



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE QUÍMICA

Propiedades de Líquidos Iónicos y su Aplicación
a la Síntesis de Nanopartículas de Fibroína
de Seda

**Dña. Mercedes García Montalbán
2016**



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

D^a M^a Gloria Villora Cano, Catedrática de Universidad del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Murcia, en calidad de directora de la presente Tesis Doctoral

AUTORIZA: La presentación de la Tesis Doctoral titulada “*Propiedades de líquidos iónicos y su aplicación a la síntesis de nanopartículas de fibroína de seda*” realizada por D^a Mercedes García Montalbán bajo mi inmediata dirección y supervisión en el Departamento de Ingeniería Química y que presenta para obtener el Grado de Doctor por la Universidad de Murcia con la mención de Doctorado Internacional.

Murcia a 21 de septiembre de 2016



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

F. Guillermo Díaz Baños, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Química Física de la Universidad de Murcia, en calidad de director de la presente Tesis Doctoral

AUTORIZA: La presentación de la Tesis Doctoral titulada “*Propiedades de líquidos iónicos y su aplicación a la síntesis de nanopartículas de fibroína de seda*” realizada por D^a Mercedes García Montalbán bajo mi inmediata dirección y supervisión en el Departamento de Ingeniería Química y que presenta para obtener el Grado de Doctor por la Universidad de Murcia con la mención de Doctorado Internacional.

Murcia a 21 de septiembre de 2016

Facultad de Química
Departamento de Química Física

Campus Universitario de Espinardo. 30071 Murcia
T. 868 88 7421.- F. 868 88 41 48 - www.um.es



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

D^a Mercedes Llórens Pascual del Riquelme, Catedrática de Universidad del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Murcia y Directora de dicho Departamento

INFORMA: Que la Tesis Doctoral titulada “*Propiedades de líquidos iónicos y su aplicación a la síntesis de nanopartículas de fibroína de seda*” que presenta D^a Mercedes García Montalbán, ha sido realizada bajo la dirección de los Doctores D^a M^a Gloria Villora Cano y D. Francisco Guillermo Díaz Baños en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química y reúne los requisitos para su presentación.

Murcia a 21 de septiembre de 2016

The School of Chemistry

The University of Nottingham
Jubilee Campus
Nottingham
NG7 2TU

t: +44 (0)115 846 6176

e: peter.licence@nottingham.ac.uk

www.nottingham.ac.uk/ionicliquids

Professor G. Víllora
Department of Chemical Engineering
University of Murcia
Campus de Espinardo
30071 Murcia
Spain

8th September 2016

Evaluation of PhD thesis submitted by Ms. Mercedes García Montalbán:
“Properties of ionic liquids and their application to the synthesis of silk fibroin nanoparticles”

Dear Professor Víllora

This letter serves as a report on my review of the thesis entitled ***“Properties of ionic liquids and their application to the synthesis of silk fibroin nanoparticles”*** which is submitted in candidature for the award of International Doctorate (PhD) by ***Mercedes García Montalbán***.

The work embodied in this Thesis is pertinent and topical to consolidated research activity within the field of ionic liquids/sustainable chemistry. The work is of very high quality; the Thesis is logical, well written and exhibits an exemplary standard of scientific methodology and rigour.

The subject of study is firmly embedded within the framework of the Green and Sustainable Chemistry. Indeed, it deals with one of the hottest topics in this rapidly moving field. The particular area of contribution of this work being the provision of fundamental physical chemistry data and knowledge regarding properties, phase behaviour, partition coefficients (*e.g.* octanol:water) and associated bio-availability in terms of toxicity towards model organisms (*Vibrio fischeri*). The Thesis is both fundamental and applied, the sections that describe the formation of silk fibroin nanoparticles are particularly noted and I look forward to reading further developments in this particular field.

In the formal aspect, the document is well written and presented with an excellent review of the current literature. I am sure that the Candidate has had the opportunity to meld the complimentary skills of both organic synthesis and materials characterisation, providing a diverse skills base. Research of this nature is precisely what the Green Chemistry community requires to make strong advances.

The scientific output of *Mercedes García Montalbán*, generated during her doctoral studies, is substantial and impressive. The Thesis work has led to the publication of a number of articles in international peer-review journals and has been presented in open meetings both nationally and internationally. Overall this work has clearly been highly successful and has realised significant advances in this research topic.

For all these reasons, I consider that the PhD Thesis presented by *Mercedes García Montalbán* fulfils the quality standards required in terms of both experimental work and novelty. I strongly support the submission of the thesis for an International Doctorate. To the best of my knowledge, all relevant necessary conditions for this have been fulfilled.

Yours truly,



Peter Licence CChem FRSC
Professor of Chemistry
Director GSK Carbon Neutral Laboratories for Sustainable Chemistry



universidade de aveiro

Aveiro, September 13th 2016

Professor G. Víllora
Department of Chemical Engineering
University of Murcia
Campus de Espinardo
30071 Murcia
Spain

Dear Professor G. Víllora,

I had the opportunity of reading and analyze the thesis entitled “*Properties of ionic liquids and their application to the synthesis of silk fibroin nanoparticles*” presented by Ms. Mercedes García Montalbán to obtain a PhD degree at University of Murcia. The thesis is well-written and its structure is well-thought making the presentation of the work here reported very clear. The research reported seems to have been carried properly with many novel aspects that do not fail to impress an expert on the field of ionic liquids. The discussion is comprehensive and sound and the conclusions supported by the observations. The quality of this work is further confirmed by the publication of 5 articles in international peer reviewed journals of the area, showing that in some way the research here reported has already been validated by scientists across the world that attested its originality and quality.

For all the above I consider that this thesis under analysis meets the requirements for awarding the International Doctorate mention.

Yours sincerely,

João Araújo Pereira Coutinho
Professor Catedrático, UA

Prof.
PIOTR STEPNOWSKI, Ph.D., D.Sc.
Head, Department of Environmental Analysis

9th September 2016

Professor G. VÍllora
Department of Chemical Engineering
University of Murcia
Campus de Espinardo
30071 Murcia
Spain

Dear Professor VÍllora,

Review of “Properties of ionic liquids and their application to the synthesis of silk fibroin nanoparticles” for a PhD degree by Ms. Mercedes García Montalbán

I have reviewed the thesis sent to me by Professor G. VÍllora and have concluded that it is suitable for the award of the International doctorate mention.

My reasons are as follows:

- The thesis describes original scientific research, part of which has been published in well-regarded peer-review journals.
- There is breadth to the work, which covers several aspects of the study of the physico-chemical characterization of ionic liquids (density and refractive index), of two parameters related to their toxicity (octanol-water partition coefficient and *Vibrio fischeri* toxicity) and the synthesis and characterization of silk fibroin nanoparticles from ionic liquid-silk fibroin solutions.
- The experimental work has been carried out with evident care and competence.
- The thesis is organized logically and acknowledge relevant previous work published by others.
- The thesis is clearly written and laid out, setting out in individual chapters the background of the work done, the experimental data obtained and sensible conclusions derived from them.
- The thesis is reasonably free of typographical and other errors.

On balance, I have no hesitation in concluding that the work meets the required standard.

Yours sincerely



WORCESTER POLYTECHNIC INSTITUTE

BIOMEDICAL ENGINEERING

12th September 2016

Jeannine M. Coburn, Ph.D.

Assistant Professor

WPI Life Sciences and Bioengineering Center

60 Prescott Street Rm 4035

Worcester, MA 01605

Phone: (508) 831-6839, Email: jmcoburn@wpi.edu

Professor G. Villora
Department of Chemical Engineering
University of Murcia
Campus de Espinardo
30071 Murcia
Spain

Dear Professor Villora,

Review of “*Properties of ionic liquids and their application to the synthesis of silk fibroin nanoparticles*” for a PhD degree by Ms. Mercedes García Montalbán.

I have reviewed the thesis and I have concluded that it is suitable for the award of International doctorate.

My reasons are as follows:

- The thesis describes original scientific research on ionic liquids characterization and utilization for silk fibroin nanoparticle fabrication. The development of strategies to make silk fibroin nanoparticles will significantly impact the silk fibroin field as there limited existing strategies to yield large quantities of nanoparticles following a simple procedure.
- There is breadth to the work, which covers several aspects of ionic liquid characterization and application.
- The experimental work has been carried out with evidence of care, competence and thoroughness.
- The thesis is organized logically starting from characterization of the ionic liquids based on (1) physical properties as a function of temperature, anion and alkyl chain length, (2) octanol-water partition coefficient, (3) toxicity assessment on bacteria (as a function of anion and alkyl chain) and (4) silk fibroin nanoparticle fabrication using ionic liquids and high-power ultrasound.
- Relevant previous work published by others is properly referenced for each chapter.
- The thesis is clearly written and laid out, setting out in individual chapters the background of the work done, the experimental data obtained and reasonable conclusions from the data.
- The thesis is reasonably free of typographical and other errors.

On balance, this work meets the required standards for the award of International doctorate.

Yours sincerely,



Jeannine Coburn

508-831-6839 (TEL) 508-831-4121 (FAX)

60 PRESCOTT STREET, WORCESTER MA 01605 USA

WPI.EDU



*Instituto de Ciências Ambientais,
Químicas e Farmacêuticas*

*Departamento de Ciências
Exatas e da Terra*



12th September 2016

Professor G. Villora
Department of Chemical Engineering
University of Murcia
Campus de Espinardo
30071 Murcia
Spain

Dear Professor Villora,

**Review of “*Properties of ionic liquids and their application to the synthesis of silk fibroin nanoparticles*”
for a PhD degree by Ms. Mercedes García Montalbán.**

I have reviewed the thesis and I have concluded that it is suitable for the award of International doctorate.

After a careful proof reading, I consider the thesis an excellent contribution to the Ionic Liquid field as it describes relevant aspects of the use of such compounds in different areas of Chemistry. The material is reasonably free of typographical and other errors and it is organized in a logically way. The thesis is clearly written and laid out, setting out in individual chapters the background of the work done, the experimental data obtained and sensible conclusions derived from them.

The thesis describes original scientific research on the study of some physicochemical properties of pure ionic liquids – *i.e.* imidazolium, pyridinium, and ammonium-based ones – such as density and refractive index as well as their aquatic toxicity in terms of the octanol-water partition coefficient and *Vibrio fischeri* toxicity. In addition, it was studied the ability of ionic liquids for dissolving and regenerating silk fibroin and cocoons from *Bombyx mori* worms.

The author presented well described experimental procedures regarding the synthesis and characterization of all ionic liquids prepared, as well as measurements of physicochemical properties, which are mandatory for a high-quality piece of work. In addition, the design of the experiments and interpretation of the results thus obtained allowed good discussion and comprehensive conclusions regarding the aspects of the ionic liquids studied so far.

On balance, I have no hesitation in concluding that the work meets the required standard.

Yours sincerely

Luiz Sidney Longo Jr
Associate Professor
Medicinal & Organic Chemistry

Professor G. Villora
Department of Chemical Engineering
University of Murcia
Campus de Espinardo
30071 Murcia
Spain

Ana Belén Pereiro Estévez
Associate Researcher
Alternative Fluids for Green Chemistry Group
LAQV, REQUIMTE, Department of Chemistry
Faculdade de Ciências e Tecnologia, FCT/UNL
Universidade Nova de Lisboa
Campus da Caparica
2829-516 Caparica
Phone: (+351) 212948318
Email: anab@fct.unl.pt

22th September 2016

Dear Professor Villora

External evaluation of the Thesis titled “*Properties of ionic liquids and their application to the synthesis of silk fibroin nanoparticles*” for a PhD degree by Ms. Mercedes García Montalbán.

(Propiedades de líquidos iónicos y su aplicación a la síntesis de nanopartículas de fibroína de seda)

I have accepted the invitation of Professor G. Villora to review the thesis of Ms. Mercedes García Montalbán. Taking into account the analysis of this work, I have concluded that it is suitable for the award of the International doctorate mention. My reasons are as follows:

The study carried out in the present Thesis was: (i) the physico-chemical characterization of ionic liquids (density and refractive index); (ii) the octanol-water partition coefficients and *Vibrio fischeri* toxicities of a broad range of ionic liquids; and (iii) the synthesis and characterization of silk fibroin nanoparticles from ionic liquid-silk fibroin solutions. The thesis is organized logically and acknowledge relevant previous work published by others. Furthermore, the document is clearly written and laid out the experimental data obtained and sensible conclusions derived from them.

Ms. Mercedes García Montalbán has also acquired a wide experience in additional areas of scientific research, namely in Green Chemistry and Ionic Liquids, as can be judged by the quality and number of papers published in international refereed journals with considerable impact, book chapter, as well as in communications to both national and international conferences, as can be seen in detail in her Curriculum Vitae. From my point of view, there has been an indeed amount of work carried out by Ms. Mercedes García Montalbán, and the obtained results present importance, interest and originality in the ionic liquid area.

On balance, I have no hesitation in concluding that the work meets the required standard.

Yours sincerely,



Ana Belén Pereiro Estévez

14th September 2016

Professor G. Vllora
Department of Chemical Engineering
University of Murcia
Campus de Espinardo
30071 Murcia
Spain

Dear Professor Vllora,

I have reviewed the thesis entitled “*Properties of ionic liquids and their application to the synthesis of silk fibroin nanoparticles*” submitted by **Ms. Mercedes García Montalbán** for a PhD degree.

In this manuscript the candidate applied a multidisciplinary approach to study different aspects related to ionic liquids (ILs) in order to:

- determine some chemico-physical properties (mainly the density and the refractive index) from which it is possible to predict, prior to synthesis, the density and molecular volumes of the ion pair. A trend of ILs density and refractive index increasing when the alkyl length of the cation decreases has been observed
- evaluate the logK_{OW} of 24 ILs to predict a possible environmental fate and estimate some ecosystem risk factors
- test the aquatic toxicity towards the marine bacterium *Vibrio fischeri* of a set of 26 ILs with the aim of identifying a structure-activity relationship and correlating the ecotoxicity results to the logK_{OW}. Additionally, a detailed study on the acute toxicity towards *V. fischeri* of dicationic ILs (characterized by a higher thermal and electrochemical stability than monocationic ILs) has been performed and a trend of lower toxicity than their monocationic counterparts has been observed
- use ionic liquids and high-power ultrasounds for dissolving and regenerating silk fibroin and cocoons from *Bombyx mori* worms and obtaining high quality silk fibroin nanoparticles

In each thesis chapter:

- The methods and techniques are properly described and widely detailed
- The data are clearly provided and analyzed skillfully and logically

- The results, discussion and conclusion are clearly and logically presented
- The bibliography is complete, relevant and well organized
- The scientific language is clear and comprehensible to professionals in the field

Additionally, from 2014 to now, the candidate published 5 relevant publications in international peer-review journals and 1 book chapter concerning the topics presented in the thesis. Moreover, she presented 10 papers in national and international conferences.

I have concluded that she is suitable for the award of the International doctorate mention and that this thesis meets the established criteria for an International doctorate mention.

Yours sincerely

Chiane Samon

Trabajo presentado para optar al Grado
de **Doctora en Ingeniería Química**
por la Universidad de Murcia

Modalidad: Doctorado Internacional

Murcia, a 21 de Septiembre de 2016

Mercedes García Montalbán
Ingeniera Química

La presente tesis ha estado subvencionada por la Comisión Europea (FEDER/ERDF), el Ministerio de Economía y Competitividad (proyectos con Ref. CTQ2011-25613 y Ref. CTQ2014-57467-R) y la Fundación Séneca-Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia (proyecto con Ref. 19499/PI/14).

Durante el desarrollo de la presente tesis, su autora, Mercedes García Montalbán, ha disfrutado de una beca-contrato predoctoral FPI (Formación del Personal Investigador) del Ministerio de Economía y Competitividad (Ref. BES-2012-053267).

De esta forma, queremos mostrar nuestro agradecimiento a dichas instituciones.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría mencionar a la persona que ha hecho posible que hoy yo esté presentando esta tesis doctoral: la Catedrática Dña. Gloria VÍllora Cano. Gloria, quiero darte las GRACIAS (sí, con mayúsculas) porque hace cuatro años me diste la oportunidad de poder trabajar contigo aún sin apenas conocerte. Pero no solo por eso, puedo decir que durante este tiempo me has enseñado con un entusiasmo y espíritu inigualables todo lo que hoy sé referente a la labor investigadora. No he podido tener mejor maestra. El camino no ha sido fácil, hemos reído mucho pero también hemos echado alguna que otra lagrimilla... y tú siempre, siempre has tenido una palabra de ánimo para mí. Me vienen a la cabeza muchos momentos irrepetibles que hemos pasado juntas: tardes interminables en el despacho, maratones para no perder aviones, llamadas telefónicas transatlánticas infinitas y así podría estar un buen rato. Mi más sincero agradecimiento por todos ellos.

También quiero mostrar mi agradecimiento al profesor Guillermo Díaz Baños del Departamento de Química Física por acceder a ser mi codirector de tesis y por su esfuerzo y colaboración en todas las tareas que hemos realizado juntos.

A Rocío, por tu inestimable ayuda siempre tanto en el laboratorio como fuera de él. Eres de esas personas que merece la pena conservar para siempre. A lo largo de estos cuatro años hemos reído (y también llorado) pero me quedo con esos buenos ratos de risas de los que hemos disfrutado tanto. Gracias.

A Mar, por tu ayuda incondicional y por iniciarme en el maravilloso campo de los cultivos celulares.

Al Departamento de Ingeniería Química, por despertar en mí las ganas de aprender cada día más y más sobre la Ingeniería Química desde que comencé la carrera aquel septiembre de 2005 y por acogerme de una forma excepcional hace cuatro años y hacerme partícipe de la gran familia que entre todos formáis. En especial, me gustaría dar las gracias a la directora del Departamento, la Catedrática Mercedes Llorens Pascual del Riquelme, por tenderme la mano cuando lo necesité y ponerme en contacto con mi directora de tesis. Siempre te estaré enormemente agradecida. También me gustaría mencionar a mis “chicas del café” (ellas saben quiénes son) porque de verdad que algunos días esos ratitos han sido más que necesarios.

Al IMIDA y, en especial, a Abel, por proporcionarnos la fibroína de seda y por ayudarme en muchas ocasiones con la interpretación de resultados.

Al Profesor Peter Licence de la Universidad de Nottingham (UK) y al Profesor David Kaplan de la Universidad de Tufts (USA) por haberme acogido en vuestras respectivas universidades para llevar a cabo mis dos estancias predoctorales. En ambas, es increíble lo que he aprendido no solo a nivel profesional sino, lo que para mí es aún más importante, a nivel personal.

A mis padres, Alfonso y Salvadora. Ellos desde el mismo momento que me dieron la vida no han dejado ni un solo segundo de preocuparse por mí y de ayudarme a cumplir todos los sueños que me he ido proponiendo a lo largo de estos 29 años. Este logro es

Agradecimientos

también vuestro y así quiero que lo sintáis. Soy consciente de que en la vida nadie me querrá con un amor tan incondicional como el vuestro.

A mis tres hermanos, Ginés, Lali y María José. Somos el resultado de las experiencias que vivimos y yo, tanto en mi niñez como en la actualidad, no puedo tener mejores compañeros en este viaje llamado vida. Sois parte de mí y siempre lo seréis. Gracias por estar siempre ahí.

A mis cuatro sobrinos, Adriana, Irene, Lucía y Marco. Sois la alegría de mi vida, ser “tata” ha cambiado mi perspectiva de la vida, os quiero y siempre tendréis mi cariño y amor incondicional.

Al resto de mi familia, cuñados, tíos, madrina, prima. Gracias por estar presentes en todas y cada una de las fases de mi vida. Sin vosotros esto no hubiera sido lo mismo.

A mis amigos y amigas, sois la familia que se elige y yo he elegido la mejor. Por esas despedidas sorpresa cada vez que me he ido de estancia y vuestras continuas llamadas y whatsapps para que no desfalleciera en ningún momento en mi empeño de lograr mis metas. Siempre habéis estado ahí y nunca lo olvidaré.

A Salva, la persona con la que hace trece años decidí compartir mi vida, el amor de mi vida. Nadie sabe más que tú lo que ha costado llegar hasta aquí. Hemos pasado de todo desde que comenzamos nuestro camino juntos y nunca, nunca has dejado de apoyarme para que consiguiera lo que me he propuesto. Son tantos y tantos los momentos que hemos compartido que podría estar recogiendo durante un año entero. Sólo puedo decirte GRACIAS. Por soportar todos aquellos días interminables de estudio cuando aún estaba en la carrera, por esos innumerables viajes de coche a Madrid, por acompañarme siempre en el “período de adaptación” (como tú lo llamas) de mis estancias, por “sobrevivir” a la organización de una boda sin parar de trabajar y por tener siempre un abrazo para mí cuando las lágrimas han brotado de mis ojos en los momentos más difíciles. TE QUIERO MÁS DE LO QUE PENSÉ QUE NUNCA PODRÍA QUERER A NADIE.

A mi familia

*“Si he conseguido ver más lejos es porque siempre me he aupado en
hombros de gigantes”*

Isaac Newton (1642-1727)

Los resultados de la labor de investigación desarrollada durante la presente Tesis Doctoral han dado lugar a la publicación de varios artículos en revistas científicas, un capítulo de libro y diversas comunicaciones (oral o póster) a congresos de ámbito nacional e internacional.

Artículos en revistas de carácter internacional:

1. **M.G. Montalbán**, C.L. Bolívar, F.G. Díaz Baños, G. Vllora, Effect of temperature, anion, and alkyl chain length on the density and refractive index of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids, *J. Chem. Eng. Data* 60 (2015) 1986-1996.
2. **M.G. Montalbán**, M. Collado-González, R. Trigo, F.G. Díaz Baños, G. Vllora, Experimental measurements of octanol-water partition coefficients of ionic liquids, *J. Adv. Chem. Eng.* 5:133 (2015) 1–9.
3. **M.G. Montalbán**, J.M. Hidalgo, M. Collado-González, F.G. Díaz Baños, G. Vllora, Assessing chemical toxicity of ionic liquids on *Vibrio fischeri*: Correlation with structure and composition, *Chemosphere* 155 (2016) 405-414.
4. **M.G. Montalbán**, P. Licence, G. Vllora, Assessing dicationic ionic liquids as an environmentally friendly alternative using the *Vibrio fisheri* inhibition test, (pendiente de publicación).
5. A.A. Lozano-Pérez, **M.G. Montalbán**, S.D. Aznar-Cervantes, F. Cagnolini, J.L. Cenis, G. Vllora, Production of silk fibroin nanoparticles using ionic liquids and high-power ultrasounds, *J. Appl. Polym. Sci.* 132 (2014) 41702.

Capítulo de libro:

1. **M.G. Montalbán**, M. Collado-González, F.G. Díaz Baños, G. Vllora, Predicting density and refractive index of ionic liquids in *Ionic Liquids*, S. Handy, Ed. (2016) Intech ISBN 978-953-51-4897-5 (aceptado para publicación, actualmente en pruebas de imprenta).

Comunicaciones a Congresos de ámbito nacional e internacional:

1. A.A. Lozano-Pérez, C.L. Bolívar, **M.G. Montalbán**, R. Trigo, J.M. Egidos, F.N. Vllora, G. Vllora. Silk fibroin nanoparticles obtained from ionic liquid solutions, XXXIV Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química, Santander (España), 15-18 Septiembre 2013, Oral.
2. **M.G. Montalbán**, C.L. Bolívar, A.A. Lozano-Pérez, R. Trigo, F.N. Vllora, G. Vllora. Octanol-Water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids XXXIV Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química, Santander (España), 15-18 Septiembre 2013, Póster.

3. A.A. Lozano-Pérez, J.L. Cenis, C.L. Bolívar, **M.G. Montalbán**, R. Trigo, F.N. VÍllora, G. VÍllora. Production of regenerated silk fibroin nanoparticles by dissolution of silk, using 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride and high-power ultrasounds, 4th International Congress on Green Process Engineering, Sevilla (España), 7-10 Abril 2014, Póster.
4. **M.G. Montalbán**, C.L. Bolívar, R. Trigo, A.A. Lozano-Pérez, F.N. VÍllora, G. VÍllora. Octanol-water partition coefficients and *Vibrio fischeri* toxicity test of imidazolium-based ionic liquids, 4th International Congress on Green Process Engineering, Sevilla (España), 7-10 Abril 2014, Póster.
5. C.L. Bolívar, **M.G. Montalbán**, R. Trigo, F.N. VÍllora, G. VÍllora. Densities and refractive indices of imidazolium based ionic liquids. Effect of temperature and alkyl chain length and anion. 4th International Congress on Green Process Engineering, Sevilla (España), 7-10 Abril 2014, Póster.
6. **M. G. Montalbán**, R. Trigo, M. Collado-González, F. Guillermo Díaz Baños, G. VÍllora. Measurements of the density and refractive index for 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids, 4th International Workshop on Ionic Liquids, Tarragona (España), 15-16 Enero 2015, Oral.
7. **M. G. Montalbán**, R. Trigo, M. Collado-González, F. Guillermo Díaz Baños, G. VÍllora. Prediction of the density and molecular volume of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids. 4th International Workshop on Ionic Liquids, Tarragona (España), 15-16 Enero 2015, Oral.
8. **M.G. Montalbán**, R. Trigo, M. Collado-González, F. Guillermo Díaz Baños, G. VÍllora. A critical examination of octanol-water partition coefficients and vibrio fischeri toxicity test for ionic liquids based on imidazolium salts. 4th International Workshop on Ionic Liquids, Tarragona (España), 15-16 Enero 2015, Oral.
9. **M.G. Montalbán**, R. Trigo, M. Collado-González, F. Guillermo Díaz-Baños, A. Abel Lozano-Pérez, G. VÍllora. Solution of silk in ionic liquids by ultrasound irradiation to obtain regenerated silk fibroin nanoparticles, X Iberoamerican Conference on Phase Equilibria and Fluid Properties for Process Design, Alicante (España), 28 Junio-1 Julio 2015, Oral.
10. **M.G. Montalbán**, J.M. Hidalgo, R. Trigo, M. Collado-González, F. Guillermo Díaz-Baños, G. VÍllora. Experimental measurements and estimation by quantitative structure-activity relationships (QSAR) of (eco) toxicity of ionic liquids, XXXV Reunión Bienal Real Sociedad Española de Química, A Coruña (España), 19-23 Julio 2015, Póster.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DEL TRABAJO	7
2.1. Objetivos	9
2.2. Estructura del trabajo	10
3. ANTECEDENTES	13
3.1. Los líquidos iónicos	15
3.1.1. Historia de los líquidos iónicos.....	16
3.1.2. Definición de líquido iónico.....	17
3.1.3. Síntesis de los líquidos iónicos.....	19
3.1.4. Propiedades físicas y químicas de los líquidos iónicos.....	22
3.1.5. Ventajas del empleo de líquidos iónicos frente a disolventes orgánicos convencionales	34
3.1.6. Aplicaciones de los líquidos iónicos.....	36
3.1.6.1. Líquidos iónicos como disolventes en reacciones biocatalíticas.....	36
3.1.6.2. Líquidos iónicos como disolventes en reacciones químicas.....	37
3.1.6.3. Líquidos iónicos como catalizadores.....	39
3.1.6.4. Líquidos iónicos como co-catalizadores.....	39
3.1.6.5. Líquidos iónicos como agentes de extracción.....	39
3.1.6.6. Líquidos iónicos como membranas líquidas soportadas (SLM) y reactores de membrana.....	40
3.1.6.7. Sistemas bifásico líquido iónico/CO ₂ supercrítico.....	41
3.1.6.8. Otros usos de los líquidos iónicos.....	43

3.2. La seda como biomaterial	43
3.2.1. La seda del gusano de seda.....	44
3.2.2. Composición y estructura de la seda.....	47
3.2.3. Propiedades de la fibroína de seda.....	49
3.2.4. Procesado de la fibroína de seda.....	51
3.2.5. Aplicaciones de la seda regenerada.....	53
3.2.5.1. Nanofibras.....	53
3.2.5.2. Películas.....	54
3.2.5.3. Matrices o estructuras porosas (<i>scaffolds 3D</i>).....	56
3.2.5.4. Micro- y nanopartículas.....	57
3.2.5.5. Hidrogeles.....	58
3.2.6. Biocompatibilidad de la seda.....	58
3.2.6.1. Degradación.....	59
3.3. Bibliografía	60
4. DENSIDAD E ÍNDICE DE REFRACCIÓN DE LÍQUIDOS IÓNICOS BASADOS EN SALES DE 1-ALQUIL-3-METILIMIDAZOLIO: EFECTO DE LA TEMPERATURA, EL ANIÓN Y LA LONGITUD DE LA CADENA ALQUÍLICA	77
4.1. Introducción	79
4.2. Materiales y Métodos	81
4.2.1. Materiales.....	81
4.2.2. Determinación de la densidad.....	81
4.2.3. Determinación del índice de refracción.....	81
4.3. Resultados y Discusión	82
4.3.1. Densidad: Resultados y correlación.....	82
4.3.2. Predicción de la densidad y el volumen molecular de los líquidos iónicos.....	88
4.3.3. Índice de refracción: Resultados y correlación.....	93
4.3.4. Correlaciones entre densidad e índice de refracción.....	94
4.4. Conclusiones	96
4.5. Bibliografía	97
4.6. Anexo al Capítulo 4	101

5. COEFICIENTES DE REPARTO OCTANOL-AGUA DE LÍQUIDOS IÓNICOS	109
5.1. Introducción	111
5.2. Materiales y Métodos	115
5.2.1. Método experimental.....	115
5.2.2. Materiales.....	116
5.2.3. Método analítico.....	118
5.3. Resultados y Discusión	118
5.3.1. Validación de la técnica experimental.....	118
5.3.2. Coeficientes de extinción.....	119
5.3.3. Coeficiente de reparto octanol-agua.....	119
5.3.4. Discusión de los resultados.....	122
5.4. Conclusiones	124
5.5. Bibliografía	125
6. TOXICIDAD ACUÁTICA DE LÍQUIDOS IÓNICOS MEDIANTE EL TEST DE <i>VIBRIO FISCHERI</i>	131
6.1. Introducción	133
6.2. Materiales y Métodos	136
6.2.1. Materiales.....	136
6.2.2. Ensayos de Microtox ®	139
6.3. Resultados y Discusión	139
6.4. Conclusiones	145
6.5. Bibliografía	146

7. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LÍQUIDOS IÓNICOS DICATIÓNICOS MEDIANTE EL TEST DE INHIBICIÓN DE <i>VIBRIO FISCHERI</i>	151
7.1. Introducción	153
7.2. Materiales y Métodos	156
7.2.1. Compuestos.....	156
7.2.2. Síntesis y caracterización.....	156
7.2.3. Ensayos de toxicidad.....	161
7.3. Resultados y Discusión	161
7.3.1. Líquidos iónicos monocatiónicos.....	164
7.3.2. Líquidos iónicos dicatiónicos	165
7.3.3. Líquidos iónicos mono- vs dicatiónicos.....	167
7.3.4. Dependencia del coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}) con la toxicidad en <i>Vibrio fischeri</i>	168
7.4. Conclusiones	169
7.5. Bibliografía	170

8. OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE FIBROÍNA DE SEDA EMPLEANDO LÍQUIDOS IÓNICOS Y ULTRASONIDOS DE ELEVADA POTENCIA	175
8.1. Introducción	177
8.2. Materiales y Métodos	179
8.2.1. Materiales.....	179
8.2.2. Ensayos de solubilidad de la fibroína de seda en líquidos iónicos mediante energía térmica.....	179
8.2.3. Disolución de proteínas de seda en líquidos iónicos mediante ultrasonicación	180
8.2.4. Caracterización de las disoluciones fibroína de seda-líquido iónico.....	180
8.2.5. Síntesis de nanopartículas de fibroína de seda.....	180
8.2.6. Caracterización de las partículas de seda.....	182
8.2.7. Ensayos de viabilidad celular/citotoxicidad.....	182
8.3. Resultados y Discusión	183
8.3.1. Ensayos de solubilidad de fibroína de seda en líquidos iónicos..	183
8.3.2. Disolución de proteínas de seda con ultrasonidos de alta potencia.....	184
8.3.3. Caracterización de las disoluciones fibroína de seda-líquido iónico.....	184
8.3.4. Preparación de nanopartículas de fibroína de seda.....	185
8.3.5. Caracterización de las nanopartículas de seda.....	186
8.3.6. Ensayos de viabilidad celular/citotoxicidad.....	189
8.4. Conclusiones	190
8.5. Bibliografía	191
8.6. Anexo al Capítulo 8	193
9. CONCLUSIONES	203
10. RESUMEN EN INGLÉS DE LA TESIS DOCTORAL	209

1

Introducción

“Ciencia es todo aquello sobre lo cual siempre cabe discusión”

José Ortega y Gasset (1883-1955)

1. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, la mayoría de los procesos implicados en las industrias farmacéuticas y de química fina han requerido elevados consumos energéticos a la vez que han generado grandes cantidades de residuos. De este modo, han ido contribuyendo a la degradación medioambiental la cual de forma gradual se ha convertido en un problema global. Con esta perspectiva, los intereses medioambientales han ido creciendo y se han establecido leyes cada vez más estrictas por lo que ha surgido la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías de menor impacto medioambiental. Es en este contexto donde surgió hace algunos años el concepto de *Química Verde* y, más recientemente, el de *Ingeniería Verde* con el objetivo de contribuir en mayor o menor grado a la solución de dicho problema. En 1998, Anastas y Warner [1] definieron la Química Verde como el diseño de productos químicos y procesos que reducen o eliminan el uso y la generación de sustancias nocivas. En 2003, Anastas y Zimmerman [2] definieron la Ingeniería Verde como el desarrollo y la comercialización de procesos industriales económicamente factibles que reducen el riesgo tanto para la salud humana como para el medioambiente.

Uno de los principios fundamentales de la Química Verde dice literalmente que “se evitará, en lo posible, el uso de sustancias que no sean imprescindibles (disolventes, reactivos para llevar a cabo separaciones, etc.) y en el caso de que se utilicen que sean lo más inocuas posible”. En este sentido, los líquidos iónicos presentan una menor toxicidad, son más seguros y menos contaminantes que los disolventes convencionales. Los líquidos iónicos son sales orgánicas que se encuentran en estado líquido a temperatura inferior a 100°C y que están formados habitualmente por un catión orgánico (frecuentemente sales de dialquilimidazolio y tetraalquilamonio) y un anión inorgánico poliatómico (por ejemplo, BF_4^- , PF_6^- , $\text{CH}_3\text{-COO}^-$). Durante las dos últimas décadas, se han desarrollado numerosos estudios con líquidos iónicos debido a que presentan un carácter más “verde” que el de los disolventes orgánicos convencionales y al elevado número de aplicaciones potenciales que poseen en la industria. Desde el punto de vista medioambiental, las propiedades más importantes de los líquidos iónicos son: su presión de vapor, prácticamente nula, y sus excelentes propiedades químicas y térmicas. Uno de los aspectos de mayor relevancia de los líquidos iónicos es la posibilidad de modular sus propiedades fisicoquímicas (hidrofobicidad, densidad, índice de refracción, viscosidad, punto de fusión y polaridad entre otras) mediante modificaciones en el catión y el anión constituyentes. Esta característica presenta especial relevancia para llevar a cabo reacciones o procesos de separación con éxito ya que es posible combinar de forma apropiada la parte catiónica y aniónica del líquido iónico. Por estos motivos, los líquidos iónicos son conocidos como “disolventes de diseño” y presentan suficiente potencial para reemplazar los disolventes orgánicos convencionales en procesos de síntesis, catálisis y separación.

La mayoría de los líquidos iónicos no son compuestos volátiles, como consecuencia de las interacciones electrostáticas que se presentan entre los componentes de los mismos, por lo que no presentan efectos sobre la contaminación atmosférica. Sin embargo, sí que presentan un grado significativo de solubilidad en agua donde sus efectos aún no han sido estudiados en profundidad. Además, debido a su elevada estabilidad, los líquidos iónicos podrían llegar a ser agentes contaminantes persistentes en aguas residuales. Por ello, es muy importante cuantificar este efecto mediante parámetros toxicológicos como el coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}), que clasifica los líquidos iónicos en función de su hidrofobicidad o hidrofiliidad, y la toxicidad acuática (EC_{50}).

1. Introducción

Durante estos últimos años, nuestro grupo de investigación ha realizado intensos esfuerzos dedicados al estudio de las propiedades fisicoquímicas de los líquidos iónicos relacionadas con sus aplicaciones, prestando especial atención a su uso como disolventes del biopolímero fibroína de seda para sintetizar nanopartículas de fibroína de seda por primera vez a partir de soluciones fibroína de seda-líquido iónico.

En el ámbito de la nanotecnología, una partícula es definida como un pequeño objeto que se comporta como una unidad independiente en relación a sus propiedades y a su transporte. Una nanopartícula presenta un diámetro con valor entre 1 y 200 nanómetros. En los Estados Unidos de América, el *National Nanotechnology Initiative* ha destinado una gran cantidad de fondos públicos a la investigación con nanopartículas, particularmente en el campo de la biomedicina. Al emplear un procedimiento específico para la liberación terapéutica de fármacos en una zona afectada, normalmente es posible encontrar muchas barreras las cuales requieren especial consideración cuando se están diseñando nuevas terapias. Así, la eficacia de cualquier terapia depende del modo de liberación y de su potencia en el área afectada. En el caso de la liberación intravenosa la eficacia puede variar dependiendo de la zona y del vehículo de liberación. Durante las dos últimas décadas, se han desarrollado numerosos estudios en el campo de los sistemas de liberación de fármaco con el objetivo de lograr mecanismos de liberación controlada que permitan dirigir el fármaco a un tejido específico (por ejemplo, un tumor) empleando micro- o nanopartículas. De este modo, un agente de liberación a escala nanométrica biocompatible y biodegradable que no genere subproductos tóxicos sería capaz de permitir la liberación del fármaco sin comprometer la eficacia. Además, si el portador derivado de una estructura biológica presenta características químicas y/o estructurales que favorezcan la absorción por las células, la efectividad del portador aumenta sustancialmente. Un ejemplo de sistema de liberación derivado de una estructura biológica podría estar basado en fibroína de seda debido a su biocompatibilidad y degradación controlada. Además, las nanopartículas son suficientemente pequeñas para penetrar a través de capilares de pequeño diámetro mejorando la absorción celular de un fármaco encapsulado o de una molécula terapéutica.

La fibroína de seda de gusano *Bombyx mori* se obtiene a partir del capullo de seda tras efectuar un proceso denominado desgomado en el que se elimina la otra proteína que acompaña a la fibroína, llamada sericina. Es una proteína biopolimérica ampliamente usada en aplicaciones biomédicas debido a que presenta propiedades mecánicas similares a las de los polímeros sintéticos más avanzados. La fibroína de seda dispone de una estabilidad medioambiental superior a la de proteínas de tipo globular debido a sus enlaces por puentes de hidrógeno, la naturaleza hidrofóbica de la mayor parte de la proteína y a su elevado grado de cristalinidad. La fibroína de seda es insoluble en la mayoría de disolventes incluyendo el agua y ácidos y bases diluidos. De forma convencional, se han empleado dos sistemas disolventes en la disolución de fibras de seda tras el proceso de desgomado: disoluciones iónicas acuosas, como LiBr 9.3M o CaCl₂ 50% (w/v) [3] y disoluciones iónicas hidroalcohólicas como la mezcla CaCl₂/Etanol/Agua (reactivo de Ajisawa [4]). Ambos tipos de disolución requieren una diálisis exhaustiva posterior en agua desionizada antes de proceder a la concentración hasta el nivel requerido. Sin embargo, estos dos procesos, diálisis y concentración, implican largos tiempos y las soluciones de seda obtenidas son inestables con un corto período de vida antes de que la proteína gelifique. El empleo de líquidos iónicos para la disolución de fibroína de seda es una opción mucho más benigna que los disolventes

empleados de modo convencional. La solubilidad de la fibroína de seda en líquidos iónicos se debe a la capacidad del anión (fundamentalmente, halógenos o pequeños carboxilatos) para romper los enlaces de hidrógeno de las láminas β de la fibroína. Al emplear, líquidos iónicos como disolventes se reduce el número total de etapas del proceso de disolución, además, es posible disolver el capullo en el líquido iónico adecuado, sin necesidad de realizar la operación de desgomado. No obstante, la disolución completa de las proteínas de la seda empleando energía térmica también puede durar varias horas, incluso aumentando la temperatura hasta unos 100 °C, dando lugar a la pérdida de la integridad de la proteína. Por este motivo, en la presente tesis se han incorporado mejoras en el proceso de disolución de la seda aplicando energía de ultrasonidos de elevada potencia, con control de temperatura, a la mezcla fibroína de seda-líquido iónico para acelerar el proceso y evitar períodos largos de calentamiento y añadiendo agua para reducir la viscosidad. La energía de ultrasonidos de elevada potencia proporciona dos relevantes efectos sinérgicos en la mezcla: rápido calentamiento y ruptura eficiente de las fibras al mismo tiempo.

Los objetivos principales de la presente tesis han sido i) el estudio de las propiedades físicoquímicas de líquidos iónicos como es el caso de la densidad y del índice de refracción y de su toxicidad mediante el coeficiente de reparto octanol-agua y la toxicidad acuática y ii) la aplicación de estos líquidos iónicos como disolventes del polímero fibroína de seda para obtener nanopartículas de este material.

BIBLIOGRAFÍA:

- [1] P.T. Anastas, J.C. Warner, Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, New York, 1998.
- [2] P.T. Anastas, J.B. Zimmerman, Design of green engineering, through the 12 principles, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 94A–101A.
- [3] E.S. Sashina, A.M. Bochek, N.P. Novoselov, D.A. Kirichenko, Structure and solubility of natural silk fibroin, *Russ. J. Appl. Chem+* 79 (2006) 869-876.
- [4] A. Ajisawa, Dissolution of silk fibroin with calcium chloride-ethanol aqueous solution, *J. Seric. Sci. Jap.* 67 (1998) 91-94.

2

Objetivos y estructura de la tesis

“Los imposibles de hoy serán posibles mañana”

Konstantin Tsiolkovsky (1857-1935)

2. OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DEL TRABAJO

2.1. OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral presenta dos objetivos globales diferenciados: i) el estudio de las propiedades fisicoquímicas de líquidos iónicos puros, como es el caso de la densidad y del índice de refracción, así como de su toxicidad a través del coeficiente de reparto octanol-agua y de su toxicidad acuática, y ii) la aplicación de los líquidos iónicos al proceso de disolución de fibroína de seda para sintetizar nanopartículas de dicho biopolímero.

Estos objetivos globales se han desglosado en los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de la temperatura, de la naturaleza del anión y la longitud de la cadena alquílica del catión sobre la densidad y el índice de refracción de líquidos iónicos puros.
2. Estimar mediante correlaciones empíricas la relación entre la densidad y el índice de refracción de líquidos iónicos puros.
3. Desarrollar un nuevo método para la predicción de la densidad de líquidos iónicos puros basado en el volumen molecular.
4. Comparar los valores de los coeficientes de reparto octanol-agua (K_{ow}) de líquidos iónicos puros obtenidos mediante tres métodos experimentales distintos: *slow-stirring*, *shake-flask* y un nuevo método que aproveche las ventajas de los dos anteriores.
5. Estudiar el efecto de la naturaleza del anión y de la longitud de la cadena alquílica del catión en el K_{ow} de líquidos iónicos puros.
6. Estimar una correlación empírica entre la toxicidad de líquidos iónicos monocatiónicos obtenida a través del test de inhibición de *Vibrio fischeri* y sus valores de K_{ow} .
7. Sintetizar una serie sistemática de líquidos iónicos mono- y dicatiónicos y caracterizarlos mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas (MS).
8. Analizar la influencia de los factores estructurales que afectan a la toxicidad en *Vibrio fischeri* de líquidos iónicos mono- y dicatiónicos.
9. Evaluar la capacidad de una serie de líquidos iónicos para disolver capullos de seda y fibroína de seda y caracterizar mediante electroforesis las disoluciones obtenidas.
10. Sintetizar nanopartículas de fibroína de seda a partir de disoluciones de fibroína de seda-líquido iónico y caracterizarlas en cuanto a su estructura y citotoxicidad.

2.2. ESTRUCTURA DEL TRABAJO

La presente tesis se ha estructurado en los siguientes capítulos:

En el **Capítulo 3** se recoge una revisión de los antecedentes de los dos grandes temas de la tesis: los líquidos iónicos y la fibroína de seda. En el caso de los líquidos iónicos, se ha dedicado una parte importante de este capítulo a su síntesis, propiedades y aplicaciones y en el caso de la fibroína de seda se ha hecho especial hincapié en su composición y estructura, propiedades mecánicas y biomédicas así como a sus aplicaciones en forma de seda regenerada.

En el **Capítulo 4** se ha determinado la densidad y el índice de refracción de líquidos iónicos basados en sales de imidazolio en un amplio rango de temperatura. A partir de los datos experimentales, se ha evaluado el efecto de la temperatura, la composición del anión y la longitud de la cadena alquílica en el comportamiento de estas dos propiedades fisicoquímicas. Además, se ha estimado la relación entre ambas propiedades mediante correlaciones empíricas y se ha desarrollado un método para entender el comportamiento de la densidad de los líquidos iónicos basado en el volumen molecular. Mediante este nuevo procedimiento, es posible predecir la densidad y los volúmenes moleculares de líquidos iónicos con cationes del tipo alquilimidazolio y con distintos aniones (también probablemente con otras combinaciones de iones de estructura similar) antes de sintetizarlos, en un amplio rango de temperaturas a partir de cálculos teóricos sencillos relacionados con la estructura de los iones presentes.

El **Capítulo 5** se centra en la determinación experimental del coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}) de muestras diluidas de líquidos iónicos con cationes imidazolio, piridinio y amonio. Para ello, se han empleado tres métodos distintos (*slow-stirring*, *shake-flask* y un método resultado de la combinación de los dos anteriores desarrollado por nuestro grupo de investigación) y los resultados han sido comparados, lo cual no se había hecho con anterioridad a esta tesis. En el capítulo se ha desarrollado una discusión del efecto de la naturaleza del anión y de la longitud de la cadena alquílica del catión sobre los valores de K_{ow} .

Los **Capítulos 6 y 7** están enfocados al estudio de la toxicidad acuática en la bacteria bioluminiscente *Vibrio fischeri* de líquidos iónicos mono- y dicatiónicos definida dicha toxicidad como la concentración nominal efectiva de líquido iónico que produce una mortalidad del 50% de la población bacteriana (EC_{50}). Concretamente en el **Capítulo 6**, se ha determinado la toxicidad de un total de 29 líquidos iónicos monocatiónicos con cationes del tipo imidazolio, piridinio y amonio. A partir de esos datos, se ha desarrollado un estudio exhaustivo de los distintos factores que afectan a la toxicidad del líquido iónico así como una correlación empírica entre los valores de EC_{50} y los coeficientes de reparto octanol-agua (K_{ow}) obtenidos en el Capítulo 2. En el **Capítulo 7**, en primer lugar, se han sintetizado 26 líquidos iónicos (9 monocatiónicos y 17 dicatiónicos) algunos de los cuales no habían sido sintetizados con anterioridad a esta tesis. A continuación, se ha determinado su toxicidad acuática mediante el test de inhibición de *Vibrio fischeri* en forma de EC_{50} al igual que en el Capítulo 6. Hasta la fecha, ningún estudio publicado en la bibliografía había reportado la toxicidad en *Vibrio fischeri* de la mayoría de estos líquidos iónicos (22 de 26). Con los resultados obtenidos,

se ha analizado sistemáticamente la influencia de la estructura y la composición en la toxicidad de los líquidos iónicos.

En el **Capítulo 8**, se ha evaluado la capacidad de una serie de líquidos iónicos para disolver y regenerar fibroína de seda y capullos de gusanos de la raza *Bombyx mori*. Las disoluciones de seda-líquido iónico obtenidas han sido caracterizadas mediante electroforesis. Además, también se han caracterizado las nano- y micropartículas de fibroína de seda obtenidas por precipitación en metanol a partir de dichas disoluciones en cuanto a su estructura y citotoxicidad (línea celular L929). No existen evidencias en la bibliografía de síntesis de nanopartículas de fibroína de seda a partir de disoluciones fibroína de seda-líquido iónico previas a este estudio.

El **Capítulo 9** recoge las conclusiones generales extraídas de los Capítulos 4, 5, 6, 7 y 8 de la presente tesis doctoral.

Las referencias bibliográficas de cada uno de los Capítulos 4, 5, 6, 7 y 8 se encuentran recogidas al final de los mismos para facilitar la lectura y comprensión de la tesis.

3

Antecedentes

“ En torno de la esencia está la morada de la ciencia ”

Platón (427-347 a.C.)

3. ANTECEDENTES

3.1. LÍQUIDOS IÓNICOS

La mayor parte de los disolventes disponibles actualmente para ser empleados en reacciones químicas, operaciones de separación y procesado de materiales ya se conocían cuando la Ingeniería Química comenzó a desarrollarse a principios del siglo XX y, prácticamente todos ellos, habían sido caracterizados. En aquellos días, cuando los ingenieros químicos requerían un disolvente para llevar a cabo una operación unitaria se dirigían a los disolventes líquidos más comunes como es el caso del tolueno, benceno, diclorometano, acetonitrilo, metanol, etanol y agua. A pesar de que estos disolventes presentan un amplio rango de polaridad y una capacidad sustancial para formar enlaces de hidrógeno, todos ellos poseen la misma desventaja: una estrecha región líquida (aproximadamente, entre 75 y 200°C). La región líquida de un compuesto se define como el rango de temperatura entre el punto de solidificación y el punto de ebullición; por tanto, el agua presenta un rango líquido de 100°C. Debido a que lo habitual es trabajar con compuestos líquidos, la mayoría de los procesos se han desarrollado bajo las restricciones impuestas por este relativamente pequeño rango de temperatura.

Los ingenieros químicos, ayudándose de las herramientas disponibles en la ingeniería química y de su ingenio, han fabricado productos que han mejorado enormemente la calidad de vida de nuestro planeta. Sin embargo, estos beneficios no han sido gratis. Precisamente el rango líquido estrecho de los disolventes comúnmente empleados significa que todos ellos son relativamente volátiles en las condiciones de proceso. Aun cuando se han dedicado enormes esfuerzos y la mejor tecnología para solventar este inconveniente se estima que 20 millones de toneladas de compuestos orgánicos volátiles son descargados a la atmósfera cada año como resultado de las operaciones de procesos industriales [1].

Las emisiones de disolventes a la atmósfera están relacionadas con una multitud de efectos negativos como son el cambio climático, mala calidad del aire en las ciudades y enfermedades en humanos. Por tanto, las nuevas metas a las que se enfrentan los ingenieros químicos son continuar proporcionando a la sociedad los productos necesarios para sustentar elevados estándares de vida y, al mismo tiempo, reducir significativamente el impacto medioambiental de los procesos que se emplean para conseguirlo. La consecución de estos objetivos aparentemente contradictorios es uno de los grandes retos a los que se está enfrentando nuestra profesión desde hace algunos años.

Durante los últimos años, se ha desarrollado una nueva clase de compuestos que podrían llegar a ser los aliados perfectos para ayudarnos a conseguir las dos metas anteriores: eficiencia y procesado químico respetuoso con el medioambiente. Estos compuestos disponen de potencial suficiente para revolucionar la forma en la que pensamos y usamos los disolventes ya que actúan como buenos disolventes orgánicos disolviendo especies polares y apolares. Además, en la mayoría de los casos, estos compuestos han actuado mucho mejor que los disolventes comúnmente empleados. La característica más fascinante de dichos compuestos quizás es que, aunque son líquidos en estado puro a temperatura ambiente, presentan una presión de vapor despreciable. No se evaporan y, por tanto, no pueden dar lugar a emisiones. La mayoría de estos

3. Antecedentes

compuestos son líquidos en un rango increíblemente amplio de temperatura, desde una temperatura inferior a la ambiente hasta superar los 300 ó 400 °C lo que hace que puedan ser usados en condiciones de procesamiento muy singulares. A estos compuestos se les ha conocido con el nombre de líquidos iónicos y son sales orgánicas cuyos cationes, sustituyentes y aniones pueden ser modificados prácticamente a voluntad con el objetivo de modular sus propiedades físicas y químicas [2].

Un indicador del interés de los líquidos iónicos en procesos de reacción y de separación es el número de publicaciones que han aparecido en los últimos años. Si se realiza una búsqueda bibliográfica del término líquido iónico, pueden encontrarse unos 20 artículos por año hasta 1995, número que creció hasta 513 en el 2002, hasta casi 1500 en el año 2006, llegándose prácticamente a duplicar en el año 2011 y llegando a 3801 en el año 2014, tal y como se puede observar en la **Figura 3.1**, en la cual se ha representado el número de artículos que sobre líquidos iónicos se han publicado en revistas de reconocido prestigio entre 1980 y 2015, presentando un crecimiento exponencial.

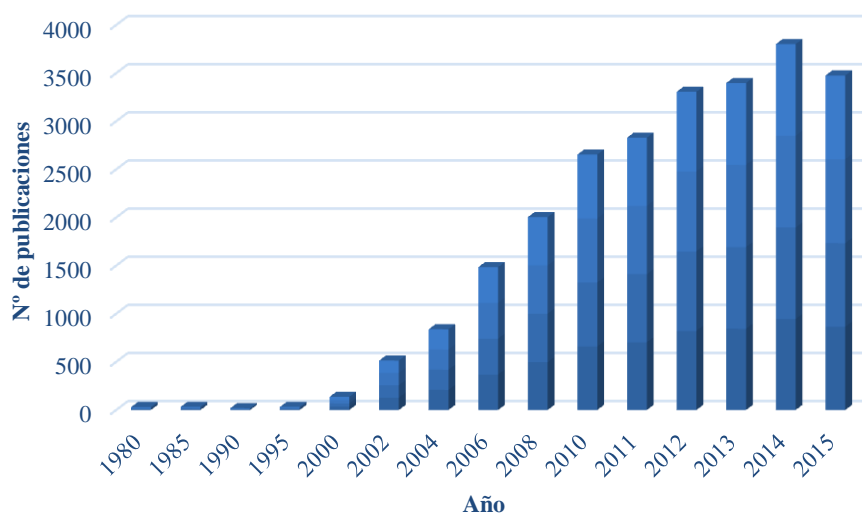


Figura 3.1. Evolución de los artículos publicados sobre líquidos iónicos a lo largo de los últimos años (ISI Web of Science, 2016) [3].

3.1.1 Historia de los líquidos iónicos

Como ya se ha comentado, los líquidos iónicos se conocen desde hace algunas décadas. Sin embargo, su uso continuado como disolventes en procesos químicos de síntesis y catálisis no había cobrado importancia hasta estos últimos años [4]. Welton [5] afirmó hace ya algunos años que los líquidos iónicos no son algo nuevo y que algunos de ellos, como el $[\text{EtNH}_3^+][\text{NO}_3^-]$ habían sido descritos por primera vez ya en el año 1914 [6]. No obstante, no fue hasta los años 70 cuando se sintetizó de forma intencionada el primer líquido iónico del que han aparecido las primeras referencias bibliográficas para su uso en baterías de misiles nucleares [7]. Wilkes [7] estaba intentando diseñar mejores baterías para misiles nucleares y sondas espaciales las cuales requerían sales fundidas para operar. Sin embargo, el problema surgió debido a que era necesario que las sales fundidas trabajasen a una temperatura muy elevada y, de este modo, dañaban los materiales circundantes. Por tanto, se empezaron a buscar sales que permanecieran en

estado líquido a temperaturas más bajas y finalmente se identificó una que era líquida a temperatura ambiente. A partir de este momento, Wilkes y sus colaboradores continuaron mejorando sus líquidos iónicos para su uso como electrolitos en baterías y una pequeña comunidad de investigadores empezó a sintetizar líquidos iónicos y a medir sus propiedades [8, 9]. De este modo, a finales de los años 90, los líquidos iónicos se convirtieron en uno de los compuestos químicos más prometedores para su uso como disolventes. Los primeros líquidos iónicos, que eran del tipo de los organoaluminatos, tenían un rango de aplicaciones limitado debido a su inestabilidad en aire y agua. Además, dichos líquidos iónicos no eran inertes a algunos compuestos orgánicos [10]. Sin embargo, después de las primeras referencias sobre la síntesis y las aplicaciones de líquidos iónicos estables como el tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ y el hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, el número de líquidos iónicos estables en aire y agua ha aumentado sustancialmente [10].

3.1.2 Definición de líquido iónico

Los líquidos iónicos son sales fundidas que son líquidas a temperatura ambiente. Estos compuestos están formados por iones cargados positiva y negativamente mientras que el agua y otros compuestos orgánicos, como el tolueno y el diclorometano, están formados por moléculas. La estructura de los líquidos iónicos es similar a la de la sal común, conocida como cloruro sódico, la cual posee cristales formados por cationes de sodio y aniones de cloruro. Sin embargo, mientras que las sales no funden a temperaturas por debajo de los 800°C , la mayoría de los líquidos iónicos son líquidos a temperatura ambiente. A modo de ejemplo, los puntos de fusión del cloruro de sodio y del cloruro de litio son 801 y 614°C , respectivamente. Debido a que estas sales convencionales presentan elevados puntos de fusión, se ha visto limitado su uso como disolventes en ciertas aplicaciones. Sin embargo, los líquidos iónicos generalmente son líquidos a temperaturas por encima de los 200°C [4].

La causa de que los líquidos iónicos sean líquidos a temperatura ambiente es que sus iones no presentan un empaquetamiento eficaz [11]. La combinación de cationes voluminosos y asimétricos y aniones uniformes da lugar a una estructura regular en fase líquida. Los bajos puntos de fusión de los líquidos iónicos son el resultado de su composición química ya que dicha combinación entre un catión orgánico asimétrico y voluminoso con un anión inorgánico más pequeño genera una energía reticular inferior a la de las sales comunes y, por tanto, el punto de fusión también será más bajo. En algunos casos, incluso los aniones son relativamente grandes y contribuyen también a disminuir el punto de fusión [12].

En la **Figura 3.2** [13] se presenta un líquido iónico, $[\text{C}_{14}\text{-mim}^+][\text{PF}_6^-]$, cuyo radical presenta una gran longitud. La red cristalina a partir de iones tan distintos como el $[\text{C}_{14}\text{-mim}^+]$ y el $[\text{PF}_6^-]$ se realiza con una disposición como la mostrada en la **Figura 3.3**, [13]. La estructura del cristal responde a una ordenación de las moléculas en capas debido a la separación que implica la cadena alquílica. Esta estructura puede destruirse fácilmente, por exposición a temperatura ambiente, dando lugar a un líquido formado por sus iones [14].

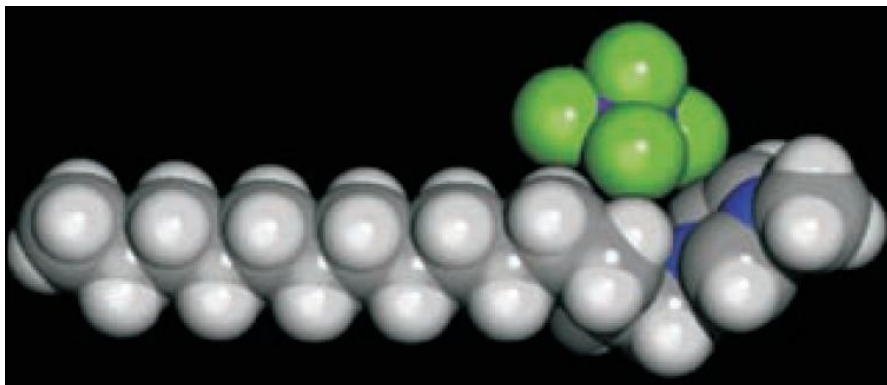


Figura 3.2. Estructura de una molécula de $[\text{C}_{14}\text{-mim}^+][\text{PF}_6^-]$ [13].

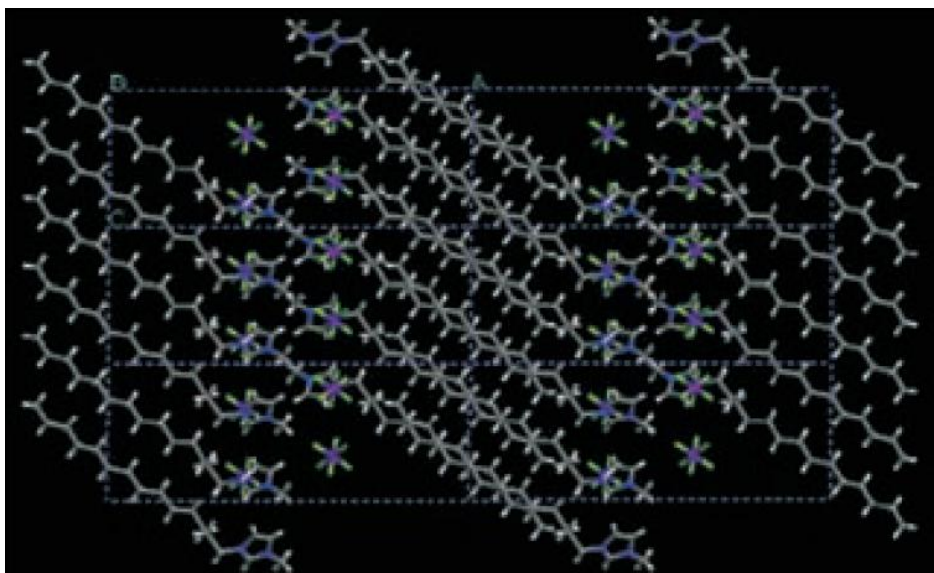


Figura 3.3. Empaquetamiento de los iones $[\text{C}_{14}\text{-mim}^+][\text{PF}_6^-]$ en la red cristalina [13].

De forma general, los líquidos iónicos están compuestos por un catión orgánico siendo los más comunes los de tetraalquilamonio, tetraalquilfosfonio, N-alquilpiridina y N,N'-dialquilimidazolio y un anión poliatómico entre los que destacan el hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, triflimida, trifluoroacetato y triflato (**Figura 3.4**).

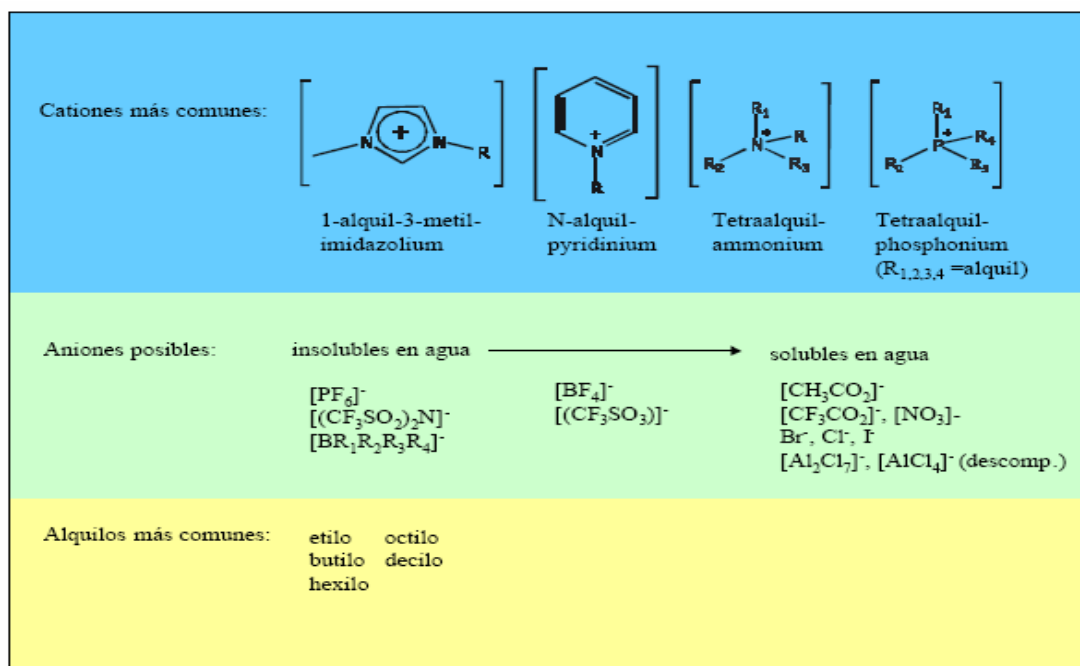


Figura 3.4. Principales cationes y aniones presentes en los líquidos iónicos [15].

Probablemente la característica más relevante de los líquidos iónicos es que poseen propiedades modulables realizando la selección adecuada del anión, catión y sustituyentes [2]. A modo de ejemplo, la solubilidad en agua de un líquido iónico puede controlarse por la naturaleza del grupo alquílico del catión (R) de forma que al aumentar la longitud de la cadena alquílica tiende a disminuir la solubilidad en agua al aumentar la hidrofobicidad del catión. Además, algunas propiedades físicas y químicas pueden variar enormemente dependiendo del anión presente en la estructura. Por ejemplo, Seddon *et al.* [16] propusieron algunas reglas generales sobre la influencia del anión en la miscibilidad de los líquidos iónicos en agua. Indicaron que las sales de imidazolio con aniones de tipo haluros, acetato, nitrato y trifluoroacetato son totalmente miscibles en agua, con aniones hexafluorofosfato y bis(trifluorometilsulfonil)imida son totalmente inmiscibles y que con tetrafluoroborato y triflato pueden ser miscibles o inmiscibles dependiendo de los sustituyentes del catión. Por este motivo, a los líquidos iónicos se les conoce como “disolventes de diseño”.

3.1.3 Síntesis de los líquidos iónicos

La síntesis de líquidos iónicos consta de dos etapas fundamentales, la formación del catión deseado y el intercambio del anión. A modo de ejemplo, en la **Figura 3.5** se refleja el proceso que se seguiriría para sintetizar una sal de amonio.

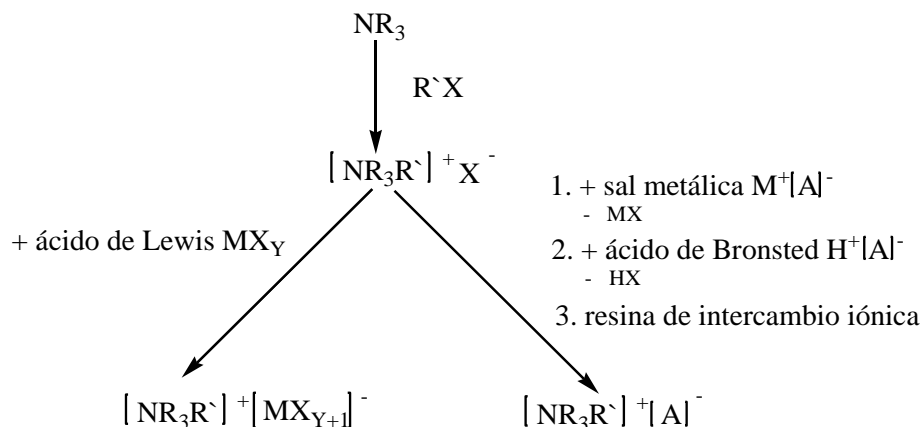


Figura 3.5. Síntesis general de líquidos iónicos [17].

Sólo en algunas síntesis es necesaria la primera etapa, como es el caso de la formación del nitrato de etilamonio. En muchos casos el catión está disponible comercialmente a un coste razonable, presentándose en la forma de sal de haluro, así lo único que se requiere para formar el líquido iónico es el intercambio del anión.

Aunque, al principio las sales de 1-alkilpiridinio fueron las más utilizadas, posteriormente fueron sustituidas por sales basadas en el catión imidazolio, de menor punto de fusión y por otros tipos de cationes, tales como los que se presentan en la **Figura 3.6**.

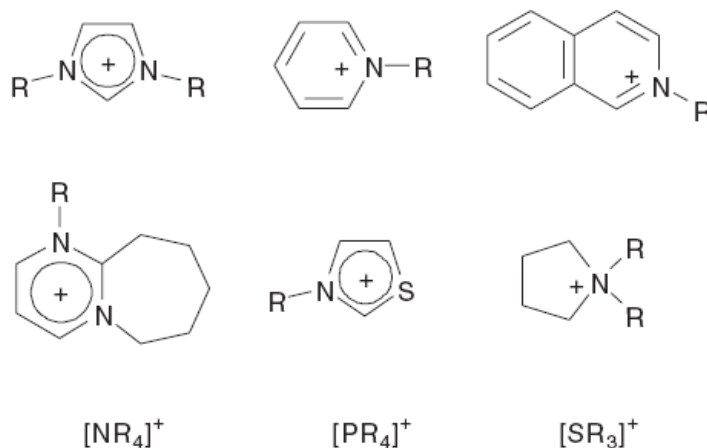


Figura 3.6. Ejemplos de cationes usados para la síntesis de líquidos iónicos.

La síntesis de **líquidos iónicos inmiscibles con agua** es más simple que sus semejantes solubles en agua. La solubilidad en agua de los ILs es función de la composición del anión y del catión constituyentes, y, en general, disminuye cuando aumenta el carácter orgánico del catión. El procedimiento más habitual para llevar a cabo la síntesis de líquidos iónicos hidrofóbicos requiere una primera etapa en la que se disuelve en agua una sal de haluro del catión y, a continuación, se le adiciona el anión, en forma de sal alcalina o de amonio, para que tenga lugar la reacción de intercambio aniónico. Otros métodos para preparar líquidos iónicos inmiscibles con agua implican la utilización de

sales de plata [18] o de plomo [19], aunque estos procedimientos de síntesis no son adecuados para la producción de líquidos iónicos a escala industrial. Si en la síntesis se usa una forma ácida del anión, el equilibrio se desplaza en sentido favorable si se elimina HCl, HBr, o HI que se forman en el transcurso de la reacción y que se podría separar del medio lavando con agua, en este caso el lavado debe de ser exhaustivo, ya que los restos de ácido podrían descomponer el líquido iónico. Este tipo de reacciones de metátesis, que suelen ser exotérmicas, se suelen realizar enfriando el medio, por ejemplo, con un baño de hielo. A veces, se sustituye la forma ácida del anión por una sal alcalina o de amonio. Los líquidos iónicos que contienen $[\text{PF}_6^-]$ pueden dar lugar a la formación de HF, lo cual puede suponer un problema para algunas aplicaciones.

Si se utiliza una sal de un metal alcalino o de amonio, se recomienda realizar un análisis de las aguas procedentes del lavado para comprobar si se encuentran presentes aniones haluro. El análisis puede realizarse, por ejemplo, valorando con nitrato de plata. Un problema que presentan los líquidos iónicos para conseguir un grado de pureza elevado es su elevada viscosidad, por lo que algunos autores recomiendan que se disuelvan en algún disolvente, por ejemplo CH_2Cl_2 o CHCl_3 , para reducir su viscosidad. La disolución en un disolvente orgánico permite también el almacenamiento en un desecador con un compuesto desecante para reducir también el contenido en agua antes de eliminar el disolvente orgánico. Este tipo de procedimientos se han usado para sintetizar líquidos iónicos basados en aniones $[\text{PF}_6^-]$ y $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-]$ [20, 21].

La síntesis de *líquidos iónicos miscibles con agua* es más compleja debida a la etapa de purificación. Se puede usar para preparar líquidos iónicos con un elevado grado de pureza un procedimiento similar al descrito utilizando sales de plata, pero el coste es muy elevado y difícil de escalar. El método sintético más habitual consiste en realizar un intercambio en disolución acuosa de la forma ácida del anión, la sal de amonio o la sal de un metal alcalino, pero hay que tener la precaución de aislar el líquido iónico sin que contenga haluros que aparecen como subproductos. Lancaster *et al.* [22] han propuesto un procedimiento de síntesis para la obtención de $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$, que podría ser también utilizada con modificaciones a otros líquidos iónicos miscibles con agua. Consiste en una reacción de metátesis entre $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$ y HBF_4 en disolución acuosa y extracción con que se elimina por evaporación en rotavapor. A veces, se utiliza carbón activo para conseguir un líquido iónico con mayor grado de pureza y se somete a filtrado en un lecho de alúmina ácida o neutra. Finalmente, se realiza un secado calentando. Esta síntesis se ha realizado a escala comercial, consiguiendo rendimientos superiores al 70%.

También se pueden llevar a cabo reacciones de metátesis en CH_2Cl_2 [23] u otro disolvente orgánico como acetona [24]. En ambos casos, el sistema de reacción es bifásico, ya que los componentes no son totalmente solubles y hay que trabajar con una suspensión. Mediante este proceso se obtienen rendimientos que varían entre un 70 y 80 % y se puede adaptar para sintetizar líquidos iónicos que con aniones tan variados como $[\text{PF}_6^-]$, $[\text{SbF}_6^-]$, $[\text{BF}_4^-]$, $[\text{ClO}_4^-]$, $[\text{CF}_3\text{SO}_3^-]$, $[\text{NO}_3^-]$ y $[\text{CF}_3\text{CO}_2^-]$.

Wasserscheid y Keim [17] han propuesto un procedimiento para sintetizar líquidos iónicos muy puros usando resinas de intercambio iónico. Lall *et al.* [25] también han usado un procedimiento similar para obtener líquidos iónicos basados en aniones fosfato con cationes de poliamonio [26].

3.1.4 Propiedades físicas y químicas de los líquidos iónicos

A la hora de seleccionar un disolvente para llevar a cabo una reacción o una operación de extracción es importante tener en cuenta una serie de factores como son el intervalo de la temperatura de operación, la solubilidad de reactantes, catalizadores y productos de reacción y el comportamiento ambiental. Además, es interesante prestar especial atención a otros aspectos relacionados con la escalación del proceso a la industria como son la seguridad, la pureza necesaria y los costes de inversión y de operación. Las posibilidades que tienen los líquidos iónicos como disolventes alternativos a los disolventes moleculares dependen de las ventajas que aporten para esta finalidad [14].

Probablemente la propiedad más importante de los líquidos iónicos es su baja presión de vapor a presiones y temperaturas moderadas. Al presentar una volatilidad prácticamente despreciable, se les considera disolventes no volátiles. Por lo tanto, propiedades tan importantes en disolventes orgánicos como la presión de vapor, el punto de ebullición, la presión crítica o el calor de vaporización, no son tenidas en cuenta para los líquidos iónicos por lo que no es necesario realizar su determinación. Un segundo grupo de propiedades de los disolventes, tensión superficial, calor específico, conductividad térmica, etc, tienen interés para realizar el cambio de escala desde un equipo a escala de laboratorio a un equipo comercial, por lo que conocer sus valores se requiere solo cuando se quiere abordar un proceso a escala industrial.

Otras propiedades que hacen que los líquidos iónicos sean disolventes muy interesantes como alternativa a los disolventes orgánicos tradicionales son su estabilidad térmica y química entre otras que se citarán más adelante. Sin embargo, la característica que les hace realmente atractivos es la gran posibilidad de combinaciones de aniones y cationes que se pueden realizar, modificando sus propiedades físicas y químicas por lo que se puede diseñar el líquido iónico más adecuado para cada operación concreta. [27, 28].

A continuación, se muestran las propiedades más importantes de los líquidos iónicos en relación a su estructura y su composición.

- **Presión de vapor**

A diferencia de las sales fundidas, las cuales forman pares iónicos en la fase vapor, en los líquidos iónicos la débil interacción coulombica entre iones limita la formación de pares iónicos que son necesarios para que se produzca la volatilización de las sales, por lo que estas sustancias tienen presión de vapor muy baja o indetectable [26].

Bier and Dietrich [29] sostienen que las presiones de vapor tan extremadamente bajas que presentan los líquidos iónicos son debidas a la combinación de su fuerte carácter iónico y su baja temperatura de fusión. La **Figura 3.7** muestra las presiones de vapor experimentales $p_{sat}(T)$ para la coexistencia de líquido-vapor a temperatura T para el benceno, líquido no polar, para el H_2O [30], para los líquidos iónicos [bmim⁺] [dca⁻], [emim⁺] [NTf₂⁻] y [omim⁺] [NTf₂⁻] [31, 32], así como para cloruro de cadmio fundido (CdCl₂) y cloruro de sodio (NaCl) como representantes de EFI [33].

Esta característica los hace fácilmente manejables al no evaporarse y permite la utilización de la destilación para recuperar los productos o sustratos disueltos en ellos

durante los procesos donde sean usados, ya sean catálisis, extracciones líquido-líquido, etc.

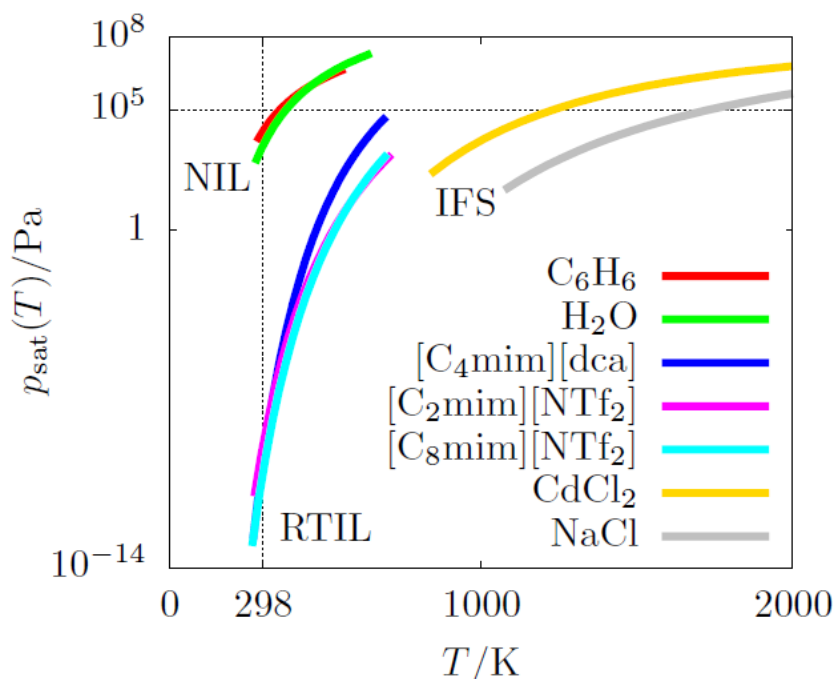


Figura 3.7. Presiones de vapor experimentales $p_{\text{sat}}(T)$ para la coexistencia de líquido-vapor a temperatura T para líquidos no iónicos (NILs), líquidos iónicos a temperatura ambiente (RTILs), y sales fundidas inorgánicas (EFI) como función de la temperatura T . Se muestran los datos para el benceno, líquido no polar, para el H_2O [30], para los líquidos iónicos $[\text{bmim}^+][\text{dca}]$, $[\text{emim}^+][\text{NTf}_2]$ y $[\text{omim}^+][\text{NTf}_2]$ [31, 32], así como para cloruro de cadmio fundido (CdCl_2) y cloruro de sodio (NaCl) como representantes de EFI [33].

- **Estabilidad térmica**

Esta propiedad de los líquidos iónicos resulta muy interesante ya que establece el límite superior del intervalo de temperatura en el que pueden utilizarse antes de descomponerse. La mayoría de los líquidos iónicos que se conocen son tan estables que este límite superior de temperatura no supone ningún problema para su uso como medio de reacción y de extracción. En general, la temperatura a la que tiene lugar una reacción química para optimizar sus resultados es bastante inferior a la temperatura a la que se inicia el proceso de descomposición del líquido iónico. La estabilidad térmica se define como la temperatura a la que se inicia el cambio en la curva de análisis termogravimétrico (TGA). Este criterio tiene la ventaja de ser reproducible y de sencilla determinación pero con su aplicación no se garantiza que la descomposición del líquido iónico sea despreciable. Los experimentos gravimétricos isoterms aportan unos resultados más fiables para asegurar la estabilidad térmica, requisito imprescindible para operar a temperaturas próximas al límite medido por TGA [14].

Como ya se ha mencionado con anterioridad, los líquidos iónicos se encuentran en estado líquido en un intervalo de temperaturas más amplio que el de los disolventes moleculares convencionales encontrándose el límite superior de temperatura, determinado por la temperatura de descomposición térmica del mismo, entre 350 y

3. Antecedentes

400°C. La temperatura de descomposición depende de la naturaleza de los iones, catión y anión, que conforman el líquido iónico. Así, la temperatura de descomposición es menor en el caso de sales de tetralquilamonio que en aquellas basadas en catión imidazolio; como ejemplos de estos últimos se exponen los casos del $[\text{emim}^+][\text{BF}_4^-]$ que es estable hasta los 300°C y el $[\text{emim}^+][(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-]$ hasta los 400°C [20]. Para las sales basadas en cationes $[\text{Rmim}^+]$ la estabilidad para los diferentes líquidos iónicos disminuye en la serie $[\text{NTf}_2^-] > [\text{BF}_4^-] > [\text{PF}_6^-]$ y $[\text{AsF}_6^-] > [\text{I}^-], [\text{Br}^-]$ y $[\text{Cl}^-]$ (**Figura 3.8**). Así, los líquidos iónicos que contienen aniones más débilmente coordinados son más estables a la descomposición a altas temperaturas [20, 34-37].

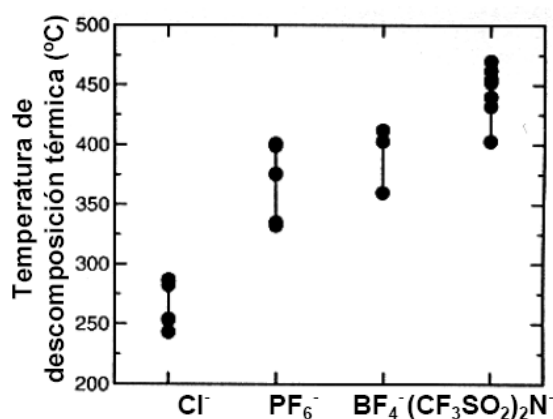


Figura 3.8. Rangos de la temperatura de descomposición.

La **Figura 3.9** muestra las curvas TGA para $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$, $[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{CH}_3\text{SO}_3^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$. Los líquidos iónicos fueron calentados hasta 700°C durante 5 minutos en atmósfera de aire [38].

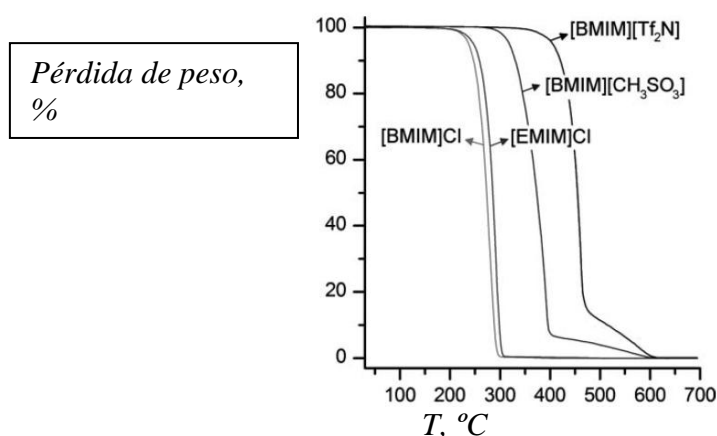


Figura 3.9. Curvas TGA para $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$, $[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{CH}_3\text{SO}_3^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$. Los líquidos iónicos fueron calentados hasta 700°C durante 5 minutos en atmósfera de aire [38].

- **Estabilidad química**

Los líquidos iónicos se han usado mayoritariamente solo como disolventes debido a su carácter inerte, sin embargo, actualmente son muchas las publicaciones que han revelado que muchos catalizadores y reactivos pueden actuar en una fase de líquido iónico, aumentando su reactividad y selectividad en diversas reacciones químicas. Sin embargo, no se deben ignorar los datos de estabilidad química y las interacciones intermoleculares o incluso las reacciones orgánicas que pueden tener lugar en líquidos iónicos. Resulta evidente del creciente número de ejemplos sobre el uso de líquidos iónicos como disolventes, catalizadores y reactivos en síntesis orgánica, que no son totalmente inertes bajo muchas condiciones de reacción. Mientras que, en algunos casos, su reactividad inesperada ha resultado fortuitamente ventajosa, en otros casos ha sido un problema, por lo que es imprescindible que, al seleccionar un líquido iónico para una aplicación particular, se preste atención a su compatibilidad con las condiciones de reacción. Aunque se conocen más de 300 líquidos iónicos a temperatura ambiente, sólo en unos pocos casos se ha comentado sus efectos sobre los mecanismos de reacción o la relación velocidad/estabilidad. Sowmiah *et al.* [39] ofrecen una revisión centrada en la naturaleza de varios líquidos iónicos, haciendo énfasis en los aspectos mecanísticos de algunas reacciones orgánicas así como la capacidad de los líquidos iónicos para promover el rendimiento y la selectividad de las reacciones en las que intervienen.

Por otra parte, los líquidos iónicos son compuestos no inflamables [40]. Su naturaleza no inflamable hace que disminuya considerablemente el riesgo de fuegos e incendios que presentan los disolventes orgánicos utilizados en la industria. Químicamente son bastante inertes [41], aunque algunos sufren modificaciones en su estructura o en su comportamiento frente al agua por lo que deben emplearse en ambientes secos, pero otros son hidrofóbicos y pueden emplearse en atmósferas húmedas, por ejemplo, los líquidos iónicos basados en cloro-aluminatos son muy sensibles a la humedad y, por tanto, necesitan ser protegidos de ella escrupulosamente y de otras impurezas de óxido. Además, muchos complejos de metales de transición y sustratos orgánicos no son inertes a los cloro-aluminatos, pudiendo reaccionar con ellos. También estas sales reaccionan de manera muy exotérmica con el agua, produciendo HCl y un precipitado blanco, que se redissuelve por agitación [42].

- **Punto de fusión**

El punto de fusión establece el límite inferior del intervalo de temperatura en el que puede utilizarse el líquido iónico como disolvente. Se puede disponer de líquidos iónicos en un intervalo cercano a los 300°C ya que la temperatura de fusión en este tipo de compuestos varía desde -90°C hasta 200°C. En general, los líquidos iónicos tienen un bajo punto de fusión, normalmente por debajo de la temperatura ambiente. El punto de fusión va a depender sustancialmente del tamaño del líquido iónico, de su carga y de la distribución de la misma. La tendencia que siguen es que al aumentar el tamaño del anión y del catión disminuye el punto de fusión. Del mismo modo, cuanto mayor simetría presentan los iones, más aumenta el punto de fusión ya que permite un mayor empaquetamiento de los iones. En el caso de cationes imidazolio con sustituyentes alquilo, al aumentar la longitud de cadena del mismo tiene lugar una disminución en el punto de fusión por cuestiones de empaquetamiento alcanzando un mínimo sobre los 6-

3. Antecedentes

8 átomos de carbono, donde la tendencia se invierte ya que las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas sustituyentes se hacen más intensas. En relación a la dependencia del punto de fusión con la carga se puede decir, de forma general, que la existencia de puentes de hidrógeno y la deslocalización de carga conducen a un aumento del punto de fusión.

En la **Tabla 3.1** se muestran los valores del punto de fusión de líquidos iónicos presentes en la bibliografía.

Tabla 3.1.
Efecto de la naturaleza del líquido iónico en las propiedades fisicoquímicas del mismo [26].

Líquido Iónico	Punto fusión (°C)	Densidad (g/cm ³)	Viscosidad (20° C) (cP)	Conductividad (S/m)	pH	Temperatura de descomposición (>°C)
[bmim ⁺][Cl ⁻]	65 ^a	1.10 ^a	-	-	-	-
[bmim ⁺][CF ₃ COO ⁻]	-40 ^a	1.21 ^a	73 ^a	0.32 ^a	-	-
[bmim ⁺][CF ₃ SO ₃ ⁻]	16 ^a	1.29 ^a	90 ^a	0.37 ^a	-	200 ^b
[emim ⁺][BF ₄ ⁻]	15 ^c	1.279 ^d (25°C)	32 ^d (25°C)	1.4 ^d (25°C)	-	-
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	-82 ^a	1.17 ^a	233 ^a	0.17 ^a	-	300 ^b
[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	-82 ^b	1.14 ^b (20 °C)	-	-	-	-
[bdmim ⁺][BF ₄ ⁻]	38 ^b	1.20 ^b	-	-	-	200 ^b
[emim ⁺][PF ₆ ⁻]	62 ^e	-	-	0.52 ^f (26°C)	-	-
[bdmim ⁺][PF ₆ ⁻]	-	1.20 ^g	-	-	3 ^b (20°C)	-
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	15 ^g	1.3650 ^g (20 °C)	195.9 ^g (25 °C) - 385 ^b	0.134 ^g	5.77 ^g	300 ^b
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	-80 ^g	1.2965 ^g (20 °C)	712 ^b (20 °C) - 3477 ^g (25°C)	-	5.91 ^a	-
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	-82 ^g	1.23 ^g (20°C)	3600 ^g (25°C) - 1007.9 ^b (20 °C)	0.0237 ^g	5.73 ^g	270 ^b
[emim ⁺][(CF ₃ SO ₂) ₂ N ⁻]	-3 ^h	1.518 ^t (25°C)	3 ⁱ (25°C)	0.57 ⁱ (25°C)	-	-
[bmim ⁺][(CF ₃ SO ₂) ₂ N ⁻]	-4 ^h	1.43 ^a	52 ^a	0.39 ^a	-	-
[hmim ⁺][(CF ₃ SO ₂) ₂ N ⁻]	-50 ^b	1.38 ^b (20 °C)	89.1 ^b (20 °C)	-	6 ^b (20°C)	300 ^b
[omim ⁺][(CF ₃ SO ₂) ₂ N ⁻]	-	1.33 ^b (20 °C)	120.8 ^b (20 °C)	-	-	-

^aM. Koel [43]; ^b<http://www.merck.com> [44]; ^cHolbrey and Seddon [34]; ^dNoda *et al.* [45]; ^eFuller *et al.* [46]; ^fMcEwen *et al.* [47]; ^g<http://www.solvent-innovation.com/> [48]; ^hBonhôte *et al.* [20]; ⁱNoda and Watanabe [49].

• Densidad e Índice de Refracción

Los líquidos iónicos tienen una densidad superior a la del agua. Es importante destacar que la densidad es la propiedad física menos sensible a la variación de la temperatura. Además, la presencia de impurezas tiene mucha menos influencia en los valores de esta propiedad que en la viscosidad. Para un catión determinado, la densidad para los distintos aniones sigue la siguiente tendencia: [CH₃SO₃⁻] ≈ [BF₄⁻] < [CF₃CO₂⁻] < [CF₃SO₃⁻] < [C₃F₇CO₂⁻] < [(CF₃SO₂)₂N⁻]. Para el caso de los cationes, la densidad disminuye con el aumento de la longitud de la cadena de manera sistemática. Se ha encontrado que la densidad de líquidos iónicos que aparecen en la bibliografía muestra variaciones considerables entre autores [50-53]. Sin embargo, los valores más recientes

son más precisos, pero todavía difieren en mayor medida que los obtenidos para otros disolventes moleculares habituales. En la **Tabla 3.1** se muestran los valores de densidad obtenidos por diversos autores.

Entre las diversas propiedades fisicoquímicas de los líquidos iónicos, la densidad ha sido probablemente la más ampliamente estudiada [54-58], mientras que el índice de refracción ha recibido mucha menor atención [59-61]. Estas dos propiedades se aportan con frecuencia para no electrolitos como pruebas de la pureza de las muestras [62]. Sin embargo, existen pocos estudios de estas dos propiedades conjuntamente, especialmente para líquidos iónicos.

Pereiro *et al.* [63] en 2007 utilizaron el método Paracor para predecir densidades, índices de refracción y tensión superficial de líquidos iónicos puros basados en el catión 1-*n*-alquil-3-metilimidazolio y en el anión hexafluorofosfato [PF₆⁻].

Posteriormente, Soriano *et al.* [64, 65] obtuvieron correlaciones entre la densidad y el índice de refracción de sistemas de líquidos iónicos puros. Con el fin de establecer dicha relación, se midieron la densidad y el índice de refracción de cuatro líquidos iónicos basados en 1-*n*-butil-3-metilimidazolio a presión atmosférica y temperaturas hasta 353.2 K. Las densidades y los índices de refracción de los líquidos iónicos puros investigados se obtuvieron en función de temperatura. Se establecieron ecuaciones de correlación basadas en la teoría de contribución de grupos modificadas para calcular la densidad en función de temperatura. También se establecieron ecuaciones empíricas para estudiar la dependencia de la densidad y del índice de refracción con la temperatura. Las ecuaciones de Lorentz-Lorenz, Dale-Gladstone, Eykman, Oster, Arago-Biot y Newton, así como un Eykman modificado se utilizaron para correlacionar a la relación entre los índices de refracción y densidades medidas, con resultados satisfactorios.

También se encuentra en la bibliografía un estudio sistemático [66] de las densidades y los índices de refracción de 17 líquidos iónicos a cuatro diferentes temperaturas que van de 293 K a 333 K. Los líquidos iónicos se agrupan en cuatro familias: bis 1-*n*-alquil-3-metilimidazolio bis (trifluorometilsulfonil)imida, [C_{*n*}mim⁺] [NTf₂⁻] (con *n* = 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14); 1-*n*-alquil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato, [C_{*n*}mim⁺] [PF₆⁻] (con *n* = 4, 6, 8); fosfonio trihexil (tetradecil), [Ph₆ 6 14], combinado con bis (trifluorometilsulfonil)imida [NTf₂⁻], con acetato, [Ac⁻] y triflato, [TfO⁻]; y [bmim⁺] combinados con los aniones [Ac⁻], [TfO⁻], metilsulfato [MeSO₄⁻] y tetrafluoroborato [BF₄⁻]. Los datos obtenidos fueron analizados para determinar el efecto de la temperatura, la longitud de la cadena alquílica de los cationes 1-*n*-alquil-3-metilimidazolio y la naturaleza de los aniones. Se ensayaron modelos empíricos para el cálculo de las densidades e índices de refracción de los líquidos iónicos y los resultados se discutieron con el objetivo de comprobar su utilidad en la obtención de conocimientos sobre las fuerzas intermoleculares y el comportamiento en solución de los diferentes líquidos iónicos.

El grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente tesis publicó en 2015 un estudio exhaustivo de la densidad y el índice de refracción de 15 líquidos iónicos basados en cationes imidazolio combinados con aniones [BF₄⁻], [NTf₂⁻], [TfO⁻], etilsulfato [EtSO₄⁻], hexafluorofosfato [PF₆⁻] y octilsulfato [OcSO₄⁻] medidos experimentalmente entre 293.15 y 343.15K [67]. A partir de estos datos experimentales, los valores de densidad y de índice de refracción han sido correlacionados empleando

ecuaciones empíricas y, además, se ha desarrollado un modelo de predicción de la densidad de líquidos iónicos a partir del volumen molar alcanzando resultados muy satisfactorios.

- **Viscosidad**

La viscosidad, junto a la densidad, son dos propiedades de las más importantes a la hora de poder diseñar operaciones como agitación, bombeo, o incluso fenómenos de transporte de materia [68]. En general, los líquidos iónicos tienen una viscosidad mayor que la de los disolventes moleculares convencionales y está comprendida entre 10-500cP, muy superior a la del agua que, a temperatura ambiente, es de 0.890cP y, aunque son capaces de disolver fácilmente un amplio rango de compuestos, su elevada viscosidad supone un obstáculo para su futuro uso [69].

Los valores de viscosidad en los líquidos iónicos dependen de forma importante de la temperatura [70] y de las impurezas que contenga el líquido iónico [71]. Se han realizado diversos estudios en los que se ha medido la viscosidad del hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio, [72], y aunque los valores se obtienen con una variación menor del 3%, los datos entre los distintos autores pueden llegar a diferir hasta en un 30% [73]. Esta disparidad de resultados parece que se debe en gran medida al contenido de impurezas, ya que se ha comprobado que la presencia de agua y disolventes orgánicos disminuye la viscosidad, mientras que los cloruros la aumentan. Sin embargo, el agua es considerada la impureza más importante, sobre todo en el caso de líquidos iónicos hidrofílicos [73], disminuyendo rápidamente la viscosidad con el aumento en el contenido de agua. En general, el efecto de la impureza sobre la viscosidad es mayor cuanto mayor es la constante dieléctrica de la misma.

Para el mismo catión, el cambio del anión afecta de manera muy importante a la viscosidad, disminuyendo su valor en la serie $[Cl^-] > [PF_6^-] > [BF_4^-] \approx [NO_3^-] > [NTf_2^-]$. En estos casos, los parámetros determinantes de la viscosidad son el tamaño del anión y su carácter básico. Así, la disminución en el tamaño del anión disminuye las interacciones de tipo van der Waals, incrementando la interacción electrostática a través de puentes de hidrógeno. Los valores de viscosidad en los líquidos iónicos también se ven afectados por la naturaleza del catión orgánico. Esta tendencia no está correlacionada con el tamaño del anión, ya que le afectan otros fenómenos como el establecimiento de puentes de hidrógeno con el catión. Aunque la influencia del catión en la viscosidad es menor, se ha observado que un aumento en la longitud de cadena del sustituyente alquílico del catión imidazolio supone un aumento en los valores de viscosidad, pudiendo ser ésta disminuida por el uso de cadenas muy ramificadas [74]. También se ha observado que la metilación en la posición C2 del catión imidazolio produce mayor incremento en la viscosidad que si se produce en la posición C4. Este hecho se explica sobre la base de un descenso de la entropía del sistema debido a las restricciones en las interacciones iónicas [75].

En la **Tabla 3.1** se muestran los valores de viscosidad obtenidos por diversos autores.

El conocimiento de las relaciones entre estructura y propiedades físicas es importante para poder determinar la idoneidad de un líquido iónico para una aplicación específica, así como para diseñar nuevos líquidos iónicos [76].

- **Propiedades electroquímicas**

Los líquidos iónicos, al estar compuestos por iones, tienen buena conductividad eléctrica, como cabe esperar. Sin embargo, poseen una conductividad menor que las disoluciones acuosas concentradas de electrolitos, pudiendo ser el gran tamaño de los iones la causa de esta diferencia, al limitar la movilidad de las cargas. No obstante, los líquidos iónicos poseen una serie de propiedades que los hacen ser disolventes adecuados en procesos electroquímicos, tales como gran estabilidad a la oxidación/reducción, resistiendo un amplio rango de potenciales y relativamente buena conductividad eléctrica. Además, permanecen en estado líquido en un amplio intervalo de temperaturas, como ya se ha comentado y son capaces de solvatar una gran variedad de especies inorgánicas, orgánicas y organometálicas [43].

Como ejemplo representativo, la **Tabla 3.1** muestra los valores de conductividad entre el resto de propiedades anteriormente descritas con la variación del catión y del anión.

- **pH**

Su acidez varía de unos a otros, pudiendo encontrar líquidos iónicos ácidos, neutros o básicos.

- **Color**

Son incoloros en estado puro, aunque en ocasiones muestran ciertas tonalidades, siendo ciertas impurezas con frecuencia las responsables de las mismas.

- **Polaridad**

La polaridad de un líquido se define como la suma de todas las posibles interacciones específicas y no específicas entre el disolvente y un soluto potencial, excepto para aquellos que conducen a una reacción química. Estas interacciones incluyen fuerzas de Coulomb, dipolares, inductivas y dispersivas, enlace de puente de hidrógeno etc.

Se cree que el efecto de los disolventes sobre la reactividad química es debido a la polaridad del disolvente como una de las propiedades que más influyen en ella. Habitualmente la polaridad de una sustancia se determina mediante su constante dieléctrica cuya medida requiere que el medio sea no conductor, lo que no ocurre con los líquidos iónicos. Por ello, las medidas de polaridad en líquidos iónicos se realizan mediante estudios solvatocrómicos empleando los reactivos de Reichardt [77] y de Nile Red [78].

El reactivo de Reichardt, 2,4,6-trifenilpiridinio-N-4-(2,6-difenilfenóxido) betaína, es un colorante solvatocrómico positivo que presenta un desplazamiento de 375 nm. Puede registrar efectos derivados de la dipolaridad del disolvente, puentes de hidrógeno y de acidez de Lewis, viniendo la contribución más importante del efecto dador de puente de hidrógeno del disolvente [79]. Las medidas de polaridad basadas en el reactivo de Reichardt [80] indican que la polaridad de estos líquidos iónicos es similar a la de alcoholes de cadena corta. El valor normalizado de la polaridad de Reichardt viene determinado fundamentalmente por la naturaleza del catión. Por ejemplo, mientras

3. Antecedentes

nitratos y tiocianatos de monoalquilamonio pueden tener valores entre 0.956-1.01, las sales de tetraalquilamonio suelen tener unos valores entre 0.42-0.46.

Hace algunos años Carmichael y Seddon [78] realizaron un estudio acerca de la polaridad de líquidos iónicos basados en 1-alkil-3-metilimidazolio mediante el colorante solvatocrómico positivo de Nile Red y concluyeron que, para los líquidos iónicos cuyo catión es [bmim⁺], la polaridad decrece según la serie [NO₂⁻] > [NO₃⁻] > [BF₄⁻] > [PF₆⁻]. Esta disminución de la polaridad está relacionada con el incremento en el tamaño del anión y la consiguiente reducción de la densidad de carga efectiva.

- **Nucleofilicidad**

La nucleofilicidad de algunos líquidos iónicos ha sido medida a través de la variación de λ_{\max} del reactivo solvatocrómico [Cu(acac)(tmem)][BPh₄] (acac=acetilacetona; tmem= N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina) [80]. De las medidas encontradas en la bibliografía se deduce que el valor de λ_{\max} depende únicamente del anión. El orden de nucleofilicidad para algunos de los aniones de los líquidos iónicos es el siguiente: [PF₆⁻] < [NTf₂⁻] < [TfO⁻]. Así, mientras la carga en el anión [PF₆⁻] se encuentra más deslocalizada, la estructura cristalina de las sales de imidazolio basadas en el anión [NTf₂⁻] sugieren que en este la carga negativa está localizada a lo largo de enlace S-N-S, aumentando así el poder nucleófilo del mismo.

- **Capacidad como disolvente de los líquidos iónicos**

Los líquidos iónicos son considerados disolventes polares. Su polaridad, según las medidas solvatocrómicas, es similar a los alcoholes de cadena corta o otros disolventes apróticos polares como DMSO (dimetilsulfóxido) o DMF (dimetilformamida). Normalmente su polaridad es intermedia entre la del agua y la de los disolventes orgánicos clorados y varía dependiendo de la naturaleza del líquido iónico. Así, pueden ser utilizados en multitud de aplicaciones pues solvatan un amplio número de especies, tanto orgánicas, inorgánicas como compuestos organometálicos [20, 43, 78, 80-82].

- **Solubilidad de gases**

La solubilidad de gases, como por ejemplo H₂, CO y O₂, es generalmente buena en líquidos iónicos y los hace atractivos disolventes para hidrogenaciones catalíticas, carbonilaciones, hidroformilaciones y oxidaciones aeróbicas [83].

- **Solubilidad en disolventes orgánicos**

La solubilidad de los líquidos iónicos en los disolventes orgánicos depende de la constante dieléctrica del disolvente; cuando esta es mayor de 6, el líquido iónico suele ser miscible con el líquido iónico (excepto para el agua).

En la **Tabla 3.2** se exponen los valores de la constante dieléctrica (ϵ) para distintos disolventes junto a su capacidad de solubilizar o no el líquido iónico [bmim⁺][PF₆⁻]. La inmiscibilidad puede ser necesaria cuando se desee utilizar un sistema bifásico.

Tabla 3.2
Solubilidad del [bmim⁺][PF₆⁻] en distintos disolventes [26].

Disolvente	ϵ	[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]
Agua	80.1	Inmiscible
Carbonato de propileno	64.4	Miscible
Metanol	33.0	Miscible
Acetonitrilo	26.6	Miscible
Acetona	20.7	Miscible
Cloruro de metileno	8.93	Miscible
Tetrahidrofurano	7.58	Miscible
Tricloroetileno	3.39	Inmiscible
Disulfuro de carbono	2.64	Inmiscible
Tolueno	2.38	Inmiscible
Hexano	1.90	Inmiscible

- **Hidrofilicidad/hidrofobicidad**

Otra propiedad de los líquidos iónicos que se va a tratar con profundidad en esta tesis es el carácter hidrofílico/hidrofóbico de los líquidos iónicos el cual determina la miscibilidad de los líquidos iónicos con agua. Hasta ahora, todos los líquidos iónicos que conocemos son higroscópicos. Mientras algunos son miscibles con agua en todas las proporciones, como es el caso de [bmim⁺][Cl⁻], otros se saturan con agua, formando entonces una bicapa [84] como le ocurre a [bmim⁺][PF₆⁻] y [bmim⁺][NTf₂⁻]. El anión constituye el factor determinante para la solubilidad de los líquidos iónicos con agua debido a la fuerte interacción por puentes de hidrógeno que se produce entre este y el agua. Sin embargo, el catión tiene un efecto secundario en esta propiedad [85]. Aun así, la lipofiliidad de las sales de dialquilimidazolío, se puede incrementar mediante el aumento en la longitud de cadena de los grupos alquílicos [35, 86].

El logaritmo del coeficiente de reparto de un líquido iónico entre un disolvente orgánico, tal como octanol, y el agua ($\text{Log } K_{ow}$), se suele emplear como método de medida relativa de la hidrofobicidad de los líquidos iónicos. Concretamente, se define como el cociente o razón entre las concentraciones de una sustancia, en este caso el líquido iónico, en una mezcla bifásica formada por dos disolventes inmiscibles en equilibrio: *n*-octanol y agua. Ese coeficiente mide, pues, la solubilidad diferencial de un soluto en esos dos disolventes. Se ha elegido el *n*-octanol por ser un compuesto orgánico que simula bien el material lipídico de la biota, o en partículas y sedimentos. Este coeficiente constituye, como ya se ha indicado, un método para determinar el carácter hidrófobo de una sustancia o la afinidad hacia los lípidos de una sustancia disuelta en agua. Como se indicará más adelante también es un coeficiente que se utiliza para establecer la toxicidad o peligrosidad de una sustancia, ya que puede relacionarse con parámetros como la ecotoxicidad y la bioacumulación.

Este tipo de medidas puede también resultar muy interesante de cara a la utilización de líquidos iónicos como medios de reacción en síntesis enzimática. Así, Laane *et al.* [87] pusieron de manifiesto la presencia de actividad enzimática en disolventes con un $\text{Log } K_{ow}$ superior a 4. En la **Tabla 3.3** se muestra el $\text{Log } K_{ow}$ de distintos líquidos iónicos y disolventes orgánicos.

Tabla 3.3.

Valor del Log K_{ow} de distintos líquidos iónicos y disolventes orgánicos [26].

Disolvente	Log K_{ow}
Hexano	3.5 ^a
[omim ⁺][(CF ₃ SO ₂) ₂ N ⁻]	0.80 -1.05 ^b
[hmim ⁺][(CF ₃ SO ₂) ₂ N ⁻]	0.15 - 0.22 ^b
[bmim ⁺][(CF ₃ SO ₂) ₂ N ⁻]	(-0.21) -(-0.96) ^b
Acetonitrilo	-0.33 ^a
[emim ⁺][(CF ₃ SO ₂) ₂ N ⁻]	(-1.05) -(-0.96) ^b
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	-1.66±0.03 ^b - 2.39±0.27 ^c
[bmim ⁺][Cl ⁻]	-2.40±0.07 ^b
[bmim ⁺][NO ₃ ⁻]	-2.42±0.02 ^b -2.90±0.01 ^d
[bmim ⁺][Br ⁻]	-2.48 ±0.13 ^b
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	-2.52±0.06 ^b
[bmim ⁺][CH ₃ COO ⁻]	-2.77±0.11 ^c

^aLaane *et al.* [87]; ^bRopel *et al.* [88]; ^cKaar *et al.* [89]; ^dVisser *et al.* [90].

Según la propuesta de Laane *et al.* [87] ninguno de los líquidos iónicos que se presentan en la **Tabla 3.3** sería adecuado como disolvente en reacciones biocatalíticas. Actualmente se ha comprobado que esto no es cierto, ya que algunos de estos líquidos iónicos se han empleado como disolventes en biotransformaciones obteniendo excelentes resultados. Sin embargo, si bien el valor de Log K_{ow} de cada uno de los líquidos iónicos no es muy fiable a la hora de establecer qué medio de reacción es mejor que otro, sí se ha observado que, en general, cuanto más hidrofóbico es un líquido iónico más adecuado es como disolvente en reacciones biocatalíticas.

El grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente tesis ha realizado un estudio sistemático del coeficiente de reparto octanol-agua de 24 líquidos iónicos a partir de su determinación experimental con tres métodos distintos. Los resultados obtenidos han sido analizados en función del anión y de la longitud de la cadena alquílica del catión entre otros parámetros [91].

- **Toxicidad**

Las bajas presiones de vapor de los líquidos iónicos hacen que las medidas de su toxicidad química en el aire sean irrelevantes. Las medidas de ecotoxicidad (EC_{50} , LD_{50}) son adecuadas para conocer su efecto cuando se ingieren por la boca o por la piel. Esta medida de la toxicidad pone de manifiesto que hay grandes diferencias entre los distintos líquidos iónicos y que sus valores son similares a los obtenidos con disolventes convencionales.

