meq Cl / g, 1% de DVB. ^bCarga unitaria de imidazolio calculada mediante análisis elemental. ^c[NTf₂]: Bis(trifluorometilsulfonil)imida.

El carácter nucleofílico del anión es un factor clave para la obtención de SILLPs catalíticamente activos. De hecho, los SILLPs que contienen anión cloruro (**Tabla 4.2**, experimento **3**) en su estructura son catalizadores muy activos, mientras que aquellos que tienen como anión [NTf₂] (Experimento **4**) no mostraron actividad catalítica. Por otro lado, también es importante mencionar que, en las mismas condiciones experimentales, el polímero PS-DVB sin funcionalizar no fue activo en la reacción de cicloadición de CO₂. En este sentido, el aumento en la carga de LI en la matriz polimérica dio como resultados mejores rendimientos en la síntesis de GCMA cuando se utilizó el mismo catión de alquilimidazolio. Con respecto al efecto de la longitud de la cadena alquímica, se alcanzaron rendimientos del 100 % para la síntesis de GCMA con cationes de 1-butylimidazolio y 1-decylimidazolio (Experimentos **3** y **6**), mientras que el rendimiento fue menor con 1-metylimidazolio (Experimento **2**).

Otros grupos de investigación han demostrado la excelente idoneidad del [1-aminopropil-3-metylimidazolio] [Cl] como catalizador para la síntesis de carbonato de propileno a partir de óxido de propileno y dióxido de carbono, obteniendo rendimientos del 96% después de 4 horas de reacción a 10 bares y 120 °C (Chen *et al.*, 2017) Asimismo, se ha informado sobre la idoneidad de los LIs con catión imidazolio y anión Cl⁻, Br⁻ y I⁻, para catalizar la reacción de conversión de epiclorhidrina en carbonato de 3-cloropropileno (Bobbink *et al.*, 2018). Mediante este estudio se demostró que la interacción entre el catión imidazolio y el anión haluro y, por lo tanto, el carácter nucleofílico del anión haluro, afecta al mecanismo de reacción de formación del carbonato cíclico.

Por otro lado, en la **Figura 4.12**, se muestran los perfiles de evolución temporal para la síntesis de GCMA catalizada por el SILLP-6 en función de la presión de CO₂ a 60 °C. Como se puede observar, este catalizador de LI soportado proporcionó la conversión completa del sustrato epóxido en el correspondiente carbonato cíclico para todas las presiones de CO₂ seleccionadas después de 20 horas de reacción. Asimismo, para el caso del acrilato de glicidilo, se observó un comportamiento similar del catalizador SILLP-6, proporcionando la conversión completa para la síntesis de GCA en las mismas condiciones. Cuando las reacciones se llevaron a cabo a presiones superiores a los 2 bares, se obtuvieron rendimientos de producto superiores al 95% en tan solo 6 horas de reacción. Solo para el experimento donde la presión seleccionada fue 1 bar, se observó una ligera disminución del rendimiento.

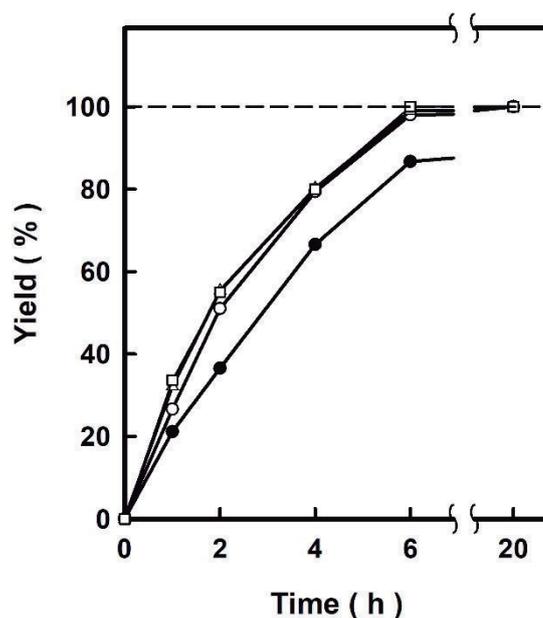


Figura 4.12. Perfil de la evolución temporal de la síntesis de metacrilato de carbonato de glicerol catalizada por SILLP basada en [1-decil-2-metilimidazolio] [Cl] mediante la cicloadición de CO_2 a metacrilato de glicidilo, en función de la presión de CO_2 (●, 0,1 MPa; ○, 0,2 MPa; △, 0,5 MPa; □, 1 MPa) a 60 °C.

En este sentido, los resultados obtenidos con los SILLPs para la obtención de GCMA concuerdan con los resultados ya obtenidos con sistemas organocatalíticos homogéneos o heterogéneos (Schimf *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020). Se requieren temperaturas en torno a 100 °C y presiones que oscilan entre 10 y 30 bares para alcanzar la misma eficiencia catalítica. Esto demuestra la excelente idoneidad de los SILLPs como un catalizador sostenible, barato y fácil de preparar para la obtención directa de GCMA mediante cicloadición de CO_2 al derivado de glicidilo. Dicha estrategia permita la síntesis de carbonatos acrílicos mediante la integración de dos etapas catalíticas consecutivas (**Figura 4.9**) en un solo proceso. En la primera etapa, la reacción de transesterificación de (met)acrilato de vinilo con glicidol catalizada por CALB inmovilizada. En la segunda etapa, la cicloadición de CO_2 catalizada por un SILLP en condiciones libres de disolvente para la obtención del (met)acrilato de glicerol carbonato puro.

4.3.4. Síntesis quimio-enzimática de GCMA en ausencia de disolvente

Con el fin de mejorar la eficiencia del proceso, la reacción de obtención de GCMA se llevó a cabo mediante el empleo de un multicatalizador en una sola etapa. La inmovilización de CALB en SILLPs que contiene cationes de 1-decil-2metilimidazolio

ha demostrado ser un excelente sistema biocatalítico para procesos en continuo en condiciones supercríticas (Lozano *et al.*, 2007). La naturaleza específica del SILLP permite ajustar la eficiencia biocatalítica mediante la selección adecuada de parámetros como la morfología de la resina y la naturaleza del anión y catión del LI. Además, estos sistemas contribuyen en la estabilización del biocatalizador soportado, lo que permite su uso prolongado incluso bajo irradiación microondas o en procesos de flujo continuo en scCO₂ (Lozano *et al.*, 2007).

En este contexto, se llevó a cabo el proceso de inmovilización mediante adsorción de CALB en SILLP-6, lo que generó un catalizador quimio-enzimático multicatalítico capaz de llevar a cabo, en una sola etapa, las dos reacciones catalíticas para la síntesis de GCMA, a partir de metacrilato de vinilo, glicidol y CO₂ (**Figura 4.13**). Este catalizador proporcionó un rendimiento del 100 % a 1 bar y 60 °C en ausencia de disolvente a las 6 horas de reacción, lo que demuestra la excelente idoneidad del LI unido covalentemente como un microambiente apropiado para la catálisis enzimática en condiciones libres de disolventes.

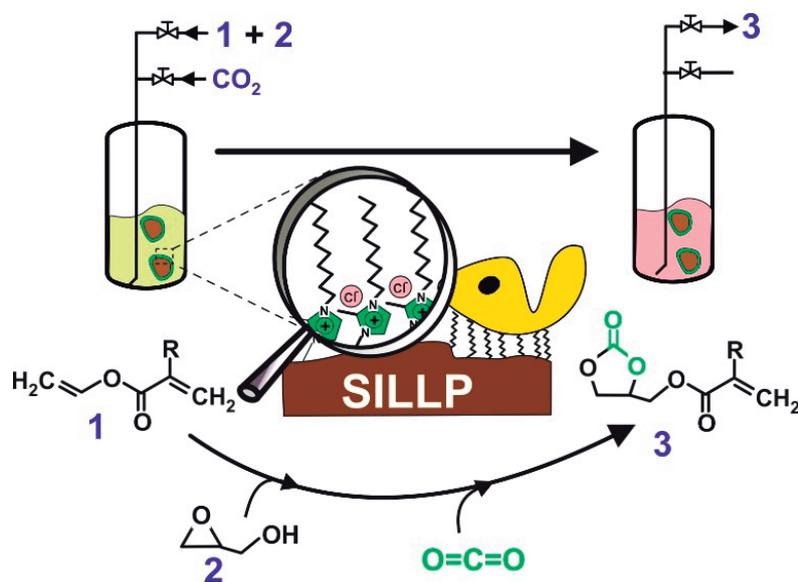


Figura 4.13. Síntesis quimio-enzimática en “one pot” de GCA o GCMA (3) mediante dos reacciones consecutivas llevadas a cabo por CALB inmovilizada sobre SILLP 1-alkil-3-metilimidazolío, como catalizador dual, en condiciones libres de disolventes. (Met)acrilato de vinilo (1); glicidol (2). Acrilato de vinilo (R =-H); metacrilato de vinilo (R =-CH₃)

Además, el producto final puro GCA se separó fácilmente por filtración del catalizador CALB-SILLP-6, ofreciendo un diseño sostenible que incluye la recuperación y reutilización del sistema multicatalítico. La **Figura 4.14.** muestra el perfil de actividad

operacional de GCMA catalizada por CALB-SILLP-6 sin disolvente a 60 °C y 1 bar. Como se puede observar, los rendimientos obtenidos fueron prácticamente los mismos durante al menos 5 ciclos operacionales consecutivos.

Estos resultados demostraron que los SILLP pueden reproducir el comportamiento observado para los procesos biocatalíticos en LI a granel, utilizando cantidades significativamente menores de equivalentes de IL, lo que conduce a la obtención de catalizadores más activos y estables y, al mismo tiempo, permite un protocolo simple con la reutilización de catalizadores.

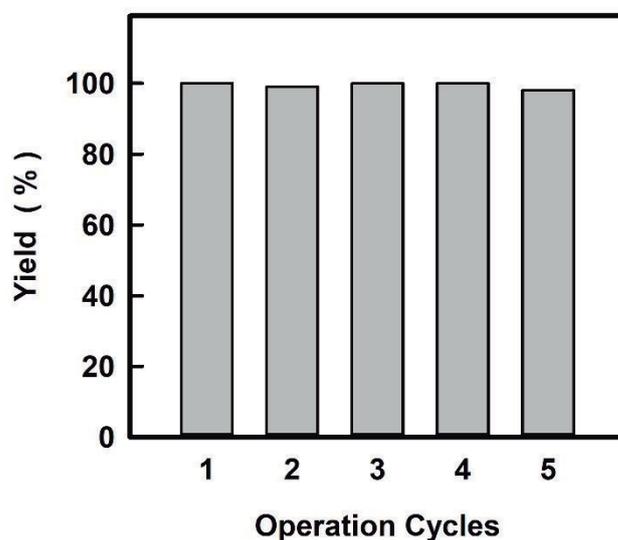


Figura 4.14. Estabilidad operacional de CALB inmovilizada en el SILLP [1-decil-2-metimidazolio] [Cl] (SILLP-6, 30 mg) para la producción de GCMA mediante de dos reacciones consecutivas en un sistema de un solo recipiente, a partir de metacrilato de vinilo, glicidol (2,2 mmol) y CO₂ (1 MPa) como sustratos, después de 6 horas a 60 °C.

4.4. Conclusiones

El enfoque quimio-enzimático para la obtención de MAGs omega-3 a partir de aceite de pescado o aceite de linaza se llevó a cabo con éxito en medios de reacción LI y LI / scCO₂. La estrategia se basó en dos etapas catalíticas consecutivas, las cuales implican la transformación selectiva de TAGs en FASEs por Novozym, seguida de la hidrólisis de estos derivados solketílicos con una zeolita ácida. Se demostró que el SLIL [C₁₈tma] [NTf₂] es un excelente medio de reacción para la transesterificación de aceites ricos en ácidos grasos omega-3 con solketal, incluso en continuo bajo condiciones supercríticas.

Además, se ha demostrado la influencia del catalizador ácido en la segunda etapa catalítica y los parámetros clave (p. ej. temperatura) para la hidrólisis del anillo ketal sin afectar al enlace éster. Ambos enfoques continuo y discontinuo proporcionaron excelentes resultados para la síntesis de MAGs omega-3. Para el sistema en continuo, el empleo de un codisolvente polar como es el t-butanol, permitió una mejora en el transporte de masa de los componentes hidrofílicos. En el caso del protocolo discontinuo, el uso de SLIL permitió la separación del producto intermedio (FASE), con la recuperación completa del LI para su posterior reutilización. Por lo tanto, los FASEs extraídos pueden ser transformados selectivamente en MAGs omega-3 utilizando una zeolita ácida en condiciones suaves. Los resultados obtenidos representan claramente un enfoque sostenible para la producción de MAGs omega-3 a partir de fuentes naturales, promoviendo el desarrollo de nuevos procesos multicatalíticos verdes a nivel industrial.

Un nuevo enfoque quimio-enzimático para la síntesis de glicerol carbonato (met)acrilato se llevó a cabo con éxito en LI y reacción sin disolventes medios de reacción. La estrategia se basó en dos etapas catalíticas consecutivas, que implicaban la transesterificación selectiva de (met)acrilato de vinilo con glicidol mediante CALB inmovilizado (es decir, Novozym 435 comercial o CALB adsorbida en SILLPs) para producir (met)acrilato de glicidilo, seguido de la cicloadición de CO₂ en el resto epoxi resultante catalizada por un SILLP que contiene 1-alkil-2-metilimidazolio unido covalentemente. Se demostró que SLIL [C₁₆mim] [NTf₂] es un excelente medio de reacción para la reacción de transesterificación catalizada por lipasa, que permitió una gran estabilidad operativa. De la misma manera, la adecuada selección de la estructura del SILLP utilizado como catalizador, incluyendo su morfología y la naturaleza iónica, así como la presión de CO₂, se han convertido en parámetros clave para lograr la conversión completa del anillo epóxido en el carbonato cíclico correspondiente en sistemas sin disolventes.

Aunque se llevó a cabo con éxito una síntesis eficiente de GCMA utilizando los dos pasos catalíticos y los procesos de un solo recipiente, lo que permitió una recuperación y reutilización completas de todos los elementos de los sistemas de reacción (biocatalizador, IL, SILLP), el enfoque libre de solventes basado sobre el uso de CALB-SILLP parece más apropiado. La excelente idoneidad del CALB inmovilizado en un SILLP que contiene [1-decil-2-metilimidazolio] [Cl] se demostró mediante el mantenimiento de las dos actividades catalíticas diferentes involucradas en este proceso

durante muchos ciclos de operación. Al utilizar este enfoque, se obtuvo GCMA casi puro en condiciones suaves (es decir, 60 °C, presión de CO₂ de 0,2-1 MPa). Estos resultados muestran claramente cómo la combinación de tecnologías de LIs y (bio)catalizadores ha abierto una nueva forma sostenible de contribuir a la reducción de la concentración de CO₂ en la atmósfera a través de su captura e incorporación en productos de valor añadido de interés para la síntesis biocatalítica de monómeros muy útiles en la preparación de nuevos polímeros libres de isocianatos.

La metodología experimental de los resultados obtenidos se encuentra detallada en los **ANEXOS IV y V**

4.5. Bibliografía

Ahn, Y., Byun, J., Kim, D., Kim, B. S., Lee, C. S., Han, J. System-level analysis and life cycle assessment of CO₂ and fossil-based formic acid strategies. *Green Chem.*, **2019**, 21, 3442-3455.