Este es el principal inconveniente que presentan los líquidos iónicos, que no se sabe muy bien cuál será su impacto medioambiental, pues hasta ahora se han utilizado a escala de laboratorio, pero su aplicación industrial es todavía bastante restringida. Si el uso de los líquidos iónicos sigue en aumento, lo cual es muy probable debido a las numerosas ventajas que presentan como posibles sustitutos de los disolventes tradicionales y en muchas aplicaciones a escala industrial, se hará necesario un estudio minucioso de su impacto sobre el medio ambiente y de su toxicidad.

En este sentido, la toxicidad de los líquidos iónicos se puede evaluar a través de los valores de los coeficientes de reparto octanol/agua. En la **Tabla 3.4** [92] se presentan

los valores de ecotoxicidad medidos por el procedimiento estándar de Microtox[®] EC_{50} y coeficientes de reparto K_{ow} encontrados en la bibliografía para diferentes líquidos iónicos y disolventes orgánicos convencionales. Los valores de toxicidad se definen de acuerdo con la EC_{50} , entendida esta como la concentración del tóxico que causa un 50% de reducción en la bioluminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri*. Cuanto menor sea el valor para la EC_{50} menos tóxico será el compuesto en cuestión. Estos valores se determinan a los 15 minutos. El grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis ha estado trabajando en la realización de estudios de toxicidad de líquidos iónicos en *Vibrio fischeri* [93].

Tabla 3.4.

Valores de ecotoxicidad y coeficientes de reparto para los distintos líquidos iónicos y disolventes orgánicos convencionales encontrados en la bibliografía [92].

	Log EC_{50} ($\mu\text{mol/L}$) 15 min	Log K_{ow}
Acetonitrilo	5.57 ^a	-0.34 ^c
Acetona	5.17 ^a	-0.24 ^d
Diclorometano	4.57 ^a	1.25 ^c
Cloroformo	4.16 ^a	1.97 ^c
Fenol	2.51 ^f	1.46 ^c
[mmim ⁺][CH ₃ SO ₄] Metilsulfato de 1,3-dimetilimidazolio	>4.76 ^b	-
[emim ⁺][C ₂ H ₅ SO ₄] Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio	4.02 ^b	-
[bmim ⁺][CH ₃ COO] Acetato de 1-butil-3-metil-imidazolio	-	-2.77 ^e
[bmim ⁺][Br] Bromuro de 1-butil-3-metil-imidazolio	3.27 ^a	-2.48 ^d
[bmim ⁺][BF ₄] Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil-imidazolio	3.10 ^a	-2.52 ^d
[bmim ⁺][NO ₃] Nitrato de 1-butil-3-metil-imidazolio	-	-2.42 ^d
[bmim ⁺][Cl] Cloruro de 1-butil-3-metil-imidazolio	3.34 ^a	-2.40 ^d
[hmim ⁺][Cl] Cloruro de 1-hexil-3-metil-imidazolio	2.32 ^a	-
[omim ⁺][Cl] Cloruro de 1-octil-3-metil-imidazolio	1.19 ^a	-
[bmim ⁺][PF ₆] Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil-imidazolio	3.07 ^a	- 2.39 ^e
[hmim ⁺][PF ₆] Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio	2.17 ^a	-
[omim ⁺][PF ₆] Hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio	0.95 ^a	-
[emim ⁺][NTf ₂] bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-etil-3- metilimidazolio	-	(-1.05) – (-0.96) ^d
[bmim ⁺][NTf ₂] bis(trifluorometilsulfonilimida) de 1-butil-3- metilimidazolio	3.39 ^f	(-0.96) – (-0.21) ^d
[hmim ⁺][NTf ₂] bis(trifluorometilsulfonilimida) de 1-hexil-3- metilimidazolio	-	(0.15) – (0.22) ^d
[omim ⁺][NTf ₂] bis-(trifluorometilsulfonilimida) de 1-metil-3- octilimidazolio	-	(0.80) – (1.05) ^d

^aGarcía et al. [94]; ^bhttp://webs.uvigo.es/prosepav/WEB_IONIC-LIQUID [95];

^chttp://www.segulab.com/hojas_de_seguridad.php [96]; ^dRopel et al. [88], ^eKaar et al. [89], ^fCouling et al. [97].

En general, tal y como se refleja en la tabla, la ecotoxicidad de los líquidos iónicos estudiados es mayor que las de los disolventes orgánicos considerados, si bien la información disponible no permite realizar una comparativa exhaustiva entre los diferentes disolventes. Al comparar los distintos líquidos iónicos entre sí, se observan diferencias de toxicidad relacionadas con diferencias en su estructura. Una disminución en la longitud de cadena del sustituyente alquílico del catión supone una menor ecotoxicidad. Todo esto sugiere que modificando el catión o el anión se podría sintetizar líquidos iónicos de menor grado de toxicidad, lo que supondría una ventaja de cara a la utilización de estos compuestos como sustitutos de los disolventes tradicionales. De hecho, tal y como se puede observar en la **Tabla 3.4**, el líquido iónico [mmim⁺][CH₃SO₄⁻] presenta una toxicidad inferior a la mayoría de los disolventes orgánicos expuestos.

Por otra parte, a la hora de evaluar el impacto ambiental potencial de una sustancia, es de gran importancia considerar la movilidad de los contaminantes. En este sentido, habría que tener en cuenta la alta volatilidad de los disolventes orgánicos convencionales respecto a los líquidos iónicos, como ya se ha indicado. Así, mientras que los disolventes orgánicos tienen en general un punto de ebullición más bajo que el del agua, llegando a los 40 °C en el caso del diclorometano, los líquidos iónicos tienen una presión de vapor prácticamente nula. El coeficiente de reparto octanol-agua de un compuesto es un parámetro relativo a la acumulación del mismo en los organismos. Un mayor coeficiente de reparto supone una mayor capacidad de bioacumulación y una mayor penetrabilidad de los componentes a través de la piel y por tanto una mayor toxicidad. Tal y como se puede observar en la **Tabla 3.4**, los líquidos iónicos presentan un coeficiente de reparto menor que los disolventes orgánicos convencionales y por tanto la bioacumulación y penetración a través de la piel se daría en menor medida.

3.1.5 Ventajas del empleo de líquidos iónicos frente a disolventes orgánicos convencionales

Una de las mayores presiones a las que se encuentra sometida la industria química hoy en día consiste en la búsqueda de soluciones para los problemas derivados del uso de los disolventes orgánicos convencionales relacionados con su carácter tóxico, inflamable y volátil. Debido a su carácter no volátil y al amplio abanico de posibles combinaciones de aniones y cationes, el estudio de los líquidos iónicos y sus aplicaciones está recibiendo un mayor interés durante los últimos años.

Es bien conocido que muchos disolventes orgánicos de uso industrial tienen efectos muy perjudiciales para el medio ambiente y la salud. Entre los efectos más preocupantes de algunos de ellos destaca su poder cancerígeno, mutagénico y teratogénico. Todo esto ha obligado a los órganos de gobierno y las administraciones competentes a desarrollar una legislación más exigente en el control de las emisiones que promueve la sustitución cuando ésta sea posible. En este sentido se ha promulgado la normativa que aparece recogida en la **Tabla 3.5** [92].

Tabla 3.5.

Normativa relativa a la sustitución o eliminación del uso de disolventes orgánicos [92].

NORMATIVA RELATIVA A MEDIO AMBIENTE	
<ul style="list-style-type: none"> • Protocolo del Convenio sobre contaminación atmosférica transfronteriza a larga distancia de 1979 • La LEY 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación (IPPC) • El Real Decreto 117/2003 de 31 de enero, sobre la limitación de emisiones de compuestos orgánicos volátiles debidas al uso de disolventes en determinadas actividades. Este, tal y como dice su artículo 1, tiene por objeto evitar ó, cuando no sea posible reducir los efectos directos o indirectos de las emisiones de compuestos orgánicos volátiles sobre el medio ambiente y la salud de las personas. • Resolución de 11 de septiembre de 2003, por el que se aprueba el Programa nacional de reducción progresiva de emisiones nacionales de dióxido de azufre (SO₂), óxidos de nitrógeno (NO_x), compuestos orgánicos volátiles (COV) y amoníaco (NH₃). 	
NORMATIVA RELATIVA A LA PROTECCIÓN DE LOS TRABAJADORES	
<ul style="list-style-type: none"> • El artículo 15 de La LEY 31/1995, de 8 de noviembre de prevención de riesgos laborales, que propone en su la sustitución de lo peligroso por la entrañe poco o ningún peligro. • El artículo 4 del Real Decreto 665/1997, sobre la prevención de riesgos derivados de agentes cancerígenos y mutágenos en el trabajo, en el que la sustitución se convierte en un imperativo legal "<i>siempre que sea técnicamente posible</i>". • El artículo 5 del Real Decreto 374/2001 sobre la prevención de riesgos derivados de los agentes químicos, que dispone que "<i>el empresario garantizará la eliminación o reducción al mínimo del riesgo que entrañe un agente químico peligroso para la salud y seguridad de los trabajadores durante el trabajo. Para ello, el empresario deberá, preferentemente, evitar el uso de dicho agente sustituyéndolo por otro o por un proceso químico que, con arreglo a sus condiciones de uso, no sea peligroso o lo sea en menor grado.</i>" 	

Ante esta necesidad, tanto investigadores como industria han unido sus esfuerzos hacia el desarrollo e implantación de procesos sostenibles o procesos basados en lo que se conoce como "**química verde**", entendiendo ésta como el diseño de productos o procesos que reducen o eliminan el uso o la producción de sustancias peligrosas. La pauta más importante a seguir ante el uso de los disolventes orgánicos es la prevención basada en la eliminación o sustitución de los disolventes por otros menos nocivos.

Otra cuestión que merece ser discutida, en relación con estas sustancias, es la recuperación de los productos de reacción que quedan retenidos en ellos. Para el caso de los productos volátiles, estos pueden ser separados del líquido iónico por una simple destilación, dado la favorable característica de dichos líquidos iónicos de presentar una presión de vapor muy baja. Para los productos no volátiles se hace necesaria una extracción con disolventes. Esto puede resultar paradójico, ya que se utiliza un líquido iónico para evitar emisiones contaminantes a la atmósfera y posteriormente un disolvente orgánico para la extracción del producto. Los beneficios medioambientales en este caso se basan en la sustitución de un disolvente perjudicial para el medio ambiente por un líquido iónico como medio de reacción y seguidamente, la extracción se lleva a cabo con un disolvente orgánico más benigno, con lo cual se reduce el impacto medioambiental. Además, también puede usarse como agente extractor otro tipo de fluido como es el caso de los fluidos supercríticos.

3.1.6 Aplicaciones de los líquidos iónicos

La primera aplicación de los líquidos iónicos sintéticos fue en el campo de la electroquímica para su uso en baterías, debido a que poseen un amplio rango de estabilidad electroquímica, al tiempo que presentan alta estabilidad térmica y química, elevada conductividad y bajo punto de fusión. Posteriormente, se amplió el campo de aplicaciones al demostrarse su utilidad como medios de reacción en procesos químicos y bioquímicos, como disolventes y como catalizadores.

3.1.6.1 Líquidos iónicos como disolventes en reacciones biocatalíticas

En 1984, Magnusson *et al.* [98] comprobaron la estabilidad en nitrato de etilamonio y agua de la enzima fosfatasa alcalina en una proporción de 4:1. A partir de este hecho, y con la finalidad de aumentar la velocidad de reacción de procesos catalíticos en medios orgánicos, aparecen los líquidos iónicos como alternativas a disolventes anhidros para llevar a cabo reacciones bioquímicas en medios no convencionales. El uso de líquidos iónicos como medios de reacción en reacciones catalizadas por enzimas ha recibido una atención creciente las últimas décadas, revelándose como la alternativa más interesante a los disolventes orgánicos, ya que se ha constatado que no ocasionan desactivación de la enzima y resultan más benignos desde el punto de vista medioambiental.

Las lipasas, que poseen una importante tolerancia a los disolventes orgánicos, son las candidatas más obvias a ser utilizadas en líquidos iónicos. De hecho, la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) [99-103] y de *Pseudomonas cepacia* (PcL) [99, 100, 104] y *Penicilina G acilasa* [105] resultaron catalíticamente activas en líquidos iónicos basados en los cationes 1-alkil-3-metilimidazolio y 1-alkilpiridinio combinados con los aniones tetrafluoroborato, hexafluorofosfato y bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida. Las reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas en líquidos iónicos transcurren con una eficiencia comparable al t-butil alcohol [101], dioxano [106] o tolueno [104]. También ha sido estudiada la actividad de la enzima α -quimotripsina en la reacción de transesterificación de ésteres de N-acetil-L-aminoácidos, utilizando como medios de reacción líquidos iónicos basados en catión 1-alkil-3-metilimidazolio con un contenido en agua del 0.5 % [107, 108].

Las lipasas se aplican en un amplio rango de reacciones tales como esterificaciones, transesterificaciones, perhidrólisis y aminólisis [109, 110].

Durante los últimos años, las lipasas se han empleado en la industria en procesos de resolución de alcoholes quirales mediante acilación enantioselectiva [111]. En este sentido, se han utilizado con éxito líquidos iónicos como medios de reacción para resoluciones de arilalcoholes catalizadas por CALB y PcL (**Figura 3.10**) [100, 102, 104, 112, 113]. Los resultados obtenidos con los líquidos iónicos en cuanto a la selectividad de la resolución racémica son ligeramente mejores que con los disolventes orgánicos convencionales, con los que los resultados iban de buenos a excelentes.

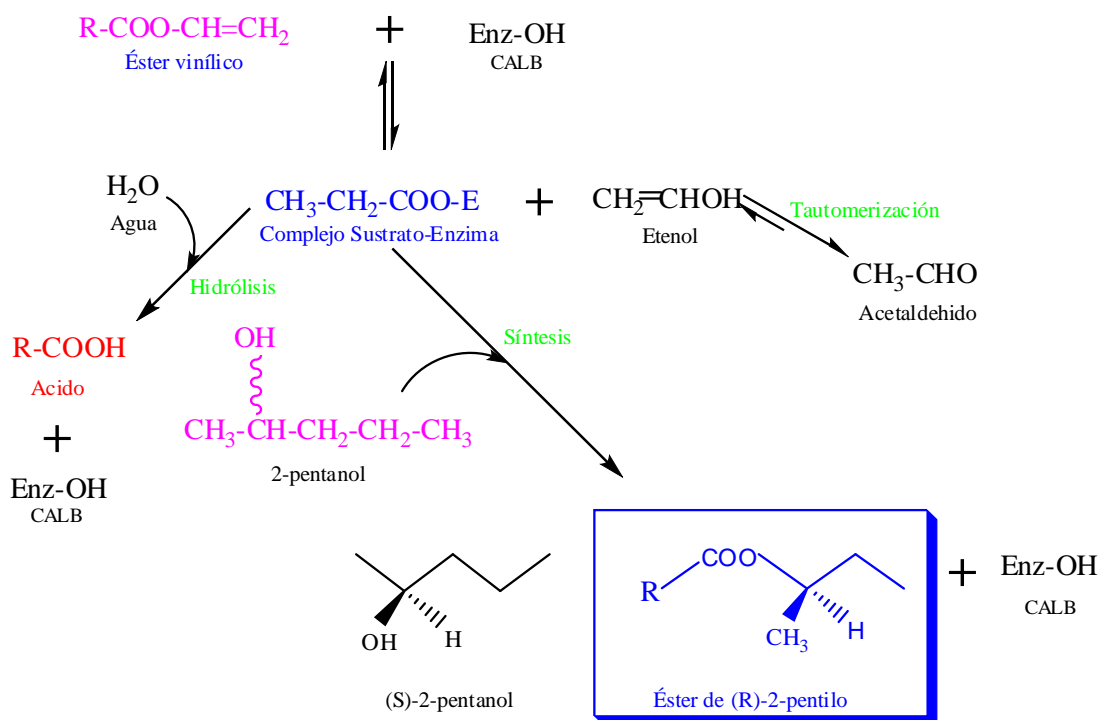


Figura 3.10. Resolución racémica de alcoholes quirales por la enzima lipasa [16].

La alta termoestabilidad de las lipasas en líquidos iónicos, ha incentivado la investigación en resoluciones racémicas a alta temperatura [107]. Así se estudió la resolución racémica de *rac*-feniletanol por PsL en $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ a diferentes temperaturas, observándose que la enantioselectividad (*E*) se mantenía en unos valores altos desde 200 hasta 150 al aumentar la temperatura de 25 a 90°C. Sin embargo, cuando se utilizó como medio de reacción el TBME el valor de *E* disminuyó rápidamente de 200 a 4 (a 55°C, temperatura de ebullición del TBME) [107]. También se ha llevado a cabo la resolución racémica de *rac*-2-pentanol [114] en líquidos iónicos basados en el catión imidazolio con excelente enantioselectividad.

3.1.6.2 Líquidos iónicos como disolventes en reacciones químicas

Este es el uso que mayoritariamente se le ha dado a los líquidos iónicos en el que han participado como disolventes en reacciones de hidrogenación, hidroformilación y oxidación.

- **Hidrogenaciones**

Chauvin *et al.* [115] fueron los primeros que llevaron a cabo una hidrogenación catalítica, en concreto la hidrogenación de 1-penteno, en medio líquido iónico. Para ello utilizaron el complejo $[\text{Rh}(\text{nbd})(\text{Ph}_3\text{P})_2]^+[\text{PF}_6^-]$ [(nbd)= norbonadieno], el cual, disuelto en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ o $[\text{bmim}^+][\text{SbF}_6^-]$ resultó ser un catalizador efectivo para esta hidrogenación. La velocidad de reacción fue 5 veces más rápida que cuando se utilizó acetona como disolvente.

3. Antecedentes

En estos medios también se han realizado hidrogenaciones estereoselectivas como la catalizada por rutenio en un sistema bifásico [bmim⁺][PF₆⁻]/MTBE para obtener el ácido cis-3-hexanoico con una selectividad del 90% (**Figura 3.11**) [116]:

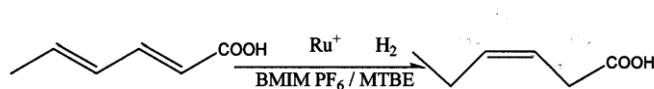


Figura 3.11. Hidrogenación estereoselectiva del ácido 3-hexanoico.

Recientemente se ha incorporado el CO₂ supercrítico (scCO₂) en reacciones de hidrogenación dando lugar a un sistema bifásico líquido iónico/scCO₂, evitando así por completo el uso de disolventes orgánicos, con lo cual estos sistemas son totalmente benignos desde el punto de vista medioambiental [117]. También se ha llevado a cabo con éxito la hidrogenación catalítica de olefinas en un sistema bifásico [bmim⁺][PF₆⁻]-scCO₂ [118].

- **Hidroformilaciones**

La hidroformilación de olefinas constituye un proceso de interés comercial. Así, la hidroformilación de propeno para obtener butanal se realiza industrialmente en un sistema bifásico en presencia de agua, utilizando como catalizador rodio soluble en agua [119]. También, Waffenschmidt y Wassercheid [120] han investigado la hidroformilación de 1-octeno, usando platino como catalizador en [bmim⁺][SnCl₃⁻] (**Figura 3.12**). Esta reacción tiene el inconveniente de la baja solubilidad de 1-octeno en el líquido iónico, que limita la reacción, sin embargo, se consiguen actividades elevadas y una notable regio-selectividad (n/ iso = 19):

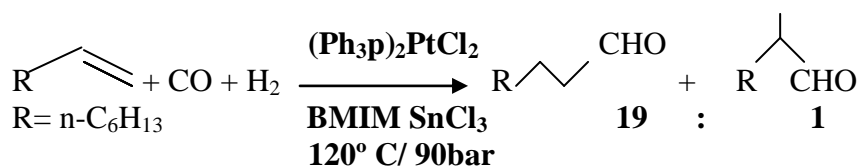


Figura 3.12. Hidroformilación regioselectiva de 1-octeno.

- **Oxidaciones**

Aunque las oxidaciones catalíticas son comunes en la industria y los líquidos iónicos son relativamente inertes a la auto-oxidación con O₂, hasta ahora las reacciones de oxidación en líquidos iónicos no han sido muy empleadas. En la bibliografía se encuentra un ejemplo de epoxidación estereoselectiva en el que se empleó un complejo quiral de Jacobsen [Mn^{III}] como catalizador, en una mezcla de [bmim⁺][PF₆⁻]/CH₂Cl₂ (1:4) (**Figura 3.13**). En este caso se consiguió una conversión del 86% en dos horas gracias a la considerable activación del catalizador por el líquido iónico [121].

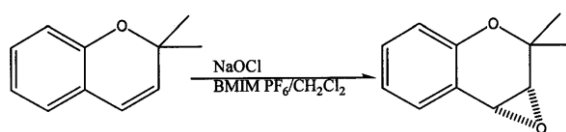


Figura 3.13. Epoxidación estereoselectiva de alquenos.

- **Alcoxicarbonilaciones**

La realización de estas reacciones en líquidos iónicos ha atraído mucho menos interés. Un ejemplo de ellas son la alcoxicarbonilación y amidocarbonilación de yoduros y bromuros de arilo, catalizadas por paladio, en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$, en estas reacciones se ha encontrado que las reactividades aumentaban con respecto a las llevadas a cabo en medios convencionales y que, además, el conjunto líquido iónico-catalizador podían ser reciclados [122].

3.1.6.3. Líquidos iónicos como catalizadores

Además, de como medios de reacción, los líquidos iónicos pueden formar parte de las reacciones químicas actuando como catalizadores, es decir, aumentando la velocidad de la reacción y, lo que es muy importante, manteniendo su naturaleza fisicoquímica después del proceso. Esta habilidad de los líquidos iónicos puede deberse a su polaridad, o a interacciones o reacciones específicas entre el líquido iónico y el catalizador [123].

3.1.6.4. Líquidos iónicos como co-catalizadores

Probablemente, la dimerización de olefinas de cadena corta, catalizada por níquel, en líquidos iónicos basados en aniones cloroaluminato, es la reacción que más se ha estudiado en líquidos iónicos. A principios de 1990, el grupo de Chauvin y colaboradores en el Instituto Francés del Petróleo, estudiaron la dimerización de propeno catalizada por níquel en $[\text{bmim}^+][\text{AlCl}_4^-]$. El precursor del catalizador consistía en un complejo de níquel del tipo L_2NiCl_2 ($\text{L}=\text{Ph}_3\text{P}$ o piridina) el cual, en combinación con el líquido iónico ternario ($\text{bmimCl}-\text{AlCl}_3-\text{EtAlCl}_2 = 1:1.2:0.25$), daba lugar a la forma activa del catalizador que era un complejo de Ni(II), $[\text{LNiCH}_2\text{CH}_3^+][\text{AlCl}_4^-]$. A 5° C y presión atmosférica se obtuvieron unas productividades mucho más altas que las que se obtenían con los disolventes orgánicos (> 250 kg de dímeros por g de Ni) [115, 124, 125].

3.1.6.5. Líquidos iónicos como agentes de extracción

Los líquidos iónicos pueden ser empleados en separaciones de gases; y como se comentó anteriormente, los conocidos hasta ahora son higroscópicos, por lo que son capaces de eliminar eficientemente vapor de agua de mezclas gaseosas [84]. La solubilidad del CO_2 en este tipo de medios es bastante elevada [84, 126]. A modo de ejemplo, a 40°C, y únicamente 50 bares de presión, la solubilidad del CO_2 en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ está en torno a 0.5 en fracción molar. Además, la solubilidad de un gas en un líquido iónico puede ser modulada eligiendo el catión, el anión y los sustituyentes del líquido iónico. De ese modo, y en base a las diferencias de solubilidad de diversos gases y vapores, se considera que los líquidos iónicos tienen un alto potencial para ser empleados en separaciones de gases.

Igualmente, la correcta elección del catión, el anión y los sustituyentes de un líquido iónico puede ofrecer una tremenda oportunidad para diseñar separaciones líquido-líquido. Esta vía fue explorada por Fadeer y Meagher [127], quienes usaron un líquido iónico para separar alcoholes de un caldo de cultivo, obteniendo, sin embargo,

resultados poco satisfactorios en cuanto a selectividad. Esto sugiere que para llegar a diseñar separaciones selectivas líquido-líquido, es necesaria una comprensión adecuada del comportamiento del líquido iónico en ambas fases (la orgánica y la acuosa). Numerosos estudios se han desarrollado para estudiar el equilibrio líquido-líquido de sistemas ternarios que contienen un líquido iónico con el objetivo de que este pueda ser empleado en operaciones de separación [128-130].

3.1.6.6. Líquidos iónicos como membranas líquidas soportadas (SLM) y reactores de membrana

Los líquidos iónicos también han sido utilizados como fase líquida inmovilizada en el interior de los poros de una membrana microporosa generando lo que recibe el nombre de membrana líquida soportada (SLM, “*supported liquid membrane*”). Con relación a este tema, Branco *et al.* [76] han llevado a cabo el estudio del transporte selectivo de especies orgánicas a través de membranas líquidas y soportadas, estas últimas basadas en líquidos iónicos, concretamente [bmim⁺][PF₆⁻], obteniendo excelentes resultados en cuanto a permeoselectividad se refiere.

El grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente tesis estudió hace algunos años el transporte selectivo de cuatro grupos de especies orgánicas, ésteres alquílicos, ésteres vinílicos, alcoholes y ácidos (correspondientes a los sustratos y productos de reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas) a través de membranas poliméricas con líquidos iónicos soportados. Este nuevo tipo de membranas permiten la separación de los sustratos y productos de reacciones de transesterificación, mostrando además una excelente estabilidad operacional [131]. La caracterización físico-química de estas membranas ha sido llevada a cabo mediante técnicas SEM-EDX en el Instituto de Catálisis y Petrolquímica del CSIC (Madrid) [132-138].

También se abordó el desarrollo y estudio de un nuevo proceso integrado de reacción/separación para la resolución de mezclas racémicas de alcoholes de alto valor añadido, mediante el uso de un biorreactor de membrana, en el cual se colocaba una membrana líquida soportada basada en líquidos iónicos. Este sistema integra la acción catalítica enantioselectiva de la enzima y la permeabilidad selectiva de los compuestos a través de la membrana líquida soportada basada en líquidos iónicos. Este nuevo proceso integrado de reacción/separación se aplicó satisfactoriamente a la resolución racémica de *rac*-1-feniletanol, cuyo enantiómero *S* es utilizado como intermedio quiral en la industria de química fina y farmacéutica y a la resolución racémica de *rac*-2-pentanol, cuyo enantiómero *S* es utilizado como intermedio quiral en la síntesis de varios fármacos anti-Alzheimer. Se estudiaron las variables de proceso que afectaban al biorreactor, tales como la naturaleza del líquido iónico soportado en la membrana, el contenido de agua del medio de reacción, la cantidad de enzima utilizada y la naturaleza de los ésteres vinílicos utilizados como dadores de acilo [114, 134, 139].

Otra línea de investigación de las membranas basadas en líquidos iónicas la constituye la obtención de membranas de electrolito polimérico (PEM) basadas en líquidos iónicos para empleo en células de combustible. La célula de combustible basada en PEM es una prometedora fuente de energía con alta eficiencia y bajas emisiones para dispositivos móviles y aplicaciones automovilísticas [140].

El rendimiento de las células de combustibles PEM depende en gran medida del agua generada en la capa catalizadora del cátodo. Se debe evitar la inundación del cátodo a la vez que se debe permitir suficiente hidratación de la membrana para mantener alta la conductividad iónica de la misma. Las membranas empleadas actualmente están limitadas a su uso por debajo de los 100°C para evitar la evaporación del agua y tienen un precio muy alto. Para aumentar el rendimiento de las membranas PEM y disminuir su coste, los líquidos iónicos son una interesante alternativa debido a su nula presión de vapor, alta estabilidad térmica y conductividad iónica, por lo que pueden aumentar la hidratación de la membrana a temperaturas mayores de 100°C y también la conducción del protón anhidro.

Yu *et al.* [141] prepararon microemulsiones con núcleos de líquido iónico [bmim⁺][BF₄⁻] dispersados en un aceite polimerizable (monómero de vinilo) empleando como surfactante un líquido iónico del tipo imidazolio funcionalizado. La polimerización dio lugar a un electrolito polimérico flexible y transparente que mostró una alta conductividad tanto a temperatura ambiente como a temperaturas elevadas. El mismo grupo de investigadores estudió posteriormente la obtención de membranas de intercambio iónico mediante la polimerización de microemulsiones que contenían redes nanoestructuradas de líquidos iónicos proticos. Estas membranas se sintetizaron mezclando un derivado de imidazolio con la cantidad molar equivalente de ácido trifluorometanosulfónico y empleando el surfactante MAUM-Br. Estas membranas poliméricas tienen una buena estabilidad térmica y química y buenas propiedades mecánicas. La conductividad de este tipo de membranas en condiciones no humidificadas es del orden de 1×10^{-1} S/cm a 160°C, debido a los nanocanales de líquidos iónicos proticos bien conectados existentes en la membrana [142].

3.1.6.7. Sistemas bifásicos líquido iónico/CO₂ supercrítico

El gran interés que han suscitado estos sistemas reside en la combinación de las excelentes propiedades de los líquidos iónicos como disolventes para llevar a cabo numerosas reacciones, junto con las magníficas cualidades del CO₂ supercrítico como agente de extracción. Por tanto, es posible llevar a cabo cualquier reacción en un líquido iónico y recuperar los productos disueltos en el CO₂ de una forma sencilla, rápida y limpia (**Figura 3.14**).

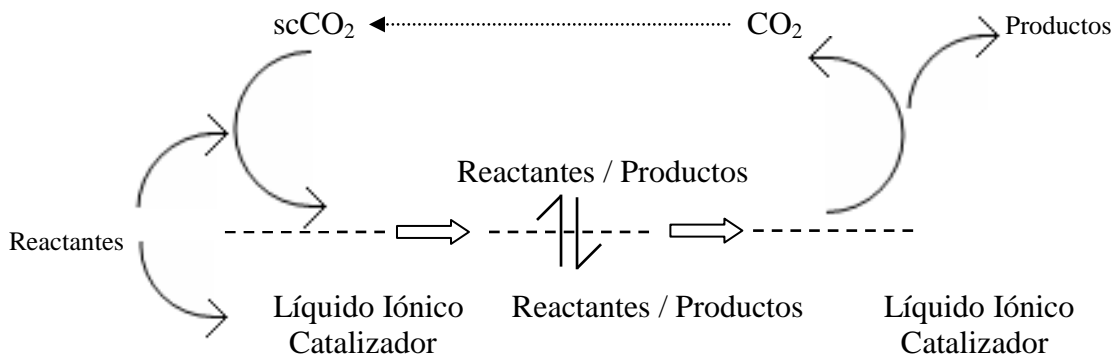


Figura 3.14. Representación de una reacción en un sistema bifásico líquido iónico/CO₂ supercrítico [143].

Desde hace algunos años, se están investigando procesos biocatalíticos en sistemas bifásicos basados en líquidos iónicos y fluidos supercríticos [144]. Al igual que en otras reacciones catalíticas, la parte más ventajosa de estos sistemas bifásicos es la elevada solubilidad del scCO_2 en la fase líquido iónico, mientras que este no presenta solubilidad detectable en la fase scCO_2 y el hecho demostrado de que el scCO_2 puede extraer sustancias orgánicas del líquido iónico, sin contaminación del extracto por este último [126], mientras que la enzima, libre o inmovilizada, se puede separar del líquido iónico mediante un proceso de filtración. Por lo tanto, la extracción con CO_2 supercrítico es una técnica también muy prometedora para reacciones enzimáticas en las que la destilación no es muy conveniente para sustancias con alto punto de ebullición o que se descomponen con facilidad a altas temperaturas o la extracción líquido-líquido, que implicaría llevar a cabo sucesivas etapas de extracción y el uso de disolventes orgánicos con las consiguientes desventajas medioambientales.

En resumen, el principal interés que presentan estos sistemas es debido a la combinación de las buenas propiedades por parte de los líquidos iónicos, como disolventes donde llevar a cabo numerosas reacciones enzimáticas en condiciones de operación severas, con la estabilización de la enzima y las buenas cualidades del scCO_2 como agente de extracción.

Otra opción aplicable a los sistemas bifásico es la operación en modo semicontinuo, es decir, llevar a cabo la reacción en el líquido iónico, mientras se hace pasar constantemente CO_2 a través del sistema para extraer con él los productos y recogerlos en una trampa fría [144].

La constatación de que en este tipo de sistemas se puedan llevar a cabo reacciones enzimáticas en condiciones extremas (150°C y 100 bar), con buenas velocidades de reacción y selectividades superiores al 99%, parece deberse a que el líquido iónico puede actuar con una doble función: proporcionar el microambiente necesario para la acción catalítica de la enzima y actuar como soporte de inmovilización simultáneamente, contribuyendo a mantener la conformación activa de la misma ante esas condiciones tan desnaturalizantes.

Otros estudios [145, 146] han combinado líquidos iónicos, scCO_2 y tecnología de membranas para realizar un proceso biocatalítico. Para ello utilizaron membranas tubulares cerámicas (α -alúmina microporosa) en las que se inmovilizó la lipasa de *Candida antarctica* para realizar la síntesis de propionato de butilo, a partir de propionato de vinilo y 1-butanol, en un bioreactor de membrana con recirculación en un medio líquido iónico/ scCO_2 a 50°C y 80 bar (**Figura 3.15**).

En estos sistemas bifásicos, la enzima inmovilizada (CALB) mostró un aumento en la selectividad del proceso en relación a cuando se empleó dióxido de carbono supercrítico en ausencia de líquido iónico. Con el fin de entender el comportamiento de la enzima en estos sistemas, las reacciones biosintéticas se llevaron a cabo también en medio scCO_2 , en medio líquido iónico y en sistemas bifásicos líquido iónico/hexano y se determinaron los coeficientes de reparto líquido iónico/hexano de los compuestos para analizar los fenómenos de transporte. Estos estudios mostraron que la eficiencia de los sistemas bifásicos líquido iónico/ scCO_2 dependía tanto de la especificidad de las interacciones enzima-líquido iónico como de los fenómenos de transferencia de materia entre el

líquido iónico y el dióxido de carbono supercrítico. Estos estudios demuestran el enorme potencial de la combinación de los líquidos iónicos, el dióxido de carbono supercrítico y la tecnología de membranas para llevar a cabo procesos biocatalíticos en un marco respetuoso con el medio ambiente. Los líquidos iónicos proporcionan un microambiente adecuado para la enzima mientras que el uso del dióxido de carbono supercrítico actúa como segunda fase en el sistema bifásico haciendo posible la fácil recuperación de los productos, sin contaminación de estos por la fase líquido iónico.

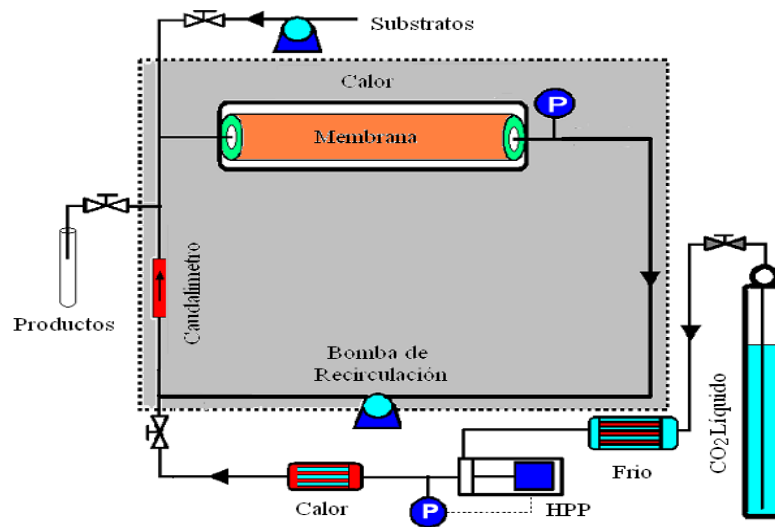


Figura 3.15. Dispositivo experimental del reactor enzimático de membrana con recirculación, usando un sistema bifásico líquido iónico/scCO₂ [143].

3.1.6.8. Otros usos de los líquidos iónicos

Los líquidos iónicos a baja temperatura se han usado con éxito como electrolitos en las baterías recargables de Litio. Las conductividades obtenidas en estas pueden ser cinco veces más altas que las obtenidas mediante las combinaciones de sales y disolventes no acuosos [147].

Pero no sólo se han empleado en el terreno de las baterías de litio, sino que también han realizado estudios en su uso en células fotovoltaicas [2].

3.2. LA SEDA COMO BIOMATERIAL

Las sedas se definen generalmente como polímeros de proteína hilados en fibras por algunas larvas de lepidópteros tales como gusanos de seda, arañas, escorpiones, ácaros y moscas [148, 149]. Las proteínas de seda generalmente se producen en glándulas especializadas después de la biosíntesis de las células epiteliales, seguido por la secreción de estas glándulas donde se almacenan las proteínas antes del hilado en fibras. Las sedas difieren en composición, estructura y propiedades dependiendo de la fuente específica. Las sedas más ampliamente caracterizadas son las de gusano de seda domesticado, *Bombyx mori*, y de las arañas (*Nephila clavipes* y *Araneus diadematus*). Muchas de las arañas, más avanzadas evolutivamente sintetizan diferentes tipos de sedas. Cada una de estas diferentes sedas tiene una composición de aminoácidos diferentes y exhibe propiedades mecánicas a la medida a sus funciones específicas:

3. Antecedentes

como estructura capsular del capullo para la reproducción, líneas para la captura de presas, red de arrastre para soporte, construcción de redes y adherencia.

Las proteínas fibrosas, como sedas y colágeno, se caracterizan por una secuencia primaria altamente repetitiva que conduce a la homogeneidad significativa en hélices de la estructura secundaria, i.e., triple hélice en el caso de colágenos y lámina β el caso de las sedas. Estos tipos de proteínas generalmente presentan interesantes propiedades mecánicas, en contraste con las funciones catalíticas y de reconocimiento molecular de las proteínas globulares. Debido a estas propiedades mecánicas impresionantes, esta familia de proteínas constituye una opción valiosa para su uso como biomaterial en el campo de la liberación controlada de fármacos, biomateriales como estructuras (*scaffolds 3D*) y fibras para la su aplicación en la ingeniería de tejidos. La relativa estabilidad ambiental de estas familias de proteínas, en comparación con las proteínas globulares, en combinación con su biocompatibilidad, propiedades mecánicas únicas y las opciones para adaptar la secuencia mediante el control genético, proporciona una base importante para explotar estas proteínas naturales para aplicaciones biomédicas [150].

3.2.1. La seda del gusano de seda

La seda del gusano de seda se ha utilizado comercialmente para realizar suturas biomédicas durante décadas, y en la producción de textiles durante siglos. La mariposa *Bombyx mori*, cuya larva es llamada gusano de seda, es una especie de insecto lepidóptero de la familia *Bombycidae* originaria del norte de Asia. Se cría hoy en muchas regiones del mundo para aprovechar el capullo que protege a su crisálida, constituido por un largo filamento de seda, el cual produce la oruga al retraerse para la metamorfosis.

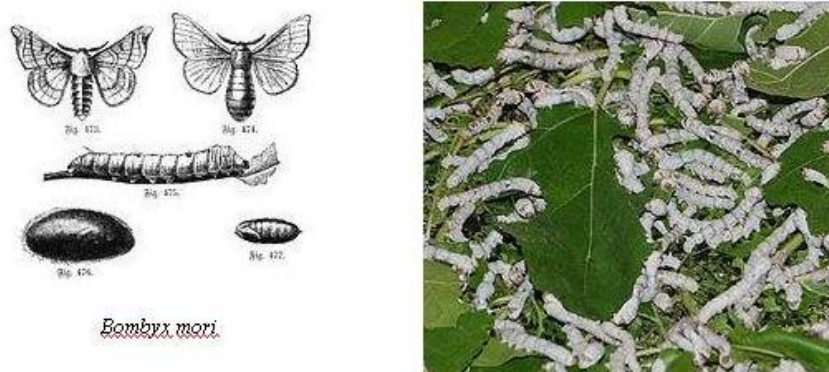


Figura 3.16. Gusano de Seda *Bombyx mori*.

El ciclo vital del gusano de seda (**Figura 3.17**) está compuesto por las siguientes etapas: huevo, larva, pupa y adulto. El proceso completo se realiza en un período comprendido entre 65 y 75 días, dependiendo de la temperatura.



Figura 3.17. Ciclo biológico del gusano de seda *Bombyx mori*.

- Huevo

Las hembras ponen entre 300 y 500 huevos sobre las hojas de morera. El tamaño de los huevos es de aproximadamente 1 mm de diámetro. Presentan una coloración blanco-amarillenta que va variando hasta que finalmente se convierte en gris plomiza.

- Larva

El huevo da lugar a la larva, que pasa por 5 estadios larvarios o edades en los que se va alimentando, creciendo y mudando la piel.

1^{er} estadio: es el tiempo que transcurre entre el nacimiento y la primera muda de piel, transcurriendo entre 4 y 6 días. Al nacer, el gusano es de cabeza negra brillante y cuerpo negro cubierto de pelos. La muda se produce entre 24 y 48 horas.

2^{do} estadio: dura 3 días. La cabeza se nota más grande, el pelo más corto y el color se va aclarando. Se produce la segunda muda de piel, que tiene lugar en 24 horas.

3^{er} estadio: transcurre en 4 días y ya su cuerpo es de color casi blanco. La tercera muda dura 24 horas, periodo durante el cual no hay necesidad de alimento debido al tamaño alcanzado por las larvas en las fases anteriores.

4^{to} estadio: se realiza en 5 días y se produce el mayor desarrollo. El cuerpo toma una coloración definitiva, blanco con rayas o sin ellas. La cuarta muda se produce en un periodo de tiempo comprendido entre 36 y 48 horas.

5^{to} estadio: la duración es de 6 a 9 días, alcanzando la larva su madurez. En los últimos días la piel comienza a tornarse amarillenta y brillante y deja lentamente de comer. Las glándulas productoras de la seda se encuentran bien desarrolladas y están llenas, listas para producir el capullo.

3. Antecedentes

La larva busca un lugar seco y apropiado para tejer el capullo, donde realizará la metamorfosis de larva a adulto.

- Pupa o crisálida

Esta es una etapa intermedia entre la larvaria y la adulta en la que la larva comienza a tejer el capullo. Para su elaboración demora de 70 a 72 horas, variando el tiempo en función de la alimentación, la temperatura y la raza.

Una vez finalizado el capullo, permanece dentro de él entre 18 y 20 días, iniciando así la metamorfosis.

- Mariposa

Las crisálidas emergen del capullo convertidas en mariposas. Recién nacidas son de color blancuzco, con pelos en todo el cuerpo y patas.

Tanto las hembras como los machos no vuelan, comen ni beben en su corta vida. La hembra vive entre 10 y 12 días y el macho lo hace entre 28 y 32 días.

La glándula sericígena del gusano es la encargada de segregar la seda para la elaboración del capullo. Esta glándula se divide en tres regiones con diferentes funciones cada una de ellas: la glándula posterior, media y anterior:

- La región posterior de la glándula de seda es curvada, de gran longitud y segrega exclusivamente fibroína, que conforma del 70 al 80% de la seda.
- La región media es la más grande y tiene tres divisiones bien definidas formando una figura de “S”. En esta región se segrega la sericina.
- La sección anterior es un tubo estrecho con un diámetro de 4 mm en el que el filamento largo de seda es formado por presión del tubo, los cambios de pH, fuerza iónica y actividad del agua.

El hilo producido es continuo y puede medir hasta 1.500 metros.

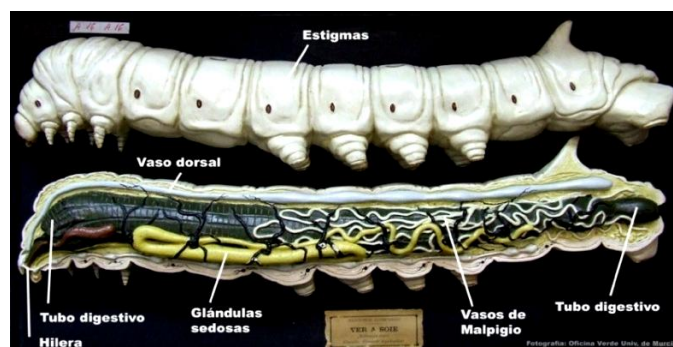


Figura 3.18. Anatomía del gusano de seda.

3.2.2. Composición y estructura de la seda

La seda del capullo de *Bombyx mori* está formada por dos proteínas principales: la fibroína y la sericina. Estas fibras del núcleo, constituidas por fibroína, están envueltas en una capa de sericina, una familia de proteínas que actúan como cementación que sostiene dos fibras de fibroína juntas para formar los capullos para proteger el crecimiento del gusano. Esta disposición estructural contrasta con sedas de araña donde estas proteínas que hacen de adhesivo están generalmente ausentes. La cría de gusanos de seda para la producción de seda, conocida como sericultura, produce altos rendimientos ya que las larvas pueden ser mantenidas en altas densidades.

Las sericinas son unas proteínas globulares e hidrofílicas que forman la cobertura externa del hilo. La fibroína es una proteína lineal de carácter hidrofóbico compuesta por una cadena pesada (aproximadamente 390 kDa) y una cadena ligera (aproximadamente 25 kDa) unidas entre sí a través de enlaces disulfuro [149, 151].

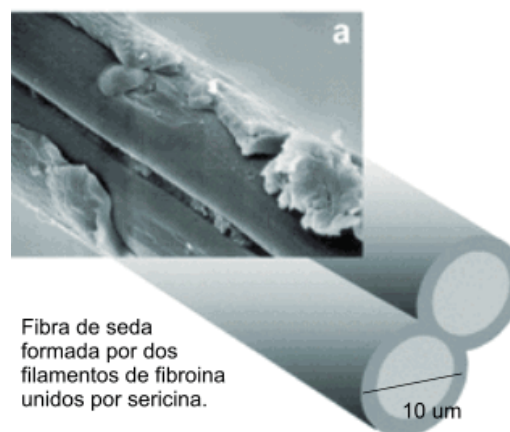


Figura 3.19. Estructura de la seda vista al microscopio electrónico

La fibroína es un copolímero natural formado por grandes bloques hidrófobos separados por pequeños bloques hidrófilos cargados negativamente (5062 aa) y dos grandes bloques hidrofílicos en los extremos. El extremo N-terminal, formado por 151 aa, está cargado negativamente y el C-terminal, formado por 50 aa, cargado positivamente [152-154] (**Figura 3.20**).

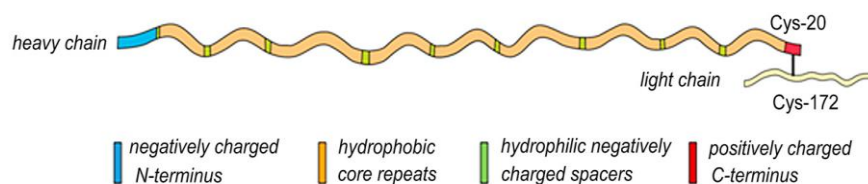


Figura 3.20. Esquema de la secuencia peptídica de la fibroína [154].

La estructura primaria de la fibroína (**Figura 3.21**) está constituida mayoritariamente por los aminoácidos glicina, alanina, serina, valina y tirosina, con secuencias repetitivas de GAGAGS, GAGAGY y GAGAGVGY. La fibroína de la seda está formada por cadenas con plegamiento β antiparalelo, en el cual las cadenas se extienden paralelamente al eje de la fibra. Los estudios muestran que grandes extensiones de la cadena están constituidas por seis residuos que se repiten.

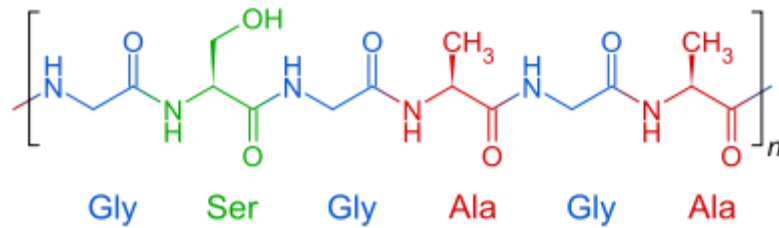


Figura 3.21. Estructura primaria de la fibroína

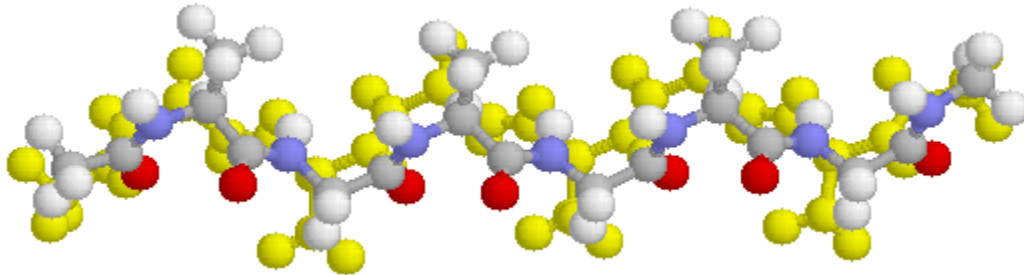


Figura 3.22. Dos cadenas polipeptídicas vecinas, se muestra la alternancia de glicina y alanina intra e intercadena.

Las láminas β proyectan la glicina hacia una superficie, las cadenas laterales de la alanina y la serina están dispuestas hacia la otra superficie. Además, las cadenas se apilan, de modo que las capas en las que se establece contacto con las cadenas laterales de la glicina se alternan con aquellas de alanina y serina. Esta estructura explica en parte las propiedades mecánicas de la seda.

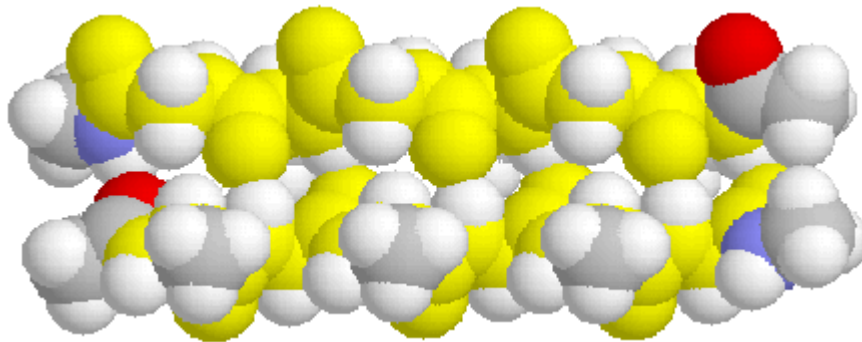


Figura 3.23. Dos cadenas polipeptídicas antiparalelas de la fibroína de la seda (modelo de esferas llenas).

Estos elementos estructurales (grandes dominios hidrófobos que contienen cadenas laterales cortas de aminoácidos) permiten la formación de un bloque compacto de hebras apiladas de forma antiparalela unidas mediante enlaces de hidrógeno, denominado lámina β .

Así, la estructura secundaria de seda es un ejemplo de la lámina β plegada. En esta estructura, las cadenas de proteínas individuales están alineadas lado a lado con otra cadena de proteína alineada en una dirección opuesta. Las cadenas de proteína se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno intermoleculares, que es el enlace de hidrógeno entre los grupos amida de dos cadenas separadas. Este enlace de hidrógeno

intermolecular en la lámina β plegada está en contraste con el enlace de hidrógeno intramolecular en la hélice alfa.

El hidrógeno de la amida de una cadena de proteína está enlazado al oxígeno amida de la cadena de proteínas vecinas. El efecto plegado de la lámina surge de forma que la estructura de la amida es plana, mientras que las "curvas" se producen en el carbono que contiene la cadena lateral (**Figura 3.24**).

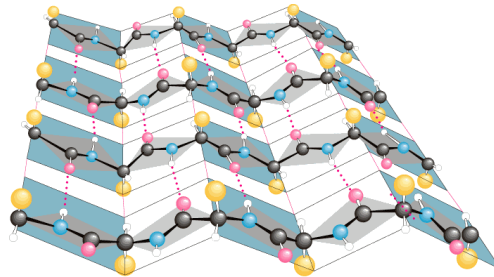


Figura 3.24. Estructura secundaria de seda (lámina β).

La seda es relativamente inestable en su forma soluble en agua (*Random coil* ó seda tipo I) y cuando se convierte a la forma de mayor estabilidad (lámina β apilada o seda tipo II), los grupos R apolares de pequeño tamaño de los residuos de aminoácido Gly, Ala y Ser, permiten el apilamiento de láminas beta formando unidades de gran estabilidad termodinámica unidas mediante interacciones hidrofóbicas. Esta transición se considera irreversible [149].

3.2.3. Propiedades de la fibroína de la seda

La mayor estabilidad de fibras de fibroína de seda en comparación con proteínas globulares es debida a los enlaces de puente de hidrógeno, la naturaleza hidrofóbica de gran parte de la proteína y la significativa cristalinidad. Las fibroínas son insolubles en la mayoría de los disolventes, incluidos el agua, ácidos diluidos y álcalis.

El análisis estructural de las proteínas de seda de araña ha proporcionado información sobre la organización y orientación de los numerosos cristales de lámina β muy pequeños en las fibras y un alto nivel de organización de la proteína incluso en los dominios menos cristalinos [148]. Estas características a nanoescala, teniendo en cuenta la orientación y numerosos cristales de lámina β , una difusa interfase entre estos cristales y los dominios menos cristalinos, así como la alineación de corte de las cadenas, proporciona una base para el origen de las propiedades mecánicas exhibida por las fibras de seda. Las propiedades mecánicas de los hilos de seda son espléndidas cuando se comparan con hilos de acero y otras fibras artificiales de altas prestaciones: la tensión de rotura para hilos muy finos de acero y para las fibras artificiales de kevlar 49 se encuentran alrededor de los 3.000 MPa; los hilos de la *Agriope trifasciata* pueden alcanzar los 1.000 MPa y otras especies de arañas alcanzan los 4.000 MPa (**Tabla 3.6**) Además, poseen una asombrosa combinación de resistencia y deformabilidad: los hilos de acero o las fibras de altas prestaciones se rompen con una deformación del 1-2%; en cambio, los hilos de seda llegan a superar deformaciones del 30% [155].

3. Antecedentes

Tabla 3.6.

Tabla comparativa de propiedades mecánicas de la seda y otros materiales.

Tipo de Fibra	Densidad (g/cm ³)	Modulo de elasticidad E (Gpa)	Resistencia Sr(Gpa)	Deformación rotura (%)	Energía de deformación almacenada hasta la rotura (MJ m ⁻³)
Seda de Araña <i>Nephilia clavipes</i>	1.3	1-10	1.8	30	130
Seda <i>Bombyx mori</i>	1.3	5	0.6	12	50
Nylon 6. 6	1.1	5	0.9	18	80
Kevlar 49	1.4	130	3.6	3	50
Acero	7.8	200	3.0	2	6

Por otra parte, la seda tiene una elasticidad reducida y es sensible a la luz solar, que puede llegar a degradarla por completo. Una de las características a tener en cuenta es que la seda pierde hasta un 25% de su fuerza cuando está húmeda. Puede acumular una alta electricidad estática al ser muy mala conductora de la electricidad.

La seda del gusano *Bombyx mori*, es la única que se utiliza para uso textil en la actualidad, pero no es la única que se puede utilizar, la seda producida por las arañas (**Figura 3.25**) tiene mejores propiedades mecánicas, el problema es que su proceso de obtención es muy limitado, por el momento.

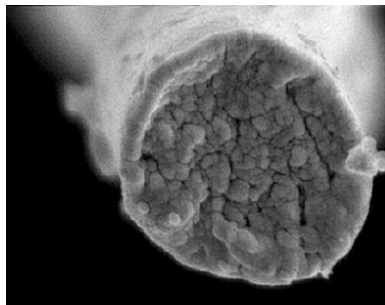


Figura 3.25. Seda de araña. Microscopio Electrónico. Imagen UPM.

La fibroína presenta, además, las siguientes características que la hacen muy interesante como biomaterial [150]:

- Es un material de naturaleza proteica altamente biocompatible. El rechazo ocasional que se ha presentado en algunas suturas se atribuye a la contaminación de la fibroína con sericina [156].
- Presenta una gran resistencia mecánica a tracción y una gran flexibilidad.

- Es biodegradable, pero se descompone a un ritmo más lento que otros materiales orgánicos, lo que permite una mejor consolidación de los tejidos. En dos años se reabsorbe totalmente y no se encuentran rastros de la misma en los tejidos [157].
- Puede elaborarse en diferentes configuraciones según las necesidades: geles, films, matrices porosas 3D, microfibras, microesferas y/o nanoesferas.
- Su producción es sencilla, sostenible y de bajo coste. La elaboración de los materiales se hace predominantemente en medio acuoso con técnicas relativamente simples, aunque costosas y lentas.
- Presenta una superficie altamente reactiva ya que contiene grupos carboxilo a los que se pueden unir de forma covalente péptidos, hormonas [158] y factores de crecimiento [159-161].
- Estas proteínas favorecen de forma muy significativa tanto la adhesión como el desarrollo de los cultivos celulares implantados sobre la matriz.

3.2.4. Procesado de la seda

Para la utilización de la seda como biomaterial, al igual que se hace para su utilización en la industria textil, se parte de la eliminación de la sericina. Ello se hace mediante ebullición en una solución jabonosa, o en carbonato sódico. Tras un filtrado, se obtiene una madeja de textura similar al algodón, constituida en su totalidad por fibroína. La fibroína es insoluble en agua y en los disolventes habituales. De forma tradicional, se ha solubilizado en bromuro de litio concentrado o en una mezcla de cloruro cálcico y etanol. Una vez solubilizada, la solución se dializa y se obtiene así una solución acuosa de fibroína regenerada a partir de la cual se fabrican las diversas presentaciones.

Como ya se ha comentado anteriormente, tradicionalmente se han empleado dos tipos de soluciones para disolver las hebras de fibroína de seda: disoluciones acuosas de sales alcalinas altamente concentradas o soluciones salinas hidroalcohólicas. Entre las primeras destacan la disolución de seda en una disolución de Bromuro de Litio (LiBr) 9.3M en agua a 60°C durante 4 horas [162-164], la disolución en Tiocianato de Litio (LiSCN) 9M en agua [165] o la disolución de CaCl₂ 50% (p/v) en agua. Entre las hidroalcohólicas destacan las que emplean una mezcla de Nitrato de Calcio/Agua/Metanol ((Ca(NO₃)₂·4H₂O-MeOH) en relación molar Ca/H₂O/MeOH (1:4:2) [166, 167] y el sistema Cloruro Cálcico/Agua/Etanol, con una relación molar CaCl₂/H₂O/EtOH (1:8:2) conocido como el método de Ajisawa [168]. En cualquier caso, las sales empleadas deben eliminarse por diálisis al menos durante dos días para posteriores usos de la disolución de proteína ya que contienen una elevada cantidad de sales [167].

Al margen de estos sistemas de disolución de la fibroína de la seda, también se han ensayado otros sistemas que emplean Cuprietilendiamina u Óxido de N-metil morfolina (NMMO) [169] aunque se ha visto que causan una considerable degradación protéica durante el proceso de disolución.

3. Antecedentes

En la línea de los métodos anteriores, que emplean sales para romper los enlaces de hidrógeno de las láminas beta para poder disolver la fibroína, Phillips *et al.* [170] describieron en 2004 un método de disolución y regeneración de fibroína de seda para formar films empleando líquidos iónicos a elevadas temperaturas, que se concretó en la patente US7671178B1 posteriormente. Este método necesitaba, al menos varias horas a temperatura superior a 90 °C, para conseguir la completa disolución del biopolímero, usando como fuente de aporte de calor un baño de aceite termostatado. Ensayaron los líquidos iónicos que se reflejan en la **Tabla 3.7**. En dicha tabla se observa que la solubilidad de la fibroína de seda en líquidos iónicos depende de la identidad del catión y del anión, teniendo el anión un efecto mucho mayor. Cuanto más capaces son de participar en el enlace del hidrógeno, mayor es la solubilidad de la fibroína de la seda. Presumiblemente, el líquido iónico rompe el hidrógeno presente en las láminas β . [bmim⁺] [Br⁻], [bmim⁺] [I⁻] y [bmim⁺] [BF₄⁻] fueron ensayados con seda y sericina y se comprobó que la sericina es soluble en [bmim⁺] [Br⁻] y [bmim⁺] [I⁻], pero no en [bmim⁺] [BF₄⁻]. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se empleó el anión [Cl⁻].

Tabla 3.7.
Solubilidad de saturación en % en peso en líquidos iónicos

CATION	ANIÓN				
	Cl ⁻	Br ⁻	I ⁻	BF ₄ ⁻	AlCl ₄ ⁻
[bmim ⁺]	13.2%	0.7% ^a	0.2% ^a	0.0% ^a	<i>c</i>
[dmbim ⁺]	8.3%	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
[emim ⁺]	23.3%	<i>c</i>	<i>c</i>	0.0%	0.0% ^b

^aTanto sericina y fibroína en el disolvente; sólo la sericina es soluble. Con la excepción de [BF₄⁻], estas soluciones no están saturadas. ^bel disolvente es una mezcla de [emim⁺][Cl⁻]/[emim⁺][AlCl₄⁻] con una relación molar de 1.0:0.7. ^csistema no probado.

Los líquidos iónicos también han demostrado su aplicabilidad como solventes en otros polímeros como la celulosa [171], PVA, poliuretano o mezclas de celulosa y seda [172] para formar composites con propiedades específicas para las diferentes aplicaciones.

El ejemplo más reciente de empleo de líquidos iónicos para la disolución y precipitación de fibroína regenerada lo muestra Brauer *et al.* [173] en la patente US20090051068 A1 (KR20100014073A), en la que se describe un método para disolver proteínas en líquidos iónicos, en particular acetatos y cloruros de 1,3-dialquilimidazolio y consiguen regenerar la proteína formando fibras, hojas, films, tubos y membranas por precipitación de la solución de proteína con un disolvente, principalmente metanol, aunque no describe la formación de partículas discretas y el tiempo necesario hasta alcanzar la completa disolución es de aproximadamente 160 minutos, a 90°C, para la fibroína en acetato de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim⁺][Ac⁻]). El grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo la presente tesis lleva varios años trabajando en la disolución de fibroína de seda en líquidos iónicos y en la posterior precipitación de esta en disolventes coagulantes para la obtención de nanopartículas de fibroína de seda. Esta investigación ha conducido a la obtención de una patente española [174] y a un artículo [175].

En cuanto a técnicas energéticas para llevar a cabo el proceso de disolución de seda con líquidos iónicos, la única utilizada hasta ahora ha sido el calentamiento en un baño de aceite termostatado a 100°C para evitar la degradación de la proteína. Sin embargo, el creciente interés por incrementar la eficiencia energética mediante el empleo de técnicas

renovables y ecológicas ha llevado los últimos años a los investigadores a utilizar diversas técnicas energéticas más ecológicas como son la electroquímica, la fotoquímica, la sonoquímica y la radiación por microondas. Aunque no se ha ensayado ninguna de estas técnicas con las proteínas de la seda, si se han utilizado con celulosa.

Ha *et al.* [176] utilizaron la irradiación con microondas para llevar a cabo el proceso de disolución de celulosa con líquidos iónicos. Encontraron que la irradiación por microondas mejoró la solubilidad de la celulosa en líquidos iónicos pero también disminuyó significativamente el grado de polimerización de la celulosa regenerada a partir de la disolución de líquido iónico, dando como resultado una mejora de la hidrólisis de la celulosa. La velocidad de hidrólisis enzimática de la celulosa de algodón aumentó en al menos 12 veces con el uso de líquidos iónicos después del pretratamiento de la disolución a 110° C y por 50 veces después del pretratamiento con los mismos líquidos iónicos con irradiación de microondas.

Liu *et al.* [177] utilizaron [Bmim]⁺[Cl]⁻ para preparar una disolución de fibroína de seda/[Bmim⁺][Cl⁻] con el fin de mezclar poliuretano insoluble en agua con fibroína de seda para preparar biopelículas insolubles en agua. Esta disolución se mezcló directamente con poliuretano en DMF (N,N-dimetilformamida), dando lugar a la unión de los dos polímeros con la conformación de lámina β en la seda como estructura principal en el *film*. El compuesto mostró una buena compatibilidad con la sangre en las pruebas de tiempo de coagulación que se llevaron a cabo, por lo que se demuestra su potencial aplicación como biomaterial.

Diversas publicaciones han seguido esta línea hasta la fecha, en la que el uso de “green solvents” está acaparando un gran interés por la necesidad de conseguir procesos industriales más respetuosos con el medio ambiente [13, 172, 173, 178, 179].

3.2.5. Aplicaciones de la seda regenerada

Una vez obtenida la seda regenerada por evaporación o precipitación se puede utilizar como biomaterial adoptando diversas formas y estructuras, tales como nanofibras, películas, estructuras porosas y micro- y nanopartículas.

3.2.5.1. Nanofibras

Se obtienen a través de un proceso conocido como electrohilado (**Figura 3.26**). Consiste en proyectar a presión una solución de fibroína sometida a un campo eléctrico (~30 KV) sobre un tambor metálico conectado a la tierra, obteniendo así nanofibras de fibroína de un diámetro comprendido entre 100 y 300 nanómetros.

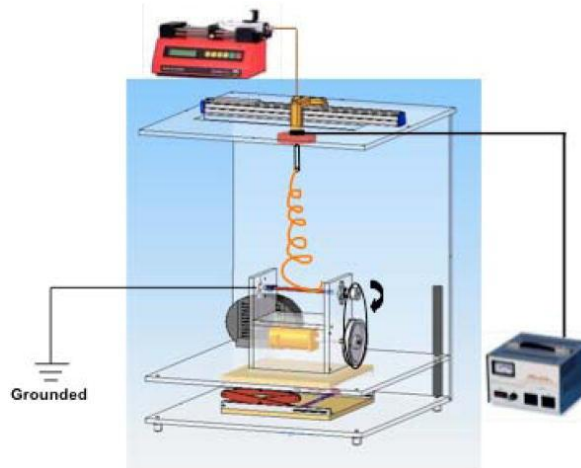


Figura 3.26. Diagrama de un dispositivo de electrohilado [180].

Estas nanofibras, entrelazadas entre sí, tienen una configuración muy similar a la de la matriz extracelular de los tejidos y, por tanto, constituyen un sustrato muy adecuado para el crecimiento de células humanas (**Figura 3.27**, [181]).

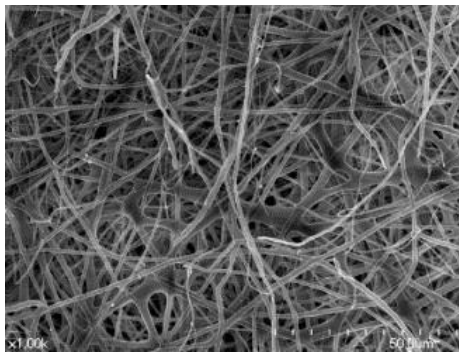


Figura 3.27. Micrográficas SEM de nanofibras de seda obtenidas mediante electrohilado.

El proceso de electrohilado no es tan agresivo como para degradar proteínas, por lo que se pueden incorporar incorporando BMP-2 (*Bone morphogenetic protein*) y gránulos de hidroxiapatito a la solución acuosa de fibroína, se produce por electrohilado un entramado óptimo para el crecimiento y diferenciación de células mesenquimales a tejido óseo [161].

El grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo esta tesis ha desarrollado en los últimos años un estudio para mejorar el mantenimiento de las muestras de fibroína de seda durante los ensayos de electrohilado mediante medidas de viscosidad, densidad e índice de refracción de dichas muestras, así como la caracterización de las propiedades mecánicas y el diámetro de las fibras obtenidas [182].

3.2.5.2. Películas

La presentación más sencilla de la fibroína es en forma de películas y recubrimientos de otros materiales. Para ello, se parte de una solución acuosa de fibroína al 10%, que se vierte en un molde o superficie adecuada y se deja evaporar. Posteriormente, se trata con una solución de metanol, que induce la transición de la estructura proteica parcialmente amorfa (seda tipo I) a una estructura cristalina e insoluble (seda tipo II).

Estas películas se pueden emplear también como recubrimiento de otros biomateriales, tales como celulosa, almidón o colágeno o como mezclas con dichos biomateriales (**Figura 3.28**).

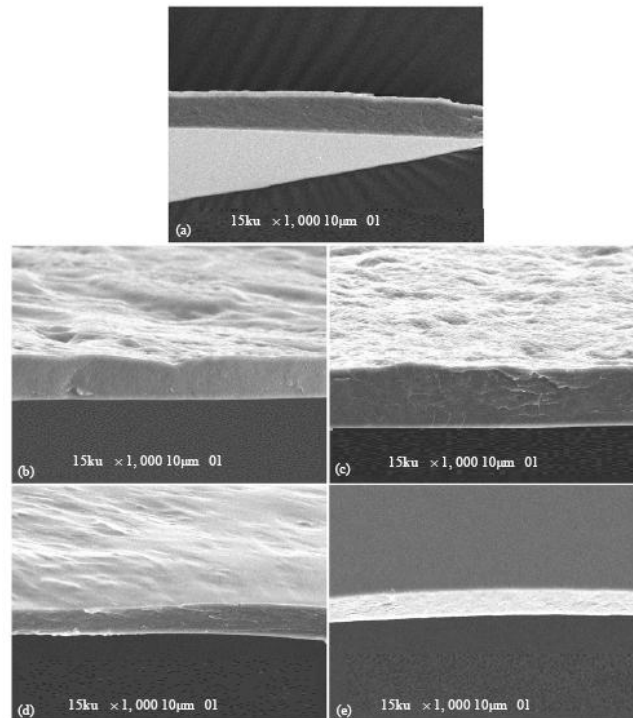


Figura 3.28. Micrografía de películas de fibroína de seda, almidón y mezclas de ambos. (a) Fibroína de seda, SF; (b) SF/almidón (3/1), (c) SF/ almidón (2/2), (d) SF/ almidón (1/3) y (e) almidón.

Por otra parte, las películas de fibroína ha demostrado tener un efecto positivo muy significativo en la regeneración de la piel. Usado como vendaje en dermatotomías, el film de fibroína produce una mayor regeneración del colágeno y menor reacción inflamatoria, que se traduce en tiempos de cicatrización más cortos con respecto a los materiales habitualmente empleados [183]. Una propiedad muy interesante que presentan estos *films* es que contienen en su superficie una gran variedad de residuos aminoacídicos que permiten la posibilidad de decorar su superficie con distintos tipos de ligandos y factores de crecimiento. A través de una modificación química con carbodiimidas o glutaraldehido es posible obtener un acoplamiento covalente del motivo peptídico RGD, lo que favorece la adhesión, proliferación y diferenciación de osteoblastos, fibroblastos y células estromales [158]. También se ha demostrado que es posible decorar films de fibroína con BMP-2 (*Bone morphogenetic protein*) unida al mismo mediante enlace covalente [159]. En estas condiciones, la proteína se retiene en la superficie del film durante un tiempo superior, en relación a la proteína que es simplemente adsorbida a la superficie. Esto se traduce en una mejora significativa en la adhesión y diferenciación de osteoblastos en la formación de tejido óseo [159, 160].

3. Antecedentes

3.2.5.3. Matrices o estructuras porosas (*scaffolds 3D*)

Las matrices porosas (**Figura 3.29**, [184]) se forman añadiendo granos de NaCl de una granulometría conocida a una disolución de fibroína en HFIP (Hexafluoroisopropanol) o de ácido poliaspártico. El efecto de la sal es el de crear huecos. Tras la evaporación del disolvente orgánico, tratamiento con metanol para inducir el cambio a seda tipo II y el lavado de la sal con agua, el resultado es una estructura altamente porosa, con espacios del orden de 100 micras, muy adecuada para el crecimiento celular.

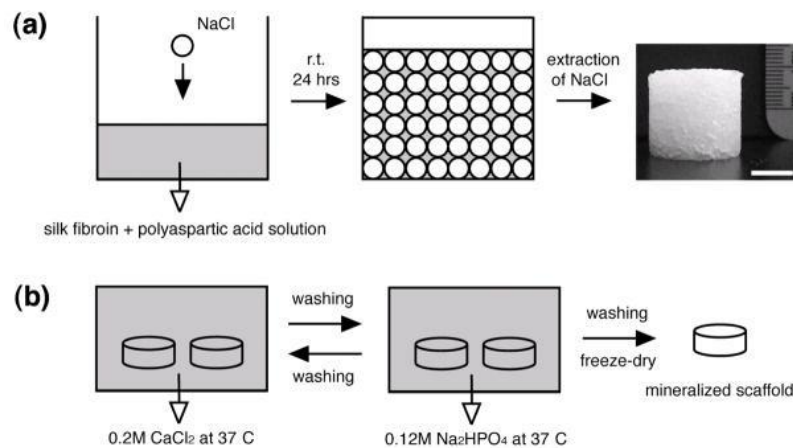


Figura 3.29. Esquema del proceso básico (a) preparación de la matriz porosa del derivado acuoso de fibroína de seda y ácido poliaspártico y (b) mineralización.

Este tipo de matrices porosas se han ensayado ampliamente, en combinación con la adición de BMP-2, para la regeneración de tejido óseo y cartílago a partir de células mesenquimales de la médula ósea [160].

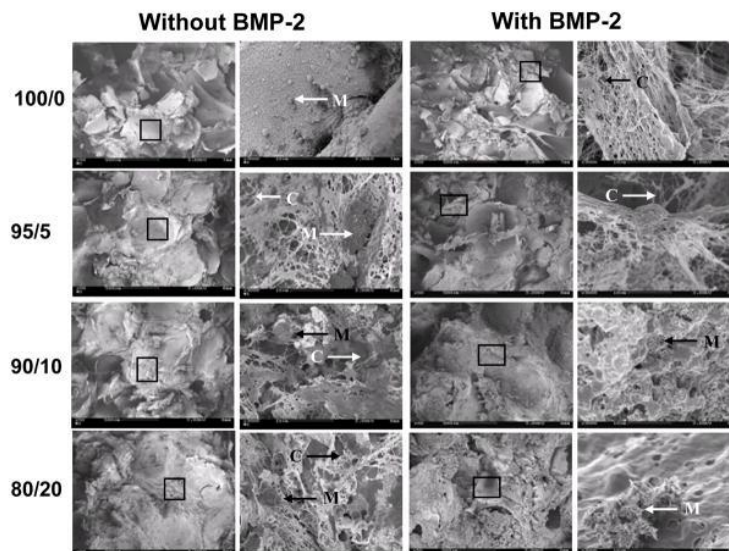


Figura 3.30. Micrografías SEM de matrices porosas de seda sembradas con osteoblastos. Cultivos con y sin BMP-2.

A partir de estos ensayos *in vitro* se ha demostrado que la matriz porosa de fibroína constituye un medio muy adecuado para el crecimiento de células mesenquimales, y la posibilidad adicional de decorar el material con factores de crecimiento se traduce en un

crecimiento y diferenciación de dichas células significativamente más rápido y eficiente que el obtenido con materiales convencionales, tales como el colágeno.

3.2.5.4. Micro- y nanopartículas

La fibroína también puede presentarse en forma de microesferas y nanoesferas para la liberación controlada de fármacos (**Figura 3.31**). Éste es un campo de un enorme interés para la industria farmacéutica. A través del tratamiento de la fibroína con metanol es posible modular el grado de cristalinidad de la estructura proteica en lámina β de la superficie, configurando la capacidad del material para retener y liberar de forma controlada enzimas y proteínas terapéuticas.

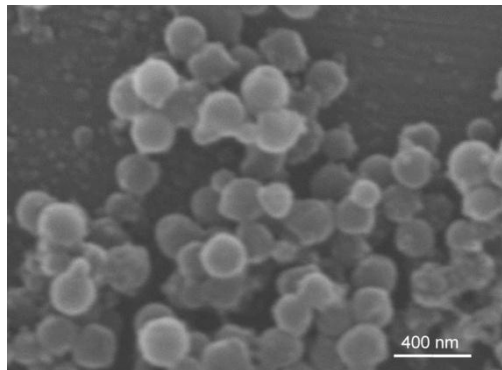


Figura 3.31. Micrografía SEM de nanopartículas de fibroína de seda de 200nm.

Las propiedades únicas de la fibroína de seda, como la lenta biodegradación, sus propiedades mecánicas excepcionales, en combinación con la biocompatibilidad y capacidad para incorporar fármacos, han alimentado un creciente interés en nanomedicina [157].

Históricamente se han empleado dos estrategias para producir partículas a partir de soluciones de proteínas: técnicas de ensamblado asistido por moldes o bien una precipitación inducida por variaciones en las condiciones fisicoquímicas del medio de disolución. Un ejemplo del primer método es el uso de gotas de una emulsión para definir el tamaño y la forma de las partículas [185]. Esta metodología permite el control del tamaño de partícula pero tiene el inconveniente de que es relativamente compleja y requiere estabilizantes de la emulsión y/o agentes entrecruzantes para mantener la rigidez de las partículas [186].

Sin embargo, la estrategia de formación de partículas que hace crecer un núcleo de precipitación por adición de sucesivas moléculas de proteína mediante mezcla con un agente precipitante (disolvente en el que es insoluble la proteína; una sal precipitante; un cambio de pH; cambio de fuerza iónica, etc.) es relativamente simple y escalable y evita los inconvenientes de la estrategia anterior [187].

Diversas revisiones recogen los principales métodos de obtención de partículas de fibroína de seda nativa o transgénica para la liberación controlada de fármacos [188, 189], así como diversas formulaciones o presentaciones alternativas a las partículas.

3.2.5.5. Hidrogeles

Los hidrogeles son estructuras ricas en lámina β formadas por la gelificación de una disolución de fibroína de seda [190]. El proceso de gelificación se ve afectado por la temperatura, la concentración de fibroína y el pH [152, 156] y puede ser acelerado por aditivos [156], mediante sonicación [190] o por agitación en vórtex [191]. Las propiedades [152], la porosidad [152, 190], el comportamiento en la liberación de fármacos [192] y el tiempo de gelificación pueden ser estrechamente controlados a través de la manipulación de las condiciones de procesamiento. Además, en hidrogeles la sonicación puede inducir la formación de microesferas antes de que finalice la gelificación [190, 191]. Las condiciones de gelificación pueden ser seleccionadas para asegurar que la disolución de seda permanezca en estado líquido el tiempo suficiente para completar la gelificación.

Hanawa *et al.* [192] prepararon hidrogeles que posteriormente fueron cargados con benfotiamina, un derivado de la vitamina B1, para estudiar así el comportamiento de su liberación en función de la fibroína y el glicerol contenidos y la presencia de benfotiamina solubilizada en β -ciclodextrina. Los autores encontraron que la liberación de benfotiamina disminuía con el aumento de la concentración de seda en los hidrogeles, la firmeza de los mismos y la concentración de glicerol. La adición de β -ciclodextrina aumentaba la liberación de la benfotiamina y la firmeza del hidrogel.

Fang *et al.* [193] investigaron la liberación de brupenorfin, un analgésico de la morfina, en hidrogeles preparados a partir de distintas concentraciones de seda, encontrando que las propiedades del material y la tasa de liberación del fármaco pueden ser controladas por la concentración de seda.

Los hidrogeles elaborados con una versión genéticamente modificada de seda que contiene elastina, para una mayor solubilidad y velocidad de gelificación y la disminución de la cristalinidad total y la tasa de reabsorción, se han utilizado en una amplia gama de aplicaciones de administración de fármacos, incluyendo ADN de plásmido [194]), adenovirus [194-196], citocromo C, vitamina B12 y teofolina [197].

3.2.6. Biocompatibilidad de la seda

Las fibras de seda de *Bombyx mori* se han utilizado comercialmente para realizar suturas desde finales del siglo XIX y han demostrado ser eficaces biomateriales. Existen evidencias de reacciones biológicas adversas que han cuestionado su biocompatibilidad. Sin embargo, es la sericina, proteína que actúa como cementación que une a las fibras de la fibroína como ya se ha comentado, la que ha sido identificada como la fuente de reacciones inmunogénicas [198, 199].

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que una vez que se extrae la sericina, la fibroína puede servir como soporte celular y para la proliferación para una variedad de tipos de células [200]. Se ha realizado un estudio *in vitro* [201] que sugiere que la fibroína sulfonada inhibe la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Estudios *in vitro*, han examinado la respuesta de macrófagos a la fibroína y han llegado a la conclusión de que la seda en forma de fibra [199] o película [202] no produce la activación de macrófagos. En forma de partículas, sin embargo, hubo activación de macrófagos, aunque los autores especularon que el tamaño de las partículas era la causa.

La reacción inflamatoria *in vivo* a películas de fibroína se ha demostrado que es similar a la de colágeno [203]). Otro estudio indicó que la seda de *Bombyx mori* trenzada produce una respuesta inflamatoria leve tras siete días *in vivo*, mientras que los hilados de seda cubiertos de sericina y ácido poliglicólico (PGA) provocaron una respuesta inflamatoria aguda [204].

La sericina se ha identificado como la causa de la respuesta inflamatoria a la seda de gusano de seda que no se ha sometido a desgomado, pero parece ser que esta respuesta se produce sólo cuando se asocia con fibroína. Películas de sericina, sin fibroína, son capaces de servir de soporte y proliferación de fibroblastos de piel humana [205]. En el último de estos estudios identificaron un componente concreto de sericina, sericina M, que mejora la proliferación celular [206].

Tejidos de seda tratada con metales han demostrado tener cierta actividad antimicrobiana *in vitro* [207]. Del mismo modo, recubrimientos de sericina en fibras de polímero sintético muestran propiedades antibacterianas y antifúngicas [208].

3.2.6.1. Degradación

Cuando se utilizan estructuras (*scaffolds*) en Ingeniería de Tejidos, el comportamiento ideal consiste en que la degradación de la estructura de seda, que sirve de soporte a las células, se produzca con un ritmo similar al crecimiento de tejido nuevo, para que dicho tejido pueda integrarse en el tejido circundante del huésped.

Estudios en cultivos celulares han demostrado que la degradación *in vitro* de *scaffolds* de fibroína de seda porosa es lenta, con una pérdida insignificante de la masa después de cuatro semanas en el cultivo [209]. Estudios de degradación con la exposición sistemática de seda de gusano de seda a diversas enzimas han encontrado que la cantidad de seda disminuye como resultado de la proteólisis [210], ya que es la proteasa la que produce el mayor efecto [211, 212]. Láminas de seda porosas [212] y no porosas [213] pueden ser degradadas significativamente por la exposición a las enzimas después de un día. Hilos de seda expuestos a proteasa exhiben una pérdida de masa de más de 50% en seis semanas y llevan asociada también una pérdida de propiedades mecánicas [211].

Por otra parte, el proceso de desgomado puede causar degradación no deseada de la fibroína [214] y el método de procesamiento de seda también puede afectar al comportamiento de degradación *in vitro*.

El índice de degradación es importante para aplicaciones de ingeniería de tejidos y el control sobre la forma física y sobre el tratamiento posterior de un biomaterial seda pueden permitir adaptar el tiempo de degradación en función de la aplicación concreta. En el caso de hueso, por ejemplo, la capacidad de un *scaffold* para mantener la integridad estructural durante un período prolongado de tiempo es crucial ya que permite el transporte de nutrientes y productos de desecho, mientras que se produce el crecimiento del hueso, se produce la remodelación y se forma una red vascular. En otras situaciones, como la cicatrización de heridas, interesa que la degradación sea más rápida.

3.3. BIBLIOGRAFÍA

- [1] D.T. Allen, D.R. Shonnard, Green engineering: Environmentally conscious design of chemical processes, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ (2002).
- [2] J.F. Brennecke, E.J. Maginn, Ionic liquids: Innovative fluids for chemical processing, *AIChE J.* 47 (2001) 2384-2389.
- [3] ISI Web of Science, <http://www.webofknowledge.com/> (Consultado el 05-09-2016).
- [4] S. Keskin, D. Kayrak-Talay, U. Akman, Ö. Hortaçsu, A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications, *J. of Supercritical Fluids* 43 (2007) 150–180.
- [5] T. Welton, Room temperature ionic liquids: Solvents for synthesis and catalysis, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071–2084.
- [6] S. Sugden, H. Wilkins, The parachor and chemical constitution. Part. Fused metals and salts, *J. Chem. Soc.* (1929) 1291–1298.
- [7] J. Gorman, Faster, better, cleaner? New liquids take aim at old-fashioned chemistry, *Sci. News* 160 (2001) 156–158.
- [8] J.S. Wilkes, J.A. Levisky, R.A. Wilson, C.L. Hussey, A new class of room-temperature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy, and synthesis, *Inorg. Chem.* 21 (1982) 1263-1264.
- [9] A.A. Fannin, D.A. Floreani, L.A. King, J.S. Landers, B.J. Piersma, D.J. Stech, R.L. Vaughn, J.S. Wilkes, J.L. Williams, Properties of 1,3- dialkylimidazolium chloride aluminium chloride ionic liquids. Part 2, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 2614–2627.
- [10] J. Dupont, On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids, *J. Braz. Chem. Soc.* 15 (2004) 341–350.
- [11] R. Renner, Ionic liquids: an industrial cleanup solution, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 410A–413.
- [12] Q. Yang, D.D. Dionysiou, Photolytic degradation of chlorinated phenols in room temperature ionic liquids, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 165 (2004) 229–240.
- [13] J.D. Holbrey, K.R. Seddon, Ionic liquids, *Clean Products and Processes*, 1 (1999) 223-236.
- [14] A. Romero, Líquidos iónicos a temperatura ambiente: un nuevo medio para las reacciones químicas, *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)*, 102 (2008) 79-90.
- [15] A. Stark, K.R. Seddon, in Kirk-Othmer Encyclopaedia of Chemical Technology, ed. A. Seidel, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey 26 (2007) 836–920.

- [16] K.R. Seddon, A. Stark, M. J. Torres, Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 2275-2287.
- [17] P. Wasserscheid, W. Keim, Ionic Liquids - "New solutions" for transition metal catalysis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39 (2000) 3772 -3789.
- [18] J.S. Wilkes, M.J. Zaworotko, Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquid, *Chem. Commun.* 13 (1992) 965- 967.
- [19] B. Ellis, WO 9618459 (to BP Chemicals Limited, UK), Chem. Abstr. 125 (1996) 114635.
- [20] P. Bonhôte, A.P. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyanasundaram, M. Grätzel, Hydrophobic, highly conductive ambient temperature molten-salts, *Inorg. Chem.* 35 (1996) 1168 -1178.
- [21] J.G. Huddleston, H.D. Willauer, R.P. Swatloski, A.E. Visser, R.D. Rogers, Room temperature ionic liquids as novel media for "clean" liquid-liquid extraction, *Chem. Commun.* 16 (1998) 1765-1766.
- [22] N.L. Lancaster, T. Welton, G.B. Young, 2.2 Quality aspects and other questions 21, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (2001) 2267- 2270.
- [23] L. Cammarata, S.G. Kazarian, P.A. Salter, T. Welton, Molecular states of water in room temperature ionic liquids, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3 (2001) 5192-5200.
- [24] J. Fuller, R.T. Carlin, Facile Preparation of Tetrafluoroborate and Trifluoromethanesulfonate Room-temperature Ionic Liquids, *Proc. Electrochem. Soc.* 98 (1999) 227-230.
- [25] S.I. Lall, D. Mancheno, S. Castro, V. Behaj, J.L.I. Cohen, R. Engel, Polycations. Part X. LIPs, a new category of room temperature ionic liquid based on polyammonium salts, *Chem. Commun.* (2000) 2413-2414.
- [26] A.P. de los Ríos, Los líquidos iónicos como nuevos medios de reacción y separación en reacciones de transesterificación enzimáticas, Tesis doctoral, (2007) Universidad de Murcia, España.
- [27] J. Carmichael, C. Hardacre, J.D. Holbrey, K.R. Seddon, M. Nieuwenhuyzen, Structure and bonding in ionic liquids, *Proc. Electrochem. Soc.* 209 (2000) 99-41.
- [28] R. Hagiwara, Y. Ito, Room temperature ionic liquids of alkylimidazolium cations and fluoroanions, *J. Fluorine Chem.* 105 (2000) 221- 227.
- [29] M. Bier and S. Dietrich, Vapor pressure of ionic liquids, *Mol. Phys.* 108 (2010) 1413.

3. Antecedentes

- [30] E.W. Lemmon, M.O. McLinden, D.G. Friend, Thermophysical Properties of Fluid Systems, in NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, edited by P. J. Linstrom and W. G. Mallard, <http://webbook.nist.gov> (Consultado el 05-09-2016).
- [31] Dz.H. Zaitsau, G.J. Kabo, A.A. Stechan, Y.U. Paulechka, A. Tschersich, S.P. Verevkin, A. Heintz, Experimental vapor pressures of 1-alkyl-3-methylimidazolium-bis-(trifluoromethanesulfonyl) imides and a correlation scheme for estimation of vaporization enthalpies of ionic liquids, *J. Phys. Chem. A* 110 (2006) 7303-7306.
- [32] V.N. Emel'yanenko, S.P. Verevkin, A. Heintz, The gaseous enthalpy of formation of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium dicyanamide from combustion calorimetry, vapor pressure measurements, and Ab Initio Calculations, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 3930-3937.
- [33] J.L. Barton, H. Bloom, A Boiling Point Method for Determination of Vapor Pressures of Molten Salts, *J. Phys. Chem.* 60 (1956) 1413-1416.
- [34] J.D. Holbrey, K.R. Seddon, The phase behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborates; ionic liquids and ionic liquid crystals, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 13 (1999) 2133 -2140.
- [35] J. G. Huddleston, A.E. Visser, W.M. Reichert, H.D. Willauer, G.A. Broker, R.D. Rogers, Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation, *Green Chem.* 3 (2001) 156 -164.
- [36] H.L. Ngo, K. LeCompte, L. Hargens, A.B. McEwan, Thermal properties of imidazolium ionic liquids, *Thermochim. Acta.* 357-358 (2000) 97-102.
- [37] S. Takahashi, N. Koura, S. Kohara, M.-L. Saboungi, L. A. Curtiss, Technological and scientific issues of room-temperature molten salts, *Plasmas & Ions* 2 (1999) 91-105.
- [38] N. Meine, F. Benedito, R. Rinaldi, Thermal stability of ionic liquids assessed by potentiometric titration, *Green Chem.* 12 (2010) 1711-1714.
- [39] S. Sowmiah, V. Srinivasadesikan, M.-C. Tseng, Y.-C. Chu, On the Chemical Stabilities of Ionic Liquids. *Molecules*, 14 (2009) 3780-3813.
- [40] Y. Chenfeng, L. Weimin, C. Yunxia, Y. Laigui, Room-temperature ionic liquids: a novel versatile lubricant. *Chem. Commun.* (2001) 2244-2245.
- [41] C.M. Gordon, New developments in catalysis using ionic liquids, *Appl. Catal. A. General* 222 (2001) 101-107.
- [42] T.A. Zawodzinski, R.A. Osteryoung, Oxide and hydroxide species formed on addition of water in ambient-temperature chloroaluminate melts: An ¹⁷O NMR study, *Inorg. Chem.* 29 (1990) 2842-2847.

- [43] M. Koel, Physical and chemical properties of ionic liquids based on the dialkylimidazolium cation, *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.* 49 (2000) 145-155.
- [44] <http://www.merck.com> (Consultado el 05-09-2016).
- [45] A. Noda, K. Hayamizu, M. Watanabe, Pulsed-Gradient spin-echo ^1H and ^{19}F NMR ionic diffusion coefficient, viscosity, and ionic conductivity of non-chloroaluminate room-temperature ionic liquids, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 4603-4610.
- [46] J. Fuller, R.T. Carlin, H.C. DeLong, D. Haworth, Structure of 1-ethyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate-model for room-temperature molten-salts. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1994) 299-300.
- [47] A.B. McEwen, H.L. Ngo, K. LeCompte, J.L. Goldman, Electrochemical properties of imidazolium salt electrolytes for electrochemical capacitor applications, *J. Electrochem. Soc.* 146 (1999) 1687-1695.
- [48] <http://www.solvent-innovation.com/> (Consultado el 05-09-2016).
- [49] A. Noda, M. Watanabe, In Proceedings of the Twelfth International Symposium on Molten Salts (P. C. Trulove, H. C. De Long, G. R. Stafford, S. Deki, eds.), The Electrochemical Society: Pennington NJ, 99-41 (2000) 202-208.
- [50] M. Ma, K.E. Johnson. In Proceedings of the Ninth International Symposium on Molten Salts (C. L. Hussey, D. S. Newman, G. Mamantov, Y. Ito, eds.), *The Electrochemical Society: Pennington NJ*, 94-13 (1994) 179-186.
- [51] A.J. Sun, M. Forsyth, D.R. MacFarlane, Room-temperature molten salts based on the quaternary ammonium ion, *J. Phys. Chem. B.* 102 (1998) 8858-8864.
- [52] A.J. Sun, M. Forsyth, D.R. MacFarlane, *Molten Salt Forum*, 585 (1998) 5-6.
- [53] Z. Gu, J.F. Brennecke, Volumen expansivities and isothermal compressibilities of imidazolium and pyridinium-based ionic liquids, *J. Chem. Eng. Data* 47 (2002) 339-345.
- [54] J.N. Canongia Lopes, T.C. Cordeiro, J.M.S.S. Esperança, H.J.R. Guedes, S. Huq, L.P.N. Rebelo, K.R. Seddon, Deviations from ideality in mixtures of two ionic liquids containing a common ion, *J. Phys. Chem. B.* 109(2005) 3519-3525.
- [55] S.V. Dzyuba, R.A. Bartsch, Recent advances in applications of room-temperature ionic liquid/supercritical CO_2 systems, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 148-150.
- [56] K.R. Seddon, A. Stark, M.J. Torres, Viscosity and density of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids, in *Clean Solvents: Alternative Media for Chemical Reactions and Processing*, Eds. M. Abraham and L. Moens, *ACS Symp Ser.* 819 (2002) 34-49.

3. Antecedentes

- [57] H. Tokuda, K. Hayamiizu, K. Ishii, M.A.B.H. Susan, M. Watanabe, Physicochemical properties and structures of room temperature ionic liquids. 1. Variation of anionic species, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 16593-16600.
- [58] J. Troncoso, C.A. Cerdeirina, Y.A. Sanmamed, L. Romaní, L.P.N. Rebelo, Thermodynamic Properties of Imidazolium-Based Ionic Liquids: Densities, Heat Capacities, and Enthalpies of Fusion of [bmim][PF₆] and [bmim][NTf₂], *J. Chem. Eng. Data* 51 (2006) 1856-1859.
- [59] M. Deetlefs, K.R. Seddon, M. Shara, Predicting physical properties of ionic liquids, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8 (2006) 642-649.
- [60] E. Gómez, B. González, N. Calvar, E. Tojo, A. Domínguez, Physical properties of pure 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate and its binary mixtures with ethanol and water at several temperatures, *J. Chem. Eng. Data* 51 (2006) 2096-2102.
- [61] A.B. Pereiro, A. Rodríguez, Thermodynamic properties of ionic liquids in organic solvents from (293.15 to 303.15) K, *J. Chem. Eng. Data*, 52 (2007) 600-608.
- [62] S.C.P. Hwa, W.T.T. Ziegler, Temperature dependence of excess thermodynamic properties of ethanol-methylcyclohexane and ethanol-toluene systems, *J. Phys. Chem.* 70 (1966) 2572-2593.
- [63] A.B. Pereiro, J.L. Legido, A. Rodríguez, Physical properties of ionic liquids based on 1-alkyl-3-methylimidazolium cation and hexafluorophosphate as anion and temperature dependence, *J. Chem. Thermodyn.* 39 (2007) 1168-1175.
- [64] A.N. Soriano, B.T. Doma Jr., M.-H. Li, Measurements of the density and refractive index for 1-*n*-butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids, *J. Chem. Thermodyn.* 41 (2009) 301-307.
- [65] A.N. Soriano, B.T. Doma Jr., M.-H. Li, Density and refractive index measurements of 1-ethyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids, *J. Taiwan Inst. Chem. E.* 41 (2010) 115-121.
- [66] M. Tariq, P.A.S. Forte, M.F. Costa Gomes, J.N. Canongia Lopes, L.P.N. Rebelo, Densities and refractive indices of imidazolium-and phosphonium-based ionic liquids: Effect of temperature, alkyl chain length, and anion, *J. Chem. Thermodyn.* 41 (2009) 790-798.
- [67] M.G. Montalbán, C.L. Bolívar, F.G. Díaz-Baños, G. Vllora, Effect of temperature, anion, and alkyl chain length on the density and refractive index of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids, *J. Chem. Eng. Data* 60 (2015) 1986-1996.
- [68] J. Jacquemin, P. Husson, A.A.H. Padua, V. Majer, Density and viscosity of several pure and water-saturated ionic liquids, *Green Chem.* 8 (2006) 172-180.
- [69] S. Tiwari, A. Kumar, Diels-Alder reactions are faster in water than in ionic liquids at room temperature, *Angew. Chem. Int. Ed.* 118 (2006) 4942-4943.

- [70] S.N. Baker, G.A. Baker, M.A. Kane, F.V. Bright, The Cybotactic región surrounding fluorescent probes dissolved in 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate: Effects of temperature and added carbon dioxide, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 9663-9668.
- [71] K.R Seddon, A. Stark, M.-J. Torres, Ionic liquid for clean technology, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 2275 -2287.
- [72] O.O Okoturo, T.J. VanderNoot, Temperature dependence of viscosity for room temperature ionic liquids, *J. of Electroanalytical Chem.* 568 (2004) 167-181.
- [73] J.A. Widegren, A. Laesecke, J.W. Magee, The effect of dissolved water on the viscosities of hydrophobic room-temperature ionic liquids, *Chem. Commun.* 12 (2005) 1610-1612.
- [74] D. Swartling, L. Ray, S. Compton, D. Ensor, Preliminary investigation into modification of ionic liquids to improve extraction parameters, *Bull. Biochem. Biotechnol.* 13 (2000) 1-7.
- [75] N.D. Khupse, A. Kumar, Ionic liquids: New materials with wide applications *Indian Journal of Chem.* 49A, (2010) 635-648.
- [76] L.C. Branco, G.V.S.M. Carrera, J. Aires-de-Sousa, I. López Martín, R. Frade, C.A.M. Afonso. Physico-chemical properties of task-specific ionic liquids in: *Ionic Liquids: Theory, Properties, New Approaches Ed. Intech.* (2011) (Chapter 3, 61-94).
- [77] C. Reichardt, Solvents and solvent effects in Organic Chemistry, *Chem. Soc. Rev.* 21 (1992) 147-153.
- [78] A.J. Carmichael, K.R. Seddon, Polarity study of some 1-alkyl-3-methylimidazolium ambient-temperature ionic liquids with the solvatochromic dye, Nile red, *J. Phys. Org. Chem.* 13 (2000) 591-595.
- [79] R.W. Taft, M.J. Kamlet, The solvatochromic comparison method. 2. The a-scale of solvent hydrogen-bond donor (HBD) acidities, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 2886-2894.
- [80] M.J. Muldoon, C.M. Gordon, I.R. Dunkin, Investigations of solvent-solute interactions in room temperature ionic liquids using solvatochromic dyes, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (2001) 433-435.
- [81] S.N.V.K. Aki, J.F. Brennecke, A. Samanta, How polar are room-temperature ionic liquids, *Chem. Commun.* (2001) 413-414.
- [82] D. Behar, C. González, P. Neta, Reaction kinetics in ionic liquids: pulse radiolysis studies of 1-butyl-3-methylimidazolium salts, *J. Phys. Chem. A* 105 (2001) 7607-7614.
- [83] R. Sheldon, Catalytic reactions in ionic liquids, *Chem. Commun.* 23 (2001) 2399-2407.

3. Antecedentes

- [84] J.L. Anthony, E.J. Maginn, J.F. Brennecke, Solution thermodynamics of imidazolium-based ionic liquids and water, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 10942-10949.
- [85] L. Cammarata, S.G. Kazarian, P.A. Salter, T. Welton, Molecular states of water in room temperature ionic liquids, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3 (2001) 5192-5200.
- [86] S.V. Dyzuba, A. Bartsch, New room-temperature ionic liquids with C2-symmetrical imidazolium cations, *Chem. Commun.* 16 (2001) 1466-1467.
- [87] C. Laane, S. Boeren, V. Kees, C. Veeger, Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents, *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1986) 81-87.
- [88] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N.V.K. Aki, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, Octanol-water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green. Chem.* 7 (2005) 83-90.
- [89] J.L. Kaar, A.M. Jesionowski, J.A. Berberich, R. Moulton, J. Russell, The impact of ionic liquid physical properties on enzyme activity and stability, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4125-4131.
- [90] A.E. Visser, J.D. Holbrey, R.D. Rogers, Liquid/liquid extraction of metal ions in room temperature ionic liquids, *Chem. Commun.* (2001) 2484-2485.
- [91] M.G. Montalbán, M. Collado-González, R. Trigo, F.G. Díaz-Baños, G. Villora, Experimental Measurements of Octanol-Water Partition Coefficients of Ionic Liquids, *J. Adv. Chem. Eng.* 5:133 (2015) 1-9.
- [92] F.J. Hernández-Fernández, A.P. de los Ríos, G. Villora, Los líquidos iónicos en la industria química (y II) ¿pueden sustituir a los disolventes orgánicos convencionales?, *Ingeniería Química*, 161 (2008) 132-135.
- [93] M.G. Montalbán, J.M. Hidalgo, M. Collado-González, F.G. Díaz-Baños, G. Villora, Assessing chemical toxicity of ionic liquids on *Vibrio fischeri*: Correlation with structure and composition, *Chemosphere* 155 (2016) 405-414.
- [94] M.T. García, N. Gathergood, P.J. Scammells, Biodegradable ionic liquids. Part II. Effect of the anion and toxicity, *Green Chem.* 7 (2005) 9-14.
- [95] http://webs.uvigo.es/prosepav/WEB_IONIC-LIQUID (Consultado el 05-09-2016).
- [96] http://www.segulab.com/hojas_de_seguridad.php (Consultado el 05-09-2016).
- [97] D.J. Couling, R.J. Bernot, K.M. Docherty, J.K. Dixon, E.J. Maginn, Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms *via* quantitative structure–property relationship modeling, *Green Chem.* 8 (2006) 82–90.
- [98] D.K. Magnusson, J.W. Bodley, D.F. Adams, The activity and stability of alkaline phosphatase in solutions of water and the fused salt ethylammonium nitrate, *J. Sol. Chem.* 13 (1984) 583-587.

- [99] T.L. Husum, C.T. Jorgensen, M.W. Christensen, O. Kirk, Enzyme catalysed synthesis in ambient temperature ionic liquids, *Biocatal. Biotransform.* 19 (2001) 331–338.
- [100] K.-W. Kim, B. Song, M.Y. Choi, in Ionic Liquids: Markedly Enhanced Enantioselectivity of Lipase, *Org. Lett.* 3 (2001) 1507-1509.
- [101] R.M. Lau, F. Van Rantwijk, K.R. Seddon, R.A. Sheldon, Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids, *Org. Lett.* 2 (2000) 4189-4191.
- [102] S.H. Schöfer, N. Kaftzik, P. Wasserscheid, U. Kragl, Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 5 (2001) 425-426.
- [103] A.P. De los Ríos, F.J. Hernández, M. Rubio, D. Gómez, G. Vllora, The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of *Candida antarctica* lipase B in transesterification reactions, *Biocatal. Biotransfor.* 25 (2007) 151-156.
- [104] S. Park, R.J. Kazlauskas, Improved preparation and use of room temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations, *J. Org. Chem.* 66 (2001) 8395–8401.
- [105] A.P. de los Ríos, F.J. Hernández, M. Rubio, D. Gómez, G. Vllora, Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (2007) 190-195.
- [106] S.J. Nara, J.R. Harjani, M.M. Salunkhe, Lipase-catalysed transesterification in ionic liquids and organic solvents: a comparative study, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 2979-2982.
- [107] M. Eckstein, At low water activity α -chymotrypsin is more active in an ionic liquid than in non-ionic organic solvents, *Biotechnol. Lett.* 24 (2002) 867-872.
- [108] J.A. Laszlo, D.L. Compton, α -Chymotrypsin catalysis in imidazolium-based ionic liquids. *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 181-186.
- [109] R.D. Schmidt, R. Verger, Lipases: interfacial enzymes with attractive applications, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37 (1998) 1608-1633.
- [110] A.P. De los Ríos, F.J. Hernández-Fernández, F. Tomás-Alonso, D. Gómez, G. Vllora, Synthesis of flavour esters using free *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids, *Flavour Frag. J.* 23 (2008) 319-322.
- [111] A. Schmidt, J.S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature* 409 (2001) 258-268.
- [112] T. Itoh, E. Akasaki, K. Kudo, S. Shirakami, Lipase-catalyzed enantioselective acylation in the ionic liquid solvent system: Reaction of enzyme anchored to the solvent, *Chem. Lett.* (2001) 262-263.

3. Antecedentes

- [113] A.P. De los Ríos, F.J. Hernández-Fernández, F. Tomás-Alonso, M. Rubio, G. Vllora. Kinetic resolution of rac-1-phenylethanol integrated with separation of substrates and products by a supported ionic liquid membrane, *J. Chem. Technol. Biot.* 84 (2009) 337-342.
- [114] F.J. Hernández Fernández, A.P. De Los Ríos, F. Tomás Alonso, D. Gómez Pérez, G. Vllora, On the development of an integrated membrane process with ionic liquids for de kinetic resolution of rac-2-pentanol, *J. Membrane Sci.* 314 (2008) 238-246.
- [115] Y. Chauvin, S. Einloft, H. Olivier, Catalytic dimerization of propene by nickelphosphine complexes in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride/AlEt[x]Cl[3-x] (x = O, 1) ionic liquids, *Ind. Eng. Chem. Res.* 34 (1995) 1149 -1155.
- [116] S. Steines, B. Drießen- Hölscher, P. Wassercheid, An ionic liquid as catalyst medium for stereoselective hydrogenations of sorbic acid with ruthenium complexes, *J. Prakt. Chem.* 342 (2000) 348-354.
- [117] R.A. Brown, P. Pollet, E. McKoon, C.A. Eckert, C.A. Liotta, P.G. Jessop, Asymmetric hydrogenation and catalyst recycling using ionic liquid and supercritical carbon dioxide, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 1254-1255.
- [118] F.C. Liu, M.B. Abrams, R.T. Baker, W. Tumas, Phase-separable catalysis using room temperature ionic liquids and supercritical carbon dioxide, *Chem. Commun.* 5 (2001) 433-434.
- [119] E.G. Kuntz, Homogeneous catalysis in water, *Chemtech.* 17 (1987) 570-575.
- [120] H. Waffenschmidt, P. Wassercheid, Ionic liquids into regioselective, platinum catalysed hydroformylation, *J. Mol. Catal. A: Chemical* 164 (2000) 61-67.
- [121] C.E. Song, E.J. Roh, Practical method to recycle a chiral (salen)Mn epoxidation catalyst by using an ionic liquid, *Chem. Commun.* 10 (2000) 837-838.
- [122] E. Mizushima, T. Hayashi, M. Tanaka, Palladium-catalysed carbonylation of aryl halides in ionic liquid media: high catalyst stability and significant rate enhancement in alkoxycarbonylation, *Green Chem.* 3 (2001) 76-79.
- [123] T. Welton, Ionic liquids in catalysis, *Coord. Chem. Rev.* 248 (2004) 2459-2477.
- [124] Y. Chauvin, B. Gilbert, I. Guibard, Catalytic dimerization of alkenes by nickel complexes in organochloroaluminate molten salts, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 23 (1990) 1715-1716.
- [125] Y. Chauvin, H. Olivier-Bourbigou, Nonaqueous ionic liquids as reaction solvents, *Chemtech.* 25 (1995) 26 -30.
- [126] L. A. Blanchard, Z. Gu, J. F. Brennecke, High-pressure phase behaviour of ionic liquid/CO₂ systems, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 2437-2444.

- [127] A.G. Fadeer, M.M. Meagher, Opportunities for ionic liquids in recovery of biofuels, *Chem. Commun.* (2001) 295-296.
- [128] F.J. Hernández-Fernández, A.P. de los Ríos, D. Gómez, M. Rubio, G. Vllora, Ternary liquid–liquid equilibria for mixtures of an ionic liquid + n-hexane + an organic compound involved in the kinetic resolution of rac-1-phenyl ethanol (rac-1-phenyl ethanol, vinyl propionate, rac-1-phenylethyl propionate or propionic acid) at 298.2 K and atmospheric pressure, *Fluid Phase Equilib.* 263 (2008) 190-198.
- [129] A.P. De los Ríos, F.J. Hernández Fernández, D. Gómez, M. Rubio, G. Vllora, (Liquid + Liquid) equilibrium for ternary systems containing of an ionic Liquid, n-hexane and an organic compound involved in the kinetic resolution of *rac*-2-pentanol, *Separ. Sci. Technol.* 47 (2012) 300-311.
- [130] M.G. Montalbán, R. Trigo, M. Collado-González, F.G. Díaz-Baños, G. Vllora, Liquid-liquid equilibria for ternary mixtures of 1-alkyl-3-methylimidazolium bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imides, n-hexane and organic compounds at 303.15 K and 0.1 MPa, *J. Chem. Thermodynamics* 103 (2016) 403-413.
- [131] F.J. Hernández-Fernández, A.P. de los Ríos, F. Tomás-Alonso, J.M. Palacios, D. Gómez, M. Rubio, G. Vllora, A SEM–EDX study of highly stable supported liquid membranes based on ionic liquids, *J. Membrane Sci.* 300 (2007) 88-94.
- [132] F.J. Hernández-Fernández, A.P. de los Ríos, M. Rubio, F. Tomás-Alonso, G. Vllora, A novel application of supported liquid membranes based on ionic liquids to the selective simultaneous separation of the substrates and products of a transesterification reaction, *J. Membrane Sci.* 293 (2007) 73-80.
- [133] A.P. De los Ríos, F.J. Hernández Fernández, J. Hernández-Fernández, G. Vllora, Los fluidos supercríticos como disolventes alternativos en la industria química (I). Ventajas frente a los disolventes orgánicos, *Ingeniería Química* Vol. XI, Nº 457 (2008) 136-141.
- [134] A.P. De los Ríos, F.J. Hernández Fernández, M. Rubio Torres, F. Tomás Alonso, D. Gómez Pérez, G. Vllora Cano, Prediction of the selectivity in the recovery of transesterification reaction products using supported liquid membranes based on ionic liquids, *J. Membrane Sci.* 307 (2008) 225-232.
- [135] A.P. De los Ríos, F.J. Hernández Fernández, H. Presa García, D. Gómez Pérez, G. Vllora Cano, Tailoring supported ionic liquid membranes for the selective separation of transesterification reaction compounds, *J. Membrane Sci.* 328 (2009) 81-85.
- [136] A.P. De los Ríos, F.J. Hernández Fernández, M. Rubio, D. Gómez, G. Vllora, Highly selective transport of transesterification reaction compounds through supported liquid membranes containing ionic liquids based on the tetrafluoroborate anion, *Desalination* 250 (2010) 101-104.
- [137] F.J. Hernández-Fernández, A.P. de los Ríos, F. Tomás, J.M. Palacios, G. Vllora, Preparation of supported ionic liquid membranes: influence of the immobilization method of the ionic liquid on their operational stability, *J. Membrane Sci.* 341 (2009) 172-177.

3. Antecedentes

- [138] A.P. de los Ríos, F.J. Hernández-Fernández, F. Tomás, J.M. Palacios, G. Vllora, Stability studies of supported liquid membranes based on ionic liquids: effect of surrounding phase nature, *Desalination* 245 (2009) 776-782.
- [139] A.P. De los Ríos, F.J. Hernández Fernández, F. Tomás Alonso, D. Gómez Pérez, G. Villora Cano, Biocatalytic kinetic resolution of rac-1-phenylethanol and rac-2-pentanol in hexane medium: acyl donor and water content effects, *Can. J. Chem. Eng.* 88 (2010) 442-446.
- [140] Li, X. Principles of fuel cells. Ed. Taylor & Francis, ISBN 1591690226, New York (2006).
- [141] S. Yu, F. Yan, X. Zhang, J. You, P. Wu, J. Lu, Q. Xu, X. Xia, G. Ma, Polymerization of ionic liquid-based microemulsions: a versatile method for the synthesis of polymer electrolytes, *Macromolecules* 41 (2008) 3389-3392.
- [142] F. Yan, S. Yu, X. Zhang, L. Qiu, F. Chu, J. You, J. Lu, Enhanced proton conduction in polymer electrolyte membranes as synthesized by polymerization of protic ionic liquid-based microemulsions, *Chem. Mater.* 21 (2009) 1480-1484.
- [143] F.J. Hernández-Fernández, Desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos basados en el uso de líquidos iónicos, fluidos supercríticos y tecnología de membranas, Tesis doctoral, (2008) Universidad de Murcia, España.
- [144] M.T. Reetz, W. Wiesenhöfer, G. Franciò, W. Leitner, Biocatalysis in ionic liquids: batchwise and continuous flow processes using supercritical carbon dioxide as the mobile phase, *Chem. Commun.* (2002) 992-993.
- [145] F.J. Hernández-Fernández, A.P. de los Ríos, D. Gómez, M. Rubio, G. Vllora, A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems, *Appl. Catal. B-Environ.* 67 (2006) 121-126.
- [146] A.P. De los Ríos, F.J. Hernández Fernández, D. Gómez, M. Rubio, F. Tomás-Alonso, G. Vllora, Understanding the chemical reaction and mass-transfer phenomena in a recirculating enzymatic membrane reactor for green ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems, *J. Supercrit. Fluid.* 43 (2007) 303-309.
- [147] J. Caja, T.D.J. Dunstan, D.M. Ryan, V. Katovic, *In Proceeding of the 39th Power Sources Conference*, (2000) 124-127.
- [148] D.L. Kaplan, W.W. Adams, B. Farmer, C. Viney, Silk: biology, structure, properties and genetics. In: D.L. Kaplan, W.W. Adams, B. Farmer, C. Viney, editors. Silk polymers: materials science and biotechnology. *ACS Symp. Ser.* 544 (1994) 2-16.
- [149] D.L. Kaplan, S.M. Mello, S. Arcidiacono, S. Fossey, K. Senecal, W. Muller, Silk. In: K. McGrath, D.L. Kaplan, editors. Protein based materials. *Boston: Birkhauser* (1998) 103-31.
- [150] J.L. Cenis, La seda como biomaterial en medicina regenerativa http://www.um.es/eubacteria/seda_medicina.pdf (Consultado el 05-09-2016).

- [151] A. Matsumoto, J. Chen, A.L. Collette, U.J. Kim, G.H. Altman, P. Cebe, D.L. Kaplan, Mechanisms of silk fibroin sol-gel transitions, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 21630–21638.
- [152] U.J. Kim, J. Park, C. Li, H.J. Jin, R. Valluzzi, D.L. Kaplan, Structure and properties of silk hydrogels, *Biomacromolecules* 5 (2004) 786–792.
- [153] X. Wang, H.J. Kim, P. Xu, A. Matsumoto, D.L. Kaplan, Biomaterial coatings by stepwise deposition of silk fibroin, *Langmuir*. 21 (2005) 11335-11341.
- [154] X. Hu, X. Wang, J. Rnjak, A.S. Weiss, D.L. Kaplan, Biomaterials derived from silk-tropoelastin protein systems, *Biomaterials*, 31 (2010) 8121-8131.
- [155] P.M. Cunniff, S.A. Fossey, M.A. Auerbach, J.W. Song, D.L. Kaplan, W.W. Adams, R.K. Eby, D. Mahoney, D.L. Vezie, Mechanical and thermal properties of dragline silk from the spider *Nephila clavipes*, *Polym. Adv. Technol.* 5 (1994) 401–410.
- [156] Y. Wang, H.-J. Kim, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials, *Biomaterials* 27 (2006) 6064-6082.
- [157] G.H. Altman, F. Díaz, C. Jakuba, T. Calabro, R.L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D.L. Kaplan, Silk-based biomaterials, *Biomaterials* 24 (2003) 401-416.
- [158] S. Sofia, M.B. McCarthy, G. Gronowicz, D.L. Kaplan, Functionalized silk-based biomaterials for bone formation, *J. Biomed. Mater. Res.* 54 (2001) 139-148.
- [159] V. Karageorgiu, L. Meinel, S. Hofmann, A. Malhotra, V. Volloch, D.L. Kaplan, Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells, *J. Biomed. Mater. Res.* 71 (2004) 528-537.
- [160] V. Karageorgiu, M. Tomkins, R. Fajardo, L. Meinel, B. Snyder, K. Wade, J. Chen, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo, *J. Biomed. Mater. Res.* 78 (2006) 324-334.
- [161] C. Li, C. Vepari, H.-J. Jin, H.J. Kim, D.L. Kaplan, Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 27 (2006) 3115-3124.
- [162] H. Saito, R. Tabeta, T. Asakura, Y. Iwanaga, S. Akira, T. Ozaki, I. Ando, High-resolution carbon-13 NMR study of silk fibroin in the solid state by the cross-polarization-magic angle spinning method. Conformational characterization of silk I and silk II type forms of Bombyx mori fibroin by the conformation-dependent carbon-13 chemical shifts, *Macromolecules*, 17 (1984) 1405–1412.
- [163] M. Tsukada, Y. Gotoh, M. Nagura, N. Minoura, N. Kasi, G. Freddi, Structural changes of silk fibroin membranes induced by immersion in methanol aqueous solution, *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.* 32 (1994) 961-968.

3. Antecedentes

- [164] E.S. Sashina, A.M. Bochek, N.P. Novoselov, D.A. Kirichenko, Structure and solubility of natural silk fibroin, *Russ. J. Appl. Chem.*, 79 (2006) 869-876.
- [165] N.V. Bhat, S.M. Ahirra, Investigation of the structure of silk film regenerated with lithium thiocyanate solution, *J. Polym. Sci.: Polym. Chem. Ed.*, 21, (1983) 1273-1280.
- [166] A.B. Mathur, A. Tonelli, T. Rathke, S. Hudson, The dissolution and characterization of Bombyx mori silk fibroin in calcium nitrate-methanol solution and the regeneration of films, *Biopolymers*, 42 (1997) 61-74.
- [167] S.W. Ha, Y.H. Park, S.M. Hudson, Dissolution of Bombyx mori silk fibroin in the calcium nitrate tetrahydrate-methanol system and aspects of wet spinning of fibroin solution, *Biomacromolecules* 4 (2003) 488-496.
- [168] A. Ajisawa, Dissolution of silk fibroin with calcium chloride-ethanol aqueous solution, *J. Seric. Sci. Jap.* 67 (1998) 91-94.
- [169] G. Freddi, G. Pessina, M. Tsukada, Swelling and dissolution of silk fibroin (Bombyx mori) in N-methyl morpholine N-oxide, *Int. J. Biol. Macromol.* 24 (1999) 251-263.
- [170] D.M. Phillips, L.F. Drummy, D.G. Conrady, D.M. Fox, R.R. Naik, M.O. Stone, P.C. Trulove, H.C. De Long, R.A. Mantz, Dissolution and regeneration of Bombyx mori silk fibroin using ionic liquids, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 14350-14351.
- [171] M.E. Gibril, Z. Yue, L. Xin da, L. Huan, Z. Xuan, L.H. Feng, Y. Muhuo, Current status of applications of ionic liquids for cellulose dissolution and modifications: review, *Int. J. Eng. Sci. Technol.* 1 (2012) 3556-3571.
- [172] S. Songmin, Physical properties of silk fibroin/cellulose blend films regenerated from the hydrophilic ionic liquid. *Carbohydr. Polym.* 86 (2011) 462– 468.
- [173] S. Brauer, B. Kosan, F. Meister, R.-U. Bauer, US Patent 20090051068 A1, (2009).
- [174] G. VÍllora, A.A. Lozano-Pérez, J.L. Cenis-Anadón (2015) Método para la obtención de partículas de proteína regenerada a partir de proteína disuelta, empleando líquidos iónicos y ultrasonidos. Patente Española: ES 2482342.
- [175] A.A. Lozano-Pérez, M.G. Montalbán, S.D. Aznar-Cervantes, F. Cragolini, J.L. Cenis, G. VÍllora, Production of silk fibroin nanoparticles using ionic liquids and high-power ultrasounds, *J. Appl. Polym. Sci.* 132 (2014) 41702.
- [176] S.H. Ha, N.L. Mai, G. An, Y.-M. Koo, Microwave assisted pretreatment of cellulose in ionic liquid for accelerated enzymatic hydrolysis, *Bioresource Technol.* 102 (2011) 1214–1219.
- [177] X. Liu, C. Zhang, W. Xu, C. Ouyang, Blend films of silk fibroin and water-insoluble polyurethane prepared from an ionic liquid, *Mater. Lett.* 65(2011) 2489-2491.

- [178] R.P. Swatloski, S.K. Spear, J.D. Holbrey, R.D. Rogers, Dissolution of cellulose with ionic liquids, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 4974-4975.
- [179] W. Lan, C.-H. Liu, F.-X. Yue, R.C. Sun, J.F. Kennedy, Ultrasound-assisted dissolution of cellulose in ionic liquid, *Carbohydr. Polym.* 86 (2011) 672-677.
- [180] X. Zhang, M.R. Reagan, D.L. Kaplan, Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 988-1006.
- [181] K.H. Kim, L. Jeong, H.N. Park, S.Y. Shin, W.H. Park, S.C. Lee, T.I. Kim, Y.J. Park, Y.J. Seol, Y.M. Lee, Y. Ku, I.C. Rhyu, S.B. Han, C.P. Chung, Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration, *J. Biotechnol.* 120 (2005) 327-339.
- [182] S.D. Aznar-Cervantes, A.A. Lozano-Pérez, M.G. Montalbán, G. Vllora, D. Vicente-Cervantes, G. Vllora, Importance of refrigeration time in the electrospinning of silk fibroin aqueous solutions, *J. Mater. Sci.* 50 (2015) 4879-4887.
- [183] A. Sugihara, K. Sugiura, H. Morita, T. Ninagawa, K. Tubouchi, R. Tobe, H. Izumiya, T. Horio, N.G. Abraham, S. Ikehara, Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 225 (2000) 58-64.
- [184] H.J. Kim, U.J. Kim, H.S. Kim, C. Li, M. Wada, G.G. Leisk, D.L. Kaplan, Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds, *Bone* 42 (2008) 1226-1234.
- [185] E. Donath, G.B. Sukhorukov, F. Caruso, S.A. Davis, H. Möhwald. Novel hollow polymer shells by colloid-templated assembly of polyelectrolytes, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1998) 2201-2205.
- [186] M.A. Vandelli, F. Rivasi, P. Guerra, F. Forni, R. Arletti, Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterisation, in vitro and in vivo studies, *Int. J. Pharm.* 215 (2001) 175-184.
- [187] Y.Q. Zhang, W.-D. Shen, R.-L. Xiang, L.-J. Zhuge, W.-J. Gao, W.-B. Wang, Formation of silk fibroin nanoparticles in water-miscible organic solvent and their characterization, *J. Nanopart. Res.* 9 (2007) 885-900.
- [188] A.S. Lammel, X. Hu, S.H. Park, D.L. Kaplan, T.R. Scheibel, Controlling silk fibroin particle features for drug delivery, *Biomaterials.* 31 (2010) 4583-4591.
- [189] E. Wenk, H.P. Merkle, L. Meinel, Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications, *J. Control. Release* 150 (2011) 128-141.
- [190] X. Wang, J.A. Kluge, G.G. Leisk, D.L. Kaplan, Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation, *Biomaterials* 29 (2008) 1054-1064.
- [191] T. Yucel, P. Cebe, D.L. Kaplan, Vortex-induced injectable silk fibroin hydrogels, *Biophys. J.* 97 (2009) 2044-2050.

3. Antecedentes

- [192] T. Hanawa, A. Watanabe, T. Tsuchiya, R. Ikoma, M. Hidaka, M. Sugihara, New oral dosage form for elderly patients: preparation and characterization of silk fibroin gel, *Chem. Pharm. Bull.* 43 (1995) 284-288.
- [193] J.Y. Fang, J.P. Chen, Y.L. Leu, H.Y. Wang, Characterization and evaluation of silk protein hydrogels for drug delivery, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 54 (2006) 156-162.
- [194] Z. Megeed, J. Cappello, H. Ghandehari, Controlled release of plasmid DNA from a genetically engineered silk-elastinlike hydrogel, *Pharm. Res.* 19 (2002) 954-959.
- [195] K. Greish, K. Araki, D. Li, B.W. O'Malley Jr., R. Dandu, J. Frandsen, J. Cappello, H. Ghandehari, Silk-elastinlike protein polymer hydrogels for localized adenoviral gene therapy of head and neck tumors, *Biomacromolecules* 10 (2009) 2183-2188.
- [196] J. Gustafson, K. Greish, J. Frandsen, J. Cappello, H. Ghandehari, Silk-elastinlike recombinant polymers for gene therapy of head and neck cancer: from molecular definition to controlled gene expression, *J. Control. Release* 140 (2009) 256-261.
- [197] A.A. Dinerman, J. Cappello, H. Ghandehari, S.W. Hoag, Solute diffusion in genetically engineered silk-elastinlike protein polymer hydrogels, *J. Control. Release* 82 (2002) 277-287.
- [198] H.K. Soong, K.R. Kenyon, Adverse reactions to virgin silk sutures in cataract surgery, *Ophthalmology* 91 (1984) 479-483.
- [199] B. Panilaitis, G.H. Altman, J. Chen, H.J. Jin, V. Karageorgiou, D.L. Kaplan, Macrophage responses to silk, *Biomaterials* 24 (2003) 3079-3085.
- [200] M.K. Gupta, S.K. Khokhar, D.M. Phillips, L.A. Sowards, L.F. Drummy, M.P. Kadakia, R.R. Naik, Patterned silk films cast from ionic liquid solubilized fibroin as scaffolds for cell growth, *Langmuir* 23 (2007) 1315-1319.
- [201] K. Gotoh, H. Izumi, T. Kanamoto, Y. Tamada, H. Nakashima, Sulfated fibroin, a novel sulfated peptide derived from silk, inhibits human immunodeficiency virus replication in vitro, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (2000) 1664-1670.
- [202] M. Santin, A. Motta, G. Freddi, M. Cannas, In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin, *J. Biomed. Mater. Res.* 46 (1999) 382-389.
- [203] L. Meinel, S. Hofmann, V. Karageorgiou, C. Kirker-Head, J. McCool, G. Gronowicz, L. Zichner, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo, *Biomaterials* 26 (2005) 147-155.
- [204] Y.K. Seo, G.M. Choi, S.Y. Kwon, H.S. Lee, Y.S. Park, K.Y. Song, Y.J. Kim, J.K. Park, The biocompatibility of silk scaffold for tissue engineered ligaments, *Key Eng. Mat.* 342-343 (2007) 73-76.

- [205] K. Tsubouchi, Y. Igarashi, Y. Takasu, H. Yamada, Sericin enhances attachment of cultured human skin fibroblasts, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (2005) 403-405.
- [206] S. Terada, M. Sasaki, K. Yanagihara, H. Yamada, Preparation of silk protein sericin as mitogenic factor for better mammalian cell culture, *J. Biosci. Bioeng.* 100 (2005) 667-671.
- [207] M. Tsukada, T. Arai, G.M Colonna, A. Boschi, G. Freddi, Preparation of metal-containing protein fibers and their antimicrobial properties, *J. Appl. Polym. Sci.* 89 (2003) 638-644.
- [208] S. Sarovart, B. Sudatis, P. Meesilpa, B.P. Grady, R. Magaraphan, The use of sericin as an antioxidant and antimicrobial for polluted air treatment, *Rev. Adv. Mater. Sci.* 5 (2003) 193-198.
- [209] L. Meinel, V. Karageorgiou, S. Hofmann, R. Fajardo, B. Snyder, C. Li, L. Zichner, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffold, *J. Biomed. Mater. Res. A* 71 (2004) 25-34.
- [210] P. Taddei, T. Arai, A. Boschi, P. Monti, M. Tsukada, G. Freddi, In vitro study of the proteolytic degradation of *Antheraea pernyi* silk fibroin, *Biomacromolecules* 7 (2006) 259-267.
- [211] R.L. Horan, K. Antle, A.L. Collette, Y. Wang, J. Huang, J.E. Moreau, V. Volloch, D.L. Kaplan, G.H. Altman, In vitro degradation of silk fibroin, *Biomaterials* 26 (2005) 3385-3393.
- [212] M. Li, M. Ogiso, N. Minoura, Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets, *Biomaterials* 24 (2003) 357-365.
- [213] T. Arai, G. Freddi, R. Innocenti, M. Tsukada, Biodegradation of *Bombyx mori* silk fibroin fibers and films, *J. Appl. Polym. Sci.* 91 (2004) 2383-2390.
- [214] P. Jiang, H. Liu, C. Wang, L. Wu, J. Huang, C. Guo, Tensile behavior and morphology of differently degummed silkworm (*Bombyx mori*) cocoon silk fibres, *Mater. Lett.* 60 (2006) 919-925.

4

Densidad e índice de refracción de líquidos iónicos basados en sales de 1-alquil-3-metilimidazolio: efecto de la temperatura, el anión y la longitud de la cadena alquílica

“La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante”

Miguel de Unamuno (1864-1936)

4. DENSIDAD E ÍNDICE DE REFRACCIÓN DE LÍQUIDOS IÓNICOS BASADOS EN SALES DE 1-ALQUIL-3-METILIMIDAZOLIO: EFECTO DE LA TEMPERATURA, EL ANIÓN Y LA LONGITUD DE LA CADENA ALQUÍLICA

4.1. INTRODUCCIÓN

Los líquidos iónicos son compuestos orgánicos que están en fase líquida a temperatura ambiente o próxima a esta permaneciendo en este estado en un amplio rango de temperatura. Generalmente, están compuestos por cationes orgánicos voluminosos y por aniones pequeños de naturaleza orgánica o inorgánica [1]. Debido a sus excelentes propiedades, los líquidos iónicos han atraído la atención de numerosos científicos e ingenieros durante los últimos años, como lo demuestra el aumento exponencial del número de artículos publicados en este ámbito [2-5]. A modo de ejemplo, el número de publicaciones relacionadas con líquidos iónicos en el campo de la Ingeniería Química aumentó desde 450 en el año 2002 hasta superar el valor de 5000 en el año 2014 (ISI Web of Science, 2015). Los líquidos iónicos son conocidos por pertenecer a una nueva clase de disolventes “verdes” debido a su baja volatilidad, presión de vapor despreciable, estabilidad química, conductividad térmica y eléctrica elevada, buenas propiedades electroquímicas, capacidad para disolver solutos orgánicos y/o inorgánicos así como gases y a su capacidad de solubilización modulable [1, 2, 6]. Esta última propiedad es probablemente la característica más atractiva porque permite ajustar su composición y propiedades, dependiendo de la aplicación futura del líquido iónico por medio de ligeras modificaciones estructurales del catión o del anión.

La determinación y el análisis de las propiedades fisicoquímicas de los líquidos iónicos tales como la densidad o el índice de refracción es esencial para el diseño y el desarrollo de procesos en los cuales estos se encuentran implicados [7, 8]. En el caso de la densidad, esta se encuentra especialmente relacionada con el diseño de los equipos asociados a los procesos, ya que se suele emplear para determinar parámetros como la velocidad de separación de fases en un equilibrio líquido-líquido, la transferencia de masa, las necesidades energéticas para llevar a cabo el mezclado y el bombeo y el dimensionamiento de equipos. Sin embargo, el índice de refracción de los líquidos iónicos se encuentra más relacionado con propiedades químicas específicas tales como la estructura, la polaridad o la capacidad para formar enlaces por puentes de hidrógeno las cuales son muy útiles a la hora de determinar solubilidades, constantes de equilibrio y velocidades de reacción [9]. Aunque ya existen una gran cantidad de datos de propiedades físicoquímicas de líquidos iónicos publicados en la bibliografía, estos presentan algunas discrepancias por lo que se puede decir que son necesarios más estudios sistemáticos para completar las bases de datos disponibles [10-13].

El objetivo de este capítulo es estudiar la densidad y el índice de refracción de líquidos iónicos basados en sales de imidazolio, así como analizar el efecto de la temperatura, la naturaleza del anión y la longitud de la cadena alquílica del catión sobre las propiedades estudiadas. Además, a partir de los datos experimentales se han estimado correlaciones empíricas que relacionan ambas magnitudes. Por ello, se han estudiado sistemáticamente quince líquidos iónicos a seis temperaturas diferentes (desde 293.15 hasta 343.15K) y a presión atmosférica.

Los líquidos iónicos estudiados son los que se nombran a continuación y aparecen en la **Figura 4.1** agrupados por familias (mismo catión/diferente anión) y mismo anión con diferente longitud de la cadena alquílica del catión:

4. Densidad e índice de refracción de líquidos iónicos basados en sales de 1-alkil-3-metilimidazolio

- Tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazolio, [emim⁺][BF₄⁻]
- Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio, [bmim⁺][BF₄⁻]
- Tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio, [hmim⁺][BF₄⁻]
- Tetrafluoroborato de 1-octil-3-metilimidazolio, [omim⁺][BF₄⁻]
- Triflato de 1-etil-3-metilimidazolio, [emim⁺][TfO⁻]
- Triflato de 1-butil-3-metilimidazolio, [bmim⁺][TfO⁻]
- Octilsulfato de 1-butil-3-metilimidazolio, [bmim⁺][OcSO₄⁻]
- Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio, [bmim⁺][PF₆⁻]
- Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio, [hmim⁺][PF₆⁻]
- Hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio, [omim⁺][PF₆⁻]
- Bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-etil-3-metilimidazolio, [emim⁺][NTf₂⁻]
- Bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-3-metilimidazolio, [bmim⁺][NTf₂⁻]
- Bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-hexil-3-metilimidazolio, [hmim⁺][NTf₂⁻]
- Bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-octil-3-metilimidazolio, [omim⁺][NTf₂⁻]
- Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio, [emim⁺][EtSO₄⁻]

	[BF ₄ ⁻]	[NTf ₂ ⁻]	[TFO ⁻]	[EtSO ₄ ⁻]	[PF ₆ ⁻]	[OctSO ₄ ⁻]
[Emim ⁺]	x	x	x	x		
[Bmim ⁺]	x	x	x		x	X
[Hmim ⁺]	x	x			x	
[Omim ⁺]	x	x			x	

Figura 4.1. Esquema de los líquidos iónicos empleados agrupados por familias de mismo catión/diferente anión y mismo anión con diferentes longitudes de cadena alquílica del catión.

Como se ha mencionado, estos líquidos iónicos han sido elegidos rigurosamente para poder llevar a cabo un estudio sistemático de la densidad y el índice de refracción y poder examinar la influencia de la longitud de la cadena alquílica del catión o del tipo de anión. Además, algunos de ellos son conocidos en la bibliografía por poseer importantes aplicaciones en una amplia variedad de campos de la industria y de la investigación. Es el caso de los iones tetrafluoroborato y el hexafluorofosfato que se emplean como disolventes inertes en la mayoría de reacciones catalizadas por metales de transición proporcionando un medio polar y débilmente coordinado para el catalizador en el que los productos son solubles [14]. Además, se ha demostrado que los iones hexafluorofosfato y bis(trifluorometilsulfonil)imida son excelentes medios de reacción en la obtención de ésteres catalizada por lipasas [15].

La densidad es una propiedad física de los líquidos iónicos ampliamente estudiada debido a su relevancia [16]. La gran mayoría de los líquidos iónicos son más densos que el agua con valores de densidad entre 1 y 1.6 g·cm⁻³ [17]. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, existen ciertas discrepancias entre los valores medidos por los distintos autores que pueden ser atribuidas a la gran influencia de la pureza de los compuestos en los valores medidos de la densidad. Por otro lado, el índice de refracción de los líquidos iónicos ha sido mucho menos estudiado que la densidad, aun cuando su determinación es más rápida, precisa y requiere una menor cantidad de muestra. Frecuentemente, los valores del índice de refracción se han publicado en el caso de sustancias no electrolíticas como una prueba de la pureza de las muestras, debido a la elevada precisión que presentan las nuevas y económicas técnicas usadas para su medida. Sin embargo y, sorprendentemente, estas dos propiedades raramente han sido estudiadas de forma conjunta en la bibliografía a pesar de la fuerte correlación que existe entre ellas, por ejemplo, mediante la ecuación de Lorentz–Lorenz [18].

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Materiales

Casi todos los líquidos iónicos han sido suministrados por IoLitec (Alemania) excepto [bmim⁺][TfO⁻], [bmim⁺][OcSO₄⁻] y [emim⁺][EtSO₄⁻], los cuales fueron proporcionados por Solvent-Innovation (Alemania). Todos los líquidos iónicos presentan una pureza superior al 99% (fracción másica) excepto [emim⁺][BF₄⁻], [bmim⁺][OcSO₄⁻], [C_nmim⁺][PF₆⁻] (con n=4, 8) y [bmim⁺][NTf₂⁻] que presentan una pureza superior al 98% (fracción másica). Debido a su elevada higroscopicidad, los líquidos iónicos se mantuvieron en pentóxido de fósforo durante 24 horas antes de llevar a cabo las medidas. No obstante, se determinó el contenido en agua de los líquidos iónicos antes de su uso mediante un valorador coulombimétrico Metrohm 831 KF Karl Fischer. Para ello, una cantidad de líquido iónico pesada de forma precisa fue valorada empleando HYDRANAL-Coulomat AG (Sigma-Aldrich Chemicals Co., Madrid, España) como reactivo del Karl Fischer. La incertidumbre en las medidas del contenido en agua fue de $\pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ mientras que el contenido en agua de estos líquidos iónicos alcanzó valores de entre 0.8 y 15 ppm. El contenido en haluros de los líquidos iónicos ha sido en todos los casos inferior a 100ppm. El agua empleada fue purificada mediante el Sistema Milli-Q[®] de Merck Millipore alcanzando una resistividad de 18.2 M Ωcm a 25 °C y un valor TOC inferior a ppb.

4.2.2. Determinación de la densidad

La densidad de todos los líquidos iónicos fue medida con un densímetro Anton Paar con un tubo oscilante en U (DMA 4500M) entre 293.15 y 343.15 K. Las incertidumbres estándares, u , son $u(T)=0.03$ K; $u(\rho)=0.00005$ g/cm³ y, dada la pureza de la muestra (99%), la incertidumbre estimada expandida, u_e , es $u_e(\rho)=0.001$ g/cm³ (con un nivel de confianza del 0.95 (k=2)). El equipo fue calibrado mediante la medida de la densidad de agua Milli-Q[®] y del aire circundante siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La cantidad de muestra necesaria (aproximadamente 1mL) fue introducida en el densímetro con una jeringa teniendo la precaución de no introducir burbujas en el tubo para prevenir errores en las medidas. Las medidas se llevaron a cabo al menos por triplicado.

4.2.3. Determinación del índice de refracción

El índice de refracción fue medido mediante un refractómetro ABBE DR-A1 Atago con una longitud de onda de 589 nm. Las incertidumbres estándar, u , son $u(T)=0.5$ K; $u(n)=0.0002$ (nD) y, dada la pureza de la muestra (99%), la incertidumbre estimada expandida, u_e , es $u_e(n)=0.0015$ (nD) (con un nivel de confianza del 0.95 (k=2)). Las medidas del índice de refracción fueron tomadas entre 293.15 y 343.15 K. En este caso, el equipo fue calibrado empleando agua Milli-Q[®] antes de las medidas y se empleó dietiléter como agente de limpieza de la superficie del prisma del refractómetro. La temperatura en la célula fue controlada usando un baño termostático externo que presenta una incertidumbre de ± 0.5 K. Las medidas se llevaron a cabo al menos por triplicado.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Densidad: Resultados y correlación

Para determinar la bondad de nuestras medidas de densidad, en la **Figura 4.2** se muestra la comparación entre los valores experimentales de densidad del $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ determinados en este capítulo y los valores encontrados en la bibliografía a distintas temperaturas. Se observa que nuestras medidas se encuentran en concordancia con las de la bibliografía obteniendo unos valores de desviación estándar entre nuestras medidas y la bibliografía de entre 0.0011 y $0.0023 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ en todo el rango de temperaturas ensayadas (ver **Tabla 4.1**) validando nuestro método experimental. Las pequeñas discrepancias entre los valores podrían ser debidas fundamentalmente al distinto grado de pureza de las muestras, incluyendo restos de agua y haluros, así como a las distintas técnicas experimentales empleadas por los grupos de investigación. Este mismo efecto ha sido observado y publicado por varios autores como, por ejemplo, Hasse *et al.* [19], Huddleston *et al.* [20], Deng *et al.* [21] y Wang *et al.* [22].

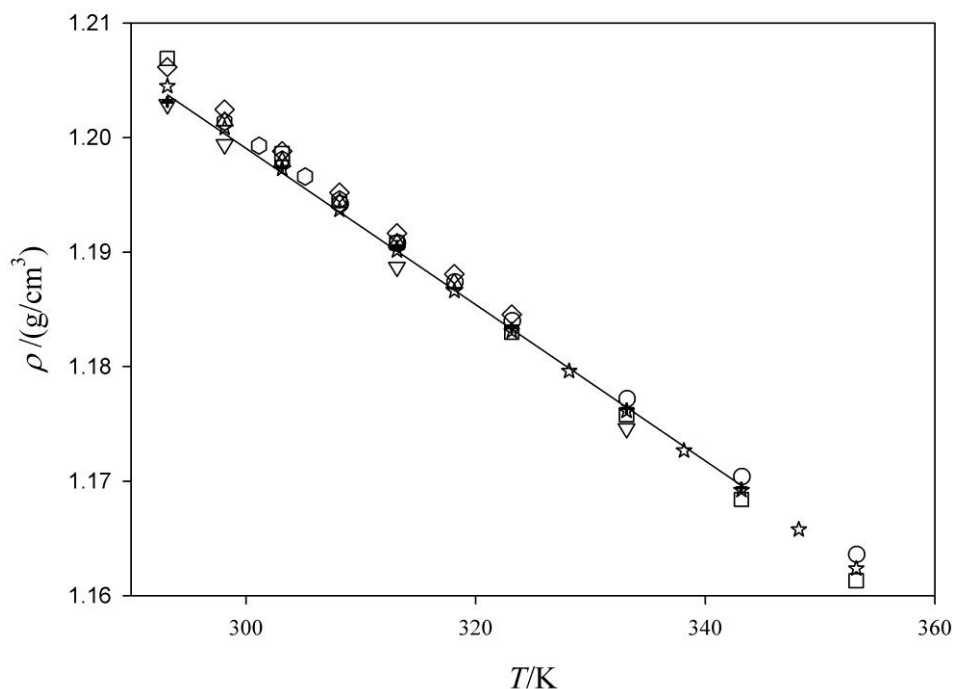


Figura 4.1. Comparación entre los valores de densidad del $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$:
 + y (—) ($\rho = -0.0007T + 1.4036$, $r^2 = 0.9989$), este trabajo; O Soriano *et al.* [23]; ∇ Tariq *et al.* [11];
 Δ Zafarani *et al.* [24]; □ Gardas *et al.* [25]; ◇ Sanmamed *et al.* [6]; ○ Navia *et al.* [26]; ☆ Vakili-Nezhod *et al.* [27].

Tabla 4.1

Valores de densidad ρ y de índice de refracción n experimentales y encontrados en la bibliografía para el tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio, [bmim⁺][BF₄⁻], en el rango de temperaturas entre 293.15 y 343.15K a presión $p=0.1$ MPa*

<i>T</i> / K	[bmim ⁺][BF ₄ ⁻] – $\rho/\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$					
	293.15	303.15	313.15	323.15	333.15	343.15
Este trabajo*	1.20311	1.19737	1.19054	1.18339	1.17634	1.16943
Bibliografía	1.20290 ^a	1.19760 ^b	1.19080 ^b	1.18400 ^b	1.17720 ^b	1.17040 ^b
	1.20460 ^c	1.19788 ^d	1.18870 ^a	1.18600 ^c	1.17460 ^a	1.16840 ^e
	1.20690 ^e	1.19840 ^c	1.19082 ^d	1.18300 ^e	1.17980 ^c	1.17370 ^h
	1.20615 ^g	1.19810 ^f	1.19220 ^c	1.18455 ^g	1.17580 ^e	1.16922 ^j
	1.20447 ^j	1.19860 ^e	1.19080 ^e	1.18310 ^j	1.18105 ⁱ	
		1.19880 ^g	1.19165 ^g		1.17613 ^j	
		1.20050 ^h	1.19400 ^h			
		1.20129 ⁱ	1.19459 ⁱ			
		1.19726 ^j	1.19014 ^j			
Desviación estándar	0.0016	0.0013	0.0018	0.0011	0.0023	0.0021
	[bmim ⁺][BF ₄ ⁻] – n					
	293.15	303.15	313.15	323.15	333.15	343.15
Este trabajo*	1.4220	1.4200	1.4180	1.4160	1.4150	1.4135
Bibliografía	1.4225 ^a	1.4206 ^b	1.4175 ^a	1.4155 ^j	1.4132 ^j	1.4107 ^j
	1.4232 ^j	1.4207 ^j	1.4181 ^j		1.4125 ^a	
Desviación estándar	0.0006	0.0004	0.0003	0.0003	0.0013	0.0020

^aTariq *et al.* [11], ^bSoriano *et al.* [23], ^cZhou *et al.* [10], ^dZafarani *et al.* [24], ^eGardas *et al.* [25], ^fNavia *et al.* [26],

^gSanmamed *et al.* [6], ^hFredlake *et al.* [28], ⁱGomes de Azevedo *et al.* [13], ^jVakili-Nezhod *et al.* [27].

*Las incertidumbres estándar u son $u(\rho)=0.00005$ g/cm³ con $u(T) = 0.03$ K y $u(n)=0.0002$ (nD) con $u(T) = 0.5$ K y, dada la pureza de la muestra (99%), las incertidumbres estimadas expandidas u_e son $u_e(\rho)=0.001$ g/cm³ y $u_e(n)=0.0015$ (nD) (con un nivel de confianza del 0.95 (k=2)).

La densidad de los líquidos iónicos fue determinada a distintas temperaturas (entre 293.15 y 343.15K) y a presión atmosférica. Los valores experimentales son lo que aparecen en la **Tabla 4.2**. Los valores de densidad se han representado frente a la temperatura y se han agrupado por familias de líquidos iónicos como se muestra en la **Figura 4.3** (gráficas a-e) y en la **Figura 4.4**. (gráficas a-d). Todas las figuras presentan la misma escala para facilitar la comparación entre las distintas familias de líquidos iónicos.

4. Densidad e índice de refracción de líquidos iónicos basados en sales de 1-alkil-3-metilimidazolio

Tabla 4.2

Valores experimentales de densidad ρ y de índice de refracción n de los líquidos iónicos estudiados en el rango de temperaturas entre 293.15 y 343.15K a presión $p=0.1$ MPa*

<i>T</i> /K	[emim ⁺][BF ₄ ⁻]		[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]		[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	
	ρ /g·cm ⁻³	<i>n</i>	ρ /g·cm ⁻³	<i>n</i>	ρ /g·cm ⁻³	<i>n</i>
293.15	1.28328	1.4150	1.20311	1.4220	1.14754	1.4275
303.15	1.27566	1.4095	1.19737	1.4200	1.14061	1.4255
313.15	1.26808	1.4070	1.19054	1.4180	1.13368	1.4235
323.15	1.26058	1.4060	1.18339	1.4160	1.12683	1.4215
333.15	1.25315	1.4035	1.17634	1.4150	1.12005	1.4200
343.15	1.24577	1.4020	1.16943	1.4135	1.11331	1.4170
<i>T</i> /K	[omim ⁺][BF ₄ ⁻]		[emim ⁺][TfO ⁻]		[bmim ⁺][TfO ⁻]	
	ρ /g·cm ⁻³	<i>n</i>	ρ /g·cm ⁻³	<i>n</i>	ρ /g·cm ⁻³	<i>n</i>
293.15	1.10635	1.4325	1.38836	1.4330	1.29664	1.4370
303.15	1.09960	1.4305	1.37994	1.4315	1.28869	1.4345
313.15	1.09286	1.4285	1.37156	1.4290	1.28077	1.4320
323.15	1.08616	1.4265	1.36324	1.4265	1.27288	1.4290
333.15	1.07952	1.4245	1.35498	1.4245	1.26502	1.4270
343.15	1.07293	1.4220	1.34676	1.4220	1.25708	1.4260
<i>T</i> /K	[bmim ⁺][O ₂ SO ₄ ⁻]		[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]		[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	
	ρ /g·cm ⁻³	<i>n</i>	ρ /g·cm ⁻³	<i>n</i>	ρ /g·cm ⁻³	<i>n</i>
293.15	1.07139	1.4715	1.37071	1.4100	1.29726	1.4180
303.15	1.06484	1.4685	1.36236	1.4080	1.28937	1.4155
313.15	1.05839	1.4660	1.35399	1.4055	1.28149	1.4130
323.15	1.05200	1.4635	1.34570	1.4030	1.27362	1.4105
333.15	1.04561	1.4615	1.33749	1.4010	1.26580	1.4080
343.15	1.03926	1.4595	1.32936	1.3990	1.25804	1.4060
<i>T</i> /K	[omim ⁺][PF ₆ ⁻]		[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]		[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	
	ρ /g·cm ⁻³	<i>n</i>	ρ /g·cm ⁻³	<i>n</i>	ρ /g·cm ⁻³	<i>n</i>
293.15	1.24019	1.4235	1.52383	1.4235	1.44033	1.4284
303.15	1.23253	1.4210	1.51374	1.4210	1.43081	1.4250
313.15	1.22499	1.4185	1.50371	1.4185	1.42016	1.4214
323.15	1.21745	1.4160	1.49374	1.4160	1.41155	1.4185
333.15	1.20992	1.4140	1.48385	1.4135	1.40221	1.4162
343.15	1.20243	1.4115	1.47397	1.4110	1.39163	1.4130
<i>T</i> /K	[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]		[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]		[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	
	ρ /g·cm ⁻³	<i>n</i>	ρ /g·cm ⁻³	<i>n</i>	ρ /g·cm ⁻³	<i>n</i>
293.15	1.37633	1.4310	1.32480	1.4335	1.24130	1.4781
303.15	1.36717	1.4285	1.31590	1.4305	1.23501	1.4742
313.15	1.35804	1.4260	1.30704	1.4280	1.22781	1.4725
323.15	1.34897	1.4235	1.29823	1.4250	1.22132	1.4710
333.15	1.33995	1.4205	1.28942	1.4225	1.21456	1.4690
343.15	1.33097	1.4180	1.28065	1.4200	1.20794	1.4665

* Las incertidumbres estándar u son $u(\rho)=0.00005$ g/cm³ con $u(T) = 0.03$ K y $u(n)=0.0002$ (nD) con $u(T) = 0.5$ K y, dada la pureza de la muestra (99%), las incertidumbres estimadas expandidas u_e son $u_e(\rho)=0.001$ g/cm³ y $u_e(n)=0.0015$ (nD) (con un nivel de confianza del 0.95 ($k=2$)).

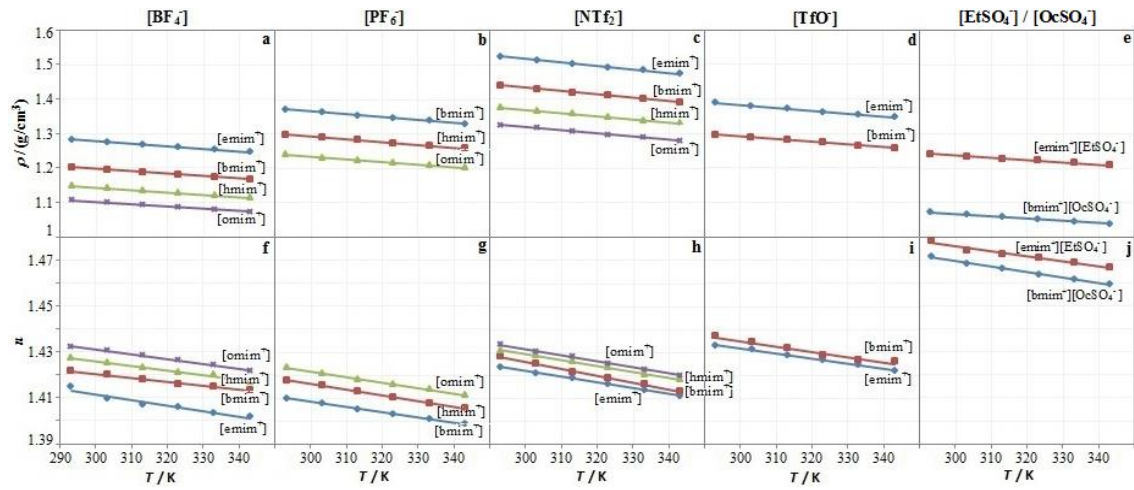


Figura 4.2. Densidad (ρ) e índice de refracción (n) de los líquidos iónicos estudiados agrupados por familias con el mismo anión pero diferente longitud de la cadena alquílica del catión: $[\text{BF}_4^-]$ (a, f) $[\text{PF}_6^-]$ (b, g) $[\text{NTf}_2^-]$ (c, h) $[\text{TfO}^-]$ (d, i) $[\text{EtSO}_4^-]$ and $[\text{OcsO}_4^-]$ (e, j). Los parámetros del ajuste lineal se encuentran en las **Tablas A4.2** (ρ) y **A4.8** (n) (Anexo al Capítulo 4).

Como puede observarse en la **Figura 4.3** (gráficas a-e), la densidad del líquido iónico aumenta cuando la longitud de la cadena del catión disminuye, estableciéndose el siguiente orden: $[\text{emim}^+] > [\text{bmim}^+] > [\text{hmim}^+] > [\text{omim}^+]$. Esto puede deberse a que al aumentar la longitud de la cadena alquílica aumenta el volumen ocupado por el catión debido a una mayor separación interiónica y a una menor eficiencia de empaquetamiento por lo que se produce una disminución de la densidad global [29].

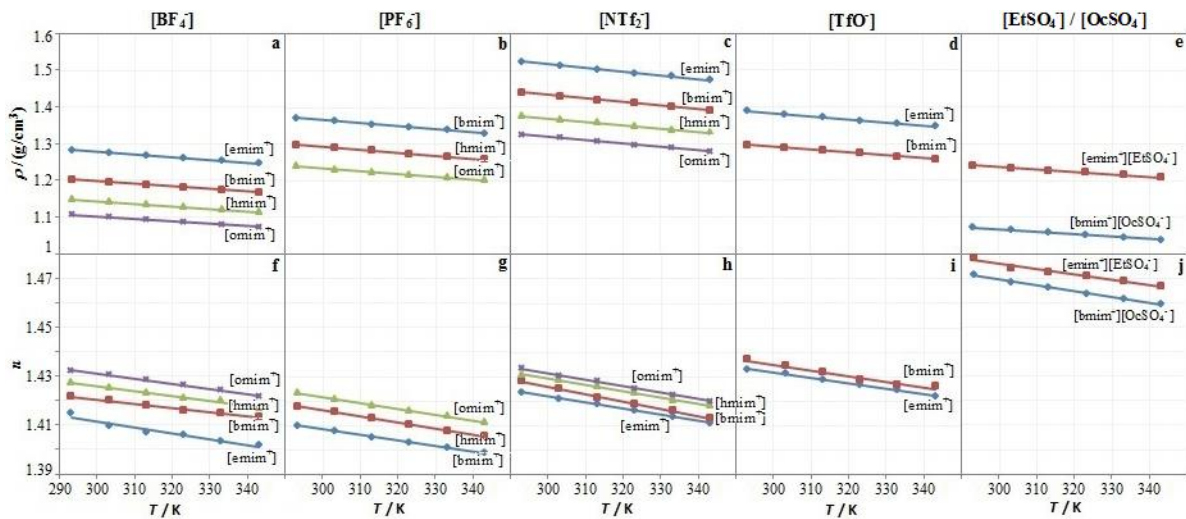


Figura 4.3. Densidad (ρ) e índice de refracción (n) de los líquidos iónicos estudiados agrupados en familias con el mismo catión: $[\text{emim}^+]$ (a, e) $[\text{bmim}^+]$ (b, f) $[\text{hmim}^+]$ (c, g) $[\text{omim}^+]$ (d, h). Los parámetros del ajuste lineal se encuentran en las **Tablas A4.2** (ρ) y **A4.8** (n) (Anexo al Capítulo 4).

A la vista de la **Figura 4.4** (gráficas a-d), se puede concluir el siguiente orden en la densidad para las familias con el mismo catión: $[\text{NTf}_2^-] > [\text{PF}_6^-] > [\text{TfO}^-] > [\text{BF}_4^-] > [\text{EtSO}_4^-] > [\text{OcSO}_4^-]$. La mayoría de los autores [5, 11, 30] afirman que la densidad de los líquidos iónicos aumenta con el peso molecular del anión. En nuestro caso, el orden (en peso molecular descendente) es: $[\text{NTf}_2^-]$ ($280.133 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) $>$ $[\text{OcSO}_4^-]$ ($209.280 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) $>$ $[\text{TfO}^-]$ ($149.062 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) $>$ $[\text{PF}_6^-]$ ($144.961 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) $>$ $[\text{EtSO}_4^-]$ ($125.126 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) $>$ $[\text{BF}_4^-]$ ($86.802 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Lo que demuestra que nuestros resultados no siguen la regla mencionada previamente. A continuación, se explicará esta discrepancia usando los volúmenes moleculares.

La densidad de los líquidos iónicos estudiados disminuye linealmente cuando la temperatura aumenta. Este comportamiento lineal es habitual para los líquidos iónicos debido a la pronunciada diferencia entre las temperaturas de trabajo y las temperaturas críticas (inalcanzables y, por tanto, hipotéticas). Los datos experimentales de densidad fueron ajustados a una ecuación del tipo ($\rho = \rho_0 T + \rho_1$), cuyos parámetros se recogen en la **Tabla A4.1** del Anexo al Capítulo 4 con sus desviaciones estándar (S.D). Los valores de S.D. fueron calculados aplicando la siguiente expresión:

$$S.D = \left[\frac{\sum (z_{\text{exp}} - z_{\text{cal}})^2}{n} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

La **Figura 4.5** muestra claramente la variación de ρ_1 (en la ecuación $\rho = \rho_0 T + \rho_1$) como una función de los distintos aniones y cationes. Si se representa lo mismo para ρ_0 se obtiene la misma dependencia. Otros autores también observaron el mismo comportamiento, como Fredlake *et al.* [28], Li *et al.* [31] y Marsh *et al.* [17] que demostraron que en el caso del catión 1-alkil-3-metilimidazolio si se reemplaza el anión $[\text{PF}_6^-]$ por el $[\text{BF}_4^-]$ aumenta sustancialmente la solubilidad del líquido iónico en agua, mientras que si se reemplaza por el anión $[\text{NTf}_2^-]$ disminuye la solubilidad en agua. Además, si aumenta la longitud de la cadena lateral del catión de 1 a 9 en el hexafluorofosfato de 1-alkil-3-metilimidazolio el líquido iónico pasa de ser muy soluble a ser insoluble en agua. Por tanto, es posible concluir que la densidad del líquido iónico se puede modular dependiendo de la estructura del catión y del anión y que esto afecta en gran medida a otras propiedades del mismo.

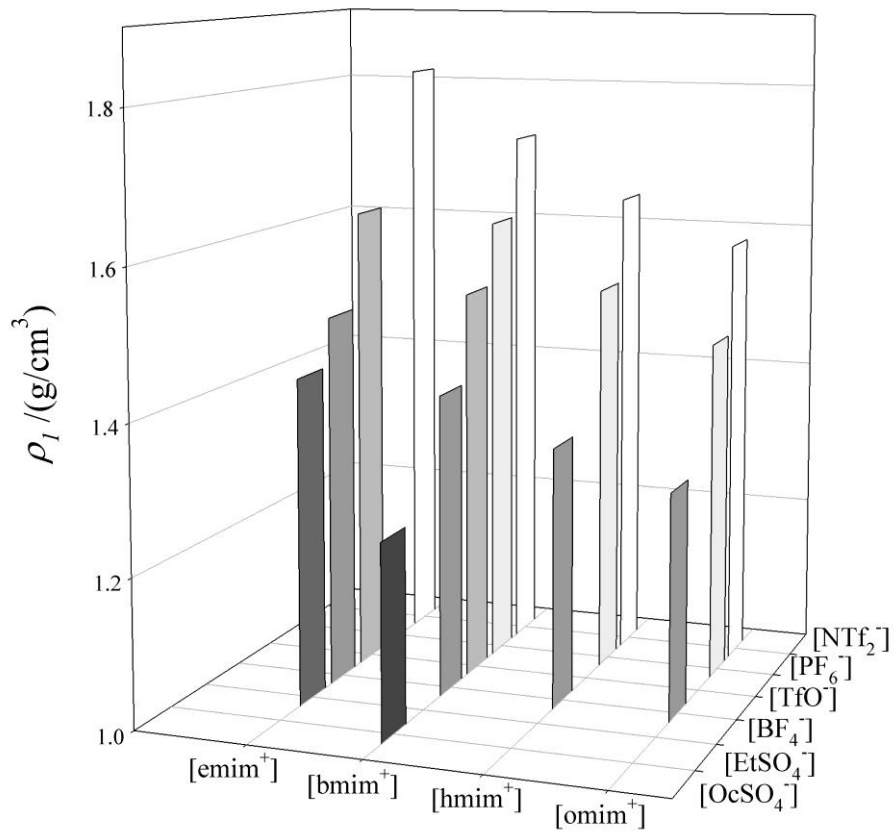


Figura 4.5. Variación de ρ_I (en la ecuación $\rho = \rho_0 T + \rho_I$) como una función de diferentes aniones y cationes.

Tal y como se observa en la **Tabla A4.1** del Anexo al Capítulo 4, es posible concluir que la disminución en la densidad debida al aumento de la temperatura es ligeramente menor cuando la longitud de la cadena del catión aumenta, lo que de nuevo resulta coherente con la premisa de una menor eficiencia de empaquetamiento cuando las cadenas son más largas. El efecto de la variación de la temperatura sobre la densidad no sigue una tendencia con el peso molecular del anión.

A partir de los datos de densidad, los cuales ya se ha comentado que son dependientes de la temperatura, es posible calcular el coeficiente de expansión térmica, α_p , mediante la siguiente expresión:

$$\alpha_p = - \left(\frac{\partial \rho}{\partial T} \right)_p \quad (2)$$

Los coeficientes α_p para todos los líquidos iónicos estudiados en el rango de temperatura entre 293.15 y 343.15K se muestran en la **Tabla A4.2** del Anexo al Capítulo 4. Los valores obtenidos varían en el rango (5.47-6.78) (10^{-4} K^{-1}), que son valores usuales para los líquidos iónicos [16, 29].

4.3.2. Predicción de la densidad y el volumen molecular de los líquidos iónicos

También es posible analizar nuestros resultados en términos de volumen. El volumen es una magnitud que proporciona más información acerca de la estructura y la eficiencia de empaquetamiento que la densidad y, de igual modo, las conclusiones y las predicciones obtenidas para el volumen pueden ser extrapoladas directamente a los valores de densidad. El volumen molecular V_m de una sal es una magnitud física observable que se define como la suma de los volúmenes iónicos, V_{ion} , de los iones constituyentes [32]. Para un líquido iónico binario, V_m se define como:

$$V_m = V_{cat} + V_{an} \quad (3)$$

Definiendo el volumen molecular (V_m) como

$$V_m = (M_w / \rho) / N_A \quad (4)$$

donde M_w es el peso molecular y N_A es el número de Avogadro, es posible estudiar la influencia de las características de los iones sobre el V_m (ver **Tabla A4.2**).

En cuanto a los cationes, nuestros datos (ver **Figura A4.1** y **Tabla A4.2** del Anexo al Capítulo 4) revelan un aumento lineal de V_m cuando la longitud de la cadena alquílica aumenta y, por tanto, cuando el volumen del catión aumenta. A partir de la pendiente del ajuste lineal de dV_m/dN_C , siendo N_C el número de carbonos de la cadena alquílica, es posible calcular el volumen de un grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) como $0.0281 \pm 0.0004 \text{ nm}^3$ (entre 0.0279 y 0.0289 nm^3) a 293.15 K , correspondiendo a un volumen molar de $17 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$. Estos valores concuerdan con los obtenidos por Kolbeck *et al.* [29] (0.0283 nm^3), Glasser [33] (0.0272 - 0.0282 nm^3) y Tariq *et al.* [11] ($17 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$) a 298.15 K . Por tanto, de acuerdo con nuestros resultados, se observa que, cada vez que se añade un grupo metileno a la cadena alquílica del catión, el aumento en el volumen molecular es siempre el mismo independientemente de la naturaleza del anión del líquido iónico y, como consecuencia, el volumen que ocupa el catión varía de forma lineal con el número de carbonos. Así, se puede concluir que la longitud de la cadena no afecta en gran medida a la interacción entre los iones o a la eficiencia de empaquetamiento de los cationes.

Es posible estudiar el efecto del volumen del ion en el V_m global. El volumen iónico es una medida del tamaño de un ion independientemente de que este sea simétrico o no. Sin embargo, determinar de forma cuantitativa el volumen de los constituyentes de un líquido iónico no es una tarea sencilla. Una forma de hacerlo es determinar la contribución de uno de los iones al volumen molecular y, a partir de la ecuación (3), obtener el otro volumen iónico. Para hacer esto, Slattery *et al.* [32] propusieron estimar el volumen del catión mediante estructuras cristalinas (por ejemplo, empleando la base de datos CCDC) [34] que contienen el ión de interés combinado con un ión de referencia de volumen conocido o predicho mediante métodos de contribución estudiados por Rebelo *et al.* [35] y Jacquemin *et al.* [36, 37]. A partir de los volúmenes catiónicos obtenidos por Slattery *et al.* [32] y nuestros volúmenes moleculares experimentales para cada temperatura, hemos determinado la fracción del volumen molecular no ocupada por el catión, V_{an} , y la densidad correspondiente a ese volumen, ρ_{an} ($\rho_{an} = M_{wanion} / V_{an}$). Los valores de V_m , M_w , M_{wanion} , V_{an} y ρ_{an} se muestran en la **Tabla A4.3** del Anexo al Capítulo 4. Sin embargo, creemos que esta aproximación puede mejorarse. El volumen iónico asigna una cierta fracción del volumen molecular total a uno de

los iones y, al hacer eso, el volumen iónico es una medida no solo del volumen de la estructura molecular real del ión sino que también incluye la separación interiónica. La separación interiónica está relacionada con la separación entre los iones, principalmente debido a atracciones electrostáticas, y con la geometría de sus estructuras moleculares, su polarizabilidad, su capacidad para formar otros enlaces (por ejemplo, por puentes de hidrógeno) y otros factores. Por tanto, no sería riguroso asumir que el volumen del catión no se ve afectado por el anión que le acompaña que es lo en lo que se basa este método y, al mismo tiempo, asumir que el volumen del anión cambia con el catión de forma significativa (por ejemplo, en la **Tabla A4.3** del Anexo al Capítulo 4, se observa un incremento del 35% de [emim⁺] a [omim⁺] para el [BF₄⁻]). Otra cuestión a tener en cuenta es que en este tratamiento no está claro el efecto de la temperatura en los volúmenes iónicos. Por tanto, si se asume que la estructura molecular (por ejemplo, enlaces covalentes) es independiente de la temperatura en un cierto rango de temperatura, pero que un incremento de la misma disminuye la densidad (y aumenta V_m), entonces el incremento del volumen iónico significaría que las distancias interiónicas aumentan. Siguiendo nuestro argumento, si no hay cambio en la estructura molecular que justifique un cambio significativo en la geometría de empaquetamiento, la principal razón para el aumento de la distancia interiónica sería una disminución en la fuerza de interacción lo que debería tener otras consecuencias conocidas como una disminución de la viscosidad.

Lo que nosotros proponemos es una forma alternativa para asignar el volumen iónico y así explicar nuestros resultados experimentales de densidad. De sobra es conocido que es posible estimar de forma teórica el volumen de una cierta estructura química. Concretamente, hemos usado la página web chemicalize.org [38] para determinar el volumen de van der Waals de los iones estudiados. Sin embargo, este volumen no es el volumen iónico porque solo tiene en cuenta la estructura molecular aislada y no depende de la temperatura. Por lo tanto, nuestra propuesta consiste en asignar el volumen iónico a partir de los volúmenes de los componentes calculados de forma teórica y de los valores experimentales de densidad que son dependientes de la temperatura.

Tabla 4.3

Volumen de la estructura molecular a partir de cálculos teóricos (volumen estructural), volumen iónico propuesto en este trabajo y el volumen iónico propuesto por Slattery *et al.* [32] para los cationes del tipo alquil-methylimidazolio presentes en los líquidos iónicos estudiados en este trabajo a 293.15K y a presión $p=0.1$ MPa.

Catión	Volumen estructural /nm ³ -teórico-	Volumen iónico /nm ³ - este trabajo -	Volumen iónico /nm ³ - Slattery <i>et al.</i> [32]-
[emim ⁺]	0.11553	0.19142	0.156
[bmim ⁺]	0.14945	0.24762	0.196
[hmim ⁺]	0.18341	0.30388	0.242
[omim ⁺]	0.21735	0.36012	0.288

A partir de los valores teóricos del volumen de van der Waals obtenidos para el conjunto de cationes alquil-metilimidazolio empleados en este trabajo (ver **Tabla 4.3**) es posible asignar el volumen molecular que presenta un grupo metileno (-CH₂-), $V_{(CH_2)Teór}=0.01697\pm 0.00001$ nm³. Por tanto, si comparamos este valor con el obtenido a partir de los valores experimentales de densidad a 293.15K, $V_{(CH_2)Densidad}=0.0281\pm 0.0004$ nm³, se observa un incremento del 65.7%. Según nuestra hipótesis, este incremento incluye la fracción de distancia interiónica que le corresponde al catión. Dado que este incremento es el mismo independientemente de la longitud de la cadena alquílica del catión o del anión, parece lógico suponer que dicho incremento es aproximadamente igual para el volumen de la molécula completa calculado de forma teórica, lo que nos permite atribuir un volumen iónico al catión.

A modo comparativo, la **Tabla 4.3** muestra los volúmenes iónicos calculados por Slattery *et al.* [32] para los cationes presentes en este trabajo, los cuales son sistemáticamente inferiores a los nuestros. Además, ellos propusieron $V_{-CH_2}=0.023 \text{ nm}^3$, que es un valor inferior al nuestro y a otro encontrado en la bibliografía (ver más abajo). Por tanto, en contraste con Slattery *et al.* [32] que proponían un incremento absoluto constante del volumen iónico, nosotros proponemos un incremento porcentual constante con la longitud de la cadena alquílica.

Empleando la ecuación (3), es posible obtener el volumen iónico ocupado por los aniones a 293.15K (ver **Tabla 4.4**)

Tabla 4.4

Volumen de la estructura molecular a partir de cálculos teóricos (volumen estructural) y volumen iónico propuesto en este trabajo para los aniones presentes en los líquidos iónicos estudiados a 293.15K y a presión $p=0.1 \text{ MPa}$.

Anión	Volumen estructural/ nm^3 -teórico-	Volumen iónico/ nm^3 - este trabajo -	% incremento
[BF ₄ ⁻]	0.05420	0.0634±0.0008	17
[PF ₆ ⁻]	0.07135	0.0952±0.0007	33
[TfO ⁻]	0.08520	0.1201±0.0010	41
[EtSO ₄ ⁻]	0.09639	0.1242	29
[NTf ₂ ⁻]	0.15671	0.2349±0.0002	50
[OcSO ₄ ⁻]	0.19820	0.2919	47

Este procedimiento presenta varias ventajas. En primer lugar, hemos sido capaces de obtener un volumen iónico lógico para los aniones que intervienen en los líquidos iónicos estudiados. Nuestros resultados han demostrado que el volumen iónico del anión no varía prácticamente con la longitud de la cadena alquílica del catión.

En segundo lugar, se ha conseguido una muy buena correlación entre el volumen molecular y ambos volúmenes iónicos, el del catión y también el del anión.

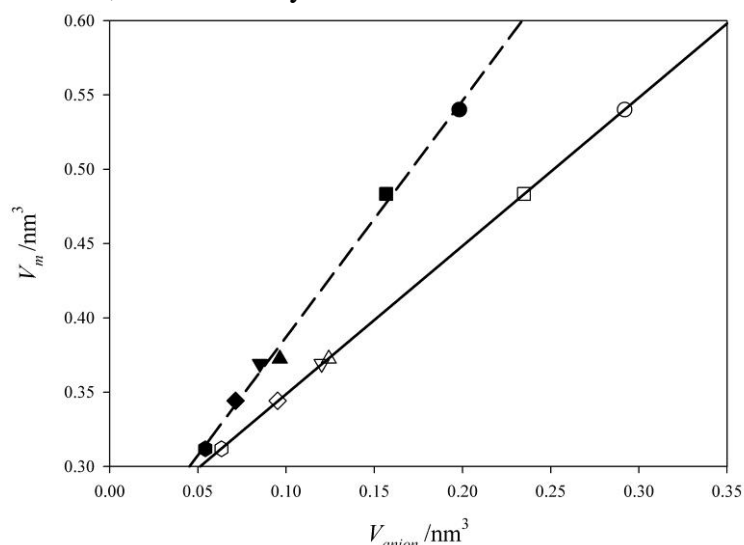


Figura 4.6. Representación del volumen molecular a 293.15 K de los líquidos iónicos basados en [bmim⁺] frente al volumen del anión. ● [OcSO₄⁻]; ■ [NTf₂⁻]; ▲ [EtSO₄⁻]; ▼ [TfO⁻]; ◆ [PF₆⁻]; ● [BF₄⁻]. El volumen molecular del [bmim⁺][EtSO₄⁻] no ha sido medido, es un valor predicho. Los símbolos con relleno representan los volúmenes aniónicos de van der Waals calculados de forma teórica mientras que los símbolos sin relleno representan el volumen iónico propuesto en este trabajo a partir de la media de las medidas experimentales de densidad (**Tabla 4.4**). En este gráfico las desviaciones estándar son inferiores al tamaño de los símbolos. Resultados del ajuste: - - - Volumen teórico $V_m=1.592V_{an}+0.2279 \text{ nm}^3$, $r^2=0.9956$. ——— Volúmenes iónicos $V_m=0.9980V_{an}+0.2489 \text{ nm}^3$, $r^2=0.99999$.

En la **Figura 4.6** se observa que el volumen del anión es el factor clave para determinar el volumen molecular siendo mayor el volumen molecular cuando aumenta el volumen del anión. De acuerdo con los cálculos teóricos (**Tabla 4.4**) es posible establecer el siguiente orden en los volúmenes de los aniones: $[\text{OcSO}_4^-] > [\text{NTf}_2^-] > [\text{EtSO}_4^-] > [\text{TfO}^-] > [\text{PF}_6^-] > [\text{BF}_4^-]$. Como se ha mencionado anteriormente, es muy probable que otros factores, como la geometría del anión o la distribución de la carga, contribuyan en mayor o menor medida al volumen global, pero, de acuerdo con nuestros resultados, la contribución es inferior al propio volumen del anión. Así, estos datos explican la tendencia observada en los valores experimentales de densidad.

En tercer lugar, empleando este tratamiento es posible obtener el incremento del volumen aniónico respecto al volumen teórico de la estructura molecular (**Tabla 4.4**), el cual tiene en cuenta las distancias interiónicas y el efecto de la temperatura y está relacionado con la eficiencia del empaquetamiento. Por tanto, se puede concluir que la eficiencia de empaquetamiento es mayor en moléculas pequeñas, pero cuando el tamaño del anión es similar al del catión, esta eficiencia disminuye, alcanza un determinado nivel y, probablemente, otros factores, además del volumen, se hacen significativos.

Por último, este tratamiento permite predecir con gran precisión las densidades de todas las combinaciones de estos aniones y cationes a todas las temperaturas mediante la obtención de los volúmenes moleculares de los líquidos iónicos después de asignar el volumen iónico adecuado a sus constituyentes. Además, si se aplica este método que nosotros hemos desarrollado para $T=293.15$ K al resto de temperaturas estudiadas, se obtiene una dependencia lineal (ver **Figura A4.2** del Anexo al Capítulo 4) $V_{\text{CH}_2} = 1.922 \times 10^{-5} T + 0.02247$ nm³ ($r^2=0.9996$) del volumen iónico de CH₂ con la temperatura (los datos numéricos se encuentran en la **Tabla A4.4** del Anexo al Capítulo 4). Conocida esta relación, es posible predecir el volumen iónico de los cationes alquil-imidazolio con distinta longitud de cadena alquílica a cada temperatura mediante la siguiente expresión:

$$V_{al-imid} = V_{al-imid-teór}(1.328 + 1.120 \times 10^{-3} T) \quad (5)$$

O en función del número de carbonos (N_C):

$$V_{al-imid} = (0.08159 + 0.01697 N_C) (1.328 + 1.120 \times 10^{-3} T) \quad (6)$$

En la ecuación (5), $V_{al-imid}$ es el volumen iónico de cualquier catión alquil-imidazolio y $V_{al-imid-teór}$ es el volumen van der Waals teórico, ambos en nm³. En la ecuación (6), N_C es el número de carbonos y T es la temperatura en Kelvin. Aunque no se ha estudiado en profundidad el rango de aplicación de estas ecuaciones se presume que puede ser bastante amplio.

También se ha estudiado la dependencia de los volúmenes iónicos de los aniones estudiados en este trabajo con la temperatura y, en todos los casos, se ha encontrado un buen ajuste lineal de los datos, con mayores pendientes para los volúmenes iónicos más elevados (para ver los valores numéricos ir a la **Figura A4.3** y a la **Tabla A4.5** del Anexo al Capítulo 4). A partir de

nuestros resultados, es posible predecir el volumen iónico de estos iones a cualquier temperatura:

$$V_{BF4} = V_{BF4teór}(1.083+0.365 \times 10^{-3}T) = 0.0587+1.98 \times 10^{-5}T \quad (7)$$

$$V_{PF6} = V_{PF6teór}(1.171+0.596 \times 10^{-3}T) = 0.0835+4.25 \times 10^{-5}T \quad (8)$$

$$V_{NTf2} = V_{NTf2teór}(1.201+1.032 \times 10^{-3}T) = 0.1882+16.17 \times 10^{-5}T \quad (9)$$

$$V_{TfO} = V_{TfOteór}(1.200+0.738 \times 10^{-3}T) = 0.1022+6.29 \times 10^{-5}T \quad (10)$$

$$V_{EtSO4} = V_{EtSO4teór}(1.156+0.468 \times 10^{-3}T) = 0.1114+4.51 \times 10^{-5}T \quad (11)$$

$$V_{OctSO4} = V_{OctSO4teór}(1.233+0.829 \times 10^{-3}T) = 0.0835+16.44 \times 10^{-5}T \quad (12)$$

En las ecuaciones (7)-(12), $V_{anión}$ es el volumen iónico de cada anión y $V_{anión-teór}$ es el volumen de van der Waals teórico, ambos en nm^3 . T es la temperatura en Kelvin.

Para validar nuestro método, hemos comparado las densidades calculadas con las ecuaciones (3) a (12) con nuestros valores experimentales y con algunos otros presentes en la bibliografía [11, 13, 18, 23, 25, 36, 39-43]. A modo de ejemplo, se han representado algunos de los resultados en la **Figura 4.7** (para valores numéricos, consultar también la **Figura A4.4** y las **Tablas A4.6a** y **A4.6b** del Anexo al Capítulo 4).

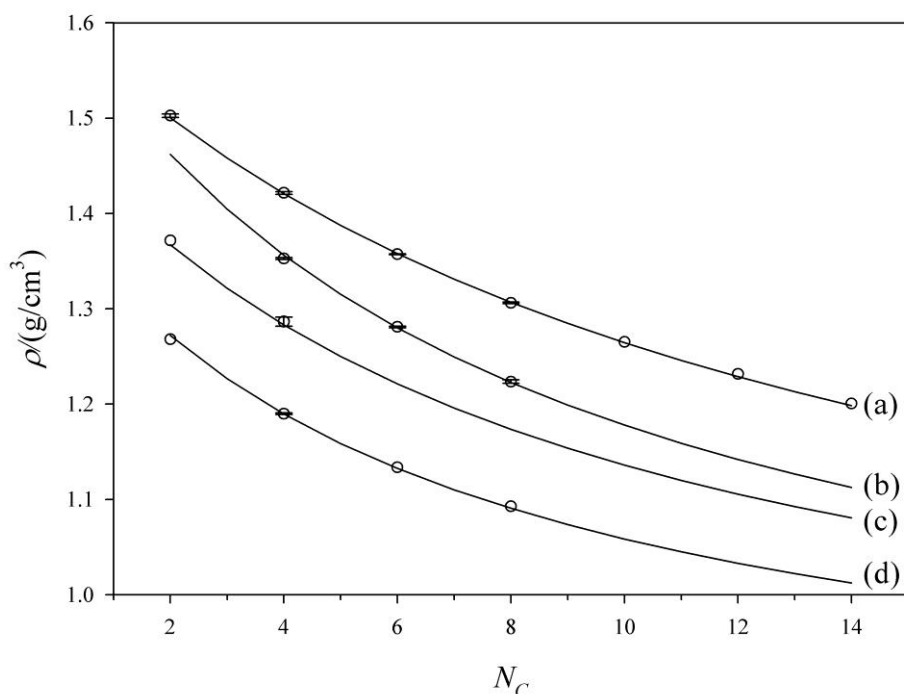


Figura 4.7. Densidad a 313.15K de varios líquidos iónicos frente al número de carbonos de la cadena alquílica el catión. Los aniones son: (a) $[\text{NTf}_2^-]$; (b) $[\text{PF}_6^-]$; (c) $[\text{TfO}^-]$; (d) $[\text{BF}_4^-]$. \circ Valores experimentales (media de distintas fuentes, consultar los valores numéricos en la **Tabla A4.6b**); (—) Valores predichos con las ecuaciones (3) a (12). En el caso de los valores experimentales, las barras de error son más pequeñas que el tamaño del símbolo.

Tariq *et al.* [11] (**Tabla 4.1**) compartieron los datos experimentales de densidad de algunos líquidos iónicos compuestos por combinaciones de cationes y de aniones que no están en este trabajo. Pues bien, el siguiente paso para validar nuestro método sería predecir el volumen de esos iones. Por ejemplo, para $T=293.15\text{K}$, obtenemos los siguientes volúmenes para los iones metilsulfato ($[\text{MeSO}_4^-]$) y acetato ($[\text{OAc}^-]$): $V_{\text{MeSO}_4}= 0.0956 \text{ nm}^3$; $V_{\text{OAc}}=0.0640 \text{ nm}^3$. El volumen del catión trihexil(tetradecil)fosfonio se obtiene a partir de los datos de tres líquidos iónicos: $[\text{P}_{66614}^+][\text{NTf}_2^-]$; $[\text{P}_{66614}^+][\text{TfO}^-]$; $[\text{P}_{66614}^+][\text{OAc}^-]$ resultando el siguiente valor: $V_{[\text{P}_{66614}^+]}=0.945 \pm 0.002\text{nm}^3$. Aunque el líquido iónico $[\text{P}_{66614}^+][\text{OAc}^-]$ está formado por dos iones que no han sido utilizados para obtener las ecuaciones propuestas en este trabajo, el resultado obtenido se aproxima bastante a los de los otros líquidos iónicos.

Para cuantificar la calidad de las predicciones podemos emplear la desviación media de los datos experimentales y comparar nuestros datos (consultar **Tabla A4.6a** y **A4.6b** del Anexo al Capítulo 4) con los de Tariq *et al.* [11] (**Tabla 4.1**) usando cuatro métodos diferentes (ver referencias dentro). Las desviaciones medias están entre $\sigma_{\text{ave}}=0.21$ y $\sigma_{\text{ave}}=1.29$ mientras que nuestro método proporciona una desviación media de $\sigma_{\text{ave}}=0.13$.

Resumiendo, con nuestro método somos capaces de predecir la densidad y el volumen molecular de líquidos iónicos con cationes alquilimidazolio y con distintos aniones (y, probablemente, con otras combinaciones de iones con estructura química similar) antes de sintetizarlos, en un amplio rango de temperaturas a partir de cálculos teóricos sencillos de la estructura de los iones presentes.

4.3.3. Índice de refracción: Resultados y correlación

El índice de refracción es la relación entre la velocidad de propagación de una onda en un medio de referencia (por ejemplo, el vacío para las ondas electromagnéticas) y su velocidad en el medio de trabajo. Describe la habilidad de un compuesto para refractar luz cuando éste pasa de un medio a otro y, por tanto, cuanto mayor es el índice de refracción de un compuesto, mayor es la luz que refracta. [12].

Para validar nuestro método experimental, los valores medidos del índice de refracción para el $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ han sido comparados con datos previamente publicados en la bibliografía (**Tabla 4.1**). Se han observado ligeras desviaciones entre nuestros valores y los presentes en la bibliografía sobre todo a temperaturas elevadas lo cual es debido probablemente a las diferencias en la pureza de las muestras, al método experimental y a los distintos equipos de medida empleados. Las desviaciones entre nuestros datos y la bibliografía están entre 0.0003 y 0.0020 para todo el rango de temperatura. Por tanto, podemos afirmar que nuestros valores están en concordancia con la mayoría de los datos disponibles en la bibliografía por lo que quedaría validado nuestro procedimiento experimental.

El índice de refracción de los líquidos iónicos fue determinado a presión atmosférica en un rango de temperatura entre 293.15 y 343.15K y los valores experimentales se muestran en la **Tabla 4.2**. Como en el caso de la densidad, el índice de refracción de los líquidos iónicos estudiados disminuye casi linealmente al aumentar la temperatura, tal y como muestra la **Figura 4.3** (gráficas f-j) y la **Figura 4.4** (gráficas e-h). Los valores del índice de refracción han sido ajustados con la temperatura al igual que la densidad a una ecuación empírica del tipo ($n=n_0T+n_1$). Los valores de n_0 y n_1 , obtenidos mediante el ajuste de la ecuación anterior, se recogen en la **Tabla A4.7** del Anexo al Capítulo 4, acompañados de la desviación estándar calculada mediante la ecuación (1).

A la vista de la **Figura 4.3**, se puede deducir que el [bmim⁺][OcSO₄⁻] y el [emim⁺][EtSO₄⁻] presentan valores más elevados (sobre 1.45) que el resto de los líquidos iónicos. Concretamente, con las gráficas f-i se puede analizar la influencia de la longitud de la cadena alquílica del catión. El índice de refracción es mayor cuanto mayor es la longitud de la cadena alquílica del catión: [omim⁺] > [hmim⁺] > [bmim⁺] > [emim⁺]. La variación en el índice de refracción es inversa a la de la densidad y casi un espejo de la misma, especialmente para las familias de [BF₄⁻] y [PF₆⁻], las cuales también muestran la misma distancia (gráficas a, f, b, g). El índice de refracción puede considerarse una medida de la polarizabilidad electrónica de una molécula proporcionando información útil, desde un punto de vista cualitativo, cuando se estudian las fuerzas entre moléculas o su comportamiento en solución. Por tanto, nuestros resultados están en concordancia con la afirmación de que a mayor longitud de la cadena alquílica, mayor índice de refracción.

La **Figura 4.4** (gráficas e-h) muestra la influencia del anión sobre el índice de refracción de los líquidos iónicos estudiados. En este rango de temperaturas, los resultados mostraron la siguiente tendencia: [EtSO₄⁻] > [OcSO₄⁻] > [TfO⁻] > [NTf₂⁻] > [BF₄⁻] > [PF₆⁻], la cual no puede considerarse una imagen espejo de la densidad. Cuando es posible establecer comparaciones, nuestros resultados siguen la misma tendencia que los publicados por Tariq *et al.* [11]. Además del volumen de van der Waals, es posible calcular la refractividad molar o la polarizabilidad molecular con la página web de chemicalize.org [38]. Hemos comprobado que los valores del índice de refracción no guardan relación con ninguno de estos parámetros, la misma conclusión a la que llegaron Tariq *et al.* [11]. La razón, de acuerdo con sus conclusiones, es que, aunque la refracción molar se ha relacionado, en términos generales, con características moleculares como la polarizabilidad a través de ecuaciones como la de Clausius–Mossotti o Lorentz–Lorenz, en el caso de los líquidos iónicos dichas ecuaciones no resultan muy adecuadas ya que la mayoría de los principios que las sostienen (fluidos isotrópicos compuestos de partículas esféricas que no interactúan las unas con las otras) no son aplicables a los líquidos iónicos desde un punto de vista físico: los líquidos iónicos están formados por iones no-esféricos (al menos uno de ellos) y son fluidos nano-segregados y no-isotrópicos compuestos por una red polar rodeada por regiones apolares.

4.3.4. Correlaciones entre densidad e índice de refracción

Los valores de la densidad y del índice de refracción se han ajustado mediante varias ecuaciones empíricas del tipo:

$$f(n)=k\rho \quad (13)$$

donde $f(n)$ es una función del índice de refracción, k es una constante empírica que depende del líquido y de la longitud de onda a la cual se mide el índice de refracción y ρ es la densidad del líquido. La función $f(n)$ se encuentra asociada a correlaciones empíricas. Concretamente, en este trabajo, se han usado las ecuaciones más comunes: Lorentz-Lorenz (14), Dale-Gladstone (15), Eykman (16), Oster (17), Arago-Biot (18) y Newton (19), las cuales han sido empleadas con anterioridad por diferentes autores para correlacionar la densidad y el índice de refracción.

$$f(n) = (n^2 - 1)/(n^2 + 2) \quad (14)$$

$$f(n) = (n - 1) \quad (15)$$

$$f(n) = (n^2 - 1)/(n + 0.4) \quad (16)$$

$$f(n) = (n^2 - 1)(2n^2 + 1)/n^2 \quad (17)$$

$$f(n) = n \quad (18)$$

$$f(n) = (n^2 - 1) \quad (19)$$

Todas estas ecuaciones suponen que la relación entre la densidad y el índice de refracción no depende de la temperatura. Pero, a la vista de nuestros resultados (**Tablas A4.2 y A4.8** del Anexo al Capítulo 4) es posible deducir que el parámetro k en la ecuación (13) guarda una cierta dependencia con la temperatura como también se muestra a continuación en la **Figura 4.8** para la ecuación (18).

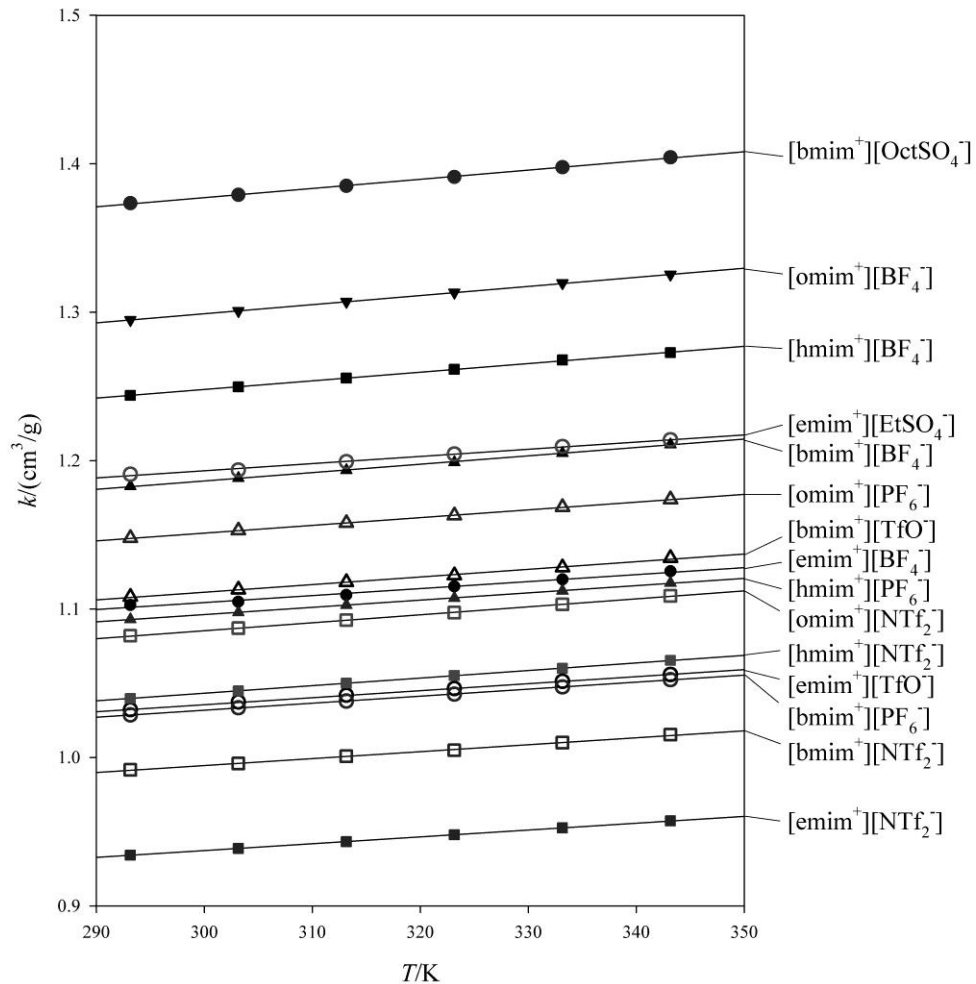


Figura 4.8. Valores de $k=n/\rho$ de distintos líquidos iónicos a distintas temperaturas. Los parámetros del ajuste lineal se pueden encontrar en la **Tabla A4.9** del Anexo al Capítulo 4.

No obstante, como una primera aproximación, y, suponiendo que esa dependencia es pequeña, se ha evaluado cuál de las ecuaciones ajusta mejor nuestros datos experimentales. Para ello, suponemos que $k=f(n)\rho$ solo depende de la naturaleza del líquido iónico y que el valor para cada uno de ellos se ha obtenido como la media de los valores para todas las temperaturas. La desviación estándar se obtiene mediante la ecuación (1). A partir de estos resultados (**Tabla A4.8** del Anexo al Capítulo 4), es posible concluir que la ecuación de Oster es la que mejor se ajusta a nuestros datos experimentales.

Como se ha mencionado anteriormente, se ha observado una ligera dependencia de k con la temperatura en nuestros datos experimentales por lo que hemos definido $k=n/\rho$ y hemos ajustado los resultados a una ecuación lineal de la forma $k=k_0T+k_1$. La **Figura 4.8** muestra la excelente bondad de los ajustes (consultar la **Tabla A4.9** del Anexo al Capítulo 4 para los datos numéricos).

Por tanto, se puede concluir que es posible mejorar de una forma muy sencilla la correlación entre la densidad y el índice de refracción incluyendo la temperatura. Si se comparan los valores de la desviación estándar con los que se muestran en la **Tabla A4.8**, se observa una mejora sustancial de la bondad del ajuste para cualquiera de las ecuaciones propuestas. Dada la calidad de los datos, una vez que se conoce la relación cuantitativa entre la densidad y el índice de refracción en un rango de temperatura, es posible conocer el valor de una de las dos magnitudes con gran precisión a partir de la medida de la otra a cualquier temperatura (probablemente, incluso fuera del rango).

4.4. CONCLUSIONES

Después de medir la densidad y el índice de refracción de 15 líquidos iónicos agrupados por familias (mismo catión o anión a presión atmosférica en un rango de temperaturas entre 293.15 y 343.15 K), se ha comprobado que la densidad del líquido iónico aumenta cuando la longitud de la cadena alquílica del catión disminuye. Por otro lado, también se concluye que la densidad no aumenta al aumentar el peso molecular del anión.

El índice de refracción aumenta con la longitud de la cadena alquílica del catión. Nuestros resultados están en concordancia con la idea de que cuanto mayor es la longitud de la cadena alquílica del catión, mayor es la polarizabilidad electrónica de la molécula, aunque no fue posible encontrar ninguna relación clara con el peso molecular, el volumen de van der Waals, la refractividad molar o la polarizabilidad calculadas. La explicación dada por Tariq *et al.* [11] es igualmente válida para nosotros.

Al cuantificar estos efectos mediante el uso de ecuaciones lineales que determinen la influencia de la temperatura para cada líquido iónico, se ha comprobado que la disminución en la densidad debida a un aumento de la temperatura es ligeramente menor cuando la longitud de la cadena del catión aumenta, lo que de nuevo ratifica una menor eficacia de empaquetamiento en cationes con cadena larga.

El índice de refracción depende de la temperatura en menor medida que la densidad y no se ha encontrado ninguna relación con la longitud de la cadena del catión o el peso molecular del anión.

Las ecuaciones existentes en la bibliografía para correlacionar la densidad y el índice de refracción son independientes de la temperatura, mientras que en este trabajo se ha

demostrado que la correlación puede mejorar de forma sustancial si se incluye dicha dependencia.

Uno de los mayores logros de este trabajo ha consistido en encontrar una forma de explicar el comportamiento de la densidad de los líquidos iónicos basada en el volumen molecular, de manera que deberíamos ser capaces de predecir, antes de sintetizarlos, la densidad y el volumen molecular de líquidos iónicos con cationes alquilimidazolio y con distintos aniones (y, muy probablemente, combinaciones de iones con estructura similar) en un amplio rango de temperatura a partir de cálculos teóricos sencillos basados en la estructura de los iones presentes.

Por último, nuestros resultados confirman que es posible diseñar líquidos iónicos con propiedades modulables (al menos, la densidad y el índice de refracción, aunque probablemente otras también) en base a la estructura del catión y del anión escogidos. Por tanto, podemos concluir que nuestros datos contribuyen de forma significativa al diseño y al estudio de los líquidos iónicos presentes y futuros.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

[1] P. Kubisa, Ionic liquids as solvents for polymerization processes—Progress and challenges, *Prog. Polym. Sci.* 34 (2009) 1333–1347.

[2] Y. Qiao, Y. Ma, Y. Huo, P. Ma, S. Xia, A group contribution method to estimate the densities of ionic liquids, *J. Chem. Thermodyn.* 42 (2010) 852–855.

[3] Y.A. Sanmamed, D. González-Salgado, J. Troncoso, L. Romaní, A. Baylaucq, C. Boned, Experimental methodology for precise determination of density of RTILs as a function of temperature and pressure using vibrating tube densimeters, *J. Chem. Thermodyn.* 42 (2010) 553–563.

[4] M. Shamsipur, A.A.M. Beigi, M. Teymouri, S.M. Pourmortazavi, M. Irandoust, Physical and electrochemical properties of ionic liquids 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, 1-butyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate and 1-butyl-1-methylpyrrolidinium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, *J. Mol. Liq.* 157 (2010) 43–50.

[5] A.B. Pereiro, J.L. Legido, A. Rodríguez, Physical properties of ionic liquids based on 1-alkyl-3-methylimidazolium cation and hexafluorophosphate as anion and temperature dependence, *J. Chem. Thermodyn.* 39 (2007) 1168–1175.

[6] Y.A. Sanmamed, D. González-Salgado, J. Troncoso, C.A. Cerdeiriña, L. Romaní, Viscosity-induced errors in the density determination of room temperature ionic liquids using vibrating tube densitometry, *Fluid Phase Equilib.* 252 (2007) 96–102.

[7] A. Heintz, Recent developments in thermodynamics and thermophysics of non-aqueous mixtures containing ionic liquids. A review, *J. Chem. Thermodyn.* 37 (2005) 525–535.

[8] A. Muhammad, M.I. Abdul Mutalib, C.D. Wilfred, T. Murugesan, A. Shafeeq, Thermophysical properties of 1-hexyl-3-methyl imidazolium based ionic liquids with tetrafluoroborate, hexafluorophosphate and bis(trifluoromethylsulfonyl)imide anions, *J. Chem. Thermodyn.* 40 (2008) 1433–1438.

- [9] J.G. Huddleston, A.E. Visser, W.M. Reichert, H.D. Willauer, G.A. Broker, R.D. Rogers, Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation, *Green Chem.* 3 (2001) 156–164.
- [10] Q. Zhou, L.-S. Wang, H.-P. Chen, Densities and viscosities of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate + H₂O binary mixtures from (303.15 to 353.15) K, *J. Chem. Eng. Data* 51 (2006) 905–908.
- [11] M. Tariq, P.A.S. Forte, M.F.C. Gomes, J.N.C. Lopes, L.P.N. Rebelo, Densities and refractive indices of imidazolium- and phosphonium-based ionic liquids: Effect of temperature, alkyl chain length, and anion, *J. Chem. Thermodyn.* 41 (2009) 790–798.
- [12] A.A. Miran Beigi, M. Abdouss, M. Yousefi, S.M. Pourmortazavi, A. Vahid, Investigation on physical and electrochemical properties of three imidazolium based ionic liquids (1-hexyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl) imide and 1-butyl-3-methylimidazolium methylsulfate), *J. Mol. Liq.* 177 (2013) 361–368.
- [13] R. Gomes de Azevedo, J.M.S.S. Esperança, J. Szydłowski, Z.P. Visak, P.F. Pires, H.J.R. Guedes, L. P. N. Rebelo, Thermophysical and thermodynamic properties of ionic liquids over an extended pressure range: [bmim][NTf₂] and [hmim][NTf₂], *J. Chem. Thermodyn.* 37 (2005) 888–899.
- [14] P. Wasserscheid, W. Keim, Ionic liquids-New “Solutions” for Transition Metal Catalysis, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 3772–3789.
- [15] F.J. Hernández-Fernández, A.P. de los Ríos, M. Rubio, D. Gómez, G. Vállora, Enhancement of activity and selectivity in lipase-catalyzed transesterification in ionic liquids by the use of additives, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (2007) 882–887.
- [16] A.N. Soriano, B.T. Doma Jr., M.-H. Li, Density and refractive index measurements of 1-ethyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 41 (2010) 115–121.
- [17] K. Marsh, J. Boxall, R. Lichtenthaler, Room temperature ionic liquids and their mixtures—a review, *Fluid Phase Equilibr.* 219 (2004) 93–98.
- [18] M.A. Iglesias-Otero, J. Troncoso, E. Carballo, L. Romání, Density and refractive index in mixtures of ionic liquids and organic solvents: Correlations and predictions, *J. Chem. Thermodyn.* 40 (2008) 949–956.
- [19] B. Hasse, J. Lehmann, D. Assenbaum, P. Wasserscheid, A. Leipertz, A.P. Fröba, Viscosity, interfacial tension, density, and refractive index of ionic liquids [EMIM][MeSO₃], [EMIM][MeOHPO₂], [EMIM][OcSO₄], and [BBIM][NTf₂] in dependence on temperature at atmospheric pressure, *J. Chem. Eng. Data.* 54 (2009) 2576–2583.
- [20] J.G. Huddleston, A.E. Visser, W.M. Reichert, H.D. Willauer, G.A. Broker, R.D. Rogers, Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation, *Green Chem.* 3 (2001) 156–164.

- [21] Y. Deng, P. Husson, A.-M. Delort, P. Besse-Hoggan, M. Sancelme, M.F. Costa Gomes, Influence of an oxygen functionalization on the physicochemical properties of ionic liquids: density, viscosity, and carbon dioxide solubility as a function of temperature, *J. Chem. Eng. Data.* 56 (2011) 4194–4202.
- [22] J. Wang, Y. Tian, Y. Zhao, K. Zhuo, A volumetric and viscosity study for the mixtures of 1-n-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid with acetonitrile, dichloromethane, 2-butanone and N, N – dimethylformamide, *Green Chem.* 5 (2003) 618–622.
- [23] A.N. Soriano, B.T. Doma Jr., M.-H. Li, Measurements of the density and refractive index for 1-n-butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids, *J. Chem. Thermodyn.* 41 (2009) 301–307.
- [24] M.T. Zafarani-Moattar, H. Shekaari, Application of Prigogine–Flory–Patterson theory to excess molar volume and speed of sound of 1-n-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate or 1-n-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate in methanol and acetonitrile, *J. Chem. Thermodyn.* 38 (2006) 1377–1384.
- [25] R.L. Gardas, M.G. Freire, P.J. Carvalho, I.M. Marrucho, I.M.A. Fonseca, A.G.M. Ferreira, J. A. P. Coutinho, High-pressure densities and derived thermodynamic properties of imidazolium-based ionic liquids, *J. Chem. Eng. Data.* 52 (2007) 80–88.
- [26] P. Navia, J. Troncoso, L. Romani, Excess magnitudes for ionic liquid binary mixtures with a common ion, *J. Chem. Eng. Data.* 52 (2007) 1369–1374.
- [27] G. Vakili-Nezhaad, M. Vatani, M. Asghari, I. Ashour, Effect of temperature on the physical properties of 1-butyl-3-methylimidazolium based ionic liquids with thiocyanate and tetrafluoroborate anions, and 1-hexyl-3-methylimidazolium with tetrafluoroborate and hexafluorophosphate anions, *J. Chem. Thermodyn.* 54 (2012), 148–154.
- [28] C.P. Fredlake, J.M. Crosthwaite, D.G. Hert, S.N.V.K. Aki, J.F. Brennecke, Thermophysical properties of imidazolium-based ionic liquids, *J. Chem. Eng. Data.* 49 (2004) 954–964.
- [29] C. Kolbeck, J. Lehmann, K.R.J. Lovelock, T. Cremer, N. Paape, P. Wasserscheid, A.P. Fröba, F. Maier and H.-P. Steinrück, Density and surface tension of ionic liquids, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010), 17025–17036.
- [30] S. Seki, T. Kobayashi, Y. Kobayashi, K. Takei, H. Miyashiro, K. Hayamizu, S. Tsuzuki, T. Mitsugi, Y. Umebayashi, Effects of cation and anion on physical properties of room-temperature ionic liquids, *J. Mol. Liq.* 152 (2010) 9–13.
- [31] H. Li, G. Zhao, F. Liu, S. Zhang, Physicochemical characterization of MF_m-based ammonium ionic liquids, *J. Chem. Eng. Data.* 58 (2013) 1505-1515.
- [32] J.M. Slattery, C. Daguene, P.J. Dyson, T.J.S. Schubert, I. Krossing. How to predict the physical properties of ionic liquids: a volume-based approach, *Angew. Chem.* 119 (2007), 5480 –5484.

- [33] L. Glasser, Lattice and phase transition thermodynamics of ionic liquids, *Thermochim. Acta* 421 (2004) 87-93.
- [34] F. H. Allen, The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising, *Acta Crystallogr. Sect. B* 58 (2002), 380-388.
- [35] L.P.N. Rebelo, V. Najdanovic-Visak, R. Gomes de Azevedo, J.M.S.S. Esperança, M. Nunes da Ponte, H.J.R. Guedes, Z.P. Visak, H.C. de Sousa, J. Szydłowski, J.N. Canongia Lopes, T.C. Cordeiro, in: R.D. Rogers, K.R. Seddon (Eds.), *Ionic Liquids IIIA: Fundamentals, Progress, Challenges, and Opportunities-Properties and Structure*, ACS Symposium Series 901, American Chemical Society, Washington DC, 2005, pp. 270–291 (Chapter 21).
- [36] J. Jacquemin, P. Nancarrow, D.W. Rooney, M.F. Costa Gomes, P. Husson, V. Majer, A.A.H. Pádua, C. Hardacre, Prediction of ionic liquid properties. I. Volumetric properties as a function of temperature and pressure, *J. Chem. Eng. Data* 53 (2008), 716–726.
- [37] J. Jacquemin, P. Nancarrow, D.W. Rooney, M.F. Costa Gomes, P. Husson, V. Majer, A.A.H. Pádua, C. Hardacre, Prediction of ionic liquid properties. II. Volumetric properties as a function of temperature and pressure, *J. Chem. Eng. Data* 53 (2008) 2133–2143.
- [38] <http://www.chemicalize.org> is a free chemical structure miner and web search engine developed and owned by ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).
- [39] J. Troncoso, C.A. Cerdeirina, Y.A. Sanmamed, L. Romani, L.P.N. Rebelo, Thermodynamic properties of imidazolium-based ionic liquids: Densities, heat capacities, and enthalpies of fusion of [bmim][PF₆] and [bmim][NTf₂], *J. Chem. Eng. Data* 51 (2006) 1856–1859.
- [40] J. Lachwa, P. Morgado, J.M.S.S. Esperança, H.J.R. Guedes, J.N.C. Lopes, L.P.N. Rebelo, Fluid-phase behavior of {1-hexyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl) imide, [C(6)mim][NTf₂], plus C-2-C-8 n-alcohol} mixtures: Liquid-liquid equilibrium and excess volumes, *J. Chem. Eng. Data* 51 (2006) 2215–2221.
- [41] A.B. Pereiro, A. Rodríguez, Thermodynamic properties of ionic liquids in organic solvents from (293.15 to 303.15) K, *J. Chem. Eng. Data* 52 (2007) 600–608.
- [42] A.B. Pereiro, A. Rodríguez, Study on the phase behaviour and thermodynamic properties of ionic liquids containing imidazolium cation with ethanol at several temperatures, *J. Chem. Thermodyn.* 39 (2007) 978–979.
- [43] P. Bonhôte, A.P. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyanasundarm, M. Gratzel, Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts, *Inorg. Chem.* 35 (1996) 1168–1178.

4.6. ANEXO AL CAPÍTULO 4

Tabla A4.1

Parámetros de ajuste de la ecuación $\rho = \rho_0 T + \rho_1$ para la densidad ρ de los líquidos iónicos estudiados.

ILs	$\rho_0 \times 10^4 / \text{g} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{K}^{-1}$	$\rho_1 / \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	r^2	S.D
[emim ⁺][BF ₄ ⁻]	-7.502	1.5031	0.99996	0.0001
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	-6.996	1.4072	0.99995	0.0001
[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	-6.848	1.3482	0.99996	0.0001
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	-6.687	1.3023	0.99998	0.0001
[emim ⁺][TfO ⁻]	-8.320	1.6322	0.99998	0.0001
[bmim ⁺][TfO ⁻]	-7.906	1.5284	1.00000	0.0000
[bmim ⁺][OcSO ₄ ⁻]	-6.421	1.2595	0.99997	0.0001
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	-8.276	1.6132	0.99997	0.0001
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	-7.848	1.5273	0.99999	0.0000
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	-7.548	1.4614	0.99999	0.0000
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-9.970	1.8160	0.99998	0.0001
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-9.655	1.7233	0.99927	0.0004
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-9.072	1.6422	0.99999	0.0001
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-8.829	1.5836	0.99999	0.0000
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	-6.704	1.4379	0.99982	0.0002

4. Densidad e índice de refracción de líquidos iónicos basados en sales de 1-alkil-3-metilimidazolio

Tabla A4.2

Valores experimentales del volumen molecular, V_m , y del coeficiente de expansión térmica, α_p , de los líquidos iónicos estudiados a temperaturas T entre 293.15 y 343.15 K a presión $p=0.1$ MPa.

T/K	[emim⁺][BF₄⁻]		[bmim⁺][BF₄⁻]		[hmim⁺][BF₄⁻]	
	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$
293.15	0.2561		0.3119		0.3676	
303.15	0.2577		0.3134		0.3698	
313.15	0.2592	5.93	0.3152	5.96	0.3721	6.06
323.15	0.2607		0.3171		0.3744	
333.15	0.2623		0.3190		0.3766	
343.15	0.2638		0.3209		0.3789	
<hr/>						
T/K	[omim⁺][BF₄⁻]		[emim⁺][TfO⁻]		[bmim⁺][TfO⁻]	
	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$
293.15	0.4234		0.3112		0.3691	
303.15	0.4260		0.3131		0.3714	
313.15	0.4286	6.14	0.3150	6.08	0.3737	6.19
323.15	0.4313		0.3169		0.3760	
333.15	0.4339		0.3189		0.3784	
343.15	0.4366		0.3208		0.3808	
<hr/>						
T/K	[bmim⁺][O₂SO₄⁻]		[bmim⁺][PF₆⁻]		[hmim⁺][PF₆⁻]	
	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$
293.15	0.5401		0.3442		0.3996	
303.15	0.5434		0.3463		0.4021	
313.15	0.5467	6.09	0.3485	6.13	0.4045	6.14
323.15	0.5500		0.3506		0.4070	
333.15	0.5534		0.3528		0.4096	
343.15	0.5568		0.3549		0.4121	
<hr/>						
T/K	[omim⁺][PF₆⁻]		[emim⁺][NTf₂⁻]		[bmim⁺][NTf₂⁻]	
	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$
293.15	0.4556		0.4264		0.4834	
303.15	0.4584		0.4292		0.4866	
313.15	0.4612	6.18	0.4321	6.65	0.4903	6.72
323.15	0.4641		0.4349		0.4933	
333.15	0.4670		0.4378		0.4966	
343.15	0.4699		0.4408		0.5003	
<hr/>						
T/K	[hmim⁺][NTf₂⁻]		[omim⁺][NTf₂⁻]		[emim⁺][EtSO₄⁻]	
	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$
293.15	0.5397		0.5959		0.3160	
303.15	0.5434		0.5999		0.3177	
313.15	0.5470	6.71	0.6040	6.78	0.3195	5.47
323.15	0.5507		0.6081		0.3212	
333.15	0.5544		0.6122		0.3230	
343.15	0.5581		0.6164		0.3248	

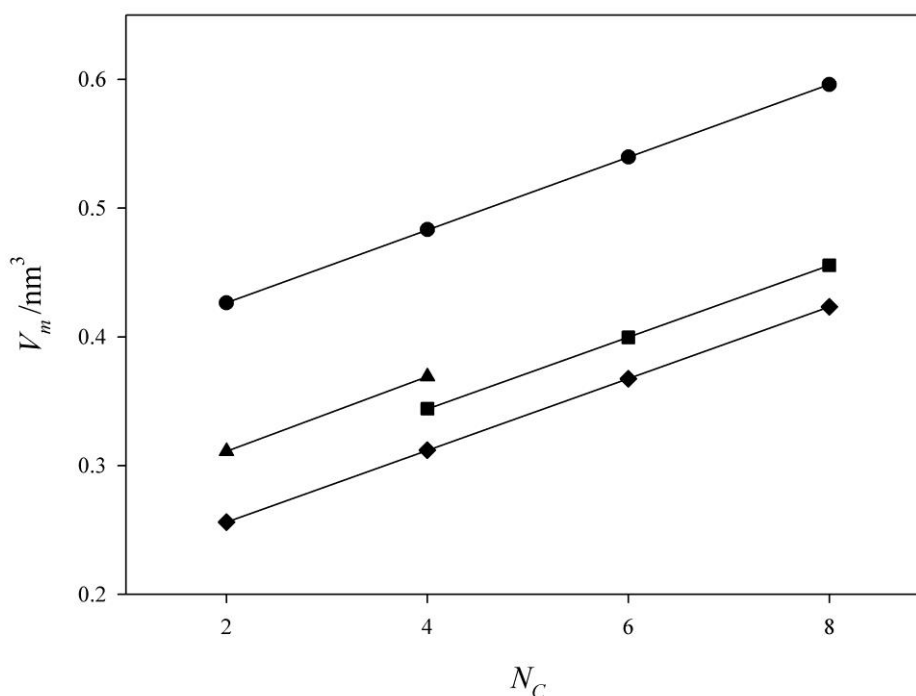


Figura A4.1. Relación entre el volumen molecular de los líquidos iónicos V_m a 293.15 K y la longitud de la cadena alquílica del catión. ● [NTf₂], ajuste lineal: $V_m=0.3702+0.02823N_C$, $r^2=0.99998$; ▲ [TfO], ajuste lineal: $V_m=0.2533+0.02895N_C$, $r^2=1$; ■ [PF₆], ajuste lineal: $V_m=0.2327+0.02785N_C$, $r^2=0.99999$; ◆ [BF₄], ajuste lineal: $V_m=0.20035+0.02788N_C$, $r^2=0.99999$.

Tabla A4.3

Peso molecular del líquido iónico (M_w), peso molecular del anión ($M_{Wanión}$), volumen (V_{an}) y densidad del volumen molecular no ocupado por el catión (ρ_{an}), para los líquidos iónicos estudiados obtenidos mediante el método propuesto por Slattery *et al.* [32] para una temperatura (T) de 293.15K a presión $p=0.1$ MPa.