Alvarez, E., Rodriguez, J., Villa, R., Gomez, C., Nieto, S., Donaire, A., Lozano, P. Clean Enzymatic Production of Flavor Esters in Spongellike Ionic Liquids. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2019**, 7, 13307-13314.

An, M. Z., Bai, Y., Bai, Y. P., Chen, G., Li, W. D., Zhao, Y. B. Chinese Patent N109216762A. **2018**.

Bassam, N., Laure, C., Blanco, J. F., Yann, R., Zephirin, M. Aza-Michael versus aminolysis reactions of glycerol carbonate acrylate. *Green Chem.*, **2013**, 15, 1900-1909.

Baum, S., Ritter, E., Smirnova, I., Schilling, M., Liese, A. The role of phase behavior in the enzyme catalyzed synthesis of glycerol monolaurate. *RSC Adv.*, **2016**, 6, 32422-32429.

Beharaj, A., Ekladios, I., Grinstaff, M.W. Poly(Alkyl Glycidate Carbonate)s as Degradable Pressure-Sensitive Adhesives *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 1407-1411.

Bizet, B., Grau, E., Cramail, H., Asua, J. M. Water-based non-isocyanate polyurethane-ureas (NIPUUs). *Polym. Chem.*, **2020**, 11, 3786-3799.

Bobbink, F. D., Vasilyev, D., Hulla, M., Chamam, S., Menoud, F., Laurency, G., Katsyuba S., Dyson, P. J. Intricacies of Cation–Anion Combinations in Imidazolium SaltCatalyzed Cycloaddition of CO₂ Into Epoxides. *ACS Catal.*, **2018**, 8, 2589- 2594.

Buttner, H., Kohrt, C., Wultia, C., Schäffner, B., Groenke, K., Hu, Y. Y., Kruse, D., Werner, T. Life Cycle Assessment for the Organocatalytic Synthesis of Glycerol Carbonate Methacrylate. *ChemSusChem*, **2019**, 12, 2701-2707.

Castejon, N., Senorans, F. J. Strategies for Enzymatic Synthesis of Omega-3 Structured Triacylglycerols from Camelina sativa Oil Enriched in EPA and DHA. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2019**, 121, 1800412.

Castillo, E., Dossat, V., Marty, A., Condoret, J. S., Combes, D. The role of silica gel in lipase-catalyzed esterification reactions of high-polar substrates. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1997**, 74, 77–85.

Chen, C., Ma, Y., Zheng, D. N., Wang, L., Li, J. F., Zhang, J. L., He, H. Y., Zhang, S. J. Insight into the role of weak interaction played in the fixation of CO₂ catalyzed by the amino-functionalized imidazolium-based ionic liquids. *J. CO₂ Util.* **2017**, 18, 156-163.

Chen, H. Y., Chauhan, P., Yan, N. “Barking” up the right tree: biorefinery from waste stream to cyclic carbonate with immobilization of CO₂ for non-isocyanate polyurethanes. *Green Chem.*, **2020**, 22, 6874-6888.

Da Costa, J. P., Santos, P. S. M., Duarte, A. C., Rocha-Santos, T. (Nano)plastics in the environment- Sources, fates and effects. *Sci. Total Environ.*, **2016**, 566, 15-26.

European Food Emulsifier Manufacturers Association, e.V. E 471, in EFEMA Index of Food Emulsifiers, June **2015** Ed., pp. 51–56. (See <http://www.emulsifiers.org>).

Feltes, M. M. C., de Oliveira, D., Block, J. M., Ninow, J. L. Glycerolysis of sardine oil catalyzed by a water dependent lipase in different tert-alcohols as reaction médium. *Food Bioprocess Technol.*, **2013**, 6, 17–35.

Fiorani, G., Perosa, A., Selva, M. Dimethyl carbonate: a versatile reagent for a sustainable valorization of renewables. *Green Chem.*, **2018**, 20, 288- 322.

García-Verdugo, E., Altava, B., Burguete, M. I., Lozano, P., Luis, S. V. Ionic liquids and continuous flow processes: a good marriage to design sustainable processes. *Green Chem.*, **2015**, 17, 2693-2713.

Giacalone, F., Gruttadauria, M. Covalently supported ionic liquid phases: an advanced class of recyclable catalytic systems. *ChemCatChem.*, **2016**, 8, 664- 684.

Guclu-Ustundag, O., Temelli, F. Solubility behavior of ternary systems of lipids, cosolvents and supercritical carbon dioxide and processing aspects. *J. Supercrit. Fluids*, **2005**, 36, 1–15.

- Guo, L. P., Lamb, K. J., North, M. Recent developments in organocatalysed transformations of epoxides and carbon dioxide into cyclic carbonates. *Green Chem.*, **2021**, 23, 77-118.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrie, D., Vaultier, M., Iborra, J. L. Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Chem. Commun.*, **2002**, 692-693.
- Lozano, P., Garcia-Verdugo, E., Piamtongkam, R., Karbass, N., De Diego, T., Burguete, M. I., Luis, S. V., Iborra, J. L. Bioreactors based on monolith-supported ionic liquid phase for enzyme catalysis in supercritical carbon dioxide. *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, 349, 1077-1084.
- Lozano, P., Piamtongkam, R., Kohns, K., De Diego, T., Vaultier, M., Iborra, J.L. Ionic liquids improve citronellyl ester synthesis catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in solvent-free media. *Green Chem.*, **2007**, 9, 780-784.
- Lozano, P. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. *Green Chem.*, **2010**, 12, 555-569.
- Lozano, P., Bernal, J. M., Piamtongkam, R., Fetzer, D., Vaultier, M. One-Phase Ionic Liquid Reaction Medium for Biocatalytic Production of Biodiesel. *ChemSusChem*, **2010**, 3, 1359-1363.
- Lozano, P., Bernal, J. M., Vaultier, M. Towards continuous sustainable processes for enzymatic synthesis of biodiesel in hydrophobic ILs / scCO₂ biphasic systems. *Fuel*, **2011**, 90, 3461-3467.
- Lozano, P., Bernal, J. M., Navarro, A. A clean enzymatic process for producing flavour esters by direct esterification in switchable ionic liquid / solid phases. *Green Chem.*, **2012**, 14, 3026-3033.
- Lozano, P., Garcia-Verdugo, E., Bernal, J. M., Izquierdo, D. I., Burguete, M. I., Sanchez-Gomez, G., Luis, S. V. Immobilised lipase on structured supports containing covalently attached ionic liquids for the Continuous synthesis of biodiesel in scCO₂. *ChemSusChem*, **2012**, 5, 790-798.
- Lozano, P., Bernal, J. M., Sanchez-Gomez, G., Lopez-Lopez, G., Vaultier, M. How to produce biodiesel easily using a green biocatalytic approach in sponge-like ionic liquids. *Energy Environ. Sci.*, **2013**, 6, 1328-1338.
- Lozano, P., Bernal, J. M., Garcia-Verdugo, E., Sanchez-Gomez, G., Vaultier, M., Burguete, M. I., Luis, S. V. Sponge-like ionic liquids: a new platform for green biocatalytic chemical processes. *Green Chem.*, **2015**, 17, 3706-3717.
- Lozano, P., Bernal, J. M., Nieto, S., Gomez, C., Garcia-Verdugo, E., Luis, S.V. Active biopolymers in green non-conventional media: a sustainable tool for developing clean chemical processes. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 17361-7374.
- Lozano, P., Gomez, C., Nicolas, A., Polo, R., Nieto, S., Bernal, J. M., Garcia-Verdugo, E., Luis, S. V. Clean Enzymatic Preparation of Oxygenated Biofuels from Vegetable and Waste Cooking Oils by Using Spongelike Ionic Liquids Technology. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **2016**, 4, 6125-6132.
- Lozano, P., Gomez, C., Nieto, S., Sanchez-Gomez, G., Garcia-Verdugo, E., Luis, S. V. Highly selective biocatalytic synthesis of monoacylglycerides in sponge-like ionic liquids. *Green Chem.*, **2017**, 19, 390-396.
- Luo, H., Zhai, Z., Fan, W. Y., Cui, W. Y., Nan, G. Z., Li, Z. M. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2015**, 54, 4923-4928.
- Martin, S., Porcar, R., Peris, E., Burguete, M. I., Garcia-Verdugo, E., Luis, S.V. Supported ionic liquid-like phases as organocatalysts for the solvent-free cyanosilylation of carbonyl compounds: from batch to continuous flow process. *Green Chem.* **2014**, 16, 1639-1647.
- Melgosa, R., Sanz, M. T., Benito-Roman, O., Illera, A. E., Beltran, S. Supercritical CO₂ processing of omega-3 polyunsaturated fatty acids-Towards a biorefinery for fish waste valorization. *J. CO₂ Util.*, **2019**, 31, 65-74.
- Morales-Cerrada, R., Boutevin, B., Caillol, S. Glycerol carbonate methacrylate: A cross-linking agent for hydroxyurethane-acrylate coatings. *Prog. Org. Coat.* **2021**, 151, 106078.

Ozorio, L. P., Pianzolli, R., Mota, M. B. S., Mota, C. J. A. Reactivity of glycerol / acetone ketal (solketal) and glycerol / formaldehyde acetals toward acid-catalyzed hydrolysis. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2012**, 23, 931–937.

Perez-Martinez, P., Katsiki, N., Mikhailidis, D. P. The Role of n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease: Back to the Future. *Angiology*, **2020**, 71, 10–16.

Perez-Pariente, J., Diaz, I., Mohino, F., Sastre, E. Selective synthesis of fatty monoglycerides by using functionalised mesoporous catalysts. *Appl. Catal., A*, **2003**, 254, 173–188.

Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G., Locatelli, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresour. Technol.*, **2006**, 98, 648–653.

Schimpf, V., Asmacher, A., Fuchs, A., Bruchmann, B., Mulhaupt, R. Polyfunctional Acrylic Non-isocyanate Hydroxyurethanes as Photocurable Thermosets for 3D Printing. *Macromolecules*, **2019**, 52, 3288-3297.

Schmitt, B., Caspari, M. US Patent US 2007/0106044 A1, **2007**.

Siener, R., Alteheld, B., Terjung, B., Junghans, B., Bitterlich, N., Stehle, P., Metzner, C. Change in the fatty acid pattern of erythrocyte membrane phospholipids after oral supplementation of specific fatty acids in patients with gastrointestinal diseases. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **2010**, 64, 410–418.

Solaesa, A. G., Sanz, M. T., Falkeborg, M., Beltran, S., Guo, Z. Production and concentration of monoacylglycerols rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids by enzymatic glycerolysis and molecular distillation. *Food Chem.*, **2016**, 190, 960–967.

Solaesa, A. G., Sanz, M. T., Melgosa, R., Beltran, S. Substrates emulsification process to improve lipase-catalyzed sardine oil glycerolysis in different systems. Evaluation of lipid oxidation of the reaction products. *Food Res. Int.*, **2017**, 100, 572–578.

Tomkins, P., Muller, T. E. Evaluating the carbon inventory, carbon fluxes and carbon cycles for a long-term sustainable world. *Green Chem.*, **2019**, 21, 3994-4013.

Turek, C., Stintzing, F. C. Stability of Essential Oils: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2013**, 12, 40–53.

Valenzuela, A., Valenzuela, V., Sanhueza, J., Nieto, S. Docosahexaenoic acid (DHA), essentiality and requirements: why and how to provide supplementation. *Ann. Nutr. Metab.*, **2005**, 49, 49–53.

Valverde, D., Porcar, R., Izquierdo, D., Burguete, M. I., Garcia-Verdugo, E., Luis, S.V. Rose Bengal Immobilized on Supported Ionic-Liquid-like Phases: An Efficient Photocatalyst for Batch and Flow Processes. *ChemSusChem*, **2019**, 12, 3996-4004.

Valverde, D., Porcar, R., Lozano, P., García-Verdugo, E., Luis, S. V. Multifunctional Polymers Based on Ionic Liquid and Rose Bengal Fragments for the Conversion of CO₂ to Carbonates. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2021**, 9, 2309-2318.

Villa, R., Alvarez, E., Porcar, R., Garcia-Verdugo, E., Luis, S. V., Lozano, P. Ionic liquids as an enabling tool to integrate reaction and separation processes. *Green Chem.*, **2019**, 21, 6527-6544.

Xie, S. Q., Zhang, W. L., Lan, X. Y., Lin, H. F. CO₂ Reduction to Methanol in the Liquid Phase: A Review. *ChemSusChem*. **2020**, 13, 6141-6159.

Yadav, N., Seidi, F., Crespy, D., D'Elia, V. Polymers Based on Cyclic Carbonates as Trait d'Union Between Polymer Chemistry and Sustainable CO₂ Utilization. *ChemSusChem*, **2019**, 12, 724-754.

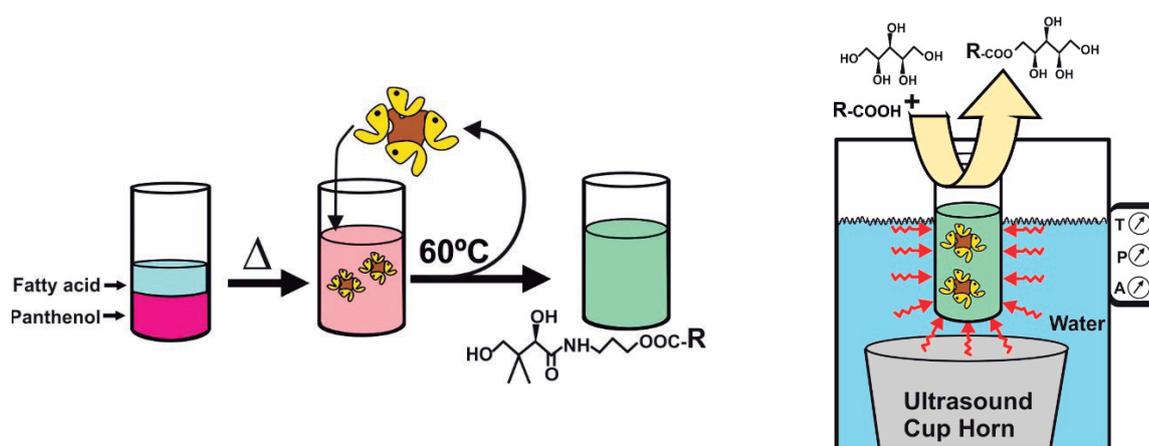
Youichi, Y. Patent WO2013129486A1, **2013**.

Zanoni, A., Gardoni, G., Sponchioni, M., Moscatelli, D. Valorisation of Glycerol and CO₂ to Produce Biodegradable Polymer Nanoparticles with a High Percentage of Bio-Based Components. *J.CO₂ Util.*, **2020**, 40, 101192.

Zhang, H., Cui, Y. A., Zhu, S. M., Feng, F. Q., Zheng, X. D. Characterization and antimicrobial activity of a pharmaceutical microemulsion. *Int. J. Pharm.*, **2010**, 395, 154–160.