IL	M_w /g·mol ⁻¹	$M_{Wanión}$ /g·mol ⁻¹	V_{an}/nm^3	$\rho_{an}/g\cdot mol^{-1}\cdot nm^{-3}$
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	391.31		0.270	1035.995
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	419.37	280.133	0.287	976.073
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	447.43		0.298	940.991
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	475.47		0.308	909.818
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	284.18		0.148	978.144
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	312.24	144.961	0.158	919.803
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	340.29		0.168	864.922
[emim ⁺][TfO ⁻]	260.23	149.062	0.155	960.451
[bmim ⁺][TfO ⁻]	288.29		0.173	861.132
[emim ⁺][BF ₄ ⁻]	197.97		0.100	867.153
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	226.02	86.802	0.116	748.939
[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	254.08		0.126	691.099
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	282.13		0.135	641.078
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	236.29	125.126	0.160	782.037
[bmim ⁺][OcSO ₄ ⁻]	348.50	209.280	0.344	608.372

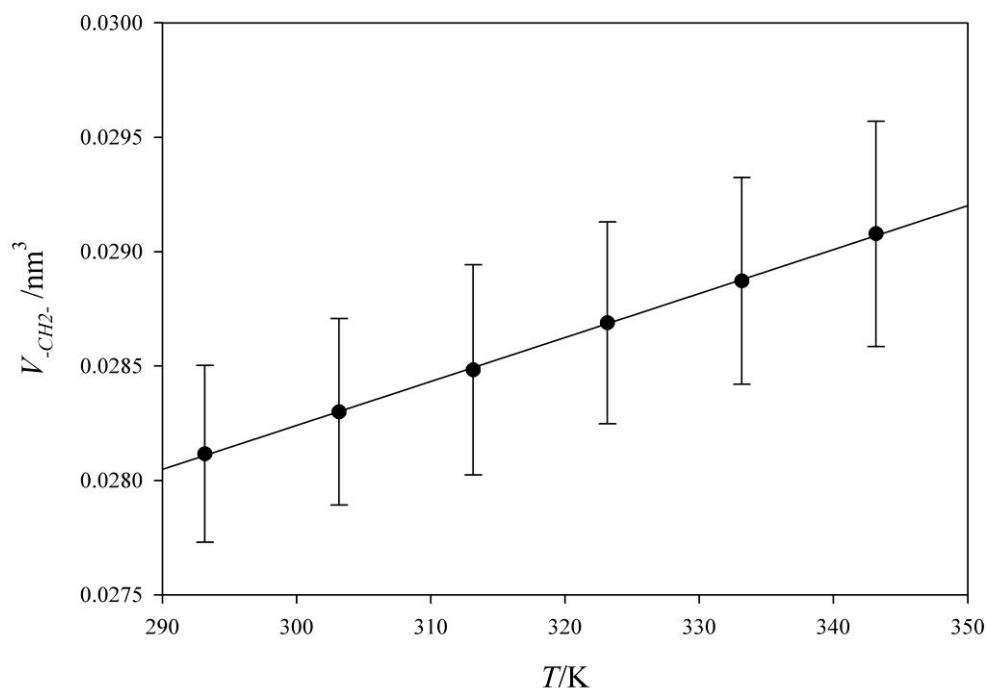


Figura A4.2. Relación entre el volumen iónico de -CH₂- (obtenido a partir de los valores experimentales de densidad) y la temperatura. Los datos numéricos se encuentran en la **Tabla A4.4**.

Ajuste lineal: $V_{-CH_2-} = 0.02247 + 1.922 \times 10^{-5} T$; $r^2 = 0.9996$.

Table A4.4

Efecto de la temperatura (T) sobre el volumen iónico de -CH₂- y % de incremento sobre el volumen de van der Waals calculado teóricamente.

T/K	Volumen iónico/nm ³	S.D.	% incremento
293.15	0.0281	0.0004	65.7
303.15	0.0283	0.0004	66.8
313.15	0.0285	0.0005	67.8
323.15	0.0287	0.0004	69.1
333.15	0.0289	0.0005	70.1
343.15	0.0291	0.0005	71.3

% incremento = $32.83 + 0.112T$; $r^2 = 0.9990$.

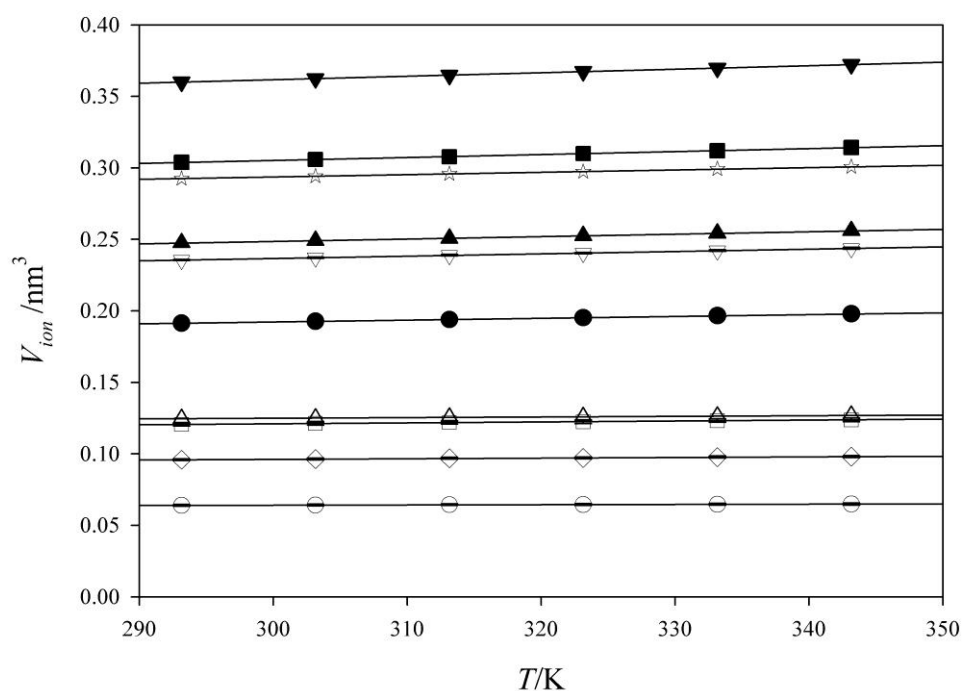


Figura A4.3. Volumen iónico (V_{ion}) frente a la temperatura (T). Esta figura muestra la dependencia lineal del volumen iónico con la temperatura siendo dicha dependencia mayor cuanto mayores son los iones. Los valores numéricos (incluyendo los parámetros de ajuste) se pueden consultar en la **Tabla A4.5**. ● [emim⁺]; ▲ [bmim⁺]; ■ [hmim⁺]; ▼ [omim⁺]; ○ [BF₄⁻]; ▽ [NTf₂⁻]; □ [TfO⁻]; △ [EtSO₄⁻]; ◇ [PF₆⁻]; ☆ [OcSO₄⁻].

Tabla A4.5

Dependencia de los volúmenes iónicos (en nm³) de todos los iones estudiados en este trabajo con la temperatura. También se muestran los parámetros de ajuste de la ecuación $V_{ion}=aT+b$.

T/K	[emim ⁺]	[bmim ⁺]	[hmim ⁺]	[omim ⁺]	[BF ₄ ⁻]	[NTf ₂ ⁻]	[TfO ⁻]	[EtSO ₄ ⁻]	[PF ₆ ⁻]	[OctSO ₄ ⁻]
293.15	0.1914	0.2476	0.3039	0.3601	0.0640	0.2356	0.1206	0.1246	0.0959	0.2925
303.15	0.1927	0.2492	0.3059	0.3625	0.0642	0.2372	0.1213	0.1250	0.0964	0.2942
313.15	0.1939	0.2508	0.3078	0.3648	0.0644	0.2390	0.1220	0.1256	0.0969	0.2959
323.15	0.1953	0.2527	0.3101	0.3674	0.0645	0.2404	0.1225	0.1259	0.0972	0.2973
333.15	0.1966	0.2543	0.3121	0.3698	0.0648	0.2421	0.1232	0.1264	0.0978	0.2991
343.15	0.1980	0.2506	0.3143	0.3724	0.0649	0.2437	0.1238	0.1268	0.0980	0.3007
$a \times 10^3 / \text{nm}^3 \cdot \text{K}^{-1}$	0.1309	0.1693	0.2078	0.2462	0.0198	0.1617	0.0629	0.0451	0.0425	0.1644
b / nm^3	0.1530	0.1979	0.2829	0.2878	0.0587	0.1882	0.1022	0.1114	0.0835	0.2443
r^2	0.9996	0.9996	0.9996	0.9996	0.9828	0.9994	0.9979	0.9962	0.9924	0.9997

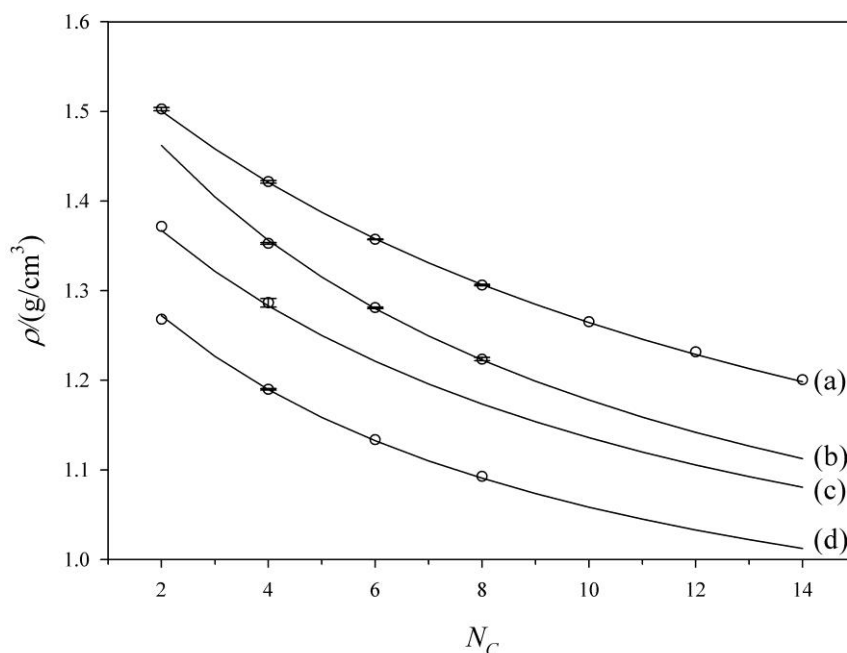


Figura A4.4. Densidad (ρ) a 293.15 K de diferentes líquidos iónicos en función del número de carbonos de la cadena alquílica del catión (N_c). Los aniones son: (a) $[\text{NTf}_2^-]$; (b) $[\text{PF}_6^-]$; (c) $[\text{TfO}^-]$; (d) $[\text{BF}_4^-]$. \circ Valores experimentales (media de distintas fuentes, consultar los valores numéricos en la Tabla A4.6a); (—) Valores estimados con las ecuaciones (3) a (12). En el caso de los valores experimentales, las barras de error son más pequeñas que el símbolo.

Tabla A4.6a

Comparación entre las densidades (ρ) estimadas (este trabajo) y las experimentales (distintas fuentes) para distintos líquidos iónicos a $T=293.15$ K y a presión $p=0.1$ MPa.

	$\rho/(\text{g}/\text{cm}^3)$					Media Exp. \pm σ	Estimada	Error*	Error ⁺		
	Experimental (distintas fuentes)										
$[\text{NTf}_2^-]$											
[emim ⁺]	1.5238 ¹	1.5197 ²	1.5229 ³	1.5234 ³	1.5260 ⁴	1.5232	0.0023	1.5215	-0.0016	-0.11	
[bmim ⁺]	1.4403 ¹	1.4408 ²	1.4427 ³	1.4402 ³	1.4389 ⁵	1.4405 ⁵	1.4406	0.0012	1.4408	0.0003	0.02
[hmim ⁺]	1.3763 ¹	1.3755 ²	1.3751 ³	1.3754 ⁶	1.3750 ⁶	1.3755	0.0005	1.3770	0.0015	0.11	
[omim ⁺]	1.3248 ¹	1.3234 ²	1.3245 ³	1.3281 ⁴		1.3252	0.0020	1.3251	-0.0001	-0.01	
[c ₁₀ mim ⁺]		1.2828 ²	1.2824 ³			1.2826	0.0003	1.2821	-0.0005	-0.04	
[c ₁₂ mim ⁺]		1.2490 ²				1.2490		1.2459	-0.0031	-0.25	
$[\text{PF}_6^-]$											
[bmim ⁺]	1.3707 ¹	1.3679 ²	1.3698 ³	1.3681 ³	1.3704 ⁵	1.3716 ^{8,9}	1.3698	0.0015	1.3734	0.0036	0.26
[hmim ⁺]	1.2973 ¹	1.2964 ²	1.2979 ^{8,9}			1.2972	0.0008	1.2964	-0.0008	-0.06	
[omim ⁺]	1.2402 ¹	1.2378 ²	1.2396 ^{8,9}			1.2392	0.0012	1.2385	-0.0007	-0.06	
$[\text{BF}_4^-]$											
[emim ⁺]	1.2833 ¹					1.2833		1.2869	0.0036	0.28	
[bmim ⁺]	1.2031 ¹	1.2029 ²	1.2049 ^{3,11}	1.2038 ³		1.2037	0.0009	1.2041	0.0004	0.04	
[hmim ⁺]	1.1475 ¹					1.1475		1.1467	-0.0008	-0.07	
[omim ⁺]	1.1064 ¹					1.1064		1.1044	-0.0020	-0.18	
$[\text{TfO}^-]$											
[emim ⁺]	1.3884 ¹					1.3884		1.3848	-0.0036	-0.26	
[bmim ⁺]	1.2966 ¹	1.3035 ²	1.3013 ³	1.2900		1.2979	0.0060	1.2998	0.0019	0.15	

4. Densidad e índice de refracción de líquidos iónicos basados en sales de 1-alkil-3-metilimidazolio

Tabla A4.6b

Comparación entre las densidades (ρ) estimadas (este trabajo) y las experimentales (distintas fuentes) para distintos líquidos iónicos a $T=313.15$ K y a presión $p=0.1$ MPa.

	$\rho/(g/cm^3)$											
	Experimental (distintas fuentes)						Media Exp. \pm σ		Estimada	Error*	Error ⁺	
[NTf ₂ ⁻]												
[emim ⁺]	1.5037 ¹	1.4996 ²	1.5029 ³	1.5034 ³	1.5038 ⁴		1.5027	0.0018	1.5005	-0.0022	-0.15	
[bmim ⁺]	1.4202 ¹	1.4216 ²	1.4230 ⁷	1.4198 ⁵	1.4214 ⁵	1.4235 ³	1.4212 ³	1.4215	0.0015	1.4210	-0.0005	-0.04
[hmim ⁺]	1.3580 ¹	1.3572 ²	1.3569 ³	1.3570 ⁷				1.3573	0.0005	1.3581	0.0008	0.06
[omim ⁺]	1.3070 ¹	1.3055 ²	1.3070 ³	1.3056 ⁴				1.3063	0.0008	1.3070	0.0007	0.05
[c ₁₀ mim ⁺]		1.2653 ²	1.2653 ³					1.2653	0.0000	1.2646	-0.0007	-0.06
[c ₁₂ mim ⁺]		1.2318 ²						1.2318		1.2289	-0.0029	-0.23
[c ₁₄ mim ⁺]		1.2006 ²						1.2006		1.1985	-0.0021	-0.17
[PF ₆ ⁻]												
[bmim ⁺]	1.3540 ¹	1.3513 ²	1.3533 ³	1.3518 ³	1.3534 ⁵	1.3528 ¹⁰		1.3528	0.0010	1.3562	0.0034	0.25
[hmim ⁺]	1.2815 ¹	1.2804 ²						1.2810	0.0008	1.2801	-0.0009	-0.07
[omim ⁺]	1.2250 ¹	1.2224 ²						1.2237	0.0018	1.2227	-0.0010	-0.08
[BF ₄ ⁻]												
[emim ⁺]	1.2681 ¹							1.2681		1.2721	0.0040	0.31
[bmim ⁺]	1.1905 ¹	1.1887 ²	1.1901 ³	1.1889 ³	1.1908 ⁷	1.1907 ¹¹		1.1900	0.0009	1.1898	-0.0002	-0.01
[hmim ⁺]	1.1337 ¹							1.1337		1.1328	-0.0009	-0.08
[omim ⁺]	1.0929 ¹							1.0929		1.0908	-0.0021	-0.19
[TfO ⁻]												
[emim ⁺]	1.3716 ¹							1.3716		1.3673	-0.0043	-0.31
[bmim ⁺]	1.2808 ¹	1.2877 ²	1.2856 ³	1.2924 ¹⁰				1.2866	0.0048	1.2832	-0.0034	-0.26

Notas para las Tablas A4.6: ¹ Este trabajo; ² Tariq *et al.* [11]; ³ Jacquemin *et al.* [36]; ⁴ Gardas *et al.* [25]; ⁵ Troncoso *et al.* [39]; ⁶ Lachwa *et al.* [40]; ⁷ Gomes de Azevedo *et al.* [13]; ⁸ Pereiro and Rodriguez [41]; ⁹ Pereiro and Rodriguez [42]; ¹⁰ Soriano *et al.* [23]; ¹¹ Iglesias-Otero *et al.* [18]; ¹² Bonhote *et al.* [43]. Error*, en g/cm³. Error⁺, en %.

Tabla A4.7

Parámetros de ajuste de la ecuación $n = n_0T + n_1$ para el índice de refracción n de los líquidos iónicos estudiados.

ILs	$n_0 \times 10^4/K^{-1}$	n_1	r^2	S.D
[emim ⁺][BF ₄ ⁻]	-2.400	1.4835	0.93046	0.0011
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	-1.700	1.4715	0.98763	0.0003
[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	-2.029	1.4870	0.99330	0.0003
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	-2.071	1.4933	0.99842	0.0001
[emim ⁺][TfO ⁻]	-2.243	1.4991	0.99612	0.0002
[bmim ⁺][TfO ⁻]	-2.300	1.5041	0.98266	0.0005
[bmim ⁺][OcSO ₄ ⁻]	-2.386	1.5410	0.99396	0.0003
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	-2.243	1.4758	0.99800	0.0002
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	-2.429	1.4891	0.99885	0.0001
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	-2.386	1.4933	0.99895	0.0001
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-2.500	1.4968	1.00000	0.0000
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-3.039	1.5171	0.99537	0.0004
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-2.614	1.5078	0.99912	0.0001
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-2.700	1.5125	0.99896	0.0001
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	-2.143	1.5401	0.97734	0.0006

4. Densidad e índice de refracción de líquidos iónicos basados en sales de 1-alkil-3-metilimidazolio

Tabla A4.8

Parámetros $k/\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ de las ecuaciones empíricas propuestas por Lorentz-Lorentz (L-L), Dale-Gladstone (D-G), Eykman, Oster, Arago-Biot (A-B) y Newton.

System	L-L	D-G	Eykman	Oster	A-B	Newton
[emim ⁺][BF ₄ ⁻]	0.1948	0.3220	0.4289	1.9418	1.1130	0.7752
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	0.2125	0.3524	0.4687	2.1276	1.1966	0.8518
[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	0.2251	0.3738	0.4969	2.2585	1.2586	0.9055
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	0.2359	0.3923	0.5212	2.3719	1.3102	0.9523
[emim ⁺][TfO ⁻]	0.1881	0.3128	0.4155	1.8914	1.0442	0.7594
[bmim ⁺][TfO ⁻]	0.2027	0.3375	0.4481	2.0415	1.1208	0.8204
[bmim ⁺][OcSO ₄ ⁻]	0.2620	0.4407	0.5825	2.6791	1.3885	1.0865
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	0.1813	0.2996	0.3992	1.8059	1.0404	0.7203
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	0.1947	0.3224	0.4291	1.9450	1.1052	0.7775
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	0.2061	0.3418	0.4546	2.0638	1.1607	0.8263
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.1679	0.2784	0.3703	1.6809	0.9457	0.6729
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.1789	0.2969	0.3947	1.7933	1.0031	0.7186
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.1888	0.3137	0.4168	1.8959	1.0526	0.7605
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.1969	0.3275	0.4350	1.9797	1.0952	0.7946
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	0.2286	0.3853	0.5088	2.3446	1.2020	0.9525
S.D	0.0032	0.0020	0.0025	0.0016	0.0099	0.0018

Tabla A4.9

Parámetros de ajuste de $k=n/\rho$ (n , índice de refracción, ρ densidad) de los líquidos iónicos estudiados a la ecuación lineal ($k = k_0T + k_1$)

ILs	$k_0 \times 10^4 / \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	$k_1 / \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	r^2	S.D
[emim ⁺][BF ₄ ⁻]	4.709	0.9632	0.9882	0.0009
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	5.632	1.0174	0.9992	0.0003
[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	5.829	1.0731	0.9994	0.0002
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	6.139	1.1149	0.9999	0.0001
[emim ⁺][TfO ⁻]	4.712	0.8942	0.9996	0.0002
[bmim ⁺][TfO ⁻]	5.140	0.9572	0.9971	0.0005
[bmim ⁺][OcSO ₄ ⁻]	6.189	1.1916	0.9991	0.0003
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	4.717	0.8904	0.9998	0.0001
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	4.888	0.9496	0.9997	0.0001
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	5.221	0.9946	0.9997	0.0001
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	4.622	0.7986	1.0000	0.00003
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	4.695	0.8538	0.9981	0.0003
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	5.123	0.8896	0.9999	0.0001
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	5.351	0.9250	0.9997	0.0002
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	4.831	1.0482	0.9952	0.0006
			Media	0.0003

5

Coeficientes de reparto octanol-agua de líquidos iónicos

*“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie
más ha pensado”*

Albert Szent-Györgi (1893-1986)

5. COEFICIENTES DE REPARTO OCTANOL-AGUA DE LÍQUIDOS IÓNICOS

5.1. INTRODUCCIÓN

Los líquidos iónicos son sales orgánicas con bajo punto de fusión por lo que la mayoría de ellos son líquidos a temperatura ambiente. Durante las décadas pasadas, los líquidos iónicos han despertado un creciente interés en la industria y en la investigación por su capacidad para ser empleados como medios de reacción en reacciones químicas y bioquímicas. Además, el interés de los líquidos iónicos también radica en que estos constituyen un nuevo grupo de disolventes polares y no acuosos cuya propiedad más importante es su prácticamente nula presión de vapor [1]. Precisamente esta propiedad es la que les ha otorgado el distintivo de “disolventes verdes” en comparación con los disolventes orgánicos convencionales. Los líquidos iónicos también pueden resistir elevadas temperaturas debido a su elevada estabilidad química y térmica. Sin embargo, de cara a sus potenciales aplicaciones, los líquidos iónicos llaman la atención debido, fundamentalmente, a la posibilidad de modular algunas de sus propiedades físicas y químicas como, por ejemplo, su punto de fusión, viscosidad, densidad, hidrofobicidad y polaridad mediante una selección adecuada del anión, el catión o el sustituyente presente en su estructura específica. El número de combinaciones distintas de aniones y cationes que pueden ser empleadas para constituir líquidos iónicos es enorme.

Como ya se ha comentado anteriormente, los líquidos iónicos presentan una baja volatilidad por lo que no contribuyen a la contaminación atmosférica [2]. Sin embargo, presentan una solubilidad en agua bastante significativa, cuyo efecto aún no ha sido estudiado en profundidad [3-5]. Y, lo que es más, debido a su elevada estabilidad, los líquidos iónicos podrían llegar a ser contaminantes importantes en corrientes acuosas residuales o vertidos accidentales. Por esta razón, resulta de gran importancia cuantificar dicho efecto a través de parámetros toxicológicos como el coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}) el cual es estudiado en este capítulo. El coeficiente de reparto octanol-agua es conocido por ser una de las propiedades físicas cuantitativas que mejor se correlaciona con la actividad biológica ya que el sistema agua-octanol saturado es un modelo bastante realista del ambiente fisicoquímico de los organismos vivos [6, 7]. Además, permite clasificar los líquidos iónicos según su hidrofobicidad o hidrofiliidad lo cual se encuentra íntimamente relacionado con la lipofiliidad de un compuesto químico, propiedad fisicoquímica esencial en química farmacéutica como, por ejemplo, en la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de fármacos [8]. De hecho, el coeficiente de reparto octanol-agua se ha empleado para simular el reparto sangre/lípido en toxicología con el fin de entender la capacidad de un compuesto para cruzar las membranas biológicas [9]. El logaritmo decimal del coeficiente de reparto octanol-agua también se emplea en correlaciones empíricas para estimar parámetros relacionados con la bioconcentración [10-13], toxicidad orientada a peces [14, 15] así como en la absorción en suelos [16-18].

La determinación del coeficiente de reparto octanol-agua es muy útil para estimar factores de riesgo en ecosistemas debido a que, como se ha mencionado, los procesos de reparto en sistemas octanol-agua son fácilmente asimilables a procesos de reparto entre sustancias orgánicas naturales y componentes biológicos en agua. Esto es debido fundamentalmente a que el octanol y los lípidos presentan una estructura semejante teniendo ambos un oxígeno polar e hidrofílico al final de una larga cadena alquílica

5. Coeficientes de reparto octanol-agua de líquidos iónicos

hidrofóbica así como similares propiedades físicas. Por lo que establecer correlaciones entre ecosistemas naturales y este parámetro es muy útil [19]. Algunos ejemplos son las correlaciones empíricas desarrolladas para estimar los factores de bioconcentración (BCF) y bioacumulación (BAF), los coeficientes de absorción en suelos (K_{OC}) o la toxicidad. La bioconcentración es el proceso que provoca un aumento de la concentración de un compuesto químico en un organismo acuático comparada con su concentración en agua, debido a la absorción del compuesto mediante distintas rutas metabólicas. Por tanto, el factor de bioconcentración es la relación de equilibrio entre la concentración del compuesto en el organismo, en $\mu\text{g}/\text{kg}$ lípido, y la concentración en agua, en $\mu\text{g}/\text{L}$ [20]. Los agentes contaminantes también son capaces de entrar a los organismos vivos a través de la cadena alimentaria lo cual se conoce como biomagnificación. La suma de la bioconcentración y la biomagnificación es la bioacumulación [21]. El coeficiente de absorción en suelos describe el reparto suelo/agua siendo la relación ente la masa de un compuesto adsorbido por unidad másica de carbono en un suelo y la concentración del compuesto en una fase líquida. La toxicidad se expresa frecuentemente en términos de mortalidad de especies cuantificado por LC_{50} en $\mu\text{mol}/\text{L}$, lo cual se define como la concentración letal para la mitad de la población de la especie objeto de estudio [22]. En la **Tabla 5.1** se muestran algunos ejemplos de ecuaciones empíricas que relacionan el coeficiente de reparto octanol-agua con el factor de bioconcentración, el factor de absorción en suelos y la toxicidad.

Tabla 5.1

Correlaciones empíricas del coeficiente de reparto octanol-agua y parámetros de riesgo de ecosistemas.

CORRELACIÓN	REFERENCIA
$\text{Log}(\text{BCF}) = 0.85\text{log}(K_{ow}) - 0.70$	[23]
$\text{Log}(\text{BCF}) = 0.79\text{log}(K_{ow}) - 0.40$	[24]
$\text{Log}(\text{BCF}) = \text{log}(K_{ow}) - 1.32$	[10]
Para $\text{Log}(K_{ow}) < 5$; $\text{Log}(\text{BCF}) = 0.5$	[13]
$\text{Log}(\text{BCF}) = 0.791\text{log}(K_{ow}) - 0.729$	[15]
$\text{Log}(K_{oc}) = 0.544\text{log}(K_{ow}) + 1.377$	[16]
$\text{Log}(K_{oc}) = 0.989\text{log}(K_{ow}) - 0.364$	[17]
$\text{Log}(K_{oc}) = 0.679\text{log}(K_{ow}) + 0.663$	[18]
$\text{Log}(1/LC_{50}) = 0.854\text{log}(K_{ow}) - 1.74^a$	[15]
$\text{Log}(1/LC_{50}) = 0.629\text{log}(K_{ow}) - 0.489^a$	[15]
$\text{Log}(1/LC_{50}) = 0.89(\pm 0.03)\text{log}(K_{ow}) - 1.75(\pm 0.05)^b$	[14]

^apara lebistes (*guppies*), carpas (*fathead minnow*), trucha arco iris (*rainbow trout*) y *medaka*.

^bpara (*guppies*), carpas (*fathead minnow*) y trucha arco iris (*rainbow trout*).

Por definición, la actividad de un compuesto, a_i , en la fase acuosa y en la fase octanol son iguales una vez que se alcanza el equilibrio ($a_i^w = a_i^o$). Como $a_i = \gamma_i x_i$, donde γ_i es el coeficiente de actividad y x_i es la fracción molar en la fase acuosa (^w) y en la fase octanol (^o), respectivamente, se puede deducir que:

$$x_i^o / x_i^w = \gamma_i^w / \gamma_i^o \quad (1)$$

Si la disolución de partida del compuesto en cuestión está muy diluida y la presión y la temperatura son constantes, las concentraciones y las fracciones molares deben ser proporcionales. Además, si el compuesto está extremadamente diluido en ambas fases, lo que se conoce como “dilución infinita” se puede considerar que los coeficientes de

actividad no varían con pequeños cambios en la concentración. Como resultado, se obtiene la ley de distribución de Nernst:

$$K_{ow} = C_i^o / C_i^w \quad (2)$$

donde K_{ow} es el coeficiente de reparto octanol-agua y C_i son las concentraciones suficientemente diluidas en ambas fases [3, 6].

Idealmente, a la hora de determinar el coeficiente de reparto octanol-agua, las concentraciones de las mismas especies del soluto deber ser medidas en ambas fases. Esto puede entrañar dificultades en especies como los ácidos o las sales en los cuales el soluto tiende a disociarse más en la fase acuosa que en la fase octanol. La **Figura 5.1** muestra un esquema en el que se aprecia que los líquidos iónicos [$M_{v+}X_{v-}$] tienden a disociarse más en la fase acuosa [3].

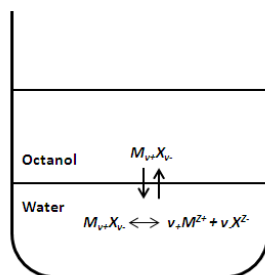


Figura 5.1. Reparto de una sal orgánica entre el octanol y el agua.

Cuando el soluto tiene tendencia a disociarse en agua, el coeficiente de reparto octanol-agua se calcula como la relación entre la concentración de las especies disociadas y sin disociar de la sal en la fase octanol y en la fase acuosa. En este capítulo, las concentraciones han sido medidas en cada fase mediante espectrofotometría UV-Vis la cual detecta el grupo imidazolio, piridinio y amonio del catión (ya se encuentre disociado o sin disociar). Por tanto, los valores del coeficiente de reparto octanol-agua obtenidos son los que proporciona la ecuación (3):

$$K_{ow} = \frac{[M_{v+}X_{v-}]^{octanol} + [M^{Z+}]^{octanol}}{[M_{v+}X_{v-}]^{water} + [M^{Z+}]^{water}} \quad (3)$$

Un aspecto a tener en cuenta es que el octanol y el agua no son completamente inmiscibles. A 25°C, la solubilidad del agua en el octanol es aproximadamente 0.275 (fracción molar) mientras que la solubilidad del octanol en el agua es de 7.45×10^{-5} (fracción molar) [25]. Como la solubilidad del agua en octanol es elevada, el coeficiente de reparto octanol-agua no puede ser obtenido simplemente como las concentraciones de saturación de un soluto disuelto en soluciones separadas de agua y octanol ya que el reparto del soluto entre los dos disolventes se ve afectado por la saturación mutua de las dos fases.

Existen muchos métodos experimentales distintos (directos e indirectos) para determinar el coeficiente de reparto octanol-agua de un compuesto químico, pero dos son los más comunes: los métodos de *shake-flask* y de *slow-stirring* (o agitación lenta), ambos métodos directos. En el método tradicional de *shake-flask*, en primer lugar, el

octanol y el agua son saturados mutuamente durante tres días. A continuación, una disolución suficientemente diluida del compuesto químico en octanol saturado se pone en contacto con la misma cantidad de agua saturada y se agita con intensidad durante cinco minutos para alcanzar el equilibrio. Seguidamente, ambas fases se separan mediante centrifugación y se mide la concentración del compuesto en cada fase. La principal ventaja de este método es su rapidez mientras que las desventajas son la posible aparición de microgotas después de centrifugar y la posibilidad de que el equilibrio no se haya alcanzado. Para solventar esto último, lo que se debe hacer es monitorizar la absorbancia en cada fase una vez que las fases se han separado [3, 26-28]. El método de *slow-stirring* es similar al método anterior. La única diferencia es que, en vez de agitar vigorosamente ambas fases, tiene lugar una agitación lenta de las mismas durante un período de tiempo más largo (45 días, aproximadamente). Después de esto, cada fase se analiza de la misma forma que en el método de *shake-flask*. La principal ventaja de este método es que se evita la emulsificación debido a una reducción de la capa de difusión entre las dos fases. No obstante, es conveniente controlar el tiempo que las fases están en contacto ya que algunos líquidos iónicos podrían descomponerse después de estar en agua durante períodos largos de tiempo [3, 29].

Nuestro grupo de investigación está especialmente interesado en trabajar con líquidos iónicos de ahí que este capítulo esté enfocado a la determinación del coeficiente de reparto octanol-agua de un grupo de líquidos iónicos. Los datos toxicológicos de los líquidos iónicos son escasos en la bibliografía. Nuestro grupo de investigación ya ha determinado el coeficiente de reparto octanol-agua de algunos líquidos iónicos basados en cationes imidazolio usando nuestro propio método que será detallado más abajo [30]. Otros autores como, por ejemplo, Ropel *et al.* [3], Deng *et al.* [7, 31] y Ventura *et al.* [32] han empleado el método de *slow-stirring* para determinar el coeficiente de líquidos iónicos basados en cationes imidazolio, piridinio, amonio y pirrolidinio. Otros, como Kaar *et al.* [33], Zhao *et al.* [34] y Lee and Lee [9] determinaron los valores del coeficiente de reparto octanol-agua de líquidos iónicos basados en cationes imidazolio y pirrolidinio mediante el método de *shake-flask*. Los resultados publicados por estos autores para líquidos iónicos presentan ciertas discrepancias entre sí debido fundamentalmente a los distintos métodos experimentales y al rango de concentración de líquido iónico empleado. Sin embargo, pueden deducirse algunas tendencias con carácter general. Por ejemplo, está claro que los aniones más hidrofóbicos, como el $[\text{NTf}_2]^-$, conducen a valores más elevados del coeficiente de reparto octanol-agua y que este aumenta con la longitud de la cadena alquílica del catión en líquidos iónicos con el mismo anión. Algunos estudios presentes han desarrollado una forma indirecta para determinar el coeficiente de reparto octanol-agua como el cociente entre la solubilidad del líquido iónico en agua y en octanol pero, sin embargo, este valor, no se corresponde exactamente con la definición del mismo [35, 36]. Recientemente, otros autores también han determinado el coeficiente de reparto octanol-agua de líquidos iónicos mediante simulación computacional [37, 38] o cálculos DFT (parámetros LFER) [39]. Además, otros autores han desarrollado un sistema robusto y automático para la medida del coeficiente de reparto octanol-agua. Concretamente, consiste en una bomba de jeringa con una válvula de selección, una columna, una célula de flujo, y un espectrofotómetro en línea. La distribución del compuesto entre la fase acuosa y el octanol tiene lugar debido al movimiento oscilatorio del pistón de la bomba de jeringa. Este sistema ha sido aplicado a la determinación del coeficiente de reparto octanol-agua de algunos fármacos comunes logrando una elevada precisión con solo una medida de una fase [40]. Otros autores han ideado una metodología experimental para obtener dicho coeficiente

empleando un dispositivo que consiste en una columna de burbuja en la que se puede medir la concentración en el espacio de cabeza. [41]. Algunos autores, como Stepnowski *et al.* [42], Ranke *et al.* [43] y Studzińska *et al.* [44], han empleado métodos cromatográficos para estimar la lipofilidad de los líquidos iónicos y así poder predecir el coeficiente de reparto octanol-agua. Debido a la gran cantidad de líquidos iónicos sintetizados y a la escasa información toxicológica es posible concluir que son necesarios más estudios para poder utilizar los líquidos iónicos en los ámbitos de la investigación y de la industria de un modo seguro y sin riesgo medioambiental.

En este capítulo se determinan los coeficientes de reparto octanol-agua de muestras diluidas de líquidos iónicos basados en sales de imidazolio, piridinio y amonio. Como se mostrará a continuación, para algunos de los líquidos iónicos los valores del coeficiente que se recogen en la bibliografía muestran grandes discrepancias. Por esta razón, en este trabajo se han empleado tres métodos experimentales distintos y se han comparado los resultados obtenidos, lo cual no se había realizado hasta ahora. Además, se ha realizado un análisis del efecto del anión y de la longitud de la cadena alquílica del catión en el coeficiente de reparto octanol-agua.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Método experimental

Como ya se ha comentado anteriormente, los valores del coeficiente de reparto octanol-agua de los líquidos iónicos han sido medidos utilizando tres métodos distintos, dos de ellos han sido explicados en el apartado anterior (los métodos de *shake-flask* y de *slow-stirring*) y el tercero es una combinación de estos dos que fue desarrollada por nuestro grupo de investigación en un artículo previo [30]. Antes de llevar a cabo los experimentos, el agua y el octanol han sido saturados mutuamente mediante agitación durante tres días o más. El equipo experimental para el método de *slow-stirring* y para la versión combinada es muy similar encontrándose compuesto por un vial de vidrio de 22 mL con un tapón abierto sellado por un septum de Teflon o silicona. Tanto en el método de *slow-stirring* como en el nuestro, el procedimiento consiste en introducir en el vial 10 mL aproximadamente de agua saturada con octanol y un tubo de Teflon hasta justo un poco más abajo de la superficie del agua. A continuación, se añaden otros 10 mL aproximadamente de la solución 1mM de líquido iónico y octanol presaturado con agua. Posteriormente, en el método combinado el vial se agita intensamente durante 5 minutos y después se mantiene a $30\pm 0.5^\circ\text{C}$ en un baño termostático sin agitación durante 13 días y en el método de *slow-stirring* el vial no se agita de forma intensa pero sí que se mantiene en agitación lenta durante 45 días en el mismo baño gracias a un agitador magnético de Teflon provisto en su interior. En ambos métodos, las muestras son extraídas de la fase rica en octanol introduciendo una jeringuilla a través del septum de silicona. Sin embargo, para extraer las muestras de la fase acuosa se inserta la aguja por el tubo de Teflon directamente hasta la dicha fase para evitar la contaminación de la muestra por el octanol. También en ambos casos, las muestras de cada fase se extraen de los viales hasta que tres medidas coinciden confirmando así que las concentraciones de líquido iónico en cada fase se han estabilizado

En el método de *shake-flask*, el equipo experimental es muy sencillo y está compuesto únicamente por un tubo de centrífuga con su tapón. En este caso, se añaden al tubo aproximadamente 5 mL de agua presaturada con octanol y 5 mL de la solución 1mM de líquido iónico y octanol presaturado con agua. El tubo se agita en un *vortex* durante

5. Coeficientes de reparto octanol-agua de líquidos iónicos

cinco minutos y posteriormente se centrifuga para separar ambas fases. Las muestras se extraen directamente de cada fase con una jeringuilla y se analizan inmediatamente.

En los tres métodos, la concentración de líquido iónico en cada fase se analiza por espectrofotometría UV-Vis tal y como se describe en el apartado de Método Analítico. Las medidas fueron realizadas al menos por triplicado para asegurar la repetitividad de los ensayos y poder calcular la media con la mayor fiabilidad posible. En aquellos casos en los que la absorbancia es superior a 1 se procede a diluir la muestra. La concentración inicial de líquido iónico en la fase octanol fue inferior a 1.2×10^{-2} mol/L, valor que es suficiente para poder determinar la concentración de líquido iónico con precisión. Las concentraciones finales de líquido iónico en la fase octanol estuvieron entre 1.77×10^{-5} mol/L y 3.92×10^{-3} mol/L mientras que en la fase acuosa estuvieron entre 2.75×10^{-5} mol/L y 8.38×10^{-3} mol/L. La concentración de líquido iónico se ha mantenido a dilución infinita para que los valores del coeficiente de reparto octanol-agua sean independientes de la concentración.

En este capítulo, se han estudiado veinticuatro líquidos iónicos basados en sales de imidazolio, piridinio y amonio con distintos sustituyentes: hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim⁺][PF₆⁻]), hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio ([hmim⁺][PF₆⁻]), hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio ([omim⁺][PF₆⁻]), tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim⁺][BF₄⁻]), tetrafluoroborato de 1-octil-3-metilimidazolio ([omim⁺][BF₄⁻]), bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-etil-3-metilimidazolio ([emim⁺][NTf₂⁻]), bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim⁺][NTf₂⁻]), bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-hexil-3-metilimidazolio ([hmim⁺][NTf₂⁻]), bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-octil-3-metilimidazolio ([omim⁺][NTf₂⁻]), bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-2,3-dimetilimidazolio ([bdmim⁺][NTf₂⁻]), triflato de 1-etil-3-metilimidazolio ([emim⁺][TfO⁻]), etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio ([emim⁺][EtSO₄⁻]), acetato de 1-etil-3-metilimidazolio ([emim⁺][CH₃COO⁻]), metilsulfato de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim⁺][MeSO₄⁻]), 2-(2-metoxietoxi) etilsulfato de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim⁺][MDEGSO₄⁻]), cloruro de 1-metilimidazolio ([mim⁺][Cl⁻]), cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio ([emim⁺][Cl⁻]), cloruro de 1-(2-hidroxi-etil)-3-metilimidazolio ([hemim⁺][Cl⁻]), cloruro de 1,2-dimetilimidazolio ([dmim⁺][Cl⁻]), cloruro de 1-etilimidazolio ([eim⁺][Cl⁻]), cloruro de 1-hexil-3-metilimidazolio ([hmim⁺][Cl⁻]), etilsulfato de 1-etil-3-metilpiridinio ([empy⁺][EtSO₄⁻]), tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilpiridinio ([bmpy⁺][BF₄⁻]) y nitrato de etilamonio (ETAN).

5.2.2. Materiales

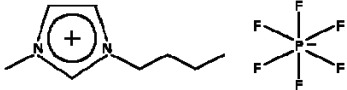
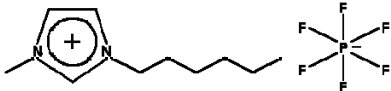
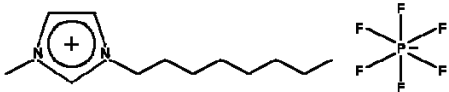
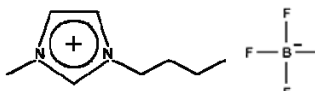
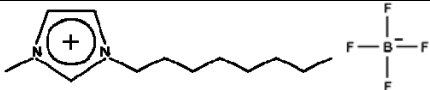
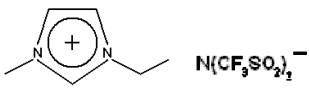
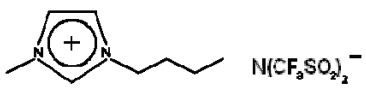
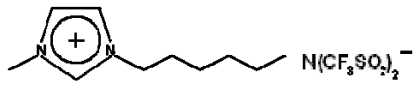
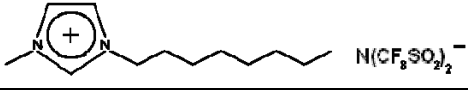
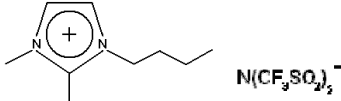
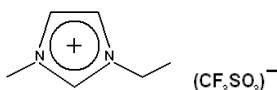
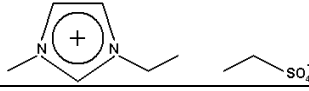
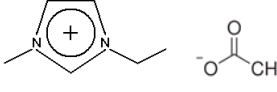
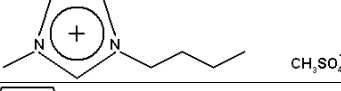
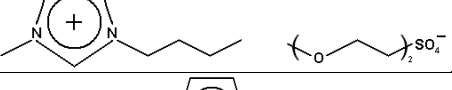
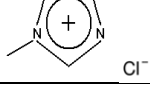
Las estructuras de los líquidos iónicos empleados en este estudio son las que aparecen en la **Tabla 5.2**. Los líquidos iónicos [bmim⁺][PF₆⁻] (pureza>99%), [hmim⁺][PF₆⁻] (pureza>99%), [omim⁺][PF₆⁻] (pureza>99%), [bmim⁺][BF₄⁻] (pureza>99%), [emim⁺][NTf₂⁻] (pureza>99%), [bmim⁺][NTf₂⁻] (pureza>99%), [hmim⁺][NTf₂⁻] (pureza>99%), [omim⁺][NTf₂⁻] (pureza>99%), [bdmim⁺][NTf₂⁻] (pureza>99%), [emim⁺][TfO⁻] (pureza>99%), [emim⁺][EtSO₄⁻] (pureza>99%), [emim⁺][CH₃COO⁻] (pureza>95%), [mim⁺][Cl⁻] (pureza>98%), [emim⁺][Cl⁻] (pureza>98%), [hemim⁺][Cl⁻] (pureza>99%), [dmim⁺][Cl⁻] (pureza>98%), [eim⁺][Cl⁻] (pureza>98%), [hmim⁺][Cl⁻] (pureza>98%) y ETAN (pureza>97%) fueron suministrados por Iolitec (Alemania). Los líquidos iónicos [omim⁺][BF₄⁻] (pureza>99%), [bmim⁺][MeSO₄⁻] (pureza>99%), [bmim⁺][MDEGSO₄⁻] (pureza>98%), [empy⁺][EtSO₄⁻] (pureza>99%) y [bmpy⁺][BF₄⁻]

5. Coeficientes de reparto octanol-agua de líquidos iónicos

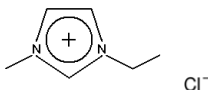
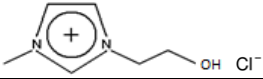
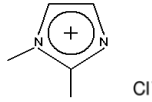
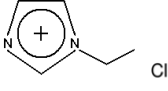
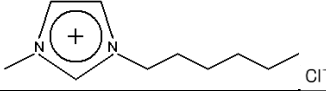
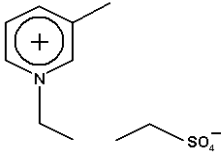
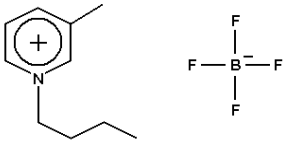
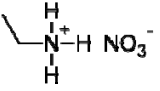
(pureza > 99%) han sido suministrados por Solvent Innovation GmbH (Cologne, Alemania) y el octanol por Merck Eurolab (Alemania).

Tabla 5.2

Abreviatura, peso molecular y estructura de los líquidos iónicos estudiados.

Abreviatura	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Estructura
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	284.18	
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	312.08	
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	340.29	
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	226.02	
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	282.13	
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	391.31	
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	419.37	
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	447.42	
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	475.47	
[bdmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	433.39	
[emim ⁺][TfO ⁻]	260.24	
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	236.29	
[emim ⁺][CH ₃ COO ⁻]	170.21	
[bmim ⁺][MeSO ₄ ⁻]	250.32	
[bmim ⁺][MDEGSO ₄ ⁻]	338.43	
[mim ⁺][Cl ⁻]	118.57	

5. Coeficientes de reparto octanol-agua de líquidos iónicos

Abreviatura	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Estructura
[emim ⁺][Cl ⁻]	146.02	
[hemim ⁺][Cl ⁻]	162.62	
[dmim ⁺][Cl ⁻]	131.58	
[eim ⁺][Cl ⁻]	131.58	
[hmim ⁺][Cl ⁻]	202.72	
[empy ⁺][EtSO ₄ ⁻]	247.32	
[bmpy ⁺][BF ₄ ⁻]	237.05	
ETAN	108.1	

5.2.3. Método analítico

La concentración de los líquidos iónicos en octanol y en agua ha sido determinada por espectrofotometría UV-Vis empleando un espectrofotómetro ThermoSpectronic UV-Vis (Helios α), con una sensibilidad de ± 0.001 . Para cada líquido iónico se ha preparado una curva de calibrado a su longitud de onda de absorbancia máxima: 212 nm para el grupo imidazolio, 216 nm para el grupo piridinio y 210 nm para el grupo amonio. Las curvas de calibrado fueron hechas por duplicado y los valores medios de los coeficientes de extinción se muestran en la **Tabla 5.3**. Las muestras han sido diluidas siempre que la concentración excedía el rango del calibrado.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Validación de la técnica experimental

El método combinado ideado por nuestro grupo de investigación fue validado en un trabajo previo [30] con benzaldehído cuyo coeficiente de reparto octanol-agua ha sido medido por varios autores y tiene un valor de $\text{Log}(K_{ow})=1.48$. El benzaldehído presenta dos picos característicos a 250 y a 200 nm en agua, y a 245 y a 207 nm en octanol entre

las cuales se seleccionaron las longitudes de onda de 250 nm y 245 nm para las medidas de absorbancia en agua y en octanol, respectivamente. El coeficiente de extinción en agua y en octanol se muestra en la **Tabla 5.3**. El valor del $\text{Log}(K_{ow})$ del benzaldehído que se ha obtenido fue de 1.43, el cual se encuentra muy próximo al valor proporcionado en la bibliografía (1.48), confirmando así la validez del método propuesto [30].

5.3.2. Coeficientes de extinción

Para determinar las concentraciones del líquido iónico en cada fase y, como consecuencia, los valores del coeficiente de reparto octanol-agua es necesario calcular el coeficiente de extinción (ϵ) en octanol y en agua a la longitud de onda de máxima absorbancia de los grupos imidazolio ($\lambda_{\text{máx}} = 212$ nm), piridinio ($\lambda_{\text{máx}} = 216$ nm) y amonio ($\lambda_{\text{máx}} = 210$ nm) (ver **Tabla 5.3**).

Tabla 5.3
Coeficientes de extinción del benzaldehído y de los líquidos iónicos en agua y en octanol.

Compuesto	ϵ en agua/ $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	ϵ en octanol/ $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
Benzaldehído	1363.7	1303.6
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	4472.5	3455.7
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	2977.6	5719.0
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	3828.4	5100.0
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	4212.3	4639.6
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	4207.1	4787.0
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	4397.7	3996.4
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	3367.6	4904.1
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	6817.3	9380.8
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	3103.3	4483.1
[bdmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	3067.3	5168.7
[emim ⁺][TfO ⁻]	4326.7	4977.2
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	3604.8	4190.8
[emim ⁺][CH ₃ COO ⁻]	5481.9	4617.4
[bmim ⁺][MeSO ₄ ⁻]	3999.5	4777.0
[bmim ⁺][MDEGSO ₄ ⁻]	5372.7	4776.9
[mim ⁺][Cl ⁻]	4197.7	5136.6
[emim ⁺][Cl ⁻]	4477.8	4513.2
[hemim ⁺][Cl ⁻]	3741.3	4703.9
[dmim ⁺][Cl ⁻]	5808.9	5803.6
[eim ⁺][Cl ⁻]	3988.6	4562.5
[hmim ⁺][Cl ⁻]	4671.8	4368.0
[empy ⁺][EtSO ₄ ⁻]	4062.2	4961.0
[bmpy ⁺][BF ₄ ⁻]	4346.1	9246.3
ETAN	5254.5	12865

A la vista de los resultados de la **Tabla 5.3**, es posible concluir que los coeficientes de extinción de todos los líquidos iónicos presentan valores entre 3000 y 6000 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ excepto el [hmim⁺][NTf₂⁻] en agua y en octanol y el [bmpy⁺][BF₄⁻] en octanol los cuales son claramente más elevados. Los coeficientes de extinción del [hmim⁺][NTf₂⁻] en agua y en octanol y del [bmpy⁺][BF₄⁻] y del ETAN en octanol son más elevados que el resto probablemente debido a las distintas interacciones con los disolventes.

5.3.3. Coeficiente de reparto octanol-agua

Los valores del coeficiente de reparto medidos para cada líquido iónico y obtenidos con los tres métodos experimentales descritos anteriormente se muestran en la **Tabla 5.4**.

5. Coeficientes de reparto octanol-agua de líquidos iónicos

Además, en la misma tabla también se muestran a modo comparativo los valores del coeficiente de reparto encontrados en la bibliografía para algunos de los líquidos iónicos estudiados, clasificados según el método con el que han sido determinados: *shake-flask* o *slow-stirring*. Las incertidumbres que se han calculado son las desviaciones estándares de varios ensayos tal y como se detalló en el subapartado de Materiales y Métodos.

Existen varios métodos para estimar el coeficiente de reparto octanol-agua de un determinado compuesto químico. La mayoría de los métodos consisten en dividir la molécula en fragmentos o grupos de átomos a cada uno de los cuales le corresponde una constante empírica y un factor estructural. A partir de datos experimentales es posible construir una base de datos con la contribución de los distintos fragmentos y los factores estructurales. En este capítulo, se han empleado dos de estas bases de datos existentes para estimar los valores de los coeficientes de reparto octanol-agua a partir de la nomenclatura SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*): la página web *molinspiration.com* [45] y un Software conocido como *Bio-Loom* [46]. Los valores estimados se recogen también en la **Tabla 5.4**

5. Coeficientes de reparto octanol-agua de líquidos iónicos

Tabla 5.4.

Coeficientes de reparto octanol-agua (K_{ow}) de los líquidos iónicos obtenidos por los tres métodos a 30°C, valores presentes en la bibliografía clasificados según el método por el que se han obtenido y valores estimados obtenidos mediante *molinspiration.com* [45] y *Bio-Loom Software* [46].

Compuesto	K_{ow} Método <i>shake- flask</i>	K_{ow} Método combinado	K_{ow} Método <i>slow-stirring</i>	Valores bibliografía		K_{ow} estimado
				Método <i>shake- flask</i>	Método <i>slow- stirring</i>	
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	0.0200 ± 0.0062	0.0323 ± 0.0001 [30]	0.2539 ± 0.0443	0.0200 [47], 0.0041 [33], 0.0035 [9], 0.0191 [48].	0.0219 [3], 0.0037 [32]	0.0091[45], 0.0054 [46]
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	0.0230 ± 0.0072	0.1120 ± 0.0023	0.3130 ± 0.0019	0.0631 [48]	0.1202- 0.338 [49], 0.1380 [32]	0.0931[45], 0.0617[46]
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	0.4663 ± 0.0338	0.2388 ± 0.0279 [30]	0.9196 ± 0.0338	0.4467 [48]	1.2106 [49], 0.4009 [32]	0.9500[45], 0.7079[46]
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	0.0094 ± 0.0003	0.0054 ± 0.0005 [30]	0.1303 ± 0.0186	0.0031 [34]	0.0030 [3]	0.0091[45], 0.0054[46]
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	0.0152 ± 0.0009	0.0537 ± 0.0011 [30]	0.0746 ± 0.0085	0.2089 [48], 0.0457 [34]	0.5754- 1.2190 [49]	0.9500[45], 0.7079[46]
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.0607 ± 0.0039	0.0642 ± 0.0142	0.1407 ± 0.0124	0.0661 [48]	0.0891- 0.1096 [3], 0.0070 [32]	925[45], 0.4467[46]
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.1193 ± 0.0063	0.1076 ± 0.0038 [30]	0.3350 ± 0.0190	0.0229 [9], 0.3162 [48], 1.2882 [34]	0.1096- 0.6166 [3], 0.4266- 0.6607 [49], 0.0210 [32]	925[45], 0.4467[46]
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.0352± 0.0127	0.1336 ± 0.0679	0.7827 ± 0.1734	1.4454 [48]	1.4125- 1.6596 [3]	925[45], 0.4467[46]
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	3.6141 ± 1.0810	3.6567 ± 0.1912 [30]	9.8147 ± 0.1258	11.2202 [48]	6.3095- 11.2202 [3]	925[45], 0.4467[46]
[bdmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.0326 ± 0.0107	0.7252 ± 0.0591	0.7327 ± 0.2768		0.6095- 1.1587 [49]	925[45], 0.4467[46]
[emim ⁺][TfO ⁻]	0.0084 ± 0.0016	0.0322 ± 0.0021	0.1150 ± 0.0987			0.0008[45], 0.0005[46]
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	0.0069 ± 0.0033	0.0226 ± 0.0093	0.0127 ± 0.0015			0.0008[45], 0.0005[46]
[emim ⁺][CH ₃ COO ⁻]	0.0098 ± 0.0008	0.0092 ± 0.0008	0.539 ± 0.0712	0.0030 [34]		0.0008[45], 0.0005[46]
[bmim ⁺][MeSO ₄ ⁻]	0.0072 ± 0.0007	0.0111 ± 0.0002	0.0038 ± 0.0038			0.0091[45], 0.0054[46]
[bmim ⁺][MDEGSO ₄ ⁻]	0.0476 ± 0.0363	0.0191 ± 0.0036	0.0111 ± 0.0006			0.0001[45], 1.95x10 ⁻⁵ [46]

5. Coeficientes de reparto octanol-agua de líquidos iónicos

Compuesto	K_{ow} Método <i>shake- flask</i>	K_{ow} Método combinado	K_{ow} Método <i>slow-stirring</i>	Valores bibliografía	K_{ow} estimado
[mim ⁺][Cl ⁻]	0.0643 ± 0.0230	0.0354± 0.0138	0.1539 ± 0.0953		0.0005[45], 2.24x10 ⁻⁵ [46]
[emim ⁺][Cl ⁻]	0.0849 ± 0.0049	0.096 ± 0.0242	0.1612 ± 0.0278		0.0008[45], 0.0005[46]
[hemim ⁺][Cl ⁻]	0.0111 ± 0.0036	0.0058 ± 0.0001	0.0125 ± 0.0047		7.85x10 ⁻⁵ [45], 0.0001[46]
[dmim ⁺][Cl ⁻]	0.0140 ± 0.0026	0.0242 ± 0.0022	0.0227 ± 0.0032		0.0003[45], 0.0001[46]
[eim ⁺][Cl ⁻]	0.0445 ± 0.0042	0.0699 ± 0.0013	0.0764 ± 0.0014		0.0013[45], 3.1623[46]
[hmim ⁺][Cl ⁻]	0.0213 ± 0.0064	0.0221 ± 0.0010	0.1246 ± 0.0041	0.0186 [48]	0.0931[45], 0.0617[46]
[empy ⁺][EtSO ₄ ⁻]	0.0049 ± 0.0011	0.0203 ± 0.0057	0.0313 ± 0.0100		0.0019[45], 0.0007[46]
[bmpy ⁺][BF ₄ ⁻]	0.0082 ± 0.0009	0.0105 ± 0.0004	0.0170 ± 0.0049		0.0215[45], 0.0076[46]
ETAN	0.0028 ± 0.0008	0.0017 ± 0.0004	0.0026 ± 0.0008		0.0005[45], 0.0003[46]

5.3.4. Discusión de los resultados

La mayoría de los líquidos iónicos estudiados en este capítulo son bastante hidrofílicos, por lo que es de esperar que el coeficiente de reparto octanol-agua sea pequeño. Además, tal y como se muestra en la **Tabla 5.4**, los valores obtenidos son inferiores a los de los disolventes orgánicos convencionales, por ejemplo, $K_{ow(ethanol)}=0.479$ [50] o $K_{ow(n-heptane)}=31623$ [51].

Por otro lado, los tres métodos que se han empleado en este capítulo para determinar el coeficiente de reparto octanol-agua tienen sus ventajas y desventajas.

El método de *shake-flask* es un método clásico para medir el coeficiente de reparto octanol-agua que ha sido ampliamente utilizado durante las últimas décadas. Sin embargo, para que las medidas sean fiables es necesario tener en cuenta algunos aspectos importantes. Por ejemplo, llevar a cabo una presaturación de ambos disolventes entre sí es esencial para obtener valores precisos del volumen de cada fase. Por otro lado, la agitación, que puede realizarse manual o mecánicamente, debe ser suficientemente prolongada en el tiempo para conseguir una disolución homogénea pero, dado que el octanol y el agua forman una emulsión, la separación posterior de ambas fases es difícil. La centrifugación podría solucionar este problema pero, incluso con ella, podrían quedar algunas microgotas del otro componente en cada una de las fases lo que introduciría grandes errores en la medida final, especialmente, en el caso de compuestos iónicos hidrofóbicos. En nuestros resultados, se ha observado que los valores del coeficiente de reparto obtenidos por el método de *shake-flask* han sido generalmente los más bajos, probablemente debido a que el equilibrio aún no se había alcanzado.

El método de *slow-stirring* es capaz de evitar los errores de medida generados por la emulsión formada entre el octanol y el agua, especialmente, en los compuestos hidrofóbicos. Este método, en términos generales, representa mejor las condiciones ecológicas donde agua y aceite se encuentran en equilibrio y el líquido iónico está presente en concentraciones muy bajas. Sin embargo, no es apropiado para todos los líquidos iónicos ya que algunos de ellos pueden descomponerse después de estar en

contacto con agua durante un período de tiempo largo. Se ha observado que los valores del coeficiente de reparto obtenidos con este método son, generalmente, mucho más elevados que los valores obtenidos por los otros dos métodos.

El método combinado desarrollado por nuestro grupo de investigación pretende evitar las desventajas de los dos métodos convencionales. Como se muestra en la **Tabla 5.4**, los valores que se obtienen con el método combinado en muchos casos son intermedios a los obtenidos con los otros dos métodos. Sin embargo, dependiendo del líquido iónico, se han encontrado distintas situaciones. Para algunos líquidos iónicos, el método combinado proporciona resultados similares a los obtenidos con el método de *shake-flask* y, para otros, similares a los valores del *slow-stirring*. Esto podría deberse a que cada líquido iónico presenta una velocidad de degradación en agua distinta y/o a la facilidad para formar microemulsiones lo que demuestra la dificultad implícita al uso de una técnica experimental u otra.

No obstante, aunque cada método experimental ha conducido a distintos valores, es posible identificar algunas tendencias. Los valores del coeficiente de reparto octanol-agua aumentan con la longitud de la cadena alquílica (**Figura 5.2**) tal y como sostienen los resultados de otros autores encontrados en la bibliografía [3, 5, 7, 30, 37, 39, 52]. Los resultados muestran que los líquidos iónicos con anión bis(trifluorometilsulfonil)imida presentan valores del coeficiente de reparto más elevados mientras que los líquidos iónicos con catión amonio tienen los valores más bajos.

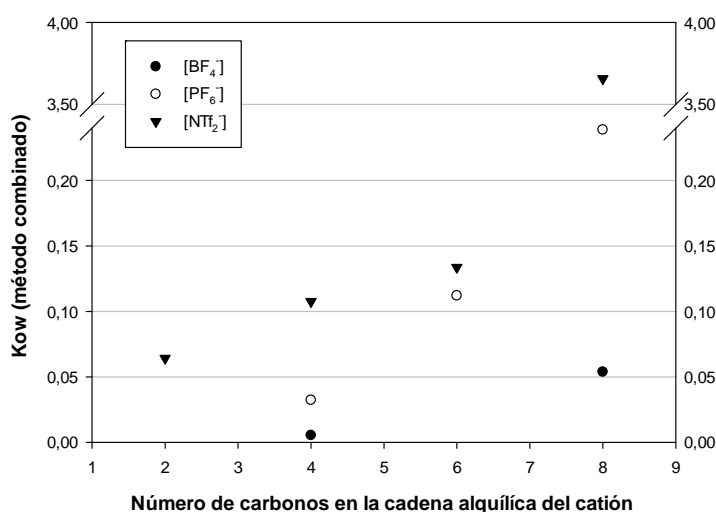


Figura 5.2. Coeficientes de reparto octanol-agua (K_{ow}) obtenidos mediante el método combinado para líquidos iónicos con distintos aniones en función de la longitud de la cadena alquílica del catión.

Manteniendo el catión imidazolio constante, es posible estudiar el efecto del anión sobre el coeficiente de reparto octanol-agua. De los resultados se deduce que el orden de hidrofiliidad para aquellos líquidos iónicos que no son completamente solubles en agua es el siguiente: $[BF_4^-] > [PF_6^-] > [NTf_2^-]$ (**Figura 5.3**). Esto puede ser debido a la mayor simetría y, en consecuencia, mayor carácter hidrofóbico, del anión $[PF_6^-]$ en comparación con el anión $[BF_4^-]$ y del anión $[NTf_2^-]$ en comparación con el anión $[PF_6^-]$, debido a la inclusión de dos átomos de carbono en la estructura del anión $[NTf_2^-]$. Por otro lado, los líquidos iónicos que son completamente solubles en agua presentan el

5. Coeficientes de reparto octanol-agua de líquidos iónicos

siguiente orden de hidrofiliicidad: $[\text{CH}_3\text{COO}^-] > [\text{Cl}^-]$. Manteniendo el mismo catión, se ha obtenido que los líquidos iónicos con los aniones $[\text{MDEGSO}_4^-]$, $[\text{MeSO}_4^-]$, $[\text{TfO}^-]$ y $[\text{EtSO}_4^-]$ presentan una hidrofiliicidad intermedia entre los dos grupos de aniones mencionados.

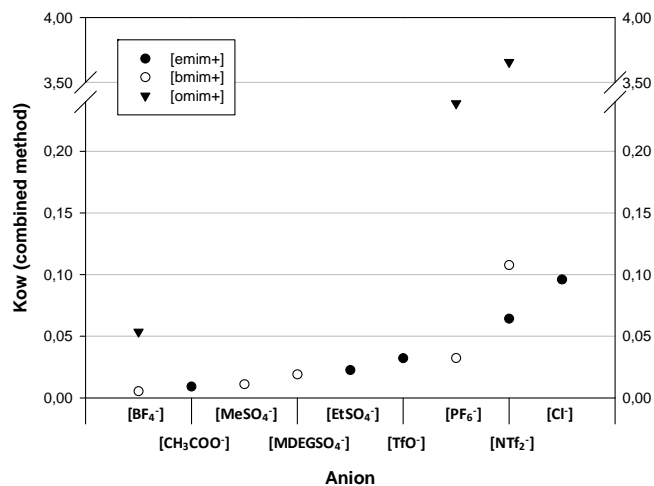


Figura 5.3. Coeficientes de reparto octanol-agua (K_{ow}) obtenidos mediante el método combinado de líquidos iónicos con tres longitudes distintas de la cadena alquílica ($[\text{emim}^+]$, $[\text{bmim}^+]$ y $[\text{omim}^+]$) y distintos aniones.

Los resultados sugieren que la presencia de un grupo hidroxilo reduce la lipofiliicidad de un líquido iónico basado en una sal de cloruro de imidazolio tal y como se observa al comparar $[\text{hemim}^+][\text{Cl}^-]$ con $[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$.

Se han detectado diferencias entre los valores de los coeficientes de reparto octanol-agua estimados mediante los dos métodos de simulación molecular aunque los resultados siguen las mismas tendencias y están en consonancia con las medidas experimentales.

5.4. CONCLUSIONES

El coeficiente de reparto octanol-agua de líquidos iónicos es un parámetro importante que determina la lipofiliicidad de los líquidos iónicos y puede usarse para determinar algunas propiedades como son sus efectos medioambientales, el reparto de soluto líquido-líquido y la miscibilidad con otros disolventes. Sin embargo, los valores del coeficiente de reparto difieren dependiendo de la técnica experimental empleada para su determinación. Es posible que las diferencias en dichos valores encontradas por los distintos autores para un mismo líquido iónico se deban también a las distintas concentraciones de líquido iónico empleadas.

En este estudio, los valores del coeficiente de reparto octanol-agua de los líquidos iónicos han variado entre 0.0017 (ETAN) y 3.6567 ($[\text{omim}^+][\text{NTf}_2^-]$) a 30°C. Se puede concluir que los líquidos iónicos estudiados son bastante hidrofílicos y su coeficiente de reparto octanol-agua es inferior al de los disolventes industriales comúnmente empleados.

Los líquidos iónicos más hidrofílicos presentan valores del coeficiente de reparto octanol-agua más bajos y estos aumentan con la longitud de la cadena alquílica. Es posible concluir que ninguno de los líquidos iónicos se acumularán o concentrarán en la biota ya que todos ellos presentan valores del coeficiente de reparto octanol-agua muy pequeños.

5.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Keskin, D. Kayrak-Talay, U. Akman, Ö. Hortaçsu, A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications, *J. Supercrit. Fluids.* 43 (2007) 150–180.
- [2] G.J. Kabo, A.V. Blokhin, Y.U. Paulechka, A.G. Kabo, M.P. Shymanovich, J.W. Magee, Thermodynamic properties of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate in the condensed state, *J. Chem. Eng. Data* 49 (2004) 453–461.
- [3] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N. Aki, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, Octanol–water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 83–90.
- [4] M.G. Freire, P.J. Carvalho, A.M.S. Silva, L.M.N.B.F. Santos, L.P.N. Rebelo, I.M. Marrucho, J.A.P. Coutinho, Ion specific effects on the mutual solubilities of water and hydrophobic ionic liquids, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 202–211.
- [5] U. Domańska, A. Rękawek, A. Marciniak, Solubility of 1-alkyl-3-ethylimidazolium-based ionic liquids in water and 1-octanol, *J. Chem. Eng. Data* 53 (2008) 1126–1132.
- [6] L.-G. Danielsson, Y.-H. Zhang, Methods for determining n-octanol-water partition constants, *TrAC Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 188–196.
- [7] Y. Deng, P. Besse-Hoggan, M. Sancelme, A.-M. Delort, P. Husson, M.F. Costa Gomes, Influence of oxygen functionalities on the environmental impact of imidazolium based ionic liquids, *J. Hazard. Mater.* 198 (2011) 165–174.
- [8] S. Han, J. Qiao, Y. Zhang, H. Lian, X. Ge, Determination of n-octanol/water partition coefficients of weak ionizable solutes by RP-HPLC with neutral model compounds, *Talanta* 97 (2012) 355–361.
- [9] S.H. Lee, S.B. Lee, Octanol/water partition coefficients of ionic liquids, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (2009) 202–207.
- [10] D. Mackay, Correlation of bioconcentration factors, *Environ. Sci. Technol.* 16 (1982) 274–278.
- [11] D. Mackay, A. Fraser, Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models, *Environ. Pollut.* 110 (2000) 375–391.

- [12] X. Wang, Y. Ma, W. Yu, H.J. Geyer, Two-compartment thermodynamic model for bioconcentration of hydrophobic organic chemicals by alga: Quantitative relationship between bioconcentration factor and surface area of marine algae or octanol/water partition coefficient, *Chemosphere* 35 (1997) 1781–1797.
- [13] W.M. Meylan, P.H. Howard, R.S. Boethling, D. Aronson, H. Printup, S. Gouchie, Improved method for estimating bioconcentration/bioaccumulation factor from octanol/water partition coefficient, *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (1999) 664–672.
- [14] O.A. Raevsky, V.Y. Grigor'ev, E.E. Weber, J.C. Dearden, Classification and quantification of the toxicity of chemicals to guppy, fathead minnow and rainbow trout: Part 1. Nonpolar narcosis mode of action, *QSAR Comb. Sci.* 27 (2008) 1274–1281.
- [15] L.M. Su, X. Liu, Y. Wang, J.J. Li, X.H. Wang, L.X. Sheng, Y.H. Zhao, The discrimination of excess toxicity from baseline effect: Effect of bioconcentration, *Sci. Total Environ.* 484 (2014) 137–145.
- [16] W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt, Handbook of chemical property estimation methods: environmental behavior of organic compounds, American Chemical Society, 1990.
- [17] S.W. Karickhoff, Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils, *Chemosphere* 10 (1981) 833–846.
- [18] Z. Gerstl, Estimation of organic chemical sorption by soils, *J. Contam. Hydrol.* 6 (1990) 357–375.
- [19] C.T. Chiou, Partition and adsorption of organic contaminants in environmental systems, John Wiley & Sons, 2003.
- [20] E. Voutsas, K. Magoulas, D. Tassios, Prediction of the bioaccumulation of persistent organic pollutants in aquatic food webs, *Chemosphere* 48 (2002) 645–651.
- [21] R.V. Thomann, Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains, *Environ. Sci. Technol.* 23 (1989) 699–707.
- [22] D.T. Allen, D.R. Shonnard, Green Engineering: Environmentally Conscious Design of Chemical Processes, Pearson Education, 2001.
- [23] R.R. Lassiter, N.E.R.C. (Corvallis Or.), Modeling dynamics of biological and chemical components of aquatic ecosystems, National Environmental Research Center, 1975.
- [24] G.D. Veith, P. Kosian, Estimating bioconcentration potential from octanol/water partition coefficients, Phys. Behav. PCBs Gt. Lakes Ann Arbor Sci. Ann Arbor MI 1983 P 269-282 3 Fig 2 Tab 2 Ref. (1983).

- [25] Y. Marcus, Structural aspects of water in 1-octanol, *J. Solut. Chem.* 19 (1990) 507–517.
- [26] US Environmental Protection Agency, Product Properties Test Guidelines: Partition Coefficient (n-Octanol/Water), Shake Flask Method, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1996.
- [27] OECD, Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 1995. <http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264069626-en> (consultado el 05-06-2013).
- [28] A. Berthod, S. Carda-Broch, Determination of liquid–liquid partition coefficients by separation methods, *Estim. Physicochem. Prop. Chromatogr. Electrophor. Tech.* 1037 (2004) 3–14.
- [29] OECD, Test No. 123: Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 2006. <http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264015845-en> (consultado el 05-06-2013).
- [30] A.P. de los Ríos, F.J. Hernández-Fernández, F. Tomás-Alonso, M. Rubio, D. Gómez, G. Villora, On the importance of the nature of the ionic liquids in the selective simultaneous separation of the substrates and products of a transesterification reaction through supported ionic liquid membranes, *J. Membr. Sci.* 307 (2008) 233–238.
- [31] Y. Deng, P. Besse-Hoggan, P. Husson, M. Sancelme, A.-M. Delort, P. Stepnowski, M. Paszkiewicz, M. Gołębowski, M.F. Costa Gomes, Relevant parameters for assessing the environmental impact of some pyridinium, ammonium and pyrrolidinium based ionic liquids, *Chemosphere* 89 (2012) 327–333.
- [32] S.P.M. Ventura, R.L. Gardas, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, Ecotoxicological risk profile of ionic liquids: octanol-water distribution coefficients and toxicological data, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86 (2011) 957–963.
- [33] J.L. Kaar, A.M. Jesionowski, J.A. Berberich, R. Moulton, A.J. Russell, Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4125–4131.
- [34] H. Zhao, G.A. Baker, Z. Song, O. Olubajo, L. Zanders, S.M. Campbell, Effect of ionic liquid properties on lipase stabilization under microwave irradiation, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 57 (2009) 149–157.
- [35] A. Chapeaux, L.D. Simoni, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, Liquid phase behavior of ionic liquids with water and 1-octanol and modeling of 1-octanol/water partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data* 52 (2007) 2462–2467.
- [36] U. Domańska, E. Bogel-Łukasik, R. Bogel-Łukasik, 1-Octanol/Water Partition Coefficients of 1-Alkyl-3-methylimidazolium Chloride, *Chem. – Eur. J.* 9 (2003) 3033–3041.

- [37] G. Kamath, N. Bhatnagar, G.A. Baker, S.N. Baker, J.J. Potoff, Computational prediction of ionic liquid 1-octanol/water partition coefficients, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 4339–4342.
- [38] B.-S. Lee, S.-T. Lin, A priori prediction of the octanol–water partition coefficient (Kow) of ionic liquids, *Fluid Phase Equilibr.* 363 (2014) 233–238.
- [39] C.-W. Cho, U. Preiss, C. Jungnickel, S. Stolte, J. Arning, J. Ranke, A. Klamt, I. Krossing, J. Thörming, Ionic liquids: predictions of physicochemical properties with experimental and/or DFT-calculated LFER parameters to understand molecular interactions in solution, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 6040–6050.
- [40] P. Wattanasin, P. Saetear, P. Wilairat, D. Nacapricha, S. Teerasong, Zone fluidics for measurement of octanol–water partition coefficient of drugs, *Anal. Chim. Acta.* 860 (2015) 1–7.
- [41] P.M. Heynderickx, P. Španěl, H. Van Langenhove, Quantification of octanol–water partition coefficients of several aldehydes in a bubble column using selected ion flow tube mass spectrometry, *Fluid Phase Equilibr.* 367 (2014) 22–28.
- [42] P. Stepnowski, P. Storoniak, Lipophilicity and metabolic route prediction of imidazolium ionic liquids, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 12 (2005) 199–204.
- [43] J. Ranke, A. Müller, U. Bottin-Weber, F. Stock, S. Stolte, J. Arning, R. Störmann, B. Jastorff, Lipophilicity parameters for ionic liquid cations and their correlation to in vitro cytotoxicity, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67 (2007) 430–438.
- [44] S. Studzińska, P. Stepnowski, B. Buszewski, Application of chromatography and chemometrics to estimate lipophilicity of ionic liquid cations, *QSAR Comb. Sci.* 26 (2007) 963–972.
- [45] <http://www.molinspiration.com/services/logp.html>, (consultado en 2015).
- [46] <http://www.biobyte.com>, (consultado en 2015).
- [47] C.-H. Chou, F.-S. Perng, D.S.H. Wong, W.C. Su, 1-octanol/water partition coefficient of ionic liquids, Boulder, CO, USA, (2003).
- [48] S. H. Lee, Biocatalysis in ionic liquids: influence of physicochemical properties of ionic liquids on enzyme activity and enantioselectivity, Pohang University of Science and Technology, Pohang, Korea, (2005).
- [49] R.L. Gardas, M.G. Freire, I.M. Marrucho, J.A.P. Coutinho, Octanol-water partition coefficients of (imidazolium-based) ionic liquids in: The 2nd National Conference on Thermodynamics of Chemical & Biological Systems, Organized by the Indian Thermodynamics Society, October 30 to November 1, Department of Chemistry, Veer Narmad South Gujarat University, Surat, India, (2006).

[50] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.* 71 (1971) 525–616.

[51] P. Ruelle, The n-octanol and n-hexane/water partition coefficient of environmentally relevant chemicals predicted from the mobile order and disorder (MOD) thermodynamics, *Chemosphere* 40 (2000) 457–512.

[52] C.-M. Hsieh, S.-T. Lin, Prediction of 1-octanol–water partition coefficient and infinite dilution activity coefficient in water from the PR + COSMOSAC model, *Spec. Sect. Fifth Ind. Prop. Simul. Chall.* 285 (2009) 8–14.

6

Toxicidad acuática de líquidos iónicos mediante el test de *Vibrio fischeri*

“Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”

Marie Curie (1867-1934)

6. TOXICIDAD ACUÁTICA DE LÍQUIDOS IÓNICOS MEDIANTE EL TEST DE *VIBRIO FISCHERI*

6.1. INTRODUCCIÓN

Los líquidos iónicos son sales orgánicas formadas por iones cargados negativa y positivamente y que en su mayoría son líquidos a temperatura ambiente. Durante los últimos años, estos compuestos han despertado un gran interés principalmente en su uso en una gran variedad de procesos químicos como disolventes “verdes”. Aunque los disolventes orgánicos convencionales están ampliamente disponibles y no son excesivamente caros, algunos aspectos como pueden ser su volatilidad, toxicidad, peligrosidad o su capacidad como agentes contaminantes medioambientales podrían limitar su uso en el futuro. La creciente preocupación sobre el riesgo que supone el uso de estos disolventes ha conducido a la búsqueda de alternativas y el descubrimiento de los líquidos iónicos parece ser una de ellas [1]. Los líquidos iónicos pueden ser usados en una amplia variedad de aplicaciones como disolventes, electrolitos, lubricantes, fase estacionaria en cromatografía, matrices para espectrometría de masas, soportes para inmovilización de enzimas, cristales líquidos, molde para síntesis de nanomateriales, en procesos de separación, en preparación de membranas catalíticas y en la generación de materiales altamente conductores. Como disolventes, los líquidos iónicos poseen ciertas ventajas sobre los disolventes convencionales lo que les hace ser compatibles medioambientalmente: presiones de vapor inferiores o nulas, mayor estabilidad química y térmica, no inflamabilidad, elevada conductividad iónica, gran ventana electroquímica y capacidad de solvatación [2].

Los líquidos iónicos son compuestos no volátiles lo que significa que no se evaporan y, por tanto, no producen contaminación atmosférica. A modo de ejemplo, Kabo *et al.* [3] determinaron la presión de vapor del [bmim⁺][PF₆⁻] a 298.15 K y resultó ser de 10⁻¹¹ Pa. Si los ingenieros químicos consiguieran reemplazar los disolventes orgánicos convencionales por líquidos iónicos, la contaminación medioambiental y los costes derivados de la mitigación de esta se reducirían significativamente. No obstante, aunque los líquidos iónicos disminuirían los costes y el riesgo medioambiental, son muy solubles en agua por lo que podrían conllevar contaminación acuática si son descargados a corrientes acuáticas [4-9]. Por ejemplo, Anthony *et al.* [10] determinaron la solubilidad del líquido iónico [bmim⁺][PF₆⁻] en agua en un 2% (wt). Sin embargo, la solubilidad de los líquidos iónicos depende de su naturaleza, y, en especial, de la naturaleza de sus cationes y aniones. Por ello, el agua es el medio por excelencia en el que los líquidos iónicos pueden ser descargados al medioambiente. Con el objetivo de aumentar el número de aplicaciones industriales, es muy importante conocer los posibles riesgos derivados del comportamiento toxicológico de los líquidos iónicos pero, sin embargo, todavía faltan muchos datos por incluir en la bibliografía con respecto a su toxicidad. Algunos autores han estudiado la toxicidad de los líquidos iónicos usando distintos organismos acuáticos como bacterias (especialmente, *Vibrio fischeri*) [4, 11-18], algas verdes (*e.g.* *Pseudokirchneriella subcapitata*) [19, 20], plantas acuáticas (*e.g.* lenteja acuática *Lemna minor*) [16, 21, 22], invertebrados (principalmente, el crustáceo de agua dulce *Daphnia magna*) [20, 23] o vertebrados como peces (el pez cebra *Danio rerio*) [20, 24] o ranas (*Rana nigromaculata*) [25]. No obstante, aunque el número de publicaciones que evalúan la toxicidad acuática de los líquidos iónicos está aumentando, la información disponible es todavía limitada. Además, el número de posibles líquidos iónicos sintetizados es enorme: Álvarez-Guerra

e Irabien [26] determinaron que pueden sintetizarse hasta 10^6 líquidos iónicos distintos con 10^{12} combinaciones binarias y 10^{18} sistemas ternarios.

Los métodos más empleados para determinar el riesgo toxicológico en un medio acuoso son los ensayos de inhibición [17]. De entre todos ellos, el más común según Parvez *et al.* [27] es el que emplea una bacteria gram negativa conocida como *Vibrio fischeri* (inicialmente conocida como *Photobacterium Phosphoreum*). Este ensayo de inhibición se caracteriza por ser el más rápido, rentable, sensible y reproducible y constituye el bioensayo ecotoxicológico estándar en Europa (DIN EN ISO 11348) [28]. A lo largo de los años, se han desarrollado distintos ensayos de inhibición de luminiscencia en *Vibrio fischeri* para el análisis de muestras en agua [17]. En este capítulo, se ha determinado la ecotoxicidad de varios líquidos iónicos mediante el Test de Toxicidad de Microtox®, uno de los más ampliamente usados debido a que la emisión de luz es estable e intensa, es altamente sensible a distintos compuestos y flexible debido al empleo de una bacteria marina [29]. Por todo ello, este método es el que más se ha utilizado durante más de dos décadas para determinar la toxicidad de los compuestos orgánicos convencionales [30]. El método está basado en la rápida determinación de la toxicidad acuática de muestras acuosas midiendo la disminución en la luz emitida por la bacteria luminiscente *Vibrio fischeri*. La emisión de luz es directamente proporcional a la actividad metabólica de la población bacteriana de manera que cualquier inhibición de la actividad enzimática genera una disminución de la luminiscencia [27].

En los estudios de toxicidad de líquidos iónicos que se encuentran en la bibliografía, algunos autores han determinado la dependencia que existe entre la toxicidad y algunos parámetros como el tipo de catión, la longitud de la cadena alquílica, la presencia de una segunda cadena alquílica corta o de una cadena lateral funcionalizada en el catión y el tipo de anión. El efecto del tipo de catión sobre la toxicidad global de los líquidos iónicos con *Vibrio fischeri* aún no ha sido estudiado en profundidad, aunque algunos autores como Costa *et al.* [31] han observado en sus ensayos una mayor toxicidad en aquellos líquidos iónicos con estructura piridínica que en los que poseen estructura imidazólica. Los mismos resultados encontraron Ventura *et al.* [32], quienes dedujeron que los cationes con un anillo de seis miembros como el piridinio eran más tóxicos que aquellos con anillos de cinco miembros como es el caso del imidazolio. En cuanto a la longitud de la cadena alquílica, muchos autores afirman que la toxicidad del líquido iónico aumenta con la longitud de la cadena alquílica del catión [4, 12-15, 19, 33]. Esto es debido a que un aumento en la longitud de la cadena alquílica conlleva un aumento de la lipofiliidad del catión lo que facilita la entrada del líquido iónico a través de la membrana celular [34, 35]. Además, la estructura de los líquidos iónicos que han sido estudiados (especialmente, los basados en sales de imidazolio) se asemejan a la de los surfactantes catiónicos, los cuáles provocan un aumento en la permeabilidad de la membrana, así como efectos narcóticos cuando la longitud de su cadena alquílica aumenta [4, 17, 33, 36]. Por otra parte, el anión también contribuye a la toxicidad del líquido iónico aunque existen bastantes discrepancias al respecto. Para aquellos autores que encontraron un efecto relevante del anión sobre la toxicidad del líquido iónico, el orden establecido en aumento de toxicidad fue el siguiente: bis(trifluorometilsulfonyl)imida > hexafluorofosfato > tetrafluoroborato > cloruro [13, 37, 38]. Según algunos autores como Pinto *et al.* [13], de [bmim⁺][Cl⁻] a [bmim⁺][BF₄⁻] la toxicidad medida hacia *Vibrio fischeri* aumentó más de 12 veces. Sin embargo, otros autores creen que la influencia del anión en la toxicidad del líquido iónico es prácticamente despreciable y que el efecto más importante sobre esta es la longitud de la cadena alquílica lateral del catión [4, 14, 39]. Finalmente, existen algunas referencias en

la bibliografía que sugieren que la funcionalización de la cadena lateral (por ejemplo, mediante introducción de átomos de oxígeno) conlleva una menor toxicidad [16, 38]. En este capítulo, se estudian estas y otras influencias sobre la toxicidad hacia *Vibrio fischeri* de los líquidos iónicos, tales como la influencia de una segunda cadena alquílica corta en el catión del líquido iónico o dobles enlaces en la misma.

Durante los últimos años, varios autores han desarrollado modelos matemáticos basados en las características estructurales de los líquidos iónicos para predecir su toxicidad. Estos modelos son conocidos como *Quantitative Structure-Activity Relationships* (QSAR) y consisten en métodos de contribución de grupos [12, 26, 34, 39-45]. Estos métodos tienen en cuenta la influencia de los tres factores principales sobre la toxicidad del líquido iónico, el anillo catiónico, la cadena alquílica y el anión. Sin embargo, estos modelos presentan limitaciones debido a la escasez de datos experimentales para algunas familias específicas de líquidos iónicos. Recientemente, un artículo de revisión ha subrayado la necesidad de estudios más amplios y sistemáticos para enriquecer las bases de datos toxicológicas y así entender mejor la toxicidad de los líquidos iónicos [46]. Debido a esa falta de información toxicológica de los líquidos iónicos, algunos estudios han intentado establecer relaciones o correlaciones matemáticas entre la toxicidad y la lipofilicidad o hidrofobicidad de los líquidos iónicos empleando el coeficiente de reparto octanol-agua [4, 16, 47].

El principal objetivo en este capítulo ha sido medir la toxicidad acuática de un conjunto de veintinueve líquidos iónicos basados en sales de imidazolio, piridinio y amonio empleando el test de inhibición de *Vibrio fischeri*: hexafluorofosfato de 1-etil-3-metilimidazolio ([emim⁺][PF₆⁻]), hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim⁺][PF₆⁻]), hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio ([hmim⁺][PF₆⁻]), hexafluorofosfato de 1-metil-3-octilimidazolio ([omim⁺][PF₆⁻]), tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim⁺][BF₄⁻]), tetrafluoroborato de 1-metil-3-octilimidazolio ([omim⁺][BF₄⁻]), bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-etil-3-metilimidazolio ([emim⁺][NTf₂⁻]), bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim⁺][NTf₂⁻]), bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-hexil-3-metilimidazolio ([hmim⁺][NTf₂⁻]), bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-metil-3-octilimidazolio ([omim⁺][NTf₂⁻]), bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-2,3-dimetilimidazolio ([bdmim⁺][NTf₂⁻]), triflato de 1-etil-3-metilimidazolio ([emim⁺][TfO⁻]), etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio ([emim⁺][EtSO₄⁻]), acetato de 1-etil-3-metilimidazolio ([emim⁺][CH₃COO⁻]), metilsulfato de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim⁺][MeSO₄⁻]), 2-(2-metoxietoxi)etilsulfato de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim⁺][MDEGSO₄⁻]), cloruro de 1-metilimidazolio ([mim⁺][Cl⁻]), cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio ([emim⁺][Cl⁻]), cloruro de 1-metil-3-propilimidazolio ([pmim⁺][Cl⁻]), cloruro de 1-alil-3-metilimidazolio ([amim⁺][Cl⁻]), cloruro de 1-(2-hidroxi-etil)-3-metilimidazolio ([hemim⁺][Cl⁻]), cloruro de 1,2-dimetilimidazolio ([dmim⁺][Cl⁻]), cloruro de 1-etilimidazolio ([eim⁺][Cl⁻]), cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim⁺][Cl⁻]), cloruro de 1-hexil-3-metilimidazolio ([hmim⁺][Cl⁻]), cloruro de 1-metil-3-octilimidazolio ([omim⁺][Cl⁻]), etilsulfato de 1-etil-3-metilpiridinio ([empy⁺][EtSO₄⁻]), tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilpiridinio ([bmpy⁺][BF₄⁻]) y nitrato de etilamonio (ETAN). La toxicidad de los líquidos iónicos ha sido determinada como la concentración nominal efectiva o EC₅₀ que se define como la concentración de líquido iónico que produce una mortalidad del 50% de la población de bacterias. Además, también se ha realizado un estudio exhaustivo sobre los principales factores que intervienen en la toxicidad de los líquidos iónicos y se ha establecido una correlación

entre los valores de EC₅₀ obtenidos y los coeficientes de reparto octanol-agua (K_{ow}) que se obtuvieron en el capítulo anterior y que se encuentran publicados en un artículo [48].

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

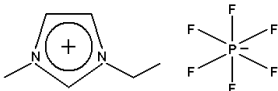
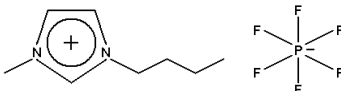
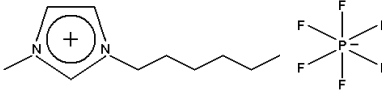
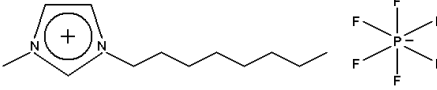
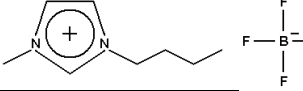
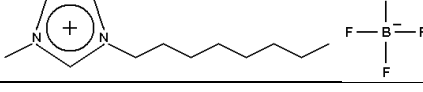
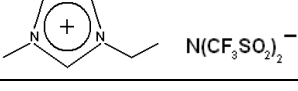
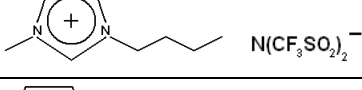
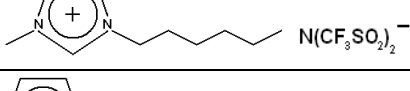
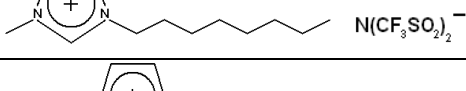
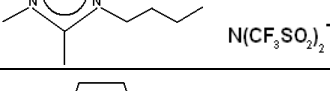
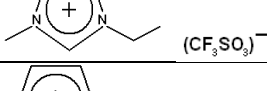
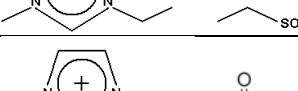
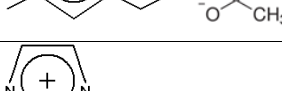
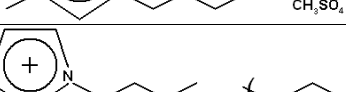

6.2.1. Materiales

Las estructuras de los líquidos iónicos empleados se muestran en la **Tabla 6.1**. Los líquidos iónicos [emim⁺][PF₆⁻] (pureza>99%), [bmim⁺][PF₆⁻] (pureza>99%), [hmim⁺][PF₆⁻] (pureza>99%), [omim⁺][PF₆⁻] (pureza>99%), [bmim⁺][BF₄⁻] (pureza>99%), [emim⁺][NTf₂⁻] (pureza>99%), [bmim⁺][NTf₂⁻] (pureza>99%), [hmim⁺][NTf₂⁻] (pureza>99%), [omim⁺][NTf₂⁻] (pureza>99%), [bdmim⁺][NTf₂⁻] (pureza>99%), [emim⁺][TfO⁻] (pureza>99%), [emim⁺][EtSO₄⁻] (pureza>99%), [emim⁺][CH₃COO⁻] (pureza>95%), [mim⁺][Cl⁻] (pureza>98%), [emim⁺][Cl⁻] (pureza>98%), [pmim⁺][Cl⁻] (pureza>98%), [amim⁺][Cl⁻] (pureza>98%), [hemim⁺][Cl⁻] (pureza>99%), [dmim⁺][Cl⁻] (pureza>98%), [eim⁺][Cl⁻] (pureza>98%), [bmim⁺][Cl⁻] (pureza>99%), [hmim⁺][Cl⁻] (pureza>98%), [omim⁺][Cl⁻] (pureza>98%) y ETAN (pureza>97%) han sido suministrados por Iolitec (Alemania). Los líquidos iónicos [omim⁺][BF₄⁻] (pureza>99%), [bmim⁺][MeSO₄⁻] (pureza>99%), [bmim⁺][MDEGSO₄⁻] (pureza>98%), [empy⁺][EtSO₄⁻] (pureza>99%) y [bmpy⁺][BF₄⁻] (pureza>99%) fueron suministrados por Solvent Innovation GmbH (Cologne, Alemania).

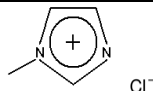
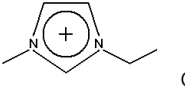
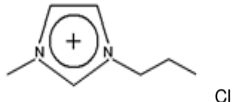
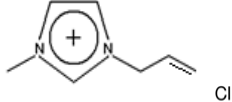
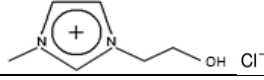
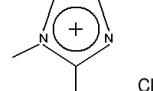
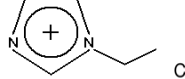
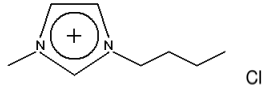
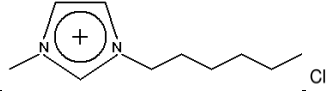
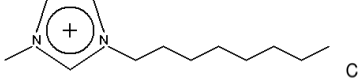
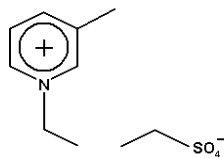
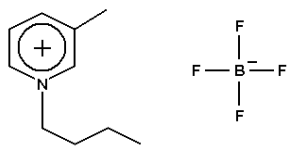
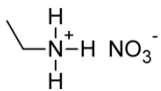
6. Toxicidad acuática de líquidos iónicos mediante el test de *Vibrio fischeri*

Tabla 6.1

Abreviatura, peso molecular y estructura de los líquidos iónicos estudiados.

Abreviatura	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Estructura
[emim ⁺][PF ₆ ⁻]	256.13	
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	284.18	
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	312.08	
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	340.29	
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	226.02	
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	282.13	
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	391.31	
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	419.37	
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	447.42	
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	475.47	
[bdmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	433.39	
[emim ⁺][TfO ⁻]	260.24	
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	236.29	
[emim ⁺][CH ₃ COO ⁻]	170.21	
[bmim ⁺][MeSO ₄ ⁻]	250.32	
[bmim ⁺][MDEGSO ₄ ⁻]	338.43	

6. Toxicidad acuática de líquidos iónicos mediante el test de *Vibrio fischeri*

Abreviatura	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Estructura
[mim ⁺][Cl ⁻]	118.57	
[emim ⁺][Cl ⁻]	146.02	
[pmim ⁺][Cl ⁻]	160.64	
[amim ⁺][Cl ⁻]	158.63	
[hemim ⁺][Cl ⁻]	162.62	
[dmim ⁺][Cl ⁻]	131.58	
[eim ⁺][Cl ⁻]	131.58	
[bmim ⁺][Cl ⁻]	174.67	
[hmim ⁺][Cl ⁻]	202.72	
[omim ⁺][Cl ⁻]	230.78	
[empy ⁺][EtSO ₄ ⁻]	247.32	
[bmpy ⁺][BF ₄ ⁻]	237.05	
ETAN	108.1	

6.2.2. Ensayos de Microtox®

Los ensayos de toxicidad Microtox® determinan el grado de inhibición de la luminiscencia de una bacteria marina que se conoce como *Vibrio Fischeri*. Esta bacteria fue suministrada por ModernWater. El equipo empleado fue un Analizador Microtox® M500 (Azur Environmental). El ensayo consiste en preparar una serie de diluciones acuosas de cada líquido iónico (entre 5.625 y 45 %) a partir de una disolución madre a la cual le corresponde una concentración del 100%. A continuación, se expone la bacteria a cada disolución de líquido iónico (cuya concentración depende del líquido iónico en cuestión) durante 15 minutos y, una vez transcurrido este tiempo, se mide la intensidad de la luz emitida por las bacterias después de estar en contacto con el tóxico. Esta intensidad se compara con la de la muestra control, es decir, la de la muestra sin tóxico. La toxicidad se determina como aquella concentración de líquido iónico que genera una mortalidad del 50% en la población bacteriana y así se obtienen los valores de EC₅₀ (µM). En este capítulo, los valores de toxicidad que se recogen en el texto y en las tablas aparecen expresados como Log EC₅₀ (µM) y, para cada líquido iónico, las medidas se realizaron al menos por triplicado.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio se centra en la influencia de las características estructurales de los líquidos iónicos sobre la toxicidad de estos hacia la bacteria marina *Vibrio fischeri*. Concretamente, esos factores han sido la estructura del catión (con los aniones tetrafluoroborato y etilsulfato), la longitud de la cadena alquílica (con los aniones hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, bis(trifluorometilsulfonil)imida y cloruro), los distintos aniones (con la familia imidazolio), la presencia de la cadena lateral funcionalizada (con el anión cloruro), la influencia de una segunda cadena alquílica corta (con los aniones bis(trifluorometilsulfonil)imida y cloruro) y el efecto de un doble enlace en la cadena alquílica (con el anión cloruro). La **Tabla 6.2** recoge los valores de EC₅₀ medidos experimentalmente en este capítulo para los líquidos iónicos estudiados, así como los valores de EC₅₀ de algunos de ellos obtenidos de la bibliografía.

6. Toxicidad acuática de líquidos iónicos mediante el test de *Vibrio fischeri*

Tabla 6.2

Valores de Log EC₅₀ de los líquidos iónicos estudiados en cada ensayo después de 15 min de exposición de la bacteria luminiscente *Vibrio fischeri* después de 15 min de exposición al tóxico, con los respectivos intervalos de confianza del 95% entre paréntesis; Valores medios de Log EC₅₀; Valores de Log EC₅₀ obtenidos con un método de contribución de grupos QSAR [34]; Valores de Log EC₅₀ encontrados en la bibliografía y Log *K_{ow}*, coeficiente de reparto octanol-agua [48]. También se muestran al final de la Tabla en cursiva algunos compuestos orgánicos volátiles (*Volatile Organic Compounds*, VOCs) con sus valores de Log EC₅₀ [30].

Líquido iónico	Log EC ₅₀ (μM), este trabajo (límite inferior, límite superior)	Log EC ₅₀ (μM), este trabajo (media)	Log EC ₅₀ (μM), de QSAR [34]	Log EC ₅₀ (μM), de la bibliografía	Log <i>K_{ow}</i> [48]
[emim ⁺][PF ₆ ⁻]	4.11 (3.11, 5.11) 4.29 (4.13, 4.44) 4.27 (4.12, 4.43)	4.22	4.38	-	-
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	3.43 (3.25, 3.61) 3.34 (3.29, 3.38) 3.09 (2.69, 3.50)	3.29	3.32	3.07 [11]	-1.4908
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	2.29 (2.29, 2.36) 2.51 (2.48, 2.55) 2.23 (2.21, 2.26) 2.43 (2.39, 2.46)	2.36	2.24	2.17 [11]; 2.11 [14]	-0.9508
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	1.33 (1.18, 1.62) 1.44 (0.27, 2.61) 0.96 (0.74, 1.18)	1.25	1.18	0.95 [11]; 0.70 [14]	-0.6220
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	3.55 (3.41, 3.69) 3.54 (3.34, 3.73) 3.21 (2.38, 4.04) 3.51 (2.03, 5.00) 3.49 (3.39, 3.60)	3.46	3.32	3.56 [33]; 3.10 [11]; 3.54 [37]; 3.20 [38]	-2.2676
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	1.07 (0.80, 1.34) 0.92 (0.77, 1.07) 0.73 (0.48, 0.98) 0.94 (0.85, 1.04)	0.91	1.18	1.41[33]	-1.2700
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	3.62 (3.32, 3.91) 3.61 (3.27, 3.95) 3.62 (3.61, 3.63)	3.62	3.97	2.57 [18]; 3.41 [31]	-1.1925
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	2.56 (2.30, 2.81) 2.49 (2.42, 2.56) 2.50 (2.43, 2.56)	2.51	2.90	2.48 [37]; 2.53 [18]	-0.9682
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	1.76 (1.61, 1.90) 1.91 (1.85, 1.97) 1.78 (1.77, 1.79)	1.82	1.82	-	-0.8742
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.91 (0.72, 1.10) 1.02 (0.82, 1.22) 1.06 (0.73, 1.38)	0.99	0.76	-	0.5631
[bdmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	3.03 (2.95, 3.12) 2.81 (2.49, 3.14) 2.76 (2.67, 2.84)	2.87	2.69	-	-0.1395
[emim ⁺][TfO]	3.70 (3.15, 4.24) 3.76 (3.20, 4.32) 3.77 (3.32, 4.22)	3.74	2.77	-	-1.4921
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	4.02 (3.66, 4.38) 4.12 (3.64, 4.60) 4.17 (3.98, 4.36)	4.10	4.38	4.02 [14]	-1.6459
[emim ⁺][CH ₃ COO ⁻]	3.81 (3.49, 4.14) 3.92 (3.89, 3.95) 3.95 (3.88, 4.01)	3.89	2.77	4.17 [31]	-2.0362
[bmim ⁺][MeSO ₄ ⁻]	3.44 (3.37, 3.51) 3.80 (3.15, 4.45) 3.49 (3.37, 3.60)	3.57	3.32	3.56 [17]	-1.9547
[bmim ⁺][MDEGSO ₄ ⁻]	3.36 (3.32, 3.41) 3.59 (3.52, 3.66) 3.49 (3.47, 3.50)	3.48	-	-	-1.7190
[mim ⁺][Cl ⁻]	4.04 (3.47, 4.60) 3.75 (3.64, 3.87) 4.07 (3.94, 4.21) 3.90 (3.59, 4.21)	3.94	-	-	-1.4510

6. Toxicidad acuática de líquidos iónicos mediante el test de *Vibrio fischeri*

Líquido iónico	Log EC ₅₀ (μM), este trabajo (límite inferior, límite superior)	Log EC ₅₀ (μM), este trabajo (media)	Log EC ₅₀ (μM), de QSAR [34]	Log EC ₅₀ (μM), de la bibliografía	Log K _{ow} [48]
[emim ⁺][Cl ⁻]	4.76 (4.39, 5.13) 4.77 (4.67, 4.88) 4.87 (4.78, 4.95)	4.80	4.38	4.55 [12]; 4.33 [16]; 4.60 [49]	-1.0177
[pmim ⁺][Cl ⁻]	3.67 (3.58, 3.77) 3.84 (3.72, 3.93) 3.83 (3.38, 4.30)	3.78	3.86	-	-
[amim ⁺][Cl ⁻]	4.28 (3.15, 5.41) 4.33 (4.26, 4.41) 4.45 (4.39, 4.51)	4.36	3.86	-	-
[hemim ⁺][Cl ⁻]	5.30 (4.93, 5.67) 5.35 (5.18, 5.52) 5.36 (5.28, 5.45) 5.34 (5.23, 5.45)	5.34	-	-	-2.2366
[dmim ⁺][Cl ⁻]	4.33 (4.13, 4.54) 4.34 (4.21, 4.47) 4.24 (4.12, 4.37)	4.31	4.92	-	-1.6162
[eim ⁺][Cl ⁻]	4.33 (4.10, 4.56) 4.02 (3.93, 4.12) 4.12 (3.92, 4.32)	4.16	4.67	-	-1.1555
[bmim ⁺][Cl ⁻]	3.48 (3.35, 3.61) 3.50 (3.06, 3.93) 3.41 (3.24, 3.59)	3.46	3.32	3.71 [4]; 3.39 [14]; 3.40 [37]; 3.47 [16]; 3.34 [11]; 2.95 [9]; 3.21 [50]	-
[hmim ⁺][Cl ⁻]	2.37 (1.84, 2.90) 2.53 (2.15, 2.90) 2.33 (2.16, 2.49) 2.45 (2.13, 2.37)	2.37	2.25	1.94 [12]; 2.18 [14]; 2.32 [11]	-1.6566
[omim ⁺][Cl ⁻]	0.79 (0.63, 0.94) 0.73 (0.48, 0.98) 0.64 (0.49, 0.79) 0.65 (0.29, 1.01) 0.63 (0.57, 0.69)	0.69	1.18	1.19 [11]; 0.94 [14]; 1.01 [16]; 0.30 [50]	-
[empy ⁺][EtSO ₄ ⁻]	3.79 (3.68, 3.90) 3.71 (3.41, 4.01) 3.94 (3.47, 4.40) 3.88 (3.44, 4.32)	3.83	3.87	-	-1.6925
[bmpy ⁺][BF ₄ ⁻]	2.44 (2.32, 2.55) 2.54 (2.46, 2.63) 2.34 (2.20, 2.47)	2.44	2.80	2.38 [31]	-1.9788
ETAN	4.27 (2.79, 5.74) 4.29 (3.96, 4.62) 4.41 (3.12, 5.69) 4.33 (3.86, 4.79)	4.32	-	-	-2.7696
Metanol	-	-	-	6.51 [30]	-
Etanol	-	-	-	5.89 [30]	-
Isopropanol	-	-	-	5.72 [30]	-
Acetonitrilo	-	-	-	5.57 [30]	-
Acetona	-	-	-	5.17 [30]	-
Diclorometano	-	-	-	4.57 [30]	-
Cloroformo	-	-	-	4.16 [30]	-
Benceno	-	-	-	3.31 [30]	-
Tolueno	-	-	-	2.33 [30]	-

Los datos de la **Tabla 6.2** muestran que los valores medios de Log EC₅₀ (μM) varían entre 0.69 ([omim⁺][Cl⁻]) y 5.34 ([hemim⁺][Cl⁻]), dependiendo de la estructura química y de la composición del líquido iónico en cuestión. Se ha observado una excelente concordancia entre los valores de toxicidad obtenidos en este capítulo y los valores presentes en la bibliografía. Además, los valores de toxicidad estimados con QSAR [34] también se asemejan a los valores experimentales obtenidos en este capítulo, tal y como se muestra en la **Figura 6.1**. Los valores de toxicidad en *Vibrio fischeri* de catorce de los veintinueve líquidos iónicos ensayados no habían sido previamente medidos en la

bibliografía, sin embargo, se puede concluir que los valores obtenidos son consistentes con el resto de los valores de Log EC₅₀ obtenidos en este capítulo.

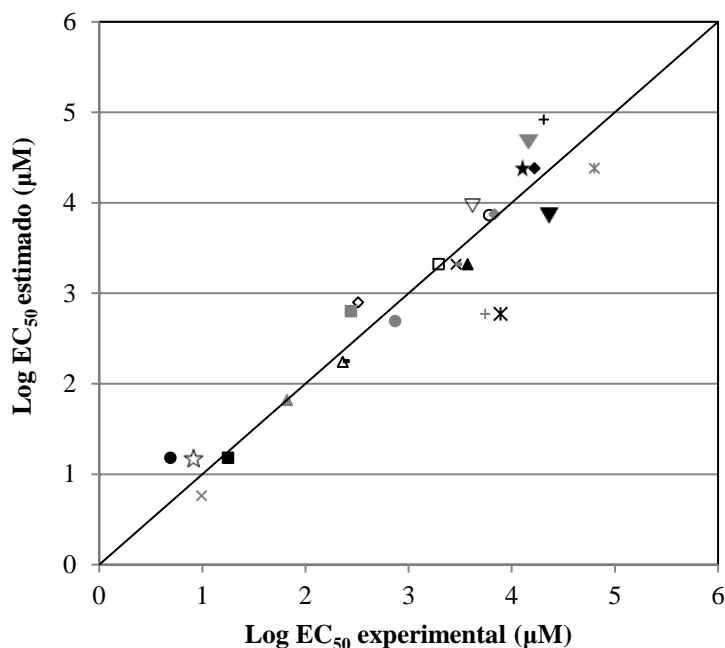


Figura 6.1. Comparación entre los valores estimados de Log EC₅₀ y los valores experimentales para algunos de los líquidos iónicos ensayados: ◆ [emim⁺][PF₆⁻]; □ [bmim⁺][PF₆⁻]; △ [hmim⁺][PF₆⁻];

■ [omim⁺][PF₆⁻]; ▾ [bmim⁺][BF₄⁻]; ☆ [omim⁺][BF₄⁻]; ▽ [emim⁺][NTf₂⁻]; ◇ [bmim⁺][NTf₂⁻];

▲ [hmim⁺][NTf₂⁻]; × [omim⁺][NTf₂⁻]; ● [bdmim⁺][NTf₂⁻]; + [emim⁺][TfO⁻]; ★ [emim⁺][EtSO₄⁻];

✱ [emim⁺][CH₃COO⁻]; ✖ [emim⁺][Cl⁻]; ○ [pmim⁺][Cl⁻]; ▼ [amim⁺][Cl⁻]; + [dmim⁺][Cl⁻]; ▽ [eim⁺][Cl⁻];

× [bmim⁺][Cl⁻]; ▾ [hmim⁺][Cl⁻]; ● [omim⁺][Cl⁻]; ▲ [bmim⁺][MeSO₄⁻]; ◆ [empy⁺][EtSO₄⁻];

■ [bmpy⁺][BF₄⁻].