CAPÍTULO V:

Procesos biocatalíticos en sistemas libres de disolventes de interés en la industria cosmética



Este capítulo es una adaptación de los siguientes trabajos publicados:

- (1) Elena Alvarez, **Rocio Villa**, Susana Nieto, Antonio Donaire, Eduardo Garcia-Verdugo, Santiago V. Luis, Pedro Lozano. The suitability of lipases for the synthesis of bioactive compounds with cosmeceutical applications. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, **021**, 18 (4), 515-528. <https://doi.org/10.2174/1570193X17999200805215623> (ANEXO VI)
- (2) Pedro Lozano, Elena Alvarez, Susana Nieto, **Rocio Villa**, Celia Gómez, Juana M. Bernal, Antonio Donaire". Biocatalytic synthesis of panthenyl monoacyl esters in ionic liquids and deep eutectic solvents. *GreenChem.*, **2019**, 21, 3353-3361. <https://doi.org/10.1039/c9gc01076a>. (ANEXO VII)
- (3) Susana Nieto, **Rocio Villa**, Antonio Donaire, Pedro Lozano. Ultrasound-assisted enzymatic synthesis of xilitol fatty acid esters in solvent-free conditions. *Ultrasonics Sonochemistry* (under revision)(ANEXO VIII)

5.1. Resumen

El desarrollo de la cosmética tiene diferentes objetivos, pero se ha centrado principalmente en la preservación y mejora de la belleza, así como el rejuvenecimiento de la piel (Ansorge-Schumacher y Thum, 2013). Atendiendo a la clasificación de los cosméticos según su aplicación, estos se pueden dividir en diversos grupos de productos: cuidado de la piel (p. ej. leches corporales, lociones, espumas de afeitado, etc.), cuidado del cabello (p. ej. champús, acondicionadores), fragancias (p. ej. desodorantes, perfumes, etc.), etc. En cuanto a la composición química, esta depende del tipo de producto y de los compuestos bioactivos utilizados como elementos de partida (p. ej. derivados de vitaminas, extractos de plantas, aceites esenciales, etc.) (Khan y Rathod, 2015; Thum, 2004). En este sentido, cabe destacar el término “*cosmocéutico*”, que hace referencia al empleo de compuestos bioactivos que aportan beneficios para la salud en productos cosméticos con propiedades tales como la actividad antioxidante, antienvjecimiento y poder antiinflamatorio o fotoprotector (Ansorge-Schumacher, 2013). Además, debe tenerse en cuenta que el compuesto bioactivo que constituye un determinado producto cosmocéutico debe ser obtenido a partir de fuentes naturales (p. ej. extractos de hierbas), mediante técnicas de fermentación, síntesis enzimática o mediante la modificación de compuestos naturales.

Una vez más, la sostenibilidad tiene un papel preponderante en la industria química, cuyo principal objetivo es la búsqueda de nuevos métodos sintéticos a escala industrial basados en enfoques verdes característicos por la elevada selectividad de las transformaciones catalíticas junto con la separación limpia y eficiente de los productos puros (Ansorge-Schumacher, 2013; Lozano *et al.*, 2015). Para ello, el uso de biocatalizadores como las enzimas puede ser considerado una herramienta muy poderosa y alternativa a los catalizadores químicos tradicionales, para la transformación de productos naturales o sintéticos en condiciones suaves (Ferreira-Dias *et al.*, 2013; Azerad, 2001). Aunque la combinación de biocatalizadores con disolventes verdes no acuosos, como son $scCO_2$ y los LIs, pueden generar plataformas sinérgicas con propiedades excepcionales para el desarrollo de nuevos procesos químicos incluso en condiciones de flujo (Villa *et al.*, 2019), las genuinas características del sector cosmético hacen que los procesos libres de todo disolvente tengan un interés prioritario.

Por ello, este capítulo de la Tesis Doctoral está centrado en un análisis del papel que las lipasas pueden ofrecer en la síntesis de principios activos y productos de interés para la industria cosmética, y en su aplicación en dos procesos de síntesis biocatalítica de ésteres bioactivos en sistemas libres de disolvente.

En este Capítulo se aborda la síntesis enzimática de monoésteres de pantenol mediante esterificación directa con ácidos grasos, que son capaces de formar mezclas eutécticas profundas, las cuales presentan condiciones idóneas para la verificación de la acción enzimática. En la parte final del capítulo se estudia la síntesis enzimática de ésteres de xilitol, también mediante la esterificación directa de ácidos grasos con xilitol en ausencia de disolventes. En este segundo ejemplo, la inmiscibilidad mutua de los sustratos y su incapacidad para formar DES, hizo necesaria la asistencia con ultrasonidos, la cual demostró ser una herramienta fundamental para la verificación del proceso biocatalítico, acortando los tiempos de reacción con respecto a los sistemas DES.

5.2. Idoneidad de las lipasas para la obtención de compuestos bioactivos con aplicaciones en la industria cosmética

Las lipasas son uno de los biocatalizadores más eficientes para la síntesis de ésteres de aromas y fragancias mediante una reacción de (trans)esterificación en medios no acuosos. Sin embargo, el empleo de sustratos de partida sintéticos (p. ej. ácido acético anhidro o ésteres de vinilo) conduce a la ruptura del principal objetivo de obtención de productos “naturales” en reacciones biocatalíticas. Por ello, la esterificación directa de sustratos “naturales” es una excelente opción para la síntesis de ésteres bioactivos, donde la desactivación de la enzima puede quedar limitada con el empleo de LIs como medios de reacción (Lozano *et al.*, 2015). Por otro lado, es importante destacar que las enzimas también pueden ser consideradas como agentes bioactivos naturales, útiles en tratamientos específicos del cuidado personal (p. ej. desacoplamiento de moléculas inactivas de la piel por proteasas, que favorece el enriquecimiento de la epidermis con ceramidas por glucosidasas, facilitando la síntesis de melanina en la piel por tirosinasa, etc.) (Goldstein, 2002).

La síntesis enzimática de fragancias con aplicaciones industriales ha sido diseñada mediante el desarrollo de enfoques limpios y sostenibles que implican el acoplamiento de biotransformaciones catalíticas y reactores de membrana (Gubicza *et al.*, 2008). Sin embargo, para solventar los problemas generados como consecuencia principal de la

utilización de disolventes orgánicos volátiles durante el proceso, la síntesis de estos compuestos de alto valor añadido en el sector de la cosmética ha sido posible realizarla mediante enfoques verdes con el empleo de lipasas como biocatalizadores y SLIL como medios de reacción (Alvarez *et al.*, 2019).

Entre los compuestos que presentan buenas propiedades y son interesantes en la industria de cosmética, farmacéutica y alimentaria, cabe destacar los antioxidantes (**Figura 5.1**), ya que reducen la oxidación a través de mecanismos que están involucrados en la formación de radicales libres que promueven los procesos de oxidación (Karovicova y Simko, 2000). Atendiendo a su clasificación, pueden dividirse en dos grupos principales: (1) compuestos derivados de plantas de bajo peso molecular (p. ej. polifenoles, como los flavonoides, que no han demostrado ser esenciales para la salud) (Ferreira-Dias *et al.*, 2013), y (2) aquellos cuya ingestión es esencial en la alimentación humana (p. ej. vitamina C y vitamina E).

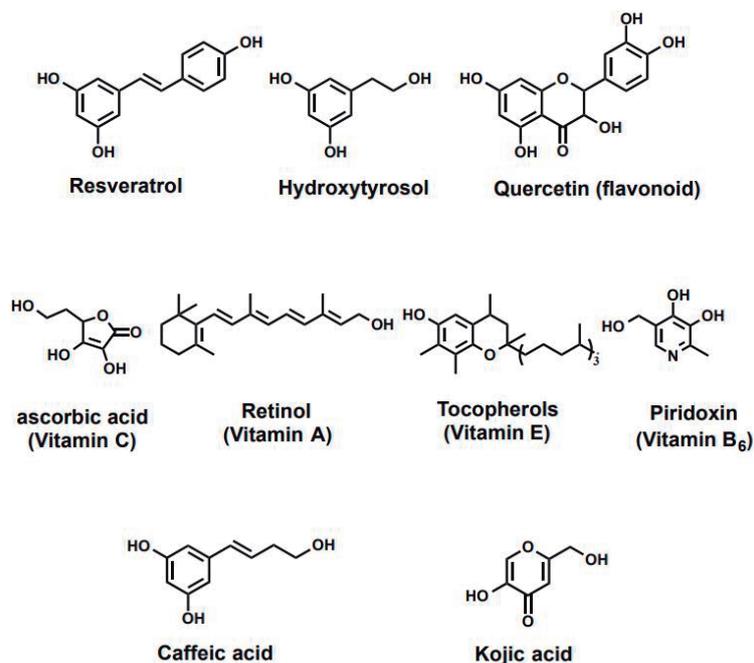


Figura 5.1. Estructuras de algunas moléculas antioxidantes comunes.

Sin embargo, sus principales aplicaciones como antioxidantes en la industria química presentan algunas limitaciones debido a su naturaleza moderadamente hidrofílica y a la baja biodisponibilidad de estos ingredientes. No obstante, se han desarrollado derivados sintéticos de antioxidantes a través nuevos enfoques basados en la catálisis enzimática

para superar las limitaciones de los procesos convencionales que se basan, en su mayoría, en el uso de ácidos corrosivos o catalizadores básicos. Estos procesos ofrecen productos que no cumplen los requisitos para sus aplicaciones directas en los sectores alimentarios, cosméticos o farmacéutico (Ansorge-Schumacher y Thum, 2013; Khan y Rathod, 2015).

El ácido L-ascórbico (**vitamina C**) es el principal antioxidante soluble en agua, utilizado en la industria cosmética como conservante, regulador de pH y / o compuesto cosmocéutico, debido a su actividad fotoprotectora frente a la irradiación UVA y UVB y propiedades cicatrizantes (Murad *et al.*, 1981). Este ácido tiene solo un alcohol primario, que puede reaccionar con un dador de acilo, para producir un éster de ascorbilo. Además, se ha demostrado que la adición de una o más cadenas de hidrocarburos al anillo de ácido ascórbico genera una mejora en la actividad antioxidante de la vitamina C (Lonostro *et al.*, 2000). En este sentido, la síntesis de ésteres de ascorbilo catalizadas por enzimas, específicamente por la lipasa de *Candida antarctica*, se ha utilizado con éxito en diferentes disolventes, a partir de ácidos grasos (p. ej. ácido palmítico, ácido oléico, etc.) y ésteres vinílicos (p. ej. palmitato / oleato de vinilo) como dadores de acilo (Reyes-Duarte *et al.*, 2010). Un ejemplo relevante es la síntesis de palmitato de ascorbilo mediante transesterificación de vinil palmitato usando CALB, que proporcionó aproximadamente un 90 % de conversión (Reyes-Duarte *et al.*, 2008).

La **vitamina E** también pertenece a uno de los compuestos liposolubles con propiedades antioxidantes (**Figura 5.1**) más importantes, siendo el tocoferol el más activo en el tejido humano y animal. Esta vitamina presenta buenas propiedades rejuvenecedoras, antitumorales y antiinflamatorias, y es capaz de prevenir la oxidación al reaccionar con los radicales obtenidos en la reacción en cadena de peroxidación lipídica (Antonopoulou *et al.*, 2016). De los cuatro isómeros del tocoferol, se ha demostrado que el α -tocoferol es el antioxidante más eficaz (Traber, 2006). Así, Duarte *et al.* estudiaron la síntesis de acetato de vitamina E catalizada por lipasa B de *Candida antarctica* (Reyes-Duarte *et al.*, 2008), y se demostró que su actividad mejoraba en presencia de luz y oxígeno, siendo la formación del éster más rápida con δ -tocoferol que con α -tocoferol. Además, el succinato de vitamina E ha sido sintetizado con éxito por una lipasa B de *Candida antártica* modificada, con un rendimiento del 94% (Yin *et al.*, 2011), mientras que el ferulado de vitamina E se sintetizó utilizando el mismo biocatalizador con un rendimiento del 25,5% (Xin *et al.*, 2011). Asimismo, otro compuesto con propiedades interesantes es la **vitamina A**, que pertenece a un grupo de compuestos insaturados que

incluyen el ácido retinoico y retinol, siendo este último la forma más activa. Como consecuencia de su baja estabilidad en grasas, el retinol se encuentra en los tejidos como un éster (p. ej. acetato / palmitato de retinol) que es fácilmente hidrolizado en el intestino. Esta vitamina también se usa ampliamente en formulaciones cosméticas (Antonopoulou *et al.*, 2016). En este contexto, también cabe destacar la importancia de los compuestos (poli)fenólicos y sus derivados, especialmente ésteres de ácidos grasos (p. ej. derivados de resveratrol, ésteres de tirosilo, flavonoides, etc.), que van a dar lugar a la mejora tanto de sus propiedades físico-químicas como biológicas.

El **pantenol** (2,4-dihidroxi-N- (3-hidroxipropil) -3,3-dimetilbutanamida), también llamado provitamina B₅, es una molécula bioactiva de gran interés en la industria farmacéutica y cosmética. Es un componente muy común en cremas, champús, acondicionadores para el cabello y formulaciones para el tratamiento de la piel, y se considera un producto cosmeceútico (Bisset, 2009; Pavlackova *et al.*, 2019). Sin embargo, como consecuencia de su alta solubilidad en agua, tiene un tiempo de interacción relativamente pequeño cuando se usa directamente en algunos productos cosméticos. No obstante, la obtención de ésteres de pantenol ha despertado especial interés en la industria cosmética ya que, las propiedades físico-químicas quedan modificadas (p. ej. hidrofobicidad, anfifilicidad, etc.), mejorando las interacciones con la piel o el cabello. Entre estos ésteres cabe destacar los ésteres de triacetato de pantenilo (Smit *et al.*, 2006) o docosohexaenoato de pantenilo (Dupont-Passelaigue *et al.*, 2012).

Por otro lado, los **ésteres de azúcares (p. ej. xilitol)** son ampliamente utilizados como tensioactivos no tóxicos con propiedades beneficiosas y un alto potencial de actividad microbiana, convirtiéndolos en productos muy atractivos en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Chang y Shaw, 2009; Coulon y Ghoul, 1998; Ferrer *et al.*, 2005). Dichos compuestos son moléculas anfifílicas no iónicas que se obtienen a partir de fuentes renovables y presentan gran capacidad emulsionante, estabilizante y poder detergente (Gruninger *et al.*, 2019; Banat *et al.*, 2021). Otras propiedades de estos compuestos, incluidas su naturaleza insípida, inodora y no tóxica, y el hecho de que son biodegradables, son muy apreciadas para aplicaciones industriales en el sector cosmético, farmacológico y alimentario (Khan y Rathod, 2015). Entre los biotensioactivos, los ésteres de ácidos grasos de xilitol han atraído el interés industrial y médico por sus propiedades conservantes y efectividad antimicrobiana en productos cosméticos (Amaral *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2016), además de ser fármacos útiles para el tratamiento de

enfermedades y tumores relacionados con la hemoglobina (Pouillart *et al.*, 1999). Estos compuestos son obtenidos mediante enzimas u otros catalizadores, siendo las primeras reacciones catalizadas fundamentalmente por lipasa B de *Candida antarctica*, ya que aportan una mayor selectividad y enantioselectividad y minimizan la generación de subproductos (Cauglia y Canepa, 2008; Sharma y Chattopadhyay, 1993).