Según los resultados que se muestran en la **Tabla 6.2**, la toxicidad de los líquidos iónicos basados en sales de piridinio es más elevada que la de los semejantes basados en sales de imidazolio como se observa al comparar dos parejas de líquidos iónicos con el mismo anión y cadena alquílica: [empy⁺][EtSO₄⁻]-[emim⁺][EtSO₄⁻] y [bmpy⁺][BF₄⁻]-[bmim⁺][BF₄⁻]. Estos resultados se encuentran soportados por los resultados encontrados en la bibliografía [31, 32].

La **Figura 6.2** muestra que, con todos los aniones, la toxicidad del líquido iónico aumenta con la longitud de la cadena alquílica del catión: [omim⁺][PF₆⁻] > [hmim⁺][PF₆⁻] > [bmim⁺][PF₆⁻] > [emim⁺][PF₆⁻]; [omim⁺][BF₄⁻] > [bmim⁺][BF₄⁻]; [omim⁺][NTf₂⁻] > [hmim⁺][NTf₂⁻] > [bmim⁺][NTf₂⁻] > [emim⁺][NTf₂⁻]; [omim⁺][Cl⁻] > [hmim⁺][Cl⁻] > [bmim⁺][Cl⁻] > [pmim⁺][Cl⁻] > [emim⁺][Cl⁻]. Los mismos resultados fueron encontrados por otros autores como ya se mencionó previamente en la sección de Introducción [4, 12-15, 33, 51]. En dicha Figura se ha representado la dependencia entre la longitud de la cadena alquílica del catión y la toxicidad del líquido iónico.

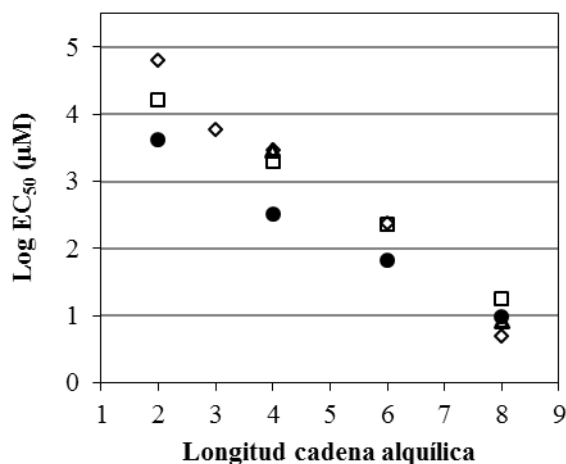


Figura 6.2. Efecto del número de carbonos de la cadena alquílica (nC_{R1}) sobre la toxicidad acuática (Log EC_{50}) para algunos de los líquidos iónicos estudiados; ● bis(trifluorometilsulfonil)imida;

□ hexafluorofosfato; △ tetrafluoroborato; y ◇ cloruro.

Asumiendo que el factor más importante en la estimación de Log EC_{50} es la longitud de la cadena alquílica, se ha realizado un ajuste por regresión lineal de Log EC_{50} vs. Longitud de la cadena alquílica obteniendo la siguiente ecuación:

$$\text{Log } EC_{50} = 5.22 - 0.52nC_{R1} \quad (1)$$

Esta ecuación presenta un coeficiente de regresión lineal r^2 de 0.918 y presenta un elevado grado de concordancia con la ecuación obtenida por Romero *et al.* [14]. Así, nuestros resultados confirman los obtenidos previamente por otros autores para distintos líquidos iónicos [4, 12-15, 33, 51], como se muestra en las **Figuras 6.2 y 6.3**.

Para poder estudiar el efecto del tipo de anión sobre la toxicidad se han seleccionado dos cationes, [bmim⁺] y [emim⁺], con distintos tipos de aniones y se ha comparado la toxicidad obteniendo la siguiente secuencia: [NTf₂⁻] > [PF₆⁻] > [BF₄⁻] ≈ [MeSO₄⁻] ≈ [MDEGSO₄⁻] > [TfO⁻] > [CH₃COO⁻] > [EtSO₄⁻] > [Cl⁻]. Los resultados muestran que los aniones más tóxicos son aquellos que presentan átomos de flúor en su estructura aumentando la toxicidad con el aumento en el número de átomos de flúor [31]. El anión bistriflimida [NTf₂⁻], con seis átomos de flúor resultó ser el más tóxico para la bacteria *Vibrio fischeri*. Camargo [52] revisó algunos estudios previos relacionados con la toxicidad de fluoruros en organismos acuáticos y observó que dichos iones actúan como venenos enzimáticos inhibiendo la actividad enzimática e interrumpiendo en última instancia algunos procesos metabólicos como la glicólisis y la síntesis de proteínas [53]. Los aniones más tóxicos son aquellos que presentan átomos de flúor en su estructura probablemente debido a que se hidrolizan a ácido fluorhídrico [31]. Volviendo a la secuencia de aniones, podemos concluir que esta se encuentra soportada por los resultados obtenidos por Frade y Afonso [54]. Además, otros autores como Pinto *et al.* [13], Samorì *et al.* [38] y Costa *et al.* [31] también confirman dicha tendencia, ya que observaron un efecto tóxico mayor en el anión [BF₄⁻] que en el [Cl⁻]. Costa *et al.* [31] también observó una toxicidad mayor en el anión bistriflimida comparando este con el acetato. Otros autores, como Stolte *et al.* [16], establecieron que la mayoría de los líquidos iónicos con anión [NTf₂⁻] presentes en su estudio eran más tóxicos que los que poseían aniones haluro como el [Cl⁻].

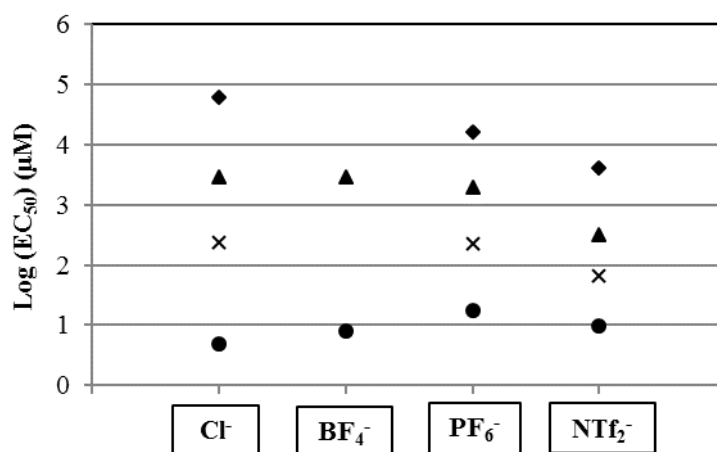


Figura 6.3. Efecto del anión sobre la toxicidad acuática (Log EC₅₀) de algunos de los líquidos iónicos ensayados; ◆ [emim⁺]; ▲ [bmim⁺]; × [hmim⁺]; ● [omim⁺].

En este capítulo también se ha analizado el efecto de la presencia de una cadena alquílica funcionalizada en el catión sobre la toxicidad de los líquidos iónicos. Para esto, se compararon [hemim⁺][Cl⁻] (Log EC₅₀=5.34) y [emim⁺][Cl⁻] (Log EC₅₀=4.80), de donde se puede concluir que la presencia de un grupo hidroxilo en la cadena alquílica disminuye la toxicidad en *Vibrio fischeri* del líquido iónico, probablemente debido a que la introducción de un átomo de oxígeno aumenta la polaridad de dicha cadena. No obstante, este factor no ha sido aún estudiado en la bibliografía en profundidad, aunque los resultados de algunos autores han mostrado una tendencia similar [16, 38].

Otro factor que ha sido estudiado en este capítulo es la presencia de una segunda cadena alquílica corta (uno o dos átomos de carbono) en el catión. Para esto, se han comparado [bdmim⁺][NTf₂⁻] (Log EC₅₀=2.87), que tiene dos cadenas alquílicas cortas (y una larga) en el anillo imidazólico y [bmim⁺][NTf₂⁻] (Log EC₅₀=2.51) que tiene solo una cadena alquílica corta (y una larga). Otro ejemplo sería [dmim⁺][Cl⁻] (Log EC₅₀=4.31) y [emim⁺][Cl⁻] (Log EC₅₀=4.80), ambos con dos cadenas alquílicas cortas comparándolos con líquidos iónicos con solo una, [mim⁺][Cl⁻] (Log EC₅₀=3.94) y [eim⁺][Cl⁻] (Log EC₅₀=4.16), respectivamente. De acuerdo con los datos experimentales que se recogen en la **Tabla 6.2**, los líquidos iónicos con dos cadenas alquílicas cortas son menos tóxicos que aquellos con solo una cadena corta en el catión. Por tanto, podemos concluir que un mayor número de cadenas alquílicas cortas en el anillo imidazólico conduce a una disminución de la toxicidad del líquido iónico en *Vibrio fischeri*.

Finalmente, se ha analizado el efecto de la presencia de un doble enlace en la cadena alquílica del catión comparando [pmim⁺][Cl⁻] (Log EC₅₀=3.78) y [amim⁺][Cl⁻] (Log EC₅₀=4.36). Como se muestra en la **Tabla 6.1**, [amim⁺][Cl⁻] posee un doble enlace en su estructura química lo que reduce la toxicidad en *Vibrio fischeri* del líquido iónico si se compara con un enlace simple ([pmim⁺][Cl⁻]).

Como se ha mencionado en la Introducción, la lipofilicidad o hidrofobicidad de los líquidos iónicos son términos que se han relacionado con la toxicidad acuática en varios estudios. A partir de sus resultados, se puede deducir una relación entre la hidrofobicidad (expresada como el logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua, $\text{Log } K_{ow}$) y $\text{Log } (1/EC_{50})$:

$$\text{Log } (1/EC_{50}) = -1.436 + 0.859\text{Log}K_{ow} - 0.119(\text{Log}K_{ow})^2 \quad (2)$$

Los valores de $\text{Log } K_{ow}$ de algunos de los líquidos iónicos estudiados en este capítulo fueron medidos experimentalmente en el capítulo anterior y se recogen en una publicación [48], además de en la **Tabla 6.2**. La **Figura 6.4** muestra cómo $\text{Log } (1/EC_{50})$ aumenta cuando aumenta $\text{Log } K_{ow}$.

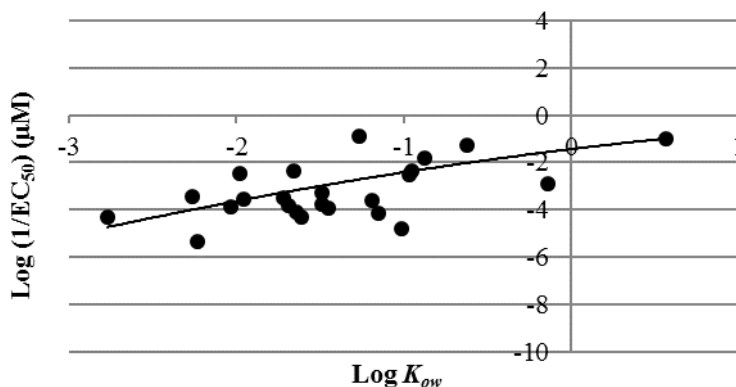


Figura 6.4. Correlación entre $\text{Log } (1/EC_{50})$ y $\text{Log } K_{ow}$ para algunos de los líquidos iónicos estudiados

Finalmente, los resultados reflejan que la toxicidad acuática de todos los líquidos iónicos basados en sales de imidazolio con los aniones $[NTf_2^-]$, $[BF_4^-]$ y $[PF_6^-]$, excepto $[emim^+][PF_6^-]$, y de todos los basados en sales de piridinio es inferior a la de los disolventes industriales comúnmente empleados como se muestra en la **Tabla 6.2**. Los líquidos iónicos con catión imidazolio y anión $[Cl^-]$ así como los líquidos iónicos basados en amonio son menos perjudiciales que los disolventes orgánicos convencionales considerados.

6.4. CONCLUSIONES

Los valores del $\text{Log } EC_{50}$ de veintinueve líquidos iónicos basados en imidazolio, piridinio y amonio con la bacteria bioluminiscente *Vibrio fischeri* variaron entre 1.25 y 5.34. Los valores experimentales mostraron un buen ajuste con los estimados mediante el método de QSAR. Los líquidos iónicos basados en sales de piridinio mostraron una toxicidad más elevada que los de sales de imidazolio y el nitrato de etilamonio resultó ser uno de los menos dañinos para el medio ambiente de todos los líquidos iónicos estudiados. La toxicidad hacia *Vibrio fischeri* aumenta con la longitud de la cadena alquílica del catión mientras que si la cadena alquílica se funcionaliza con un grupo hidroxilo, presenta un doble enlace o una segunda cadena alquílica corta, el líquido iónico es menos tóxico. Sin embargo, la naturaleza del anión constituyente tiene una influencia significativamente menor en la EC_{50} de los líquidos iónicos, especialmente cuando la longitud de la cadena alquílica del catión aumenta.

Se ha obtenido una correlación polinómica de segundo orden entre el Log (1/EC₅₀) y el Log *K*_{ow} aunque la correlación ha resultado ser bastante pobre para algunos de los líquidos iónicos estudiados. Por otro lado, ya que los valores de EC₅₀ son del mismo orden que los de los VOCs es posible concluir que la toxicidad acuática de estos líquidos iónicos es bastante similar a la de los VOCs empleados comúnmente en la industria y no se acumulan en el medio ambiente. Por ello, el reemplazo de un proceso convencional por un proceso basado en líquidos iónicos como nuevos disolventes podría ser una alternativa atractiva desde el punto de vista medioambiental, siempre que el líquido iónico pueda ser reutilizado debido a su fácil separación.

6.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A.H. Mohammad Fauzi, N.A.S. Amin, An overview of ionic liquids as solvents in biodiesel synthesis, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16 (2012) 5770–5786.
- [2] S. Keskin, D. Kayrak-Talay, U. Akman, Ö Hortaçsu, A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications, *J. Supercrit. Fluids* 43 (2007) 150–180.
- [3] G.J. Kabo, A.V. Blokhin, Y.U. Paulechka, A.G. Kabo, M.P. Shymanovich, J.W. Magee, Thermodynamic properties of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate in the condensed state, *J. Chem. Eng. Data* 49 (2004) 453–461.
- [4] K.M. Docherty, C.F. Kulpa Jr., Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 185–189.
- [5] U. Domańska, A. Rękawek, A. Marciniak, Solubility of 1-alkyl-3-ethylimidazolium-based ionic liquids in water and 1-octanol, *J. Chem. Eng. Data* 53 (2008) 1126–1132.
- [6] M.G. Freire, P.J. Carvalho, A.M.S. Silva, L.M.N.B.F. Santos, L.P.N. Rebelo, I.M. Marrucho, J.A.P. Coutinho, Ion specific effects on the mutual solubilities of water and hydrophobic ionic liquids, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 202–211.
- [7] J. McFarlane, W.B. Ridenour, H. Luo, R.D. Hunt, D.W. DePaoli, R.X. Ren, Room temperature ionic liquids for separating organics from produced water, *Sep. Sci. Technol.* 40 (2005) 1245–1265.
- [8] J. Ranke, A. Othman, P. Fan, A. Müller, Explaining ionic liquid water solubility in terms of cation and anion hydrophobicity, *Int. J. Mol. Sci.* 10 (2009) 1271–1289.
- [9] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N.V.K. Aki, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, Octanol–water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 83–90.
- [10] J.L. Anthony, E.J. Maginn, J.F. Brennecke, Solution thermodynamics of imidazolium-based ionic liquids and water, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 10942–10949.
- [11] M.T. García, N. Gathergood, P.J. Scammells, Biodegradable ionic liquids: Part II. Effect of the anion and toxicology, *Green Chem.* 7 (2005) 9.

- [12] P. Luis, I. Ortiz, R. Aldaco, A. Irabien, A novel group contribution method in the development of a QSAR for predicting the toxicity (*Vibrio fischeri* EC50) of ionic liquids, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67 (2007) 423–429.
- [13] P.C.A.G. Pinto, S.P.F. Costa, J.L.F.C. Lima, M.L.M.F.S. Saraiva, Automated high-throughput *Vibrio fischeri* assay for (eco)toxicity screening: Application to ionic liquids, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80 (2012) 97–102.
- [14] A. Romero, A. Santos, J. Tojo, A. Rodríguez, Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids, *J. Hazard. Mater.* 151 (2008) 268–273.
- [15] C. Samorì, A. Pasteris, P. Galletti, E. Tagliavini, Acute toxicity of oxygenated and nonoxygenated imidazolium-based ionic liquids to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*, *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (2007) 2379–2382.
- [16] S. Stolte, M. Matzke, J. Arning, A. Bösch, W.-R. Pitner, U. Welz-Biermann, B. Jastorff, J. Ranke, Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids, *Green Chem.* 9 (2007) 1170–1179.
- [17] S.P.M. Ventura, C.S. Marques, A.A. Rosatella, C.A.M. Afonso, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, Toxicity assessment of various ionic liquid families towards *Vibrio fischeri* marine bacteria, Spec. Issue Sect. SETAC North Am. 31st Annu. Meet. Adv. Omi. Aquat. Toxicol. 76 (2012) 162–168.
- [18] S.P.M. Ventura, R.L. Gardas, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, Ecotoxicological risk profile of ionic liquids: octanol-water distribution coefficients and toxicological data, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86 (2011) 957–963.
- [19] T.P.T. Pham, C.-W. Cho, J. Min, Y.-S. Yun, Alkyl-Chain Length Effects of Imidazolium and Pyridinium Ionic Liquids on Photosynthetic Response of *Pseudokirchneriella subcapitata*, *J. Biosci. Bioeng.* 105 (2008) 425–428.
- [20] C. Pretti, C. Chiappe, I. Baldetti, S. Brunini, G. Monni, L. Intorre, Acute toxicity of ionic liquids for three freshwater organisms: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (2009) 1170–1176.
- [21] J.H. Larson, P.C. Frost, G.A. Lamberti, Variable toxicity of ionic liquid-forming chemicals to *Lemna mino* and the influence of dissolved organic matter, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 676–681.
- [22] B. Zhang, X. Li, D. Chen, J. Wang, Effects of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide on the antioxidant system of *Lemna minor*, *Protoplasma* 250 (2013) 103–110.
- [23] A.S. Wells, V.T. Coombe, On the Freshwater Ecotoxicity and Biodegradation Properties of Some Common Ionic Liquids, *Org. Process Res. Dev.* 10 (2006) 794–798.
- [24] C. Pretti, C. Chiappe, D. Pieraccini, M. Gregori, F. Abramo, G. Monni, L. Intorre, Acute toxicity of ionic liquids to the zebrafish (*Danio rerio*). *Green Chem.* 8 (2006) 238.

- [25] X.-Y. Li, J. Zhou, M. Yu, J.-J. Wang, Y.C. Pei, Toxic effects of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on the early embryonic development of the frog *Rana nigromaculata*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (2009) 552–556.
- [26] M. Álvarez-Guerra, A. Irabien, Design of ionic liquids: an ecotoxicity (*Vibrio fischeri*) discrimination approach, *Green Chem.* 13 (2011) 1507.
- [27] S. Parvez, C. Venkataraman, S. Mukherji, A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environ. Int.* 32 (2006) 265–268.
- [28] ISO 11348-3. Water quality. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Part 3: Method using freeze-dried bacteria, 2007.
- [29] A. Fuentes, M. Lloréns, J. Sáez, M.I. Aguilar, A.B. Pérez-Marín, J.F. Ortuño, V.F. Meseguer, Ecotoxicity, phytotoxicity and extractability of heavy metals from different stabilised sewage sludges, *Environ. Pollut.* 143 (2006) 355–360.
- [30] K.L.E. Kaiser, V.S. Palabrica, *Photobacterium phosphoreum* toxicity data index, *Water Qual. Res. J. Canada* 26 (1991) 361–431.
- [31] S.P.F. Costa, P.C.A.G. Pinto, R.A.S. Lapa, M.L.M.F.S. Saraiva, Toxicity assessment of ionic liquids with *Vibrio fischeri*: An alternative fully automated methodology, *J. Hazard. Mater.* 284 (2015) 136–142.
- [32] S.P.M. Ventura, A.M.M. Gonçalves, T. Sintra, J.L. Pereira, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, Designing ionic liquids: the chemical structure role in the toxicity, *Ecotoxicology* 22 (2013) 1–12.
- [33] J. Ranke, K. Mölter, F. Stock, U. Bottin-Weber, J. Poczobutt, J. Hoffmann, B. Ondruschka, J. Filser, B. Jastorff, Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58 (2004) 396–404.
- [34] P. Luis, A. Garea, A. Irabien, Quantitative structure–activity relationships (QSARs) to estimate ionic liquids ecotoxicity EC50 (*Vibrio fischeri*), *J. Mol. Liq.* 152 (2010) 28–33.
- [35] R. Sheldon, Catalytic reactions in ionic liquids, *Chem. Commun.* (2001) 2399–2407.
- [36] D.W. Roberts, J. Costello, QSAR and mechanism of action for aquatic toxicity of cationic surfactants, *QSAR Comb. Sci.* 22 (2003) 220–225.
- [37] M. Matzke, S. Stolte, K. Thiele, T. Juffernholz, J. Arning, J. Ranke, U. Welz-Biermann, B. Jastorff, The influence of anion species on the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids observed in an (eco)toxicological test battery, *Green Chem.* 9 (2007) 1198–1207.

- [38] C. Samorì, D. Malferrari, P. Valbonesi, A. Montecavalli, F. Moretti, P. Galletti, G. Sartor, E. Tagliavini, E. Fabbri, A. Pasteris, Introduction of oxygenated side chain into imidazolium ionic liquids: evaluation of the effects at different biological organization levels, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73 (2010) 1456–1464.
- [39] D.J. Couling, R.J. Bernot, K.M. Docherty, J.K. Dixon, E.J. Maginn, Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure-property relationship modeling, *Green Chem.* 8 (2006) 82–90.
- [40] S. Bruzzone, C. Chiappe, S.E. Focardi, C. Pretti, M. Renzi, Theoretical descriptor for the correlation of aquatic toxicity of ionic liquids by quantitative structure–toxicity relationships, *Chem. Eng. J.* 175 (2011) 17–23.
- [41] M. Ismail Hossain, B.B. Samir, M. El-Harbawi, A.N. Masri, M.I. Abdul Mutalib, G. Hefter, C.-Y. Yin, Development of a novel mathematical model using a group contribution method for prediction of ionic liquid toxicities, *Chemosphere* 85 (2011) 990–994.
- [42] A.-M. Lacrămă, M. V. Putz, V. Ostafe, A Spectral-SAR Model for the Anionic-Cationic Interaction in Ionic Liquids: Application to *Vibrio fischeri* Ecotoxicity, *Int. J. Mol. Sci.* 8 (2007) 842–863.
- [43] S. Ma, M. Lv, F. Deng, X. Zhang, H. Zhai, W. Lv, Predicting the ecotoxicity of ionic liquids towards *Vibrio fischeri* using genetic function approximation and least squares support vector machine. *J. Hazard. Mater.* 283 (2015) 591–598.
- [44] S. Viboud, N. Papaiconomou, A. Cortesi, G. Chatel, M. Draye, D. Fontvieille, Correlating the structure and composition of ionic liquids with their toxicity on *Vibrio fischeri*: A systematic study, *J. Hazard. Mater.* 215–216 (2012) 40–48.
- [45] F. Yan, Q. Shang, S. Xia, Q. Wang, P. Ma, Topological study on the toxicity of ionic liquids on *Vibrio fischeri* by the quantitative structure–activity relationship method, *J. Hazard. Mater.* 286 (2015) 410–415.
- [46] M. Petkovic, K.R. Seddon, L.P.N. Rebelo, C. Silva Pereira, Ionic liquids: a pathway to environmental acceptability, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 1383.
- [47] S. Stolte, J. Arning, U. Bottin-Weber, A. Müller, W.-R. Pitner, U. Welz-Biermann, B. Jastorff, J. Ranke, Effects of different head groups and functionalised side chains on the cytotoxicity of ionic liquids, *Green Chem.* 9 (2007) 760.
- [48] M.G. Montalbán, M. Collado-González, R. Trigo, F.G. Díaz Baños, G. Vállora, Experimental Measurements of Octanol-Water Partition Coefficients of Ionic Liquids, *J. Adv. Chem. Eng.* 5:133 (2015) 1–9.
- [49] S.P.F. Costa, V.D. Justina, K. Bica, M. Vasiloiu, P.C.A.G. Pinto, M.L.M.F.S. Saraiva, Automated evaluation of pharmaceutically active ionic liquids' (eco)toxicity through the inhibition of human carboxylesterase and *Vibrio fischeri*, *J. Hazard. Mater.* 265 (2014) 133–141.

6. Toxicidad acuática de líquidos iónicos mediante el test de *Vibrio fischeri*

[50] B. Peric, J. Sierra, E. Martí, R. Cruañas, M.A. Garau, J. Arning, U. Bottin-Weber, S. Stolte, (Eco)toxicity and biodegradability of selected protic and aprotic ionic liquids, *J. Hazard. Mater.* 261 (2013) 99–105.

[51] T.P.T. Pham, C.-W. Cho, Y.-S. Yun, Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review, *Water Res.* 44 (2010) 352–372.

[52] J.A. Camargo, Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review, *Chemosphere* 50 (2003) 251–64.

[53] H. Wang, S.V. Malhotra, A.J. Francis, Toxicity of various anions associated with methoxyethyl methyl imidazolium-based ionic liquids on *Clostridium* sp, *Chemosphere* 82 (2011) 1597–603.

[54] R.F. Frade, C.A. Afonso, Impact of ionic liquids in environment and humans: an overview, *Hum. Exp. Toxicol.* 29 (2010) 1038–1054.

7

Evaluación de la toxicidad de líquidos iónicos dicatiónicos mediante el test de inhibición de *Vibrio fischeri*

*“Las ciencias están todas entrelazadas entre sí: es mucho más fácil
aprenderlas todas juntas a la vez que separar una de las otras”*

René Descartes (1596-1650)

7. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LÍQUIDOS IÓNICOS DICATIÓNICOS MEDIANTE EL TEST DE INHIBICIÓN DE *VIBRIO FISCHERI*

7.1. INTRODUCCIÓN

Los líquidos iónicos son sales orgánicas que se encuentran en estado líquido en condiciones ambientales o próximas a estas. En los últimos años, los líquidos iónicos se han dado a conocer como disolventes verdes debido a sus excepcionales propiedades entre las que destacan que son compuestos con volatilidad prácticamente nula, no inflamables, con un amplio rango de temperatura en el que se encuentran en estado líquido, con una elevada estabilidad térmica y química y con una elevada conductividad iónica [1]. Además, las propiedades de los líquidos iónicos pueden ser moduladas seleccionando las estructuras del anión y del catión adecuadas. Por este motivo, se les conoce como disolventes de diseño [2]. De esta forma, es posible controlar varias propiedades físicas como la hidrofobicidad, la viscosidad, la densidad, la solubilidad así como la biodegradabilidad y el comportamiento toxicológico [3]. Con motivo de estas propiedades, los líquidos iónicos pueden ser empleados en una amplia variedad de aplicaciones como, por ejemplo, en reacciones químicas, procesamiento de compuestos químicos o dispositivos electrónicos [1].

Recientemente, se está prestando una mayor atención a los líquidos iónicos dicatiónicos los cuales están formados por dos grupos catiónicos unidos por una cadena alquílica y por dos monoaniones. Este tipo de líquidos iónicos son especialmente interesantes porque generalmente poseen una mayor estabilidad térmica y electroquímica lo que les confiere una cierta ventaja con respecto a los líquidos iónicos monocatiónicos en aplicaciones a alta temperatura [4]. Por tanto, en los últimos años se está estudiando el uso de los líquidos iónicos dicatiónicos como medios de reacción en procesos a altas temperaturas [5]. Además, este tipo de líquidos iónicos presenta un gran potencial para ser empleados en otras aplicaciones como surfactantes, lubricantes así como en recubrimiento de nanopartículas.

A pesar de que los líquidos iónicos no contribuyen a la contaminación atmosférica porque no son volátiles [6], son bastante solubles en agua y podrían ser tóxicos para los organismos acuáticos [7] en caso de que hubiera vertidos accidentales o incluso al final de su ciclo de vida. Por este motivo, es necesario evaluar su comportamiento medioambiental y efectos toxicológicos. Debido al gran número de líquidos iónicos que pueden ser sintetizados son necesarios más estudios relacionados con el perfil de riesgo ecotoxicológico de los líquidos iónicos [8, 9]. Durante los últimos años, se han publicado algunos estudios sobre la toxicidad de los líquidos iónicos empleando distintos organismos acuáticos como bacterias (especialmente, *Vibrio fischeri*) [3, 8, 10-17], algas verdes (por ejemplo, *Pseudokirchneriella subcapitata*) [18, 19], plantas acuáticas (por ejemplo, lenteja acuática *Lemna minor*) [15, 20, 21], invertebrados (principalmente el crustáceo de agua dulce *Daphnia magna*) [4, 18, 22] o vertebrados como peces (el pez cebra *Danio rerio*) [18, 23] o ranas (*Rana nigromaculata*) [24]. En estos estudios, los líquidos iónicos muestran distinto potencial toxicológico dependiendo de su morfología individual. Sin embargo, independientemente del sistema de evaluación empleado, el factor determinante de la toxicidad de un líquido iónico parece ser su lipofilicidad [4]. No obstante, a pesar del creciente número de estudios para evaluar la toxicidad acuática de un líquido iónico, la información disponible aún es escasa y, en especial, aquella relacionada con los líquidos iónicos dicatiónicos.

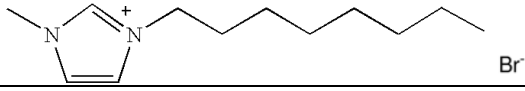
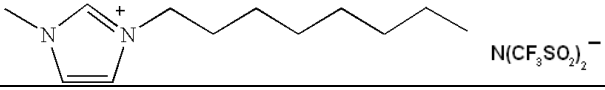
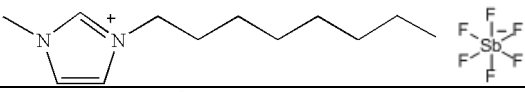
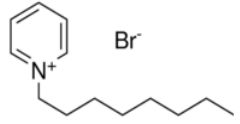
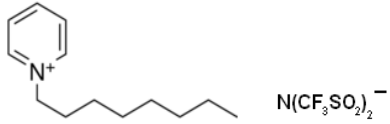
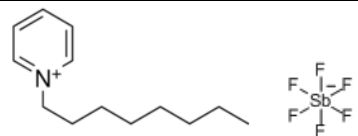
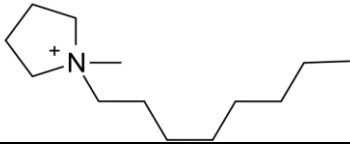
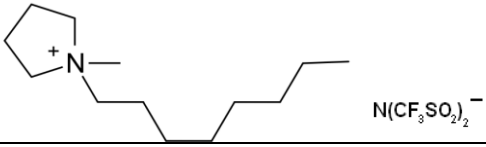
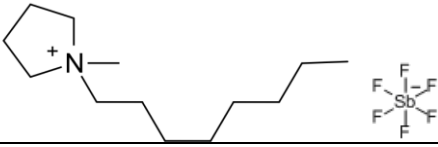
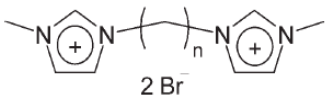
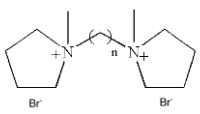
Varios trabajos publicados han intentado predecir la toxicidad acuática de los líquidos iónicos mediante métodos basados en relaciones estructura-actividad cuantitativas (*Quantitative Structure-Activity Relationships*, QSAR) [16, 25-29] los cuales son modelos matemáticos centrados fundamentalmente en el tipo de anión, la estructura del catión y la longitud de la cadena alquílica del catión del líquido iónico. Desafortunadamente, este tipo de modelos no se encuentra lo suficientemente bien desarrollado como para ser útil con algunos tipos específicos de líquidos iónicos como es el caso de los dicatiónicos. Por este motivo, son necesarios más estudios toxicológicos de líquidos iónicos dicatiónicos para así poder incorporar esa información a las bases de datos y aumentar la capacidad de predicción de su toxicidad.

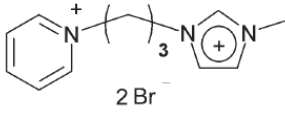
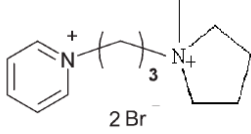
Según Ventura *et al* [8], uno de los tests de toxicidad más ampliamente utilizados es el test de toxicidad de Microtox®, el cual emplea la bacteria marina gram negativa *Vibrio fischeri* (también conocida como *Photobacterium Phosphoreum*). Este test es uno de los más comúnmente empleados debido a la intensidad y a la estabilidad de la emisión de luz de esta bacteria y también debido a su elevada sensibilidad hacia compuestos muy distintos [30], y, por ello, se ha utilizado durante más de dos décadas en un gran número de estudios para determinar la toxicidad de compuestos orgánicos convencionales [31]. De hecho, este método constituye a nivel europeo un ensayo estándar de inhibición ecotoxicológica (DIN EN ISO 11348) [32], el cual determina la toxicidad de una sustancia en *Vibrio fischeri* mediante la medida de la disminución de su luz emitida. Específicamente, esta disminución en la emisión de luz de la bacteria *Vibrio fischeri* se debe a una reducción en su actividad enzimática de manera que la luminiscencia es directamente proporcional a la actividad metabólica de la población bacteriana [33].

El primer objetivo de este capítulo fue sintetizar un conjunto de 26 líquidos iónicos basados en sales de imidazolio, pirrolidinio y piridinio (9 monocatiónicos y 17 dicatiónicos) (**Tabla 7.1**). La síntesis de algunos de estos compuestos aún no ha sido descrita en la bibliografía. El segundo objetivo fue medir su toxicidad acuática empleando el test de inhibición de *Vibrio fischeri* para obtener la concentración nominal efectiva EC₅₀ (concentración necesaria para disminuir al 50% la luminiscencia producida por la población bacteriana). Hasta la fecha, aún no se ha reportado en la bibliografía la toxicidad en *Vibrio fischeri* de la mayoría de estos líquidos iónicos (22 de 26). Los resultados mostrados en este capítulo constituyen un estudio preciso de la influencia de la composición y la estructura en la toxicidad de los líquidos iónicos.

7. Evaluación de la toxicidad de líquidos iónicos dicatiónicos mediante inhibición de *Vibrio fischeri*

Tabla 7.1
Abreviación y estructura de los líquidos iónicos estudiados.

Abreviatura	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Estructura
C ₈ (MIm) Br	275.23	
C ₈ (MIm) NTf ₂	475.47	
C ₈ (MIm) SbF ₆	431.07	
C ₈ (Pyr) Br	272.22	
C ₈ (Pyr) NTf ₂	472.47	
C ₈ (Pyr) SbF ₆	428.07	
C ₈ (MPyrr) Br	278.27	
C ₈ (MPyrr) NTf ₂	478.51	
C ₈ (MPyrr) SbF ₆	434.12	
C ₂ (MIm) ₂ Br ₂	352.07	
C ₃ (MIm) ₂ Br ₂	366.07	
C ₄ (MIm) ₂ Br ₂	380.12	
C ₆ (MIm) ₂ Br ₂	408.18	
C ₈ (MIm) ₂ Br ₂	436.23	
C ₃ (MPyrr) ₂ Br ₂	372.21	
C ₄ (MPyrr) ₂ Br ₂	386.21	
C ₆ (MPyrr) ₂ Br ₂	414.26	
C ₈ (MPyrr) ₂ Br ₂	442.32	
C ₂ (Pyr) ₂ Br ₂	346.06	
C ₃ (Pyr) ₂ Br ₂	360.09	
C ₄ (Pyr) ₂ Br ₂	374.09	
C ₆ (Pyr) ₂ Br ₂	402.09	
C ₈ (Pyr) ₂ Br ₂	430.09	
C ₁₂ (Pyr) ₂ Br ₂	486.09	

Abreviatura	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Estructura
C ₃ (Pyr)(MIm) Br ₂	363.12	
C ₃ (Pyr)(MPyrr) Br ₂	366.14	

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1 Compuestos

1-metilimidazol (>99%), 1-metilpirrolidina (>98%), piridina (>99%), 1-bromooctano (>99%), 1,2-dibromoetano (>98%), 1,3-dibromopropano (>99%), 1,4-dibromobutano (>99%), 1,6-dibromohexano (>96%), 1,8-dibromooctano (>98%), 1,12-dibromododecano (98>%), bis(trifluorometano)sulfonimida de litio (99.95%), hexafluoro antimoniato (V) de sodio (*technical grade*), acetonitrilo, etil acetato, diclorometano y metanol fueron suministrados por Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania). Todos los productos químicos se usaron sin purificación adicional.

7.2.2. Síntesis y Caracterización

C₈(MIm)Br 100 mmol de 1-metilimidazol se vierten en un matraz esférico provisto de un condensador de reflujo y de un embudo adicional en atmósfera de argón. A continuación, se añaden 110 mmol of 1-bromooctano gota a gota mediante el embudo a la vez que la mezcla se agita en atmósfera inerte. Una vez que se ha añadido todo el 1-bromooctano, se retira el embudo adicional y la mezcla de reacción se mantiene en agitación a 60 °C durante 72 horas. El producto obtenido se disuelve en 20 mL de acetonitrilo y se lava con 250 mL de etil acetato para eliminar el 1-bromooctano que ha quedado sin reaccionar. La capa superior (etil acetato conteniendo 1-bromooctano) se decanta y el acetonitrilo se elimina mediante un rotavapor automático. El líquido iónico se deja secar a alto vacío a 60 °C durante 24 horas.

C₈(MPyrr)Br y **C₈(Pyr)Br** se sintetizan de acuerdo a procedimientos descritos en la bibliografía. 240 mmol de 1-metilpirrolidina o piridina se vierten en un matraz de fondo redondo provisto de un condensador de agua tapado con un tubo de secado para evitar la penetración de humedad. A continuación, 288 mmol de 1-bromooctano se añaden gota a gota mientras que se agita a 70 °C. El tiempo de reacción es de 48 horas. El producto se somete a un proceso de recristalización en acetonitrilo/etil acetato y se seca primero empleando el rotavapor y después a elevado vacío a 60 °C durante 12 horas para dar lugar a un sólido blanco.

C₈(MIm)NTf₂, **C₈(MPyrr)NTf₂** y **C₈(Pyr)NTf₂** se sintetizan de acuerdo a procedimientos descritos en la bibliografía. 5 mmol de C₈(MIm)Br, C₈(MPyrr)Br o C₈(Pyr)Br se transfieren a un matraz esférico y se disuelven en 10 mL de agua ultrapura mientras que se somete a agitación a temperatura ambiente. A continuación, una disolución acuosa de bis(trifluorometano)sulfonimida de litio (6 mmol en 6 mL de agua ultrapura) se añade gota a gota. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 24

horas. Después la mezcla se transfiere a un embudo de decantación enjuagando con etil acetato; la fase acuosa se retira y el líquido iónico se disuelve en 30 mL de etil acetato y se lava con agua ultrapura (4 x 30 mL). Finalmente, el etil acetato se elimina con un rotavapor y el líquido iónico se seca a vacío a 60 °C durante 24 horas.

C₈(MIm)SbF₆, C₈(MPyrr)SbF₆ y C₈(Pyr)SbF₆ se sintetizan de acuerdo a procedimientos descritos en la bibliografía. En un matraz esférico de una sola entrada y provisto de un agitador magnético, 5 mmol de C₈(MIm)Br, C₈(MPyrr)Br o C₈(Pyr)Br se disuelven en 20 mL de diclorometano. A continuación, se añaden 6 mmol de hexafluoroantimonato (V) de sodio. La mezcla se agita durante 24 horas a temperatura ambiente mientras se observa la aparición de un sólido blanco (NaBr). Este sólido se filtra y el filtrado se lava con agua ultrapura varias veces (5 x 50 mL). El disolvente se elimina en un rotavapor y el líquido iónico se seca a alto vacío a 70 °C durante 24 horas.

C₂ (MIm)₂ Br₂, C₃ (MIm)₂ Br₂, C₄ (MIm)₂ Br₂, C₆ (MIm)₂ Br₂ y C₈ (MIm)₂ Br₂ se sintetizan siguiendo el mismo procedimiento. Se añade una disolución de 30 mmol de 1,2-dibromoetano, 1,3-dibromopropano, 1,4-dibromobutano, 1,6-dibromohexano o 1,8-dibromooctano en 12 mL de metanol a un matraz esférico provisto de un condensador de reflujo y de un embudo. A continuación, se añaden 60 mmol de 1-metilimidazol gota a gota bajo agitación a temperatura ambiente. La mezcla resultante se somete a calentamiento a 40-50°C mientras que es agitada durante 48 horas. El producto es aislado por filtración y purificado mediante recristalización. El producto resultante de la recristalización se transfiere a un matraz esférico realizando enjuagues con metanol. Finalmente, el disolvente es eliminado tras someterse a vacío.

C₃ (MPyrr)₂ Br₂, C₄ (MPyrr)₂ Br₂, C₆ (MPyrr)₂ Br₂ y C₈ (MPyrr)₂ Br₂ se sintetizan siguiendo el mismo procedimiento. Se añade una disolución de 30 mmol de 1,3-dibromopropano, 1,4-dibromobutano, 1,6-dibromohexano o 1,8-dibromooctano en 10 mL de metanol a un matraz esférico provisto de un condensador de reflujo y de un embudo. A continuación, 63 mmol de 1-metilimidazol se añaden gota a gota bajo agitación a temperatura ambiente. La mezcla resultante se somete a calentamiento a 40-50°C mientras que es agitada durante 48 horas. El producto es aislado por filtración y purificado mediante recristalización en metanol/etil acetato. El producto resultante de la recristalización se transfiere a un matraz esférico realizando enjuagues con metanol. Finalmente, el disolvente es eliminado tras someterse a vacío.

C₂ (Pyr)₂ Br₂, C₃ (Pyr)₂ Br₂, C₄ (Pyr)₂ Br₂, C₆ (Pyr)₂ Br₂, C₈ (Pyr)₂ Br₂ y C₁₂ (Pyr)₂ Br₂ se sintetizan siguiendo el mismo procedimiento. Se añade una disolución de 30 mmol de 1,2-dibromoetano, 1,3-dibromopropano, 1,4-dibromobutano, 1,6-dibromohexano, 1,8-dibromooctano o 1,12-dibromododecano en 5 mL de metanol a un matraz esférico provisto de un condensador de reflujo y de un embudo. A continuación, 75 mmol de 1-metilimidazol se añaden gota a gota bajo agitación a temperatura ambiente. La mezcla resultante se somete a calentamiento a 50°C mientras que es agitada durante 48 horas. El producto es aislado por filtración y purificado mediante recristalización en metanol/etil acetato. El producto resultante de la recristalización se transfiere a un matraz esférico realizando enjuagues con metanol. Finalmente, el disolvente es eliminado tras someterse a vacío.

Bromuro de (3-bromopropil)piridinio: 100 mmol de piridina son transferidos a un matraz esférico. A continuación, se añaden 150 mmol de 1,3-dibromopropano y la mezcla resultante se agita durante 72 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, la mezcla se somete a un proceso de lavado con etil acetato con el objetivo de eliminar los

reactivos que han quedado sin reaccionar. Finalmente, se filtra para obtener un precipitado blanco.

C₃ (Pyr) (MIm) Br₂ y **C₃ (Pyr) (MPyrr) Br₂** se sintetizan siguiendo el mismo procedimiento. Se añade una disolución de 15 mmol de bromuro de (3-bromopropil)piridinio en 20 mL de metanol. A continuación, se añaden 18 mmol of 1-metilimidazol o 19.5 mmol de 1-metilpyrrolidina gota a gota mientras que se agita a temperatura ambiente. La mezcla resultante es sometida a reflujo y a calentamiento a 50°C mientras que se agita durante 48 horas. La solución resultante se recristalizó directamente con metanol/etil acetato (≈1:5 v:v) y el producto fue aislado con una filtración posterior.

Las estructuras de los líquidos iónicos obtenidos fueron confirmadas mediante espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C (datos obtenidos a temperatura ambiente en un espectrómetro Jeol modelo EX270) y mediante espectrometría de masas (MS) (espectrómetro Bruker MicroTOF 61).

C₈(MIm)Br: bromuro de 1-metil-3-octilimidazolio. C₁₂H₂₃BrN₂; ¹H RMN (270 MHz, CDCl₃): δ 10.29 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 4.27 (t, 2H), 4.08 (s, 3H), 1.86 (m, 2H), 1.23 (m, 10H), 0.80 (t, 3H). ¹³C RMN (68 MHz, CDCl₃): δ 137.49, 123.97, 122.21, 50.31, 36.91, 31.83, 30.50, 29.18, 29.11, 26.41, 22.73, 14.24. MS m/z ión molecular: 195.1864 (catión).

C₈(MPyrr)Br: bromuro de 1-metil-1-octilpirrolidinio. C₁₂H₂₈BrN; ¹H RMN (270 MHz, CDCl₃): δ 3.83-3.74 (m, 4H), 3.62-3.56 (m, 2H), 3.24 (s, 3H), 2.25 (s, 4H), 2.02 (m, 2H), 1.36-1.14 (m, 10H), 0.81 (t, 3H). ¹³C RMN (68 MHz, CDCl₃): δ 64.66, 64.41, 48.89, 31.82, 29.37, 29.20, 26.61, 24.31, 22.74, 21.87, 14.24. MS m/z ión molecular: 198.2227 (catión).

C₈(Pyr)Br: bromuro de 1-octilpiridinio C₁₃H₂₂BrN; ¹H RMN (270 MHz, CDCl₃): δ 9.55-9.53 (d, 2H), 8.52-8.47 (t, 1H), 8.14-8.11 (t, 2H), 4.95-4.91 (t, 2H), 2.02-1.95 (m, 2H), 1.33-1.09 (m, 10H), 0.77 (t, 3H). ¹³C RMN (68 MHz, CDCl₃): δ 145.59, 145.26, 128.82, 62.36, 32.15, 31.89, 29.22, 26.28, 22.78, 14.18. MS m/z ión molecular: 192.1753 (catión).

C₈(MIm)NTf₂: bis (trifluorometilsulfonil) imida de 1-metil-3-octilimidazolio. C₁₄H₂₃F₆N₃O₄S₂; ¹H RMN (270 MHz, CD₄O): δ 8.87 (s, 1H), 7.62-7.54 (d, 2H), 4.20 (t, 2H), 3.92 (s, 3H), 1.94-1.83 (m, 2H), 1.37-1.28 (m, 10H), 0.90 (t, 3H). ¹³C RMN (68 MHz, CD₄O): δ 125.05, 123.75, 50.98, 36.54, 33.01, 31.23, 30.30, 30.16, 27.38, 23.79, 14.52. MS m/z ión molecular: 195.1863 (catión), 279.9180 (anión).

C₈(MPyrr)NTf₂: bis (trifluorometilsulfonil) imida de 1-metil-1-octilpirrolidinio. C₁₅H₂₈F₆N₂O₄S₂; ¹H RMN (270 MHz, CDCl₃): δ 3.57-3.45 (m, 4H), 3.32-3.26 (m, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.25 (s, 4H), 1.80-1.71 (m, 2H), 1.38-1.21 (m, 10H), 0.88 (t, 3H). ¹³C RMN (68 MHz, CDCl₃): δ 122.50, 117.78, 65.14, 64.87, 48.69, 31.87, 29.22, 24.14, 22.85, 21.81, 14.32. MS m/z ión molecular: 198.2227 (catión), 279.9179 (anión).

C₈(Pyr)NTf₂: bis (trifluorometilsulfonil) imida de 1-octilpiridinio. C₁₅H₂₂F₆N₂O₄S₂; ¹H RMN (270 MHz, CDCl₃): δ 8.84-8.81 (d, 2H), 8.51-8.45 (t, 1H), 8.09-8.03 (t, 2H), 4.62-4.56 (t, 2H), 2.05-1.94 (m, 2H), 1.40-1.19 (m, 10H), 0.89-0.84 (t, 3H). ¹³C RMN (68 MHz, CDCl₃): δ 145.75, 144.71, 128.99, 62.97, 31.87, 29.17, 29.08, 26.23, 22.83, 14.30. MS m/z ión molecular: 192.1742 (catión), 279.9188 (anión).

C₈(MIm)SbF₆: hexafluoroantimoniato de 1-metil-3-octilimidazolío. C₁₂H₂₃F₆N₂Sb; ¹H RMN (270 MHz, DMSO-d₆): δ 9.09 (s, 1H), 7.66-7.78 (d, 2H), 4.14 (t, 2H), 3.84 (s, 3H), 1.82-1.73 (m, 2H), 1.32-1.18 (m, 10H), 0.86 (t, 3H). ¹³C RMN (68 MHz, DMSO-d₆): δ 136.47, 123.58, 122.24, 48.77, 35.72, 31.15, 29.35, 28.45, 28.32, 25.47, 22.04, 13.91. MS m/z ión molecular: 195.1865 (catión), 234.8935 (anión).

C₈(MPyrr)SbF₆: hexafluoroantimoniato de 1-metil-1-octilpirrolidinio. C₁₂H₂₈F₆NSb; ¹H RMN (270 MHz, DMSO-d₆): δ 3.51-3.34 (m, 4H), 3.31-3.23 (m, 2H), 2.97 (s, 3H), 2.07 (s, 4H), 1.74-1.63 (m, 2H), 1.35-1.23 (m, 10H), 0.87 (t, 3H). ¹³C RMN (68 MHz, DMSO-d₆): δ 63.38, 63.09, 47.46, 31.14, 28.43, 25.89, 22.88, 22.01, 21.05, 13.91. MS m/z ión molecular: 198.2225 (catión), 234.8939 (anión).

C₈(Pyr)SbF₆: hexafluoroantimoniato de 1-octilpiridinío. C₁₃H₂₂F₆NSb; ¹H RMN (270 MHz, DMSO-d₆): δ 9.10-9.07 (d, 2H), 8.63-8.57 (t, 1H), 8.18-8.13 (t, 2H), 4.61-4.56 (t, 2H), 1.97-1.86 (m, 2H), 1.33-1.20 (m, 10H), 0.88-0.83 (t, 3H). ¹³C RMN (68 MHz, DMSO-d₆): δ 145.45, 144.72, 128.08, 60.80, 31.11, 30.69, 28.42, 28.33, 25.39, 22.03, 13.92. MS m/z ión molecular: 192.1737 (catión), 234.8943 (anión).

C₂ (MIm)₂ Br₂: dibromuro de 1,2-bis(3-metilimidazolío-1-yl)etano. C₁₀H₁₆Br₂N₄; ¹H RMN (270 MHz, DMSO-d₆): δ 9.25 (s, 2H), 7.77-7.73 (d, 4H), 4.76 (s, 4H), 3.86 (s, 6H). ¹³C RMN (68 MHz, DMSO-d₆): δ 137.16, 123.78, 122.33, 48.30, 36.01. MS m/z ión molecular: 192.1747 (catión).

C₃ (MIm)₂ Br₂: dibromuro de 1,3-bis(3-metilimidazolío-1-yl)propano. C₁₁H₁₈Br₂N₄; ¹H RMN (270 MHz, D₂O): δ 8.78 (s, 2H), 7.51-7.44 (d, 4H), 4.30 (t, 4H), 3.88 (s, 6H), 2.56-2.45 (m, 2H). ¹³C RMN (68 MHz, D₂O): δ 136.38, 124.16, 122.36, 46.49, 36.10, 29.95. MS m/z ión molecular: 103.0727 (catión).

C₄ (MIm)₂ Br₂: dibromuro de 1,4-bis(3-metilimidazolío-1-yl)butano. C₁₂H₂₀Br₂N₄; ¹H RMN (270 MHz, D₂O): δ 8.70 (s, 2H), 7.45-7.39 (d, 4H), 4.21 (t, 4H), 3.85 (s, 6H), 1.90-1.84 (m, 4H). ¹³C RMN (68 MHz, D₂O): δ 136.16, 123.92, 122.28, 48.92, 35.97, 26.41. MS m/z ión molecular: 110.0805 (catión).

C₆ (MIm)₂ Br₂: dibromuro de 1,6-bis(3-metilimidazolío-1-yl)hexano. C₁₄H₂₄Br₂N₄; ¹H RMN (270 MHz, DMSO-d₆): δ 9.31 (s, 2H), 7.85-7.75 (d, 4H), 4.19 (t, 4H), 3.87 (s, 6H), 1.81-1.76 (m, 4H), 1.29-1.24 (m, 4H). ¹³C RMN (68 MHz, DMSO-d₆): δ 136.50, 123.53, 122.24, 48.53, 35.77, 29.07, 24.76. MS m/z ión molecular: 124.0985 (catión).

C₈ (MIm)₂ Br₂: dibromuro de 1,8-bis(3-metilimidazolío-1-yl)octano. C₁₆H₂₈Br₂N₄; ¹H RMN (270 MHz, D₂O): δ 8.66 (s, 2H), 7.43-7.37 (d, 4H), 4.14 (t, 4H), 3.84 (s, 6H), 1.86-1.76 (m, 4H), 1.30-1.18 (m, 8H). ¹³C RMN (68 MHz, D₂O): δ 135.97, 123.65, 122.67, 49.70, 35.85, 29.33, 28.02, 25.38. MS m/z ión molecular: 138.1155 (catión).

C₃ (MPyrr)₂ Br₂: dibromuro de 1,3-bis(1-metilpirrolidinio-1-yl)propano. C₁₃H₂₈Br₂N₂; ¹H RMN (270 MHz, D₂O): δ 3.65-3.41 (m, 12H), 3.10 (s, 6H), 2.44-2.31 (m, 2H), 2.28-2.17 (m, 8H). ¹³C RMN (68 MHz, D₂O): δ 65.09, 60.46, 48.51, 21.52, 19.13. MS m/z ión molecular: 106.1111 (catión).

C₄ (MPyrr)₂ Br₂: dibromuro de 1,4-bis(1-metilpirrolidinio-1-yl)butano. C₁₄H₃₀Br₂N₂; ¹H RMN (270 MHz, D₂O): δ 3.54-3.37 (m, 12H), 3.02 (s, 6H), 2.21-2.14 (m, 8H), 1.90-1.84 (m, 4H). ¹³C RMN (68 MHz, D₂O): δ 64.67, 63.32, 48.29, 21.47, 20.66. MS m/z ión molecular: 113.1187 (catión).

C₆ (MPyrr)₂ Br₂: dibromuro de 1,6-bis(1-metilpirrolidinio-1-yl)hexano. C₁₆H₃₄Br₂N₂; ¹H RMN (270 MHz, D₂O): δ 3.51-3.27 (m, 12H), 3.00 (s, 6H), 2.22-2.11 (m, 8H), 1.85-1.73 (m, 4H), 1.43-1.37 (m, 4H). ¹³C RMN (68 MHz, D₂O): δ 64.48, 64.22, 48.27, 25.47, 23.18, 21.48. MS m/z ión molecular: 127.1315 (catión).

C₈ (MPyrr)₂ Br₂: dibromuro de 1,8-bis(1-metilpirrolidinio-1-yl)octano. C₁₈H₃₈Br₂N₂; ¹H RMN (270 MHz, D₂O): δ 3.53-3.25 (m, 12H), 2.99 (s, 6H), 2.23-2.10 (m, 8H), 1.81-1.70 (m, 4H), 1.34 (s, 8H). ¹³C RMN (68 MHz, D₂O): δ 64.46, 64.42, 48.25, 28.10, 25.70, 23.31, 21.47. MS m/z ión molecular: 141.1491 (catión).

C₂ (Pyr)₂ Br₂: dibromuro de 1,2-bis(piridinio-1-yl)etano. C₁₂H₁₄Br₂N₂; ¹H RMN (270 MHz, D₂O): δ 8.86-8.83 (d, 4H), 8.68-8.62 (t, 2H), 8.14-8.09 (t, 4H), 5.34 (s, 4H). ¹³C RMN (68 MHz, D₂O): δ 147.74, 144.93, 129.39, 60.31. MS m/z ión molecular: 130.1581 (catión).

C₃ (Pyr)₂ Br₂: dibromuro de 1,3-bis(piridinio-1-yl)propano. C₁₃H₁₆Br₂N₂; ¹H RMN (270 MHz, D₂O): δ 8.92-8.89 (d, 4H), 8.60-8.54 (t, 2H), 8.12-8.06 (t, 4H), 4.84-4.76 (t, 4H), 2.86-2.75 (m, 2H). ¹³C RMN (68 MHz, D₂O): δ 146.54, 144.62, 128.85, 58.30, 31.96. MS m/z ión molecular: 103.0857 (catión).

C₄ (Pyr)₂ Br₂: dibromuro de 1,4-bis(piridinio-1-yl)butano. C₁₄H₁₈Br₂N₂; ¹H RMN (270 MHz, D₂O): δ 8.86-8.83 (d, 4H), 8.58-8.51 (t, 2H), 8.09-8.04 (t, 4H), 4.72-4.61 (m, 4H), 2.18-2.06 (m, 4H). ¹³C RMN (68 MHz, D₂O): δ 146.15, 144.45, 128.65, 61.03, 27.49. MS m/z ión molecular: 107.0696 (catión).

C₆ (Pyr)₂ Br₂: dibromuro de 1,6-bis(piridinio-1-yl)hexano. C₁₆H₂₂Br₂N₂; ¹H RMN (270 MHz, D₂O): δ 8.84-8.81 (d, 4H), 8.56-8.49 (t, 2H), 8.07-8.02 (t, 4H), 4.62-4.57 (t, 4H), 2.06-1.94 (m, 4H), 1.44-1.33 (m, 4H). ¹³C RMN (68 MHz, D₂O): δ 145.79, 144.39, 128.45, 61.92, 30.49, 24.99. MS m/z ión molecular: 121.0873 (catión).

C₈ (Pyr)₂ Br₂: dibromuro de 1,8-bis(piridinio-1-yl)octano. C₁₈H₂₆Br₂N₂; ¹H RMN (270 MHz, D₂O): δ 8.83-8.80 (d, 4H), 8.55-8.48 (t, 2H), 8.06-8.01 (t, 4H), 4.60-4.55 (t, 4H), 2.04-1.93 (m, 4H), 1.37-1.24 (m, 8H). ¹³C RMN (68 MHz, D₂O): δ 145.69, 144.37, 128.39, 62.12, 30.65, 28.00, 25.25. MS m/z ión molecular: 135.1037 (catión).

C₁₂ (Pyr)₂ Br₂: dibromuro de 1,12-bis(piridinio-1-yl)dodecano. C₂₂H₃₄Br₂N₂; ¹H RMN (270 MHz, D₂O): δ 8.83-8.80 (d, 4H), 8.54-8.48 (t, 2H), 8.06-8.01 (t, 4H), 4.60-4.55 (t, 4H), 2.03-1.92 (m, 4H), 1.30-1.19 (m, 16H). ¹³C RMN (68 MHz, D₂O): δ 145.68, 144.36, 128.38, 62.17, 30.69, 28.68, 28.59, 28.23, 25.35. MS m/z ión molecular: 163.1370 (catión).

C₃ (Pyr) (MIm) Br₂: dibromuro de 1-(piridinio-1-yl)-3-(3-metilimidazolio-1-yl)propano C₁₂H₁₇Br₂N₃; ¹H RMN (270 MHz, methanol-d₄): δ 9.20-9.13 (t, 3H), 8.69-8.62 (t, 1H), 8.21-8.15 (t, 2H), 7.78 (t, 1H), 7.64 (t, 1H), 4.89-4.83 (t, 3H), 4.52-4.47 (t, 2H), 3.98 (s, 3H), 2.77-2.66 (m, 2H). ¹³C RMN (68 MHz, methanol-d₄): δ 147.48, 146.41, 138.48, 129.86, 125.40, 123.89, 59.68, 47.61, 36.95, 32.81. MS m/z ión molecular: 101.5682 (catión).

C₃ (Pyr) (MPyrr) Br₂: dibromuro de 1-(piridinio-1-yl)-3-(1-metilpirrolidinio-1-yl)propano C₁₃H₂₂Br₂N₂; ¹H RMN (270 MHz, methanol-d₄): δ 9.23-9.20 (d, 2H), 8.70-8.64 (t, 1H), 8.22-8.17 (t, 2H), 4.88-4.82 (t, 2H), 3.71-3.63 (m, 6H), 3.17 (s, 3H), 2.70-2.64 (m, 2H), 2.31-2.24 (m, 4H). ¹³C RMN (68 MHz, methanol-d₄): δ 147.58, 146.45,

129.87, 66.20, 66.16, 61.53, 59.46, 27.30, 22.83. MS m/z ión molecular: 103.0862 (catión).

7.2.3. Ensayos de toxicidad

El ensayo Microtox® de toxicidad está basado en la determinación de la inhibición de la luminiscencia de la bacteria marina Gram-negativa *Vibrio Fischeri*. Esta bacteria fue suministrada en forma liofilizada por Modern Water y activada por rehidratación con agua Milli-Q. En cada ensayo se introduce una muestra control de la suspensión bacteriana sin líquido iónico. Ambos, el control y las muestras, se diluyen con una disolución de NaCl al 2% para ajustar la presión osmótica. Para medir la emisión de luz de las bacterias que están en contacto con el líquido iónico se ha empleado un analizador Microtox® M500 (Azur Environmental). En este ensayo, se prepara una serie de disoluciones acuosas de líquido iónico de distinta concentración (de 5.625 a 45.000 %). La concentración del 100 % corresponde a una disolución “stock” de líquido iónico a partir de la cual por dilución se obtienen el resto de disoluciones. Después de 15 minutos de exposición de la bacteria a las disoluciones de líquido iónico (cuyo rango de concentración dependerá del líquido iónico en cuestión), se mide la emisión de luz de la bacteria y se compara con la emisión de luz de la muestra control. De esta forma, se determina la toxicidad con el apoyo del programa informático del analizador. Los valores de toxicidad que se recogen en el texto y en las tablas están en forma de Log EC₅₀ (µM), representando el valor de toxicidad medido después de que la bacteria *Vibrio fischeri* esté en contacto con el líquido iónico 15 minutos. Las medidas se repitieron al menos tres veces para la mayoría de los líquidos iónicos.

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los líquidos iónicos mono- y dicatiónicos mencionados anteriormente han sido sintetizados y se ha evaluado su ecotoxicidad hacia la bacteria marina luminiscente *Vibrio fischeri*.

Las **Tablas 7.2 y 7.3** recogen los valores experimentales de EC₅₀ para líquidos iónicos monocatiónicos y dicatiónicos, respectivamente. Además, la **Tabla 4.2** también incluye los valores de EC₅₀ encontrados en la bibliografía y los estimados mediante un método QSAR. En el caso de los líquidos iónicos dicatiónicos no existen datos disponibles en la bibliografía y el método QSAR no tiene aplicabilidad en ellos (**Tabla 7.3**). La **Tabla 7.4** muestra los valores de EC₅₀ de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) extraídos de la bibliografía. En la **Figura 7.1** se representan los valores de EC₅₀ recopilados en las **Tablas 7.2, 7.3 y 7.4** con el objetivo de facilitar su comparación.

Para diseñar líquidos iónicos menos tóxicos, se han introducido varios cambios estructurales en los mismos. Específicamente, estos han sido la estructura del catión (en líquidos iónicos mono- y dicatiónicos), la longitud de la cadena alquílica central (sólo en líquidos iónicos dicatiónicos) y el anión (sólo en líquidos iónicos monocatiónicos). En este capítulo se estudiado la influencia de estos parámetros en la toxicidad de los líquidos iónicos. Para ello, los principales resultados obtenidos se discutirán en tres apartados: líquidos iónicos monocatiónicos, líquidos iónicos dicatiónicos y monocatiónicos frente a dicatiónicos.

7. Evaluación de la toxicidad de líquidos iónicos dicatiónicos mediante inhibición de *Vibrio fischeri*

Tabla 7.2

Valores de Log EC₅₀ de los líquidos iónicos monocatiónicos después de 15 min of exposición a la bacteria luminiscente *Vibrio fischeri*, con sus respectivos intervalos del 95% de confianza (entre paréntesis) y los valores de Log EC₅₀ medios. También se recogen los valores de Log EC₅₀ presentes en la bibliografía y los obtenidos empleando el método QSAR [25]. En todos los casos se ha expresado la toxicidad como Log EC₅₀ (μM).

Líquido iónico	Log EC ₅₀ , este capítulo (límite inferior, límite superior)	Log EC ₅₀ , este capítulo (valor medio)	Log EC ₅₀ bibliografía	Log EC ₅₀ del QSAR [25]
C ₈ (MIm) Br	0.75 (0.45, 1.05) 0.78 (0.75, 0.80) 0.60 (0.30, 0.89)	0.71	0.63 [13]; 2.27 [34]	1.17
C ₈ (MIm) NTf ₂	0.99 (0.96, 1.02) 0.93 (0.87, 1.00) 0.92 (0.89, 0.96)	0.95	-	0.76
C ₈ (MIm) SbF ₆	0.96 (0.93, 0.99) 0.83 (0.63, 1.02) 0.78 (0.61, 1.82)	0.85	-	-
C ₈ (Pyr) Br	1.24 (1.01, 1.47) 1.27 (1.09, 1.46) 1.30 (1.10, 1.50)	1.27	1.89 [34]	0.95
C ₈ (Pyr) NTf ₂	1.47 (1.38, 1.57) 1.48 (1.42, 1.54) 1.59 (1.49, 1.69)	1.51	-	-
C ₈ (Pyr) SbF ₆	1.14 (0.99, 1.29) 1.07 (0.99, 1.16) 1.18 (1.14, 1.22)	1.13	-	-
C ₈ (MPyrr) Br	1.53 (1.46, 1.60) 1.72 (1.60, 1.84) 1.74 (1.59, 1.87)	1.66	2.26 [34]	1.96
C ₈ (MPyrr) NTf ₂	1.48 (1.45, 1.50) 1.54 (1.37, 1.71) 1.58 (1.57, 1.60)	1.53	1.58 [34]	0.34
C ₈ (MPyrr) SbF ₆	1.71 (1.13, 2.30) 1.69 (0.75, 2.63) 1.67 (1.00, 2.34) 1.69 (0.73, 2.65)	1.69	-	-

7. Evaluación de la toxicidad de líquidos iónicos dicatiónicos mediante inhibición de *Vibrio fischeri*

Tabla 7.3

Valores de Log EC₅₀ (μM) de líquidos iónicos dicatiónicos después de 15 min of exposición a la bacteria luminiscente *Vibrio fischeri*, con sus respectivos intervalos del 95% de confianza (entre paréntesis) y los valores de Log EC₅₀ medios.

Líquido iónico	Log EC ₅₀ (μM), este capítulo (límite inferior, límite superior)	Log EC ₅₀ (μM), este capítulo (valor medio)
C ₂ (MIm) ₂ Br ₂	5.35 (5.05, 5.64)	5.35
	5.40 (5.24, 5.56)	
C ₃ (MIm) ₂ Br ₂	5.30 (5.23, 5.37)	5.37
	5.41 (5.05, 5.77)	
C ₄ (MIm) ₂ Br ₂	5.02 (4.67, 5.36)	5.00
	5.06 (4.87, 5.25)	
C ₆ (MIm) ₂ Br ₂	4.92 (4.53, 5.31)	4.56
	4.54 (4.09, 4.99)	
C ₈ (MIm) ₂ Br ₂	4.59 (4.14, 5.05)	2.34
	4.56 (4.11, 5.01)	
C ₃ (MPyrr) ₂ Br ₂	2.33 (2.20, 2.45)	2.34
	2.34 (2.18, 2.49)	
C ₄ (MPyrr) ₂ Br ₂	2.35 (2.21, 2.50)	5.07
	5.18 (5.14, 5.23)	
C ₆ (MPyrr) ₂ Br ₂	4.89 (4.61, 5.18)	4.31
	5.13 (4.99, 5.28)	
C ₈ (MPyrr) ₂ Br ₂	5.06 (4.99, 5.13)	4.08
	4.26 (3.97, 4.55)	
C ₂ (Pyr) ₂ Br ₂	4.28 (3.88, 4.68)	5.40
	4.36 (4.01, 4.70)	
C ₃ (Pyr) ₂ Br ₂	4.33 (4.01, 4.65)	4.56
	4.17 (4.10, 4.23)	
C ₄ (Pyr) ₂ Br ₂	4.22 (4.04, 4.40)	5.04
	3.86 (3.69, 4.04)	
C ₆ (Pyr) ₂ Br ₂	3.64 (2.63, 4.64)	5.18
	3.69 (3.48, 3.90)	
C ₈ (Pyr) ₂ Br ₂	4.00 (3.78, 4.23)	4.52
	3.82 (3.49, 4.14)	
C ₁₂ (Pyr) ₂ Br ₂	3.51 (3.22, 3.79)	2.07
	3.95 (3.77, 4.13)	
C ₃ (Pyr) (MIm) Br ₂	5.37 (5.31, 5.42)	5.23
	5.42 (5.25, 5.60)	
C ₃ (Pyr) (MPyrr) Br ₂	4.59 (4.48, 4.71)	4.55
	4.60 (4.49, 4.70)	
C ₃ (Pyr) (MIm) Br ₂	4.48 (4.46, 4.50)	4.55
	4.93 (4.81, 5.05)	
C ₃ (Pyr) (MPyrr) Br ₂	5.15 (5.04, 5.26)	4.55
	5.03 (4.90, 5.17)	
C ₃ (Pyr) (MIm) Br ₂	5.11 (4.76, 5.46)	4.55
	5.17 (4.94, 5.40)	
C ₃ (Pyr) (MPyrr) Br ₂	5.31 (4.57, 6.05)	4.55
	5.13 (4.90, 5.36)	
C ₃ (Pyr) (MIm) Br ₂	4.19 (3.32, 5.06)	4.55
	4.64 (4.58, 4.71)	
C ₃ (Pyr) (MPyrr) Br ₂	4.39 (2.93, 5.85)	4.55
	4.62 (4.55, 4.68)	
C ₃ (Pyr) (MIm) Br ₂	4.77 (4.76, 4.82)	4.55
	2.07 (2.04, 2.11)	
C ₃ (Pyr) (MIm) Br ₂	2.04 (2.01, 2.07)	4.55
	2.09 (2.06, 2.13)	
C ₃ (Pyr) (MIm) Br ₂	5.18 (4.77, 5.59)	4.55
	5.24 (5.04, 5.44)	
C ₃ (Pyr) (MIm) Br ₂	5.31 (5.28, 5.34)	4.55
	5.19 (5.04, 5.34)	
C ₃ (Pyr) (MIm) Br ₂	4.54 (4.51, 4.58)	4.55
	4.59 (4.57, 4.81)	
C ₃ (Pyr) (MIm) Br ₂	4.52 (4.19, 4.85)	4.55
	4.52 (4.19, 4.85)	

Tabla 7.4.

Valores de Log EC₅₀ (μM) de algunos VOCs encontrados en la bibliografía [31].

Compuesto	Log EC ₅₀ (μM)
Etanol	5.89
Acetonitrilo	5.57
Acetona	5.17
Cloroformo	4.16
Benceno	3.31
Tolueno	2.33

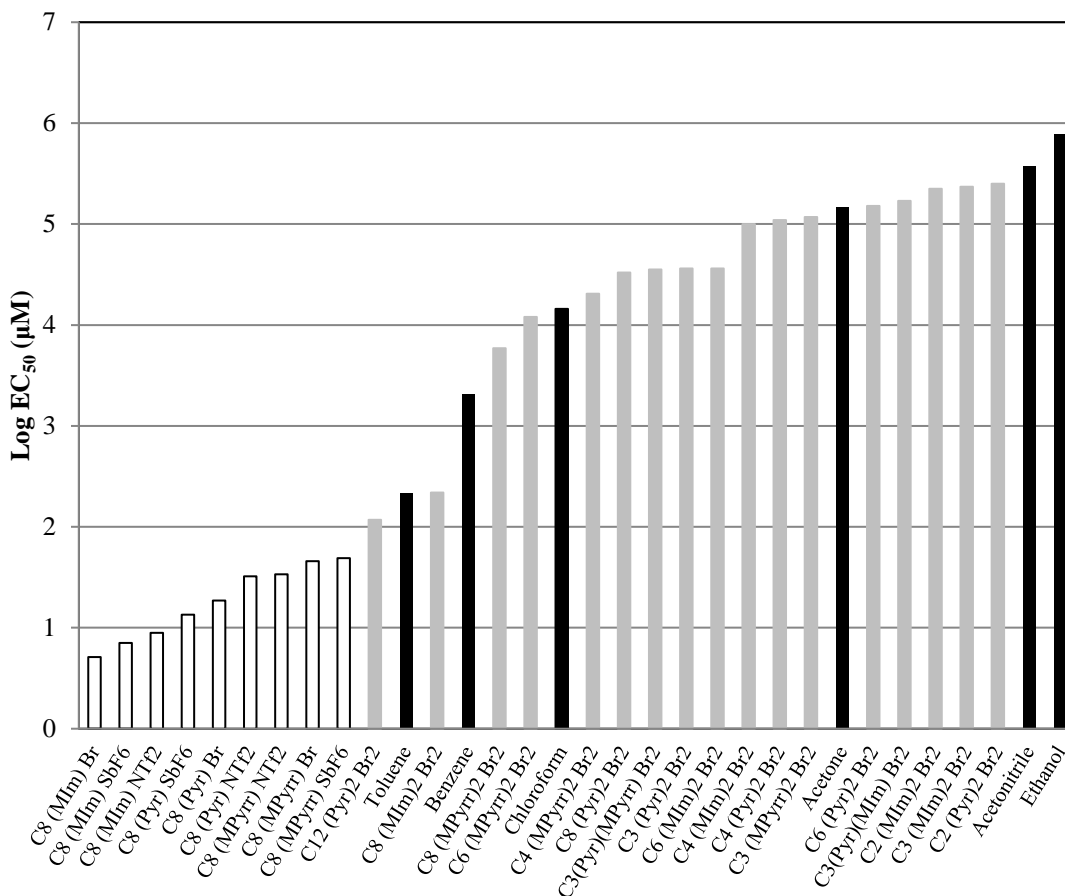


Figura 7.1. Valores de Log EC₅₀ de los líquidos iónicos obtenidos experimentalmente (barras blancas y grises, monocatiónicos y dicatiónicos, respectivamente) y Log EC₅₀ de COVs obtenidos de la bibliografía (barras negras).

7.3.1. Líquidos iónicos monocatiónicos

En este capítulo se ha estudiado en profundidad la toxicidad de líquidos iónicos monocatiónicos en *Vibrio fischeri*. Los valores obtenidos de Log EC₅₀ de líquidos iónicos monocatiónicos (**Tabla 7.2**) ponen de manifiesto la influencia de dos características estructurales en la toxicidad: la influencia de la estructura del catión en líquidos iónicos con el mismo anión y la influencia del anión en líquidos iónicos con el mismo catión.

El análisis de los líquidos iónicos derivados de imidazolio, pirrolidinio y piridinio mostró que, para el mismo anión, los líquidos iónicos más tóxicos fueron los basados en sales de imidazolio de manera que la tendencia observada en cada serie de aniones estudiados fue la misma: C₈(MIm)⁺>C₈(MPyr)⁺. Sin embargo, no fue posible establecer

una comparación entre los líquidos iónicos basados en imidazolio y pirrolidinio y los basados en piridinio debido a que estos últimos no presentan un grupo metilo conectado al anillo piridínico. En nuestros ensayos, para todos los aniones, el catión imidazolio fue más tóxico que el pirrolidinio. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por otros autores. Por ejemplo, Torrecilla *et al.* [35] afirmó que los líquidos iónicos con cationes pirrolidínicos presentaban una menor citotoxicidad IPC-81 que los que poseían cationes imidazólicos, mientras que Arning *et al.* [36] obtuvo resultados similares en ensayos de inhibición con acetilcolinesterasa. Es posible concluir, por tanto, que los anillos catiónicos de tipo aromático presentes en líquidos iónicos monocatiónicos parecen conducir a mayores valores de toxicidad en *Vibrio fischeri*.

Observando la **Tabla 7.2**, se pone de manifiesto que los valores de Log EC₅₀ para una serie de aniones dada son muy similares y no es posible establecer una tendencia general en relación a la toxicidad en *Vibrio fischeri* en base al anión constituyente de los líquidos iónicos estudiados. En nuestro caso, esto podría ser debido a la presencia de una cadena alquílica larga (octil) en el catión que podría conducir a un efecto mayor en la toxicidad al propio efecto del anión. De hecho, muchos autores sugieren que la longitud de la cadena alquílica del catión presenta un efecto muy superior en la toxicidad del líquido iónico que el anión [13, 14, 28].

7.3.2. Líquidos iónicos dicatiónicos

Los valores de Log EC₅₀ de los líquidos iónicos dicatiónicos recogidos en la **Tabla 7.3** han permitido analizar la influencia de dos distintas características estructurales en la toxicidad de los líquidos iónicos en la bacteria marina: i) el efecto de la estructura del catión en una amplia colección de líquidos iónicos dicatiónicos con el mismo anión (bromuro) y ii) la influencia de la longitud de la cadena alquílica intermedia en líquidos iónicos con el mismo tipo de catión.

Para estudiar la influencia de la estructura del catión en la toxicidad en *Vibrio fischeri*, se han sintetizado dos familias de líquidos iónicos dicatiónicos: quince líquidos iónicos simétricos basados en sales de imidazolio, piridinio y pirrolidinio y dos líquidos iónicos asimétricos basados en combinaciones de piridinio-imidazolio y de piridinio-pirrolidinio. Como ya se ha comentado anteriormente, en esta ocasión tampoco es posible establecer una comparación exhaustiva entre los líquidos iónicos basados en sales de imidazolio y pirrolidinio con los basados en piridinio debido a la presencia de un grupo metilo conectado al anillo piridínico.

Como se observa en la **Tabla 7.3** y en la **Figura 7.3**, la influencia de la estructura del catión en la toxicidad en *Vibrio fischeri* depende de la longitud de la cadena alquílica del catión. De los resultados obtenidos se ha deducido que la toxicidad de los líquidos iónicos dicatiónicos con una cadena de unión de tres átomos de carbono sigue el siguiente orden: C₃(Pyr)₂ Br₂ > C₃(mPyr)₂ Br₂ > C₃(MIm)₂ Br₂, mientras que para los líquidos iónicos análogos con ocho átomos de carbono se ha obtenido el orden opuesto: C₈(MIm)₂ Br₂ > C₈(MPyr)₂ Br₂ > C₈(Pyr)₂ Br₂. Esta misma conclusión también fue sugerida por Docherty y Kulpa [13] en un trabajo anterior para líquidos iónicos monocatiónicos. Concretamente, dedujeron que no es posible establecer comparaciones directas entre la toxicidad de líquidos iónicos basados en sales de imidazolio y piridinio porque, de acuerdo con sus resultados, el C₄(MIm)Br fue significativamente menos tóxico que el C₄(MPyr)Br mientras que el C₆(MIm)Br fue menos tóxico que el C₆(MPyr)Br y, en el caso de ocho átomos de carbono, el C₈(MIm)Br y el C₈(MPyr)Br mostraron una toxicidad similar.

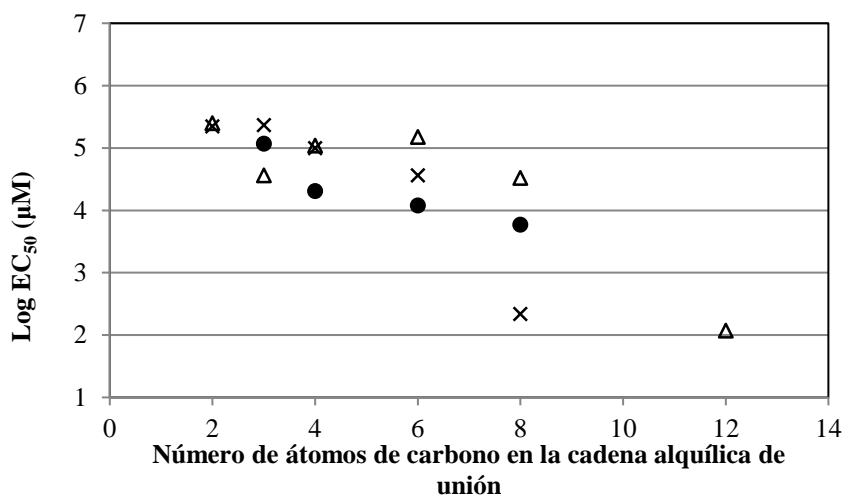


Figura 7.2. Relación entre el número de carbonos de la cadena alquílica de unión entre ambos cationes y la toxicidad acuática (Log EC₅₀) de líquidos iónicos dicatiónicos con distintas estructuras catiónicas; X metilimidazolio, ● metilpirrolidinio y Δ piridinio.

Al comparar líquidos iónicos dicatiónicos simétricos y asimétricos se ha encontrado el siguiente orden de toxicidad (ver **Tabla 7.3**): C₃ (Pyr)₂ Br₂ > C₃ (Pyr) (MIm) Br₂ > C₃ (MIm)₂ Br₂ y C₃ (Pyr)₂ Br₂ ≈ C₃ (Pyr) (MPyrr) Br₂ > C₃ (MPyrr)₂ Br₂. Estos resultados confirman que, para cadenas de unión cortas, los líquidos iónicos basados en sales de piridinio son más tóxicos que los basados en sales de imidazolio y pirrolidinio lo cual está de acuerdo con los resultados mostrados por Docherty y Kulpa [13].

Mediante la comparación de líquidos iónicos dicatiónicos que contienen la misma estructura catiónica pero distinta cadena central se ha estudiado el efecto de la longitud de la cadena alquílica de unión entre los dos cationes sobre la toxicidad de líquidos iónicos dicatiónicos en la bacteria luminiscente. Para ello, se han examinado las siguientes series: de C₂(MIm)₂Br₂ a C₈(MIm)₂Br₂, de C₃(MPyrr)₂Br₂ a C₈(MPyrr)₂Br₂ y de C₂(Pyr)₂Br₂ a C₁₂(Pyr)₂Br₂ (**Tabla 7.3** y **Figura 7.2**). Los resultados de la ecotoxicidad medida siguieron la siguiente tendencia: C₈ > C₆ > C₄ > C₃ ≈ C₂ en los líquidos iónicos de tipo imidazolio, C₈ > C₆ > C₄ > C₃ en los líquidos iónicos basados en sales de pirrolidinio y, finalmente, C₁₂ > C₈ > C₃ > C₆ ≈ C₄ > C₂ en los líquidos iónicos basados en piridinio.

De acuerdo con los resultados obtenidos, en las familias de líquidos iónicos de tipo imidazolio y pirrolidinio evaluadas en este capítulo, la toxicidad en *Vibrio fischeri* aumenta con la longitud de la cadena alquílica central. Sin embargo, en el caso de los líquidos iónicos basados en piridinio estudiados, aunque se observa la misma tendencia de un modo general, los resultados no son tan claros como en el caso de las otras dos familias de líquidos iónicos. Aunque, los resultados de toxicidad de líquidos iónicos dicatiónicos disponibles en la bibliografía son escasos, las tendencias reflejadas en esta están en concordancia con nuestros resultados [4, 37, 38]. Por ejemplo, Steudte *et al.* [4] observaron que la inhibición de acetilcolinesterasa y la toxicidad en *Daphnia Magna* disminuía con la longitud de la cadena central en algunos de los líquidos iónicos dicatiónicos de tipo imidazolio estudiados en este capítulo. Además, los resultados de e Silva *et al.* [38] mostraron la misma tendencia en la toxicidad en *Vibrio fischeri* en el caso de líquidos iónicos dicatiónicos basados en colinio. Gindri *et al.* [37] también encontraron la misma tendencia en la citotoxicidad en MC3T3-E1 de líquidos iónicos dicatiónicos basados en imidazolio. No obstante, no existen estudios previos que hayan

evaluado la toxicidad en *Vibrio fischeri* de los líquidos iónicos dicatiónicos evaluados en este trabajo.

7.3.3. Líquidos iónicos mono- vs dicatiónicos

En el desarrollo de este capítulo se han llevado a cabo comparaciones entre la ecotoxicidad de líquidos iónicos mono- y dicatiónicos con los tres tipos distintos de estructura catiónica. Específicamente, se han comparado líquidos iónicos con el mismo tipo de catión (imidazolio, pirrolidinio o piridinio), la misma longitud de la cadena alquílica (octil) y el mismo anión (bromuro): $C_8(\text{MIm})\text{Br}$ vs $C_8(\text{MIm})_2\text{Br}_2$, $C_8(\text{Pyr})\text{Br}$ vs $C_8(\text{Pyr})_2\text{Br}_2$ y $C_8(\text{MPyrr})\text{Br}$ vs $C_8(\text{MPyrr})_2\text{Br}_2$. De acuerdo con los resultados mostrados en las **Tablas 7.2 y 7.3** y en la **Figura 7.3**, los líquidos iónicos dicatiónicos resultaron ser menos tóxicos en la bacteria *Vibrio fischeri* que sus homólogos monocatiónicos. Estos resultados se encuentran en concordancia con los obtenidos por e Silva *et al.* [38] en líquidos iónicos basados en colina, una sal cuaternaria de amonio, quienes sugirieron que este hecho podría estar relacionado con el tamaño de las moléculas de líquido iónico de manera que a mayor tamaño mayor restricción de las interacciones con las membranas celulares. Del mismo modo, Steudte *et al.* [4] observaron esta misma tendencia en la toxicidad en IPC-81, *S. vacuolatus* y *D. magna* al comparar líquidos iónicos mono- y dicatiónicos. Más recientemente, Gindri *et al.* [37] también obtuvieron resultados similares en ensayos de toxicidad en células pre-osteoblastos del tipo MC3T3-E1. En este caso, los autores afirmaron que la reducción en la toxicidad de los líquidos iónicos podría ser debida a un aumento en la polaridad de la estructura de los mismos.

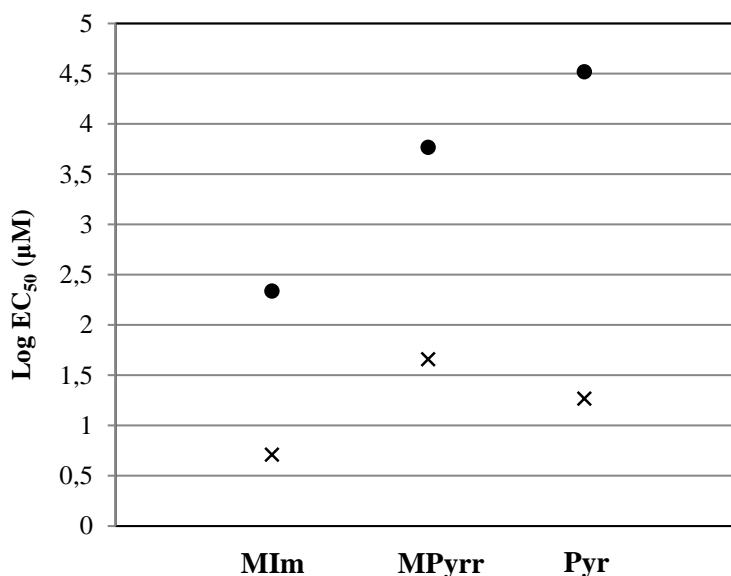


Figura 7.3. Efecto de la estructura del catión en la toxicidad acuática (Log EC_{50}) de líquidos iónicos: \times Monocatiónicos, \bullet Dicatiónicos.

7.3.4. Dependencia del coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}) con la toxicidad en *Vibrio fischeri*

Haciendo una revisión bibliográfica se han encontrado varios autores que afirman que la toxicidad de los líquidos iónicos en *Vibrio fischeri* se encuentra directamente relacionada con su hidrofobicidad: a mayor carácter hidrofóbico mayor toxicidad [13, 37, 38]. El mejor parámetro para representar la hidrofobicidad de un compuesto es su coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}) ya que el sistema formado por agua saturada y octanol presenta un comportamiento similar al ambiente fisicoquímico presente en los organismos vivos [39]. En un estudio previo a esta investigación realizado en nuestro laboratorio se ha obtenido una correlación empírica entre la hidrofobicidad (expresada como $\text{Log } K_{ow}$) y la toxicidad en *Vibrio fischeri* (expresada como $\text{Log}(1/EC_{50})$) a partir de un conjunto de datos experimentales de ambos parámetros de veintinueve líquidos iónicos:

$$\text{Log}(1/EC_{50}) = -1.436 + 0.859\text{Log}K_{ow} - 0.119(\text{Log}K_{ow})^2 \quad (1)$$

Con los datos experimentales que se muestran en las **Tablas 7.2 y 7.3** se han estimado los valores de $\text{Log } K_{ow}$ de todos los líquidos iónicos estudiados en este capítulo mediante la ecuación (1). Dichos valores estimados se recogen en la **Tabla 7.5**. Además de la estimación con la ecuación (1), se han empleado otras dos métodos para estimar el coeficiente de reparto octanol-agua: *molinspiration.com* [40] y *chemicalize.org* [41]. Dichos métodos predicen la toxicidad de una estructura molecular dada a partir de la ruptura de la misma en fragmentos o grupos de átomos que tienen asignados previamente una constante empírica y un factor estructural. Ambos métodos emplean nomenclatura en SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) y los valores estimados obtenidos con ellos también se muestran en la **Tabla 7.5**.

Tabla 7.5.

Valores estimados de K_{ow} empleando la ecuación (1), *molinspiration.com* [40] y *chemicalize.org* [41] de los líquidos iónicos estudiados.

Líquido iónico	Log K_{ow} (Ecuación (1))	Log K_{ow} [40]	Log K_{ow} [41]
C ₈ (MIm) Br	9.78E-1	-0.02	-0.37
C ₈ (MIm) NTf ₂	6.19E-1	2.97	2.17
C ₈ (MIm) SbF ₆	7.63E-1	-0.02	-0.37
C ₈ (Pyr) Br	1.99E-1	-1.01	-0.09
C ₈ (Pyr) NTf ₂	-8.51E-2	2.97	2.17
C ₈ (Pyr) SbF ₆	3.76E-1	-1.01	-0.09
C ₈ (MPyrr) Br	-2.52E-1	0.23	-0.46
C ₈ (MPyrr) NTf ₂	-1.08E-1	2.97	-0.46
C ₈ (MPyrr) SbF ₆	5.19E-1	0.23	2.17
C ₂ (MIm) ₂ Br ₂	-3.17	-5.45	-7.11
C ₃ (MIm) ₂ Br ₂	-3.18	-5.39	-7.05
C ₄ (MIm) ₂ Br ₂	-2.95	-5.32	-6.53
C ₆ (MIm) ₂ Br ₂	-2.66	-5.00	-5.64
C ₈ (MIm) ₂ Br ₂	-0.93	-4.54	-4.76
C ₃ (MPyrr) ₂ Br ₂	-2.99	-5.25	-7.24
C ₄ (MPyrr) ₂ Br ₂	-2.49	-5.17	-6.73
C ₆ (MPyrr) ₂ Br ₂	-2.33	-4.8	-5.84
C ₈ (MPyrr) ₂ Br ₂	-2.10	-4.19	-4.95
C ₂ (Pyr) ₂ Br ₂	-3.20	-5.83	-6.55
C ₃ (Pyr) ₂ Br ₂	-2.66	-5.79	-6.49
C ₄ (Pyr) ₂ Br ₂	-2.97	-5.74	-5.97
C ₆ (Pyr) ₂ Br ₂	-3.06	-5.55	-5.08
C ₈ (Pyr) ₂ Br ₂	-2.63	-5.31	-4.19
C ₁₂ (Pyr) ₂ Br ₂	-0.67	-4.52	-2.41
C ₃ (Pyr) (MIm) Br ₂	-3.09	-5.61	-6.77
C ₃ (Pyr) (MPyrr) Br ₂	-2.65	-5.56	-6.87

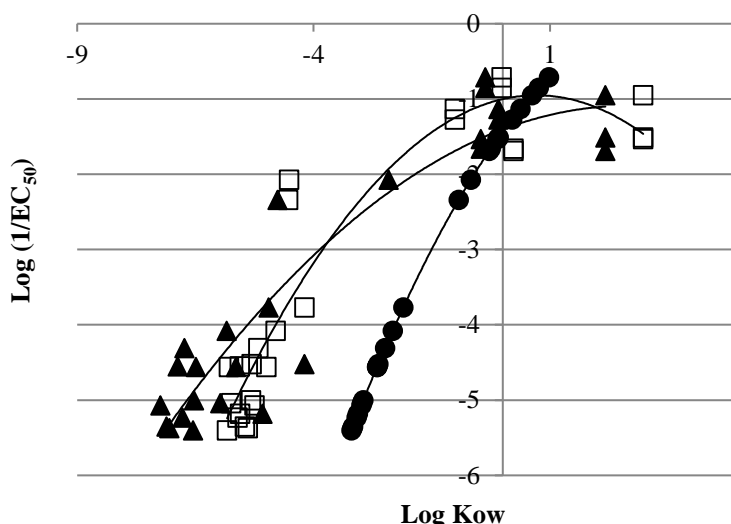


Figura 7.4. Dependencia entre la toxicidad en *Vibrio fischeri* (expresada como $\text{Log}(1/\text{EC}_{50})$) y la hidrofobicidad estimada (expresada como $\text{Log} K_{ow}$) de todos los líquidos iónicos estudiados:

- K_{ow} a partir de la ecuación (1); □ K_{ow} con molinspiration.com; ▲ K_{ow} con chemicalize.org.

Tal y como se muestra en la **Figura 7.4** y en la **Tabla 7.5**, la toxicidad de los líquidos iónicos en *Vibrio fischeri* aumenta con la hidrofobicidad y el factor más importante responsable de dicho aumento para series homólogas es la longitud de la cadena alquílica del catión.

7.4. CONCLUSIONES

La toxicidad en *Vibrio fischeri*, expresada como $\text{Log} \text{EC}_{50}$, de veintiséis líquidos iónicos mono- y dicatiónicos ha variado entre 0.71 y 5.37. Los valores experimentales obtenidos se encuentran en concordancia con los estimados, cuando ha sido posible, empleando el método QSAR y es posible analizar a partir de ellos la dependencia de algunos factores como la composición o la estructura química de los líquidos iónicos con la ecotoxicidad en *Vibrio fischeri*. De acuerdo con nuestros resultados, los factores determinantes en la ecotoxicidad de los líquidos iónicos son la longitud de la cadena alquílica y la existencia de una o dos estructuras catiónicas. La toxicidad de los líquidos iónicos aumenta con la longitud de la cadena alquílica del sustituyente del catión y está principalmente relacionada con el catión y no con la naturaleza del anión. Finalmente, se ha observado que la EC_{50} de los líquidos iónicos dicatiónicos presenta un valor superior a la observada en los monocatiónicos homólogos.

La hidrofobicidad de los líquidos iónicos, expresada como K_{ow} , ha sido estimada empleando tres métodos y se ha encontrado que el $\text{Log}(1/\text{EC}_{50})$ es dependiente de $\text{Log} K_{ow}$. Ya que los valores de EC_{50} son del mismo orden que los de los VOCs, es posible concluir que la toxicidad acuática de estos líquidos iónicos es bastante similar a la de los VOCs empleados comúnmente en la industria, incluso inferiores, especialmente, la de los dicatiónicos. Esto significa que los líquidos iónicos dicatiónicos pueden ser diseñados para aplicaciones industriales prácticas y sostenibles con el medio ambiente.

7.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] B.-S. Lee, S.-T. Lin, A priori prediction of the octanol–water partition coefficient (Kow) of ionic liquids, *Fluid Phase Equilib.* 363 (2014) 233–238.
- [2] G. Viswanathan, S. Murugesan, V. Pushparaj, O. Nalamasu, P.M. Ajayan, R.J. Linhardt, Preparation of biopolymer fibers by electrospinning from room temperature ionic liquids, *Biomacromolecules* 7 (2006) 415–418.
- [3] S.P.M. Ventura, C.S. Marques, A.A. Rosatella, C.A.M. Afonso, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, Toxicity assessment of various ionic liquid families towards *Vibrio fischeri* marine bacteria, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76 (2012) 162–168.
- [4] S. Steudte, S. Bemowsky, M. Mahrova, U. Bottin-Weber, E. Tojo-Suárez, P. Stepnowski, S. Stolte, Toxicity and biodegradability of dicationic ionic liquids, *RSC Adv.* 4 (2014) 5198–5205.
- [5] X. Han, D.W. Armstrong, Using geminal dicationic ionic liquids as solvents for high-temperature organic reactions, *Org. Lett.* 7 (2005) 4205–4208.
- [6] T.P. Thuy Pham, C.-W. Cho, Y.-S. Yun, Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review, *Water Res.* 44 (2010) 352–372.
- [7] M.G. Freire, P.J. Carvalho, A.M.S. Silva, L.M.N.B.F. Santos, L.P.N. Rebelo, I.M. Marrucho, J.A.P. Coutinho, Ion specific effects on the mutual solubilities of water and hydrophobic ionic liquids, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 202–211.
- [8] S.P.M. Ventura, R.L. Gardas, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, Ecotoxicological risk profile of ionic liquids: octanol-water distribution coefficients and toxicological data, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86 (2011) 957–963.
- [9] S.H. Lee, S.B. Lee, Octanol/water partition coefficients of ionic liquids, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (2009) 202–207.
- [10] C. Samorì, A. Pasteris, P. Galletti, E. Tagliavini, Acute toxicity of oxygenated and nonoxygenated imidazolium-based ionic liquids to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*, *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (2007) 2379–2382.
- [11] P.C.A.G. Pinto, S.P.F. Costa, J.L.F.C. Lima, M.L.M.F.S. Saraiva, Automated high-throughput *Vibrio fischeri* assay for (eco)toxicity screening: Application to ionic liquids, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80 (2012) 97–102.
- [12] M.T. Garcia, N. Gathergood, P.J. Scammells, Biodegradable ionic liquids: Part II. Effect of the anion and toxicology, *Green Chem.* 7 (2005) 9–14.
- [13] K.M. Docherty, C.F. Kulpa, Jr., Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 185–189.
- [14] A. Romero, A. Santos, J. Tojo, A. Rodríguez, Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids, *J. Hazard. Mater.* 151 (2008) 268–273.

- [15] S. Stolte, M. Matzke, J. Arning, A. Bösch, W.-R. Pitner, U. Welz-Biermann, B. Jastorff, J. Ranke, Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids, *Green Chem.* 9 (2007) 1170–1179.
- [16] P. Luis, I. Ortiz, R. Aldaco, A. Irabien, A novel group contribution method in the development of a QSAR for predicting the toxicity (*Vibrio fischeri* EC50) of ionic liquids, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67 (2007) 423–429.
- [17] S.P.M. Ventura, F.A. e Silva, A.M.M. Gonçalves, J.L. Pereira, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine bacteria, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 102 (2014) 48–54.
- [18] C. Pretti, M. Renzi, S.E. Focardi, A. Giovani, G. Monni, B. Melai, S. Rajamani, C. Chiappe, Acute toxicity and biodegradability of N-alkyl-N-methylmorpholinium and N-alkyl-DABCO based ionic liquids, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74 (2011) 748–753.
- [19] T.P.T. Pham, C.-W. Cho, J. Min, and Y.-S. Yun, Alkyl-chain length effects of imidazolium and pyridinium ionic liquids on photosynthetic response of *Pseudokirchneriella subcapitata*, *J. Biosci. Bioeng.* 105 (2008) 425–428.
- [20] J.H. Larson, P.C. Frost, G.A. Lamberti, Variable toxicity of ionic liquid-forming chemicals to *Lemna minor* and the influence of dissolved organic matter, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 676–681.
- [21] B. Zhang, X. Li, D. Chen, J. Wang, Effects of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide on the antioxidant system of *Lemna minor*, *Protoplasma*, 250 (2013) 103–110.
- [22] A.S. Wells, V.T. Coombe, On the Freshwater Ecotoxicity and Biodegradation Properties of Some Common Ionic Liquids, *Org. Process Res. Dev.* 10 (2006) 794–798.
- [23] C. Pretti, C. Chiappe, D. Pieraccini, M. Gregori, F. Abramo, G. Monni, L. Intorre, Acute toxicity of ionic liquids to the zebrafish (*Danio rerio*), *Green Chem.* 8 (2006) 238–240.
- [24] X.-Y. Li, J. Zhou, M. Yu, J.-J. Wang, Y. C. Pei, Toxic effects of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on the early embryonic development of the frog *Rana nigromaculata*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (2009) 552–556.
- [25] P. Luis, A. Garea, A. Irabien, Quantitative structure–activity relationships (QSARs) to estimate ionic liquids ecotoxicity EC50 (*Vibrio fischeri*), *J. Mol. Liq.* 152 (2010) 28–33.
- [26] A.-M. Lacrămă, M.V. Putz, V. Ostafe, A spectral-SAR model for the anionic-cationic interaction in ionic liquids: application to *Vibrio fischeri* ecotoxicity, *Int. J. Mol. Sci.* 8 (2007) 842–863.
- [27] M. Ismail Hossain, B.B. Samir, M. El-Harbawi, A.N. Masri, M.I. Abdul Mutalib, G. Hefter, C.-Y. Yin, Development of a novel mathematical model using a group contribution method for prediction of ionic liquid toxicities, *Chemosphere* 85 (2011) 990–994.

- [28] D.J. Couling, R.J. Bernot, K.M. Docherty, J.K. Dixon, E.J. Maginn, Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure-property relationship modeling, *Green Chem.* 8 (2006) 82–90.
- [29] S. Bruzzone, C. Chiappe, S.E. Focardi, C. Pretti, M. Renzi, Theoretical descriptor for the correlation of aquatic toxicity of ionic liquids by quantitative structure–toxicity relationships, *Chem. Eng. J.* 175 (2011) 17–23.
- [30] A. Fuentes, M. Lloréns, J. Sáez, M.I. Aguilar, A.B. Pérez-Marín, J.F. Ortuño, V.F. Meseguer, Ecotoxicity, phytotoxicity and extractability of heavy metals from different stabilised sewage sludges, *Environ. Pollut.* 143 (2006) 355–360.
- [31] K.L.E. Kaiser, V.S. Palabrica, Photobacterium phosphoreum toxicity data index, *Water Qual. Res. J. Canada* 26 (1991) 361–431.
- [32] ISO 11348-3. Water quality. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Part 3: Method using freeze-dried bacteria. Geneva, 2007.
- [33] S. Parvez, C. Venkataraman, S. Mukherji, A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environ. Int.* 32 (2006) 265–268.
- [34] S. Viboud, N. Papaiconomou, A. Cortesi, G. Chatel, M. Draye, D. Fontvieille, Correlating the structure and composition of ionic liquids with their toxicity on *Vibrio fischeri*: A systematic study, *J. Hazard. Mater.* 215–216 (2012) 40–48.
- [35] J.S. Torrecilla, J. Palomar, J. Lemus, F. Rodriguez, A quantum-chemical-based guide to analyze/quantify the cytotoxicity of ionic liquids, *Green Chem.* 12 (2010) 123–134.
- [36] J. Arning, S. Stolte, A. Bösch, F. Stock, W.-R. Pitner, U. Welz-Biermann, B. Jastorff, J. Ranke, Qualitative and quantitative structure activity relationships for the inhibitory effects of cationic head groups, functionalised side chains and anions of ionic liquids on acetylcholinesterase, *Green Chem.* 10 (2008) 47–58.
- [37] I.M. Gindri, D.A. Siddiqui, P. Bhardwaj, L.C. Rodriguez, K.L. Palmer, C.P. Frizzo, M.A.P. Martins, D.C. Rodrigues, Dicationic imidazolium-based ionic liquids: a new strategy for non-toxic and antimicrobial materials, *RSC Adv.* 4 (2014) 62594–62602.
- [38] F.A. e Silva, F. Siopa, B.F.H.T. Figueiredo, A.M.M. Gonçalves, J.L. Pereira, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, C.A.M. Afonso, S.P.M. Ventura, Sustainable design for environment-friendly mono and dicationic cholinium-based ionic liquids, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108 (2014) 302–310.
- [39] M.G. Montalbán, M. Collado-González, R. Trigo, F.G. Díaz Baños, G. Villora, Experimental Measurements of Octanol-Water Partition Coefficients of Ionic Liquids, *J. Adv. Chem. Eng.* 5:133 (2015) 1-9.
- [40] <http://www.molinspiration.com/services/logp.html>, (consultado en 2015).

7. Evaluación de la toxicidad de líquidos iónicos dicatiónicos mediante inhibición de *Vibrio fischeri*

[41] <http://www.chemicalize.org/>, (consultado en 2015).

8

Obtención de nanopartículas de fibroína de seda empleando líquidos iónicos y ultrasonidos de elevada potencia

*“Las ciencias aplicadas no existen,
solo las aplicaciones de las ciencias”*

Louis Pasteur (1822-1895)

8. OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE FIBROÍNA DE SEDA EMPLEANDO LÍQUIDOS IÓNICOS Y ULTRASONIDOS DE ELEVADA POTENCIA

8.1. INTRODUCCIÓN

La seda es un interesante biomaterial en aplicaciones como la ingeniería biomédica y de tejidos debido a su excelente biocompatibilidad y propiedades mecánicas [1]. La fibroína de seda que se obtiene de los capullos del gusano de seda de la raza *Bombyx mori* presenta una combinación única de propiedades mecánicas y biológicas además de su no-toxicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad. Este biomaterial, formulado como partículas, puede ser empleado en una gran cantidad de aplicaciones médicas por su capacidad de adsorción, transporte y liberación de un amplio conjunto de moléculas bioactivas [2]. Las sedas son insolubles en la mayoría de los disolventes incluyendo el agua, los ácidos diluidos y las bases. La gran estabilidad de los biomateriales de seda se atribuye a sus enlaces por puentes de hidrógeno, la naturaleza hidrofóbica de la mayor parte de la proteína y un elevado grado de cristalinidad [3].

Tradicionalmente, se han empleado dos sistemas de disolventes para disolver la fibra de seda tras el desgomado: disoluciones acuosas iónicas, como una disolución 9.3 M de LiBr o una disolución al 50 %wt CaCl₂ [4], y disoluciones hidroalcohólicas iónicas, como la mezcla CaCl₂/etanol/agua (reactivo de Ajisawa) [5]. Con ambos tipos de disolventes se requiere una exhaustiva diálisis en agua desionizada para eliminar los iones presentes en el medio antes de concentrar la seda al nivel deseado. Sin embargo, ambos procesos, diálisis y concentración, son lentos y las disoluciones que se obtienen son inestables, con un período de vida media corto antes de que tiendan a gelificar. Sin un tratamiento posterior, las fibras [6,7] y las películas [8] producidos a partir de estas disoluciones acuosas de fibroína de seda regenerada son, por lo general, frágiles. Como alternativa, cuando se desea un almacenaje de la fibroína a largo plazo, las disoluciones acuosas de fibroína de seda pueden ser liofilizadas y redisueltas en disolventes orgánicos como el 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP). Sin embargo, estos disolventes son tóxicos y extremadamente corrosivos por lo que requieren especial cuidado en su manipulación [9].

La degradación de las moléculas de fibroína por la disolución a elevada temperatura en sistemas salinos inorgánicos es el origen de las pobres propiedades mecánicas de los biomateriales basados en fibroína de seda [10, 11]. En la bibliografía se encuentran referencias en las que la seda ha sido disuelta en líquidos iónicos, como el cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim⁺][Cl⁻]), para formar disoluciones estables de fibroína de seda [12-16]. La solubilidad de la fibroína de seda en los líquidos iónicos se debe a la capacidad del anión (principalmente halógenos o pequeños carboxilatos) para romper los enlaces por puente de hidrógeno en las láminas β de la fibroína de seda [17]. La ventaja más importante de usar líquidos iónicos como disolventes consiste en la reducción del número total de etapas requeridas en el proceso de disolución ya que el capullo puede ser disuelto directamente en el líquido iónico seleccionado.