5.3. Síntesis biocatalítica de monoésteres de pantenol en LIs y DES

En este trabajo se planteó el desarrollo de un proceso biocatalítico para la obtención de monoésteres de pantenol mediante esterificación directa entre un ácido carboxílico y el pantenol, en medios de reacción basados bien en líquidos iónicos tipo esponja, o bien medios de reacción libres de todo disolvente, con el fin de obtener de un modo sencillo y directo nuevos derivados anfipáticos de pantenol con aplicación directa en las formulaciones cosméticas. En algunas investigaciones, la síntesis biocatalítica de los monoésteres de pantenilo y de diésteres de pantenilo se ha llevado a cabo mediante reacciones de transesterificación de ésteres alifáticos (p. ej. acetato de isopropilo (de Diego *et al.*, 2013), acrilato de etilo (Haring *et al.*, 2008) etc.), como dadores de acilo en disolventes orgánicos volátiles como medios de reacción, quedando este enfoque fuera de los Principios de la Química Verde.

Otros disolventes neotéricos ya mencionados en el Capítulo I, y que son considerados como una excelente alternativa a los disolventes orgánicos tradicionales son los disolventes eutécticos profundos (DES), los cuales han atraído interés como nuevos medios de reacción con propiedades similares a las de los líquidos iónicos (Abbott *et al.*, 2003). La formación de un DES se genera mediante la mezcla adecuada de enlaces aceptores de hidrógeno (HBA) y dadores de hidrógeno (HBD), capaces de interaccionar a través de enlaces por puentes de hidrógeno, dando como resultado una mezcla líquida a partir de compuestos sólidos a temperatura ambiente (Ma *et al.*, 2018). Recientemente, los DES constituidos por sales orgánicas de HBD han recibido especial atención para las transformaciones biocatalíticas, debido al uso de recursos renovables (p. ej. ácidos carboxílicos, aminas, polioles, etc.), que proporcionan el microambiente adecuado para las enzimas (Guajardo *et al.*, 2016), y que aportan innumerables ventajas que incluyen la baja toxicidad, bajo costo de precursores, síntesis eficiente, muy baja volatilidad y alta biodegradabilidad (Zainal-Abidin *et al.*, 2017).

En este sentido, el objetivo principal de este trabajo fue demostrar por primera vez la síntesis enzimática de seis monoésteres de pantenilo a partir de diferentes ácidos grasos, tanto en medios de reacción sostenibles (LIs), como en sistemas totalmente libre de disolventes, ya que fueron capaces de conformar mezclas eutécticas profundas (DES) (Lozano *et al.*, 2019). Para ello, los productos fueron obtenidos gracias a la catálisis enzimática, tanto mediante la esterificación directa de ácidos grasos libres (p. ej. ácido cáprico, láurico, mirístico, palmítico, oléico y linoléicos respectivamente) con pantenol, así como por transesterificación de diferentes ésteres como dadores de acilo (p. ej. laurato de vinilo, laurato de metilo, etc.) en diferentes SLILs como medios de reacción ($[C_{12}mim][BF_4]$, $[C_{12}mim][NTf_2]$, $[C_{10}mim][NTf_2]$, $[C_{14}mim][NTf_2]$, $[C_{16}mim][NTf_2]$, $[C_{18}mim][NTf_2]$). Además, con el objetivo principal de este trabajo de diseñar nuevos medios de reacción innovadores y alternativos a los LIs, también se demostró la capacidad del pantenol y los ácidos grasos libres para formar mezclas eutécticas profundas, proporcionando un protocolo sencillo y sostenible para la producción a gran escala de monoésteres de pantenilo en sistemas totalmente libres de disolventes (ver **Figura 5.2**).

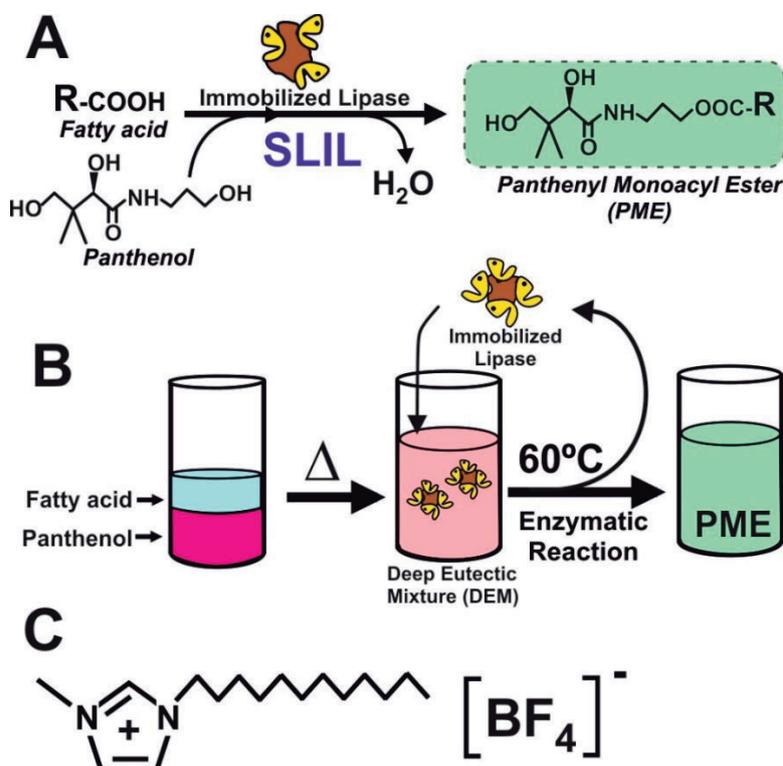


Figura 5.2. (A) Reacción de síntesis enzimática de monoésteres de pantenol mediante esterificación del pantenol con ácidos grasos. (B). Esquema del protocolo de obtención de monoésteres de pantenol mediante biocatálisis en sistemas libres de disolventes y con formación de mezclas eutécticas profundas (DESs). (C). Estructura del líquido iónico $[C_{12}mim][BF_4]$, como ejemplo de SLIL utilizado como medio de reacción en la síntesis biocatalítica de monoésteres de pantenol mediante esterificación directa (Lozano *et al.*, 2019).

Para el caso de los medios de reacción basados en líquidos iónicos tipo esponja, a modo de ejemplo, la **Figura 5.3** muestra el perfil de actividad para la síntesis enzimática de monolaurato de pantenilo en $[C_{12}mim][BF_4]$ como medio de reacción, y utilizando diferentes dadores de acilo, a saber, laurato de vinilo (**Figura 5.3A**), laurato de metilo (**Figura 5.3B**) y ácido láurico (**Figura 5.3C**) y pantenol, en una relación molar dador de acilo:pantenol (1:2). Es necesario indicar que, cuando se utilizan ésteres vinílicos como dadores de acilo, el alcohol vinílico liberado en la etapa de acilación de la enzima se tautomeriza a acetaldehído, que no puede actuar como sustrato para la enzima. Esta vía sintética puede considerarse como un proceso cinéticamente controlado, donde la rápida acumulación del intermedio acil-enzima, la ausencia de agua y la alta concentración de alcohol son esenciales (Lozano *et al.*, 2007). Sin embargo, al utilizar ácidos carboxílicos libres como sustrato, la reacción de acilación de la enzima se encuentra en equilibrio (control termodinámico), siendo necesaria la eliminación de las moléculas de agua que se liberan como subproducto en la etapa de acilación de la enzima (Lozano *et al.*, 2017).

Tal y como se puede observar en la **Figura 5.3 A**, el empleo del éster de laurato de vinilo como sustrato dio lugar a la mayor velocidad de reacción de monoéster de pantenol (PME) en la primera hora de reacción ($18,4 \mu\text{mol min}^{-1}$), obteniendo un nivel de conversión máximo (70%) a las 4 horas. Sin embargo, cuando se usó laurato de metilo, la velocidad de reacción fue menor ($6,7 \mu\text{mol min}^{-1}$), con un rendimiento de producto del 45,5% a las 6 horas, sin la generación de diéster de pantenilo (PDE). En este mismo sentido, la esterificación directa de ácido láurico con pantenol dio como resultado la reacción más lenta ($3,7 \mu\text{mol min}^{-1}$), con un rendimiento del producto monoéster del 45,5% a las 6 horas, mientras que el contenido de PDE se incrementó hasta un 3,1%. Asimismo, los resultados obtenidos para la síntesis de monocaprato de pantenilo fueron muy similares en las mismas condiciones de reacción. Es importante mencionar que un aumento de la longitud de cadena alquílica del dador de acilo (p. ej. ácidos mirístico y palmítico), tanto la conversión como el contenido de PME mejoran ligeramente con respecto al rendimiento obtenido a partir de ácido láurico y cáprico. Estos resultados están relacionados con fenómenos de transferencia de masa por difusión al centro activo de la enzima, así como con la velocidad de reacción mostrada por la misma. En este sentido, el contenido de PDE obtenido (**Figura 5.3A**) también podría estar relacionado con la rápida velocidad de reacción que suele ser ocasionada por el uso de ésteres vinílicos como dadores de acilo. El carácter hidrofóbico del LI basado en cadena de alquilo C12 podría

también estar implicado en una posible baja tasa de transferencia de masa del pantenol, que conlleva a la enzima a una segunda reacción de acilación de la molécula del producto PME (Lozano *et al.*, 2017).

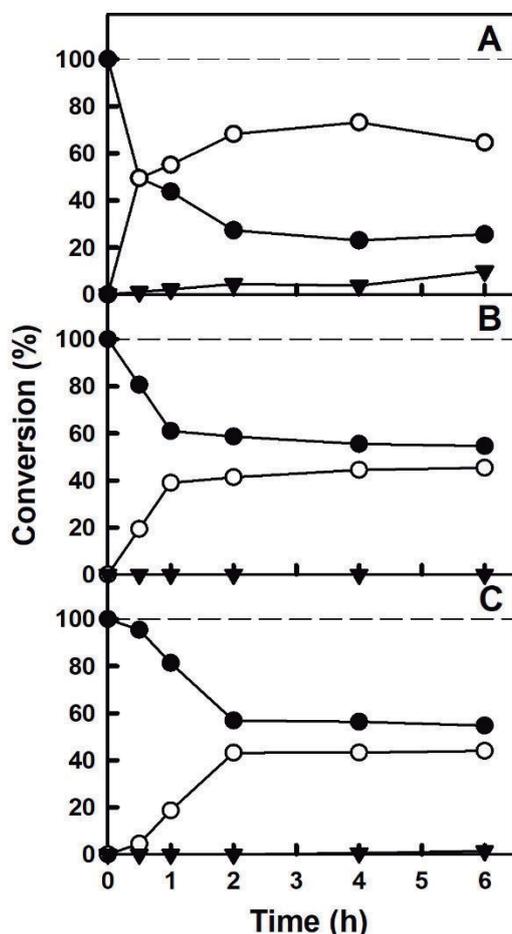


Figura 5.3. Perfiles cinéticos para la síntesis catalizada por Novozym 435 de monolaurato de pantenilo (PME, ○), y de dilaurato de pantenilo (PDE, ▼) utilizando laurato de vinilo (A), laurato de metilo (B) o ácido láurico (C) (●), respectivamente, como acilo donante para la esterificación de pantenol en $[C_{12}mim][BF_4]$ a $60\text{ }^\circ\text{C}$. Relación molar de dador de acilo: pantenol, 1: 2 (mol / mol).

Por otro lado, los resultados también mostraron que cuando se utilizaba LI con anión $[NTf_2]$, el aumento de la concentración del dador de acilo con respecto al pantenol producía un incremento del rendimiento del producto PME en todos los casos, obteniendo un 92,9% para el caso de $[C_{12}mim][NTf_2]$ con respecto al obtenido con el LI con anión $[BF_4]$. No obstante, tanto la velocidad de reacción enzimática como la hidrofobicidad del líquido iónico son parámetros fundamentales para controlar la selectividad de la síntesis enzimática de PME. Además de la eficiencia y selectividad de cualquier transformación química, es necesario demostrar que todos los elementos involucrados en el proceso se

pueden recuperar para su reutilización. Asimismo, la excelente adecuación de los LIs con una cadena de alquilo larga en el catión y basadas en aniones $[\text{NTf}_2]$ o $[\text{BF}_4]$ para el proceso realizado se vio ensalzada por la excelente estabilidad operacional del biocatalizador.

El desarrollo de enfoques experimentales limpios para la separación directa de productos, incluida la recuperación del LI para su reutilización, es un eje fundamental para la implementación de este proceso. Es por ello que se estudió la separación del monolaurato de pantenilo del medio de reacción $[\text{C}_{12}\text{mim}][\text{BF}_4]$ mediante un protocolo común de enfriamiento / centrifugación basado en las características de los SLIL (Lozano *et al.*, 2015; Lozano *et al.*, 2015). Debido al carácter anfipático de los productos, para conseguir una adecuada separación se desarrolló un nuevo protocolo de fraccionamiento, En primer lugar, fue necesario agregar una mezcla de dodecano y agua en el medio de reacción a 60°C , seguido de enfriamiento a 0°C y centrifugación (15 000 rpm durante 15 min a 0°C). Tras este protocolo, tal como se observa en la **Figura 5.4**, se consiguió la precipitación de una fase sólida, que contenía principalmente LI, una fase acuosa intermedia, que contiene el pantenol que no ha reaccionado (como compuesto hidrófilo insoluble en disolventes no polares), y una fase superior de dodecano que contenía el producto PME. No obstante, además del empleo de un disolvente orgánico para este proceso, también se detectó un contenido residual de IL residual del 3,5% (p/p) en la fase de producto, tal como se determinó mediante ^{19}F -RMN, factores ambos que empañan la sostenibilidad del protocolo presentado.

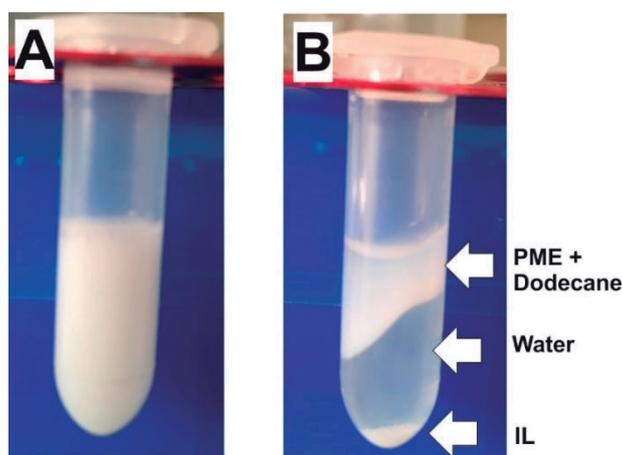


Figura 5.4. Comportamiento de fase de la mezcla de reacción de monolaurato de pantenilo / $[\text{C}_{12}\text{mim}][\text{BF}_4]$ después de la adición de 0,5 ml de agua y 0,5 ml de dodecano (A), y luego centrifugación (15 000 rpm, 15 min) a 15°C (B).

Alternativamente, se pudo comprobar que la mezcla de los dos sustratos puros, a saber, pantenol y ácido graso (p.ej. ácido cáprico, láurico, mirístico, palmítico, oléico y linoléico), conformaba mezclas semisólidas e incluso DES cuando se sometían a un proceso de calentamiento. Tal como se observa en la **Figura 5.5** para el caso de las mezclas de pantenol / ácido láurico y de pantenol / ácido palmítico, se prepararon diferentes DES constituidos mediante combinación de los sustratos en la proporción 1:2 (mol/mol), y calentando a 80 °C, lo que generó un sistema líquido bifásico que, posteriormente se convierte en un sistema monofásico tras agitar durante 1 hora a la misma temperatura. Estas mezclas permanecieron en estado líquido después de enfriar a temperatura ambiente (Lozano *et al.*, 2019).

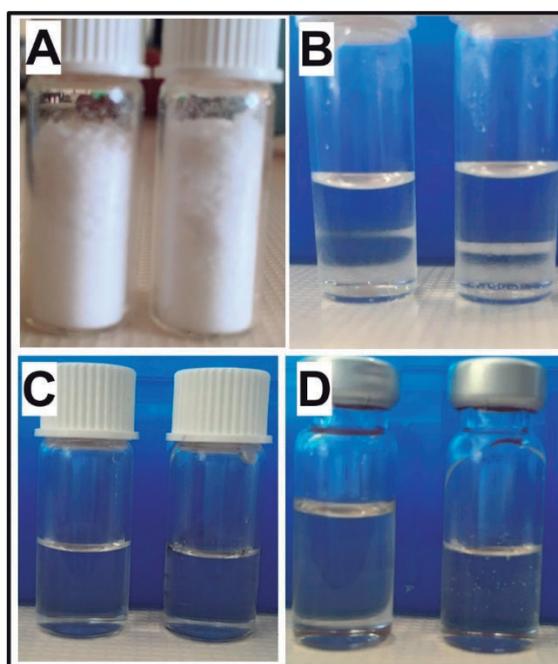


Figure 5.5. Comportamiento de fases de mezclas 1:2 (mol/mol) de pantenol : ácido láurico (vial izquierdo) y pantenol : ácido palmítico (vial derecho) a temperatura ambiente (A), tras calentar a 80 °C (B), tras agitar durante 1 h a 80 °C (C), y tras la reacción enzimática a 60°C (D).

Posteriormente, se procedió al estudio de la idoneidad de estos DES basados en pantenol y ácido graso como medio de reacción para la síntesis de PME catalizada por Novozym 435. Como ejemplo representativo, la **Figura 5.6.** muestra el perfil de reacción para la síntesis enzimática de monolaurato de pantenilo en un medio DES basado en pantenol y ácido láurico (2: 1 mol / mol) a 60 ° C. Dicho sistema proporcionó una velocidad de reacción de 18,4 $\mu\text{mol min}^{-1}$ durante la primera hora, que alcanzó un nivel de conversión máximo del 83%. a las 6 horas, antes de disminuir ligeramente con el

aumento concomitante de la producción de pantenil dilaurato (hasta un 3,9%) a las 8 horas de reacción.

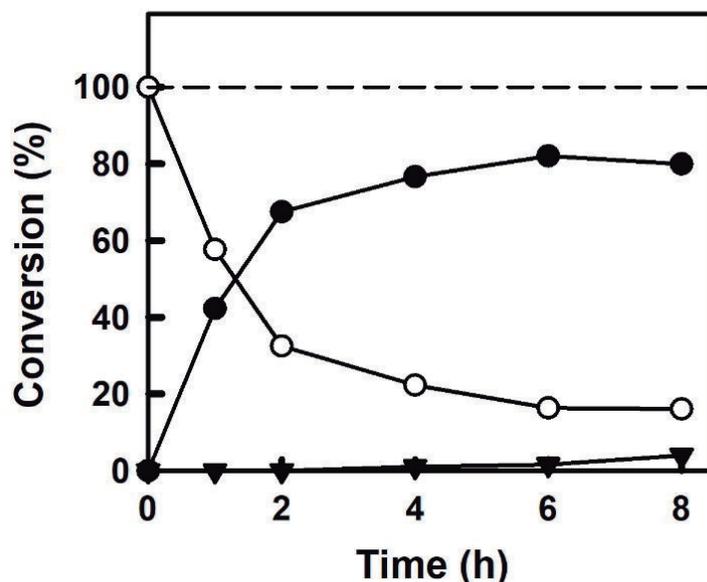


Fig. 5.6. Perfiles de concentración de monolaurato de pantenilo (●), dilaurato de pantenilo (▼), como resultado de la reacción de esterificación directa del ácido láurico (○) con pantenol, catalizada por Novozym 435 en un sistema libre de disolvente con formación de DES a 60 °C. Relación ácido láurico: pantenol, 1:2 (mol/mol).

En resumen, en esta investigación se demuestra por primera vez la excelente idoneidad de estos DES a base de pantenol con ácidos grasos como medio de reacción para la síntesis enzimática de monoésteres de pantenilo, obteniendo eficacia en la estabilidad operativa del biocatalizador Novozym 435 en DES a base de pantenol con ácido láurico con un rendimiento y una selectividad sin cambios durante 7 ciclos operacionales consecutivos en la síntesis enzimática de monolaurato de pantenilo. Ya se ha informado que los polioles (p. ej. Xilitol, sorbitol, etc.) (Lozano *et al.*, 1994) y DES (p. ej. Mezcla de urea: cloruro de colina) (Monhemi *et al.*, 2014) son excelentes medios para proteger los biocatalizadores contra la desactivación como resultado de la red de enlaces por puentes de hidrógeno formada alrededor de las enzimas, la cual mantiene la conformación activa de la misma. En este sentido, la excelente estabilidad operativa mostrada por la enzima a 60 °C en este DES a base de pantenol podría atribuirse a los mismos fenómenos.

5.4 Síntesis biocatalítica de ésteres de xilitol en sistemas libres de disolventes asistida por ultrasonidos

Las lipasas se han utilizado como catalizadores para la síntesis de ésteres de azúcares mediante reacciones de esterificación o transesterificación, aunque el proceso sea limitado debido a la baja solubilización de los sustratos. No obstante, se han estudiado reacciones de síntesis de ésteres de glucosa a partir de ésteres vinílicos catalizadas por lipasas en acetonitrilo como medio de reacción, obteniendo un 100% de producto después de 3 días a 45 °C. Asimismo, al emplear un ácido graso como sustrato de partida en lugar de un derivado de vinilo, los rendimientos disminuyeron considerablemente (Arcens *et al.*, 2020). Alternativamente, también se ha descrito la idoneidad de la lipasa de *P. aeruginosa* inmovilizada para la acilación regio-selectiva 1-5 de xilitol mediante el uso de ácidos anhídridos alifáticos (p. ej. anhídrido caproico) como dadores de acilo en un medio de reacción orgánicos (p. ej., acetonitrilo, tetrahidrofurano, etc.), con un rendimiento de producto que varía de 32 a 80% después de 12 horas de reacción (Misra *et al.*, 2012). Otros disolventes orgánicos, como mezclas de 2-metil-2-pentanol / hexano han sido utilizadas como medios de reacción para la síntesis de ésteres de xilitol catalizada por lipasas mediante esterificación directa de ácidos grasos libres proporcionando rendimientos de producto en torno al 90 % a las 18 horas de reacción (Castillo *et al.*, 2003). Cabe destacar que el empleo de t-butanol junto con el uso de microondas o ultrasonidos para la obtención de oleato de xilitol catalizada por una lipasa mejoró la velocidad de reacción y proporcionó un rendimiento del 63 % a las 6 horas de reacción (Rufino *et al.*, 2010). Sin embargo, tanto el uso de sustrato no naturales (p. ej. ácido acético anhidro, ésteres de vinilo, etc.), los dadores de acilo, como los disolventes orgánicos volátiles como medios de reacción, deben considerarse como un punto de ruptura en el intento de desarrollo de procesos biocatalíticos sostenibles (Lozano *et al.*, 2012).

No obstante, la esterificación directa de ácidos grasos con xilitol catalizada por lipasas en sistemas libres de disolventes debe considerarse como un enfoque más sostenible, aunque el carácter sólido o semisólido de los sustratos, junto con la inmiscibilidad entre los sustratos genere desventajas y dificultades a la hora de conseguir un medio adecuado para la biocatálisis. En este sentido, se ha demostrado la obtención de dicaprato de xilitol mediante esterificación directa por vía enzimática, obteniendo un rendimiento del 24 % después de 24 horas a 50 °C (Zhang *et al.*, 2013). Un aumento de temperatura hasta 60

°C, aumentó el rendimiento de caprato de xilitol (mezcla de ésteres mono-, di-, y tricaprato) hasta un 74% después de 29 horas (Adnani *et al.*, 2011).

Los ultrasonidos son ondas acústicas con una frecuencia ≥ 20 kHz, las cuales necesitan un medio determinado para su propagación, siendo la frecuencia, potencia y energía suministradas parámetros fundamentales para optimizar la velocidad de las reacciones químicas (Pokhrel *et al.*, 2016). Recientemente, la irradiación de ultrasonidos ha surgido como una excelente herramienta sostenible para activar las enzimas, ya que aumenta el rendimiento del producto y mejora de la velocidad de reacción en condiciones suaves (Bansode *et al.*, 2017) y, además, se considera una técnica “verde” debido al ahorro energético y a la capacidad de proporcionar productos limpios en muy cortos periodos operativos (Cintas *et al.*, 2016).

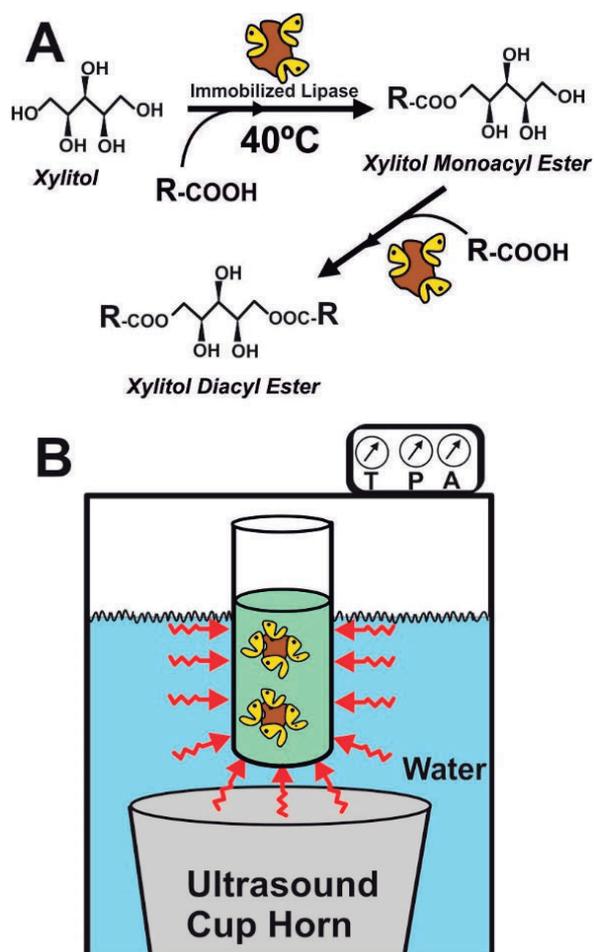


Figura 5.7. A. Esquema de la síntesis de mono- y diésteres de xilitol catalizada por lipasa inmovilizada de mediante esterificación directa de ácidos grasos con xilitol en sistemas sin disolventes. B. Esquema del reactor de ultrasonidos de cuerno de copa utilizado para la síntesis enzimática de ésteres de xilitol en sistemas libres de disolventes. Dispositivos de control: T, temperatura; P, potencia; A: amplitud.

En este sentido, se llevó a cabo por primera vez la síntesis enzimática de cuatro ésteres de xilitol a partir de ácidos grasos, como el ácido caprílico, cáprico, láurico y mirisítico, mediante esterificación directa con xilitol en ausencia de disolventes, y utilizando la radiación ultrasónica a temperaturas moderadas (40-50 °C, **Figura 5.7**). Además, la asistencia por ultrasonidos fue estudiada en función de diversos parámetros como la amplitud y la potencia, en un sistema copa-bocina (“cup-horn”). Tras la reacción enzimática, los productos pudieron separarse fácilmente mediante un simple calentamiento de la mezcla de reacción y posterior centrifugación, demostrando la adecuación de esta estrategia de reacción basada exclusivamente en la combinación de los sustratos que intervienen en la reacción, sin el empleo de disolventes adicionales.

5.4.1. Síntesis biocatalítica de laurato de xilitol

La síntesis de laurato de xilitol catalizada por una lipasa inmovilizada se realizó mediante esterificación directa de ácido láurico (punto de fusión, 43,8 °C) con xilitol (punto de fusión, 94,5 °C), y en un sistema sin disolventes. Habida cuenta del carácter sólido de los sustratos, cuando dicha reacción se ensayó mediante agitación magnética, o mecánica, no dio lugar a la formación del producto, incluso aumentando la temperatura a 60 °C, probablemente como consecuencia de su inmiscibilidad mutua. Por ello, se empleó la agitación ultrasónica con el fin de promover la reacción enzimática en estas condiciones. La **Figura 5.8** muestra los perfiles de evolución de los sustratos y productos en función del tiempo de reacción en la síntesis enzimática, tanto de monolaurato de xilitol, como dilaurato de xilitol, obtenido por esterificación directa del ácido láurico con el xilitol (relación molar 1:1) en función de la potencia suministrada a 20 kHz y 40 °C. Tal y como se puede apreciar en dicha Figura, la enzima inmovilizada catalizó la síntesis de los productos de forma eficaz y, aunque la temperatura seleccionada era menor que los puntos de fusión de ambos sustratos, la asistencia por ultrasonidos fue una herramienta eficiente para favorecer los fenómenos de transferencia de masa de los sustratos al centro activo de la enzima inmovilizada. Diversas investigaciones ponen de manifiesto la existencia de diversos efectos mecánicos asociados a la propagación de la onda ultrasónica, los cuales aceleran la mezcla de cualquier reactivo y mejoran la transferencia de calor y masa durante el proceso química en cuestión (Bansode *et al.*, 2017). Además, dado que el mecanismo de reacción de las lipasas implica la formación de un intermedio

covalente acil-enzima, que se somete a un ataque nucleofílico por parte del xilitol para verificar la síntesis del éster. En este sistema de reacción semisólido, los ultrasonidos también podrían ayudar a fundir el ácido láurico y favorecer así su transferencia al centro activo de la lipasa para formar dicho intermedio acil-enzima. Por otro lado, el agua generada como subproducto de la esterificación es retenida por el xilitol debido a su carácter higroscópico. Ambos fenómenos promovidos por la radiación ultrasónica intervienen en la velocidad de la reacción ya que el ácido láurico se consume por completo después de 90 minutos.