El uso de líquidos iónicos para disolver la seda es una opción mucho más “verde” que el uso de HFIP, un disolvente volátil, corrosivo y tóxico, ya que este conlleva una contaminación innecesaria. [18]. Sin embargo, la disolución total de las proteínas de

8. Obtención de nanopartículas de fibroína de seda empleando ILs y ultrasonidos

seda empleando los métodos descritos más arriba tardaría varias horas incluso con un severo calentamiento a 100 °C [12], lo que conllevaría la pérdida de la integridad de la proteína. Los tratamientos largos provocan la ruptura de las cadenas peptídicas y propiedades mecánicas pobres en los biomateriales resultantes. La disolución seda-líquido iónico es altamente viscosa y dicha viscosidad aumenta con la concentración de proteína lo cual puede constituir un problema a la hora de escalar el proceso a la industria. Por este motivo, el proceso de disolución de la seda se ha mejorado aplicando ultrasonidos de alta potencia a la mezcla seda-líquido iónico para acelerar el proceso evitando períodos largos de calentamiento y añadiendo agua para reducir la viscosidad.

La energía de ultrasonidos de alta potencia presenta dos importantes efectos sinérgicos en la mezcla: calentamiento rápido y ruptura eficaz de las fibras al mismo tiempo. La ultrasonicación aumenta rápidamente la temperatura del líquido iónico y ayuda a introducirlo en las cohesionadas hebras de fibroína de seda rompiendo los enlaces por puente de hidrógeno hasta su completa disolución. Los líquidos iónicos también han sido empleados para disolver otros biopolímeros como la celulosa. Por ejemplo, Swatlosky *et al.* [19] publicaron que el método utilizado para preparar la disolución afecta sustancialmente a la solubilidad. Concretamente, estos autores emplearon energía microondas para calentar la mezcla [bmim⁺][Cl⁻]/celulosa al 25% (w/w) de celulosa y compararon los resultados con los obtenidos para una disolución al 10% (w/w) de celulosa calentada en un baño de aceite a 100 °C. Sin embargo, el pico de temperatura alcanzado durante el proceso de disolución con microondas no fue reportado ni los autores analizaron el grado de degradación de la celulosa. También pueden prepararse novedosos materiales compuestos mezclando distintas disoluciones en líquidos iónicos de polímeros como la celulosa, el acetato de polivinilo (PVA) o el poliuretano con la fibroína de seda [20].

La energía de ultrasonidos también se ha empleado para disolver celulosa en líquidos iónicos siendo capaz de mejorar el proceso de disolución de biopolímeros insolubles en agua con un elevado número de enlaces por puentes de hidrógeno [21]. Hasta la fecha, los ultrasonidos solo han sido aplicados a disoluciones acuosas de fibroína de seda con el objetivo de provocar la gelificación del biopolímero [9]. Aunque la fibroína de seda disuelta en líquidos iónicos ha sido regenerada en películas, esponjas y fibras [12-15], la coagulación de partículas a partir de fibroína de seda disuelta en líquido iónico no ha sido aún reportada.

Aplicando el método de precipitación comúnmente usado para la coagulación de una disolución acuosa de fibroína de seda en un disolvente orgánico miscible en agua, es posible obtener partículas de fibroína de seda regenerada [22]. Estudios anteriores sugieren que las películas de seda obtenidas a partir de una disolución en líquido iónico no afectan a la viabilidad celular, la diferenciación o la expresión génica y que el uso de los líquidos iónicos como disolventes para la disolución de la fibroína proporciona una vía para la fabricación de estructuras tridimensionales (*scaffolds*) de fibroína de seda para aplicaciones en ingeniería de tejidos [14]. Por tanto, las nanopartículas de fibroína de seda regenerada obtenidas a partir de la coagulación de la disolución fibroína de seda-líquido iónico en metanol tampoco deberían mostrar efecto negativo alguno sobre la viabilidad celular aunque serían necesarios más ensayos para confirmar esta teoría.

La primera parte de este estudio está dedicada a la comparación de los procesos clásicos de disolución de la seda utilizando un baño de aceite como fuente de energía con el proceso de disolución con ultrasonidos de elevada potencia y a la caracterización de las muestras fibroína de seda-líquido iónico. La integridad de la fibroína de seda es preservada durante el proceso de disolución tal y como se confirmó mediante electroforesis con dodecilsulfato de sodio-gel de poliacrilamida (*sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) de la disolución seda-líquido iónico y HPLC/MS de las bandas seleccionadas. La segunda parte está dirigida a la preparación de nanopartículas de fibroína de seda directamente a partir de la disolución fibroína de seda-líquido iónico por desolvatación rápida en disolventes orgánicos polares. Estas nuevas nanopartículas de fibroína de seda son insolubles en agua y en otros disolventes orgánicos comunes y son idénticas a las clásicas en cuanto a su diámetro, potencial zeta, alto contenido de lámina β y baja citotoxicidad. Además, los líquidos iónicos pueden ser recuperados de la disolución coagulante a vacío y reutilizados sin pérdida de sus propiedades como disolventes.

8.2. MATERIALES Y MÉTODOS

8.2.1. Materiales

Los capullos de seda blancos han sido obtenidos a partir de gusanos de seda de la raza *Bombyx Mori* los cuales han sido criados en las instalaciones de sericultura del IMIDA (Murcia, España) donde se han alimentado con una dieta de hojas frescas naturales de *Morus alba L.* La larva intacta se extrajo de los capullos entre 2 y 7 días después de la formación del capullo, abriendo los mismos mediante un corte. Este método evita la posible contaminación y la degradación térmica de los procesos industriales en los que hierven la larva en el capullo. Para los ensayos de solubilidad se utilizó seda desgomada. Brevemente, lo que se hizo fue hervir los capullos de seda blanca dos veces en una disolución acuosa 0.05 M de Na_2CO_3 durante 45 minutos. A continuación, la fibroína de seda fue enjuagada varias veces con agua ultrapura y secada al aire antes de utilizarla. En los experimentos de disolución de la seda con ultrasonidos, tanto de los capullos como de la fibroína, se obtuvieron pequeñas porciones (~100 mg) que se añadieron a los líquidos iónicos. Todos los líquidos iónicos (97% pureza) fueron suministrados por IoliTec GmbH (Alemania) y fueron usados sin purificación adicional. El agua empleada en los ensayos ha sido agua purificada (18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ a 25 °C; de un sistema de agua ultrapura Millipore Direct-Q1, Billerica, MA). El resto de compuestos y disolventes fueron de pureza analítica y se usaron sin purificación posterior.

8.2.2. Ensayos de solubilidad de la fibroína de seda en líquidos iónicos mediante energía térmica

Para evaluar la solubilidad de la fibroína de seda se realizaron experimentos de disolución en un vaso de precipitados. La proteína se añadió lentamente al líquido iónico fundido bajo agitación mientras que la temperatura de la mezcla se mantuvo a 90 °C con un baño de aceite con controlador de temperatura. Las disoluciones seda-líquido iónico presentaron un color ámbar, sin turbidez y, por encima del 10% (w/w) fueron bastante viscosas.

8.2.3. Disolución de proteínas de seda en líquidos iónicos mediante ultrasonificación

Pequeños fragmentos de ~100 mg de capullo o fibroína se añadieron secuencialmente a 5 g de líquido iónico fundido en un vaso resistente a altas temperaturas y ultrasonidos. Tras cada adición, la mezcla se trata con un Sonicador Branson 450D (Emmerson Ultrasonic Corporation, Dansbury, USA) que emite ultrasonidos a pulsos alternantes al 30% de amplitud con un vástago de 3/8" y un controlador de temperatura a 100 °C (ver Figura A8.1, del Anexo al Capítulo 8), hasta su completa disolución. La disolución completa de las fibras se ha confirmado mediante microscopía, empleando un microscopio Nikon Eclipse 50i (equipado con una cámara CCD DS-Fi1) y el software NIS-Elements Ver. 2.0.

8.2.4. Caracterización de las disoluciones fibroína de seda-líquido iónico

La integridad de la proteína de seda en las disoluciones fibroína de seda-líquido iónico se ha confirmado mediante SDS-PAGE, una consiguiente digestión con tripsina y la indentificación por HPLC-MS de los fragmentos de la proteína en las bandas seleccionadas. La SDS-PAGE se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo de Laemmli, con un gradiente del gel de acrilamida del 4-20% (Amersham GE-HC) [23]. El dispositivo experimental empleado fue una cámara de electroforesis Gel-Box horizontal (Amersham GE-HC). Después de la electroforesis, los geles fueron tintados con 0.25% Coomassie Brilliant Blue (Acros Organics, Belgium) y se cargaron dos marcadores de peso molecular: ColorBurst™ Electrophoresis Marker (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO) y BenchMark™ protein ladder (Invitrogen). Las concentraciones de proteína en las muestras fueron unificadas a 50 µg por calle, diluyendo las distintas disoluciones de fibroína de seda-líquido iónico con agua Milli-Q. Las muestras fueron cargadas desnaturalizadas mediante la adición de β-mercaptoetanol (10% v/v) al tampón de carga y calentando a 100 °C durante 5 min inmediatamente antes de la electroforesis.

A continuación, las bandas de gel seleccionadas se cortaron y se sometieron a digestión con Trypsin Gold (Promega), siguiendo el protocolo del proveedor para análisis de espectrometría de masas. Se empleó el Software Proteome Discoverer Ver. 1.3 y se buscó en el Banco de Datos SwissProt [24]; la tolerancia resultó ser de ±1.5 Da para precursores y ±0.8 Da para fragmentos. Se estableció un filtro para FDR $p < 0.01$ y al menos dos péptidos únicos por proteína.

8.2.5. Síntesis de nanopartículas de fibroína de seda

La **Figura 8.1** resume el proceso global de preparación de nanopartículas a partir de disoluciones fibroína de seda-líquido iónico. La preparación de nanopartículas se ha basado en el método descrito por Zhang *et al.*, con modificaciones [22].

8. Obtención de nanopartículas de fibroína de seda empleando ILs y ultrasonidos

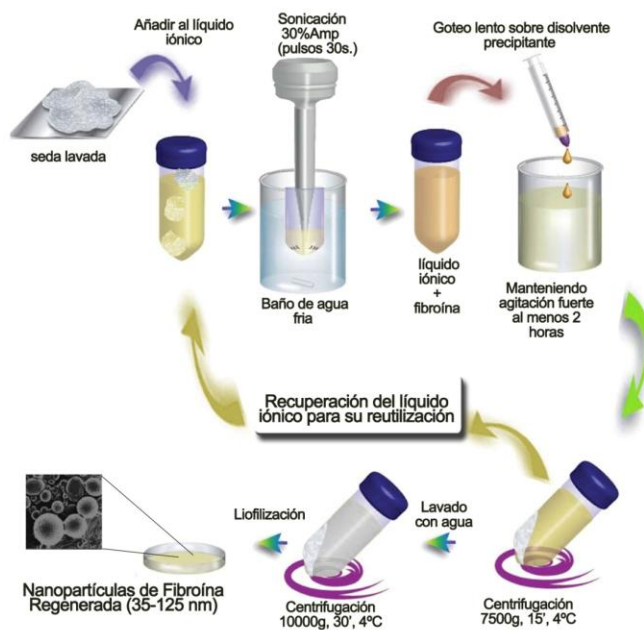


Figura 8.1. Esquema del proceso global de disolución de fibroína de seda empleando líquidos iónicos y ultrasonidos y la consiguiente preparación de nanopartículas de fibroína de seda a partir de disoluciones seda-líquido iónico.

Brevemente, a la disolución de fibroína de seda-líquido iónico recién preparada se le añade agua ultrapura (MilliQ, $18.2 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}$) lentamente para reducir la viscosidad. Después de calentar a $\sim 45 \text{ }^\circ\text{C}$, la disolución se añade (~ 1 gota cada 2 s) sobre 100 mL de metanol frío en vigorosa agitación. Se observa una suspensión lechosa después de unas gotas y se deja que alcance la temperatura ambiente en agitación durante 2 horas. A continuación, la suspensión de partículas se transfiere a tubos de centrífuga y se centrifuga a $18.000g$ durante 15 minutos, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (Centrífuga Eppendorf 5810R equipada con un rotor F-34-6-38).

Seguidamente, el sobrenadante (libre de partículas) se decanta, se filtra con un filtro de PTFE desechable de $0.22 \mu\text{m}$ y se reserva para el reciclado posterior del líquido iónico. Se añade una cantidad igual de metanol fresco, se resuspende el precipitado blanco mediante agitación vigorosa en *vórtex* durante 2 minutos y se repite la centrifugación en las mismas condiciones. Se efectúan varios lavados al precipitado blanco con agua ultrapura en una relación 20:1 (agua/fibroína de seda) hasta que no aparece precipitado de AgCl tras añadir 0.1 N AgNO_3 al agua de lavado después de centrifugarla. Las partículas se liofilizaron en un liofilizador Edwards Modulo 4K durante 72 h, a $-55 \text{ }^\circ\text{C}$ y 0.5 mbar , y la fibroína de seda regenerada se obtuvo como partículas secas liofilizadas. Las fracciones metanólicas se mezclaron y se procedió a recuperar el líquido iónico mediante la eliminación de la mezcla metanol/agua en un rotavapor a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ y 80 mbar . Los líquidos iónicos recuperados se mantuvieron en un desecador en presencia de pentóxido de fósforo hasta su reutilización.

8.2.6. Caracterización de las partículas de seda

Las partículas se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM), dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering, DLS) y espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (Infrared Spectroscopy, FTIR). La observación morfológica fue realizada mediante un SEM (JEOL-JSM-6100; JEOL-Japan). Una gota de la suspensión de nanopartículas se fijó a un soporte de aluminio, fue recubierta con oro (a vacío, con un fino recubridor automático) y se observó a distintos aumentos. El tamaño medio, la distribución de tamaños y el potencial zeta se obtuvieron con un instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS. Todas las medidas se realizaron en agua purificada a 25°C o en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) sin ser suplementado con suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum, FBS) a 37°C. El Z-average y la polidispersidad se obtuvieron con el software proporcionado por la casa comercial. Tanto el Z-average como el potencial zeta fueron medidos por quintuplicado. El espectro de infrarrojo del líquido iónico puro, de las nanopartículas obtenidas a partir de disoluciones fibroína de seda-líquido iónico y de las nanopartículas obtenidas con el sistema disolvente de Ajisawa [22] se obtuvieron con un espectrómetro FTIR Perkin-Elmer Spectrum 100 Series (Norwalk, CT, USA) controlado con el Software Spectrum Ver. 6.1.0.0038. Aproximadamente 2 mg de muestra se mezclaron con ~198 mg of KBr (Sigma-Aldrich), y se machacaron con un mortero hasta obtener un polvo fino que fue comprimido hasta obtener una pastilla (Perkin Elmer 15.011, USA). Cada espectro fue adquirido en modo de transmitancia (10 scans) con una resolución de 4.0 cm⁻¹ y un rango espectral de 4000-500 cm⁻¹. El análisis finalmente se centró en el rango de 2000-500 cm⁻¹, al constituir la parte más informativa del espectro de la fibroína de seda.

8.2.7. Ensayos de viabilidad celular/citotoxicidad

Para los estudios con cultivo celular se han empleado fibroblastos de ratón (línea celular L929) ya que estos fibroblastos se caracterizan por ser muy estables, por un crecimiento rápido y por ser comúnmente utilizados en los experimentos de citotoxicidad. Los fibroblastos se sembraron en placas de cultivo de 48 pocillos con una densidad celular de 3.0·10⁴ células/pocillo. Después de 24 h, se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por medio de cultivo nuevo el cual contenía nanopartículas de fibroína de seda obtenidas con una disolución fibroína de seda-líquido iónico coagulada en metanol. También se realizaron ensayos con nanopartículas de fibroína de seda clásicas obtenidas con el método de Zhang [22] y se emplearon como controles pocillos con medio de cultivo sin nanopartículas. El medio de cultivo empleado fue Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL), a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 7.5%.

Para evaluar la citotoxicidad se empleó el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio). Los fibroblastos de ratón de la línea L929 fueron sembrados a una densidad celular de 3.0·10⁴ células/pocillo en placas de cultivo de 48 pocillos a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 7.5%. Después de 24 horas, se retira el medio de cultivo de los pocillos y se reemplazó por las suspensiones de nanopartículas en medio de cultivo fresco a las concentraciones seleccionadas (100 y 200 µg/mL). Para analizar la citotoxicidad se emplearon nanopartículas de fibroína de seda preparadas con el nuevo método de disolución de la seda en distintos líquidos

iónicos además de las obtenidas por el método clásico. A las 24 horas, el medio se retiró y se añadieron a cada pocillo 500 μL de la disolución de MTT (Sigma, St. Louis, MO) (1 mg/mL en DMEM sin rojo fenol). A continuación, la placa se incubó durante 4 h a 37°C y a 7.5% CO_2 . Una vez transcurrido este tiempo, se retiró la disolución de MTT y se solubilizaron los cristales de formazano con 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) por pocillo, agitando vigorosamente la placa durante 5 min para disolver el colorante. La absorbancia de cada pocillo se midió con un lector de placas (BMG Fluostar Galaxy) a 570 nm; la longitud de onda de referencia fue 690 nm. Los datos se han presentado como la media \pm SD (desviación estándar), calculados a partir de cinco muestras por condición. Se comprobó que las ditribuciones cumplen los valores de normalidad (Kolmogorov-Smirnov, $p>0.05$) y homogeneidad de la varianza u homocedasticidad (Levene, $p>0.05$) y se determinó la significación estadística empleando los tests paramétricos Tukey ($p<0.05$) y ANOVA ($p<0.05$).

8.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.3.1. Ensayos de solubilidad de fibroína de seda en líquidos iónicos

La disolución de fibroína de seda de gusano de la raza *Bombyx mori* en líquidos iónicos se ha llevado a cabo empleando un baño de aceite como fuente de energía. La **Tabla 8.1** resume los resultados obtenidos. La disolución de las muestras de fibroína de seda se ha confirmado por observación de la disolución de la fibra en un microscopio óptico. La disolución completa duró 1 h aproximadamente a 90°C , tal y como describieron Phillips *et al.* [12]. La **Tabla 8.1** muestra que las solubilidades saturadas en peso de la fibroína de seda en cloruros de 1-alkil-3-metilimidazolio dependen de la longitud del sustituyente alquílico del anillo imidazolio. De todos los cloruros, el [emim⁺][Cl⁻] es el que mostró la mayor capacidad como disolvente alcanzando el 25% (w/w). Estos resultados se encuentran en concordancia con los descritos previamente en la bibliografía [12].

Tabla 8.1

Solubilidad (% wt) de fibroína de seda en líquidos iónicos a 90°C (calentados en un baño de aceite)

Líquido iónico	Solubilidad Fibroína (wt%)	Líquido iónico	Solubilidad Fibroína (wt%)
[mim ⁺][Cl ⁻]	S(>12%)	[eim ⁺][Cl ⁻]	Is
[emim ⁺][Cl ⁻]	S(>23%)	[emim ⁺]EtSO ₄ ⁻	Is
[pmim ⁺][Cl ⁻]	S(>15%)	[emim ⁺]TfO ⁻	Is
[bmim ⁺][Cl ⁻]	S(>12%)	[bmim ⁺]OctSO ₄ ⁻	Is
[hmim ⁺][Cl ⁻]	S(>11%)	[bBmim ⁺]PF ₆ ⁻	Is
[omim ⁺][Cl ⁻]	Is	[3-MEP ⁺]EtSO ₄ ⁻	Is
[dmim ⁺][Cl ⁻]	Is	ETAN	Is

Is - Insoluble después de 24 h a 90°C ; S – Soluble

Los resultados confirmaron que los cloruros de 1-alkil-3-metilimidazolio actúan como buenos disolventes de la fibroína de seda cuando la longitud de la cadena alquílica es menor de ocho carbonos [12]. La ruptura de los enlaces por puente de hidrógeno requiere una polaridad media-alta y las cadenas más largas aumentan la hidrofobicidad del catión orgánico por lo que los líquidos iónicos con sustituyentes alquílicos de cadena larga en el catión no pueden disolver la fibroína de seda. De la misma forma, cuando los líquidos iónicos poseen aniones muy hidrofóbicos tampoco son capaces de disolver la fibroína de seda.

8.3.2. Disolución de proteínas de seda con ultrasonidos de alta potencia

Para evaluar el efecto de la energía de ultrasonidos en las fibras de seda se seleccionaron aquellos líquidos iónicos con mayor habilidad para disolver la fibroína de seda. Así, las proteínas de seda se disolvieron con éxito en los cloruros de 1-alkuil-3-metilimidazolio (donde 1-*alkuil* es: *metil* [mim⁺][Cl⁻]; *etil* [emim⁺][Cl⁻]; *propil* [pmim⁺][Cl⁻]; *butil* [bmim⁺][Cl⁻] o *hexil* [hmim⁺][Cl⁻]), empleando ultrasonidos a pulsos para calentar eficientemente la disolución y lograr una ruptura rápida de las fibras. En la **Tabla 8.2** se muestra la solubilidad de saturación en peso y el tiempo requerido para disolver la seda en los líquidos iónicos seleccionados.

Tabla 8.2.

Solubilidad y tiempo requerido para disolver las proteínas de seda en los líquidos iónicos seleccionados.

Disolvente	<i>Fibroína de seda</i>		<i>Capullo</i>	
	Solubilidad (%wt)	Tiempo (min.)	Solubilidad (%wt)	Tiempo (min.)
[mim ⁺][Cl ⁻]	12.5 ± 0.1	4	12.5 ± 0.1	17
[emim ⁺][Cl ⁻]	23.0 ± 0.3	17	18.7 ± 0.6	67
[pmim ⁺][Cl ⁻]	15.2 ± 0.3	14	17.6 ± 0.1	27
[bmim ⁺][Cl ⁻]	12.7 ± 0.6	5	12.9 ± 0.4	24
[hmim ⁺][Cl ⁻]	10.9 ± 0.2	8	11.1 ± 0.3	20

La solubilidad se presenta como el valor medio ± SD (desviación estándar) de tres ensayos independientes.

Mientras que los métodos de calentamiento clásico necesitan horas para completar el proceso de disolución, con la aplicación de ultrasonidos a la mezcla se logra una reducción significativa del tiempo necesario para completar el proceso de disolución de la fibroína de seda en líquidos iónicos a menos de 100 °C. La habilidad de los líquidos iónicos para disolver la fibroína depende de su capacidad para romper los puentes de hidrógeno de las láminas β y esta aumentó con los ultrasonidos. Aquellos líquidos iónicos de mayor viscosidad tardaron más en alcanzar la saturación (ver Anexo al Capítulo 8). Después de su reciclado, los líquidos iónicos pueden emplearse sin pérdida de sus propiedades como disolventes en, al menos, cuatro ciclos sucesivos (ver detalles en Anexo al Capítulo 8).

Aunque la solubilidad de la fibroína de seda fue más elevada en el [emim⁺][Cl⁻], para la formación de partículas no es necesario alcanzar una concentración mayor del 10% (w/w), ya que el aumento de la viscosidad representa una dificultad en la manipulación de la disolución. Para la obtención de nanopartículas, se prepararon disoluciones fibroína de seda-líquido iónico al 10% (w/w) siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

8.3.3. Caracterización de las disoluciones fibroína de seda-líquido iónico

Los experimentos SDS-PAGE mostraron que tiempos de disolución de la proteína más cortos a altas temperaturas evitan un elevado grado de fragmentación de las cadenas peptídicas que sí tienen lugar con los métodos de disolución tradicionales. Como se observa en la **Figura 8.2**, las masas moleculares de los fragmentos de fibroína de seda presentes en las disoluciones en líquido iónico son casi idénticas a las que están presentes en la glándula del gusano de seda [25].

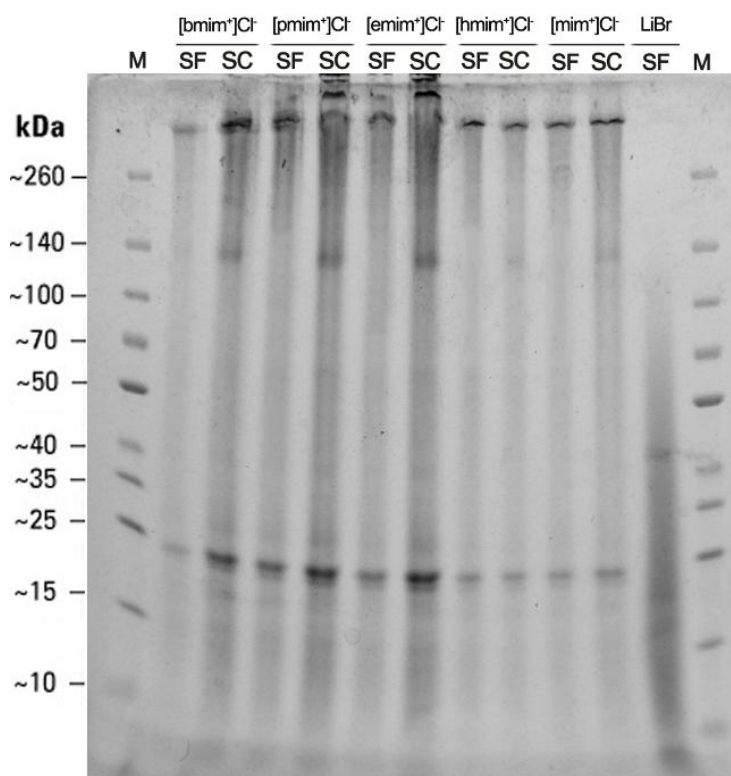


Figura 8.2. Análisis SDS-PAGE de los componentes proteicos de la fibroína de seda (SF) y del capullo de seda (SC) después de la aplicación de energía de ultrasonidos para la disolución en los líquidos iónicos seleccionados: [bmim⁺][Cl⁻], [pmim⁺][Cl⁻], [emim⁺][Cl⁻], [hmim⁺][Cl⁻] and [mim⁺][Cl⁻]. Calle M: *Spectra Multicolor Protein Ladder* 10-260 KDa (Thermo), (gradiente 4-20% Gel Amersham GE-HC).

La distribución de péptidos en el gel de poliacrilamida muestra unas bandas discretas en las muestras de fibroína disuelta que han sido identificadas mediante HPLC/MS (ver Anexo al Capítulo 8) como la cadena pesada (390.1 KDa) y la ligera (27.7 KDa) de la fibroína de seda así como la fibrohexamerina P25 (25.1KDa) de la fibroína. En el caso de las disoluciones de proteína de seda a partir del capullo completo con líquidos iónicos y ultrasonidos aparecieron las tres mencionadas anteriormente más las cadenas peptídicas de la sericina 1 (119.1 KDa) [26]. La cadena pesada de la fibroína de seda está compuesta por 5263 residuos aminoácidos y es muy sensible al tratamiento térmico y a la composición del sistema disolvente [11]. En la **Figura 8.2** (Calle LiBr SF) se muestra que los métodos clásicos de disolución de la fibroína en disoluciones salinas hidroalcohólicas presentan un SDS-PAGE con una franja continua de fragmentos de múltiples tamaños en contraste con el nuevo método de disolución con tiempos cortos que conserva la integridad de las proteínas [11].

8.3.4. Preparación de nanopartículas de fibroína de seda

El esquema de la **Figura 8.1** resume el proceso global de preparación de nanopartículas a partir de disoluciones fibroína de seda-líquido iónico. Cuando una disolución de este tipo es añadida de forma rápida a un disolvente orgánico polar en exceso como es el metanol, el etanol o la acetona, se forma inmediatamente una suspensión de aspecto lechoso de proteína de seda. Por tanto, la regeneración de la fibroína de seda en forma

de nanopartículas se produce al verter la disolución fibroína de seda-líquido iónico sobre un exceso de metanol. Lo que realmente ocurre es que el disolvente orgánico disuelve el líquido iónico y las cadenas proteicas son capaces de reconstituir la red de enlaces por puente de hidrógeno y transformar la estructura *random coil* en una estructura perfectamente ordenada en láminas β en las partículas [22]. La viscosidad de la mezcla es un factor muy importante en la formación de las nanopartículas. Cuanto más baja es la viscosidad de la disolución, más eficiente es la mezcla y más rápida es la desolvatación de las cadenas peptídicas dando lugar a una formación eficiente de nanopartículas cuando la viscosidad de la disolución es inferior a 0.5 Pa·s (ver Anexo al Capítulo 8). Con viscosidades mayores la mezcla del disolvente precipitante y de la disolución proteica no es total y, por tanto, se obtienen agregados de tamaño micrométrico o milimétrico.

La formación de nanopartículas de fibroína de seda tras la coagulación de las mezclas fibroína de seda-líquido iónico se consiguió de forma eficiente con un rendimiento en términos de recuperación de proteína después de la liofilización superior al 85%. Aproximadamente, el 15% en peso de nanopartículas se perdió en el proceso de lavado ya que las partículas más pequeñas necesitan una fuerza centrífuga mayor para sedimentar en agua. No obstante, el proceso de lavado es esencial para evitar que el líquido iónico quede retenido en las nanopartículas pudiendo afectar a las aplicaciones biomédicas de las mismas. Los análisis FTIR realizados a las nanopartículas descartaron la presencia de líquido iónico en ellas.

Una vez llevada a cabo la precipitación y la separación del disolvente coagulante por centrifugación y filtración a través de un filtro de PTFE de 0.22- μm para eliminar las partículas proteicas, los líquidos iónicos se recuperaron con elevados rendimientos (por encima del 98%) por rotoevaporación a vacío debido a su extremadamente baja presión de vapor [18]. Seguidamente, se comprobó la estabilidad de los líquidos iónicos mediante un análisis rutinario de NMR en metanol deuterado sin que se encontraran diferencias significativas con los líquidos iónicos comerciales (datos no mostrados). Los líquidos iónicos fueron reutilizados al menos en cuatro ciclos sin que disminuyeran sus propiedades disolventes (ver Anexo al Capítulo 8).

8.3.5. Caracterización de las nanopartículas de fibroína de seda

Mediante SEM se observó que las partículas de seda eran gránulos globulares de un tamaño bastante homogéneo (**Figura 8.3**). La estabilidad de las nanopartículas fue evaluada en agua MilliQ a 25° C y en medio de cultivo DMEM a 37° C. En agua MilliQ las partículas presentaron un tamaño medio de 170–184 nm (Zsizer ZS, Malvern) mientras que los resultados indicaron que en DMEM las partículas eran ligeramente más grandes (183–341 nm) (ver **Tabla 8.3**); estos valores son prácticamente idénticos a los descritos previamente en la bibliografía correspondiente [22, 28, 29].

8. Obtención de nanopartículas de fibroína de seda empleando ILs y ultrasonidos

Tabla 8.3

Valores comparativos del tamaño de partícula (diámetro), índice de polidispersidad (PdI) y potencial zeta (Zpot) de nanopartículas clásicas [22] obtenidas a partir de la mezcla de disolventes CaCl₂/EtOH/H₂O y de nanopartículas obtenidas con disoluciones fibroína de seda-líquido iónico.

Disolvente	Agua MilliQ a 25 °C			DMEM ^c (sin FBS) a 37 °C		
	Diámetro ^a (nm)	PdI ^b	Zpot ^a (mV)	Diámetro ^a (nm)	PdI ^b	Zpot ^a (mV)
CaCl ₂ /EtOH/H ₂ O	174 ± 2	0.121	-26.23± 0.59	183 ± 3	0.140	-12.02± 0.42
[mim ⁺][Cl ⁻]	177 ± 4	0.153	-27.15± 0.74	208 ± 4	0.115	-12.08± 1.50
[emim ⁺][Cl ⁻]	181 ± 3	0.230	-25.65± 0.90	341 ± 9	0.393	-12.00± 2.12
[pmim ⁺][Cl ⁻]	175 ± 4	0.129	-27.53± 0.66	211± 4	0.076	-12.22± 1.09
[bmim ⁺][Cl ⁻]	184 ± 5	0.212	-24.53± 1.42	235± 4	0.245	-12.24± 1.66
[hmim ⁺][Cl ⁻]	176 ± 3	0.140	-27.90± 0.82	200± 3	0.133	-11.28± 0.55

^a Z-average ± SD (n=5) y tiempos de acumulación=100. ^b Valor medio. ^c *Dulbecco's modified Eagle's medium*.

Los valores del índice de polidispersidad de las nanopartículas de fibroína de seda fueron similares en todos los casos lo que demuestra que las partículas presentaban una distribución monomodal. El rango de potencial zeta de las nanopartículas estuvo entre -25.6 y -27.9 mV en agua milliQ y entre -11.2 y -12.2 mV en DMEM (**Tabla 8.3**); los valores en DMEM fueron ligeramente inferiores debido al efecto salino de la disolución tampón y al efecto de apantallamiento de los componentes del suero [29]. Las partículas de fibroína de seda cargadas negativamente facilitan la interacción de las propias nanopartículas con las células cuya carga es positiva aumentando la velocidad y el grado de internalización lo cual sería útil para la liberación de fármaco.

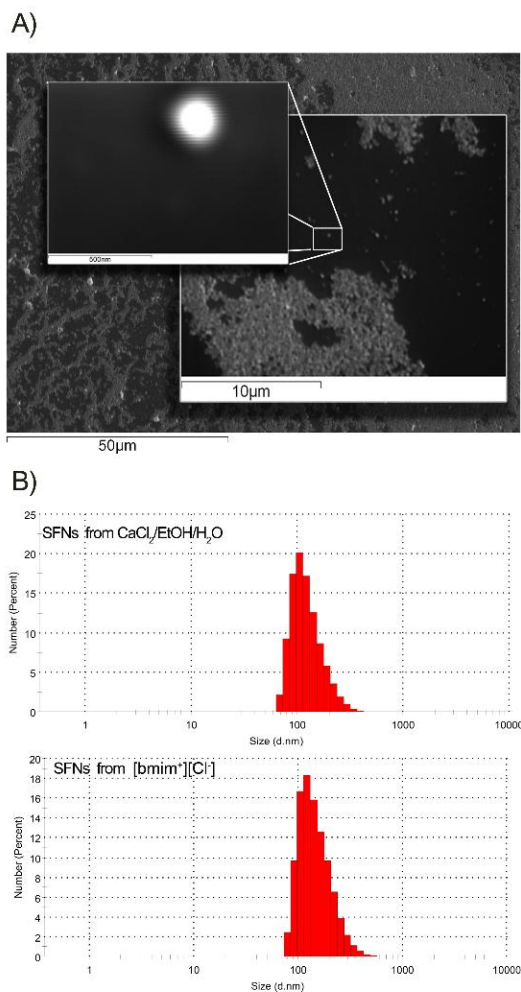


Figura 8.3. A) Secuencia de imágenes SEM de nanopartículas de fibroína de seda regenerada a partir de disoluciones fibroína de seda/[bmim⁺][Cl⁻] (Escala de las barras secuencial: 50 μm, 10 μm and 500 nm).

B) Comparación entre las distribuciones de tamaño de nanopartículas de fibroína de seda clásicas obtenidas con el sistema de disolventes de Ajisawa [22] y con disoluciones fibroína de seda/[bmim⁺][Cl⁻] (Malvern Zetasizer ZS).

En la **Figura 8.4** se muestra el espectro FTIR del [bmim⁺][Cl⁻] puro, de las nanopartículas de fibroína de seda obtenidas con una disolución en [bmim⁺][Cl⁻] y de las nanopartículas obtenidas según el método clásico de Zhang [22]. Ambos tipos de partículas mostraron que la estructura secundaria de la fibroína de seda era fundamentalmente en forma de láminas β con fuertes picos a 1626 cm⁻¹ (Amida I, C=O *Stretching*), 1516 cm⁻¹ (Amida II, N-H *Bending*) and 1230 cm⁻¹ (Amida III, C-H *Stretching*) los cuales son característicos de la estructura en lámina β de la seda Tipo II estable e insoluble [27]. El perfil de los picos fue similar al de las nanopartículas de fibroína de seda obtenidas por precipitación en metanol de fibroína de seda disuelta en sistema de disolventes de Ajisawa [22, 27]. En el espectro recogido para las nanopartículas de fibroína de seda obtenidas a partir de [bmim⁺][Cl⁻] no se encontraron las señales características del líquido iónico (1572, 1465 y 1170 cm⁻¹) lo que indica que el lavado de las nanopartículas fue suficientemente efectivo.

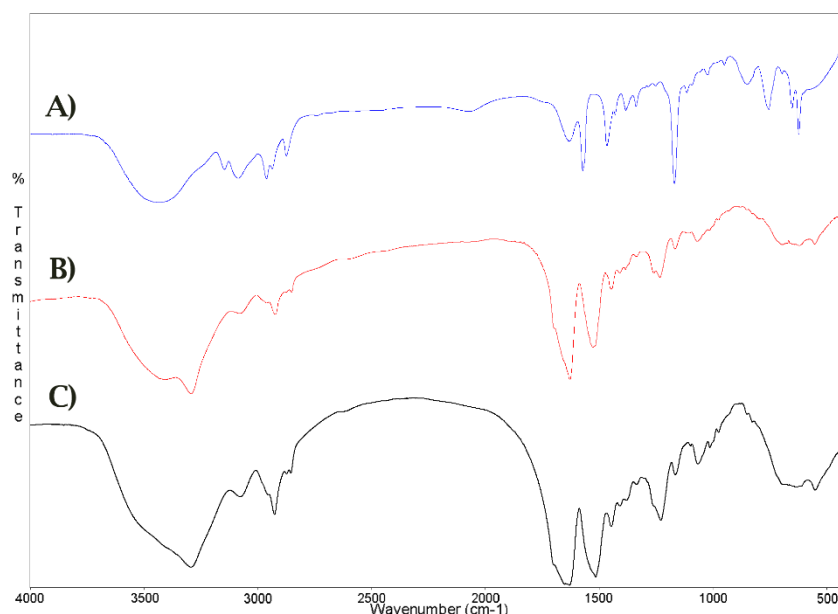


Figura 8.4. Espectro FTIR comparativo entre A) $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$ puro; B) Nanopartículas de fibroína de seda regenerada a partir de disoluciones fibroína de seda/ $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$; C) Nanopartículas de fibroína de seda regeneradas a partir de la mezcla clásica $\text{CaCl}_2/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ [22], medidos en un espectrómetro Perkin Elmer 100 Series.

8.3.6. Ensayos de viabilidad celular/citotoxicidad

Para estudiar el potencial citotóxico de las nanopartículas de fibroína de seda obtenidas a través de las distintas metodologías se han empleado ensayos MTT a dos concentraciones distintas (100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) basados en experimentos similares llevados a cabo por Kundu *et al.*[28].

El ensayo MTT se utiliza ampliamente para evaluar la toxicidad de biomateriales basándose en su actividad mitocondrial la cual afecta a la actividad metabólica y a la viabilidad celular [30, 31]. Para determinar la toxicidad de las recién sintetizadas nanopartículas de fibroína de seda se ha aplicado este ensayo a células fibroblastos de ratón de la línea L929 como ya se explicó con anterioridad. La viabilidad celular ha sido monitorizada mediante medidas de absorbancia en los ensayos de MTT y los valores de la absorbancia de los controles negativos (sin nanopartículas) se asumieron como el 100% de viabilidad después de 24 horas de incubación (**Figura 8.5**). No se encontraron diferencias significativas entre la viabilidad celular de los controles negativos y la de las células incubadas con nanopartículas a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tukey, $p > 0.05$), lo que significa que a esta concentración no se detectó citotoxicidad. Sin embargo, a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la viabilidad celular disminuyó significativamente en todos los tratamientos al comparar con los controles negativos correspondientes (Tukey, $p < 0.05$) y con la incubación a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para cada tipo de nanopartícula de fibroína de seda (ANOVA, $p < 0.05$). La viabilidad de las células incubadas con partículas a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estuvo entre el 50% y el 74%, como se muestra en la **Figura 8.5**. Se observó que cuando las células fueron expuestas a las nanopartículas obtenidas empleando $[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$ la viabilidad fue significativamente más baja que con el resto de tratamientos (Tukey, $p < 0.05$).

8. Obtención de nanopartículas de fibroína de seda empleando ILs y ultrasonidos

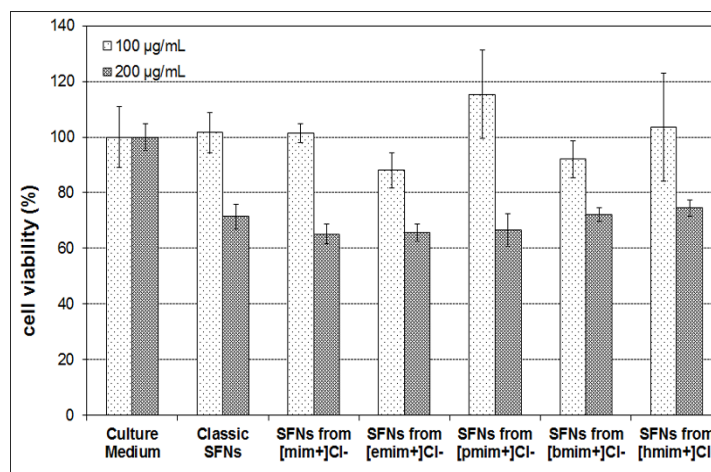


Figura 8.5. Viabilidad celular (%) de fibroblastos de ratón de la línea L929 después de 24 h de incubación con nanopartículas de fibroína de seda (las clásicas y las obtenidas con disoluciones fibroína de seda-líquido iónico) relativa al control de células sin nanopartículas determinada mediante el ensayo MTT (media \pm SD de n=6).

Nuestros resultados concuerdan con los resultados de viabilidad publicados por Kundu *et al.* [28], quienes estudiaron nanopartículas producidas mediante el método de Zhang [22], lo que confirma el potencial de nuestro nuevo procedimiento para producir nanopartículas de fibroína de seda para aplicaciones biomédicas.

8.4. CONCLUSIONES

Nuestra nueva metodología aporta la aplicación de ultrasonidos de elevada potencia a una mezcla de líquido iónico y fibroína de seda para mejorar la disolución de la proteína. De esta forma, las nanopartículas de fibroína de seda se pueden obtener fácilmente a partir de la mezcla usando simplemente el método de desolvatación con disolventes orgánicos polares. Las micro- y nanopartículas de fibroína de seda regenerada obtenidas muestran un contenido de lámina β similar al de las hebras de fibroína y casi idéntico al de las nanopartículas de fibroína de seda previamente descritas en la bibliografía. Después de la desolvatación, los líquidos iónicos se pueden recuperar eficientemente a vacío y se pueden reutilizar sin pérdidas de sus propiedades solventes lo que mejora considerablemente la eficacia global del proceso. De este modo, grandes cantidades de seda pueden transformarse en biomateriales directamente a partir de fibroína de seda disuelta en líquido iónico y ser empleados en una amplia gama de aplicaciones.

8.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] F.G. Omenetto, D.L. Kaplan, New opportunities for an ancient material, *Science* 329 (2010) 528–531.
- [2] S. Hofmann, C. Foo, F. Rossetti, M. Textor, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, H. P. Merkle, L. Meinel, Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery, *J. Control. Release* 111 (2006) 219–227.
- [3] G.H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R.L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D.L. Kaplan, Silk-based biomaterials, *Biomaterials* 24 (2003) 401–416.
- [4] T. Asakura, Y. Watanabe, A. Uchida, H. Minagawa, NMR of silk fibroin. 2. ¹³C NMR study of the chain dynamics and solution structure of Bombyx mori silk fibroin, *Macromolecules* 17 (1984) 1075–1081.
- [5] A. Ajisawa, Dissolution of silk fibroin with calcium chloride/ethanol aqueous solution, *J. Seric. Sci. Jpn.* 67 (1998) 91–94.
- [6] G.Q. Zhou, Z.Z. Shao, D.P. Knight, J.P. Yan, X. Chen, Silk fibers extruded artificially from aqueous solutions of regenerated *Bombyx mori* silk fibroin are tougher than their natural counterparts, *Adv. Mater.* 21 (2009) 366–370.
- [7] J.P. Yan, G.Q. Zhou, D.P. Knight, Z.Z. Shao, X. Chen, Wet-spinning of regenerated silk fiber from aqueous silk fibroin solution: discussion of spinning parameters, *Biomacromolecules* 11 (2010) 1–5.
- [8] J.W. Yin, E. Q. Chen, D. Porter, Z.Z. Shao, Enhancing the toughness of regenerated silk Fibroin film through uniaxial extension, *Biomacromolecules* 11 (2010) 2890–2895.
- [9] D.N. Rockwood, R.C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M.L. Lovett, D.L. Kaplan, Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin, *Nat. Protoc.* 6 (2011) 1612–1631.
- [10] C.A. Holland, E. Terry, D. Porter, F. Vollrath, Natural and unnatural Silks, *Polymer* 48 (2007) 3388–3392.
- [11] S.D. Aznar-Cervantes, D. Vicente-Cervantes, L. Meseguer-Olmo, J.L. Cenis, A.A. Lozano-Pérez, Influence of the protocol used for fibroin extraction on the mechanical properties and fiber sizes of electrospun silk mats, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 1945–1950.
- [12] D.M. Phillips, L.F. Drummy, D.G. Conrady, D.M. Fox, R.R. Naik, M.O. Stone, P.C. Trulove, H.C. De Long, R.A. Mantz, Dissolution and regeneration of *Bombyx mori* silk fibroin using ionic liquids, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 14350–14351.
- [13] D.M. Phillips, L.F. Drummy, R.R. Naik, H.C. De Long, D.M. Fox, P.C. Trulove, R.A. Mantz, Regenerated silk fiber wet spinning from an ionic liquid solution, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 4206–4208.
- [14] M.K. Gupta, S.K. Khokhar, D.M. Phillips, L.A. Sowards, L.F. Drummy, M.P. Kadakia, R.R. Naik, Patterned silk films cast from ionic liquid solubilized fibroin as scaffolds for cell growth, *Langmuir*, 23 (2007) 1315–1359.
- [15] US Pat. 7 671 178, 2010.
- [16] N. Goujon, X. Wang, R. Rajkova, N. Byrne, Regenerated silk fibroin using protic ionic liquids solvents: towards an all-ionic-liquid process for producing silk with tunable properties, *Chem. Commun.* 48 (2012) 1278–1280.

- [17] Q. Wang, Y. Yang, X. Chen, Z. Shao, Investigation of rheological properties and conformation of silk fibroin in the solution of AmimCl, *Biomacromolecules* 13 (2012) 1875–1881.
- [18] R.D. Rogers, K.R. Seddon, Ionic liquids – Solvents of the future?, *Science* 302 (2003) 792–793.
- [19] R.P. Swatlow, S.K. Spear, J.D. Holbrey, R.D. Rogers, Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 4974–4975.
- [20] S. Shang, L. Zhu, J. Fan, Physical properties of silk fibroin/cellulose blend films regenerated from the hydrophilic ionic liquid, *Carbohydr. Polym.* 86 (2011) 462–468.
- [21] J. Mikkola, A. Kirilin, J.C. Tuuf, A. Pranovich, B. Holmbom, L.M.D. Kustov, Y. Murzina, T. Salmi, Ultrasound enhancement of cellulose processing in ionic liquids: from dissolution towards functionalization, *Green Chem.* 9 (2007) 1229–1237.
- [22] Y.-Q. Zhang, W.-D. Shen, R.-L. Xiang, L.-J. Zhuge, W.-J. Gao, W.-B. Wang, Formation of silk fibroin nanoparticles in water-miscible organic solvent and their characterization, *J Nanopart. Res.* 9 (2007) 885–900.
- [23] U.K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [24] M.L. Huynh, P. Russell, B. Walsh, Tryptic digestion of in-gel proteins for mass spectrometry analysis, *Methods Mol. Biol.* 519 (2009) 507–513.
- [25] H. Yamada, H. Nakao, Y. Takasu, K. Tsubouchi, Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons, *Mater. Sci. Eng. C* 14 (2001) 41–46.
- [26] Y. Takasu, H. Yamada, K. Tsubouchi, Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (2002) 2715–2718.
- [27] Z. Cao, X. Chen, J. Yao, L. Huang, Z. Shao, The preparation of regenerated silk fibroin microspheres, *Soft Matter*. 3 (2007) 910–915.
- [28] J. Kundu, Y.I. Chung, Y.H. Kim, G. Tae, S.C. Kundu, Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release, *Int. J. Pharm.* 388 (2010) 242–250.
- [29] B. Subia, S.C. Kundu, Loading and release on tumor cells using silk fibroin–albumin nanoparticles as carriers, *Nanotechnology* 24 (2013) 035103–035114.
- [30] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 95 (1983) 55–63.
- [31] A.K. Gupta, M. Gupta, S.J. Yarwood, A.S. Curtis, Effect of cellular uptake of gelatin nanoparticles on adhesion, morphology and cytoskeleton organisation of human fibroblasts, *J. Control. Release.* 95 (2004) 197–207.

8.6. ANEXO AL CAPÍTULO 8

8.6.1. Disolución de proteínas de seda en líquidos iónicos empleando energía de ultrasonidos en pulsos

Los pequeños fragmentos de capullo de seda o de fibroína se añadieron secuencialmente a 5 g de líquido iónico fundido, en un recipiente resistente a altas temperaturas y energía de ultrasonidos. Después de cada adición, la mezcla fue ultrasonificada al 30% de amplitud por pulsos con el vástago del ultrasonificador Branson 450D (temperatura limitada a 100°C), hasta que se completó la disolución.

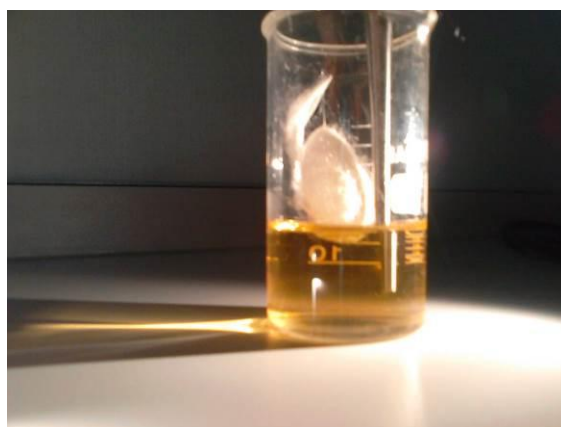


Figura A8.1. Disolución de proteínas de seda usando líquidos iónicos y ultrasonidos.

Disolución completa de fibras de seda confirmada mediante microscopía empleando un microscopio Nikon Eclipse 50i (equipado con una cámara CCD DS-Fi1) y el software NIS-Elements Ver. 2.0.

8. Obtención de nanopartículas de fibroína de seda empleando ILs y ultrasonidos

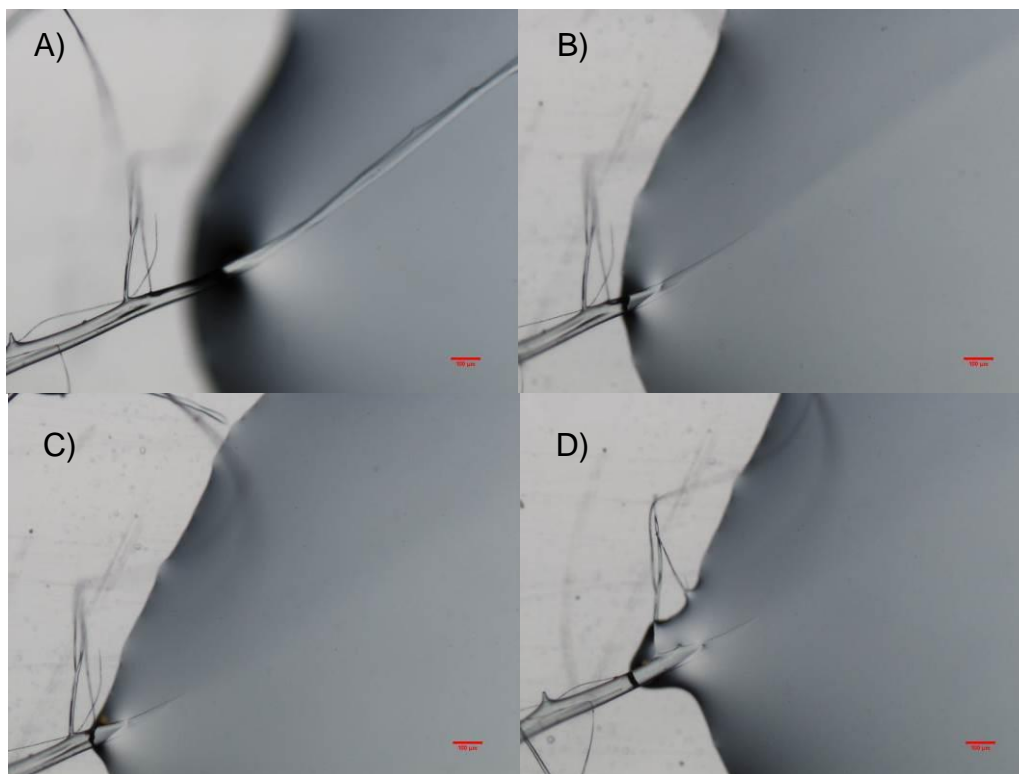


Figura A8.2. Imágenes secuenciales de la disolución de fibroína de seda en $[\text{bmim}^+]\text{Cl}^-$. A) Inmersión de la seda; B) Después de 5 minutos a 90°C , C) Después de 30 minutos a 90°C y D) Después de 1h a 90°C . (Magnificación 5x, escala de la barra $100\ \mu\text{m}$).

8.6.2. Propiedades como disolventes de los líquidos iónicos reciclados

Después de su reciclaje, los líquidos iónicos pueden ser utilizados sin pérdida de sus propiedades como disolventes en al menos cuatro procesos sucesivos de disolución de proteína (incluyendo, precipitación, separación, centrifugación, filtración para eliminar partículas proteicas y paso por el rotavapor para eliminar el metanol y el agua). La solubilidad (%wt) de la fibroína de seda en los líquidos iónicos reciclados empleando ultrasonicación se muestra en la **Figura A8.3**.

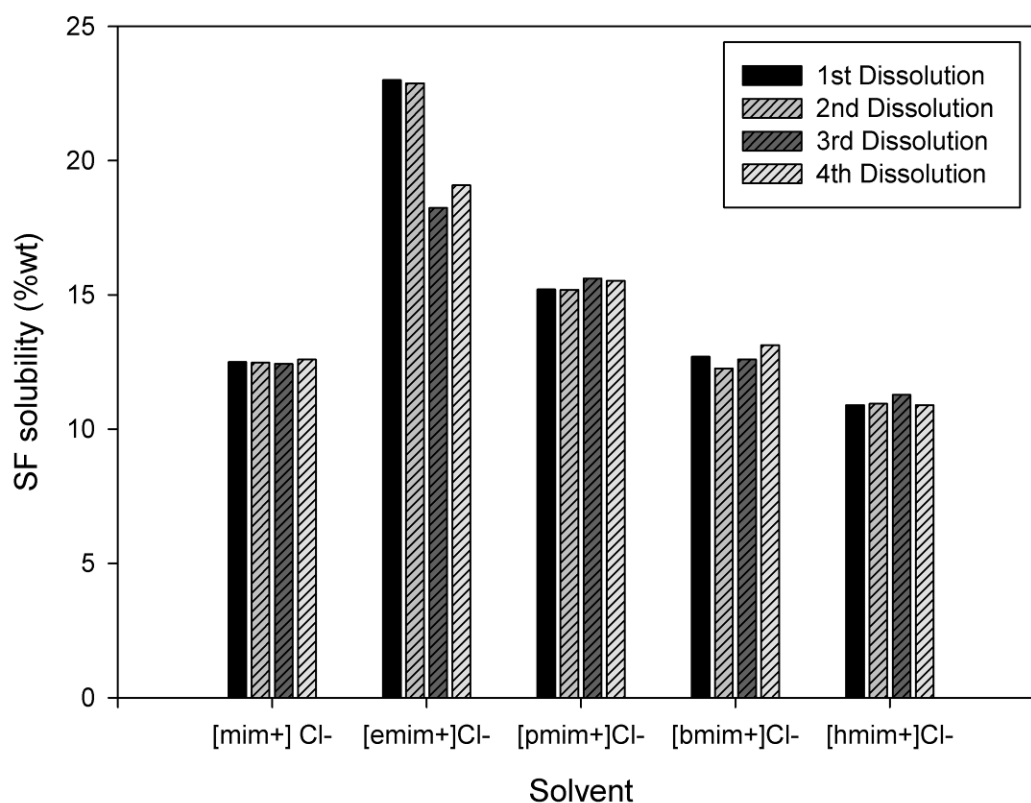


Figura A8.3. Solubilidad (%wt) de la fibroína de seda en los líquidos iónicos reciclados empleando ultrasonidos de alta potencia en cuatro procesos consecutivos.

Tras el primer proceso de reciclado, los líquidos iónicos necesitan tratamientos de ultrasonidos más largos (~5% más largos que con los líquidos iónicos comerciales) para disolver la misma cantidad de proteína debido a su mayor contenido en agua. Los líquidos iónicos empleados son muy hidrofílicos por lo que siguen reteniendo una cierta cantidad de agua después del proceso de reciclado. Sin embargo, esa pequeña cantidad de agua presente en los líquidos iónicos después del reciclado (entre 218 y 512 ppm) no presenta efecto alguno sobre la capacidad de romper la red de enlaces por puente de hidrógeno de la fibroína. El contenido en agua de los líquidos iónicos ha sido medido con un aparato Metrohm 831 KF coulometric Karl Fischer. Para ello, una cantidad exactamente pesada de muestra se valora con HYDRANAL-Coulomat AG (Sigma-Aldrich Chemicals Co., Madrid, Spain) siendo este el reactivo del Karl Fischer.

8.6.3. Identificación de las proteínas de seda mediante SDS-PAGE-HPLC/MS

La distribución peptídica en el gel de poliacrilamida muestra bandas discretas que fueron identificadas mediante análisis en HPLC/MS después de la digestión con tripsina.

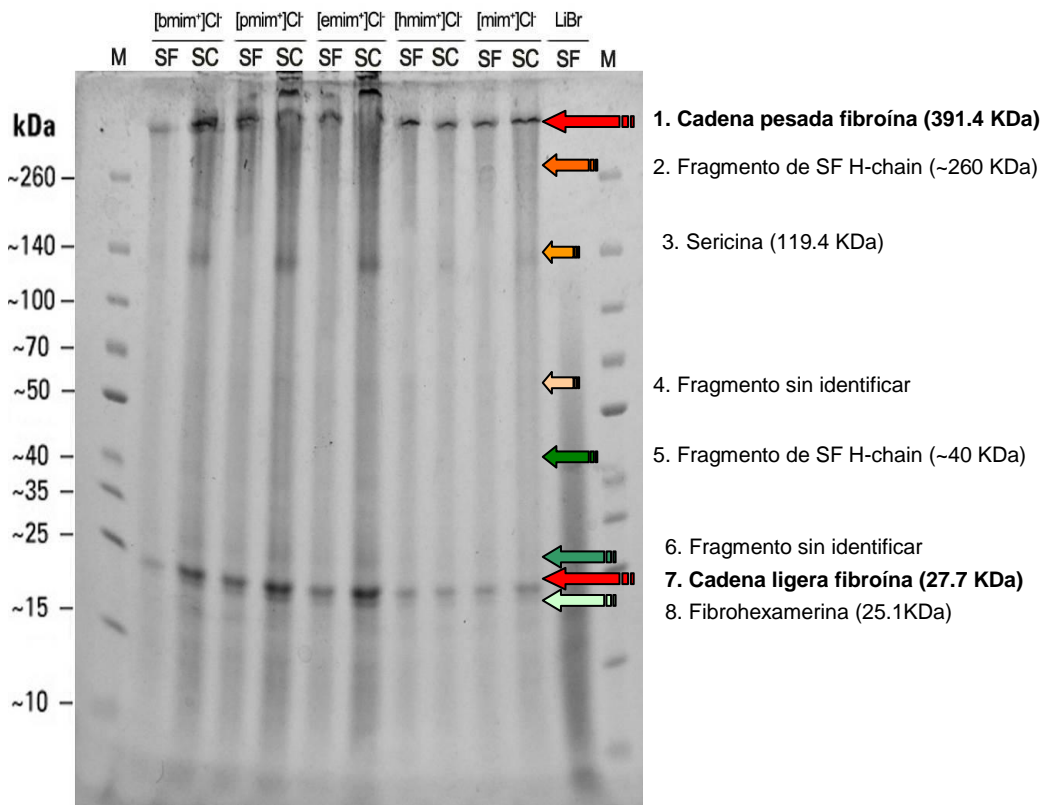


Figura A8.4. Bandas del gel seleccionadas y empleadas para el análisis HPLC/MS y su identificación.

Las bandas del gel seleccionadas se cortaron y se sometieron a digestión con Trypsin Gold (Promega), siguiendo el protocolo marcado por el proveedor para realizar análisis de espectrometría de masas usando el software Proteome Discoverer Ver. 1.3 y realizando búsquedas en el banco de datos SwissProt (2013). La tolerancia de la búsqueda fue de ± 1.5 Da para los precursores y de ± 0.8 Da para los fragmentos. Se estableció un filtro para FDR $p < 0.01$ y al menos dos péptidos únicos por proteína. La **Tabla A8.1** recoge los datos obtenidos para las bandas de gel analizadas.

8. Obtención de nanopartículas de fibroína de seda empleando ILs y ultrasonidos

Tabla A8.1

Datos obtenidos en el análisis de HPLC/MS de las bandas de gel.

Número de banda	Acceso en bases de datos	Descripción	Puntuación (protein score)	Cobertura (%)	Péptidos únicos	Peso molecular (Da)
1	P05790	Precursor de la cadena pesada de la fibroína - <i>Bombyx mori</i> (mariposa de seda) [FIBH-BOMMO]	1033.32	0.65%	2	391367
2	P05790	Precursor de la cadena pesada de la fibroína - <i>Bombyx mori</i> (mariposa de seda) [FIBH-BOMMO]	582.29	1.27%	4	391367
3	P07856	Precursor de la Sericina 1 - <i>Bombyx mori</i> (mariposa de seda) [SERI1-BOMMO]	16.04	3.79%	4	119417
4	-	-	-	-	-	-
5	P05790	Precursor de la cadena pesada de la fibroína - <i>Bombyx mori</i> (mariposa de seda) [FIBH-BOMMO]	8.38	0.65%	2	391367
6	-	-	-	-	-	-
7	P21828	Precursor de la cadena ligera de la fibroína - <i>Bombyx mori</i> (mariposa de seda) [FIBL-BOMMO]	674.99	27.86%	6	27652
8	P04148	Precursor de la Fibrohexamerina <i>Bombyx mori</i> (mariposa de seda) [SI25-BOMMO]	39.07	4.55%	2	25151

8. Obtención de nanopartículas de fibroína de seda empleando ILs y ultrasonidos

Se ha realizado un análisis comparativo de SDS-PAGE de fibroína de seda disuelta en sistemas disolventes convencionales (disolvente de Ajisawa, CaCl_2 50% (w/w) y LiBr 9.3M), líquido iónico + calentamiento en baño de aceite (90°C) y líquido iónico + ultrasonidos. La **Figura A8.5** muestra que la fragmentación de la cadena peptídica es menor cuando los tiempos de tratamiento aplicados son más cortos. Las calles 5 y 8 muestran fragmentos muy conservados los cuales corresponden a líquido iónico + tratamiento por ultrasonidos. Aunque los tratamientos con líquido iónico + calentamiento en baño de aceite (calles 4 y 7) muestran bandas de fragmentos conservados más claras que con los sistemas disolventes tradicionales (calles 1-3) son mucho más difusas que las bandas obtenidas con tratamientos cortos de ultrasonidos.

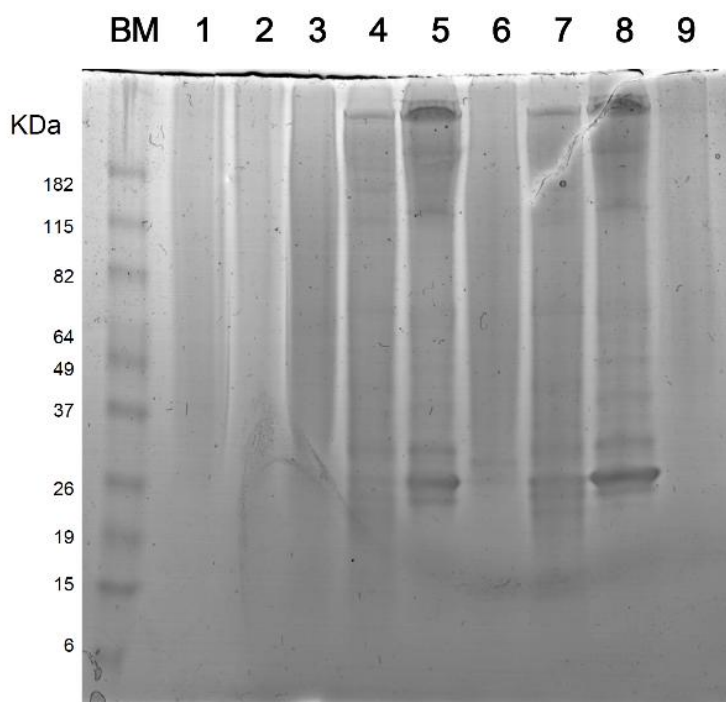


Figura A8.5. Análisis SDS-PAGE de los componentes de la proteína de la fibroína y de los capullos blancos disueltos. Calle BM: *Spectra Multicolor Protein Ladder* 10-260 KDa (Thermo); Calle 1: Fibroína disuelta con el sistema de disolventes de Ajisawa; Calle 2: Fibroína disuelta en CaCl_2 50% (w/w); Calle 3: Fibroína disuelta en LiBr 9.3M; Calle 4: Fibroína disuelta en el líquido iónico $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$ en baño de aceite a 90°C , 4h; Calle 5: Fibroína disuelta en el líquido iónico $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$ aplicando ultrasonidos, $<100^\circ\text{C}$, 5'; Calle 6: Capullo blanco disuelto con el sistema de disolventes de Ajisawa; Calle 7: Capullo blanco disuelto en el líquido iónico $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$ en baño de aceite a 90°C , 4h; Calle 8: Capullo blanco disuelto en el líquido iónico $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$ aplicando ultrasonidos, $<100^\circ\text{C}$, 24'; Calle 9: Igual a la Calle 1 (4-20% gradiente *Gel Amersham GE-HC*).

8.6.4. Reología de disoluciones seda-líquido iónico

La viscosidad dinámica de las disoluciones fibroína de seda-líquido iónico se ha medido con un Viscosímetro Rotacional BOHLIN Visco 88 (Malvern Instruments, UK). La viscosidad de las disoluciones mostró una fuerte dependencia con la temperatura y la composición. Por ejemplo, una disolución al 10 %wt de fibroína de seda en [bmim⁺][Cl⁻] presentó una viscosidad de 53.9 Pa·s a 30 °C pero de solo 3.2 Pa·s a 60 °C. Añadiendo agua a la mezcla, la viscosidad disminuyó por debajo de 0.5 Pa·s, permitiendo la dispersión eficiente de nanopartículas de seda en el agente precipitante a temperatura ambiente.

Tabla A8.2

Dependencia de la viscosidad dinámica de las disoluciones fibroína de seda-líquido iónico con la composición y la temperatura de las muestras.

%wt fibroína	Viscosidad (Pa·s)						
	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C	60 °C
0	2.198	1.437	0.939	0.614	0.401	0.262	0.171
1	1.388	0.885	0.564	0.360	0.229	0.146	0.093
3	11.174	5.981	3.202	1.714	0.917	0.491	0.263
7	38.879	22.999	13.605	8.048	4.761	2.816	1.666
10	91.663	62.759	40.041	23.511	13.167	11.041	9.011

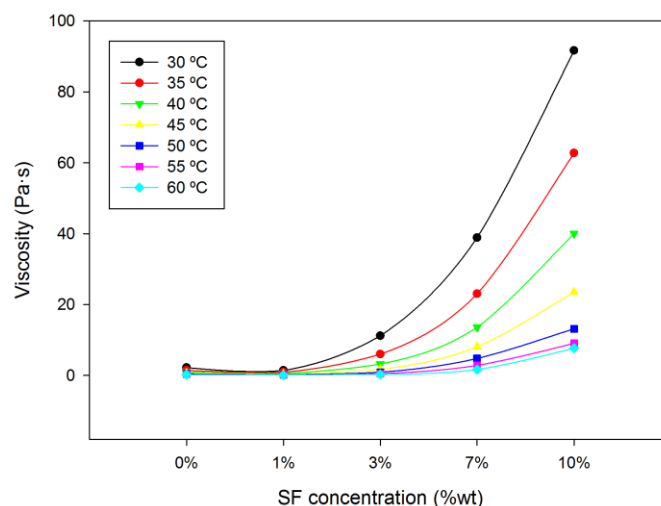


Figura A8.6. Representación del efecto de la composición (% wt fibroína) y temperatura (°C) sobre la viscosidad de las disoluciones fibroína de seda-líquido iónico.

Las mezclas binarias al 10% de fibroína de seda en [bmim⁺][Cl⁻] mostraron un índice de refracción de 1.5 y una densidad que osciló en torno a 1.08 g/cm³.

8.6.5. Efecto de la viscosidad de la disolución fibroína de seda-líquido iónico en el tamaño de las partículas de seda

Las medidas reológicas mostraron que la viscosidad de la disolución fibroína de seda-líquido iónico es un factor clave en la capacidad para formar nanopartículas de fibroína de seda. Las medidas de la viscosidad de las disoluciones fibroína de seda-líquido iónico con distintas cantidades de agua y la visualización del efecto macroscópico en las partículas formadas condujo a la afirmación de que la viscosidad límite para formar nanopartículas está en torno a 0.5 Pa·s.

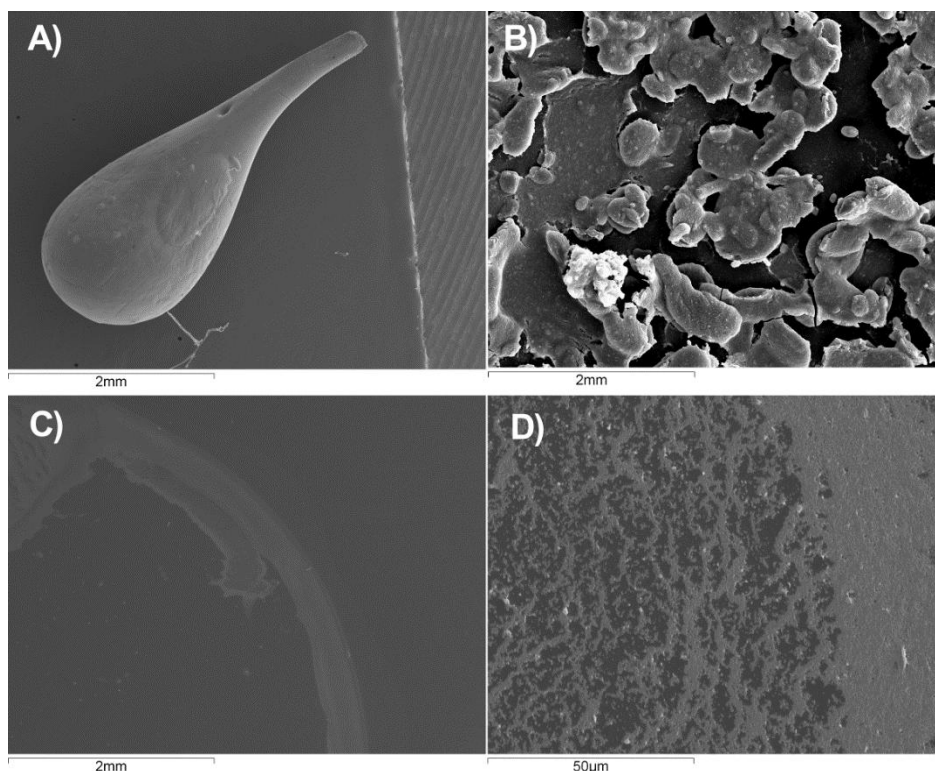


Figura A8.7. Imágenes SEM de partículas obtenidas a partir de disoluciones fibroína de seda-líquido iónico con distinto contenido en agua. A) Vista de una gota formada a partir de disoluciones de fibroína de seda-líquido iónico sin agua añadida. B) Vista de partículas de seda amorfas obtenidas a partir de una disolución de fibroína de seda-líquido iónico con 8% wt de agua añadida. C) Vista de nanopartículas de fibroína de seda obtenidas a partir de una disolución fibroína de seda-líquido iónico con un 15.3% de agua añadida. D) Vista de C aumentada. (Las imágenes A-C se adquirieron con una magnificación de 25x y D con 1000x).

8. Obtención de nanopartículas de fibroína de seda empleando ILs y ultrasonidos

En la **Tabla A8.3** se muestran las viscosidades de las disoluciones fibroína de seda-líquido iónico. La viscosidad disminuye al aumentar la temperatura de la disolución y la adición de agua.

Tabla A8.3

Efecto del contenido en agua sobre la viscosidad (Pa·s) de las disoluciones fibroína de seda-líquido iónico.

T (°C)	Contenido en agua (%wt)						
	0%	8.3%	15.3%	21.4%	26.6%	31.3%	35.3%
30	91.6630	2.3058	0.4370	0.1631	0.0978	0.0633	0.0377
35	62.7590	1.4697	0.3121	0.1212	0.0793	0.0518	0.0313
40	40.0410	0.9833	0.2250	0.0914	0.0632	0.0429	0.0268
45	23.5110	0.6401	0.1654	0.0684	0.0527	0.0369	0.0232

9

Conclusiones generales

“La mayoría de las ideas fundamentales de la ciencia son esencialmente sencillas y, por regla general pueden ser expresadas en un lenguaje comprensible para todos”

Albert Einstein (1879-1955)

9. CONCLUSIONES GENERALES

Los líquidos iónicos han sido caracterizados, desde el punto de vista fisicoquímico, mediante la medida de su densidad y de su índice de refracción y, desde el punto de vista toxicológico mediante su toxicidad acuática en *Vibrio fischeri*. También se ha determinado su lipoafinidad e hidrofobicidad a través de la medida experimental de su coeficiente de reparto octanol-agua y se ha relacionado con su potencial toxicidad. Algunos de estos líquidos iónicos han resultado aptos para disolver fibroína de seda del gusano de la raza *Bombyx mori*. A partir de estas disoluciones se han sintetizado de forma satisfactoria nanopartículas de fibroína de seda mediante desolvatación en disolventes orgánicos.

Con respecto a la caracterización de los líquidos iónicos los principales logros obtenidos han sido los siguientes:

1. La densidad de los líquidos iónicos aumenta cuando la longitud de la cadena alquílica del catión disminuye mientras que se ha comprobado que la densidad no aumenta al aumentar el peso molecular del anión.
2. La densidad de los líquidos iónicos estudiados disminuye al aumentar la temperatura siendo esta disminución ligeramente menor cuando aumenta la longitud de la cadena alquílica del catión.
3. El índice de refracción de los líquidos iónicos estudiados aumenta con la longitud de la cadena alquílica del catión.
4. El índice de refracción de los líquidos iónicos estudiados depende de la temperatura en menor medida que la densidad y no se ha encontrado ninguna relación con la longitud de la cadena del catión o el peso molecular del anión.
5. Las ecuaciones existentes en la bibliografía para correlacionar la densidad y el índice de refracción de líquidos iónicos son independientes de la temperatura, mientras que en este estudio se ha demostrado que la correlación puede mejorar de forma sustancial si se incluye dicha dependencia.
6. Es posible diseñar líquidos iónicos con propiedades modulables (al menos, la densidad y el índice de refracción, aunque probablemente otras también) en base a la estructura del catión y del anión escogidos. De esta forma, los datos que se muestran en esta tesis contribuyen de forma significativa al diseño y al estudio de los líquidos iónicos presentes y futuros.
7. Los líquidos iónicos estudiados son hidrofílicos, ya que presentan bajos valores del coeficiente de reparto octanol-agua, y este aumenta con la longitud de la cadena alquílica del catión.
8. El coeficiente de reparto octanol-agua de los líquidos iónicos estudiados es inferior al de los disolventes industriales comúnmente empleados, lo que ratifica su carácter más benigno en comparación con estos últimos.

9. Conclusiones generales

9. Ninguno de los líquidos iónicos estudiados presenta tendencia a acumularse o a concentrarse en la biota ya que todos ellos presentan valores del coeficiente de reparto octanol-agua muy pequeños.
10. Los líquidos iónicos basados en sales de piridinio muestran una toxicidad en *Vibrio fischeri* más elevada que los de sales de imidazolio y el nitrato de etilamonio resultó ser uno de los menos perjudiciales para el medio ambiente de todos los líquidos iónicos estudiados.
11. La toxicidad de los líquidos iónicos estudiados en *Vibrio fischeri* aumenta con la longitud de la cadena alquílica del catión, mientras que si la cadena alquílica se funcionaliza con un grupo hidroxilo, presenta un doble enlace o una segunda cadena alquílica corta, el líquido iónico es menos tóxico.
12. La naturaleza del anión del líquido iónico presenta una influencia significativamente menor en la toxicidad en *Vibrio fischeri* de los líquidos iónicos, especialmente cuando la longitud de la cadena alquílica del catión aumenta.
13. La toxicidad en *Vibrio fischeri* de estos líquidos iónicos es bastante similar a la de los disolventes orgánicos convencionales por lo que el reemplazo de un proceso convencional por un proceso basado en líquidos iónicos como nuevos disolventes podría ser una alternativa atractiva desde el punto de vista medioambiental.
14. Los líquidos iónicos dicatiónicos presentan una toxicidad en *Vibrio fischeri* inferior a la observada en los monocatiónicos homólogos.
15. La toxicidad en *Vibrio fischeri* de los líquidos iónicos estudiados, expresada como $\text{Log}(1/EC_{50})$, está relacionada con la hidrofobicidad de los mismos, expresada como $\text{Log} K_{ow}$.

Con respecto al proceso de disolución de la fibroína de seda en líquidos iónicos y a la posterior síntesis de nanopartículas de fibroína de seda, los principales logros obtenidos son los que se detallan a continuación:

1. Se ha comprobado que los líquidos iónicos más hidrofílicos y capaces de captar el hidrógeno de la estructura de lámina β , tales como los cloruros de 1-alkil-3-metilimidazolio, son capaces de disolver la fibroína y la sericina de seda de *Bombyx mori*.
2. La nueva metodología propuesta para mejorar la disolución de fibroína de seda en líquidos iónicos incorpora la aplicación de ultrasonidos de elevada potencia.
3. Las micro- y nanopartículas de fibroína de seda regenerada obtenidas por desolvatación en un disolvente orgánico muestran un contenido de lámina β similar al de las hebras de fibroína y casi idéntico al de las nanopartículas de fibroína de seda previamente descritas en la literatura.

4. Tras la desolvatación, los líquidos iónicos se pueden recuperar eficientemente a vacío y se pueden reutilizar sin pérdidas de sus propiedades solventes, lo que mejora considerablemente la eficacia global del proceso.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se pueden resumir en una conclusión final afirmando que se ha profundizado en el conocimiento de las propiedades de los líquidos iónicos enriqueciendo las bases de datos disponibles y se ha conseguido un nuevo procedimiento para la disolución de las fibras de seda con líquidos iónicos mediante una técnica rápida, la cual preserva la integridad proteica y es más respetuosa con el medio ambiente, ya que pueden reciclarse los líquidos iónicos y se pueden obtener micro- o nanopartículas de tamaño controlado en función de las aplicaciones a las que vayan a ser destinadas.

10

Resumen en inglés de la Tesis Doctoral

*“La ciencia no es solo una disciplina de la razón sino también de
romance y de pasión”*

Stephen Hawking (1942-)



UNIVERSITY OF MURCIA

FACULTY OF CHEMISTRY

DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING

*Properties of ionic liquids
and their application to the synthesis
of silk fibroin nanoparticles*

MERCEDES GARCÍA MONTALBÁN

2016

Summary

During the last decades, many processes of the pharmaceutical and fine chemistry industry have involved high energy consumptions and have generated large amounts of waste. In this way, they have contributed to the high degree of environmental degradation which has gradually become a global problem. During the last years, the environmental interest has grown and the laws have become stricter and new technologies of lower environmental impact have been developed. In this context, the concepts of *Green Chemistry* and, more recently, *Green Engineering* have emerged in order to contribute to the solution of the problem. In 1998, Green Chemistry was defined by Anastas and Warner as the design of chemical products and processes that reduce or eliminate the use and generation of hazardous substances. Some years later, in 2003, Anastas and Zimmerman claimed that Green Engineering is the development and commercialization of industrial processes that are economically feasible and reduce the risk to human health and the environment.

The design of benign solvents, such as ionic liquids, is one of the most active areas in the fields of Green Chemistry and Green Engineering. Ionic liquids are organic salts that are liquid below 100°C and normally consist of an organic cation, the most commonly used being dialkylimidazolium and tetraalkylammonium salts, and a polyatomic inorganic anion (e.g. BF_4^- , PF_6^- , Cl^-). They have been thoroughly investigated in the last two decades because of their numerous potential industrial applications and because they are “greener” than traditionally used chemicals. From an environmental point of view, the most important properties of ionic liquids are their negligible vapour pressure and their good chemical and thermal properties. Additionally, the physicochemical properties of ionic liquids, such as their hydrophobicity, density, refractive index, viscosity, melting point, polarity and solvent properties, may be modified by altering the anion or the cation. Indeed, this feature is a key factor for realizing successful reactions or extraction operations, since appropriate combinations of the cationic and anionic parts of the solvent can be made. In this sense, ionic liquids are often referred to as “designer solvents”. For all of these reasons, ionic liquids have the potential to replace traditional organic solvents for synthesis, catalysis and separation purposes.

Because ionic liquids are non-volatile, they do not contribute to atmospheric pollution. However, they show a significant degree of solubility in water where their full effect remains to be studied in depth. Moreover, because of their high stability, ionic liquids could become persistent pollutants in waste waters. For this reason, it is very important to quantify this effect through toxicological parameters such as the octanol-water partition coefficient (K_{ow}), which classifies ionic liquids according to their hydrophobicity or hydrophilicity, and the aquatic toxicity (EC_{50}).

Over the past several years, our research group has made an intense effort in the study of the physicochemical properties of the ionic liquids related to their applications, being especially interested in their usage as solvents of the biopolymer silk fibroin in order to synthesize silk fibroin nanoparticles from ionic liquid-silk fibroin solutions for the first time.

In nanotechnology, a particle is defined as a small object that behaves as a whole unit as regards its transport and properties. Nanoparticles are between 1 and 200 nanometers in

size and can further be classified according to their diameter. The National Nanotechnology Initiative has led to generous public funding for nanoparticle research in the United States of America. When a specific procedure is used for the therapeutic delivery of drugs into the diseased site, the barriers are numerous and require careful consideration when new therapies are being designed. The efficacy of any therapy is dependent upon its mode of delivery and its potency at the site of disease. Intravenous delivery to a diseased site can vary in efficacy, depending on the properties of the site and the delivery vehicle. In the last two decades, many studies have focused on the development of drug-delivery systems to achieve controlled release mechanisms that enable drug targeting of specific tissue (e.g. tumor) sites by using microparticles and nanoparticles. A biologically derived and biodegradable nanoscale delivery agent with no toxic byproducts would allow the delivery of the therapeutic drug without compromising efficacy. If the biologically derived carrier has chemical and/or structural characteristics that enhance uptake by the cells, then the effectiveness of the carrier would be enormously improved. The silk fibroin-based delivery vehicle is an example of such a biologically derived delivery system. The biocompatibility and controlled degradation of silk fibroin makes it an ideal candidate as a nanoscale drug-delivery vehicle. Nanoparticles are small enough to penetrate through small capillaries, allowing enhanced cellular uptake of an encapsulated drug or therapeutic molecule.

Silk fibroin, derived from *Bombyx mori* cocoons, is a widely used protein polymer for biomedical applications. It has mechanical properties that rival those of the most advanced synthetic polymers. The enhanced environmental stability of silk fibroin compared with globular proteins is due to their hydrogen bonding, the hydrophobic nature of much of their protein and a significant degree of crystallinity. Silks are insoluble in most solvents, including water, dilute acid and alkali. Traditionally, two solvent systems have been used to dissolve degummed silk fibres: ionic aqueous solutions, such as 9.3M LiBr or 50% (w/v) CaCl₂ solution and ionic hydro-alcoholic solutions such as a CaCl₂/Ethanol/Water mixture (Ajisawa's reagent). These solutions require extensive dialysis in deionized water before being concentrated to the required level. However, the processes of both dialysis and concentration are time-consuming, and the solutions are unstable, with a short half life before the protein becomes unstable and aggregates to a gel state. The use of ionic liquids for silk fibroin dissolution is a considerably greener option than the conventional ones. Silk fibroin solubility in ionic liquids is attributed to the ability of the anion (mainly halogens or small carboxylates) to disrupt the hydrogen bonds in the silk fibroin β -sheets. Using ionic liquids as solvents the total number of steps required for the dissolution process is reduced, as the cocoon can be dissolved directly into selected ionic liquids. But complete dissolution of silk proteins using the above described method takes several hours even with intense heating at 100 °C, resulting in the loss of protein integrity. For this reason, the process of silk dissolution was improved by applying high-power ultrasounds to the silk fibroin-ionic liquid mixture to accelerate the process thus avoiding long heating treatments, and adding water to reduce the viscosity. High power ultrasounds have two important synergistic effects on the mixture: rapid heating and efficient disruption of the fibers at the same time.

The main aims of this doctoral thesis have been i) the study of some physicochemical properties of pure ionic liquids such as density and refractive index and their toxicity in terms of the octanol-water partition coefficient and the aquatic toxicity and ii) the

application of these ionic liquids to the silk fibroin dissolution process to obtain silk fibroin nanoparticles.

A brief summary of the specific content of each chapter is detailed as follows.

In **Chapter 1**, the density and refractive index of some imidazolium-based ionic liquids have been measured in a wide range of temperature and the effect of temperature, anion and the alkyl chain length on the behavior of these properties has been studied. In addition, a relationship between the density and refractive index has been estimated from empirical equations and a way to explain the behavior of the density of the ionic liquids studied based on the molecular volume has been found. With this last finding, we should be able to predict, prior to synthesis, the density and molecular volumes for ionic liquids with alkyl imidazolium cations and with different anions (and very likely combinations of ions of similar chemical structure) in a wide range of temperatures from easily accessible theoretical calculations of the structure of the proposed ions.

In **Chapter 2**, the octanol-water partition coefficient (K_{ow}) of dilute samples of several imidazolium, pyridinium and ammonium-based ionic liquids has been experimentally determined. For that, three different experimental methods (slow-stirring, shake-flask and a combined method developed by our research group) have been used and the results obtained have been compared, which has not been done before now. Furthermore, the effect of the anion nature and cation alkyl chain length on the K_{ow} values has been discussed.

In **Chapter 3**, the aquatic toxicity of a set of twenty-nine imidazolium, pyridinium and ammonium-based ionic liquids using the *Vibrio fischeri* inhibition test has been determined. Ionic liquids toxicity was determined as effective nominal concentration EC_{50} which is defined as the ionic liquid concentration that produces a mortality of 50 per cent of the bacterial population. An accurate study of the different influences on ionic liquid toxicity has been presented and a correlation between EC_{50} values and the 1-octanol-water partition coefficients (K_{ow}) obtained in Chapter 2 has been established.

In **Chapter 4**, a set of twenty-six imidazolium, pyrrolidinium and pyridinium-based ionic liquids (9 monocationic and 17 dicationic) has been synthesized. Some of them had not been synthesized before this thesis. In addition, their aquatic toxicity using the *Vibrio fischeri* inhibition test has been also experimentally determined as the effective nominal EC_{50} concentration. To date, no report in the literature has studied the toxicity of the most of these ionic liquids (22 out of 26) towards *Vibrio fischeri*. The results represent an accurate study of the influence of the composition and structure on ionic liquids toxicities.

In **Chapter 5**, the suitability of ionic liquids for dissolving and regenerating silk fibroin and cocoons from *Bombyx mori* worms has been tested and the silk-ionic liquid solutions have been characterized by electrophoresis. In addition, the structural properties and the cytotoxicity (cell line L929) of silk nano- and microparticles obtained by precipitation on methanol from ionic liquid solutions have been examined. This was the first time that the synthesis of silk fibroin nanoparticles was carried out from ionic liquid-silk fibroin solutions.

TABLE OF CONTENTS

1. EFFECT OF TEMPERATURE, ANION, AND ALKYL CHAIN LENGTH ON THE DENSITY AND REFRACTIVE INDEX OF 1-ALKYL-3-METHYLIMIDAZOLIUM-BASED IONIC LIQUIDS	219
1.1. Introduction	221
1.2. Experimental.....	222
1.3. Results and Discussion	223
1.4. Conclusions	238
1.5. References	239
1.6. Supporting Information	243
2. EXPERIMENTAL MEASUREMENTS OF OCTANOL–WATER PARTITION COEFFICIENTS OF IONIC LIQUIDS	251
2.1. Introduction	253
2.2. Experimental.....	256
2.3. Results and Discussion	260
2.4. Conclusions	266
2.5. References	267
3. ASSESSING CHEMICAL TOXICITY OF IONIC LIQUIDS ON <i>VIBRIO FISCHERI</i> : CORRELATION WITH STRUCTURE AND COMPOSITION	271
3.1. Introduction	273
3.2. Experimental.....	275
3.3. Results and Discussion	278
3.4. Conclusions	284
3.5. References	285
4. ASSESSING DICATIONIC IONIC LIQUIDS AS AN ENVIRONMENTALLY FRIENDLY ALTERNATIVE USING THE <i>VIBRIO FISHERI</i> INHIBITION TEST	291
4.1. Introduction	293
4.2. Experimental.....	296
4.3. Results and Discussion	301
4.4. Conclusions	309
4.5. References	309
5. PRODUCTION OF SILK FIBROIN NANOPARTICLES USING IONIC LIQUIDS AND HIGH-POWER ULTRASOUNDS	313
5.1. Introduction	315
5.2. Experimental.....	316
5.3. Results and Discussion	320
5.4. Conclusions	326
5.5. References	326
5.6. Supporting Information	328
6. CONCLUSIONS	327

1

Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids

The density and refractive index of 15 room temperature ionic liquids (ILs) grouped according to whether they had the same cation or anion have been measured at atmospheric pressure in a temperature range from 293.15 K to 343.15 K. Changes in the physical properties have been quantified as a function of temperature and alkyl chain length for each cation or anion family. It has been observed that ionic liquid density increases when the alkyl length of the cation decreases but not with the molecular weight of the anion. We have proposed a new method to assign the ionic volume of each component in an IL that explains the trend, followed by all experimental data in this work, and allows us to predict the molecular volume and density of many ILs prior to synthesis. It was also seen that the refractive index increases as alkyl chain length of the cation increases. The temperature-dependent correlation between density and refraction index for the ILs studied has been quantified.

1. EFFECT OF TEMPERATURE, ANION AND ALKYL CHAIN LENGTH ON THE DENSITY AND REFRACTIVE INDEX OF 1-ALKYL-3-METHYLIMIDAZOLIUM-BASED IONIC LIQUIDS

1.1. INTRODUCTION

Ionic liquids (ILs) are organic salts that are liquid at room temperature and remain liquid over a wide temperature range. ILs are composed of large organic cations and small inorganic or organic anions [1]. Due to their unusual properties, ILs have been attracting the attention of a growing number of scientists and engineers, as seen from the increasing number of papers published in recent years [2-5]. For instance, in 2002 the number of publications in the field of the Chemical Engineering was 450 but exceeded than 5000 by 2014 (ISI Web of Science, 2015). ILs have been accepted as a new class of “green” solvents for practical applications due to their unique combination of low volatility, negligible vapor pressure, chemical stability, high conductivity, wide electrochemical window, ability to dissolve organic and inorganic solutes and gases, and tunable solvent properties [1, 2, 6]. The last mentioned is probably the most attractive feature because it permits the desired properties to be adjusted depending on the application simply by means of a slight structural modification of the cation or the anion.

The determination and understanding of the basic physicochemical properties of ILs, such as density or refractive index, is essential for the process design and product development of contacting equipment [7, 8]. In the particular case of density of ILs, it is directly linked to the mechanics and engineering components associated with a process and is being used to determine several parameters such as rates of liquid-liquid phase separation, mass transfer, power requirements of mixing and pumping and equipment sizing. However, refractive index of ILs is more related to specific chemical properties like the structuredness, polarity and relative hydrogen bonding donating and accepting ability which are useful to determine solubilities, partition constants and reaction rates [9]. Although a fair amount of physicochemical data has been published, there are disagreements in some reports. The lack of systematic studies means that much work remains to be done in order to complete an accurate database [10-13].

The aim of the present work is to study the density and refractive index of some imidazolium-based ILs and to identify the effect of temperature, and anion and the alkyl chain length on the behavior of the properties studied. In addition, a relation between the density and refractive index is estimated from empirical equations. For that purpose, fifteen ILs were studied systematically at six different temperatures from 293.15 to 343.15 K at atmospheric pressure.

The investigated ILs are named below and Figure 1.1 shows them grouped by family (same cation/different anion), and the common anion with different cation alkyl chain length:

- 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, [emim⁺][BF₄⁻]
- 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, [bmim⁺][BF₄⁻]
- 1-hexyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, [hmim⁺][BF₄⁻]
- 1-methyl-3-octylimidazolium tetrafluoroborate, [omim⁺][BF₄⁻]
- 1-ethyl-3-methylimidazolium triflate, [emim⁺][TfO⁻]
- 1-butyl-3-methylimidazolium triflate, [bmim⁺][TfO⁻]
- 1-butyl-3-methylimidazolium octylsulphate, [bmim⁺][OcSO₄⁻]
- 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [bmim⁺][PF₆⁻]

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

- 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [hmim⁺][PF₆⁻]
- 1-methyl-3-octylimidazolium hexafluorophosphate, [omim⁺][PF₆⁻]
- 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, [emim⁺][NTf₂⁻]
- 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, [bmim⁺][NTf₂⁻]
- 1-hexyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, [hmim⁺][NTf₂⁻]
- 1-methyl-3-octylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, [omim⁺][NTf₂⁻]
- 1-ethyl-3-methylimidazolium ethyl sulphate, [emim⁺][EtSO₄⁻]

	[BF ₄ ⁻]	[NTf ₂ ⁻]	[TfO ⁻]	[EtSO ₄ ⁻]	[PF ₆ ⁻]	[OOctSO ₄ ⁻]
[Emim ⁺]	x	x	x	x		
[Bmim ⁺]	x	x	x		x	X
[Hmim ⁺]	x	x			x	
[Omim ⁺]	x	x			x	

Figure 1.1. Schematic representation of the ILs used grouped by families of common cation/different anion, and common anion with different cation alkyl chain length.

These specific ILs have been chosen in order to carry out a systematic study of density and refractive index, to examine effects such as the length of the alkyl chain of the cation or the type of anion. Furthermore, some of these ILs are known to be useful for relevant applications in several fields. On the one hand, tetrafluoroborate and hexafluorophosphate ions are considered as inert solvents in most transition metal catalyzed reactions providing a polar and weakly coordinating medium for the transition metal catalyst in which products are soluble [14]. Hexafluorophosphate and bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ions are suitable as reaction medium to carry out lipase-catalysed ester synthesis, obtaining excellent results [15].

Density is a physical property widely studied in ILs because of its importance [16]. Most known ILs are denser than water, with values ranging from 1 to 1.6 g·cm⁻³ [17]. However, different values have been obtained by some authors, which have been ascribed to an unusually strong influence of impurities on density. On the other hand, the refractive index of ILs has received less attention compared to density even though its determination is rapid, highly accurate and needs a small amount of sample in most techniques. Refractive indices are often reported together with density in the case of non-electrolytes as proof of purity of the samples concerned due to the high precision obtainable with these now common, inexpensive techniques. Surprisingly, however, these two quantities have rarely been studied jointly despite their strong correlation as reflected, for example, in the Lorentz–Lorenz equation [18].

1.2. EXPERIMENTAL

1.2.1. Chemicals

Almost all of the ILs used in this work were supplied by IoLitec (Germany) except [bmim⁺][TfO⁻], [bmim⁺][OOctSO₄⁻] and [emim⁺][EtSO₄⁻], which were provided by Solvent-Innovation (Germany). All the ILs reported purity >99% (mass-fraction) while [emim⁺][BF₄⁻], [bmim⁺][OOctSO₄⁻], [C_nmim⁺][PF₆⁻] (with n=4, 8) and [bmim⁺][NTf₂⁻] reported purity >98% (mass-fraction). ILs were treated with phosphorus pentoxide for 24 hours in vacuum before use. The water content of the liquid phase was measured with a Metrohm 831 KF coulometric

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

Karl Fischer apparatus. For that, an exactly weighed sample was titrated using HYDRANAL-Coulomat AG (Sigma-Aldrich Chemicals Co., Madrid, Spain) as the Karl Fischer reagent. The uncertainty for the water content measurements was $\pm 0.1 \mu\text{g/mL}$. The water content of these ILs was between 0.8 and 15 ppm. The content of halides in these ILs has been always lower than 100 ppm. Water was purified by the Merck Millipore System Milli-Q[®], which reached a resistivity of $18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}$ at 25°C and a TOC value below 5 ppb.

1.2.2. Density measurements

The density of all ILs was measured with an Anton Paar, Oscilating U-tube densitometer (DMA 4500M) at temperatures from 293.15 to 343.15 K. Standard uncertainties, u , are $u(T) = 0.03 \text{ K}$; $u(\rho) = 0.00005 \text{ g/cm}^3$ and, given the purity of sample (99%), the estimated expanded uncertainty, u_e , are $u_e(\rho) = 0.001 \text{ g/cm}^3$ (with 0.95 level of confidence ($k=2$)). The apparatus was calibrated by measuring the density of Millipore quality water and ambient air according to the instructions of the supplier. The quantity of liquid required (approximately 1 mL) was transferred to the apparatus by a syringe, care been taken not to introduce bubbles in the tube to prevent errors in the measurements. The measurements were done in 3 replicate runs.

1.2.3. Refractive index measurements

The refractive index was determined by an ABBE DR-A1 Atago refractometer with a wavelength of 589 nm. Standard uncertainties, u , are $u(T) = 0.5 \text{ K}$; $u(n) = 0.0002 \text{ (nD)}$ and, given the purity of sample (99%), the estimated expanded uncertainty, u_e , are $u_e(n) = 0.0015 \text{ (nD)}$ (with 0.95 level of confidence ($k=2$)). The temperatures range measured was from 293.15 to 343.15 K. Calibration was carried out using Millipore quality water before the measurements and diethyl ether as a cleaning solvent for the prism surface of the refractometer. The temperature in the cell was controlled using an external thermostatic bath with an uncertainty of $\pm 0.5 \text{ K}$. The measurements were done in 3 replicate runs.

1.3. RESULTS AND DISCUSSION

1.3.1. Density: results and correlation

A comparison between the experimental and literature values of the density of $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ in different ranges of temperature is illustrated in Figure 1.2. As can be observed our density data are in good agreement with those of the available literature. The spread (standard deviation) of our values and the literature is from 0.0011 to $0.0023 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ over all the ranges of temperatures measured as seen in Table 1.1, validating the present experimental method. The small discrepancies in the values may be related essentially with the different degrees of purity of the samples, including water and halide content and the differences in the experimental technique used by the research teams. The same effect has been observed and reported by several authors, such as Hasse *et al.* [19], Huddleston *et al.* [20], Deng *et al.* [21] and Wang *et al.* [22].

The densities of the ILs were measured at atmospheric pressure in a temperature range from 293.15 to 343.15 K. The experimental values are reported in Table 1.2. The variation of the density values is plotted as a function of temperature and grouped in families in Figure 1.3 (graphs a-e) and Figure 1.4 (graphs a-d). All the figures have the same scale to facilitate comparison between the families.

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

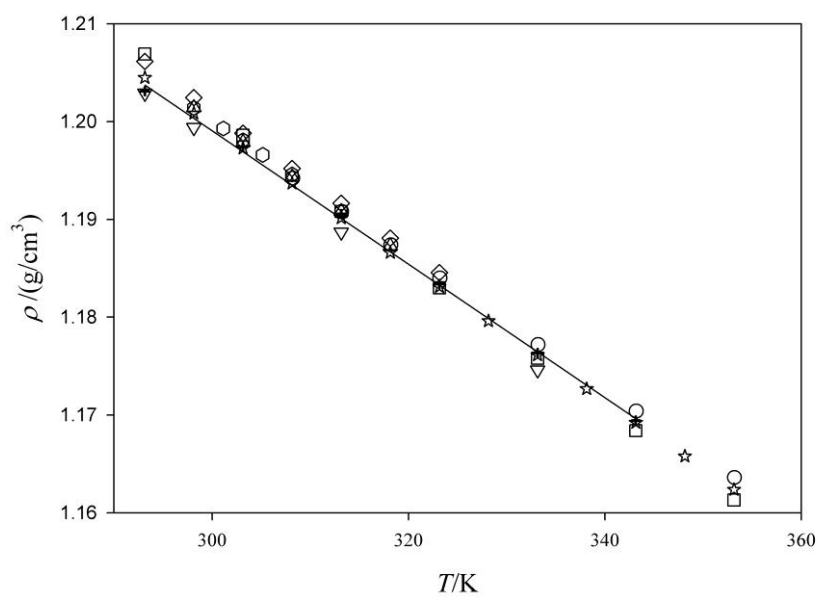


Figure 1.2. Comparison of density data for [bmim⁺][BF₄⁻]: + and (—) ($\rho = -0.0007T + 1.4036$, $r^2 = 0.9989$), this work; ○ Soriano *et al.* [23]; ∇ Tariq *et al.* [11]; Δ Zafarani *et al.* [24]; □ Gardas *et al.* [25]; ◇ Sanmamed *et al.* [6]; ○ Navia *et al.* [26]; ☆ Vakili-Nezhod *et al.* [27].

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

Table 1.1

Experimental and literature values of density ρ and refractive index n of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, [bmim⁺][BF₄⁻] at temperatures T ranging from 293.15 to 343.15 K K at pressure $p=0.1$ MPa*

T / K	[bmim ⁺][BF ₄ ⁻] – $\rho/\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$					
	293.15	303.15	313.15	323.15	333.15	343.15
This Work*	1.20311	1.19737	1.19054	1.18339	1.17634	1.16943
Literature	1.20290 ^a	1.19760 ^b	1.19080 ^b	1.18400 ^b	1.17720 ^b	1.17040 ^b
	1.20460 ^c	1.19788 ^d	1.18870 ^a	1.18600 ^c	1.17460 ^a	1.16840 ^c
	1.20690 ^e	1.19840 ^e	1.19082 ^d	1.18300 ^e	1.17980 ^e	1.17370 ^h
	1.20615 ^g	1.19810 ^f	1.19220 ^c	1.18455 ^g	1.17580 ^e	1.16922 ^j
	1.20447 ^j	1.19860 ^e	1.19080 ^e	1.18310 ^j	1.18105 ⁱ	
		1.19880 ^g	1.19165 ^g		1.17613 ^j	
		1.20050 ^h	1.19400 ^h			
		1.20129 ⁱ	1.19459 ⁱ			
		1.19726 ^j	1.19014 ^j			
Standard Deviation	0.0016	0.0013	0.0018	0.0011	0.0023	0.0021
T / K	[bmim ⁺][BF ₄ ⁻] – n					
	293.15	303.15	313.15	323.15	333.15	343.15
This Work*	1.4220	1.4200	1.4180	1.4160	1.4150	1.4135
Literature	1.4225 ^a	1.4206 ^b	1.4175 ^a	1.4155 ^j	1.4132 ^j	1.4107 ^j
	1.4232 ^j	1.4207 ^j	1.4181 ^j		1.4125 ^a	
Standard Deviation	0.0006	0.0004	0.0003	0.0003	0.0013	0.0020

^a Tariq *et al.* [11], ^b Soriano *et al.* [23], ^c Zhou *et al.* [10], ^d Zafarani *et al.* [24], ^e Gardas *et al.* [25], ^f Navia *et al.* [26], ^g Sanmamed *et al.* [6], ^h Fredlake *et al.* [28], ⁱ Gomes de Azevedo *et al.* [13], ^j Vakili-Nezhoo *et al.* [27].

* Standard uncertainties u are $u(\rho)=0.00005$ g/cm³ with $u(T) = 0.03$ K and $u(n)=0.0002$ (nD) with $u(T) = 0.5$ K and, given the purity of sample (99%), the estimated expanded uncertainties u_e are $u_e(\rho)=0.001$ g/cm³ and $u_e(n)=0.0015$ (nD) (with 0.95 level of confidence (k=2)).

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

Table 1.2

Experimental values of density ρ and refractive index n of the studied ILs at temperatures T ranging from 293.15 to 343.15 K at pressure $p=0.1$ MPa*

T/K	[emim⁺][BF₄⁻]		[bmim⁺][BF₄⁻]		[hmim⁺][BF₄⁻]	
	$\rho/g \cdot cm^{-3}$	n	$\rho/g \cdot cm^{-3}$	n	$\rho/g \cdot cm^{-3}$	n
293.15	1.28328	1.4150	1.20311	1.4220	1.14754	1.4275
303.15	1.27566	1.4095	1.19737	1.4200	1.14061	1.4255
313.15	1.26808	1.4070	1.19054	1.4180	1.13368	1.4235
323.15	1.26058	1.4060	1.18339	1.4160	1.12683	1.4215
333.15	1.25315	1.4035	1.17634	1.4150	1.12005	1.4200
343.15	1.24577	1.4020	1.16943	1.4135	1.11331	1.4170
T/K	[omim⁺][BF₄⁻]		[emim⁺][TfO⁻]		[bmim⁺][TfO⁻]	
	$\rho/g \cdot cm^{-3}$	n	$\rho/g \cdot cm^{-3}$	n	$\rho/g \cdot cm^{-3}$	n
293.15	1.10635	1.4325	1.38836	1.4330	1.29664	1.4370
303.15	1.09960	1.4305	1.37994	1.4315	1.28869	1.4345
313.15	1.09286	1.4285	1.37156	1.4290	1.28077	1.4320
323.15	1.08616	1.4265	1.36324	1.4265	1.27288	1.4290
333.15	1.07952	1.4245	1.35498	1.4245	1.26502	1.4270
343.15	1.07293	1.4220	1.34676	1.4220	1.25708	1.4260
T/K	[bmim⁺][O₂SO₄⁻]		[bmim⁺][PF₆⁻]		[hmim⁺][PF₆⁻]	
	$\rho/g \cdot cm^{-3}$	n	$\rho/g \cdot cm^{-3}$	n	$\rho/g \cdot cm^{-3}$	n
293.15	1.07139	1.4715	1.37071	1.4100	1.29726	1.4180
303.15	1.06484	1.4685	1.36236	1.4080	1.28937	1.4155
313.15	1.05839	1.4660	1.35399	1.4055	1.28149	1.4130
323.15	1.05200	1.4635	1.34570	1.4030	1.27362	1.4105
333.15	1.04561	1.4615	1.33749	1.4010	1.26580	1.4080
343.15	1.03926	1.4595	1.32936	1.3990	1.25804	1.4060
T/K	[omim⁺][PF₆⁻]		[emim⁺][NTf₂⁻]		[bmim⁺][NTf₂⁻]	
	$\rho/g \cdot cm^{-3}$	n	$\rho/g \cdot cm^{-3}$	n	$\rho/g \cdot cm^{-3}$	n
293.15	1.24019	1.4235	1.52383	1.4235	1.44033	1.4284
303.15	1.23253	1.4210	1.51374	1.4210	1.43081	1.4250
313.15	1.22499	1.4185	1.50371	1.4185	1.42016	1.4214
323.15	1.21745	1.4160	1.49374	1.4160	1.41155	1.4185
333.15	1.20992	1.4140	1.48385	1.4135	1.40221	1.4162
343.15	1.20243	1.4115	1.47397	1.4110	1.39163	1.4130
T/K	[hmim⁺][NTf₂⁻]		[omim⁺][NTf₂⁻]		[emim⁺][EtSO₄⁻]	
	$\rho/g \cdot cm^{-3}$	n	$\rho/g \cdot cm^{-3}$	n	$\rho/g \cdot cm^{-3}$	n
293.15	1.37633	1.4310	1.32480	1.4335	1.24130	1.4781
303.15	1.36717	1.4285	1.31590	1.4305	1.23501	1.4742
313.15	1.35804	1.4260	1.30704	1.4280	1.22781	1.4725
323.15	1.34897	1.4235	1.29823	1.4250	1.22132	1.4710
333.15	1.33995	1.4205	1.28942	1.4225	1.21456	1.4690
343.15	1.33097	1.4180	1.28065	1.4200	1.20794	1.4665

* Standard uncertainties u are $u(\rho)=0.00005$ g/cm³ with $u(T) = 0.03$ K and $u(n)=0.0002$ (nD) with $u(T) = 0.5$ K and, given the purity of sample (99%), the estimated expanded uncertainties u_e are $u_e(\rho)=0.001$ g/cm³ and $u_e(n)=0.0015$ (nD) (with 0.95 level of confidence ($k=2$)).