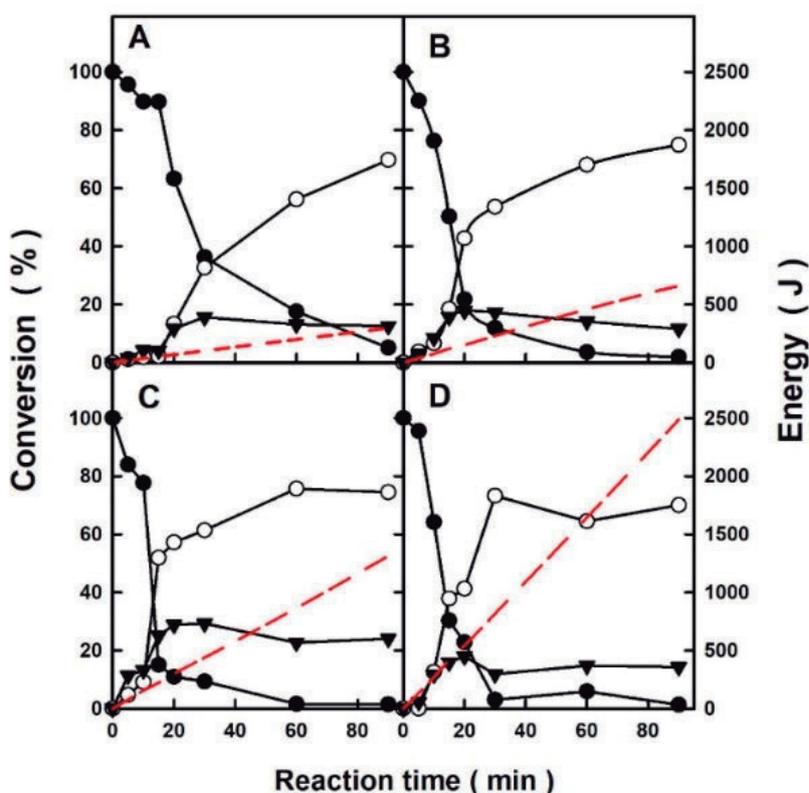


Figura 5.8. Perfiles de concentración con el tiempo de reacción para la síntesis de monolaurato de xilitilo (○) y dilaurato de xilitilo (▼) catalizada por Novozym 435, utilizando xilitol y ácido láurico (○) como sustratos en una relación 1: 1 (mol / mol), así como de la energía de ultrasonidos suministrada (línea discontinua roja) para las diferentes condiciones de potencia de ultrasonido (A, 60 vatios, 10% de amplitud; B, 135 vatios, 40% de amplitud; C, 260 vatios, 70% de amplitud; y D, 470 vatios, 100% de amplitud) a 40 °C.

Por otro lado, es importante tener en cuenta que todos los perfiles mostraron una velocidad inicial lenta, que luego fue incrementando de forma exponencial. Al comienzo de la reacción, la síntesis de dilaurato de xilitol se ve favorecida frente a la obtención del producto monoéster, probablemente porque la transferencia de masa de xilitol sólido fue

menor que la del ácido láurico, pudiendo ser solubilizado en tiempos más largos de reacción por el producto monoéster sintetizado. En este sentido, algunos estudios han confirmado cómo la asistencia de ultrasonidos incrementaba la velocidad de la reacción para la síntesis enzimática de propionato de isobutilo en ausencia de disolvente, proporcionando rendimientos del 100% (Jaiswal y Tadhod, 2018). Como se menciona anteriormente, la influencia de la potencia y la frecuencia son parámetros clave a tener en cuenta antes de comenzar la reacción, ya que un aumento drástico de ambos podría alterar el proceso biocatalítico como consecuencia de la desactivación de la enzima (Bansode *et al.*, 2017).

Asimismo, se estudió la influencia de la relación molar evaluando diferentes mezclas de reacción basadas en 4:1, 2:1, 1:1, 1:2 y 1:4, relación molar xilitol:ácido láurico, respectivamente, como medios de reacción en ausencia de disolvente para la esterificación directa con Novozym 435 a 40 °C y 270 vatios de potencia. En este estudio no se observó mejoras con el aumento de la concentración de xilitol, lo que podría estar relacionado con el carácter sólido de este poliol en las condiciones de reacción, junto con la inmiscibilidad mutua entre los sustratos. Sin embargo, los medios de reacción que contenían una mayor concentración de ácido láurico mostraron ser adecuados para llevar a cabo la reacción enzimática. Los mejores resultados se mostraron con una relación xilitol:ácido láurico 1:1 o 1:2, que proporcionaron el 70 % de monolaurato de xilitol y 30 % de dilaurato de xilitol, respectivamente. Por otro lado, se estudió la influencia de la longitud de cadena alquílica del ácido graso (p.ej. cáprico, caprílico, láurico o mirístico), con mejores resultados a mayor longitud de cadena alquílica. Sin embargo, este efecto no pudo observarse claramente para el caso del ácido mirístico, probablemente por su elevado punto de fusión que genera un sistema casi sólido.

A medida que la viscosidad del medio aumenta con el aumento de la longitud de la cadena del ácido graso, la capacidad del producto monoéster para salir del microambiente enzimático parece disminuir, lo que favorece a la enzima a catalizar una segunda esterificación en la misma molécula de xilitol. Asimismo, los resultados obtenidos para las relaciones molares xilitol / ácido graso 1: 1 y 1: 2 (mol / mol) fueron muy similares. Cabe destacar que anteriormente, otros investigadores describieron cómo el dador de acilo con la longitud de cadena más larga proporcionaba un valor de conversión más alto en la síntesis enzimática de ésteres de glucosa (Arcens *et al.*, 2020).

En un intento por determinar la idoneidad del enfoque biocatalítico propuesto para la síntesis de ésteres de xilitol asistida por ultrasonidos, se estudió la reutilización de la enzima, donde la actividad de Novozym 435 se mantuvo prácticamente invariable durante varios ciclos operacionales, demostrando la excelente idoneidad del uso de esta herramienta ultrasónica para llevar a cabo la síntesis de ésteres de xilitol en ausencia de disolventes. Además, ya se demostró con anterioridad como Novozym 435 era reutilizada en más de 6-9 ciclos en reacciones de esterificación, transesterificación o hidrólisis asistidas por ultrasonidos (p. ej producción de biodiesel) (Bansode *et al.*, 2017).

Adicionalmente, se evaluó la idoneidad del proceso biocatalítico para la obtención de laurato de xilitol aumentando la reacción en un factor de 100 y 200 veces bajo dos amplitudes de ultrasonidos diferentes. Tal y como se puede observar en la **Figura 5.9 A**, el perfil de actividad de la reacción biocatalítica para una escala de 100 veces bajo un 70 % de amplitud de ultrasonidos, conduce a un perfil de reacción ligeramente más rápido que el obtenido a menor escala. Así, el rendimiento de monolaurato de xilitol fue del 67 % después de 30 minutos de reacción que, posteriormente, aumentó hasta el 89 % a los 90 minutos. Alternativamente, al disminuir la amplitud de la radiación ultrasónica a un 40 % para el mismo sistema de reacción (**Figura 5.9 B**), la reacción transcurre más lentamente, lo que conlleva a un rendimiento de monolaurato de xilitol del 22 % en 30 minutos. Finalmente, el rendimiento al cabo de 90 minutos de reacción fue muy similar al experimento anterior. Sin embargo, cuando el medio de reacción se amplió hasta 200 veces y se sometió a la misma radiación ultrasónica (40 % de amplitud, ver **Figura 5.9 C**), se observó un aumento en la velocidad de la reacción biocatalítica, alcanzando un 67 % de rendimiento de monolaurato de xilitol a tan solo 15 minutos de reacción, mientras que el rendimiento más alto resultó a los 30 minutos con un 88 %. Teniendo en cuenta que la reacción biocatalítica se llevó a cabo a 40 °C (temperatura próxima al punto de fusión del ácido láurico), el aumento de la masa total del sistema de reacción implica un aumento de la fracción de ácido láurico (fundido) en el medio en los primeros minutos de reacción, favoreciendo la el proceso de agitación ultrasónica y, por lo tanto, homogeneizando la mezcla de reacción. En este sentido, debido a la esterificación reversible del monolaurato de xilitol a dilaurato de xilito catalizada por la enzima inmovilizada, la forma de campana para el perfil de actividad enzimática de dilaurato de xilitol podría estar directamente relacionada con los fenómenos de transferencia de masa, dando como resultado un valor máximo a tiempos de reacción cortos.

Además, debido a la insolubilidad del xilitol (sin reaccionar), los productos de reacción se separaron fácilmente como una fase líquida superior tras una simple centrifugación a 50 °C, mientras que la enzima, el xilitol sin reaccionar y el tamiz molecular, quedaron en fracciones separadas (**Figura 5.9 D**). Así, el análisis de la fase líquida superior mostró que el contenido de xilitol libre en la mezcla de reacción era inferior al 2% en peso. Adicionalmente, también se determinó que la fase de xilitol sin reaccionar contenía hasta un 8 % en agua, debido a su alto carácter higroscópico.

Estos resultados muestran una excelente sinergia al combinar la lipasa inmovilizada y la agitación ultrasónica para la síntesis biocatalítica de ésteres de ácidos grasos de xilitol en medio sin solvente y en condiciones suaves. Se demuestra claramente la excelente idoneidad de la irradiación ultrasónica para acelerar la síntesis biocatalítica de monolaurato de xilitilo en condiciones libres de disolventes, lo que indica un enfoque sencillo y sostenible para la producción de este tipo de tensioactivos no iónicos a escala industrial.

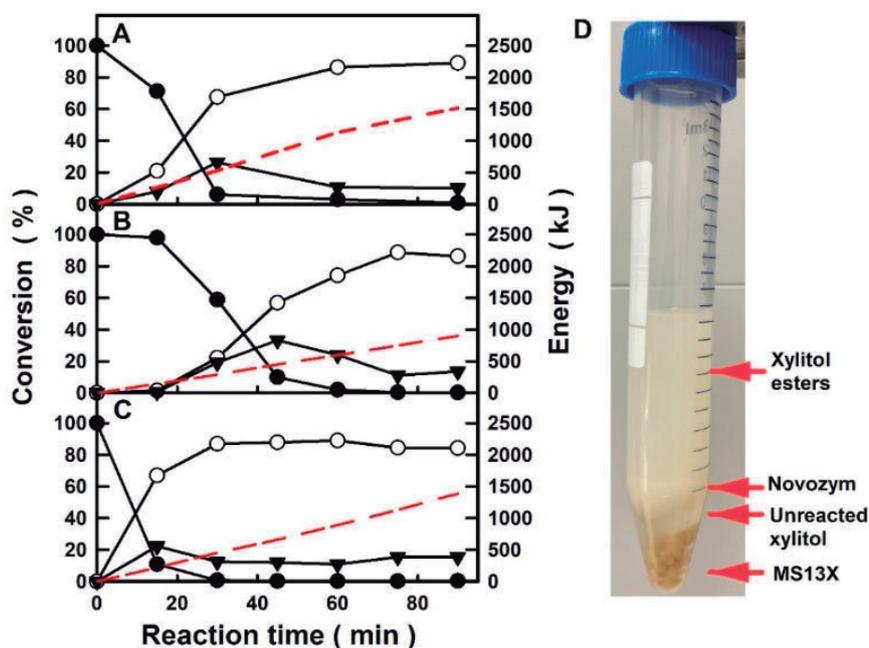


Figure 5.9. Perfiles de actividad para la síntesis de monolaurato de xilitilo catalizada por Novozym 435 (○) y dilaurato de xilitilo (▼) a partir de xilitol y ácido láurico (○) como sustratos (1: 1, relación mol / mol), y la energía suministrada (línea discontinua roja), a gran escala (**A, B**, 8.8 g; **C**, 17.6 g de sustratos de masa total) bajo diferentes condiciones de potencia de ultrasonido (**A**, 70% de amplitud; **B, C**, 40% de amplitud). **D.** Ejemplo representativo del medio de reacción tras el proceso biocatalítico asistido por ultrasonidos, seguido de centrifugación a 50 °C.

5.5. Conclusiones

La industria cosmética crece y cambia continuamente como consecuencia de la alta demanda de los consumidores. En general, la preferencia por productos más “naturales” y “verdes” ha incentivado a la industria cosmética al desarrollo de procesos sostenibles. En el siglo XXI, la industria cosmética está claramente impulsada a cambiar todos los protocolos clásicos para la producción de compuestos bioactivos hacia una red de procesos químicos ecológicos. Así, se han obtenido una gran cantidad de compuestos con un alto potencial en aplicaciones cosméticas, entre los que destacan los compuestos antioxidantes, antimicrobianos, fotoprotectores, productos de antienvjecimiento, etc. En este sentido, las enzimas se considera la herramienta más poderosa para llevar a cabo biotransformaciones altamente eficientes y, se ha demostrado que las lipasas son las más utilizadas para la síntesis selectiva de una gran cantidad de compuestos bioactivos con propiedades cosmocéuticas. No obstante, la correcta combinación de las lipasas con los disolventes neotéricos (p. ej. LIs, scCO₂, DES, etc.) es una forma evidente para el desarrollo de procesos integrados de biotransformaciones químicas y separación de productos de un modo sencillo y eficaz.

En este trabajo se demuestra una vez más se demuestra que, los LIs con catión de larga longitud de cadena alquílica como medios de reacción son beneficiosos para llevar a cabo reacciones enzimáticas, siendo capaces de disolver tanto los ácidos grasos como el pantenol y generar un sistema homogéneo. Además, una adecuada selección de las estructuras catiónicas y aniónicas en estos SLIL también ayuda a controlar los procesos de transferencia de masa hacia el sitio activo de la enzima, favoreciendo la consecución de procesos sintéticos selectivos para la preparación de PME (p. ej. Aprox. 100% síntesis selectiva de monolaurato de pantenilo en [C₁₂mim][BF₄].

No obstante, para el proceso de obtención de monoésteres de pantenilo y su implementación a la industria cosmética, se ha podido demostrar que la estrategia de reacción basado en DESs parece ser más sostenible y natural que el basado en SLIL, porque únicamente implica la combinación de una mezcla de sustratos puros con el biocatalizador inmovilizado, sin utilizar ningún tipo de disolvente, ni proceso de separación, lo que permitiría la utilización directa de la mezcla de reacción en la elaboración de formulaciones cosméticas. El carácter innovador tanto de los productos,

como la sostenibilidad de los protocolos de operación desarrollados abren un camino para la obtención de otros productos de interés para el sector cosmético.

En otros casos, las limitaciones impuestas por la inmiscibilidad entre los sustratos y su carácter sólido en las condiciones de reacción son las principales desventajas. Así, aunque el xilitol y los ácidos grasos son sustratos que cumplen estas dos características, se demostró como la radiación de ultrasonidos fue eficaz para la síntesis de mono- y diésteres de xilitol mediante esterificación directa catalizada por Novozym 435, con una alta estabilidad operacional. La tecnología de ultrasonidos proporciona excelentes rendimientos y alta selectividad para la transformación biocatalítica de estos compuestos en ausencia de disolvente, y acortando considerablemente los tiempos de reacción, en relación a los sistemas de reacción con agitación convencional.

Estos trabajos demuestran como la combinación de enzimas con enfoques sostenibles, basados en medios de reacción sin disolventes que contienen sustratos naturales y tecnologías habilitadoras, como los ultrasonidos o los DES, brinda oportunidades sinérgicas y abre una nueva metodología para desarrollar procesos químicos saludables.

La metodología experimental de los resultados obtenidos de este Capítulo se puede consultar en los **ANEXO VII y VIII**.

5.6. Bibliografía

Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., Tambyrajah, V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun.*, **2003**, 70–71.

Adnani, A., Basri, M., Chaibakhsh, N., Ahangar, H. A., Salleh, A. B., Rahman, R. N. Z. R. A., Abdul Rahman, M. B. Chemometric analysis of lipase-catalyzed synthesis of xylitol esters in a solvent-free system. *Carbohydr. Res.*, **2011**, 346, 472-479.

Alvarez, E., Rodriguez, J., Villa, R., Gomez, C., Nieto, S., Donaire, A., Lozano, P. Clean enzymatic production of flavor esters in Sponge like ionic liquids. *ACS Sustain. Chem. & Eng.*, **2019**, 7, 13307-13314.

Amaral, L. F. B., Camilo, N. S., Pereda, M. D. C. V., Levy, C. E., Moriel, P., Mazzola, P. G. Evaluation of antimicrobial effectiveness of C-8 xylitol monoester as an alternative preservative for cosmetic products. *Int. J. Cosmetic Sci.*, **2011**, 33, 391-397.

Ansorge-Schumacher, M. B., Thum, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42(15), 6475-6490.

Antonopoulou, I., Varriale, S., Topakas, E., Rova, U., Christakopoulos, P., Faraco, V. Enzymatic synthesis of bioactive compounds with high potential for cosmeceutical application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2016**, 100(15), 6519-6543.

Arcens, D., Grau, E., Grelier, S., Cramail, H., Peruch, F. Impact of fatty acid structure on CALB-catalyzed esterification of glucose. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2020**, 122, 1900294.

Azerad, R. Chemical Biotechnology: Better enzymes for green Chemistry. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2001**, 12, 533-534.

Banat, I. M., Carboue, Q., Saucedo-Castaneda, G., Cazares-Marinero, J. J. Biosurfactants: The green generation of speciality chemicals and potential production using solid-state fermentation (SSF) technology. *Bioresour. Technol.*, **2021**, 320, 124222.

Bansode, S. R., Rathod, V. K. An investigation of lipase catalysed sonochemical synthesis: A review. *Ultrason. Sonochem.*, **2017**, 38, 503-529.

Bissett, D. L. Common Cosmeceuticals. *Clin. Dermatol.*, **2009**, 27, 435–445.

Castillo, E., Pezzotti, F., Navarro, A., López-Munguia, A. Lipase-catalyzed synthesis of xylitol monoesters: Solvent engineering approach. *J. Biotechnol.*, **2003**, 102, 251-259.

Cauglia, F., Canepa, P. The enzymatic synthesis of glucosylmyristate as a reaction model for general considerations on ‘sugar esters’ production. *Bioresour. Technol.*, **2008**, 99(10), 4065-4072.

Chang, S. W., Shaw, J. F. Biocatalysis for the production of carbohydrate esters. *N. Biotechnol.*, **2009**, 26(3-4), 109.

Cintas, P. Ultrasound and green chemistry - Further comments. *Ultrason. Sonochem.*, **2016**, 28, 257-258.

Coulon, D., Ghoul, M. The enzymatic synthesis of non-ionic surfactants: the sugar esters. *Agro Food Ind. Hi-Tech*, **1998**, 9, 22-26.

De Diego, T., Manjon, A., Iborra, J. L. Selective synthesis of panthenyl esters by a kinetically controlled enzymatic process. *Biotechnol. Lett.*, **2013**, 31, 175–180.

Dupont-Passelaigue, E., Lantoine-Adam, F., Letienne, R. WO 20122020094 A1, **2012**.

Ferreira-Dias, S., Sandoval, G., Plou, F., Valero, F. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electron. J. Biotechnol.*, **2013**, 16, 1- 24.

Ferrer, M., Soliveri, J., Plou, F. J., López-Cortés, N., Reyes-Duarte, D., Christensen, M., Copa-Patino, J. L., Ballesteros, A. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* lipase B, and their antimicrobial properties. *Enzyme Microb. Technol.*, **2005**, 36, 391-398.

Goldstein, M. S. *Chemistry and Manufacture of Cosmetics*, 3rd ed; M. L. Schlossman, **2002**.

Gotor-Fernandez, V., Paul, C.E. Deep eutectic solvents for redox biocatalysis. *J Biotechnol.* **2019**, 239, 24-35.

Gruninger, J., Delavault, A., Ochsenreither, K. Enzymatic glycolipid surfactant synthesis from renewables. *Process Biochem.*, **2019**, 87, 45-54.

Guajardo, N., Muller, C. R., Schreiber, R., Carlesi, C., de Maria, P. D. Deep Eutectic Solvents for Organocatalysis, Biotransformations, and Multistep Organocatalyst/Enzyme Combinations. *ChemCatChem*, **2016**, 8, 1020–1027.

Gubicza, L., Bélafi-Bakó, K., E. Féher, T. Frater. Waste-free process for continuous flow enzymatic esterification using a double pervaporation system. *Green Chem.*, **2008**, 10, 1284-1287.

Haring, D., Nguyen-Kim, S., Garcia-Castro, I. WO 2008053051A2, **2008**.

Jaiswal, K. S., Rathod, V. K. Acoustic cavitation promoted lipase catalysed synthesis of isobutyl propionate in solvent free system: Optimization and kinetic studies. *Ultrason. Sonochem.*, **2018**, 40, 727-735.

Karovicová, J., Simko, P. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 882(1-2), 271-281.

Khan, N. R., Rathod, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. *Process Biochem.*, **2015**, 50, 1793-1806.

Khan, N. R., Rathod, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. *Process Biochem.*, **2015**, 50, 1793-1806.

Lonostro, P., Capuzzi, G., Pinelli, P., Mulinacci, N., Romani, A., Vincieri, F. F. Self-assembling and antioxidant activity of some vitamin C derivatives. *Colloid Surface A*, **2000**, 167, 83-93.

Lozano, P., Combes, D., Iborra, J. L. Effect of polyols on alpha-chymotrypsin thermostability: a mechanistic analysis of the enzyme stabilization. *J. Biotechnol.*, **1994**, 35, 9–18.

Lozano, P., Piamtongkam, R., Kohns, K., De Diego, T., Vaultier, M., Iborra, J. L. Ionic liquids improve citronellyl ester synthesis catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in solvent-free media. *Green Chem.*, **2007**, 9, 780–784.

Lozano, P., Alvarez, E., Nieto, S., Villa, R., Bernal, J. M., Donaire, A. Biocatalytic synthesis of panthenyl monoacyl esters in ionic liquids and deep eutectic solvents. *Green Chem.*, **2019**, 21, 3353.

Lozano, P., Bernal, J. M., Garcia-Verdugo, E., Sanchez-Gomez, G., Vaultier, M., Burguete, M. I., Luis, S. V. Sponge-like ionic liquids: a new platform for green biocatalytic chemical processes. *Green Chem.*, **2015**, 17, 3706-3717.

Lozano, P., Bernal, J. M., Nieto, S., Gomez, C., Garcia-Verdugo, E., Luis, S. V. Active biopolymers in green non-conventional media: a sustainable tool for developing clean chemical processes. *Chem. Commun.*, **2015**, 51(98), 17361-17374.

Lozano, P., Gomez, C., Nieto, S., Sanchez-Gomez, G., Garcia-Verdugo, E., Luis, S. V. Highly selective biocatalytic synthesis of monoacylglycerides in sponge-like ionic liquids. *Green Chem.*, **2017**, 19, 390–396.

Lozano, P., Alvarez, E., Nieto, S., Gomez, C., Bernal, J. M., Donaire, A. Spanish patent, P201830595, **2018**.

Ma, C., Laaksonen, A., Liu, C., Lu, X. H., Ji, X. Y. The peculiar effect of water on ionic liquids and deep eutectic solvents. *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, 47, 8685–8720.

Misra, S., Raghuwanshi, S., Gupta, P., Saxena, R. K. Efficient 1-5 regioselective acylation of primary hydroxyl groups of fermentative derived xylitol catalyzed by an immobilized *Pseudomonas aeruginosa* lipase. *Biotechnol Bioproc. Eng.*, **2012**, 17, 398-406.

Monhemi, H., Housaindokht, M. R., MoosaviMovahedi, A. A., Bozorgmehr, M. R. How a protein can remain stable in a solvent with high content of urea: insights from molecular dynamics simulation of *Candida antarctica* lipase B in urea: choline chloride deep eutectic solvent. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2014**, 16, 14882–14893.

Murad, S., Grove, D., Lindberg, K. A., Reynolds, G., Sivarajah, A., Pinnell, S. R. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, 78, 2879-2882.

Pavlackova, J., Egner, P., Sedlacek, T., Mokrejs, P., Sedlarikova, J., Polaskova, J. In vivo efficacy and properties of semisolid formulations containing pantenol. *J. Cosmet. Dermatol.*, **2019**, 18, 346–354.

Pérez-Pariente, J., Diaz, I., Mohino, F., Sastre, E. Catalysis By Mesoporous Materials. *Appl. Catal., A*, **2003**, 254, 173–188.

Pokhrel, N., Vabbina, P. K., Pala, N. Sonochemistry: Science and Engineering. *Ultrason. Sonochem.*, **2016**, 29, 104-128.

Pouillart, P., Douillet, O., Scappini, B., Gozzini, A., Santini, V., Grossi, A., Pagliai, G., Strippoli, P., Rigacci, L., Ronco, G., Villa, P. Regioselective synthesis and biological profiling of butyric and phenylalkylcarboxylic esters derivated from D-mannose and xylitol: influence of alkyl chain length on acute toxicity. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **1999**, 7, 93-106.

Reyes-Duarte, D., López-Cortés, N., Ferrer, M., Ballesteros, A., Plou, F. J. Acetylation of vitamin E by *Candida antarctica* lipase B immobilized on different carriers. *Process Biochem.*, **2008**, 43(2), 145-153.

Reyes-Duarte, D., Lopez-Cortes, N., Torres, P., Comelles, F., Parra, J. L., Peña, S., Ugidos, A. V., Ballesteros, A., Plou, F. J. Synthesis and properties of ascorbyl esters catalyzed by lipozyme TL IM using triglycerides as acyl donors. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2010**, 8, 57-64.

Rufino, A. R., Biaggio, F. C., Santos, J. C., de Castro, H. F. Screening of lipases for the synthesis of xylitol monoesters by chemoenzymatic esterification and the potential of microwave and ultrasound irradiations to enhance the reaction rate. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2010**, 47, 5-9.

Sharma, A., Chattopadhyay, S. Lypase catalysed acylation of carbohydrates. *Biotechnol. Lett.*, **1993**, 15, 1145-1193.

Silveira, J. E. P. S., Pereda, M. C. V., Nogueira, C., Dieamant, G., Cesar, C. K. M., Assanome, K. M., Silva, M. S., Torello, C. O., Queiroz, M. L. S., Eberlin, S. Preliminary safety assessment of C-8 xylitol monoester and xylitol phosphate esters. *Int. J. Cosmetic Sci.*, **2016**, 38, 41-51.

Smit, J. K., Liu, Z. Z., Vedachalam, M., Compton, D. US 6982346B2, **2006**.

Thum, O. Enzymatic production of care specialties based on fatty acid esters. *Tenside Surf. Det.*, **2004**, 41(6), 287-290.

Traber, M. G. Vitamin, E. *Modern Nutrition in Health and Disease*, 10th; Baltimore, M. D: Lippincott Williams Wilkins, **2006**, 396-411.

Villa, R., Alvarez, E., Porcar, R., Garcia-Verdugo, E., Luis, S. V., Lozano, P. Ionic liquids as an enabling tool to integrate reaction and separation processes. *Green Chem.*, **2019**, 21, 6527-6544.

Xin, J. Y., Chen, L. I., Zhang, Y. X., Wen, R. R., Zhao, D. M., Xia, C. G. Lipase catalyzed synthesis of a-tocopheryl ferulate. *Food Biotechnol.*, **2011**, 25, 43-57.

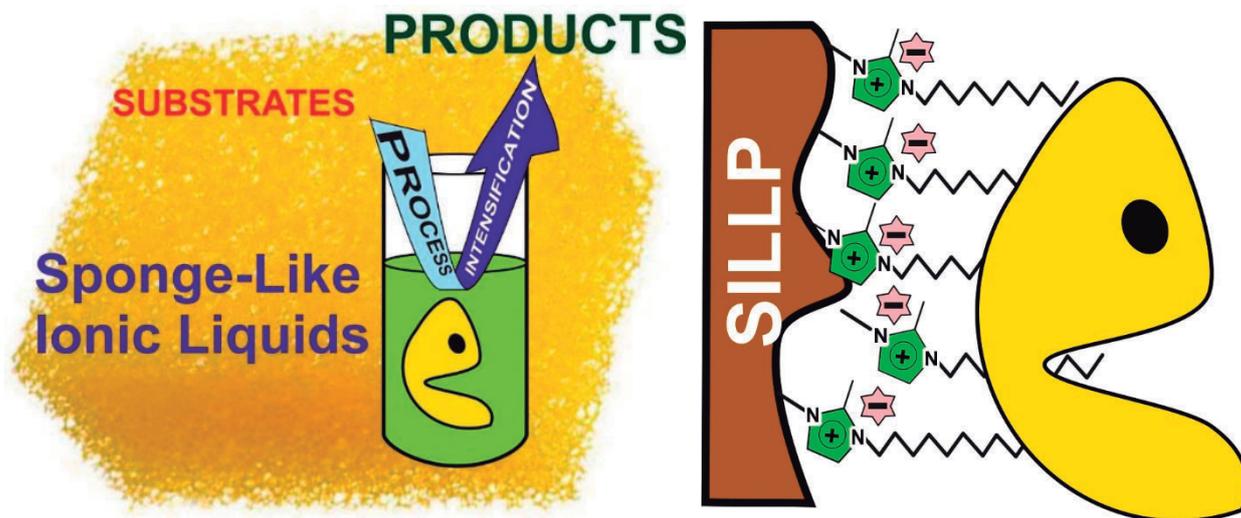
Yin, C., Zhang, C., Gao, M. Enzyme-catalyzed synthesis of vitamin E succinate using a chemically modified Novozym-435. *Chin. J. Chem. Eng.*, **2011**, 19, 135-139

Zainal-Abidin, M. H., Hayyan, M., Hayyan, A., Jayakumar, N. S. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. *Anal. Chim. Acta*, **2017**, 979, 1–23.

Zhang, X., Nie, K. L., Wang, M., Liu, L., Li, K. F., Wang, F., Tan, T. W., Deng, L. Site-specific xylitol dicaprate ester synthesized by lipase from *Candida sp* 99-125 with solvent-free system. *J. Mol. Cat. B Enzym.*, **2013**, 89, 61-66.

CAPÍTULO VI:

Conclusiones/conclusions



1. Conclusiones

Esta Tesis Doctoral se ha desarrollado en el ámbito conceptual y metodológico de la Química Sostenible, con aportaciones directas de aplicaciones de interés para diversos sectores industriales. De este modo, en esta Tesis Doctoral se presenta de modo exitoso el desarrollo y diseño de procesos químicos que integran de una forma sostenible y limpia, la síntesis y separación de productos de gran interés industrial con un alto valor añadido en los sectores farmacéutico, alimentario y cosmético, así como en la industria de polímeros. Los protocolos y aproximaciones experimentales desarrollados ofrecen las ventajas sinérgicas que aportan diferentes elementos sostenibles, como son los LIs, DES, fluidos supercríticos y las enzimas, y su adecuada combinación, para la obtención de los productos de un modo eficiente y seguro. Además, se han implementado protocolos de separación de los productos puros, con una fácil extrapolación para su posible escalamiento a nivel industrial, en diversos productos de síntesis tales como las fragancias, los monoacilglicéridos de ácidos grasos omega-3, o los carbonatos cíclicos. Adicionalmente, en esta Tesis Doctoral también se ha podido demostrar la adecuación de los sistemas de reacción libres de todo disolvente, basados incluso en mezclas de sustratos sólidos a temperatura ambiente, para la verificación de biotransformaciones mediante la formación de DESs, o la asistencia con ultrasonidos, obteniéndose productos de interés para la industria cosmética (p. ej. monoésteres de pantenol, monoésteres de xilitol).