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

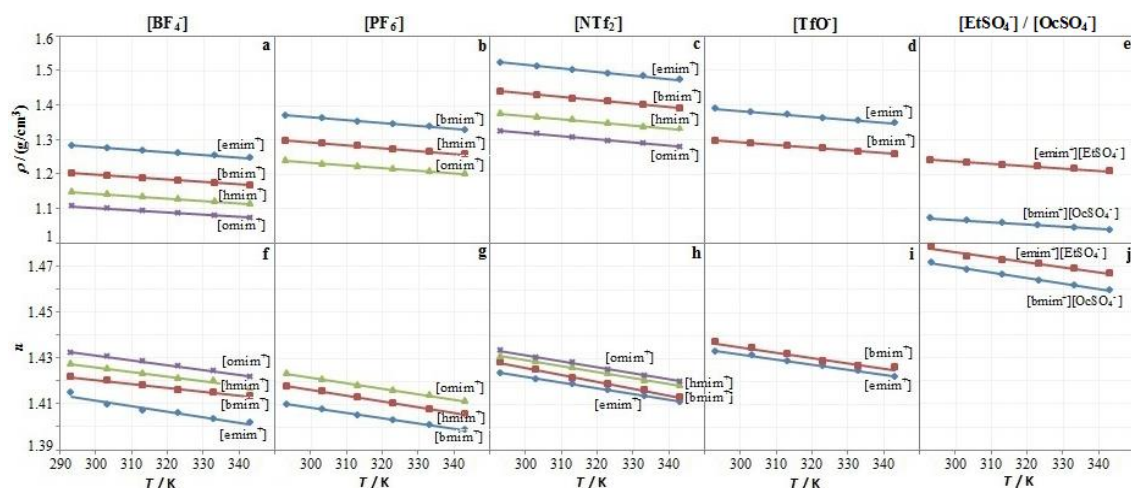


Figure 1.3. Density (ρ) and refractive index (n) of the studied ILs grouped by families with the same anion but varying cation length chain: $[\text{BF}_4^-]$ (a, f) $[\text{PF}_6^-]$ (b, g) $[\text{NTf}_2^-]$ (c, h) $[\text{TfO}^-]$ (d, i) $[\text{EtSO}_4^-]$ and $[\text{OcSO}_4^-]$ (e, j). Parameters for linear fitting can be found in Tables 1.S2 (ρ) and 1.S8 (n) (supporting information).

According to Figure 1.3 (graphs a-e), the ionic liquid density increases with a decrease in the alkyl chain length of the cation, the order followed by the families being: $[\text{emim}^+] > [\text{bmim}^+] > [\text{hmim}^+] > [\text{omim}^+]$. It might be reasoned that the increasing volume occupied by the cations results from the increase in interionic separation and the lowered packing efficiency with the elongation of the alkyl chain length, resulting in a lower overall density [29].

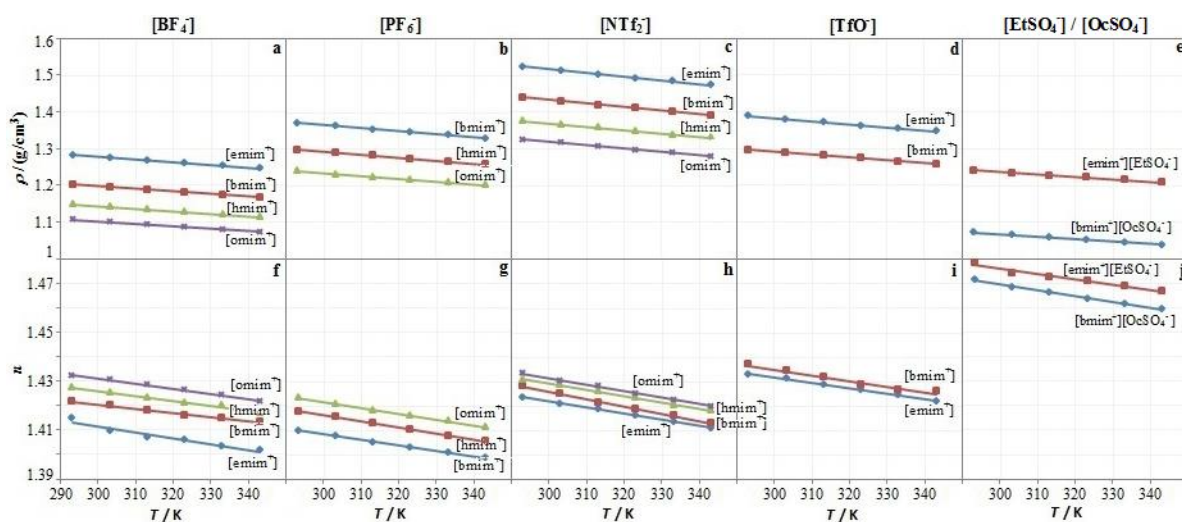


Figure 1.4. Density (ρ) and refractive index (n) of the studied ILs grouped by families with the same cation: $[\text{emim}^+]$ (a, e) $[\text{bmim}^+]$ (b, f) $[\text{hmim}^+]$ (c, g) $[\text{omim}^+]$ (d, h). Parameters for linear fitting can be found in Tables 1.S2 (ρ) and 1.S8 (n) (supporting information).

The order observed in the density for the families with the same cation is: $[\text{NTf}_2^-] > [\text{PF}_6^-] > [\text{TfO}^-] > [\text{BF}_4^-] > [\text{EtSO}_4^-] > [\text{OcSO}_4^-]$, as seen in Figure 4 (graphs a-d). Most authors [5, 11, 30] state that the density of ILs increases with the molecular weight of the anion. In our case,

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

the order (in decreasing molecular weight) is: $[\text{NTf}_2^-]$ ($280.133 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) $>$ $[\text{OcSO}_4^-]$ ($209.280 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) $>$ $[\text{TfO}^-]$ ($149.062 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) $>$ $[\text{PF}_6^-]$ ($144.961 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) $>$ $[\text{EtSO}_4^-]$ ($125.126 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) $>$ $[\text{BF}_4^-]$ ($86.802 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Clearly our results do not follow the mentioned rule. We shall explain this discrepancy using molecular volumes (see below).

The density of the ILs studied decreases as the temperature was raised, following a linear correlation. Such linear behavior is usual for ILs and is due to the pronounced difference between the working temperatures and the critical temperatures (unreachable and therefore hypothetical). Data were fitted to the equation of the type ($\rho = \rho_0 T + \rho_1$), whose parameters are listed in Table 1.S1 of supporting information with their standard deviations (S.D). The S.D values were calculated by applying the following expression:

$$S.D = \left[\frac{\sum (z_{\text{exp}} - z_{\text{cal}})^2}{n} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

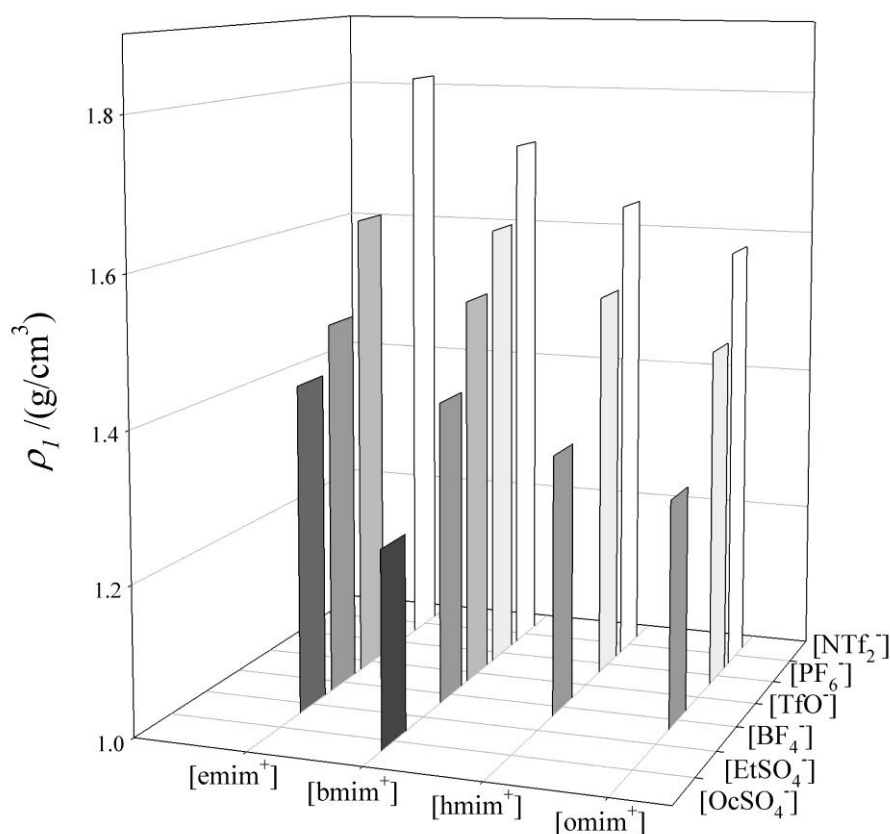


Figure 1.5. Variation of ρ_1 (in the equation $\rho = \rho_0 T + \rho_1$) as a function of different anions and cations.

Figure 1.5 clearly illustrates the variation of ρ_1 (in the equation $\rho = \rho_0 T + \rho_1$) as a function of different anions and cations. A similar plot for ρ_0 shows the same dependence. This behavior was

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

also reported by other authors, such as Fredlake *et al.* [28] and Li *et al.* [31], who related it with solubility, as did, for example, Marsh *et al.* [17] who demonstrated that in the case of 1-alkyl-3-alkylimidazolium cation replacing the $[\text{PF}_6^-]$ anion with $[\text{BF}_4^-]$ dramatically increases the solubility of the ionic liquid in water, while replacement with the $[\text{NTf}_2^-]$ ion decreases the water solubility. Further, the change in length of the 1-alkyl chain from 1 to 9 in 1-alkyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate turns the liquid from being soluble in water to being very immiscible. It must be concluded that ionic liquid density is adjustable depending on the structure of the cation and anion, and this affects over other properties.

We also observe (see Table 1.S1 at supporting information) that the decrease in density due to an increase in temperature is slightly less important as the length of the cation increases, which, again, supports the idea of a lesser packing efficiency for longer chains. The effect of a variation of temperature on density does not follow a trend with the molecular weight of the anion.

From the temperature-dependent density data the thermal expansion coefficient, α_p , can be calculated by:

$$\alpha_p = -\left(\frac{\partial \rho}{\partial T}\right)_p \quad (2)$$

The coefficient α_p has been listed in supporting information (Table 1.S2) for all investigated ILs and over a temperature range of from 293.15 to 343.15 K. The calculated values lie in a range of (5.47-6.78) (10^{-4} K^{-1}) which are typical values for ILs [16, 29].

1.3.2. How to predict the density and molecular volume of ILs.

In a different approximation, we can analyze our results in terms of volume. Volume is more informative about structure and packing efficiency than density, and the conclusions and predictions obtained for volume can be immediately translated to density values. The molecular volume V_m (or formula-unit volume) of a salt is a physical observable and is defined as the sum of the ionic volumes, V_{ion} , of the constituent ions [32]. For a binary IL, V_m is given by:

$$V_m = V_{cat} + V_{an} \quad (3)$$

If we define the molecular volume (V_m) as

$$V_m = (M_w/\rho)/N_A \quad (4)$$

In equation 4, M_w is the molecular weight and N_A is Avogadro's constant, we can study the influence in V_m (see Table 1.S2 for numerical values) of the characteristics of the ions.

Regarding the cations, our data (see Figure 1.S1 and Table 1.S2 in supporting information) reveal a linear increase of V_m with increasing alkyl chain length, and so, with the volume of the

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

cation. From the slope of the linear fit to dV_m/dN_C , with N_C being the number of carbons of the imidazolium alkyl chain, the volume of one methylene group (-CH₂-) is calculated to be $0.0281 \pm 0.0004 \text{ nm}^3$ (between 0.0279 and 0.0289 nm^3) at 293.15 K , corresponding to a molar volume of $17 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$. These values agree well with the calculations of Kolbeck *et al.* [29] (0.0283 nm^3), Glasser [33] (0.0272 - 0.0282 nm^3) and Tariq *et al.* [11] ($17 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$) at 298.15 K . Therefore, according to our results the increase in molecular volume per added methylene group is always the same, irrespective of the nature of the anion of the ionic liquid, and, as a consequence, the volume that the cation occupies varies linearly with the number of carbons. Then, we can conclude, that the length of the chain does not change significantly the interaction between ions or the packing efficiency of cations.

We can study the effect of the volume of the ion in the global V_m . The ionic volume is a measure of the size of an ion, equally valid for symmetrical and nonsymmetrical ions. But, to obtain quantitatively the volume of the constituents in an IL is not a trivial task. One way is to define the contribution of one of the ions to the molecular volume and, from equation 3, to obtain the other ionic volume. To do so, Slattery *et al.* [32] have proposed to derive the volume of the cation from crystal structures (e.g., the CCDC Database) [34] containing the ion of interest in combination with a reference ion of known volume or predicted by the contribution methods proposed by Rebelo *et al.* [35] and Jacquemin *et al.* [36, 37]. From the cationic volumes obtained by Slattery *et al.* [32] and our experimental molecular volume for each temperature, it is possible to assess the fraction of the molecular volume not occupied by the cation, V_{an} , and the density of it, ρ_{an} ($\rho_{an} = M_{Wanion}/V_{an}$). The values of V_m , M_w , M_{Wanion} , V_{an} and ρ_{an} are reported in Table 1.S3 (supporting information). We think that this is not a good approximation. Ionic volume assigns a certain fraction of the total molecular volume to one of the ions. When doing so, the ionic volume is a measure not only of the volume of the actual molecular structure of the ion, but also of the interionic separation. This interionic separation must be the consequence of the interactions between ions, mainly due to electrostatic attraction, but also of geometry of their molecular structures, their polarizability, their ability to establish some other type of interactions (i.e. hydrogen bond) and other factors. Then, it is not plausible to assume that the volume of the cation is not affected by the anion in front (like it is proposed in this method), and, at the same time, to assume that the volume of the anion changes with the cation in a very significant amount (i.e. from Table 1.S3 in supporting information, for [BF₄⁻] we find a 35% increase from [emim⁺] to [omim⁺]). Another question is that in this treatment it is not clear the effect of temperature on the ionic volumes. Clearly, if we assume that molecular structure (i.e. covalent bonds) are temperature independent in a certain temperature range, but an increment in T decreases density (and increases V_m), then the increment in ionic volumes should mean that the interionic distances increase. Following our argument, if there is no change in molecular structure that justifies a significant change in the geometry of packing, the main reason for the increase in the interionic distance should be a decrease in the strength of interaction, what should have other known consequences as the decrease in viscosity.

We now propose an alternative way to assign the ionic volume, and so to explain the experimental results of density. Volume of a given chemical structure can be theoretically calculated. We used the web page chemicalize.org [38] to obtain the van der Waals volume of the ions studied. This volume is not comparable with the ionic volume, because it only takes into account the isolated molecular structure and it is independent of the temperature. We propose below a way to assign the ionic volumes from the theoretically calculated volumes of the components and the experimental measurements of density, which takes into account the effect of temperature.

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

Table 1.3

Volume of molecular structure from theoretical calculation (structure volume), ionic volume proposed in this work and ionic volume proposed by Slattery *et al.* [32] for the alkyl methylimidazolium cations present in the ILs studied in this work at 293,15K at pressure $p=0.1$ MPa

Cation	Structural volume /nm ³ -theoretical-	Ionic volume /nm ³ - this work -	Ionic volume/nm ³ - Slattery <i>et al.</i> [32]-
[emim ⁺]	0.11553	0.19142	0.156
[bmim ⁺]	0.14945	0.24762	0.196
[hmim ⁺]	0.18341	0.30388	0.242
[omim ⁺]	0.21735	0.36012	0.288

From the values of the theoretical van der Waals volume obtained for the set of alkyl methylimidazolium cations used in this work (see Table 1.3), it is straightforward to assign a molecular volume to one methylene group (-CH₂-), $V_{(CH_2)Theo}=0.01697\pm 0.00001$ nm³. If we compare with the value obtained from experimental values of density at 293.15 K, $V_{(CH_2)Density}=0.0281\pm 0.0004$ nm³, the increment is 65.7%. In our hypothesis, this increment includes the fraction corresponding to the cation of interionic distance. Given that this increment is the same regardless of the length of the alkyl chain of the cation or the anion in front, it is reasonable to assume that this increment is approximately the same for the theoretically calculated volume of the whole molecule, what allows us to assign a ionic volume of the cation.

For comparison purposes, Table 1.3 includes ionic volume for the cations used in this work proposed by Slattery *et al.* [32]. Their values are systematically lower than ours. In addition, they propose a $V_{-CH_2-}=0.023$ nm³, lower than ours and other found in the literature (see above). While Slattery *et al.* [32] proposed a constant absolute increment of ionic volume, we propose a constant percentual increment of ionic volume with alkyl chain length.

Using equation 3, we can obtain the ionic volume occupied by the anions at 293.15K (see Table 1.4).

Table 1.4

van der Waals volume of molecular structure from theoretical calculation (structural volume) and ionic volume proposed in this work for anions present in the ILs studied at 293.15K at pressure $p=0.1$ MPa

Anion	Structural volume/nm ³ -theoretical-	Ionic volume/nm ³ - this work -	% increment
[BF ₄ ⁻]	0.05420	0.0634±0.0008	17
[PF ₆ ⁻]	0.07135	0.0952±0.0007	33
[TfO ⁻]	0.08520	0.1201±0.0010	41
[EtSO ₄ ⁻]	0.09639	0.1242	29
[NTf ₂ ⁻]	0.15671	0.2349±0.0002	50
[O _c SO ₄ ⁻]	0.19820	0.2919	47

We find various advantages in this procedure. First, we are able to obtain a plausible ionic volume for the anions participating in the IL studied. Our results show that the ionic volume of the anion is not affected significantly by the length of the alkyl chain of the cation.

The second consequence of our approximation is that there is a very good correlation between the molecular volume with both, volume of the cation and also with the volume of the anion.

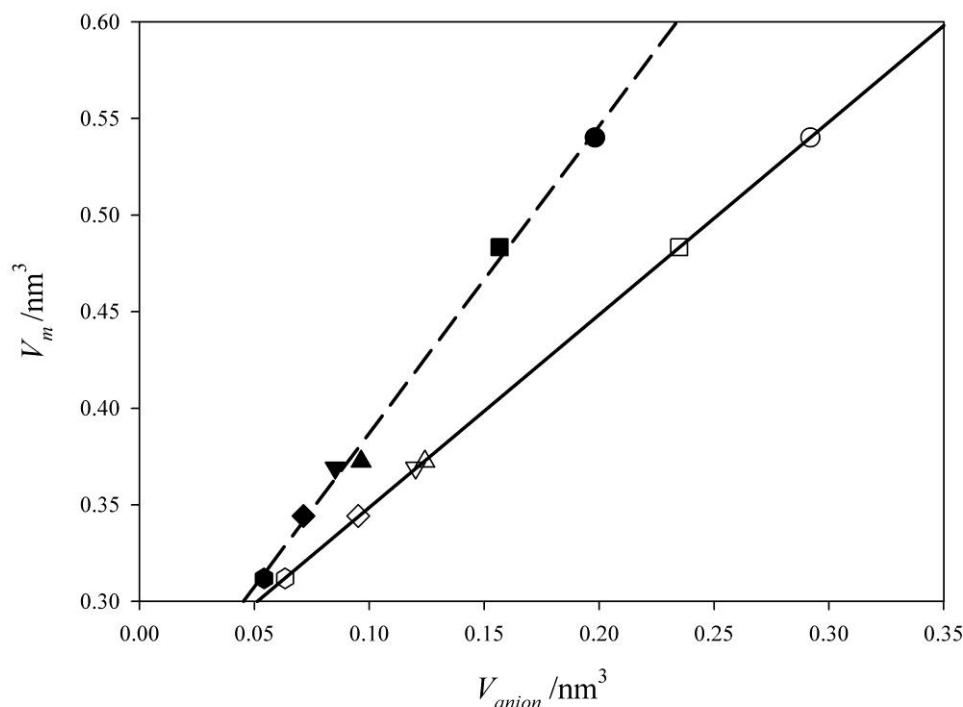


Figure 1.6. Molecular volume at 293.15 K of ILs based on [bmim⁺] versus volume of anion. ● [OcSO₄⁻]; ■ [NTf₂⁻]; ▲ [EtSO₄⁻]; ▼ [TfO⁻]; ◆ [PF₆⁻]; ● [BF₄⁻]. V_m for [bmim⁺][EtSO₄⁻] is not measured but predicted. Full symbols are for van der Waals theoretically calculated anionic volume. Empty symbols are for our proposed ionic volume obtained from averages over experimental measurements of density (Table 1.4). In this plot, standard deviations are smaller than symbols. Fitting results: - - - Theoretical volume $V_m = 1.592V_{an} + 0.2279 \text{ nm}^3$, $r^2 = 0.9956$. ——— Ionic volumes $V_m = 0.9980V_{an} + 0.2489 \text{ nm}^3$, $r^2 = 0.99999$.

Indeed, in Figure 1.6, we observe that volume of the anion is the fundamental factor to determine the molecular volume (the higher the volume of the anion, the higher V_m). According to theoretical calculations (Table 1.4) the order of volumes is: [OcSO₄⁻] > [NTf₂⁻] > [EtSO₄⁻] > [TfO⁻] > [PF₆⁻] > [BF₄⁻]. As we mentioned before, it is very likely that some other factors (geometry of the anion, distribution of charge, ...) have some influence in the global volume, but according to our results their importance is smaller than the volume of the anion. These data explain the trend observed in the experimental values of the density.

Using our treatment, we can obtain the increment of anionic volume respect to the theoretical volume of the molecular structure (Table 1.4). This increment takes into account interionic distances and effect of temperature and could be taken as a measure of the packing quality. If we assume this idea, we conclude that packing quality is higher for small molecules, but when the size of the anion becomes similar to the cation, the packing quality decreases, reaches a certain level and probably other factors than volume become significant.

Finally, this treatment allows us to predict with high accuracy the densities of all the combinations at all temperatures of these anions and cations by obtaining molecular volumes of ILs after assigning proper ionic volumes to its constituents. Indeed, following the method we

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

have used for $T=293.15$ K for the rest of temperatures studied, we obtain (see Figure 1.S2 in supporting information) a linear dependence $V_{CH_2}=1.922 \times 10^{-5}T + 0.02247 \text{ nm}^3$ ($r^2=0.9996$) of the ionic volume of CH_2 with temperature (numerical values in supporting material, Table 1.S4). Knowing this quantitative dependence the ionic volume of alkyl imidazolium cations with different alkyl chain length can be properly assigned for any temperature. We propose the following equation:

$$V_{al-imid} = V_{al-imid-theo}(1.328+1.120 \times 10^{-3}T) \quad (5)$$

Or in terms of number of carbons

$$V_{al-imid} = (0.08159+0.01697N_C)(1.328+1.120 \times 10^{-3}T) \quad (6)$$

In equation 5, $V_{al-imid}$ is the ionic volume of any alkyl imidazolium cation and $V_{al-imid-theo}$ is the calculated theoretical van der Waals volume, both in nm^3 . In equation 6, N_C is the number of carbons and T is the temperature in Kelvin. Although the limits of validity should be established it is likely that the range of application of these equations is rather broad.

Regarding the dependence of the ionic volumes of the anions studied in this work on temperature, in all cases we find a very good linear dependence, with a tendency to higher slopes for higher ionic volumes (see Figure 1.S3 and Table 1.S5 for numerical values in supporting information). From our results, the ionic volume of these ions can be predicted for any temperature:

$$V_{BF_4} = V_{BF_4theo}(1.083+0.365 \times 10^{-3}T) = 0.0587+1.98 \times 10^{-5}T \quad (7)$$

$$V_{PF_6} = V_{PF_6theo}(1.171+0.596 \times 10^{-3}T) = 0.0835+4.25 \times 10^{-5}T \quad (8)$$

$$V_{NTf_2} = V_{NTf_2theo}(1.201+1.032 \times 10^{-3}T) = 0.1882+16.17 \times 10^{-5}T \quad (9)$$

$$V_{TFO} = V_{TFOtheo}(1.200+0.738 \times 10^{-3}T) = 0.1022+6.29 \times 10^{-5}T \quad (10)$$

$$V_{EtSO_4} = V_{EtSO_4theo}(1.156+0.468 \times 10^{-3}T) = 0.1114+4.51 \times 10^{-5}T \quad (11)$$

$$V_{OctSO_4} = V_{OctSO_4theo}(1.233+0.829 \times 10^{-3}T) = 0.0835+16.44 \times 10^{-5}T \quad (12)$$

In equations 7-12, V_{anion} is the ionic volume of each anion and $V_{anion-theo}$ is the calculated theoretical van der Waals volume, both in nm^3 . T is the temperature in Kelvin.

To check our procedure, we have compared the calculated densities from equations 3 to 12 with our experimental values and some others found in the literature [11, 13, 18, 23, 25, 36, 39-43]. As an illustration, some results are plotted in Figure 1.7 (see also Figure 1.S4 and Tables 1.S6.a and 1.S6.b for numerical values in supporting information).

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

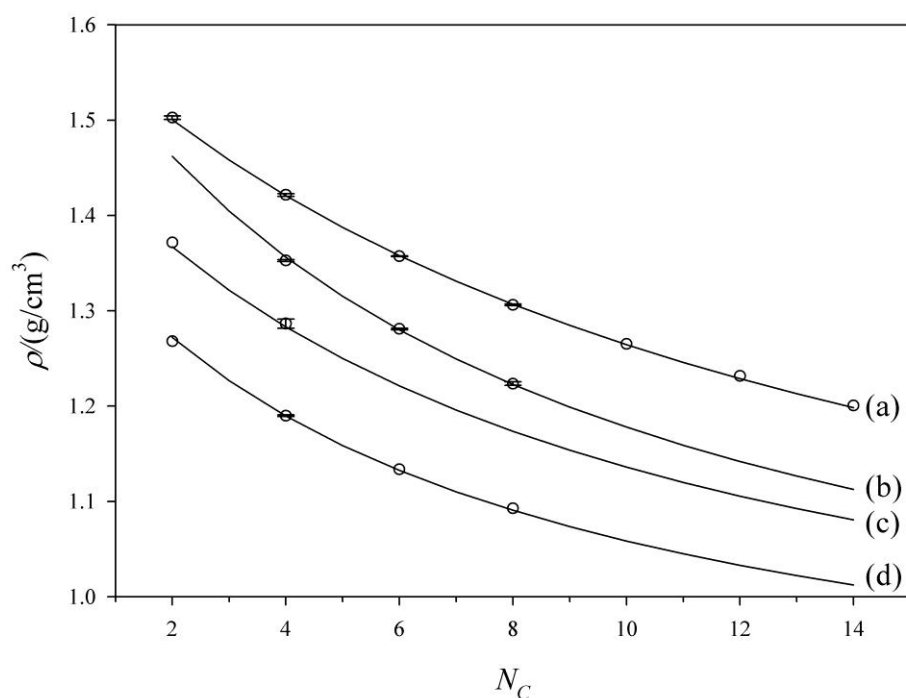


Figure 1.7. Density at 313.15K of different ILs versus number of carbons of the alkyl chain of the cation. The anions are: (a) $[\text{NTf}_2^-]$; (b) $[\text{PF}_6^-]$; (c) $[\text{TfO}^-]$; (d) $[\text{BF}_4^-]$. \circ Experimental (averaged from different sources, see Table 1.S6.b for numerical values); (—) Predicted from equations (3) to (12). For experimental values, the error bars are smaller than the size of the symbol.

Tariq *et al.* [11] (Table 1.1) showed the experimental density of some ILs composed with combinations of cations and anions not used in this work. A further test for our method is to predict volumes of these ions. For $T=293.15\text{K}$, we obtain the volume of methylsulfate ($[\text{MeSO}_4^-]$) and acetate ($[\text{OAc}^-]$): $V_{\text{MeSO}_4} = 0.0956 \text{ nm}^3$; $V_{\text{OAc}} = 0.0640 \text{ nm}^3$. The volume of the trihexyl(tetradecyl)phosphonium cation ($[\text{P}_{6,6,6,14}^+]$) can be obtained from data of three different ILs: $[\text{P}_{6,6,6,14}^+][\text{NTf}_2^-]$; $[\text{P}_{6,6,6,14}^+][\text{TfO}^-]$; $[\text{P}_{6,6,6,14}^+][\text{OAc}^-]$. We obtain $V_{[\text{P}_{6,6,6,14}^+]} = 0.945 \pm 0.002 \text{ nm}^3$. We can see that, although $[\text{P}_{6,6,6,14}^+][\text{OAc}^-]$ is formed by two ions not used to obtain the equations proposed in this work, the result obtained is very close to the ones obtained from the other ILs.

To have an idea of the quality of the predictions we can use the average deviation from experimental values. Then, we can compare our values (see Table 1.S6.a and 1.S6.b in supporting information) with those shown in Table 1.1 of Tariq *et al.* [11] using four different previous methods (see references within). Those average deviations are between $\sigma_{\text{ave}}=0.21$ and $\sigma_{\text{ave}}=1.29$. Our method gives $\sigma_{\text{ave}}=0.13$.

As a summary, with our results we should be able to predict, prior to synthesis, the density and molecular volumes for IL with alkyl imidazolium cations and with different anions (and very likely combinations of ions of similar chemical structure) in a wide range of temperatures from easily accessible theoretical calculations of the structure of the proposed ions.

1.3.3. Refractive index: results and correlation

The refractive index is the ratio between the speed of wave propagation in the reference medium (for example the vacuum for electromagnetic waves) and its speed in the work medium. This value describes the ability to refract light as it moves from one medium to another and, therefore, the higher the refractive index of a given compound, the more the light is refracted [12].

The refractive index data for [bmim⁺][BF₄⁻] were compared with previously published values in order to validate our method (Table 1.1). Small deviations were observed (increasing with temperature) in our data from the values in the literature, probably due to the effect of sample purity, the experimental method and equipment used. The deviations in the measurements (our data and literature) are from 0.0003 to 0.0020 for the whole range of temperatures studied. In light of these values, it can be affirmed that the data reported here are in good agreement with most of the available literature, thereby justifying our experimental procedure.

The refractive indices of ILs were measured at atmospheric pressure and over a temperature range of from 293.15 to 343.15 K. The experimental values are reported in Table 1.2. As with the density, the refractive index of the ILs studied decreased almost linearly with the increasing temperature, as seen in Figure 1.3 (graphs f-j) and Figure 1.4 (graphs e-h). The respective experimental refractive indices were correlated as a function of temperature using an empirical equation of the same type as for density ($n = n_0T + n_1$). The values of n_0 and n_1 , estimated by fitting the above equation, are displayed in Table 1.S7 of the supporting information, along with the standard deviation calculated as shown in equation (1).

From Figure 1.3, it can be noted that [bmim⁺][OcSO₄⁻] and [emim⁺][EtSO₄⁻] have higher values (above 1.45) than the other ILs. From these plots (graphs f-i) it is possible to analyze the influence the alkyl chain length of the cation. The refractive index increased with an increase in the alkyl chain length of the cation: [omim⁺] > [hmim⁺] > [bmim⁺] > [emim⁺]. The variation in the refractive index was in inverse order to that of density and it could almost be considered a mirror of the same, especially for the families of [BF₄⁻] and [PF₆⁻], which also show the same spacing (graphs a, f, b, g). If we bear in mind that the refractive index can be used as a measure of the electronic polarizability of a molecule and provides useful information, from a qualitative point of view, when studying the forces between molecules or their behavior in solution, our results agree with the assertion that the longer the length of the alkyl chain the higher the refractive index.

Figure 1.4 (graphs e-h) represents the effect of the anion on the refractive index for the ILs studied. In this range of temperatures the results follow the trend: [EtSO₄⁻] > [OcSO₄⁻] > [TfO⁻] > [NTf₂⁻] > [BF₄⁻] > [PF₆⁻], which cannot be considered a mirror image of the density. When comparison is applicable, our results follow the same trend than those published by Tariq *et al.* [11]. In addition to van der Waals volume, theoretical values of molecular refractivity or molecular polarizability can be calculated in the web page chemicalize.org [38]. We have checked that values of refraction index do not follow the tendency of any of these parameters. This is the same conclusion that Tariq *et al.* [11] obtained. The reason, according to their conclusions, is that, although molar refractions are typically related to molecular characteristics such as the polarizability or hard-core volume through the Clausius–Mossotti or Lorentz–Lorenz equations, in the particular case of ILs special care must be taken when using such

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

relations since most of the assumptions underlying their use – isotropic fluids composed of spherical non-interacting particles – make no sense from a physical perspective: ILs are built from non-spherical ions (at least one of them) and are nano-segregated, non-isotropic fluids composed of a polar network permeated by non-polar domains.

1.3.4. Density and refractive index correlations

The density and refractive index were correlated using several empirical equations of the form:

$$f(n)=k\rho \quad (13)$$

Where $f(n)$ is a function of the refractive index, k is an empirical constant that depends on the liquid and the wavelength at which the refractive index is measured, and ρ is the density of the liquid. The $f(n)$ function is associated to several empirical equations. In this work, we have used the most common equations, those of Lorentz-Lorenz (14), Dale-Gladstone (15), Eykman (16), Oster (17), Arago-Biot (18) and Newton (19), which have also been used by different authors to correlate the density with the refractive index.

$$f(n) = (n^2 - 1)/(n^2 + 2) \quad (14)$$

$$f(n) = (n - 1) \quad (15)$$

$$f(n) = (n^2 - 1)/(n + 0.4) \quad (16)$$

$$f(n) = (n^2 - 1)(2n^2 + 1)/n^2 \quad (17)$$

$$f(n) = n \quad (18)$$

$$f(n) = (n^2 - 1) \quad (19)$$

All these equations assume that the relation between density and refractive index is temperature independent. But, from our results (see Tables 1.S2 and 1.S8 in supporting information) it can be deduced that k in equation 13 has a certain dependence on T (as it is illustrated below in Figure 1.8 in the case of equation 18).

Nevertheless, as a first approximation, and assuming that the dependence is small, it is worth finding the equation that best fits our experimental results. In this approximation we shall assume that $k=f(n)\rho$ only depends on the nature of IL. The value for each IL is obtained as the average for all the temperatures. The standard deviation is obtained as described in equation 1. From these calculations (Table 1.S8 in supporting information) we conclude that the Oster equation, is the one that best fitted our experimental results.

As mentioned above, a small dependence of k on T can be observed from our experimental results, and, as a consequence, we used another approach, defining $k=n/\rho$ and fitting the results

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

to a linear equation in the form $k=k_0T+k_1$. Figure 1.8 (numerical values can be found in Table 1.S9 in supporting information) shows the good quality of the fittings.

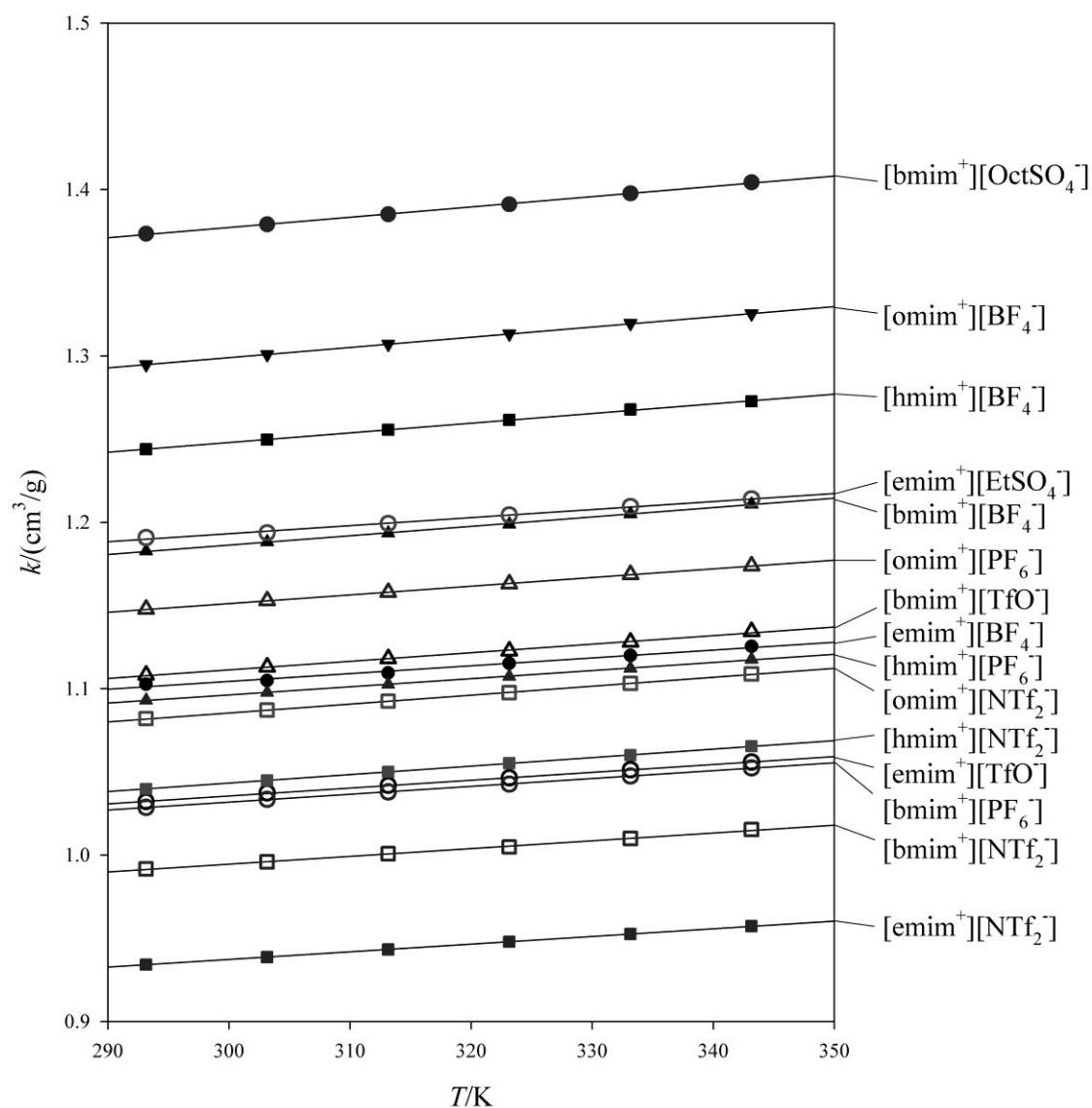


Figure 1.8. Values of $k=n/\rho$ of different ILs for different temperatures. Parameters for linear fitting can be found in Table 1.S9 (supporting information).

As a consequence, we think that a very good and simple description of the correlation between density and the refraction index can be obtained by including the dependence on T . If we compare the S.D. results with those in Table 1.S8 for any of the equations proposed, a substantial improvement in the quality of the fitting can be observed. Given the quality of the data, once the quantitative relation between density and refractive index is known in a range of temperatures, it is possible just to measure one of these properties at any temperature (probably even outside the range) to know the value of the other with a high degree of precision.

1.4. CONCLUSIONS

After measuring the density and refractive index of 15 room temperature ILs grouped by families (same cation or anion at atmospheric pressure in a temperature range from 293.15 to 343.15 K) the ionic liquid density was seen to increase as the alkyl length of the cation decreased. On the other hand, density does not increase following the trend of the molecular weight of the anion.

The refractive index increases with the alkyl chain length of the cation. Our results agree with the idea that the longer the length of the alkyl chain, the higher the electronic polarizability of the molecule. No clear correlation can be found with molecular weight, van der Waals volume, calculated molar refractivity or calculated molar polarizability. We support the explanation given by Tariq *et al.* [11].

When we quantified these effects using linear equations to show the influence of the temperature for each IL, the decrease in density due to an increase in temperature was found to be slightly less important when the cation is longer, which again supports the idea of a lower packing efficiency for longer chains.

The effect of a variation in temperature on the refractive index is less pronounced than in the case of density and no clear tendency can be detected according to the length of the cation or the molecular weight of the anion.

The correlation between density and the refraction index is usually described in the bibliography by equations which are assumed to be temperature independent, we have shown that a substantial improvement can be obtained if the dependence on temperature is included.

We have found a way to explain the behavior of the density of ILs studied based on the molecular volume. With the results shown in this work we should be able to predict, prior to synthesis, the density and molecular volumes for IL with alkyl imidazolium cations and with different anions (and very likely combinations of ions of similar chemical structure) in a wide range of temperatures from easily accessible theoretical calculations of the structure of the proposed ions.

Finally, our results support the idea that ILs can be designed with adjustable properties (at least density and refractive index, but very probably some others) based on the structure of the cation and anion chosen. Our data may provide valuable contributions for the design and study of present and future ILs.

1.5. REFERENCES

- [1] P. Kubisa, Ionic liquids as solvents for polymerization processes—Progress and challenges, *Prog. Polym. Sci.* 34 (2009) 1333–1347.
- [2] Y. Qiao, Y. Ma, Y. Huo, P. Ma, S. Xia, A group contribution method to estimate the densities of ionic liquids, *J. Chem. Thermodyn.* 42 (2010) 852–855.
- [3] Y.A. Sanmamed, D. González-Salgado, J. Troncoso, L. Romani, A. Baylaucq, C. Boned, Experimental methodology for precise determination of density of RTILs as a function of temperature and pressure using vibrating tube densimeters, *J. Chem. Thermodyn.* 42 (2010) 553–563.
- [4] M. Shamsipur, A.A.M. Beigi, M. Teymouri, S.M. Pourmortazavi, M. Irandoust, Physical and electrochemical properties of ionic liquids 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, 1-butyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate and 1-butyl-1-methylpyrrolidinium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, *J. Mol. Liq.* 157 (2010) 43–50.
- [5] A.B. Pereiro, J.L. Legido, A. Rodríguez, Physical properties of ionic liquids based on 1-alkyl-3-methylimidazolium cation and hexafluorophosphate as anion and temperature dependence, *J. Chem. Thermodyn.* 39 (2007) 1168–1175.
- [6] Y.A. Sanmamed, D. González-Salgado, J. Troncoso, C.A. Cerdeiriña, L. Romani, Viscosity-induced errors in the density determination of room temperature ionic liquids using vibrating tube densitometry, *Fluid Phase Equilib.* 252 (2007) 96–102.
- [7] A. Heintz, Recent developments in thermodynamics and thermophysics of non-aqueous mixtures containing ionic liquids. A review, *J. Chem. Thermodyn.* 37 (2005) 525–535.
- [8] A. Muhammad, M.I. Abdul Mutalib, C.D. Wilfred, T. Murugesan, A. Shafeeq, Thermophysical properties of 1-hexyl-3-methyl imidazolium based ionic liquids with tetrafluoroborate, hexafluorophosphate and bis(trifluoromethylsulfonyl)imide anions, *J. Chem. Thermodyn.* 40 (2008) 1433–1438.
- [9] J.G. Huddleston, A.E. Visser, W.M. Reichert, H.D. Willauer, G.A. Broker, R.D. Rogers, Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation, *Green Chem.* 3 (2001) 156–164.
- [10] Q. Zhou, L.-S. Wang, H.-P. Chen, Densities and viscosities of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate + H₂O binary mixtures from (303.15 to 353.15) K, *J. Chem. Eng. Data* 51 (2006) 905–908.
- [11] M. Tariq, P.A.S. Forte, M.F.C. Gomes, J.N.C. Lopes, L.P.N. Rebelo, Densities and refractive indices of imidazolium- and phosphonium-based ionic liquids: Effect of temperature, alkyl chain length, and anion, *J. Chem. Thermodyn.* 41 (2009) 790–798.

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

- [12] A.A. Miran Beigi, M. Abdouss, M. Yousefi, S.M. Pourmortazavi, A. Vahid, Investigation on physical and electrochemical properties of three imidazolium based ionic liquids (1-hexyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl) imide and 1-butyl-3-methylimidazolium methylsulfate), *J. Mol. Liq.* 177 (2013) 361–368.
- [13] R. Gomes de Azevedo, J.M.S.S. Esperança, J. Szydłowski, Z.P. Visak, P.F. Pires, H.J.R. Guedes, L. P. N. Rebelo, Thermophysical and thermodynamic properties of ionic liquids over an extended pressure range: [bmim][NTf₂] and [hmim][NTf₂], *J. Chem. Thermodyn.* 37 (2005) 888–899.
- [14] P. Wasserscheid, W. Keim, Ionic liquids-New “Solutions” for Transition Metal Catalysis, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 3772–3789.
- [15] F.J. Hernández-Fernández, A.P. de los Ríos, M. Rubio, D. Gómez, G. Villora, Enhancement of activity and selectivity in lipase-catalyzed transesterification in ionic liquids by the use of additives, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (2007) 882–887.
- [16] A.N. Soriano, B.T. Doma Jr., M.-H. Li, Density and refractive index measurements of 1-ethyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 41 (2010) 115–121.
- [17] K. Marsh, J. Boxall, R. Lichtenthaler, Room temperature ionic liquids and their mixtures—a review, *Fluid Phase Equilib.* 219 (2004) 93–98.
- [18] M.A. Iglesias-Otero, J. Troncoso, E. Carballo, L. Romani, Density and refractive index in mixtures of ionic liquids and organic solvents: Correlations and predictions, *J. Chem. Thermodyn.* 40 (2008) 949–956.
- [19] B. Hasse, J. Lehmann, D. Assenbaum, P. Wasserscheid, A. Leipertz, A.P. Fröba, Viscosity, interfacial tension, density, and refractive index of ionic liquids [EMIM][MeSO₃], [EMIM][MeOHPO₂], [EMIM][OcSO₄], and [BBIM][NTf₂] in dependence on temperature at atmospheric pressure, *J. Chem. Eng. Data.* 54 (2009) 2576–2583.
- [20] J.G. Huddleston, A.E. Visser, W.M. Reichert, H.D. Willauer, G.A. Broker, R.D. Rogers, Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation, *Green Chem.* 3 (2001) 156–164.
- [21] Y. Deng, P. Husson, A.-M. Delort, P. Besse-Hoggan, M. Sancelme, M.F. Costa Gomes, Influence of an oxygen functionalization on the physicochemical properties of ionic liquids: density, viscosity, and carbon dioxide solubility as a function of temperature, *J. Chem. Eng. Data.* 56 (2011) 4194–4202.
- [22] J. Wang, Y. Tian, Y. Zhao, K. Zhuo, A volumetric and viscosity study for the mixtures of 1-n-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid with acetonitrile, dichloromethane, 2-butanone and N, N – dimethylformamide, *Green Chem.* 5 (2003) 618–622.
- [23] A.N. Soriano, B.T. Doma Jr., M.-H. Li, Measurements of the density and refractive index for 1-n-butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids, *J. Chem. Thermodyn.* 41 (2009) 301–307.

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

- [24] M.T. Zafarani-Moattar, H. Shekaari, Application of Prigogine–Flory–Patterson theory to excess molar volume and speed of sound of 1-n-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate or 1-n-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate in methanol and acetonitrile, *J. Chem. Thermodyn.* 38 (2006) 1377–1384.
- [25] R.L. Gardas, M.G. Freire, P.J. Carvalho, I.M. Marrucho, I.M.A. Fonseca, A.G.M. Ferreira, J. A. P. Coutinho, High-pressure densities and derived thermodynamic properties of imidazolium-based ionic liquids, *J. Chem. Eng. Data.* 52 (2007) 80–88.
- [26] P. Navia, J. Troncoso, L. Romani, Excess magnitudes for ionic liquid binary mixtures with a common ion, *J. Chem. Eng. Data.* 52 (2007) 1369–1374.
- [27] G. Vakili-Nezhaad, M. Vatani, M. Asghari, I. Ashour, Effect of temperature on the physical properties of 1-butyl-3-methylimidazolium based ionic liquids with thiocyanate and tetrafluoroborate anions, and 1-hexyl-3-methylimidazolium with tetrafluoroborate and hexafluorophosphate anions, *J. Chem. Thermodyn.* 54 (2012), 148–154.
- [28] C.P. Fredlake, J.M. Crosthwaite, D.G. Hert, S.N.V.K. Aki, J.F. Brennecke, Thermophysical properties of imidazolium-based ionic liquids, *J. Chem. Eng. Data.* 49 (2004) 954–964.
- [29] C. Kolbeck, J. Lehmann, K.R.J. Lovelock, T. Cremer, N. Paape, P. Wasserscheid, A.P. Fröba, F. Maier and H.-P. Steinrück, Density and surface tension of ionic liquids, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010), 17025–17036.
- [30] S. Seki, T. Kobayashi, Y. Kobayashi, K. Takei, H. Miyashiro, K. Hayamizu, S. Tsuzuki, T. Mitsugi, Y. Umebayashi, Effects of cation and anion on physical properties of room-temperature ionic liquids, *J. Mol. Liq.* 152 (2010) 9–13.
- [31] H. Li, G. Zhao, F. Liu, S. Zhang, Physicochemical characterization of MF_m-based ammonium ionic liquids, *J. Chem. Eng. Data.* 58 (2013) 1505-1515.
- [32] J.M. Slattery, C. Daguene, P.J. Dyson, T.J.S. Schubert, I. Krossing. How to predict the physical properties of ionic liquids: a volume-based approach, *Angew. Chem.* 119 (2007), 5480–5484.
- [33] L. Glasser, Lattice and phase transition thermodynamics of ionic liquids, *Thermochim. Acta* 421 (2004) 87-93.
- [34] F. H. Allen, The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising, *Acta Crystallogr. Sect. B* 58 (2002), 380-388.
- [35] L.P.N. Rebelo, V. Najdanovic-Visak, R. Gomes de Azevedo, J.M.S.S. Esperança, M. Nunes da Ponte, H.J.R. Guedes, Z.P. Visak, H.C. de Sousa, J. Szydłowski, J.N. Canongia Lopes, T.C. Cordeiro, in: R.D. Rogers, K.R. Seddon (Eds.), *Ionic Liquids IIIA: Fundamentals, Progress, Challenges, and Opportunities-Properties and Structure*, ACS Symposium Series 901, American Chemical Society, Washington DC, 2005, pp. 270–291 (Chapter 21).

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

- [36] J. Jacquemin, P. Nancarrow, D.W. Rooney, M.F. Costa Gomes, P. Husson, V. Majer, A.A.H. Pádua, C. Hardacre, Prediction of ionic liquid properties. I. Volumetric properties as a function of temperature and pressure, *J. Chem. Eng. Data* 53 (2008), 716–726.
- [37] J. Jacquemin, P. Nancarrow, D.W. Rooney, M.F. Costa Gomes, P. Husson, V. Majer, A.A.H. Pádua, C. Hardacre, Prediction of ionic liquid properties. II. Volumetric properties as a function of temperature and pressure, *J. Chem. Eng. Data* 53 (2008) 2133–2143.
- [38] <http://www.chemicalize.org> is a free chemical structure miner and web search engine developed and owned by ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).
- [39] J. Troncoso, C.A. Cerdeirina, Y.A. Sanmamed, L. Romani, L.P.N. Rebelo, Thermodynamic properties of imidazolium-based ionic liquids: Densities, heat capacities, and enthalpies of fusion of [bmim][PF₆] and [bmim][NTf₂], *J. Chem. Eng. Data* 51 (2006) 1856–1859.
- [40] J. Lachwa, P. Morgado, J.M.S.S. Esperança, H.J.R. Guedes, J.N.C. Lopes, L.P.N. Rebelo, Fluid-phase behavior of {1-hexyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl) imide, [C(6)mim][NTf₂], plus C-2-C-8 n-alcohol} mixtures: Liquid-liquid equilibrium and excess volumes, *J. Chem. Eng. Data* 51 (2006) 2215–2221.
- [41] A.B. Pereiro, A. Rodríguez, Thermodynamic properties of ionic liquids in organic solvents from (293.15 to 303.15) K, *J. Chem. Eng. Data* 52 (2007) 600–608.
- [42] A.B. Pereiro, A. Rodríguez, Study on the phase behaviour and thermodynamic properties of ionic liquids containing imidazolium cation with ethanol at several temperatures, *J. Chem. Thermodyn.* 39 (2007) 978–979.
- [43] P. Bonhôte, A.P. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyanasundarm, M. Gratzel, Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts, *Inorg. Chem.* 35 (1996) 1168–1178.

1.6. SUPPORTING INFORMATION

Table 1.S1

Fitting parameters to the equation $\rho = \rho_0 T + \rho_1$ for density ρ of ILs studied

ILs	$\rho_0 \times 10^4 / \text{g} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{K}^{-1}$	$\rho_1 / \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	r^2	S.D
[emim ⁺][BF ₄ ⁻]	-7.502	1.5031	0.99996	0.0001
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	-6.996	1.4072	0.99995	0.0001
[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	-6.848	1.3482	0.99996	0.0001
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	-6.687	1.3023	0.99998	0.0001
[emim ⁺][TfO ⁻]	-8.320	1.6322	0.99998	0.0001
[bmim ⁺][TfO ⁻]	-7.906	1.5284	1.00000	0.0000
[bmim ⁺][OcSO ₄ ⁻]	-6.421	1.2595	0.99997	0.0001
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	-8.276	1.6132	0.99997	0.0001
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	-7.848	1.5273	0.99999	0.0000
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	-7.548	1.4614	0.99999	0.0000
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-9.970	1.8160	0.99998	0.0001
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-9.655	1.7233	0.99927	0.0004
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-9.072	1.6422	0.99999	0.0001
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-8.829	1.5836	0.99999	0.0000
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	-6.704	1.4379	0.99982	0.0002

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

Table 1.S2

Experimental values of molecular volume, V_m , and thermal expansion coefficient, α_p , of the studied ILs at temperatures T ranging from 293.15 to 343.15 K at pressure $p=0.1$ MPa.

T/K	[emim ⁺][BF ₄ ⁻]		[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]		[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	
	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$
293.15	0.2561		0.3119		0.3676	
303.15	0.2577		0.3134		0.3698	
313.15	0.2592	5.93	0.3152	5.96	0.3721	6.06
323.15	0.2607		0.3171		0.3744	
333.15	0.2623		0.3190		0.3766	
343.15	0.2638		0.3209		0.3789	
<hr/>						
T/K	[omim ⁺][BF ₄ ⁻]		[emim ⁺][TfO ⁻]		[bmim ⁺][TfO ⁻]	
	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$
293.15	0.4234		0.3112		0.3691	
303.15	0.4260		0.3131		0.3714	
313.15	0.4286	6.14	0.3150	6.08	0.3737	6.19
323.15	0.4313		0.3169		0.3760	
333.15	0.4339		0.3189		0.3784	
343.15	0.4366		0.3208		0.3808	
<hr/>						
T/K	[bmim ⁺][O ₂ SO ₄ ⁻]		[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]		[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	
	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$
293.15	0.5401		0.3442		0.3996	
303.15	0.5434		0.3463		0.4021	
313.15	0.5467	6.09	0.3485	6.13	0.4045	6.14
323.15	0.5500		0.3506		0.4070	
333.15	0.5534		0.3528		0.4096	
343.15	0.5568		0.3549		0.4121	
<hr/>						
T/K	[omim ⁺][PF ₆ ⁻]		[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]		[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	
	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$
293.15	0.4556		0.4264		0.4834	
303.15	0.4584		0.4292		0.4866	
313.15	0.4612	6.18	0.4321	6.65	0.4903	6.72
323.15	0.4641		0.4349		0.4933	
333.15	0.4670		0.4378		0.4966	
343.15	0.4699		0.4408		0.5003	
<hr/>						
T/K	[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]		[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]		[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	
	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$	V_m/nm^3	$\alpha_p \times 10^{-4}/\text{K}^{-1}$
293.15	0.5397		0.5959		0.3160	
303.15	0.5434		0.5999		0.3177	
313.15	0.5470	6.71	0.6040	6.78	0.3195	5.47
323.15	0.5507		0.6081		0.3212	
333.15	0.5544		0.6122		0.3230	
343.15	0.5581		0.6164		0.3248	

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

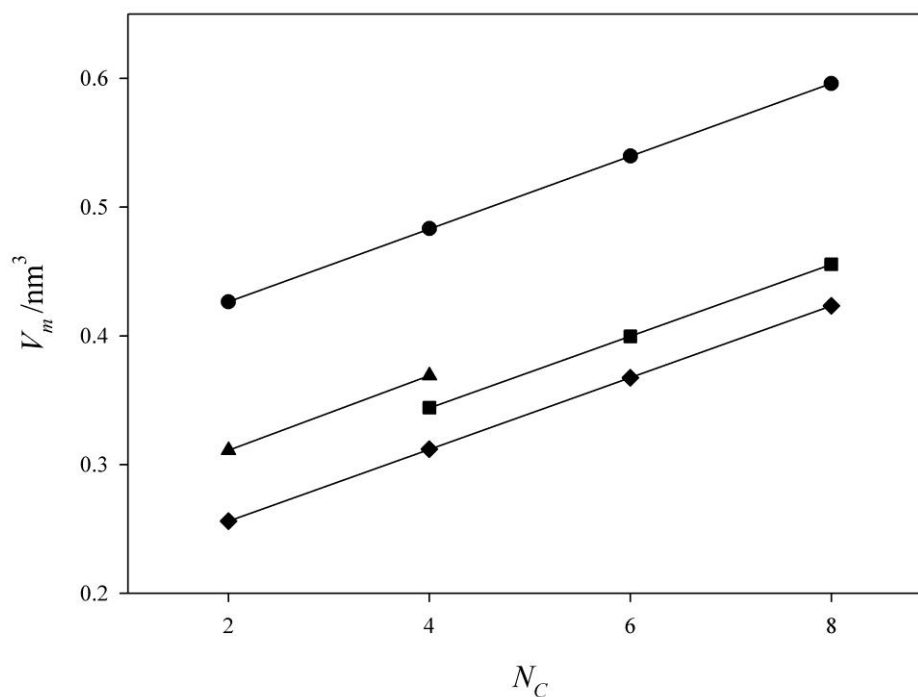


Figure 1.S1. Dependence of the ILs molecular volume V_m at 293.15 K on the alkyl chain length of the cation. ● [NTf₂⁻], linear fitting: $V_m=0.3702+0.02823N_C$, $r^2=0.99998$; ▲ [TfO⁻], linear fitting: $V_m=0.2533+0.02895N_C$, $r^2=1$; ■ [PF₆⁻], linear fitting: $V_m=0.2327+0.02785N_C$, $r^2=0.99999$; ◆ [BF₄⁻], linear fitting: $V_m=0.20035+0.02788N_C$, $r^2=0.99999$.

Table 1.S3

The molecular weight of the ionic liquid (M_w), molecular weight of the anion (M_{Wanion}), volume (V_{an}) and density of the molecular volume not occupied by the cation (ρ_{an}), for all investigated ILs obtained from the method proposed by Slattery *et al.* [32] for a temperature (T) of 293.15K at pressure $p=0.1$ MPa

IL	M_w /g·mol ⁻¹	M_{Wanion} /g·mol ⁻¹	V_{an} /nm ³	ρ_{an} /g·mol ⁻¹ ·nm ⁻³
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	391.31		0.270	1035.995
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	419.37	280.133	0.287	976.073
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	447.43		0.298	940.991
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	475.47		0.308	909.818
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	284.18		0.148	978.144
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	312.24	144.961	0.158	919.803
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	340.29		0.168	864.922
[emim ⁺][TfO ⁻]	260.23		0.155	960.451
[bmim ⁺][TfO ⁻]	288.29	149.062	0.173	861.132
[emim ⁺][BF ₄ ⁻]	197.97		0.100	867.153
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	226.02	86.802	0.116	748.939
[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	254.08		0.126	691.099
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	282.13		0.135	641.078
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	236.29	125.126	0.160	782.037
[bmim ⁺][OcSO ₄ ⁻]	348.50	209.280	0.344	608.372

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

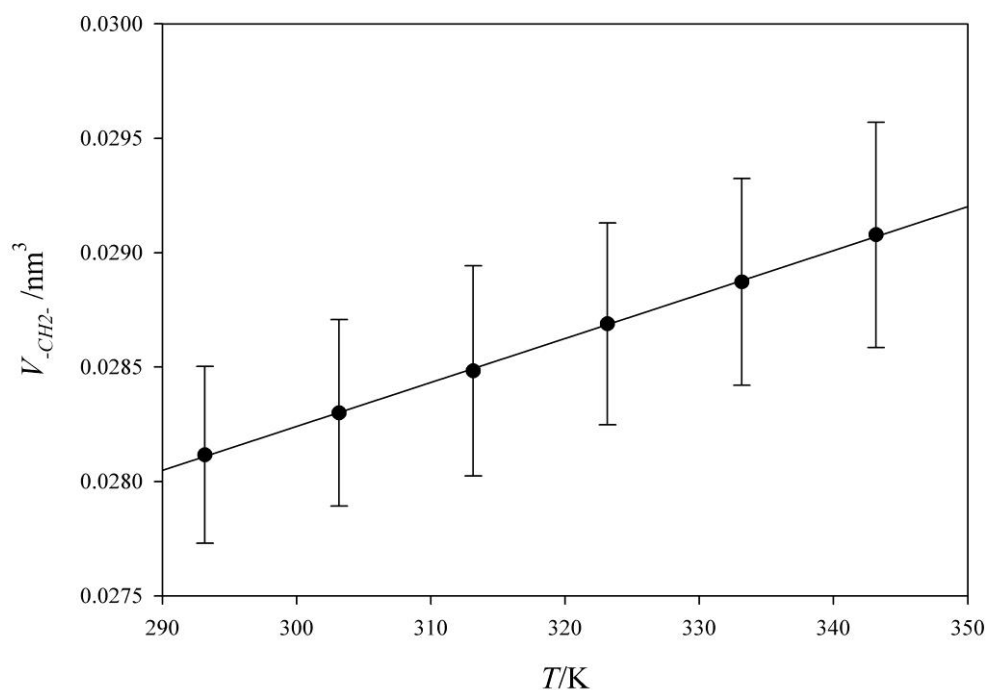


Figure 1.S2. Dependence of the ionic volume of $-CH_2-$ ionic (obtained from density experimental values) on temperature. All numerical data can be found in Table 1.S5. Linear fit: $V_{-CH_2-} = 0.02247 + 1.922 \times 10^{-5}T$; $r^2 = 0.9996$.

Table 1.S4

Effect of temperature (T) on ionic volume of $-CH_2-$ and % of increase over theoretically calculated van der Waals volume.

T/K	Ionic volumen/ nm^3	S.D.	% increase
293.15	0.0281	0.0004	65.7
303.15	0.0283	0.0004	66.8
313.15	0.0285	0.0005	67.8
323.15	0.0287	0.0004	69.1
333.15	0.0289	0.0005	70.1
343.15	0.0291	0.0005	71.3

$$\% \text{ increase} = 32.83 + 0.112T; r^2 = 0.9990.$$

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

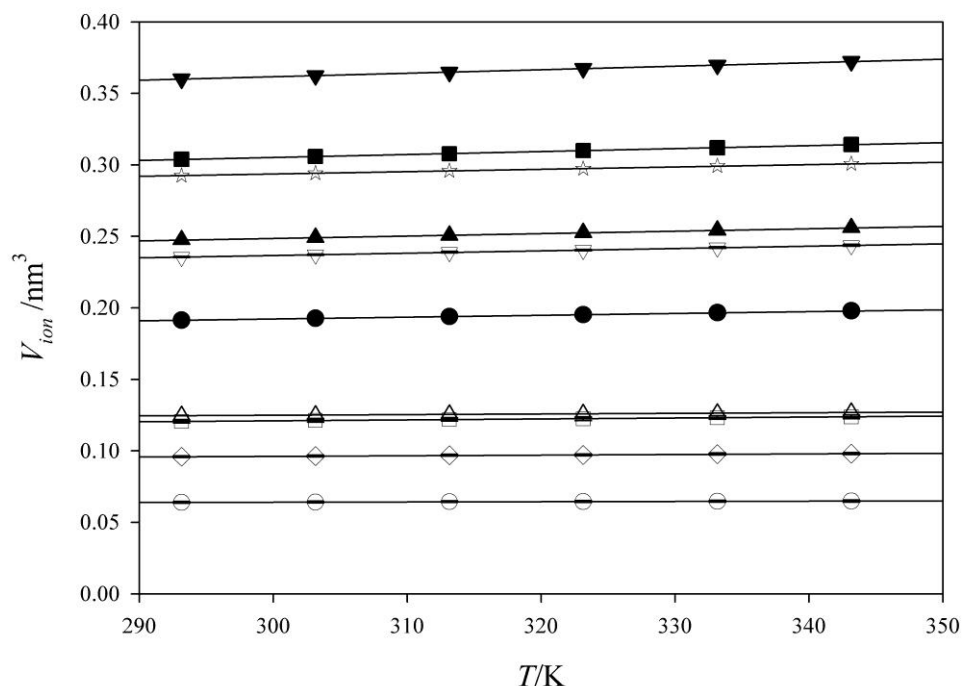


Figure 1.S3. Ionic volume (V_{ion}) versus temperature (T). This figure shows the linear dependence of ionic volume on temperature which is higher for bigger structures. All numerical data (including fitting parameters) can be found in Table 1.S5. ● [emim⁺]; ▲ [bmim⁺]; ■ [hmim⁺]; ▼ [omim⁺]; ○ [BF₄⁻]; ▽ [NTf₂⁻]; □ [TfO⁻]; △ [EtSO₄⁻]; ◇ [PF₆⁻]; ☆ [OcSO₄⁻].

Table 1.S5

Dependence of the ionic volumes (in nm³) of all the ions studied in this work on the temperature (T). Fitting parameters to equation $V_{ion}=aT+b$ are also included.

T/K	[emim ⁺]	[bmim ⁺]	[hmim ⁺]	[omim ⁺]	[BF ₄ ⁻]	[NTf ₂ ⁻]	[TFO ⁻]	[EtSO ₄ ⁻]	[PF ₆ ⁻]	[OctSO ₄ ⁻]
293.15	0.1914	0.2476	0.3039	0.3601	0.0640	0.2356	0.1206	0.1246	0.0959	0.2925
303.15	0.1927	0.2492	0.3059	0.3625	0.0642	0.2372	0.1213	0.1250	0.0964	0.2942
313.15	0.1939	0.2508	0.3078	0.3648	0.0644	0.2390	0.1220	0.1256	0.0969	0.2959
323.15	0.1953	0.2527	0.3101	0.3674	0.0645	0.2404	0.1225	0.1259	0.0972	0.2973
333.15	0.1966	0.2543	0.3121	0.3698	0.0648	0.2421	0.1232	0.1264	0.0978	0.2991
343.15	0.1980	0.2506	0.3143	0.3724	0.0649	0.2437	0.1238	0.1268	0.0980	0.3007
$a \times 10^3 / \text{nm}^3 \cdot \text{K}^{-1}$	0.1309	0.1693	0.2078	0.2462	0.0198	0.1617	0.0629	0.0451	0.0425	0.1644
b / nm^3	0.1530	0.1979	0.2829	0.2878	0.0587	0.1882	0.1022	0.1114	0.0835	0.2443
r^2	0.9996	0.9996	0.9996	0.9996	0.9828	0.9994	0.9979	0.9962	0.9924	0.9997

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

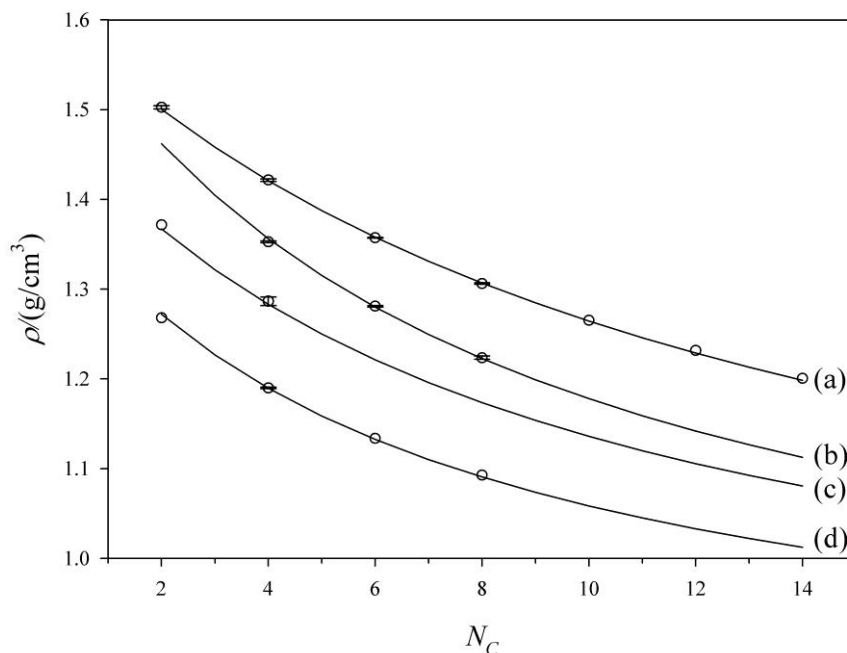


Figure 1.S4. Density (ρ) at 293.15 K of different ILs versus number of carbons of the alkyl chain of the cation (N_C). The anions are: (a) $[\text{NTf}_2^-]$; (b) $[\text{PF}_6^-]$; (c) $[\text{TfO}^-]$; (d) $[\text{BF}_4^-]$. \circ Experimental (averaged from different sources, see Table S7.a for numerical values); (—) Predicted from equations (3) to (12). For experimental values, the error bars are smaller than the size of the symbol.

Table 1.S6.a

Comparison of predicted (this work) and experimental (different sources) densities (ρ) for different ILs at temperature $T=293.15$ K at pressure $p=0.1$ MPa.

	$\rho/(\text{g}/\text{cm}^3)$					Exp. Average $\pm \sigma$	Predicted	Error*	Error ⁺	
	Experimental (different sources)									
$[\text{NTf}_2^-]$										
$[\text{emim}^+]$	1.5238 ¹	1.5197 ²	1.5229 ³	1.5234 ³	1.5260 ⁴	1.5232	0.0023	1.5215	-0.0016	-0.11
$[\text{bmim}^+]$	1.4403 ¹	1.4408 ²	1.4427 ³	1.4402 ³	1.4389 ⁵	1.4406	0.0012	1.4408	0.0003	0.02
$[\text{hmim}^+]$	1.3763 ¹	1.3755 ²	1.3751 ³	1.3754 ⁶	1.3750 ⁶	1.3755	0.0005	1.3770	0.0015	0.11
$[\text{omim}^+]$	1.3248 ¹	1.3234 ²	1.3245 ³	1.3281 ⁴		1.3252	0.0020	1.3251	-0.0001	-0.01
$[\text{C}_{10}\text{mim}^+]$		1.2828 ²	1.2824 ³			1.2826	0.0003	1.2821	-0.0005	-0.04
$[\text{C}_{12}\text{mim}^+]$		1.2490 ²				1.2490		1.2459	-0.0031	-0.25
$[\text{PF}_6^-]$										
$[\text{bmim}^+]$	1.3707 ¹	1.3679 ²	1.3698 ³	1.3681 ³	1.3704 ⁵	1.3698	0.0015	1.3734	0.0036	0.26
$[\text{hmim}^+]$	1.2973 ¹	1.2964 ²	1.2979 ^{8,9}			1.2972	0.0008	1.2964	-0.0008	-0.06
$[\text{omim}^+]$	1.2402 ¹	1.2378 ²	1.2396 ^{8,9}			1.2392	0.0012	1.2385	-0.0007	-0.06
$[\text{BF}_4^-]$										
$[\text{emim}^+]$	1.2833 ¹					1.2833		1.2869	0.0036	0.28
$[\text{bmim}^+]$	1.2031 ¹	1.2029 ²	1.2049 ^{3,11}	1.2038 ³		1.2037	0.0009	1.2041	0.0004	0.04
$[\text{hmim}^+]$	1.1475 ¹					1.1475		1.1467	-0.0008	-0.07
$[\text{omim}^+]$	1.1064 ¹					1.1064		1.1044	-0.0020	-0.18
$[\text{TfO}^-]$										
$[\text{emim}^+]$	1.3884 ¹					1.3884		1.3848	-0.0036	-0.26
$[\text{bmim}^+]$	1.2966 ¹	1.3035 ²	1.3013 ³	1.2900		1.2979	0.0060	1.2998	0.0019	0.15

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

Table 1.S6.b

Comparison of predicted (this work) and experimental (different sources) densities (ρ) for different ILs at temperature $T=313.15$ K at pressure $p=0.1$ MPa.

	$\rho/(g/cm^3)$											
	Experimental (different sources)							Exp. Average $\pm \sigma$		Predicted	Error*	Error ⁺
[NTf ₂ ⁻]												
[emim ⁺]	1.5037 ¹	1.4996 ²	1.5029 ³	1.5034 ³	1.5038 ⁴			1.5027	0.0018	1.5005	-0.0022	-0.15
[bmim ⁺]	1.4202 ¹	1.4216 ²	1.4230 ⁷	1.4198 ⁵	1.4214 ⁵	1.4235 ³	1.4212 ³	1.4215	0.0015	1.4210	-0.0005	-0.04
[hmim ⁺]	1.3580 ¹	1.3572 ²	1.3569 ³	1.3570 ⁷				1.3573	0.0005	1.3581	0.0008	0.06
[omim ⁺]	1.3070 ¹	1.3055 ²	1.3070 ³	1.3056 ⁴				1.3063	0.0008	1.3070	0.0007	0.05
[c ₁₀ mim ⁺]		1.2653 ²	1.2653 ³					1.2653	0.0000	1.2646	-0.0007	-0.06
[c ₁₂ mim ⁺]		1.2318 ²						1.2318		1.2289	-0.0029	-0.23
[c ₁₄ mim ⁺]		1.2006 ²						1.2006		1.1985	-0.0021	-0.17
[PF ₆ ⁻]												
[bmim ⁺]	1.3540 ¹	1.3513 ²	1.3533 ³	1.3518 ³	1.3534 ⁵	1.3528 ¹⁰		1.3528	0.0010	1.3562	0.0034	0.25
[hmim ⁺]	1.2815 ¹	1.2804 ²						1.2810	0.0008	1.2801	-0.0009	-0.07
[omim ⁺]	1.2250 ¹	1.2224 ²						1.2237	0.0018	1.2227	-0.0010	-0.08
[BF ₄ ⁻]												
[emim ⁺]	1.2681 ¹							1.2681		1.2721	0.0040	0.31
[bmim ⁺]	1.1905 ¹	1.1887 ²	1.1901 ³	1.1889 ³	1.1908 ⁷	1.1907 ¹¹		1.1900	0.0009	1.1898	-0.0002	-0.01
[hmim ⁺]	1.1337 ¹							1.1337		1.1328	-0.0009	-0.08
[omim ⁺]	1.0929 ¹							1.0929		1.0908	-0.0021	-0.19
[TfO ⁻]												
[emim ⁺]	1.3716 ¹							1.3716		1.3673	-0.0043	-0.31
[bmim ⁺]	1.2808 ¹	1.2877 ²	1.2856 ³	1.2924 ¹⁰				1.2866	0.0048	1.2832	-0.0034	-0.26

Note for Tables 1.S6: ¹ This work; ² Tariq *et al.* [11]; ³ Jacquemin *et al.* [36]; ⁴ Gardas *et al.* [25]; ⁵ Troncoso *et al.* [39]; ⁶ Lachwa *et al.* [40]; ⁷ Gomes de Azevedo *et al.* [13]; ⁸ Pereiro and Rodriguez [41]; ⁹ Pereiro and Rodriguez [42]; ¹⁰ Soriano *et al.* [23]; ¹¹ Iglesias-Otero *et al.* [18]; ¹² Bonhote *et al.* [43]. Error*, in g/cm³. Error⁺, in %.

Table 1.S7

Fitting parameters to a equation $n = n_0 T + n_1$ for refractive index n of ILs studied

ILs	$n_0 \times 10^4 / K^{-1}$	n_1	r^2	S.D
[emim ⁺][BF ₄ ⁻]	-2.400	1.4835	0.93046	0.0011
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	-1.700	1.4715	0.98763	0.0003
[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	-2.029	1.4870	0.99330	0.0003
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	-2.071	1.4933	0.99842	0.0001
[emim ⁺][TfO ⁻]	-2.243	1.4991	0.99612	0.0002
[bmim ⁺][TfO ⁻]	-2.300	1.5041	0.98266	0.0005
[bmim ⁺][OcSO ₄ ⁻]	-2.386	1.5410	0.99396	0.0003
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	-2.243	1.4758	0.99800	0.0002
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	-2.429	1.4891	0.99885	0.0001
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	-2.386	1.4933	0.99895	0.0001
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-2.500	1.4968	1.00000	0.0000
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-3.039	1.5171	0.99537	0.0004
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-2.614	1.5078	0.99912	0.0001
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-2.700	1.5125	0.99896	0.0001
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	-2.143	1.5401	0.97734	0.0006

1. Effect of temperature, anion and alkyl chain length on the density and refractive index of ILs

Table 1.S8

Parameters $k/\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ for the different empirical equations from equation (8) for the equations proposed by Lorentz-Lorentz (L-L), Dale-Gladstone (D-G), Eykman, Oster, Arago-Biot (A-B) and Newton.

System	L-L	D-G	Eykman	Oster	A-B	Newton
[emim ⁺][BF ₄ ⁻]	0.1948	0.3220	0.4289	1.9418	1.1130	0.7752
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	0.2125	0.3524	0.4687	2.1276	1.1966	0.8518
[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	0.2251	0.3738	0.4969	2.2585	1.2586	0.9055
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	0.2359	0.3923	0.5212	2.3719	1.3102	0.9523
[emim ⁺][TfO ⁻]	0.1881	0.3128	0.4155	1.8914	1.0442	0.7594
[bmim ⁺][TfO ⁻]	0.2027	0.3375	0.4481	2.0415	1.1208	0.8204
[bmim ⁺][OcSO ₄ ⁻]	0.2620	0.4407	0.5825	2.6791	1.3885	1.0865
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	0.1813	0.2996	0.3992	1.8059	1.0404	0.7203
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	0.1947	0.3224	0.4291	1.9450	1.1052	0.7775
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	0.2061	0.3418	0.4546	2.0638	1.1607	0.8263
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.1679	0.2784	0.3703	1.6809	0.9457	0.6729
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.1789	0.2969	0.3947	1.7933	1.0031	0.7186
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.1888	0.3137	0.4168	1.8959	1.0526	0.7605
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.1969	0.3275	0.4350	1.9797	1.0952	0.7946
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	0.2286	0.3853	0.5088	2.3446	1.2020	0.9525
S.D	0.0032	0.0020	0.0025	0.0016	0.0099	0.0018

Table 1.S9

Fitting parameters for $k=n/\rho$ (n , refractive index, ρ density) of ILs studied to a linear equation ($k= k_0T+k_1$)

ILs	$k_0 \times 10^4 / \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$	$k_1 / \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	r^2	S.D
[emim ⁺][BF ₄ ⁻]	4.709	0.9632	0.9882	0.0009
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	5.632	1.0174	0.9992	0.0003
[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	5.829	1.0731	0.9994	0.0002
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	6.139	1.1149	0.9999	0.0001
[emim ⁺][TfO ⁻]	4.712	0.8942	0.9996	0.0002
[bmim ⁺][TfO ⁻]	5.140	0.9572	0.9971	0.0005
[bmim ⁺][OcSO ₄ ⁻]	6.189	1.1916	0.9991	0.0003
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	4.717	0.8904	0.9998	0.0001
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	4.888	0.9496	0.9997	0.0001
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	5.221	0.9946	0.9997	0.0001
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	4.622	0.7986	1.0000	0.00003
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	4.695	0.8538	0.9981	0.0003
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	5.123	0.8896	0.9999	0.0001
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	5.351	0.9250	0.9997	0.0002
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	4.831	1.0482	0.9952	0.0006
			average	0.0003

2

Experimental measurements of octanol–water partition coefficients of ionic liquids

Interest in ionic liquids (ILs) has increased due to their promising use as “green solvents” because of their negligible vapor pressure. However, their solubility in water could lead to their dispersion into the environment through liquid effluents, generating an important toxicological effect in soils and seawater. One of the most relevant parameters related to the assessment of environmental risk is the octanol-water partition coefficient (K_{ow}). With this parameter is possible to estimate some ecosystem risk factors such as bioaccumulation, sorption to soils and sediments and toxicity in fish by the usage of experimental correlations. Shake-flask and slow-stirring methods are the most currently used methods for determining the K_{ow} of a chemical compound. The former has the disadvantage that equilibrium might not be reached quickly, while the slow-stirring method is not always suitable for ILs, since some of them may decompose after continuous contact with water. We have developed a combined version of both methods. Here, we present measurements of the K_{ow} of twenty-four ILs at 30°C, using the three experimental methods. The type of anion and alkyl chain length of the cation are among the parameters studied. The K_{ow} of ILs used in this study range between 0.0017 and 3.6567 at 30°C. The K_{ow} of ILs studied are lower than in commonly used industrial solvents.

2. EXPERIMENTAL MEASUREMENTS OF OCTANOL–WATER PARTITION COEFFICIENTS OF IONIC LIQUIDS

2.1. INTRODUCTION

Ionic liquids (ILs) are low melting point organic salts, most of which are liquids at room temperature. In the past decade they have generated a huge interest in research and industrial fields for their capacity to serve as chemical and biochemical reaction media. In addition, ILs are of interest because they constitute a new group of polar and non-aqueous solvents, whose most important advantage is their negligible vapor pressure [1]. It is mainly for this reason that they are considered “green solvents” compared to conventional volatile organic compounds (VOCs). Due to their high chemical and thermal stability, ILs can resist high temperatures. However, for their potential applications, ILs are mainly valued because of the possibility of modulating their physical and chemical properties, such as melting point, viscosity, density, hydrophobicity and polarity by selecting the anion, the cation or substituent present in their specific structure. The number of different combinations of anions and cations that can be used to form potential ILs is enormous.

Due to the non-volatile character of ILs, they do not contribute to atmospheric pollution [2]. However, despite their significant degree of solubility in water, their effect in this respect has not been studied in depth [3-5]. Moreover, because of their high stability, ILs could represent serious pollutants in aqueous waste streams or accidental spills. For this reason, it is very important to quantify this effect by means of toxicological parameters such as the octanol-water partition coefficient (K_{ow}) that we study in this work. The K_{ow} is known to be one of the quantitative physical properties that best correlates with biological activity because the water–saturated octanol system is considered a reasonable model of the physico-chemical environment in living organisms [6, 7]. K_{ow} classifies ILs according to their hydrophobicity or hydrophilicity, the latter characteristic being closely linked to the lipophilicity of a chemical compound and this parameter constitutes an essential physicochemical property in medicinal chemistry. For instance, it plays a crucial role in the absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) characteristics of drugs [8]. In fact, K_{ow} is used to model blood/lipid partition in toxicology to understand the tendency of a compound to cross biological membranes [9]. Therefore, $\log K_{ow}$ is the key parameter for use in experimental correlations to estimate some parameters related to bioconcentration [10-13] and toxicity in fish [14, 15], as well as sorption to soils [16-18].

Octanol and lipids have similar molecular structures containing both a polar and hydrophilic oxygen at the end of a long hydrophobic alkyl chain and also similar physical properties. For this reason, correlations between natural ecosystems and this parameter are highly useful [19]. A high number of empirical correlations have been developed to estimate values of bioconcentration (BCF) and bioaccumulation (BAF) factors, soil sorption coefficients (K_{oc}), and toxicity. Bioconcentration is the process that causes an increased chemical concentration in an aquatic organism compared to that observed in water, due to the absorption of chemicals by different metabolic routes. The bioconcentration factor, BCF, is the equilibrium ratio of the chemical's concentration in the organism, in $\mu\text{g}/\text{kg}$ lipid, to the concentration in the water, in $\mu\text{g}/\text{L}$, when exposure is only to the chemical in the water [20]. Pollutants also enter the biota through the food chain, which is referred to as biomagnification. The sum of bioconcentration and

2. Experimental measurements of octanol–water partition coefficients of ionic liquids

biomagnification is referred to as bioaccumulation [21]. The soil sorption coefficient, K_{OC} , describes soil-water partitioning. The K_{OC} is the ratio of the mass of a chemical adsorbed per unit weight of organic carbon in a soil to the concentration of the chemical in a liquid phase. Toxicity is typically reported in terms of mortality to various species quantified by the LC_{50} in $\mu\text{mol/L}$, which is the concentration lethal to half of the species population [22]. Examples of equations based on experimental data relating K_{ow} with BCF, K_{OC} and LC_{50} are shown in Table 2.1.

Table 2.1

Correlations of K_{ow} with ecosystem risk parameters.

CORRELATION	REFERENCE
$\text{Log (BCF)} = 0.85\text{log} (K_{ow}) - 0.70$	[23]
$\text{Log (BCF)} = 0.79\text{log} (K_{ow}) - 0.40$	[24]
$\text{Log (BCF)} = \text{log} (K_{ow}) - 1.32$	[10]
For $\text{Log} (K_{ow}) < 5$; $\text{Log} (\text{BCF}) = 0.5$	[13]
$\text{Log (BCF)} = 0.791\text{log} (K_{ow}) - 0.729$	[15]
$\text{Log} (K_{oc}) = 0.544\text{log} (K_{ow}) + 1.377$	[16]
$\text{Log} (K_{oc}) = 0.989\text{log} (K_{ow}) - 0.364$	[17]
$\text{Log} (K_{oc}) = 0.679\text{log} (K_{ow}) + 0.663$	[18]
$\text{Log} (1/LC_{50}) = 0.854\text{log} (K_{ow}) - 1.74^a$	[15]
$\text{Log} (1/LC_{50}) = 0.629\text{log} (K_{ow}) - 0.489^a$	[15]
$\text{Log} (1/LC_{50}) = 0.89(\pm 0.03)\text{log} (K_{ow}) - 1.75(\pm 0.05)^b$	[14]

^afor guppies, fathead minnow, rainbow trout and medaka.

^bfor guppies, fathead minnow and rainbow trout.

The activity of a compound, a_i , in the water-rich phase and the octanol rich-phase will be, by definition, the same ($a_i^w = a_i^o$) when the equilibrium is reached. Because $a_i = \gamma_i x_i$, where γ_i is the activity coefficient and x_i is the mole fraction in the water rich (^w) and octanol rich (^o) phases, respectively, the following expression can be deduced:

$$x_i^o / x_i^w = \gamma_i^w / \gamma_i^o \quad (1)$$

If the test compound solution is very dilute and pressure and temperature are constant, concentrations and mole fractions will be proportional. In addition, if the compound is extremely dilute in both phases, so-called “infinite dilution”, activity coefficients can be considered not to change with small variations in the concentrations. As a result, the Nernst distribution law is followed:

$$K_{ow} = C_i^o / C_i^w \quad (2)$$

where K_{ow} is the octanol-water partition coefficient and C_i are sufficiently dilute concentrations in both phases [3, 6].

Ideally, concentrations of the same solute species are measured in the two liquid phases when determining K_{ow} values. This may be difficult for species such as acids or salts, in

2. Experimental measurements of octanol–water partition coefficients of ionic liquids

which the solute tends to dissociate more in the aqueous phase than in the octanol-rich phase. As shown in Figure 2.1, ILs $[M_{v+}X_{v-}]$ tend to have a greater tendency to dissociate in the water-rich phase [3].

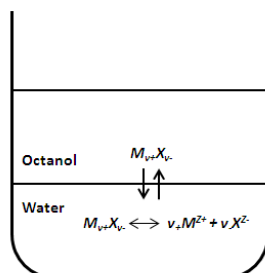


Figure 2.1. Partitioning of an organic salt between octanol and water.

When solute dissociation is expected, the K_{ow} is calculated as the ratio between the concentration of the undissociated and dissociated species of the salt in the octanol-rich phase and in the water-rich phase. For this work, concentrations were measured in each phase using UV-vis spectroscopy, which detects the imidazolium, pyridinium and ammonium group on the cation (whether dissociated or undissociated). Therefore, the K_{ow} values reported are given by Eq.3:

$$K_{ow} = \frac{[M_{v+}X_{v-}]^{octanol} + [M^{Z+}]^{octanol}}{[M_{v+}X_{v-}]^{water} + [M^{Z+}]^{water}} \quad (3)$$

It is important to recognize that octanol and water are not completely immiscible. At 25 °C, the solubility of water in octanol is approximately 0.275 mole fraction, but the solubility of octanol in water is 7.45×10^{-5} mole fraction [25]. Since the solubility of water in octanol is high, the K_{ow} cannot be represented simply as the ratio of saturation concentrations of a solute dissolved in separate solutions of octanol and water. The mutually saturated octanol and water phases affect the partitioning of the solute between the two solvents.

Many different experimental methods (direct and indirect) exist for determining K_{ow} of a chemical compound, but two methods are the most commonly used: shake-flask and slow-stirring, both direct methods. In the traditional shake-flask method, octanol and water are mutually saturated for three days. A sufficiently dilute solution of the test compound and water-saturated octanol is brought into contact with the same quantity of saturated water and shaken for about five minutes to achieve equilibrium. Next, both phases are separated by centrifugation and the test chemical concentrations are measured in each phase. This method has speed as an advantage and the disadvantages of the possible formation of microdroplets after centrifugation and the fact that equilibrium is not guaranteed then the evaluation of partition equilibrium can be done by monitoring the absorbance after the phase separation [3, 26-28]. Slow-stirring method is similar to the previous method. However, instead of rigorously shaking both phases, they are stirred slowly for an extended period of time (45 days, approximately). After that, each phase is analyzed in the same way as in the shake-flask method. The main advantage of this method is to avoid the emulsification due to the reduction of the stagnant diffusion layer between the two phases. Nevertheless, care must be taken with the length of time that the phases are in contact since some ILs may decompose after continuous contact with water [3, 29].

Our research group is especially interested in working with ILs hence this paper is focused on the determination of the K_{ow} for a group of ILs. Information about the toxicological risk of ILs is limited in the literature. Our research group has already measured several K_{ow} values for some imidazolium-based ILs using our own method, which will be explained below [30]. Other authors, for example, Ropel *et al.* [3], Deng *et al.* [7, 31] and Ventura *et al.* [32] used the slow-stirring method to measure K_{ow} for imidazolium, pyridinium, ammonium and pyrrolidinium-based ILs. Others, like Kaar *et al.* [33], Zhao *et al.* [34] and Lee and Lee [9] determined K_{ow} values for imidazolium and pyrrolidinium-based ILs using the shake-flask method. The results reported by these publications for ILs have been inconsistent due to different experimental methods and range of IL concentrations established in the experiments. However, some tendencies can be extracted. For instance, it is clear that more hydrophobic anions such as $[NTf_2^-]$ lead to higher K_{ow} values and, K_{ow} values increase with alkyl chain length in ILs with the same anion. Some studies have developed an indirect way to determine K_{ow} from the ratio of IL solubility in water and in octanol but this value does not exactly correspond with the definition of K_{ow} [35, 36]. Recently, other authors have preferred to use computational simulations [37, 38] or DFT calculations (LFER parameters) [39] to determine K_{ow} for ILs. Recently, a robust and automated method for measurement of K_{ow} has been established. It consists of a syringe pump with a selection valve, a holding column, a silica capillary flow-cell and an in-line spectrophotometer. Distribution of the drug between the aqueous and octanol phases occurs by the oscillation movement of the syringe pump piston. The system has been applied to the determination of the K_{ow} of some common drugs, achieving high precision with only one-phase measurement [40]. Other new experimental methodology to obtain K_{ow} has been developed by the use of a bubble column set-up in combination with headspace concentration measurement [41]. Finally, a K_{ow} prediction method based on the lipophilicity estimation of ILs by chromatographic methods was used by Stepnowski *et al.* [42], Ranke *et al.* [43] and Studzińska *et al.* [44]. Due to the quantity of ionic ILs synthesized and the lack of information data about their toxicological risk, more studies are required to ensure the safe and environmental friendly use of ILs by researchers and industries.

In the present paper, we measured the K_{ow} of dilute samples of several imidazolium, pyridinium and ammonium-based ILs. The K_{ow} values previously reported for some ILs have shown huge discrepancies, as can be seen below. For this reason, we have used three different experimental methods and compared the results obtained, which has not been done before now. Furthermore, the effect of the anion and cation alkyl chain length on the K_{ow} values is discussed.

2.2. EXPERIMENTAL

2.2.1. Experimental Method

The K_{ow} values of ILs were measured using three different methods, two of them explained in the previous section (the shake-flask and slow-stirring methods) and the other one a combined version of the same which our research group developed in a previous paper [30]. Before to carry out each experiment, both water and octanol were mutually saturated by stirring for three days or more. The experimental setup for the slow-stirring method and the combined method is very similar, both consisting of a 22 mL glass vial with an open-top screw cap sealed with a silicone/Teflon septum. In the slow-stirring method and our combined method, approximately 10 mL of distilled,

2. Experimental measurements of octanol–water partition coefficients of ionic liquids

deionised water, presaturated with octanol was added to the glass vial. A 12-gauge Teflon tube was introduced into the vial, reaching just below the water surface. Approximately 10 mL of octanol-IL “stock” solution, consisting of octanol presaturated with water and containing a known concentration of IL (1 mM), was added to the vial. In the combined method, the vial was shaken vigorously for 5 minutes and then maintained at $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ in a thermostatic bath without stirring for 13 days. In the slow-stirring method, the vial was not shaken intensely, but was maintained in the same bath at $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ with a 1 cm Teflon coated magnetic stir bar which provided slow-stirring for 45 days. In both methods, samples were taken from the octanol-rich phase by penetrating the silicone septum with a stainless-steel needle fitted with a glass syringe. Samples were withdrawn from the water-rich phase by inserting the needle through the Teflon tubing directly into the aqueous phase to prevent octanol contamination. In both cases, samples of each phase were taken from the vials until three measurements coincided confirming that the concentrations in both phases had stabilized.

In the shake-flask method, the apparatus consists of a 12 mL centrifuge tube with cap. Approximately 5 mL of distilled, deionised water, presaturated with octanol and 5 mL of octanol-IL “stock” solution, consisting of octanol presaturated with water and containing a known concentration of IL (1 mM) was added to the centrifuge tube. The tube was shaken vigorously for about five minutes and then the octanol and water phases were separated by centrifugation. Samples were taken from the octanol-rich phase and the water-rich phase with a glass syringe and analyzed directly.

In all three methods, the IL concentration in each phase was analysed by UV-VIS spectrophotometry as described in the section Analytical Method. Determinations were made at least in triplicate to ensure repeatability of the tests and the mean values are reported. The samples were diluted until the absorbance was less than 1. The initial concentration of IL in the octanol phase was less than 1.2×10^{-2} mol/L, but enough to ensure that the IL could be measured accurately. The final concentrations of IL in the octanol phase were between 1.77×10^{-5} mol/L and 3.92×10^{-3} mol/L and in the water phase between 2.75×10^{-5} and 8.38×10^{-3} mol/L. IL concentrations were kept at the dilution limit so that K_{ow} values would be independent of concentration.

In the present paper, we have studied twenty-four ILs based on imidazolium, pyridinium and ammonium salts with different substituents: 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ($[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$), 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ($[\text{hmim}^+][\text{PF}_6^-]$), 1-methyl-3-octylimidazolium hexafluorophosphate ($[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$), 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ($[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$), 1-methyl-3-octylimidazolium tetrafluoroborate ($[\text{omim}^+][\text{BF}_4^-]$), 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ($[\text{emim}^+][\text{NTf}_2^-]$), 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ($[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$), 1-hexyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ($[\text{hmim}^+][\text{NTf}_2^-]$), 1-methyl-3-octylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ($[\text{omim}^+][\text{NTf}_2^-]$), 1-butyl-2,3-dimethylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ($[\text{bdmim}^+][\text{NTf}_2^-]$), 1-ethyl-3-methylimidazolium triflate ($[\text{emim}^+][\text{TfO}^-]$), 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulphate ($[\text{emim}^+][\text{EtSO}_4^-]$), 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ($[\text{emim}^+][\text{CH}_3\text{COO}^-]$), 1-butyl-3-methylimidazolium methylsulphate ($[\text{bmim}^+][\text{MeSO}_4^-]$), 1-butyl-3-methylimidazolium 2-(2-methoxyethoxy) ethylsulphate ($[\text{bmim}^+][\text{MDEGSO}_4^-]$), 1-methylimidazolium chloride ($[\text{mim}^+][\text{Cl}^-]$), 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride ($[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$), 1-(2-hydroxy-ethyl)-3-methylimidazolium chloride ($[\text{hemim}^+][\text{Cl}^-]$), 1,2-dimethylimidazolium chloride ($[\text{dmim}^+][\text{Cl}^-]$), 1-

2. Experimental measurements of octanol–water partition coefficients of ionic liquids

ethylimidazolium chloride ($[\text{eim}^+][\text{Cl}^-]$), 1-hexyl-3-methylimidazolium chloride ($[\text{hmim}^+][\text{Cl}^-]$), 1-ethyl-3-methylpyridinium ethylsulphate ($[\text{empy}^+][\text{EtSO}_4^-]$), 1-butyl-3-methylpyridinium tetrafluoroborate ($[\text{bmpy}^+][\text{BF}_4^-]$) and ethylammonium nitrate (ETAN).

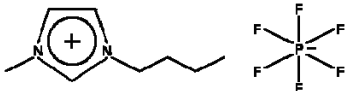
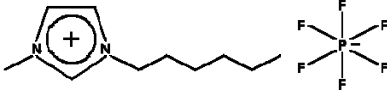
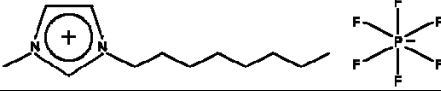
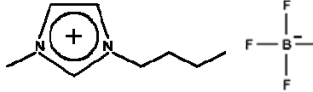
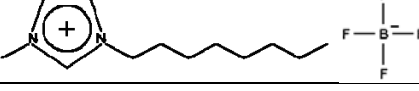
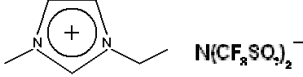
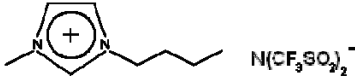
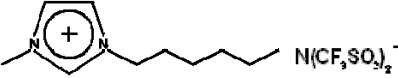
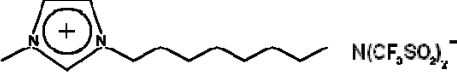
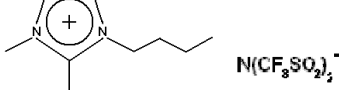
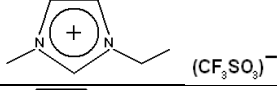
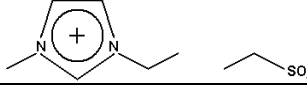
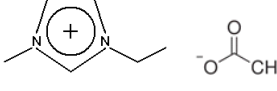
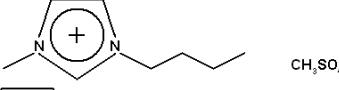
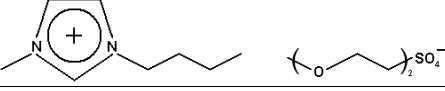
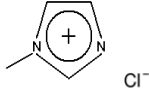
2.2.2. Materials

The structures of the ILs used in this study are listed in Table 2.2. The ILs $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ (purity>99%), $[\text{hmim}^+][\text{PF}_6^-]$ (purity>99%), $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ (purity>99%), $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ (purity>99%), $[\text{emim}^+][\text{NTf}_2^-]$ (purity>99%), $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ (purity>99%), $[\text{hmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ (purity>99%), $[\text{omim}^+][\text{NTf}_2^-]$ (purity>99%), $[\text{bdmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ (purity>99%), $[\text{emim}^+][\text{TfO}^-]$ (purity>99%), $[\text{emim}^+][\text{EtSO}_4^-]$ (purity>99%), $[\text{emim}^+][\text{CH}_3\text{COO}^-]$ (purity>95%), $[\text{mim}^+][\text{Cl}^-]$ (purity>98%), $[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$ (purity>98%), $[\text{hemim}^+][\text{Cl}^-]$ (purity>99%), $[\text{dmim}^+][\text{Cl}^-]$ (purity>98%), $[\text{eim}^+][\text{Cl}^-]$ (purity>98%), $[\text{hmim}^+][\text{Cl}^-]$ (purity>98%) and ETAN (purity>97%) were purchased from Iolitec (Germany). The ILs $[\text{omim}^+][\text{BF}_4^-]$ (purity>99%), $[\text{bmim}^+][\text{MeSO}_4^-]$ (purity>99%), $[\text{bmim}^+][\text{MDEGSO}_4^-]$ (purity>98%), $[\text{empy}^+][\text{EtSO}_4^-]$ (purity>99%) and $[\text{bmpy}^+][\text{BF}_4^-]$ (purity>99%) were purchased from Solvent Innovation GmbH (Cologne, Germany). The reagent octanol was purchased from Merck Eurolab (Germany).

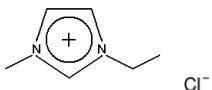
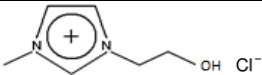
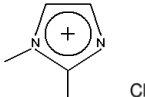
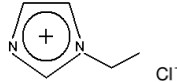
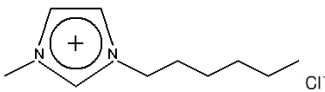
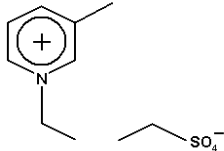
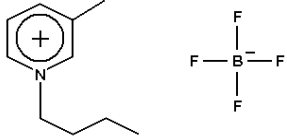
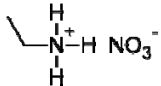
2. Experimental measurements of octanol–water partition coefficients of ionic liquids

Table 2.2

Abbreviations and structures of the studied ILs.

Abbreviation	Molecular weight (g mol ⁻¹)	Structure
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	284.18	
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	312.08	
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	340.29	
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	226.02	
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	282.13	
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	391.31	
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	419.37	
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	447.42	
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	475.47	
[bdmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	433.39	
[emim ⁺][TfO ⁻]	260.24	
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	236.29	
[emim ⁺][CH ₃ COO ⁻]	170.21	
[bmim ⁺][MeSO ₄ ⁻]	250.32	
[bmim ⁺][MDEGSO ₄ ⁻]	338.43	
[mim ⁺][Cl ⁻]	118.57	

2. Experimental measurements of octanol–water partition coefficients of ionic liquids

Abbreviation	Molecular weight (g mol ⁻¹)	Structure
[emim ⁺][Cl ⁻]	146.02	
[hemim ⁺][Cl ⁻]	162.62	
[dmim ⁺][Cl ⁻]	131.58	
[eim ⁺][Cl ⁻]	131.58	
[hmim ⁺][Cl ⁻]	202.72	
[empy ⁺][EtSO ₄ ⁻]	247.32	
[bmpy ⁺][BF ₄ ⁻]	237.05	
ETAN	108.1	

2.2.3. Analytical Method

The concentration of the ILs in octanol and water was measured by UV-VIS spectrophotometry using a ThermoSpectronic UV-VIS recording spectrophotometer (Helios α), which has a sensitivity of ± 0.001 . A calibration curve was prepared for the different ILs at their maximum absorbance wavelength: 212 nm for imidazolium, 216 nm for pyridinium and 210 nm for ammonium-based ILs. The calibration curves were made in duplicate and mean values of the extinction coefficients are reported (Table 2.3). Samples were diluted if their concentration exceeded the calibration range.

2.3. RESULTS AND DISCUSSION

2.3.1. Experimental Technique Evaluation

The combined experimental technique developed by our group was validated in a previous work [30] with benzaldehyde, which has a well-known $\log(K_{ow})=1.48$. Benzaldehyde shows two characteristic peaks at 250 and 200 nm in water, and at 245 and 207 nm in octanol. The wavelengths at 250 nm and 245 nm were selected for absorbance measurements in water and octanol, respectively. The extinction coefficient

2. Experimental measurements of octanol–water partition coefficients of ionic liquids

in water and octanol is shown in Table 2.3. $\text{Log}(K_{ow})$ of benzaldehyde obtained was 1.43, which is very close to the value given in the literature (1.48), confirming the validity of the proposed method [30].

2.3.2. Extinction Coefficients

To determine the concentrations of IL in each phase and the resulting K_{ow} values, the IL extinction coefficients (ϵ) in octanol and water were obtained at the wavelength of maximum absorption of the imidazolium ($\lambda_{\text{max}} = 212 \text{ nm}$), pyridinium ($\lambda_{\text{max}} = 216 \text{ nm}$) and ammonium ($\lambda_{\text{max}} = 210 \text{ nm}$) groups (see Table 2.3).

Table 2.3

Extinction coefficients of benzaldehyde and ILs in water and octanol.

Compound	ϵ in water/ $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	ϵ in octanol/ $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Benzaldehyde	1363.7	1303.6
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	4472.5	3455.7
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	2977.6	5719.0
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	3828.4	5100.0
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	4212.3	4639.6
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	4207.1	4787.0
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	4397.7	3996.4
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	3367.6	4904.1
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	6817.3	9380.8
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	3103.3	4483.1
[bdmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	3067.3	5168.7
[emim ⁺][TfO ⁻]	4326.7	4977.2
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	3604.8	4190.8
[emim ⁺][CH ₃ COO ⁻]	5481.9	4617.4
[bmim ⁺][MeSO ₄ ⁻]	3999.5	4777.0
[bmim ⁺][MDEGSO ₄ ⁻]	5372.7	4776.9
[mim ⁺][Cl ⁻]	4197.7	5136.6
[emim ⁺][Cl ⁻]	4477.8	4513.2
[hemim ⁺][Cl ⁻]	3741.3	4703.9
[dmim ⁺][Cl ⁻]	5808.9	5803.6
[eim ⁺][Cl ⁻]	3988.6	4562.5
[hmim ⁺][Cl ⁻]	4671.8	4368.0
[empy ⁺][EtSO ₄ ⁻]	4062.2	4961.0
[bmpy ⁺][BF ₄ ⁻]	4346.1	9246.3
ETAN	5254.5	12865

The extinction coefficients of all the ILs have values of between 3000 and 6000 $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ except [hmim⁺][NTf₂⁻] in water and in octanol and [bmpy⁺][BF₄⁻] in octanol which were greater. The ones of [hmim⁺][NTf₂⁻] in water and in octanol and [bmpy⁺][BF₄⁻] and ETAN in octanol are bigger than the others, perhaps as a result of different interactions with the solvents.

2.3.3. K_{ow} Values

The values of K_{ow} measured for each ionic liquid and obtained with the three methods indicated in Experimental Method Section are shown in Table 2.4. The K_{ow} values found in literature for some of the ILs have been added to compare the results, distinguishing between the K_{ow} values obtained by the shake-flask or slow-stirring

2. Experimental measurements of octanol–water partition coefficients of ionic liquids

method. The uncertainties reported are standard deviations of multiple tests, as detailed in the Experimental section.

The K_{ow} of a given chemical structure can also be estimated. Most methods divide the molecule into fragments or groups of atoms, each with its corresponding empirical constant and structural factor. Using experimental data, a database of the different contributing fragments and structure factors possible can be computed. We used two of these approaches to estimate the K_{ow} values of ILs, both using SMILES notation (Simplified Molecular Input Line Entry System): web page *molinspiration.com* [45] and Bio-Loom Software [46]. The estimated values are also shown in Table 2.4.

2. Experimental measurements of octanol–water partition coefficients of ionic liquids

Table 2.4.

Octanol-water partition coefficients (K_{ow}) of ILs measured with shake-flask method, combined method and slow-stirring method at 30°C. Literature values are also shown, classified into those obtained by shake-flask or slow-stirring method. Estimated K_{ow} values obtained by molinspiration.com and Bio-Loom Software are also shown.