A continuación, se detallan las principales conclusiones obtenidas en esta Tesis Doctoral:

1. Los líquidos iónicos y sus desarrollos tecnológicos (p. ej. líquidos iónicos soportados covalentemente, SILLPs) abren nuevas oportunidades en el contexto de las tecnologías sostenibles, como una excelente herramienta habilitadora para integrar los procesos de reacción y separación. En este sentido, la excepcional función de muchos biocatalizadores altamente eficientes como las enzimas, se pueden mejorar enormemente en entornos LI, $scCO_2$ y la combinación de ambos con excelentes sinergias, lo que permite el desarrollo de procesos verdes. Estos sistemas basados en LIs pueden contribuir no solo a la estabilización y fácil recuperación de los biocatalizadores, sino que además pueden implementarse en sistemas de flujo para procesos posteriores. La correcta combinación de los biocatalizadores / catalizadores químicos eficientes con materiales avanzados basados en LIs (SILLPs, SLIL, etc.)

ofrece nuevas oportunidades que apuntan directamente a la integración de varias etapas catalíticas en síntesis orgánicas, sin la necesidad de aislar intermedios.

2. El comportamiento tipo esponja mostrado por algunos LIs, ha permitido el diseño de nuevos procesos orgánicos sostenibles, proporcionando mejores rendimientos y ventajas metodológicas para la extracción de los productos puros. No obstante, la ausencia de disolventes orgánicos volátiles durante la extracción de los productos de síntesis, junto con la reutilización de todos los elementos que intervienen en la reacción (biocatalizador, SLIL, etc.), son elementos que mejoran la sostenibilidad y la competitividad económica de los procesos descritos.
3. La síntesis biocatalítica de ésteres de aromas es de gran interés en la industria química alimentaria, cosmética y farmacéutica, y ha sido posible realizarla mediante esterificación directa de ácidos carboxílicos con alcoholes catalizada por enzimas en medios de reacción basados en SLILs, obteniéndose rendimientos de productos puros muy próximos al 100%. Además, el comportamiento tipo esponja de dichos SLILs permitió implementar un desarrollo sencillo para la separación limpia de las fragancias obtenidas mediante enfriamiento / centrifugación utilizando filtros de membrana. Los resultados obtenidos apuntan claramente a una forma sostenible de producción de fragancias "naturales" a partir de sustratos sencillos obtenidos de fuentes "naturales", lo que podría estimular el desarrollo de procesos químicos verdes a nivel industrial.
4. Se ha desarrollado un enfoque quimio-enzimático para la obtención de MAGs omega-3 a partir de aceite de pescado o aceite de linaza en medios de reacción LI y LI / scCO₂. La estrategia se basó en dos etapas catalíticas consecutivas, las cuales implican la transformación biocatalítica de los triacilglicéridos (TAGs) en ésteres solketílicos de los ácidos grasos (FASEs) que los componen, y en una segunda etapa, la verificación de la hidrólisis selectiva del anillo de solketal con una zeolita ácida, para rendir los correspondientes monoglicéridos. Se ha podido demostrar que SLIL [C₁₈tma][NTf₂] es un excelente medio de reacción para la transesterificación de aceites ricos en ácidos grasos omega-3 con solketal, incluso en continuo bajo condiciones supercríticas. La estrategia experimental aquí propuesta supone un enfoque sostenible para la producción de MAGs omega-3 a partir de fuentes naturales (p. ej. aceites de pescado), promoviendo el desarrollo de nuevos procesos multicatalíticos que pueden ser implementados a nivel industrial.
5. Se ha llevado a cabo un nuevo enfoque quimio-enzimático para la síntesis de glicerol carbonato (met)acrilato, como monómeros muy útiles en la preparación de nuevos

polímeros libres de isocianatos, empleando la tecnología de los LIs, así como en medios de reacción sin disolventes. La estrategia se basó en dos etapas catalíticas consecutivas, que implicaban la transesterificación selectiva de (met)acrilato de vinilo con glicidol mediante CALB inmovilizada para producir (met)acrilato de glicidilo, seguido de la cicloadición de CO₂ sobre el epóxido resultante, catalizada por un SILLP en un medio libre de disolvente, lo que permitió alcanzar rendimientos próximos al 100 % en ambas etapas catalíticas. Con este ejemplo práctico, se demostró una vez más la adecuación de los SLILs como excelentes medio de reacción para la reacción de transesterificación catalizada por lipasa, mantenida al máximo nivel durante varios ciclos de operación. Estos resultados volvieron a mostrar claramente cómo la combinación de tecnologías de LIs y (bio)catalizadores pueden constituir un nuevo camino con el que contribuir a la reducción de la concentración de CO₂ en la atmósfera a través de su captura e incorporación en productos de valor añadido de interés para la síntesis biocatalítica

6. Se ha desarrollado un proceso de síntesis biocatalítica de monoésteres de pantenol, como moléculas diana en la industria cosmocéutica, implicando exclusivamente la combinación de los sustratos sólidos con la ausencia de todo tipo de disolventes, que se resultó claramente favorecido por la formación de un sistema DES entre los sustratos, y que resultó muy eficiente en la acción enzimática. Dicho proceso permitió obtener los monoésteres de pantenol en rendimientos superiores al 80 %, y en una mezcla de reacción directamente utilizable en la formulación de productos cosméticos.
7. Se ha podido demostrar la excelente idoneidad de los ultrasonidos en la síntesis biocatalítica de monoésteres de xilitol, como surfactantes no iónicos de interés para las industrias cosmética y alimentaria, implicando exclusivamente la combinación de los sustratos sólidos con la ausencia de todo tipo de disolventes. La asistencia por la irradiación ultrasónica proporcionó rendimientos en monoésteres de xilitol superiores al 80 %, y en tiempos cortos de reacción inferiores a 1 hora. Además, mediante simple calentamiento y centrifugación, fue posible separar el monoéster de xilitol obtenido, respecto los sustratos sin reaccionar, lo que facilita su incorporación directa a la formulación de productos de comerciales. Nuevamente, la combinación de enzimas con los medios de reacción sin disolventes, que impliquen sustratos naturales y tecnologías facilitadoras (p. ej. ultrasonidos), brinda nuevas oportunidades sinérgicas para desarrollar procesos químicos sostenibles para la obtención de productos de alto valor añadido.

2. Conclusions

This Doctoral Thesis has been developed in the conceptual and methodological field of Sustainable Chemistry, with direct contributions of applications of interest to various industrial sectors. In this way, this Doctoral Thesis successfully presents the development and design of chemical processes that integrate, in a sustainable and clean way, the synthesis and separation of products of great industrial interest with high added value in the pharmaceutical and food sectors and cosmetics, as well as in the polymer industry. The protocols and experimental approaches developed offer the synergistic advantages provided by different sustainable elements, such as ILs, DES, supercritical fluids and enzymes, and their appropriate combination, to obtain the products in an efficient and safe way. In addition, protocols for the separation of pure products have been implemented, with easy extrapolation for possible scaling at an industrial level, in various synthetic products such as fragrances, omega-3 fatty acid monoacylglycerides, or cyclic carbonates. Additionally, in this Doctoral Thesis it has also been possible to demonstrate the adequacy of all solvent-free reaction systems, even based on solid substrate mixtures at room temperature, for the verification of biotransformations through the formation of DESs, or the assistance with ultrasounds, obtaining products of interest for the cosmetic industry (*e.g.* panthenol monoesters, xylitol monoesters).

The main conclusions obtained in this Doctoral Thesis are detailed below:

1. Ionic liquids and their technological developments (*e.g.* supported ionic liquids like phase, SILLPs) open up new opportunities in the context of sustainable technologies, as an excellent enabling tool to integrate reaction and separation processes. In this sense, the exceptional function of many highly efficient biocatalysts such as enzymes, can be greatly improved in IL, scCO₂ environments and the combination of both with excellent synergies, allowing the development of green processes. These IL-based systems can contribute not only to the stabilization and easy recovery of biocatalysts, but can also be implemented in flow systems for downstream processes. The correct combination of efficient chemical biocatalysts / catalysts with advanced materials based on ILs (*e.g.* SILLPs, SLIL, etc.) offers new opportunities that directly point to the integration of several catalytic steps in organic synthesis, without the need to isolate intermediates.

2. The sponge-like behavior shown by some ILs has allowed the design of new sustainable organic processes, providing better yields and methodological advantages for the extraction of pure products. However, the absence of volatile organic solvents during the extraction of the synthesis products, together with the reuse of all the elements involved in the reaction (*e.g.* biocatalyst, SLIL, etc.), are elements that improve sustainability and economic competitiveness. of the processes described.
3. The biocatalytic synthesis of flavor esters is of great interest in the food chemical, cosmetic and pharmaceutical industries, and it has been possible to carry it out by direct esterification of carboxylic acids with alcohols catalyzed by enzymes in reaction media based on SLILs, obtaining yields of pure products very close to 100%. Furthermore, the sponge-like behavior of said SLILs allowed to implement a simple development for the clean separation of the fragrances obtained by cooling / centrifugation using membrane filters. Clearly, the results obtained point to a sustainable way of producing "natural" fragrances from simple substrates obtained from "natural" sources, which could stimulate the development of green chemical processes at an industrial level.
4. A chemo-enzymatic approach has been developed to obtain omega-3 MAGs from fish oil or linseed oil in IL and IL / scCO₂ reaction media. The strategy was based on two consecutive catalytic stages, which involve the biocatalytic transformation of triacylglycerides (TAGs) into solketyl esters of the fatty acids (FASEs) that compose them, and in a second stage, the verification of the selective hydrolysis of the ring. of solketal with an acid zeolite, to yield the corresponding monoglycerides. It has been shown that SLIL [C₁₈tma][NTf₂] is an excellent reaction medium for the transesterification of oils rich in omega-3 fatty acids with solketal, even continuously under supercritical conditions. The experimental strategy proposed assumes a sustainable approach to the production of omega-3 MAGs from natural sources (*e.g.* fish oils), promoting the development of new multi-catalytic processes that can be implemented at an industrial level.
5. A new chemo-enzymatic approach has been carried out for the synthesis of glycerol carbonate (meth)acrylate, as very useful monomers in the preparation of new isocyanate-free polymers, using the technology of ILs, as well as in solvent-free reaction. The strategy was based on two consecutive catalytic steps, involving the selective transesterification of vinyl (meth)acrylate with glycidol by

immobilized CALB to produce glycidyl (meth)acrylate, followed by cycloaddition of CO₂ on the resulting epoxide, catalyzed by a SILLP in a solvent-free medium, which made it possible to achieve yields close to 100% in both catalytic stages. With this practical example, the suitability of SLILs as excellent reaction medium for the lipase-catalyzed transesterification reaction, maintained at the highest level during several cycles of operation, was once again demonstrated. These results clearly showed how the combination of IL technologies and (bio)catalysts can constitute a new way to contribute to reducing the concentration of CO₂ in the atmosphere through its capture and incorporation into value-added products. of interest for biocatalytic synthesis.

6. A biocatalytic synthesis process of panthenol monoesters has been developed, as target molecules in the cosmeceutical industry, exclusively involving the combination of solid substrates with the absence of all types of solvents, which was clearly favored by the formation of a DES system between substrates, and which was very efficient in enzymatic action. This process made it possible to obtain panthenol monoesters in yields greater than 80%, and in a reaction mixture directly usable in the formulation of cosmetic products.
7. It has been possible to demonstrate the excellent suitability of ultrasound in the biocatalytic synthesis of xylitol monoesters, as non-ionic surfactants of interest for the cosmetic and food industries, exclusively involving the combination of solid substrates with the absence of all types of solvents. The assistance by the ultrasonic irradiation provided yields in xylitol monoesters greater than 80%, and in short reaction times of less than 1 hour. Furthermore, by simple heating and centrifugation approach, it was possible to separate the xylitol monoester obtained from the unreacted substrates, which facilitates its direct incorporation into the formulation of commercial products. Once more, the combination of enzymes with solvent-free reaction media, involving natural substrates and enabling technologies (*e.g.* ultrasound), provides new synergistic opportunities to develop sustainable chemical processes to obtain high added value products.

Anexo I

Rocío Villa, Elena Alvarez, Raúl Porcar, Eduardo Garcia-Verdugo, Santiago V. Luis, Pedro Lozano. Ionic liquids as an enabling tool to integrate reaction and separation processes. *Green Chem.*, **2019**, 21, 6527-6544. <https://doi.org/10.1039/C9GC02553G>

Anexo II

Susana Nieto, **Rocío Villa**, Antonio Donaire, José L. Serrano, Pedro Lozano. Ionic Liquids in Clean and Sustainable Biocatalytic Organic Reactions. En *Encyclopedia of Ionic Liquids*. S. Zhang (ed.), pp. 1-13. **2019**. Springer Nature Singapore Pte Ltd. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6739-6_30-1.

Anexo III

Elena Alvarez, Jose Rodriguez, **Rocío Villa**, Celia Gómez, Susana Nieto, Antonio Donaire, Pedro Lozano. Clean Enzymatic Production of Flavor Esters in Spongelike Ionic Liquids. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2019**, 7 (15), 13307–13314. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b02537>

Anexo IV

Rocío Villa, Elena Alvarez, Susana Nieto, Antonio Donaire, Eduardo Garcia-Verdugo, Santiago V Luis, Pedro Lozano. Chemo-enzymatic Production of Omega-3 monoacylglycerides using Sponge-like Ionic liquids and Supercritical carbon dioxide. *Green Chem.*, **2020**, 22, 5701-5710. <https://doi.org/10.1039/D0GC02033H>.

Anexo V

Rocío Villa, Raul Porcar, Susana Nieto, Antonio Donaire, Eduardo Garcia-Verdugo, Santiago V Luis, Pedro Lozano. Sustainable chemo-enzymatic synthesis of glycerol carbonate (meth)acrylate from glycidol and carbon dioxide enabled by ionic liquids technologies. *Green Chem.*, **2021**, <https://doi.org/10.1039/D1GC01096D> .

Anexo VI

Elena Alvarez, **Rocío Villa**, Susana Nieto, Antonio Donaire, Eduardo Garcia-Verdugo, Santiago V. Luis, Pedro Lozano. The suitability of lipases for the synthesis of bioactive compounds with cosmeceutical applications. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, **2021**, 18 (4), 515-528. <https://doi.org/10.2174/1570193X17999200805215623>

Anexo VII

Pedro Lozano, Elena Alvarez, Susana Nieto, **Rocío Villa**, Celia Gómez, Juana M. Bernal, Antonio Donaire". Biocatalytic synthesis of panthenyl monoacylestere in ionic liquids and deep eutectic solvents. *GreenChem.*, **2019**, 21, 3353-3361. <https://doi.org/10.1039/c9gc01076a>.

Anexo VIII

Susana Nieto, **Rocío Villa**, Antonio Donaire, Pedro Lozano. Ultrasound-assisted enzymatic synthesis of xylitol fatty acid esters in solvent-free conditions. *Ultrasonics Sonochemistry* (under rerevision)