Compound	K_{ow} shake-flask method	K_{ow} combined method	K_{ow} slow-stirring method	Literature values		K_{ow} estimated
				shake-flask method	slow-stirring method	
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	0.0200 ± 0.0062	0.0323 ± 0.0001 [30]	0.2539 ± 0.0443	0.0200 [47], 0.0041 [33], 0.0035 [9], 0.0191 [48].	0.0219 [3], 0.0037 [32]	0.0091[45], 0.0054 [46]
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	0.0230 ± 0.0072	0.1120 ± 0.0023	0.3130 ± 0.0019	0.0631 [48]	0.1202-0.338 [49], 0.1380 [32]	0.0931[45], 0.0617[46]
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	0.4663 ± 0.0338	0.2388 ± 0.0279 [30]	0.9196 ± 0.0338	0.4467 [48]	1.2106 [49], 0.4009 [32]	0.9500[45], 0.7079[46]
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	0.0094 ± 0.0003	0.0054 ± 0.0005 [30]	0.1303 ± 0.0186	0.0031 [34]	0.0030 [3]	0.0091[45], 0.0054[46]
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	0.0152 ± 0.0009	0.0537 ± 0.0011 [30]	0.0746 ± 0.0085	0.2089 [48], 0.0457 [34]	0.5754-1.2190 [49]	0.9500[45], 0.7079[46]
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.0607 ± 0.0039	0.0642 ± 0.0142	0.1407 ± 0.0124	0.0661 [48]	0.0891-0.1096 [3], 0.0070 [32]	925[45], 0.4467[46]
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.1193 ± 0.0063	0.1076 ± 0.0038 [30]	0.3350 ± 0.0190	0.0229 [9], 0.3162 [48], 1.2882 [34]	0.1096-0.6166 [3], 0.4266-0.6607 [49], 0.0210 [32]	925[45], 0.4467[46]
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.0352± 0.0127	0.1336 ± 0.0679	0.7827 ± 0.1734	1.4454 [48]	1.4125-1.6596 [3]	925[45], 0.4467[46]
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	3.6141 ± 1.0810	3.6567 ± 0.1912 [30]	9.8147 ± 0.1258	11.2202 [48]	6.3095-11.2202 [3]	925[45], 0.4467[46]
[bdmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.0326 ± 0.0107	0.7252 ± 0.0591	0.7327 ± 0.2768		0.6095-1.1587 [49]	925[45], 0.4467[46]
[emim ⁺][TfO ⁻]	0.0084 ± 0.0016	0.0322 ± 0.0021	0.1150 ± 0.0987			0.0008[45], 0.0005[46]
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	0.0069 ± 0.0033	0.0226 ± 0.0093	0.0127 ± 0.0015			0.0008[45], 0.0005[46]
[emim ⁺][CH ₃ COO ⁻]	0.0098 ± 0.0008	0.0092 ± 0.0008	0.539 ± 0.0712	0.0030 [34]		0.0008[45], 0.0005[46]
[bmim ⁺][MeSO ₄ ⁻]	0.0072 ± 0.0007	0.0111 ± 0.0002	0.0038 ± 0.0038			0.0091[45], 0.0054[46]
[bmim ⁺][MDEGSO ₄ ⁻]	0.0476 ± 0.0363	0.0191 ± 0.0036	0.0111 ± 0.0006			0.0001[45], 1.95x10 ⁻⁵ [46]
[mim ⁺][Cl ⁻]	0.0643 ± 0.0230	0.0354± 0.0138	0.1539 ± 0.0953			0.0005[45], 2.24x10 ⁻⁵ [46]

2. Experimental measurements of octanol–water partition coefficients of ionic liquids

Compound	K_{ow} shake- flask method	K_{ow} combined method	K_{ow} slow- stirring method	Literature values		K_{ow} estimated
				shake- flask method	slow- stirring method	
[emim ⁺][Cl ⁻]	0.0849 ± 0.0049	0.096 ± 0.0242	0.1612 ± 0.0278			0.0008[45], 0.0005[46]
[hemim ⁺][Cl ⁻]	0.0111 ± 0.0036	0.0058 ± 0.0001	0.0125 ± 0.0047			7.85x10 ⁻⁵ [45], 0.0001[46]
[dmim ⁺][Cl ⁻]	0.0140 ± 0.0026	0.0242 ± 0.0022	0.0227 ± 0.0032			0.0003[45], 0.0001[46]
[eim ⁺][Cl ⁻]	0.0445 ± 0.0042	0.0699 ± 0.0013	0.0764 ± 0.0014			0.0013[45], 3.1623[46]
[hmim ⁺][Cl ⁻]	0.0213 ± 0.0064	0.0221 ± 0.0010	0.1246 ± 0.0041	0.0186 [48]		0.0931[45], 0.0617[46]
[empy ⁺][EtSO ₄ ⁻]	0.0049 ± 0.0011	0.0203 ± 0.0057	0.0313 ± 0.0100			0.0019[45], 0.0007[46]
[bmpy ⁺][BF ₄ ⁻]	0.0082 ± 0.0009	0.0105 ± 0.0004	0.0170 ± 0.0049			0.0215[45], 0.0076[46]
ETAN	0.0028 ± 0.0008	0.0017 ± 0.0004	0.0026 ± 0.0008			0.0005[45], 0.0003[46]

2.3.4. Discussion

The ILs studied here based on imidazolium, pyridinium and ammonium, are fairly hydrophilic so their K_{ow} were expected to be low. Indeed, the experimental values shown in Table 2.4 are lower than those in commonly used industrial solvents (i.e. $K_{ow(ethanol)}=0.479$ [50]; $K_{ow(n-heptane)}=31623$ [51]).

On the other hand, the three methods used here to determine the K_{ow} of ILs have their advantages and drawbacks.

The shake-flask method is a classical method to measure the K_{ow} that has been widely used in recent decades; however, several parameters need to be taken into account for the measurement to be valid. For example, pre-saturation of the two solvents with each other is essential to obtain accurate numbers for the volume of each phase. Shaking has to be carried out manually or mechanically for a sufficiently long time to homogenize the solution and, since octanol and water form an emulsion, the two phases have to be separated. This problem may be overcome by centrifugation, but, even so, micro droplets might still remain in each phase, which can introduce large errors in the final measurements, especially in the case of hydrophobic ionic compounds. The K_{ow} values obtained by the shake-flask method are generally the lowest, probably because the equilibrium had not been achieved.

The slow stirring method can avoid the measurement errors introduced by the emulsion between octanol and water, especially for hydrophobic compounds. This method is generally considered a better representation of ecological conditions, whereby oil and water are equilibrated and the IL is present in very dilute amounts. Nevertheless, it is not appropriate for all ILs, since some may decompose after continuous contact with water for a long period of time. The values obtained by the slow stirring method are generally much higher than those obtained by the other methods.

The combined version of both methods seeks to avoid the disadvantages of each of the conventional methods. As can be seen in Table 2.4, the values obtained with the combined method are generally intermediate with respect to the other two procedures. However, depending on the IL, different situations can be found. For some ILs the combined method provides results very similar to those obtained with the shake-flask

2. Experimental measurements of octanol–water partition coefficients of ionic liquids

method and, for others they are similar to the slow-stirring results. This may be due to the different rates of degradation in water and/or the different tendencies to form microemulsions, and demonstrates the difficulty involving in using the technique.

However, while the three methods deliver different results, some trends can be identified. The K_{ow} values increase with increasing alkyl chain length of the cation (Figure 2.2), which is consistent with the findings of other authors [3, 5, 7, 30, 37, 39, 52]. The ILs with a bis(trifluoromethylsulfonyl)imide anion have higher K_{ow} values and the ILs with an ammonium cation have the lowest values.

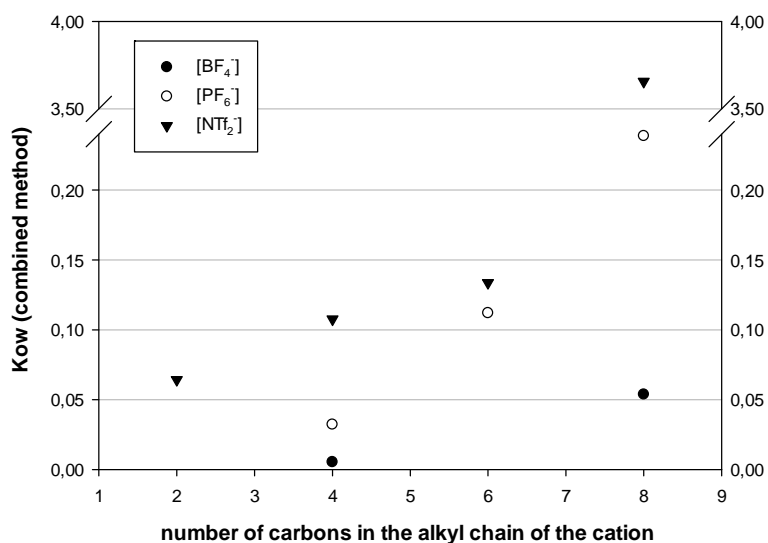


Figure 2.2. Octanol-water partition coefficients (K_{ow}) obtained by the combined method of ILs with different anions as a function of the alkyl chain length of the cation.

Keeping the imidazolium cation constant, it is possible to see the effect by changing the anion. The hydrophilic order for the ILs which are not completely soluble with water is $[\text{BF}_4^-] > [\text{PF}_6^-] > [\text{NTf}_2^-]$ (Figure 2.3). These results can be explained by the greater symmetry and consequent greater hydrophobic character of $[\text{PF}_6^-]$ compared with $[\text{BF}_4^-]$ and of $[\text{NTf}_2^-]$ compared with $[\text{PF}_6^-]$, due to the inclusion of two carbon atoms in the $[\text{NTf}_2^-]$ skeleton. At the other extreme, the hydrophilic order for the ILs completely soluble in water is $[\text{CH}_3\text{COO}^-] > [\text{Cl}^-]$. For the same cation, the ILs with the anions $[\text{MDEGSO}_4^-]$, $[\text{MeSO}_4^-]$, $[\text{TfO}^-]$ and $[\text{EtSO}_4^-]$ have an intermediate hydrophilicity between the two groups of anions mentioned above.

2. Experimental measurements of octanol–water partition coefficients of ionic liquids

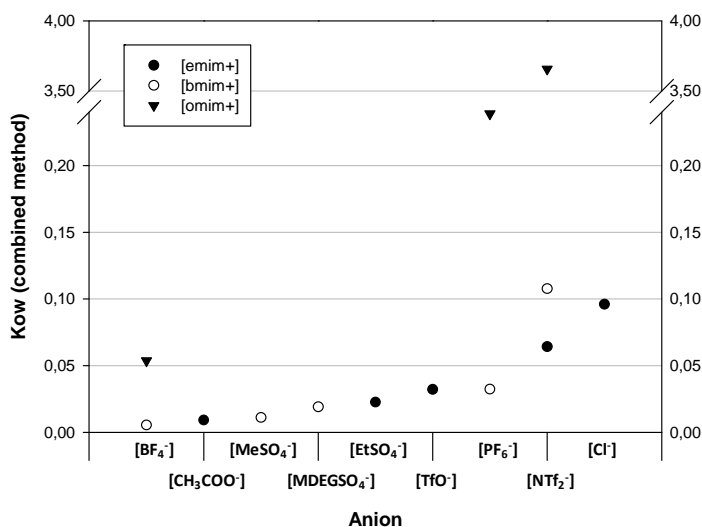


Figure 2.3. Octanol-water partition coefficients (K_{ow}) obtained by the combined method of ILs with three different alkyl chains ([emim⁺], [bmim⁺] and [omim⁺]) and different anions.

The insertion of a hydroxyl group reduces the lipophilicity of an imidazolium chloride IL, as can be observed when [hemim⁺][Cl⁻] is compared with [emim⁺][Cl⁻].

There are some differences between the K_{ow} values calculated by the two molecular simulation methods, but the trends observed are similar and agree with the experimental results.

2.4. CONCLUSIONS

The K_{ow} of ILs is an important parameter because describes the lipophilicity of ILs and can be used to determine properties such as environmental effects, liquid/liquid solute partitioning and miscibility with other solvents. However, the values of the K_{ow} of ILs differ very much according to the experimental method used for their determination. It is possible that the differences in K_{ow} values obtained by different authors for the same ionic liquid might be also due to differences in ionic liquid concentrations.

The K_{ow} of ILs used in this study range between 0.0017 (ETAN) and 3.6567 ([omim⁺][NTf₂⁻]) at 30°C. The ILs studied here are fairly hydrophilic, and their K_{ow} are lower than in commonly used industrial solvents.

The values of K_{ow} are lowest for the most hydrophilic ILs and increase with the cation alkyl chain length. Since all of the K_{ow} values are very small, we conclude that none of the ILs studied will accumulate or concentrate in the biota.

2.5. REFERENCES

- [1] S. Keskin, D. Kayrak-Talay, U. Akman, Ö. Hortaçsu, A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications, *J. Supercrit. Fluids*. 43 (2007) 150–180.
- [2] G.J. Kabo, A.V. Blokhin, Y.U. Paulechka, A.G. Kabo, M.P. Shymanovich, J.W. Magee, Thermodynamic properties of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate in the condensed state, *J. Chem. Eng. Data* 49 (2004) 453–461.
- [3] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N. Aki, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, Octanol–water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 83–90.
- [4] M.G. Freire, P.J. Carvalho, A.M.S. Silva, L.M.N.B.F. Santos, L.P.N. Rebelo, I.M. Marrucho, J.A.P. Coutinho, Ion specific effects on the mutual solubilities of water and hydrophobic ionic liquids, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 202–211.
- [5] U. Domańska, A. Rękawek, A. Marciniak, Solubility of 1-alkyl-3-ethylimidazolium-based ionic liquids in water and 1-octanol, *J. Chem. Eng. Data* 53 (2008) 1126–1132.
- [6] L.-G. Danielsson, Y.-H. Zhang, Methods for determining n-octanol-water partition constants, *TrAC Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 188–196.
- [7] Y. Deng, P. Besse-Hoggan, M. Sancelme, A.-M. Delort, P. Husson, M.F. Costa Gomes, Influence of oxygen functionalities on the environmental impact of imidazolium based ionic liquids, *J. Hazard. Mater.* 198 (2011) 165–174.
- [8] S. Han, J. Qiao, Y. Zhang, H. Lian, X. Ge, Determination of n-octanol/water partition coefficients of weak ionizable solutes by RP-HPLC with neutral model compounds, *Talanta* 97 (2012) 355–361.
- [9] S.H. Lee, S.B. Lee, Octanol/water partition coefficients of ionic liquids, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (2009) 202–207.
- [10] D. Mackay, Correlation of bioconcentration factors, *Environ. Sci. Technol.* 16 (1982) 274–278.
- [11] D. Mackay, A. Fraser, Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models, *Environ. Pollut.* 110 (2000) 375–391.
- [12] X. Wang, Y. Ma, W. Yu, H.J. Geyer, Two-compartment thermodynamic model for bioconcentration of hydrophobic organic chemicals by alga: Quantitative relationship between bioconcentration factor and surface area of marine algae or octanol/water partition coefficient, *Chemosphere* 35 (1997) 1781–1797.
- [13] W.M. Meylan, P.H. Howard, R.S. Boethling, D. Aronson, H. Printup, S. Gouchie, Improved method for estimating bioconcentration/bioaccumulation factor from octanol/water partition coefficient, *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (1999) 664–672.

2. Experimental measurements of octanol–water partition coefficients of ionic liquids

- [14] O.A. Raevsky, V.Y. Grigor'ev, E.E. Weber, J.C. Dearden, Classification and quantification of the toxicity of chemicals to guppy, fathead minnow and rainbow trout: Part 1. Nonpolar narcosis mode of action, *QSAR Comb. Sci.* 27 (2008) 1274–1281.
- [15] L.M. Su, X. Liu, Y. Wang, J.J. Li, X.H. Wang, L.X. Sheng, Y.H. Zhao, The discrimination of excess toxicity from baseline effect: Effect of bioconcentration, *Sci. Total Environ.* 484 (2014) 137–145.
- [16] W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt, Handbook of chemical property estimation methods: environmental behavior of organic compounds, American Chemical Society, 1990.
- [17] S.W. Karickhoff, Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils, *Chemosphere* 10 (1981) 833–846.
- [18] Z. Gerstl, Estimation of organic chemical sorption by soils, *J. Contam. Hydrol.* 6 (1990) 357–375.
- [19] C.T. Chiou, Partition and adsorption of organic contaminants in environmental systems, John Wiley & Sons, 2003.
- [20] E. Voutsas, K. Magoulas, D. Tassios, Prediction of the bioaccumulation of persistent organic pollutants in aquatic food webs, *Chemosphere* 48 (2002) 645–651.
- [21] R.V. Thomann, Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains, *Environ. Sci. Technol.* 23 (1989) 699–707.
- [22] D.T. Allen, D.R. Shonnard, Green Engineering: Environmentally Conscious Design of Chemical Processes, Pearson Education, 2001.
- [23] R.R. Lassiter, N.E.R.C. (Corvallis Or.), Modeling dynamics of biological and chemical components of aquatic ecosystems, National Environmental Research Center, 1975.
- [24] G.D. Veith, P. Kosian, Estimating bioconcentration potential from octanol/water partition coefficients, Phys. Behav. PCBs Gt. Lakes Ann Arbor Sci. Ann Arbor MI 1983 P 269-282 3 Fig 2 Tab 2 Ref. (1983).
- [25] Y. Marcus, Structural aspects of water in 1-octanol, *J. Solut. Chem.* 19 (1990) 507–517.
- [26] US Environmental Protection Agency, Product Properties Test Guidelines: Partition Coefficient (n-Octanol/Water), Shake Flask Method, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1996.
- [27] OECD, Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 1995. <http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264069626-en> (accessed 05-06-2013).

- [28] A. Berthod, S. Carda-Broch, Determination of liquid–liquid partition coefficients by separation methods, *Estim. Physicochem. Prop. Chromatogr. Electrophor. Tech.* 1037 (2004) 3–14.
- [29] OECD, Test No. 123: Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 2006. <http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264015845-en> (accessed 05-06-2013).
- [30] A.P. de los Ríos, F.J. Hernández-Fernández, F. Tomás-Alonso, M. Rubio, D. Gómez, G. Villora, On the importance of the nature of the ionic liquids in the selective simultaneous separation of the substrates and products of a transesterification reaction through supported ionic liquid membranes, *J. Membr. Sci.* 307 (2008) 233–238.
- [31] Y. Deng, P. Besse-Hoggan, P. Husson, M. Sancelme, A.-M. Delort, P. Stepnowski, M. Paszkiewicz, M. Gołębowski, M.F. Costa Gomes, Relevant parameters for assessing the environmental impact of some pyridinium, ammonium and pyrrolidinium based ionic liquids, *Chemosphere* 89 (2012) 327–333.
- [32] S.P.M. Ventura, R.L. Gardas, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, Ecotoxicological risk profile of ionic liquids: octanol-water distribution coefficients and toxicological data, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86 (2011) 957–963.
- [33] J.L. Kaar, A.M. Jesionowski, J.A. Berberich, R. Moulton, A.J. Russell, Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4125–4131.
- [34] H. Zhao, G.A. Baker, Z. Song, O. Olubajo, L. Zanders, S.M. Campbell, Effect of ionic liquid properties on lipase stabilization under microwave irradiation, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 57 (2009) 149–157.
- [35] A. Chapeaux, L.D. Simoni, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, Liquid phase behavior of ionic liquids with water and 1-octanol and modeling of 1-octanol/water partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data* 52 (2007) 2462–2467.
- [36] U. Domańska, E. Bogel-Lukasik, R. Bogel-Lukasik, 1-Octanol/Water Partition Coefficients of 1-Alkyl-3-methylimidazolium Chloride, *Chem. – Eur. J.* 9 (2003) 3033–3041.
- [37] G. Kamath, N. Bhatnagar, G.A. Baker, S.N. Baker, J.J. Potoff, Computational prediction of ionic liquid 1-octanol/water partition coefficients, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 4339–4342.
- [38] B.-S. Lee, S.-T. Lin, A priori prediction of the octanol–water partition coefficient (Kow) of ionic liquids, *Fluid Phase Equilibr.* 363 (2014) 233–238.
- [39] C.-W. Cho, U. Preiss, C. Jungnickel, S. Stolte, J. Arning, J. Ranke, A. Klamt, I. Krossing, J. Thörming, Ionic liquids: predictions of physicochemical properties with experimental and/or DFT-calculated LFER parameters to understand molecular interactions in solution, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 6040–6050.

2. Experimental measurements of octanol–water partition coefficients of ionic liquids

[40] P. Wattanasin, P. Saetear, P. Wilairat, D. Nacapricha, S. Teerasong, Zone fluidics for measurement of octanol–water partition coefficient of drugs, *Anal. Chim. Acta.* 860 (2015) 1–7.

[41] P.M. Heynderickx, P. Španěl, H. Van Langenhove, Quantification of octanol–water partition coefficients of several aldehydes in a bubble column using selected ion flow tube mass spectrometry, *Fluid Phase Equilib.* 367 (2014) 22–28.

[42] P. Stepnowski, P. Storoniak, Lipophilicity and metabolic route prediction of imidazolium ionic liquids, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 12 (2005) 199–204.

[43] J. Ranke, A. Müller, U. Bottin-Weber, F. Stock, S. Stolte, J. Arning, R. Störmann, B. Jastorff, Lipophilicity parameters for ionic liquid cations and their correlation to in vitro cytotoxicity, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67 (2007) 430–438.

[44] S. Studzińska, P. Stepnowski, B. Buszewski, Application of chromatography and chemometrics to estimate lipophilicity of ionic liquid cations, *QSAR Comb. Sci.* 26 (2007) 963–972.

[45] <http://www.molinspiration.com/services/logp.html>, (accessed in 2015).

[46] <http://www.biobyte.com>, (accessed in 2015).

[47] C.-H. Chou, F.-S. Perng, D.S.H. Wong, W.C. Su, 1-octanol/water partition coefficient of ionic liquids, Boulder, CO, USA, (2003).

[48] S. H. Lee, Biocatalysis in ionic liquids: influence of physicochemical properties of ionic liquids on enzyme activity and enantioselectivity, Pohang University of Science and Technology, Pohang, Korea, (2005).

[49] R. L. Gardas, M. G. Freire, I. M. Marrucho, J. A. P. Coutinho, Octanol-water partition coefficients of (imidazolium-based) ionic liquids in: The 2nd National Conference on Thermodynamics of Chemical & Biological Systems, Organized by the Indian Thermodynamics Society, October 30 to November 1, Department of Chemistry, Veer Narmad South Gujarat University, Surat, India, (2006).

[50] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.* 71 (1971) 525–616.

[51] P. Ruelle, The n-octanol and n-hexane/water partition coefficient of environmentally relevant chemicals predicted from the mobile order and disorder (MOD) thermodynamics, *Chemosphere* 40 (2000) 457–512.

[52] C.-M. Hsieh, S.-T. Lin, Prediction of 1-octanol–water partition coefficient and infinite dilution activity coefficient in water from the PR + COSMOSAC model, *Spec. Sect. Fifth Ind. Prop. Simul. Chall.* 285 (2009) 8–14.

3

Assessing chemical toxicity of ionic liquids on *Vibrio fischeri*: Correlation with structure and composition

*One of the most important properties of ionic liquids is their non-volatility, making them potentially "green" alternatives to volatile organic compounds. However, they are widely soluble in water, meaning that they can be released into aquatic ecosystems and so contribute to water pollution. Nevertheless, although the toxicity of ILs has been widely assessed in the literature, the information is still scarce due to the great number of ionic liquids that have been synthesized. The present work reports the toxicity of twenty-nine imidazolium-, pyridinium- and ammonium-based ionic liquids towards the bioluminescent photobacterium *Vibrio fischeri*. When the effect of the type of anion, the length of the alkyl chain of the cation, the cation core and the presence of a functionalized side chain in the cation on ionic liquid toxicity were analyzed, the main influence was seen to be exercised by the alkyl chain length. A Quantitative Structure-Activity Relationships-based method was used to compare the experimental results with previously estimated values and very good agreement was obtained. A relationship between the toxicity, expressed as Log EC_{50} , and the 1-octanol-water partition coefficient was established.*

3. ASSESSING CHEMICAL TOXICITY OF IONIC LIQUIDS ON *VIBRIO FISCHERI*: CORRELATION WITH STRUCTURE AND COMPOSITION

3.1. INTRODUCTION

Ionic liquids (ILs) are a class of organic salts made of positively and negatively charged ions with a wide liquid range that have recently drawn much attention for use in a variety of chemical processes as “green” solvents. Although conventional organic solvents are widely available and can be obtained without exorbitant prices, issues regarding volatility, toxicity, physical hazards and the possibility of environmental pollution may well limit their use in the future. Growing awareness about the risk of using these solvents has led to a search for alternatives and the discovery of ILs seemed to solve the problem [1]. In general, ILs are used as solvents, electrolytes, lubricants, stationary phases for chromatography, matrices for mass spectrometry, supports for the immobilization of enzymes, as liquid crystals, templates for nano-materials synthesis, in separation technologies, in preparation of catalytic membranes and in the generation of high conductivity materials. As solvents, ILs possess several advantages over conventional solvents, which make them environmentally compatible: low vapor pressures, chemical and thermal stability, non-flammability, high ionic conductivity, a large electrochemical window and solvation ability [2].

Non-volatility is an essential common characteristic for which ILs do not evaporate or produce air contamination. For instance, Kabo *et al.* [3] determined the vapor pressure of [bmim⁺][PF₆⁻] at 298.15 K as 10⁻¹¹ Pa. If chemical engineers replaced conventional organic solvents by ILs, air pollution and the costs involved in environmental mitigation would be reduced significantly. Nevertheless, while ILs might decrease costs and environmental damage, their introduction into aquatic environments may lead to water pollution because of their high solubility in water [4-9]. Anthony *et al.* [10] showed that the solubility of IL [bmim⁺][PF₆⁻] in water is about 2% (wt). However, the water solubility of ILs depends on their nature, especially the nature of their cations and anions. For this reason, water is the most likely medium for ILs to be released into the environment. Moreover, to increase the number of industrial applications it is crucial to know the environmental fate and toxicological behavior of ILs. In this respect, there is paucity of toxicological data on ILs in the bibliography although, in recent years, some studies related to these issues have been published. In the context of aquatic toxicity, several publications have investigated IL toxicity using different aquatic organisms such as bacteria (specially, *Vibrio fischeri*) [4, 11-18], green algae (*e.g.* *Pseudokirchneriella subcapitata*) [19, 20], aquatic plants (*e.g.* duckweed *Lemna minor*) [16, 21, 22], invertebrates (mainly the freshwater crustacean *Daphnia magna*) [20, 23] or vertebrates like fish (the zebrafish *Danio rerio*) [20, 24] or frogs (*Rana nigromaculata*) [25]. But, while the number of studies which evaluate the aquatic toxicity of ILs is increasing, only limited information is available. In addition, the number of possible synthesized ILs is enormous: Álvarez-Guerra and Irabien [26] established that “more than 10⁶ different ILs may be synthesized, with 10¹² binary combinations and 10¹⁸ ternary systems possible”.

The most widely used methods to determine toxicological risk in an aqueous medium are inhibition assays [17]. The most common bacterial bioassay according to Parvez *et al.* [27] uses *Vibrio fischeri* (formerly known as *Photobacterium Phosphoreum*), a

marine gram negative bacterium. This inhibition assay is characterized for being the most rapid, cost effective, sensitive and reproducible assay. It is also the standard (eco) toxicological bioassay in Europe (DIN EN ISO 11348) [28]. In reality, many different luminescence inhibition tests involving *Vibrio fischeri* have been developed for the analysis of aqueous samples [17]. In this paper, the (eco) toxicity of several ILs is determined by the Microtox® Toxicity Test, one of the most widely used bioassay tests because of its intense and stable light emission, the high sensitivity to different compounds and the flexibility which a marine bacterium provides [29]. Indeed, this test has been widely used to determine the toxicity of conventional organic compounds for more than two decades [30]. In addition, this test provides a rapid means of determining the acute toxicity of aqueous compounds by measuring decreases in light output from the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. Light emission is directly proportional to the metabolic activity of the bacterial population and any inhibition of enzymatic activity causes a corresponding decrease in luminescence [27].

In the toxicity studies of ILs previously published in the literature, various authors established a relationship between IL toxicity and different parameters, such as cation core, alkyl chain length and short second alkyl chain of the cation, side chain functionalization and type of anion. The effect of the cation core on the overall toxicity of ILs towards *Vibrio fischeri* has not been studied in depth, although Costa *et al.* [31] observed an apparent higher toxicity of the pyridinium core than of the imidazolium core in their assays. Their results agreed with those obtained by Ventura *et al.* [32], who deduced that cations with a six-member ring (pyridinium) are more toxic than those with a five-member ring (imidazolium). The general tendency is that IL toxicity increases with alkyl chain length [4, 12-15, 19, 33]. To cite Romero *et al.* [14] “the shorter the chain length of side chain R₂, the lower the toxic effect”. The explanation for this is that an increase in alkyl chain length produces an increase in cation lipophilicity, facilitating the entrance of IL through the cell membrane [34, 35]. In addition, the structures of the ILs tested (especially, imidazolium-based ILs) are quite similar to cationic surfactants, which are known to produce an increase in membrane permeability and have narcotic effects when their alkyl chain length increases [4, 17, 33, 36]. On the other hand, varying the anion also contributes to IL toxicity, although controversy exists in this respect. In publications in which the anion is seen as relevant for IL toxicity, the general trend for increasing anion toxicity is: bis(trifluoromethylsulfonyl)imide > hexafluorophosphate > tetrafluoroborate > chloride [13, 37, 38]. According to Pinto *et al.* [13], from [bmim⁺][Cl⁻] to [bmim⁺][BF₄⁻] *Vibrio fischeri* toxicity increased more than 12-fold. Nevertheless, other authors think that the influence of anions on IL toxicity is negligible and that the most important effect is that of side alkyl chain of cation [4, 14, 39]. Finally, there is the suggestion that side chain functionalization (e.g. oxygenated chains) leads to lower toxicity values [16, 38]. This paper studies these and other influences on *Vibrio fischeri* toxicity of ILs, such as the influence of a second short alkyl chain in the IL cation and the presence of double bonds in the same.

During recent years, several authors have developed mathematical models based on the structural features of ILs to predict their toxicity. These models are called Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) and consist of group contribution methods [12, 26, 34, 39-45]. The influence of three main components, namely the cation ring, the alkyl chain and the anion, on the toxicity of ILs is studied in these methods. However, this type of model has some limitations due to the lack of experimental data for some specific families of ILs. Recently, a critical review has underlined the need for extensive and systematic studies to enlarge the toxicological databases, in order to better

understand the toxicity of ILs [46]. Due to this lack of toxicological information on ILs, some previous studies have tried to establish relations or mathematical correlations between toxicity and the lipophilicity or hydrophobicity of ILs using the 1-octanol-water partition coefficient [4, 16, 47].

The main objective of this work was to measure the aquatic toxicity of a set of twenty-nine imidazolium, pyridinium and ammonium-based ILs using the *Vibrio fischeri* inhibition test: 1-ethyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([emim⁺][PF₆⁻]), 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([bmim⁺][PF₆⁻]), 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([hmim⁺][PF₆⁻]), 1-methyl-3-octylimidazolium hexafluorophosphate ([omim⁺][PF₆⁻]), 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([bmim⁺][BF₄⁻]), 1-methyl-3-octylimidazolium tetrafluoroborate ([omim⁺][BF₄⁻]), 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([emim⁺][NTf₂⁻]), 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([bmim⁺][NTf₂⁻]), 1-hexyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([hmim⁺][NTf₂⁻]), 1-methyl-3-octylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([omim⁺][NTf₂⁻]), 1-butyl-2,3-dimethylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([bdmim⁺][NTf₂⁻]), 1-ethyl-3-methylimidazolium triflate ([emim⁺][TfO⁻]), 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulphate ([emim⁺][EtSO₄⁻]), 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([emim⁺][CH₃COO⁻]), 1-butyl-3-methylimidazolium methylsulphate ([bmim⁺][MeSO₄⁻]), 1-butyl-3-methylimidazolium 2-(2-methoxyethoxy) ethylsulphate ([bmim⁺][MDEGSO₄⁻]), 1-methylimidazolium chloride ([mim⁺][Cl⁻]), 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride ([emim⁺][Cl⁻]), 1-methyl-3-propylimidazolium chloride ([pmim⁺][Cl⁻]), 1-allyl-3-methylimidazolium chloride ([amim⁺][Cl⁻]), 1-(2-hydroxyethyl)-3-methylimidazolium chloride ([hemim⁺][Cl⁻]), 1,2-dimethylimidazolium chloride ([dmim⁺][Cl⁻]), 1-ethylimidazolium chloride ([eim⁺][Cl⁻]), 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([bmim⁺][Cl⁻]), 1-hexyl-3-methylimidazolium chloride ([hmim⁺][Cl⁻]), 1-methyl-3-octylimidazolium chloride ([omim⁺][Cl⁻]), 1-ethyl-3-methylpyridinium ethylsulphate ([empy⁺][EtSO₄⁻]), 1-butyl-3-methylpyridinium tetrafluoroborate ([bmpy⁺][BF₄⁻]) and ethylammonium nitrate (ETAN). ILs toxicity was determined as effective nominal concentration EC₅₀ which is defined as the IL concentration that produces a mortality of 50 per cent of the bacterial population. We also present an accurate study of the different influences on IL toxicity and establish a correlation between EC₅₀ values and the 1-octanol-water partition coefficients (*K_{ow}*) obtained in a previous paper [48].

3.2. EXPERIMENTAL

3.2.1. Test Chemicals

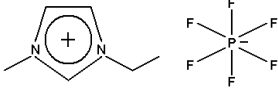
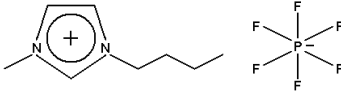
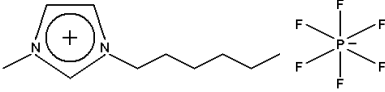
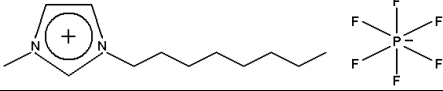
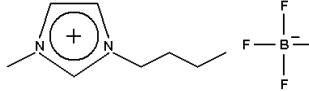
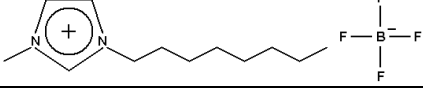
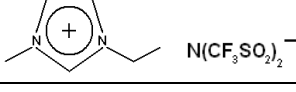
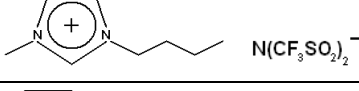
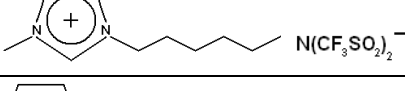
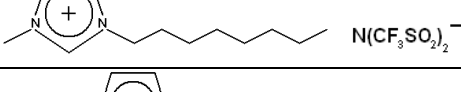
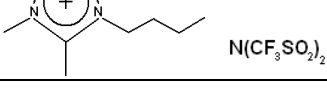
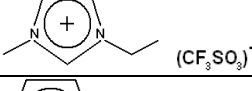
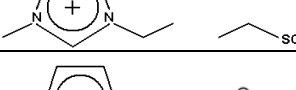
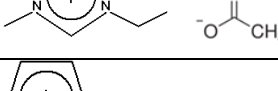
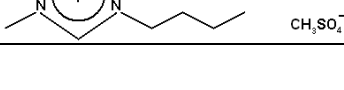
The structures of the ILs used in this study are listed in Table 3.1. The ILs [emim⁺][PF₆⁻] (purity>99%), [bmim⁺][PF₆⁻] (purity>99%), [hmim⁺][PF₆⁻] (purity>99%), [omim⁺][PF₆⁻] (purity>99%), [bmim⁺][BF₄⁻] (purity>99%), [emim⁺][NTf₂⁻] (purity>99%), [bmim⁺][NTf₂⁻] (purity>99%), [hmim⁺][NTf₂⁻] (purity>99%), [omim⁺][NTf₂⁻] (purity>99%), [bdmim⁺][NTf₂⁻] (purity>99%), [emim⁺][TfO⁻] (purity>99%), [emim⁺][EtSO₄⁻] (purity>99%), [emim⁺][CH₃COO⁻] (purity>95%), [mim⁺][Cl⁻] (purity>98%), [emim⁺][Cl⁻] (purity>98%), [pmim⁺][Cl⁻] (purity>98%), [amim⁺][Cl⁻] (purity>98%), [hemim⁺][Cl⁻] (purity>99%), [dmim⁺][Cl⁻] (purity>98%), [eim⁺][Cl⁻] (purity>98%), [bmim⁺][Cl⁻] (purity>99%), [hmim⁺][Cl⁻] (purity>98%), [omim⁺][Cl⁻] (purity>98%) and ETAN (purity>97%) were purchased from Iolitec (Germany). The ILs [omim⁺][BF₄⁻] (purity>99%), [bmim⁺][MeSO₄⁻] (purity>99%),

3. Assessing chemical toxicity of ILs on *Vibrio fischeri*

[bmim⁺][MDEGSO₄⁻] (purity>98%), [emip⁺][EtSO₄⁻] (purity>99%) and [bmpy⁺][BF₄⁻] (purity>99%) were purchased from Solvent Innovation GmbH (Cologne, Germany).

Table 3.1

Abbreviations, molecular weight and structures of the studied ILs.

Abbreviation	Molecular weight (g mol ⁻¹)	Structure
[emim ⁺][PF ₆ ⁻]	256.13	
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	284.18	
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	312.08	
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	340.29	
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	226.02	
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	282.13	
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	391.31	
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	419.37	
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	447.42	
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	475.47	
[bdmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	433.39	
[emim ⁺][TfO ⁻]	260.24	
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	236.29	
[emim ⁺][CH ₃ COO ⁻]	170.21	
[bmim ⁺][MeSO ₄ ⁻]	250.32	

3. Assessing chemical toxicity of ILs on *Vibrio fischeri*

Abbreviation	Molecular weight (g mol ⁻¹)	Structure
[bmim ⁺][MDEGSO ₄ ⁻]	338.43	
[mim ⁺][Cl ⁻]	118.57	
[emim ⁺][Cl ⁻]	146.02	
[pmim ⁺][Cl ⁻]	160.64	
[amim ⁺][Cl ⁻]	158.63	
[hemim ⁺][Cl ⁻]	162.62	
[dmim ⁺][Cl ⁻]	131.58	
[eim ⁺][Cl ⁻]	131.58	
[bmim ⁺][Cl ⁻]	174.67	
[hmim ⁺][Cl ⁻]	202.72	
[omim ⁺][Cl ⁻]	230.78	
[empy ⁺][EtSO ₄ ⁻]	247.32	
[bmpy ⁺][BF ₄ ⁻]	237.05	
ETAN	108.1	

3.2.2. Microtox® tests

The Microtox® Toxicity Test evaluates the extent to which luminescence is inhibited in the marine bacterium *Vibrio Fischeri*. The bacterium was purchased from ModernWater. A Microtox® M500 Analyzer (Azur Environmental) was used. In this test a range of diluted aqueous solutions (from 5.625 to 45 percent) of each IL was used. A concentration of 100 percent corresponds to a known concentration of an IL stock solution. After exposing the bacteria to each IL solution (the concentration of which depended on the IL used) for 15 minutes, the light output was measured and compared with the light output of a blank control sample. The toxicity was evaluated and a 50 percent reduction in luminescence was computed and EC₅₀ (µM) values were obtained. In this work toxicity values reported in the text and in the tables are expressed as Log EC₅₀ (µM). For each IL the measurement was taken at least three times.

3.3. RESULTS AND DISCUSSION

The study focuses on the relevance of some IL structural features such as the cation core (tetrafluoroborate and ethylsulphate anions), the alkyl chain length (hexafluorophosphate, tetrafluoroborate, bis(trifluoromethylsulfonyl)imide and chloride anions), the impact of different anions (imidazolium family), the presence of a functionalized lateral chain (chloride anion), the influence of a second short alkyl chain (bis(trifluoromethylsulfonyl)imide and chloride anions) and the effect of a double bond in the alkyl chain (chloride anion) on the toxicity towards the marine luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. Table 3.2 shows the EC₅₀ values for the ILs measured experimentally in this work and the EC₅₀ values for some taken from the literature.

3. Assessing chemical toxicity of ILs on *Vibrio fischeri*

Table 3.2

Log EC₅₀ values for the ILs tested in each assay after 15 min of exposure of the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*, with the respective 95 percent confidence limits (in brackets); Log EC₅₀ mean values; Log EC₅₀ obtained with a group contribution method QSAR [34]; Log EC₅₀ found in the literature and Log *K_{ow}*, 1-octanol-water partition coefficient [48]. Some Volatile Organic Compounds (VOCs) appear in italics at the end of the table with their Log EC₅₀ values [30].

Ionic liquid	Log EC₅₀ (μM), this work (lower limit, upper limit)	Log EC₅₀ (μM), this work (average)	Log EC₅₀ (μM), from QSAR [34]	Log EC₅₀ (μM), from the literature	Log <i>K_{ow}</i> [48]
[emim ⁺][PF ₆ ⁻]	4.11 (3.11, 5.11) 4.29 (4.13, 4.44) 4.27 (4.12, 4.43)	4.22	4.38	-	-
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	3.43 (3.25, 3.61) 3.34 (3.29, 3.38) 3.09 (2.69, 3.50)	3.29	3.32	3.07 [11]	-1.4908
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	2.29 (2.29, 2.36) 2.51 (2.48, 2.55) 2.23 (2.21, 2.26) 2.43 (2.39, 2.46)	2.36	2.24	2.17 [11]; 2.11 [14]	-0.9508
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	1.33 (1.18, 1.62) 1.44 (0.27, 2.61) 0.96 (0.74, 1.18)	1.25	1.18	0.95 [11]; 0.70 [14]	-0.6220
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	3.55 (3.41, 3.69) 3.54 (3.34, 3.73) 3.21 (2.38, 4.04) 3.51 (2.03, 5.00) 3.49 (3.39, 3.60)	3.46	3.32	3.56 [33]; 3.10 [11]; 3.54 [37]; 3.20 [38]	-2.2676
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	1.07 (0.80, 1.34) 0.92 (0.77, 1.07) 0.73 (0.48, 0.98) 0.94 (0.85, 1.04)	0.91	1.18	1.41[33]	-1.2700
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	3.62 (3.32, 3.91) 3.61 (3.27, 3.95) 3.62 (3.61, 3.63)	3.62	3.97	2.57 [18]; 3.41 [31]	-1.1925
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	2.56 (2.30, 2.81) 2.49 (2.42, 2.56) 2.50 (2.43, 2.56)	2.51	2.90	2.48 [37]; 2.53 [18]	-0.9682
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	1.76 (1.61, 1.90) 1.91 (1.85, 1.97) 1.78 (1.77, 1.79)	1.82	1.82	-	-0.8742
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.91 (0.72, 1.10) 1.02 (0.82, 1.22) 1.06 (0.73, 1.38)	0.99	0.76	-	0.5631
[bdmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	3.03 (2.95, 3.12) 2.81 (2.49, 3.14) 2.76 (2.67, 2.84)	2.87	2.69	-	-0.1395
[emim ⁺][TfO]	3.70 (3.15, 4.24) 3.76 (3.20, 4.32) 3.77 (3.32, 4.22)	3.74	2.77	-	-1.4921
[emim ⁺][EtSO ₄ ⁻]	4.02 (3.66, 4.38) 4.12 (3.64, 4.60) 4.17 (3.98, 4.36)	4.10	4.38	4.02 [14]	-1.6459
[emim ⁺][CH ₃ COO ⁻]	3.81 (3.49, 4.14) 3.92 (3.89, 3.95) 3.95 (3.88, 4.01)	3.89	2.77	4.17 [31]	-2.0362
[bmim ⁺][MeSO ₄ ⁻]	3.44 (3.37, 3.51) 3.80 (3.15, 4.45) 3.49 (3.37, 3.60)	3.57	3.32	3.56 [17]	-1.9547
[bmim ⁺][MDEGSO ₄ ⁻]	3.36 (3.32, 3.41) 3.59 (3.52, 3.66) 3.49 (3.47, 3.50)	3.48	-	-	-1.7190
[mim ⁺][Cl ⁻]	4.04 (3.47, 4.60) 3.75 (3.64, 3.87) 4.07 (3.94, 4.21) 3.90 (3.59, 4.21)	3.94	-	-	-1.4510

3. Assessing chemical toxicity of ILs on *Vibrio fischeri*

Ionic liquid	Log EC ₅₀ (μM), this work (lower limit, upper limit)	Log EC ₅₀ (μM), this work (average)	Log EC ₅₀ (μM), from QSAR [34]	Log EC ₅₀ (μM), from the literature	Log K _{ow} [48]
[emim ⁺][Cl ⁻]	4.76 (4.39, 5.13) 4.77 (4.67, 4.88) 4.87 (4.78, 4.95)	4.80	4.38	4.55 [12]; 4.33 [16]; 4.60 [49]	-1.0177
[pmim ⁺][Cl ⁻]	3.67 (3.58, 3.77) 3.84 (3.72, 3.93) 3.83 (3.38, 4.30)	3.78	3.86	-	-
[amim ⁺][Cl ⁻]	4.28 (3.15, 5.41) 4.33 (4.26, 4.41) 4.45 (4.39, 4.51)	4.36	3.86	-	-
[hemim ⁺][Cl ⁻]	5.30 (4.93, 5.67) 5.35 (5.18, 5.52) 5.36 (5.28, 5.45) 5.34 (5.23, 5.45)	5.34	-	-	-2.2366
[dmim ⁺][Cl ⁻]	4.33 (4.13, 4.54) 4.34 (4.21, 4.47) 4.24 (4.12, 4.37)	4.31	4.92	-	-1.6162
[eim ⁺][Cl ⁻]	4.33 (4.10, 4.56) 4.02 (3.93, 4.12) 4.12 (3.92, 4.32)	4.16	4.67	-	-1.1555
[bmim ⁺][Cl ⁻]	3.48 (3.35, 3.61) 3.50 (3.06, 3.93) 3.41 (3.24, 3.59)	3.46	3.32	3.71 [4]; 3.39 [14]; 3.40 [37]; 3.47 [16]; 3.34 [11]; 2.95 [9]; 3.21 [50]	-
[hmim ⁺][Cl ⁻]	2.37 (1.84, 2.90) 2.53 (2.15, 2.90) 2.33 (2.16, 2.49) 2.45 (2.13, 2.37)	2.37	2.25	1.94 [12]; 2.18 [14]; 2.32 [11]	-1.6566
[omim ⁺][Cl ⁻]	0.79 (0.63, 0.94) 0.73 (0.48, 0.98) 0.64 (0.49, 0.79) 0.65 (0.29, 1.01) 0.63 (0.57, 0.69)	0.69	1.18	1.19 [11]; 0.94 [14]; 1.01 [16]; 0.30 [50]	-
[empy ⁺][EtSO ₄ ⁻]	3.79 (3.68, 3.90) 3.71 (3.41, 4.01) 3.94 (3.47, 4.40) 3.88 (3.44, 4.32)	3.83	3.87	-	-1.6925
[bmpy ⁺][BF ₄ ⁻]	2.44 (2.32, 2.55) 2.54 (2.46, 2.63) 2.34 (2.20, 2.47)	2.44	2.80	2.38 [31]	-1.9788
ETAN	4.27 (2.79, 5.74) 4.29 (3.96, 4.62) 4.41 (3.12, 5.69) 4.33 (3.86, 4.79)	4.32	-	-	-2.7696
Methanol	-	-	-	6.51 [30]	-
Ethanol	-	-	-	5.89 [30]	-
Isopropanol	-	-	-	5.72 [30]	-
Acetonitrile	-	-	-	5.57 [30]	-
Acetone	-	-	-	5.17 [30]	-
Dichlorometane	-	-	-	4.57 [30]	-
Chloroform	-	-	-	4.16 [30]	-
Benzene	-	-	-	3.31 [30]	-
Toluene	-	-	-	2.33 [30]	-

Data in Table 3.2 showed that the measured mean Log EC₅₀ (μM) values vary from 0.69 ([omim⁺][Cl⁻]) to 5.34 ([hemim⁺][Cl⁻]), depending on the chemical structure and composition of the IL in question. Note the excellent agreement between the toxicity values obtained in this paper and the values taken from the literature. The toxicity values estimated by QSAR [34] appear in Table 3.2 and are also in very good agreement with the Log EC₅₀ values obtained in this work (see Figure 3.1). The toxicity towards *Vibrio fischeri* of fourteen of the twenty-nine ILs tested was not previously analyzed in literature. However, these values are consistent with the rest of the Log EC₅₀ values obtained in this work.

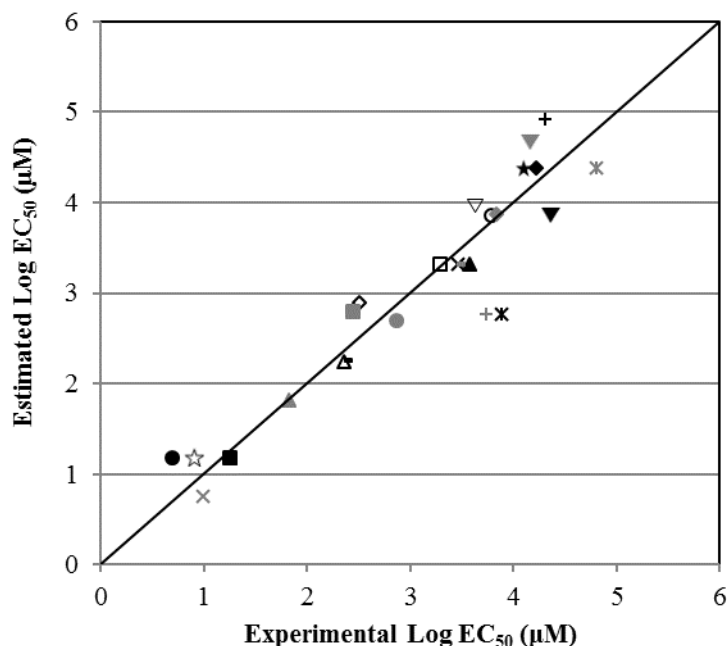


Figure 3.1. Comparison of estimated Log EC₅₀ with the experimental data for some of the ILs tested:

- ◆ [emim⁺][PF₆⁻]; □ [bmim⁺][PF₆⁻]; △ [hmim⁺][PF₆⁻]; ■ [omim⁺][PF₆⁻]; - [bmim⁺][BF₄⁻];
- ☆ [omim⁺][BF₄⁻]; ▽ [emim⁺][NTf₂⁻]; ◇ [bmim⁺][NTf₂⁻]; ▲ [hmim⁺][NTf₂⁻]; × [omim⁺][NTf₂⁻];
- [bdmim⁺][NTf₂⁻]; + [emim⁺][TfO⁻]; ★ [emim⁺][EtSO₄⁻]; ✱ [emim⁺][CH₃COO⁻]; ✱ [emim⁺][Cl⁻];
- [pmim⁺][Cl⁻]; ▼ [amim⁺][Cl⁻]; + [dmim⁺][Cl⁻]; ▼ [eim⁺][Cl⁻]; × [bmim⁺][Cl⁻]; - [hmim⁺][Cl⁻];
- [omim⁺][Cl⁻]; ▲ [bmim⁺][MeSO₄⁻]; ◆ [empy⁺][EtSO₄⁻]; ■ [bmpy⁺][BF₄⁻].

According to the results shown in Table 3.2, the toxicity of pyridinium-based ILs is higher than that of similar imidazolium-based ILs, as demonstrated by two pairs of ILs with the same anion and alkyl chain: [empy⁺][EtSO₄⁻]-[emim⁺][EtSO₄⁻] and [bmpy⁺][BF₄⁻]-[bmim⁺][BF₄⁻]. These results are in good agreement with the literature data [31, 32].

As regards the effect of the cation alkyl chain length, it can be seen from Figure 3.2 that all types of anions showed increased IL toxicity as the alkyl chain length increased: [omim⁺][PF₆⁻] > [hmim⁺][PF₆⁻] > [bmim⁺][PF₆⁻] > [emim⁺][PF₆⁻]; [omim⁺][BF₄⁻] > [bmim⁺][BF₄⁻]; [omim⁺][NTf₂⁻] > [hmim⁺][NTf₂⁻] > [bmim⁺][NTf₂⁻] > [emim⁺][NTf₂⁻]; [omim⁺][Cl⁻] > [hmim⁺][Cl⁻] > [bmim⁺][Cl⁻] > [pmim⁺][Cl⁻] > [emim⁺][Cl⁻]. This tendency has been demonstrated by other authors as mentioned in the Introduction [4, 12-15, 33, 51]. In Figure 3.2 the relationship between alkyl chain length and IL toxicity is represented.

3. Assessing chemical toxicity of ILs on *Vibrio fischeri*

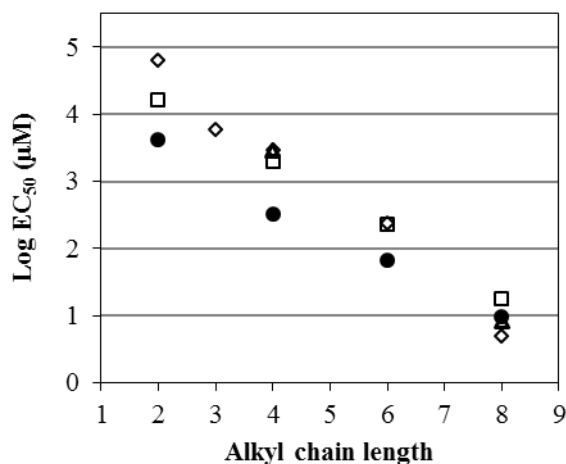


Figure 3.2. Effect of the number of carbons of the alkyl chain (n_{CR1}) on the aquatic toxicity (Log EC_{50}) for some of the ILs tested; ● bis(trifluoromethylsulfonyl)imide; □ hexafluorophosphate; △ tetrafluoroborate; and ◇ chloride anions.

The linear regression analysis of Log EC_{50} vs. alkyl chain length was carried out assuming that the most important factor in the Log EC_{50} estimation is the alkyl chain length. The following equation was obtained:

$$\text{Log EC}_{50} = 5.22 - 0.52n_{CR1} \quad (1)$$

This equation has an r^2 of 0.918 and agrees closely with the equation obtained by Romero et al. [14]. Our results confirm those obtained previously by other authors for different ILs [4, 12, 13, 33, 14, 15, 51], as can be seen in Figures 3.2 and 3.3.

The toxicity comparison was made using [bmim⁺] and [emim⁺] cations with different types of anion. According to this, the following trend in IL toxicity can be established: [NTf₂⁻] > [PF₆⁻] > [BF₄⁻] ≈ [MeSO₄⁻] ≈ [MDEGSO₄⁻] > [TfO⁻] > [CH₃COO⁻] > [EtSO₄⁻] > [Cl⁻]. The most toxic anions are those which have fluorine atoms in their structure and their toxicity rose with an increase in the number of fluorine atoms [31]. Bistriflimide [NTf₂⁻] anion with six fluorine atoms was the most toxic toward *Vibrio fischeri*. Camargo [52] reviewed studies on fluoride toxicity to aquatic organisms and he noted that fluoride ions act as enzymatic poisons, inhibiting enzyme activity and ultimately interrupting metabolic processes, such as glycolysis and the synthesis of proteins [53]. The most toxic anions are those which have fluorine atoms in their structure, probably because they are hydrolysed to hydrofluoric acid [31]. Bistriflimide [NTf₂⁻] anion with six fluorine atoms was the most toxic toward *Vibrio fischeri*. The same order was established by Frade and Afonso [54]. This trend was also observed previously by Pinto et al. [13], Samorì et al. [38] and Costa et al. [31], who observed a more toxic effect in [BF₄⁻] than [Cl⁻] anion. The higher toxicity of the bistriflimide anion compared with the acetate anion was also observed by Costa et al [31]. Other authors, such as Stolte et al. [16], also established that most of the ILs with [NTf₂⁻] anion tested in their study were more toxic than ILs with halide anions such as [Cl⁻].

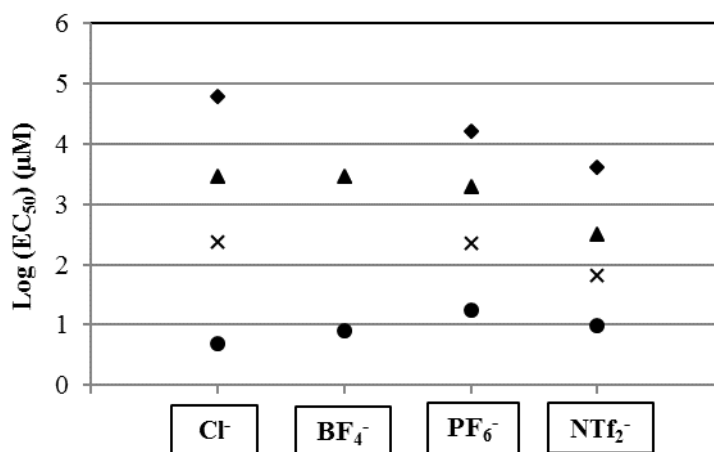


Figure 3.3. Effect of the anion in the aquatic toxicity (Log EC₅₀) of some of the ILs tested;
 ◆ [emim⁺]; ▲ [bmim⁺]; × [hmim⁺]; ● [omim⁺].

Another factor in the *Vibrio fischeri* toxicity of ILs analyzed was the effect of the presence of a functionalized alkyl chain in the cation. For this, [hemim⁺][Cl⁻] (log EC₅₀=5.34) and [emim⁺][Cl⁻] (log EC₅₀=4.80) were compared, the results showing that the presence of a hydroxyl group in the alkyl chain decreased *Vibrio fischeri* toxicity of the IL, perhaps because the introduction of one oxygen increases the polarity of the alkyl chain. Although this trend has not been studied in the literature in depth some authors have obtained similar results [16, 38].

Another influence studied in this work was the presence of a second short (one or two carbon atoms) alkyl chain in the cation. For this, we compared [bdmim⁺][NTf₂⁻] (log EC₅₀=2.87), which has two short alkyl (and a long one) chains in the imidazolium ring, and [bmim⁺][NTf₂⁻] (log EC₅₀=2.51) with only one short alkyl chain and a long one. Other examples would be [dmim⁺][Cl⁻] (log EC₅₀=4.31) and [emim⁺][Cl⁻] (log EC₅₀=4.80), both with two short alkyl chains, compared with ILs with only one cation alkyl chain [mim⁺][Cl⁻] (log EC₅₀=3.94) and [eim⁺][Cl⁻] (log EC₅₀=4.16), respectively. According to the experimental data presented in Table 3.2, ILs with two short alkyl chains were less toxic than those with only one alkyl chain in the cation. As a consequence, we can assume that a higher number of short alkyl chains in the imidazolium ring involves a decrease in IL toxicity towards *Vibrio fischeri*.

Finally, the effect of the presence of a double bond in the alkyl chain of the cation was analyzed by comparing [pmim⁺][Cl⁻] (log EC₅₀=3.78) and [amim⁺][Cl⁻] (log EC₅₀=4.36). As can be seen in Table 3.1, [amim⁺][Cl⁻] has a double bond in its chemical structure, which reduced the IL *Vibrio fischeri* toxicity compared with the single bond ([pmim⁺][Cl⁻]).

As mentioned in the Introduction, lipophilicity and hydrophobicity of ILs are terms that have been linked to the aquatic toxicity in several studies. From the results, a relationship was deduced between IL hydrophobicity (expressed as logarithm of 1-octanol-water partition coefficient, Log K_{ow}) and Log (1/EC₅₀):

$$\text{Log}(1/EC_{50}) = -1.436 + 0.859\text{Log}K_{ow} - 0.119(\text{Log}K_{ow})^2 \quad (2)$$

3. Assessing chemical toxicity of ILs on *Vibrio fischeri*

The Log K_{ow} values of some of the ILs studied in this work were determined in a previous work published by the authors [48] and they are resumed in Table 3.2. Figure 3.4 shows how Log (1/EC₅₀) increases with increasing Log K_{ow} .

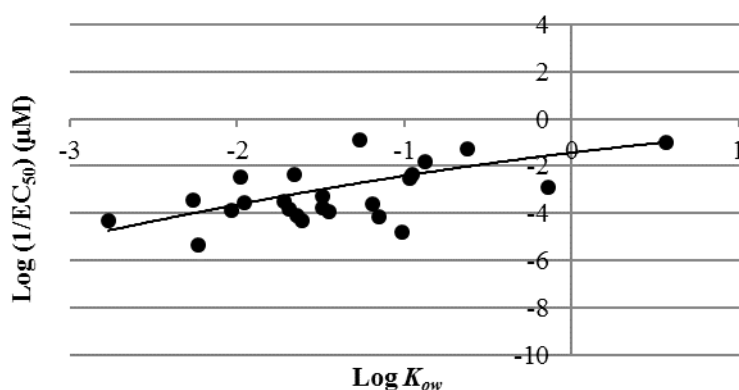


Figure 3.4. Correlation between Log (1/EC₅₀) and Log K_{ow} for some of the ILs studied.

Finally, the Log EC₅₀ of all of the imidazolium-based ILs with [NTf₂⁻], [BF₄⁻] and [PF₆⁻] anions, except [emim⁺][PF₆⁻], and of the pyridinium-based ILs was seen to be lower than some commonly used industrial solvents, as seen in the comparisons shown in Table 3.2. The imidazolium-based ILs with [Cl⁻] anion and ammonium-based ILs are less harmful than the conventional organic solvents considered.

3.4. CONCLUSIONS

The Log EC₅₀ of twenty-nine imidazolium-, pyridinium- and ammonium-based ILs towards the bioluminescent photobacterium *Vibrio fischeri* ranged between 1.25 and 5.34. The experimental values showed very good agreement with those estimated using the QSAR method. Pyridinium-based ILs showed higher toxicity than imidazolium-based ILs, but ethylammonium nitrate was one of the most environmentally friendly of all the ILs studied. *Vibrio fischeri* toxicity increases as the length of the alkyl substituent of the cation increases, while if the alkyl chain is functionalized with a hydroxyl group or a double bond or a second short alkyl chain is present in the cation, the IL is less toxic. The nature of the anion has much less influence on the EC₅₀ of the ILs, especially when the alkyl chain length of the cation increases.

The Log (1/EC₅₀) is correlated with Log K_{ow} by a second order polynomial, although the correlation is quite poor for some of the ILs studied. On the other hand, because the EC₅₀ values are of the same order than VOCs we can conclude that the aquatic toxicity of these ILs are quite similar to that of industrial VOCs and will not be accumulated in the environment. In addition, the replacement of a conventional process by a process based on ILs as new solvents may be environmentally attractive if the IL permits a high degree of reusability due to its easy separation.

3.5. REFERENCES

- [1] A.H. Mohammad Fauzi, N.A.S. Amin, An overview of ionic liquids as solvents in biodiesel synthesis, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16 (2012) 5770–5786.
- [2] S. Keskin, D. Kayrak-Talay, U. Akman, Ö Hortaçsu, A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications, *J. Supercrit. Fluids* 43 (2007) 150–180.
- [3] G.J. Kabo, A.V. Blokhin, Y.U. Paulechka, A.G. Kabo, M.P. Shymanovich, J.W. Magee, Thermodynamic properties of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate in the condensed state, *J. Chem. Eng. Data* 49 (2004) 453–461.
- [4] K.M. Docherty, C.F. Kulpa Jr., Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 185–189.
- [5] U. Domańska, A. Rękawek, A. Marciniak, Solubility of 1-alkyl-3-ethylimidazolium-based ionic liquids in water and 1-octanol, *J. Chem. Eng. Data* 53 (2008) 1126–1132.
- [6] M.G. Freire, P.J. Carvalho, A.M.S. Silva, L.M.N.B.F. Santos, L.P.N. Rebelo, I.M. Marrucho, J.A.P. Coutinho, Ion specific effects on the mutual solubilities of water and hydrophobic ionic liquids, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 202–211.
- [7] J. McFarlane, W.B. Ridenour, H. Luo, R.D. Hunt, D.W. DePaoli, R.X. Ren, Room temperature ionic liquids for separating organics from produced water, *Sep. Sci. Technol.* 40 (2005) 1245–1265.
- [8] J. Ranke, A. Othman, P. Fan, A. Müller, Explaining ionic liquid water solubility in terms of cation and anion hydrophobicity, *Int. J. Mol. Sci.* 10 (2009) 1271–1289.
- [9] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N.V.K. Aki, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, Octanol–water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 83–90.
- [10] J.L. Anthony, E.J. Maginn, J.F. Brennecke, Solution thermodynamics of imidazolium-based ionic liquids and water, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 10942–10949.
- [11] M.T. García, N. Gathergood, P.J. Scammells, Biodegradable ionic liquids: Part II. Effect of the anion and toxicology, *Green Chem.* 7 (2005) 9.
- [12] P. Luis, I. Ortiz, R. Aldaco, A. Irabien, A novel group contribution method in the development of a QSAR for predicting the toxicity (*Vibrio fischeri* EC50) of ionic liquids, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67 (2007) 423–429.
- [13] P.C.A.G. Pinto, S.P.F. Costa, J.L.F.C. Lima, M.L.M.F.S. Saraiva, Automated high-throughput *Vibrio fischeri* assay for (eco)toxicity screening: Application to ionic liquids, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80 (2012) 97–102.
- [14] A. Romero, A. Santos, J. Tojo, A. Rodríguez, Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids, *J. Hazard. Mater.* 151 (2008) 268–273.

- [15] C. Samorì, A. Pasteris, P. Galletti, E. Tagliavini, Acute toxicity of oxygenated and nonoxygenated imidazolium-based ionic liquids to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*, *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (2007) 2379–2382.
- [16] S. Stolte, M. Matzke, J. Arning, A. Bösch, W.-R. Pitner, U. Welz-Biermann, B. Jastorff, J. Ranke, Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids, *Green Chem.* 9 (2007) 1170–1179.
- [17] S.P.M. Ventura, C.S. Marques, A.A. Rosatella, C.A.M. Afonso, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, Toxicity assessment of various ionic liquid families towards *Vibrio fischeri* marine bacteria, Spec. Issue Sect. SETAC North Am. 31st Annu. Meet. Adv. Omi. Aquat. Toxicol. 76 (2012) 162–168.
- [18] S.P.M. Ventura, R.L. Gardas, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, Ecotoxicological risk profile of ionic liquids: octanol-water distribution coefficients and toxicological data, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86 (2011) 957–963.
- [19] T.P.T. Pham, C.-W. Cho, J. Min, Y.-S. Yun, Alkyl-Chain Length Effects of Imidazolium and Pyridinium Ionic Liquids on Photosynthetic Response of *Pseudokirchneriella subcapitata*, *J. Biosci. Bioeng.* 105 (2008) 425–428.
- [20] C. Pretti, C. Chiappe, I. Baldetti, S. Brunini, G. Monni, L. Intorre, Acute toxicity of ionic liquids for three freshwater organisms: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (2009) 1170–1176.
- [21] J.H. Larson, P.C. Frost, G.A. Lamberti, Variable toxicity of ionic liquid-forming chemicals to *Lemna mino* and the influence of dissolved organic matter, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 676–681.
- [22] B. Zhang, X. Li, D. Chen, J. Wang, Effects of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide on the antioxidant system of *Lemna minor*, *Protoplasma* 250 (2013) 103–110.
- [23] A.S. Wells, V.T. Coombe, On the Freshwater Ecotoxicity and Biodegradation Properties of Some Common Ionic Liquids, *Org. Process Res. Dev.* 10 (2006) 794–798.
- [24] C. Pretti, C. Chiappe, D. Pieraccini, M. Gregori, F. Abramo, G. Monni, L. Intorre, Acute toxicity of ionic liquids to the zebrafish (*Danio rerio*). *Green Chem.* 8 (2006) 238.
- [25] X.-Y. Li, J. Zhou, M. Yu, J.-J. Wang, Y.C. Pei, Toxic effects of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on the early embryonic development of the frog *Rana nigromaculata*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (2009) 552–556.
- [26] M. Álvarez-Guerra, A. Irabien, Design of ionic liquids: an ecotoxicity (*Vibrio fischeri*) discrimination approach, *Green Chem.* 13 (2011) 1507.
- [27] S. Parvez, C. Venkataraman, S. Mukherji, A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environ. Int.* 32 (2006) 265–268.

- [28] ISO 11348-3. Water quality. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Part 3: Method using freeze-dried bacteria, 2007.
- [29] A. Fuentes, M. Lloréns, J. Sáez, M.I. Aguilar, A.B. Pérez-Marín, J.F. Ortuño, V.F. Meseguer, Ecotoxicity, phytotoxicity and extractability of heavy metals from different stabilised sewage sludges, *Environ. Pollut.* 143 (2006) 355–360.
- [30] K.L.E. Kaiser, V.S. Palabrica, *Photobacterium phosphoreum* toxicity data index, *Water Qual. Res. J. Canada* 26 (1991) 361–431.
- [31] S.P.F. Costa, P.C.A.G. Pinto, R.A.S. Lapa, M.L.M.F.S. Saraiva, Toxicity assessment of ionic liquids with *Vibrio fischeri*: An alternative fully automated methodology, *J. Hazard. Mater.* 284 (2015) 136–142.
- [32] S.P.M. Ventura, A.M.M. Gonçalves, T. Sintra, J.L. Pereira, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, Designing ionic liquids: the chemical structure role in the toxicity, *Ecotoxicology* 22 (2013) 1–12.
- [33] J. Ranke, K. Mölter, F. Stock, U. Bottin-Weber, J. Poczobutt, J. Hoffmann, B. Ondruschka, J. Filser, B. Jastorff, Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58 (2004) 396–404.
- [34] P. Luis, A. Garea, A. Irabien, Quantitative structure–activity relationships (QSARs) to estimate ionic liquids ecotoxicity EC50 (*Vibrio fischeri*), *J. Mol. Liq.* 152 (2010) 28–33.
- [35] R. Sheldon, Catalytic reactions in ionic liquids, *Chem. Commun.* (2001) 2399–2407.
- [36] D.W. Roberts, J. Costello, QSAR and mechanism of action for aquatic toxicity of cationic surfactants, *QSAR Comb. Sci.* 22 (2003) 220–225.
- [37] M. Matzke, S. Stolte, K. Thiele, T. Juffernholz, J. Arning, J. Ranke, U. Welz-Biermann, B. Jastorff, The influence of anion species on the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids observed in an (eco)toxicological test battery, *Green Chem.* 9 (2007) 1198–1207.
- [38] C. Samorì, D. Malferrari, P. Valbonesi, A. Montecavalli, F. Moretti, P. Galletti, G. Sartor, E. Tagliavini, E. Fabbri, A. Pasteris, Introduction of oxygenated side chain into imidazolium ionic liquids: evaluation of the effects at different biological organization levels, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73 (2010) 1456–1464.
- [39] D.J. Couling, R.J. Bernot, K.M. Docherty, J.K. Dixon, E.J. Maginn, Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure-property relationship modeling, *Green Chem.* 8 (2006) 82–90.

- [40] S. Bruzzone, C. Chiappe, S.E. Focardi, C. Pretti, M. Renzi, Theoretical descriptor for the correlation of aquatic toxicity of ionic liquids by quantitative structure–toxicity relationships, *Chem. Eng. J.* 175 (2011) 17–23.
- [41] M. Ismail Hossain, B.B. Samir, M. El-Harbawi, A.N. Masri, M.I. Abdul Mutalib, G. Hefter, C.-Y. Yin, Development of a novel mathematical model using a group contribution method for prediction of ionic liquid toxicities, *Chemosphere* 85 (2011) 990–994.
- [42] A.-M. Lacrămă, M. V. Putz, V. Ostafe, A Spectral-SAR Model for the Anionic-Cationic Interaction in Ionic Liquids: Application to *Vibrio fischeri* Ecotoxicity, *Int. J. Mol. Sci.* 8 (2007) 842–863.
- [43] S. Ma, M. Lv, F. Deng, X. Zhang, H. Zhai, W. Lv, Predicting the ecotoxicity of ionic liquids towards *Vibrio fischeri* using genetic function approximation and least squares support vector machine. *J. Hazard. Mater.* 283 (2015) 591–598.
- [44] S. Viboud, N. Papaiconomou, A. Cortesi, G. Chatel, M. Draye, D. Fontvieille, Correlating the structure and composition of ionic liquids with their toxicity on *Vibrio fischeri*: A systematic study, *J. Hazard. Mater.* 215–216 (2012) 40–48.
- [45] F. Yan, Q. Shang, S. Xia, Q. Wang, P. Ma, Topological study on the toxicity of ionic liquids on *Vibrio fischeri* by the quantitative structure–activity relationship method, *J. Hazard. Mater.* 286 (2015) 410–415.
- [46] M. Petkovic, K.R. Seddon, L.P.N. Rebelo, C. Silva Pereira, Ionic liquids: a pathway to environmental acceptability, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 1383.
- [47] S. Stolte, J. Arning, U. Bottin-Weber, A. Müller, W.-R. Pitner, U. Welz-Biermann, B. Jastorff, J. Ranke, Effects of different head groups and functionalised side chains on the cytotoxicity of ionic liquids, *Green Chem.* 9 (2007) 760.
- [48] M.G. Montalbán, M. Collado-González, R. Trigo, F.G. Díaz Baños, G. Villora, Experimental Measurements of Octanol-Water Partition Coefficients of Ionic Liquids, *J. Adv. Chem. Eng.* 5:133 (2015) 1–9.
- [49] S.P.F. Costa, V.D. Justina, K. Bica, M. Vasiloiu, P.C.A.G. Pinto, M.L.M.F.S. Saraiva, Automated evaluation of pharmaceutically active ionic liquids' (eco)toxicity through the inhibition of human carboxylesterase and *Vibrio fischeri*, *J. Hazard. Mater.* 265 (2014) 133–141.
- [50] B. Peric, J. Sierra, E. Martí, R. Cruañas, M.A. Garau, J. Arning, U. Bottin-Weber, S. Stolte, (Eco)toxicity and biodegradability of selected protic and aprotic ionic liquids, *J. Hazard. Mater.* 261 (2013) 99–105.
- [51] T.P.T. Pham, C.-W. Cho, Y.-S. Yun, Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review, *Water Res.* 44 (2010) 352–372.
- [52] J.A. Camargo, Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review, *Chemosphere* 50 (2003) 251–64.

[53] H. Wang, S.V. Malhotra, A.J. Francis, Toxicity of various anions associated with methoxyethyl methyl imidazolium-based ionic liquids on *Clostridium* sp, *Chemosphere* 82 (2011) 1597–603.

[54] R.F. Frade, C.A. Afonso, Impact of ionic liquids in environment and humans: an overview, *Hum. Exp. Toxicol.* 29 (2010) 1038–1054.

4

Assessing dicationic ionic liquids as an environmentally friendly alternative using the *Vibrio fischeri* inhibition test

*One of the reasons why Ionic Liquids (ILs) have received growing interest from researchers is their environmentally interesting characteristics, such as their negligible vapour pressure and their good chemical and thermal properties. In particular, dicationic ILs whose thermal and electrochemical stability is higher than that of monocationic ILs, have begun to gain attention during recent years. In this work, monocationic and dicationic ILs were synthesized, characterized and tested for their toxicity, which was assessed using the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. The results revealed that the toxicity of the ILs mainly depends on the head groups and linkage chain length of their cationic structure. Introduction of a new cationic head decreased the EC_{50} (concentration which produces 50% mortality in the bacteria) of the ILs. The results present a promising picture of dicationic ILs as alternatives with lower environmental impact than their monocationic counterparts and underline the significance of designing particular structures for ILs.*

4. ASSESSING DICATIONIC IONIC LIQUIDS AS AN ENVIRONMENTALLY FRIENDLY ALTERNATIVE USING THE *VIBRIO FISHERI* INHIBITION TEST

4.1. INTRODUCTION

Ionic liquids (ILs) are organic salts which are liquids at or near ambient conditions. ILs have gained much attention as green solvents during recent years due to their outstanding properties, which include negligible vapour pressure, non-flammability, wide liquid state temperature range, high thermal and chemical stability and high ionic conductivity [1]. Moreover, the properties of ILs can be tuned by adjusting the structures of their anion and cation, or both, leading ILs to become known as “designer solvents” [2]. In this way, it is possible to control several physical properties, such as hydrophobicity, viscosity, density, solubility and their biodegradability and toxicological behaviour [3]. Because of these properties, ILs can be used in a wide variety of applications; for instance, in chemical reactions, chemical processing and electronic devices [1].

Recently, dicationic ILs have developed with two cationic head groups linked by an alkyl chain and two monoanions. These compounds are especially interesting because they generally possess higher thermal and electrochemical stability, making them more suitable than monocationic ILs for use in high-temperature applications [4]. In this context, the suitability of dicationic ILs as reaction media has been studied when high temperatures are necessary [5]. In addition, dicationic ILs present a new potential for use as surfactants, lubricants and for nanoparticle coating.

Although ILs should not contribute to atmospheric pollution due to their non-volatility [6], they are easily soluble in water and could be toxic to aquatic organisms [7] in cases of accidental release or at the end of their life cycle. For this reason, the environmental behaviour and toxicological effects of ILs need to be evaluated. However, more studies related to the ecotoxicological risk profiles of ILs are required because of the huge number of ILs that can be synthesized [8, 9]. During the past few years, some publications have studied IL toxicity using different aquatic organisms such as bacteria (especially, *Vibrio fischeri*) [3, 8, 10-17], green algae (e.g. *Pseudokirchneriella subcapitata*) [18, 19], aquatic plants (e.g. duckweed *Lemna minor*) [15, 20, 21], invertebrates (mainly the freshwater crustacean *Daphnia magna*) [4, 18, 22] or vertebrates like fish (the zebrafish *Danio rerio*) [18, 23] or frogs (*Rana nigromaculata*) [24]. In these studies, ILs show a varying hazard potential, depending on their individual morphology. Regardless of the studied test system, the strongest effect on an IL toxicity seems to be their lipophilicity [4]. However, despite the increasing number of studies which evaluate IL aquatic toxicity, the information available is still limited, especially information related to dicationic ILs.

Several published works have attempted to predict the aquatic toxicity of ILs by Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) methods [16, 25-29] which are mathematical models mainly based on the anion, the cation core and the length of the alkyl chain of the cation of the IL. Nevertheless, this kind of models is not sufficiently well developed to be useful for certain specific ILs, such as dicationic ILs. For this reason, more experimental data concerning the toxicity of dicationic ILs are required for incorporation in the respective databases, which will help predict their toxicity.

4. Assessing dicationic ILs using the *Vibrio fischeri* inhibition test

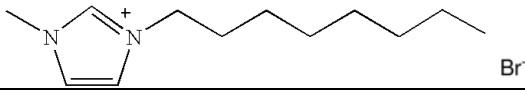
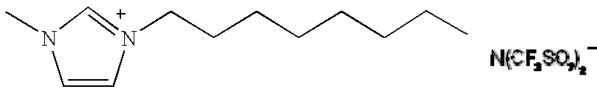
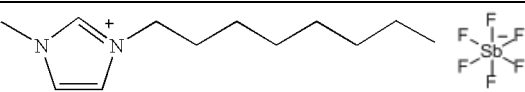
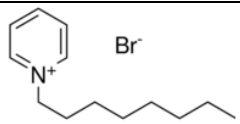
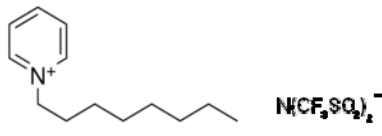
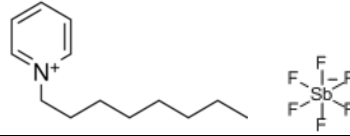
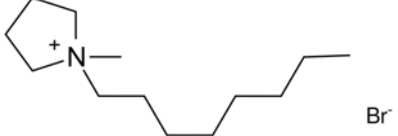

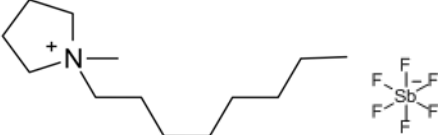
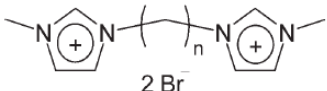
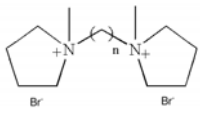
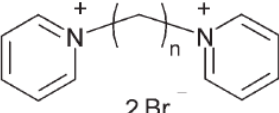
According to Ventura *et al.* [8], one of the most widely used toxicological tests is the Microtox® Acute Toxicity Test, which uses the gram negative marine bacterium *Vibrio fischeri* (formerly known as *Photobacterium Phosphoreum*). This test is one of the most commonly used bioassay tests due to the intense and stable light emission of these bacteria and because it is highly sensitive to different compounds [30], and has been used for more than two decades in a large number of studies to determine the toxicity of conventional organic compounds toxicity for more than two decades [31]. In fact, this method constitutes a standard (eco) toxicological inhibition assay in Europe (DIN EN ISO 11348) [32], which determines the toxicity of a substance toward *Vibrio fischeri* by measuring the diminution in their light output. This decrease in *Vibrio fischeri* light emission is due to a reduction in enzymatic activity, so that any luminescence is directly proportional to the metabolic activity of the bacterial population [33].

The first objective of this work was to synthesize a set of twenty-six imidazolium, pyrrolidinium and pyridinium-based ILs (9 monocationic and 17 dicationic) (Table 4.1). This paper presents the first reported synthesis for some of these compounds. The second objective was to measure their aquatic toxicity using the *Vibrio fischeri* inhibition test as the effective nominal EC₅₀ concentration (concentration necessary to decrease 50% of luminescence produced by the bacteria population). To date, no report in the literature has studied the toxicity of the most of these ILs (22 out of 26) towards *Vibrio fischeri*. The results represent an accurate study of the influence of the composition and structure on ILs toxicities.

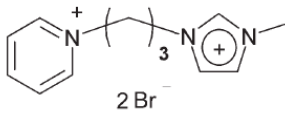
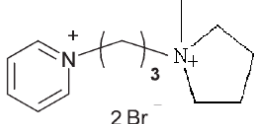
4. Assessing dicationic ILs using the *Vibrio fisheri* inhibition test

Table 4.1

Abbreviations and structures of the studied ILs.

Abbreviation	Molecular weight (g mol ⁻¹)	Structure
C ₈ (MIm) Br	275.23	
C ₈ (MIm) NTf ₂	475.47	
C ₈ (MIm) SbF ₆	431.07	
C ₈ (Pyr) Br	272.22	
C ₈ (Pyr) NTf ₂	472.47	
C ₈ (Pyr) SbF ₆	428.07	
C ₈ (MPyrr) Br	278.27	
C ₈ (MPyrr) NTf ₂	478.51	
C ₈ (MPyrr) SbF ₆	434.12	
C ₂ (MIm) ₂ Br ₂	352.07	 2 Br ⁻ n = 2, 3, 4, 6, 8
C ₃ (MIm) ₂ Br ₂	366.07	
C ₄ (MIm) ₂ Br ₂	380.12	
C ₆ (MIm) ₂ Br ₂	408.18	
C ₈ (MIm) ₂ Br ₂	436.23	
C ₃ (MPyrr) ₂ Br ₂	372.21	 2 Br ⁻ n = 3, 4, 6, 8
C ₄ (MPyrr) ₂ Br ₂	386.21	
C ₆ (MPyrr) ₂ Br ₂	414.26	
C ₈ (MPyrr) ₂ Br ₂	442.32	
C ₂ (Pyr) ₂ Br ₂	346.06	 2 Br ⁻ n = 2, 3, 4, 6, 8, 12
C ₃ (Pyr) ₂ Br ₂	360.09	
C ₄ (Pyr) ₂ Br ₂	374.09	
C ₆ (Pyr) ₂ Br ₂	402.09	
C ₈ (Pyr) ₂ Br ₂	430.09	
C ₁₂ (Pyr) ₂ Br ₂	486.09	

4. Assessing dicationic ILs using the *Vibrio fischeri* inhibition test

Abbreviation	Molecular weight (g mol ⁻¹)	Structure
C ₃ (Pyr)(MIm) Br ₂	363.12	
C ₃ (Pyr)(MPyrr) Br ₂	366.14	

4.2. EXPERIMENTAL

4.2.1 Test Chemicals

1-methylimidazole (>99%), 1-methylpyrrolidine (>98%), pyridine (>99%), 1-bromooctane (>99%), 1,2-dibromoethane (>98%), 1,3-dibromopropane (>99%), 1,4-dibromobutane (>99%), 1,6-dibromohexane (>96%), 1,8-dibromooctane (>98%), 1,12-dibromododecane (98>%), bis(trifluoromethane)sulfonimide lithium (99.95%), sodium hexafluoroantimonate (V) (technical grade), acetonitrile, ethyl acetate, dichloromethane and methanol were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). All chemical products were used without additional purification.

4.2.2. Synthesis and Characterization

C₈(MIm)Br 100 mmol of 1-methylimidazole was placed in a round bottom flask fitted with a reflux condenser and an additional funnel under an Argon atmosphere. Then, 110 mmol of 1-bromooctane was added dropwise via the funnel while the mixture was stirred under inert atmosphere. The additional funnel was then removed and the reaction mixture was stirred at 60 °C for 72 hours. The crude oil product obtained was dissolved in 20 ml of acetonitrile and washed with 250 ml of ethyl acetate to remove unreacted 1-bromooctane. The upper layer (ethyl acetate containing 1-bromooctane) was decanted and the acetonitrile was removed by automated rotary evaporator. The oil was dried under high vacuum at 60° C for 24 hours.

C₈(MPyrr)Br and **C₈(Pyr)Br** were synthesized according to procedures described in the literature. 240 mmol of 1-methylpyrrolidine or pyridine was placed in a round bottom flask fitted with a water condenser topped with a drying tube to avoid moisture penetration. 288 mmol of 1-bromooctane was added dropwise while stirring at 70 °C. The reaction time was 48 hours. The desired product was recrystallised in acetonitrile/ethyl acetate and dried first using a rotary evaporator and then under high vacuum at 60 °C for 12 hours to yield a white solid.

C₈(MIm)NTf₂, **C₈(MPyrr)NTf₂** and **C₈(Pyr)NTf₂** were synthesized according to procedures described in the literature. 5 mmol of C₈(MIm)Br, C₈(MPyrr)Br or C₈(Pyr)Br were transferred to a round bottom flask and dissolved in 10 ml of ultrapure water while stirring at room temperature. Aqueous lithium bis(trifluoromethane)sulfonimide (6 mmol in 6 ml of ultrapure water) was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 24 hours. Then the mixture was transferred to a funnel washing with ethyl acetate; the aqueous layer was separated

and the ionic liquid was then dissolved in 30 ml of ethyl acetate and washed with ultrapure water (4 x 30 ml). Finally, the ethyl acetate was removed in a rotary evaporator and the ionic liquid was dried under vacuum at 60 °C for 24 hours.

C₈(MIm)SbF₆, C₈(MPyrr)SbF₆ and C₈(Pyr)SbF₆ were synthesized according to procedures described in the literature. In a single necked round bottom flask with a magnetic stirring bar, 5 mmol of C₈(MIm)Br, C₈(MPyrr)Br or C₈(Pyr)Br were dissolved in 20 ml of dichloromethane. Then 6 mmol of sodium hexafluoroantimonate (V) was added. The mixture was stirred for 24 hours at room temperature while observing the formation of a white solid (NaBr). This solid was filtered off and the filtrate was washed with ultrapure water several times (5 x 50 ml). The solvent was removed in a rotary evaporator and the ionic liquid was dried under high vacuum at 70 °C for 24 hours.

C₂ (MIm)₂ Br₂, C₃ (MIm)₂ Br₂, C₄ (MIm)₂ Br₂, C₆ (MIm)₂ Br₂ and C₈ (MIm)₂ Br₂ were synthesized following the same procedure. A three-necked round bottom flask fitted with reflux condenser and pressure equalization funnel was filled with a solution of 30 mmol of 1,2-dibromoethane, 1,3-dibromopropane, 1,4-dibromobutane, 1,6-dibromohexane or 1,8-dibromooctane in 12 ml of methanol. Then 60 mmol of 1-methylimidazole was added dropwise while stirring at room temperature. The resulting mixture was further heated and stirred at 40-50°C for 48 hours. The product was isolated by filtration and purified by recrystallization. The resulting product was transferred to a single-necked round-bottomed flask, washing with methanol. The solvent was then removed under pressure.

C₃ (MPyrr)₂ Br₂, C₄ (MPyrr)₂ Br₂, C₆ (MPyrr)₂ Br₂ and C₈ (MPyrr)₂ Br₂ were synthesized with the same procedure. A three-necked round-bottomed flask fitted with a reflux condenser and pressure-equalised funnel was charged with a solution of 30 mmol of 1,3-dibromopropane, 1,4-dibromobutane, 1,6-dibromohexane or 1,8-dibromooctane in 10 ml of methanol. Then 63 mmol of 1-methylimidazole was added dropwise while stirring at room temperature. The resulting mixture was further heated and stirred at 40-50°C for 48 hours. The product was isolated by filtration and purified by recrystallization in methanol/ethyl acetate. The resulting product was transferred to a single-necked round-bottomed flask, washing with methanol. The solvent was then removed under pressure.

C₂ (Pyr)₂ Br₂, C₃ (Pyr)₂ Br₂, C₄ (Pyr)₂ Br₂, C₆ (Pyr)₂ Br₂, C₈ (Pyr)₂ Br₂ and C₁₂ (Pyr)₂ Br₂ were synthesized with the same procedure. A three-necked round bottomed flask fitted with a reflux condenser and pressure-equalised addition funnel was charged with a solution of 30 mmol of 1,2-dibromoethane, 1,3-dibromopropane, 1,4-dibromobutane, 1,6-dibromohexane, 1,8-dibromooctane or 1,12-dibromododecane in 5 ml of methanol. Then 75 mmol of 1-methylimidazole was added dropwise while stirring at room temperature. The resulting mixture was further heated and stirred at 50°C for 48 hours. The product was isolated by filtration and purified by recrystallization in methanol/ethyl acetate. The resulting product was transferred to a single-necked round-bottomed flask washing with methanol. The solvent was then removed under pressure.

(3-bromopropyl)pyridinium bromide: 100 mmol of pyridine was transferred to a round bottom flask. 150 mmol of 1,3-dibromopropane was added and the resulting mixture was stirred for three days at room temperature. Then, the mixture was washed

4. Assessing dicationic ILs using the *Vibrio fischeri* inhibition test

with ethyl acetate to remove any unreacted reactants and filtered to obtain a white precipitate.

C₃ (Pyr) (MIm) Br₂ and **C₃ (Pyr) (MPyrr) Br₂** were synthesized with the same procedure. A three-neck round bottom flask fitted with a reflux condenser was charged with a solution of 15 mmol of (3-bromopropyl)pyridinium bromide in 20 ml of methanol. Then 18 mmol of 1-methylimidazole or 19.5 mmol of 1-methylpyrrolidine was added dropwise while stirring at room temperature. The resulting mixture was refluxed while stirring at 50°C for 48 hours. The resulting solution was recrystallised directly from methanol/ethyl acetate (≈1:5 v:v) and the product was isolated by filtration.

The structures of the resulting ILs were confirmed by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy (recorded at room temperature on a Jeol model EX270) and mass spectrometry (Bruker MicroTOF 61 spectrometer).

C₈(MIm)Br: 1-methyl-3-octylimidazolium bromide. C₁₂H₂₃BrN₂; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃): δ 10.29 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 4.27 (t, 2H), 4.08 (s, 3H), 1.86 (m, 2H), 1.23 (m, 10H), 0.80 (t, 3H). ¹³C NMR (68 MHz, CDCl₃): δ 137.49, 123.97, 122.21, 50.31, 36.91, 31.83, 30.50, 29.18, 29.11, 26.41, 22.73, 14.24. MS m/z molecular ion: 195.1864 (cation).

C₈(MPyrr)Br: 1-methyl-1-octylpyrrolidinium bromide. C₁₂H₂₈BrN; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃): δ 3.83-3.74 (m, 4H), 3.62-3.56 (m, 2H), 3.24 (s, 3H), 2.25 (s, 4H), 2.02 (m, 2H), 1.36-1.14 (m, 10H), 0.81 (t, 3H). ¹³C NMR (68 MHz, CDCl₃): δ 64.66, 64.41, 48.89, 31.82, 29.37, 29.20, 26.61, 24.31, 22.74, 21.87, 14.24. MS m/z molecular ion: 198.2227 (cation).

C₈(Pyr)Br: 1-octylpyridinium bromide. C₁₃H₂₂BrN; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃): δ 9.55-9.53 (d, 2H), 8.52-8.47 (t, 1H), 8.14-8.11 (t, 2H), 4.95-4.91 (t, 2H), 2.02-1.95 (m, 2H), 1.33-1.09 (m, 10H), 0.77 (t, 3H). ¹³C NMR (68 MHz, CDCl₃): δ 145.59, 145.26, 128.82, 62.36, 32.15, 31.89, 29.22, 26.28, 22.78, 14.18. MS m/z molecular ion: 192.1753 (cation).

C₈(MIm)NTf₂: 1-methyl-3-octylimidazolium bis (trifluoromethylsulfonyl) imide. C₁₄H₂₃F₆N₃O₄S₂; ¹H NMR (270 MHz, CD₄O): δ 8.87 (s, 1H), 7.62-7.54 (d, 2H), 4.20 (t, 2H), 3.92 (s, 3H), 1.94-1.83 (m, 2H), 1.37-1.28 (m, 10H), 0.90 (t, 3H). ¹³C NMR (68 MHz, CD₄O): δ 125.05, 123.75, 50.98, 36.54, 33.01, 31.23, 30.30, 30.16, 27.38, 23.79, 14.52. MS m/z molecular ion: 195.1863 (cation), 279.9180 (anion).

C₈(MPyrr)NTf₂: 1-methyl-1-octylpyrrolidinium bis (trifluoromethylsulfonyl) imide. C₁₅H₂₈F₆N₂O₄S₂; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃): δ 3.57-3.45 (m, 4H), 3.32-3.26 (m, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.25 (s, 4H), 1.80-1.71 (m, 2H), 1.38-1.21 (m, 10H), 0.88 (t, 3H). ¹³C NMR (68 MHz, CDCl₃): δ 122.50, 117.78, 65.14, 64.87, 48.69, 31.87, 29.22, 24.14, 22.85, 21.81, 14.32. MS m/z molecular ion: 198.2227 (cation), 279.9179 (anion).

C₈(Pyr)NTf₂: 1-octylpyridinium bis (trifluoromethylsulfonyl) imide. C₁₅H₂₂F₆N₂O₄S₂; ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃): δ 8.84-8.81 (d, 2H), 8.51-8.45 (t, 1H), 8.09-8.03 (t, 2H), 4.62-4.56 (t, 2H), 2.05-1.94 (m, 2H), 1.40-1.19 (m, 10H), 0.89-0.84 (t, 3H). ¹³C NMR (68 MHz, CDCl₃): δ 145.75, 144.71, 128.99, 62.97, 31.87, 29.17, 29.08, 26.23, 22.83, 14.30. MS m/z molecular ion: 192.1742 (cation), 279.9188 (anion).

C₈(MIm)SbF₆: 1-methyl-3-octylimidazolium hexafluoroantimonate. C₁₂H₂₃F₆N₂Sb; ¹H NMR (270 MHz, DMSO-d₆): δ 9.09 (s, 1H), 7.66-7.78 (d, 2H), 4.14 (t, 2H), 3.84 (s, 3H), 1.82-1.73 (m, 2H), 1.32-1.18 (m, 10H), 0.86 (t, 3H). ¹³C NMR (68 MHz, DMSO-d₆): δ 136.47, 123.58, 122.24, 48.77, 35.72, 31.15, 29.35, 28.45, 28.32, 25.47, 22.04, 13.91. MS m/z molecular ion: 195.1865 (cation), 234.8935 (anion).

C₈(MPyrr)SbF₆: 1-methyl-1-octylpyrrolidinium hexafluoroantimonate. C₁₂H₂₈F₆NSb; ¹H NMR (270 MHz, DMSO-d₆): δ 3.51-3.34 (m, 4H), 3.31-3.23 (m, 2H), 2.97 (s, 3H), 2.07 (s, 4H), 1.74-1.63 (m, 2H), 1.35-1.23 (m, 10H), 0.87 (t, 3H). ¹³C NMR (68 MHz, DMSO-d₆): δ 63.38, 63.09, 47.46, 31.14, 28.43, 25.89, 22.88, 22.01, 21.05, 13.91. MS m/z molecular ion: 198.2225 (cation), 234.8939 (anion).

C₈(Pyr)SbF₆: 1-octylpyridinium hexafluoroantimonate. C₁₃H₂₂F₆NSb; ¹H NMR (270 MHz, DMSO-d₆): δ 9.10-9.07 (d, 2H), 8.63-8.57 (t, 1H), 8.18-8.13 (t, 2H), 4.61-4.56 (t, 2H), 1.97-1.86 (m, 2H), 1.33-1.20 (m, 10H), 0.88-0.83 (t, 3H). ¹³C NMR (68 MHz, DMSO-d₆): δ 145.45, 144.72, 128.08, 60.80, 31.11, 30.69, 28.42, 28.33, 25.39, 22.03, 13.92. MS m/z molecular ion: 192.1737 (cation), 234.8943 (anion).

C₂ (MIm)₂ Br₂: 1,2-bis(3-methylimidazolium-1-yl)ethane dibromide. C₁₀H₁₆Br₂N₄; ¹H NMR (270 MHz, DMSO-d₆): δ 9.25 (s, 2H), 7.77-7.73 (d, 4H), 4.76 (s, 4H), 3.86 (s, 6H). ¹³C NMR (68 MHz, DMSO-d₆): δ 137.16, 123.78, 122.33, 48.30, 36.01. MS m/z molecular ion: 192.1747 (cation).

C₃ (MIm)₂ Br₂: 1,3-bis(3-methylimidazolium-1-yl)propane dibromide. C₁₁H₁₈Br₂N₄; ¹H NMR (270 MHz, D₂O): δ 8.78 (s, 2H), 7.51-7.44 (d, 4H), 4.30 (t, 4H), 3.88 (s, 6H), 2.56-2.45 (m, 2H). ¹³C NMR (68 MHz, D₂O): δ 136.38, 124.16, 122.36, 46.49, 36.10, 29.95. MS m/z molecular ion: 103.0727 (cation).

C₄ (MIm)₂ Br₂: 1,4-bis(3-methylimidazolium-1-yl)butane dibromide. C₁₂H₂₀Br₂N₄; ¹H NMR (270 MHz, D₂O): δ 8.70 (s, 2H), 7.45-7.39 (d, 4H), 4.21 (t, 4H), 3.85 (s, 6H), 1.90-1.84 (m, 4H). ¹³C NMR (68 MHz, D₂O): δ 136.16, 123.92, 122.28, 48.92, 35.97, 26.41. MS m/z molecular ion: 110.0805 (cation).

C₆ (MIm)₂ Br₂: 1,6-bis(3-methylimidazolium-1-yl)hexane dibromide. C₁₄H₂₄Br₂N₄; ¹H NMR (270 MHz, DMSO-d₆): δ 9.31 (s, 2H), 7.85-7.75 (d, 4H), 4.19 (t, 4H), 3.87 (s, 6H), 1.81-1.76 (m, 4H), 1.29-1.24 (m, 4H). ¹³C NMR (68 MHz, DMSO-d₆): δ 136.50, 123.53, 122.24, 48.53, 35.77, 29.07, 24.76. MS m/z molecular ion: 124.0985 (cation).

C₈ (MIm)₂ Br₂: 1,8-bis(3-methylimidazolium-1-yl)octane dibromide. C₁₆H₂₈Br₂N₄; ¹H NMR (270 MHz, D₂O): δ 8.66 (s, 2H), 7.43-7.37 (d, 4H), 4.14 (t, 4H), 3.84 (s, 6H), 1.86-1.76 (m, 4H), 1.30-1.18 (m, 8H). ¹³C NMR (68 MHz, D₂O): δ 135.97, 123.65, 122.67, 49.70, 35.85, 29.33, 28.02, 25.38. MS m/z molecular ion: 138.1155 (cation).

C₃ (MPyrr)₂ Br₂: 1,3-bis(1-methylpyrrolidinium-1-yl)propane dibromide. C₁₃H₂₈Br₂N₂; ¹H NMR (270 MHz, D₂O): δ 3.65-3.41 (m, 12H), 3.10 (s, 6H), 2.44-2.31 (m, 2H), 2.28-2.17 (m, 8H). ¹³C NMR (68 MHz, D₂O): δ 65.09, 60.46, 48.51, 21.52, 19.13. MS m/z molecular ion: 106.1111 (cation).

C₄ (MPyrr)₂ Br₂: 1,4-bis(1-methylpyrrolidinium-1-yl)butane dibromide. C₁₄H₃₀Br₂N₂; ¹H NMR (270 MHz, D₂O): δ 3.54-3.37 (m, 12H), 3.02 (s, 6H), 2.21-2.14 (m, 8H), 1.90-1.84 (m, 4H). ¹³C NMR (68 MHz, D₂O): δ 64.67, 63.32, 48.29, 21.47, 20.66. MS m/z molecular ion: 113.1187 (cation).

4. Assessing dicationic ILs using the *Vibrio fischeri* inhibition test

C₆ (MPyrr)₂ Br₂: 1,6-bis(1-methylpyrrolidinium-1-yl)hexane dibromide. C₁₆H₃₄Br₂N₂; ¹H NMR (270 MHz, D₂O): δ 3.51-3.27 (m, 12H), 3.00 (s, 6H), 2.22-2.11 (m, 8H), 1.85-1.73 (m, 4H), 1.43-1.37 (m, 4H). ¹³C NMR (68 MHz, D₂O): δ 64.48, 64.22, 48.27, 25.47, 23.18, 21.48. MS m/z molecular ion: 127.1315 (cation).

C₈ (MPyrr)₂ Br₂: 1,8-bis(1-methylpyrrolidinium-1-yl)octane dibromide. C₁₈H₃₈Br₂N₂; ¹H NMR (270 MHz, D₂O): δ 3.53-3.25 (m, 12H), 2.99 (s, 6H), 2.23-2.10 (m, 8H), 1.81-1.70 (m, 4H), 1.34 (s, 8H). ¹³C NMR (68 MHz, D₂O): δ 64.46, 64.42, 48.25, 28.10, 25.70, 23.31, 21.47. MS m/z molecular ion: 141.1491 (cation).

C₂ (Pyr)₂ Br₂: 1,2-bis(pyridinium-1-yl)ethane dibromide. C₁₂H₁₄Br₂N₂; ¹H NMR (270 MHz, D₂O): δ 8.86-8.83 (d, 4H), 8.68-8.62 (t, 2H), 8.14-8.09 (t, 4H), 5.34 (s, 4H). ¹³C NMR (68 MHz, D₂O): δ 147.74, 144.93, 129.39, 60.31. MS m/z molecular ion: 130.1581 (cation).

C₃ (Pyr)₂ Br₂: 1,3-bis(pyridinium-1-yl)propane dibromide. C₁₃H₁₆Br₂N₂; ¹H NMR (270 MHz, D₂O): δ 8.92-8.89 (d, 4H), 8.60-8.54 (t, 2H), 8.12-8.06 (t, 4H), 4.84-4.76 (t, 4H), 2.86-2.75 (m, 2H). ¹³C NMR (68 MHz, D₂O): δ 146.54, 144.62, 128.85, 58.30, 31.96. MS m/z molecular ion: 103.0857 (cation).

C₄ (Pyr)₂ Br₂: 1,4-bis(pyridinium-1-yl)butane dibromide. C₁₄H₁₈Br₂N₂; ¹H NMR (270 MHz, D₂O): δ 8.86-8.83 (d, 4H), 8.58-8.51 (t, 2H), 8.09-8.04 (t, 4H), 4.72-4.61 (m, 4H), 2.18-2.06 (m, 4H). ¹³C NMR (68 MHz, D₂O): δ 146.15, 144.45, 128.65, 61.03, 27.49. MS m/z molecular ion: 107.0696 (cation).

C₆ (Pyr)₂ Br₂: 1,6-bis(pyridinium-1-yl)hexane dibromide. C₁₆H₂₂Br₂N₂; ¹H NMR (270 MHz, D₂O): δ 8.84-8.81 (d, 4H), 8.56-8.49 (t, 2H), 8.07-8.02 (t, 4H), 4.62-4.57 (t, 4H), 2.06-1.94 (m, 4H), 1.44-1.33 (m, 4H). ¹³C NMR (68 MHz, D₂O): δ 145.79, 144.39, 128.45, 61.92, 30.49, 24.99. MS m/z molecular ion: 121.0873 (cation).

C₈ (Pyr)₂ Br₂: 1,8-bis(pyridinium-1-yl)octane dibromide. C₁₈H₂₆Br₂N₂; ¹H NMR (270 MHz, D₂O): δ 8.83-8.80 (d, 4H), 8.55-8.48 (t, 2H), 8.06-8.01 (t, 4H), 4.60-4.55 (t, 4H), 2.04-1.93 (m, 4H), 1.37-1.24 (m, 8H). ¹³C NMR (68 MHz, D₂O): δ 145.69, 144.37, 128.39, 62.12, 30.65, 28.00, 25.25. MS m/z molecular ion: 135.1037 (cation).

C₁₂ (Pyr)₂ Br₂: 1,12-bis(pyridinium-1-yl)dodecane dibromide. C₂₂H₃₄Br₂N₂; ¹H NMR (270 MHz, D₂O): δ 8.83-8.80 (d, 4H), 8.54-8.48 (t, 2H), 8.06-8.01 (t, 4H), 4.60-4.55 (t, 4H), 2.03-1.92 (m, 4H), 1.30-1.19 (m, 16H). ¹³C NMR (68 MHz, D₂O): δ 145.68, 144.36, 128.38, 62.17, 30.69, 28.68, 28.59, 28.23, 25.35. MS m/z molecular ion: 163.1370 (cation).

C₃ (Pyr) (MIm) Br₂: 1-(pyridinium-1-yl)-3-(3-methylimidazolium-1-yl)propane dibromide C₁₂H₁₇Br₂N₃; ¹H NMR (270 MHz, methanol-d₄): δ 9.20-9.13 (t, 3H), 8.69-8.62 (t, 1H), 8.21-8.15 (t, 2H), 7.78 (t, 1H), 7.64 (t, 1H), 4.89-4.83 (t, 3H), 4.52-4.47 (t, 2H), 3.98 (s, 3H), 2.77-2.66 (m, 2H). ¹³C NMR (68 MHz, methanol-d₄): δ 147.48, 146.41, 138.48, 129.86, 125.40, 123.89, 59.68, 47.61, 36.95, 32.81. MS m/z molecular ion: 101.5682 (cation).

C₃ (Pyr) (MPyrr) Br₂: 1-(pyridinium-1-yl)-3-(1-methylpyrrolidinium-1-yl)propane dibromide C₁₃H₂₂Br₂N₂; ¹H NMR (270 MHz, methanol-d₄): δ 9.23-9.20 (d, 2H), 8.70-8.64 (t, 1H), 8.22-8.17 (t, 2H), 4.88-4.82 (t, 2H), 3.71-3.63 (m, 6H), 3.17 (s, 3H), 2.70-2.64 (m, 2H), 2.31-2.24 (m, 4H). ¹³C NMR (68 MHz, methanol-d₄): δ 147.58, 146.45,

129.87, 66.20, 66.16, 61.53, 59.46, 27.30, 22.83. MS m/z molecular ion: 103.0862 (cation).

4.2.3. Toxicity Tests

The Microtox® Toxicity Test evaluates any inhibition in luminescence of the marine Gram-negative bacterium *Vibrio Fischeri*. This bacterium was purchased in lyophilized form from Modern Water and activated by rehydration with a restorative solution of MilliQ water. A control sample of the bacterial suspension without the test substance was included along with the sample. Both, standard and samples were used in 2% NaCl to adjust the osmotic pressure. A Microtox® M500 Analyzer (Azur Environmental) was used to measure the light emission of the bacterium in contact with the samples. In this test, a range of diluted aqueous solutions (from 5.625 to 45.000 %) of each IL was used. A concentration of 100 % corresponds to a known concentration of an IL stock solution. After 15 minutes of exposure to the IL solution (depending on the IL), the light output of the luminescent bacterium was measured and compared with the light output of a blank control sample. The toxicity was evaluated and a 50% reduction in luminescence was computed. The toxicity values reported in the text and tables are expressed as Log EC₅₀ (µM), representing the toxicity value measured 15 min after *Vibrio fischeri* comes in contact with an IL. The measurement was taken at least three times for most ILs.

4.3. RESULTS AND DISCUSSION

The above mentioned mono- and dicationic ILs were synthesized and their ecotoxicity towards the luminescent marine bacterium *Vibrio fischeri* was evaluated.

Tables 4.2 and 4.3 show the experimental results of the EC₅₀ for monocationic and dicationic ILs, respectively. Table 4.2 also includes the EC₅₀ values found in the literature and estimated by a QSAR method. There are no data available for dicationic ILs (Table 4.3). Table 4.4 shows the EC₅₀ values of common volatile organic compounds (VOCs) collected from the literature. Figure 4.1 depicts the EC₅₀ values collated in Tables 4.2, 4.3 and 4.4 for comparison.

To obtain less toxic ILs, several structural changes affecting the cation core (in mono- and dicationic ILs), the central alkyl chain length (only in dicationic ILs) and the anion (only in monocationic ILs) were introduced. The influence of these parameters on ILs toxicity was analyzed. In an attempt to increase the readability of this study, the main results will be discussed in three sections: monocationic ILs, dicationic ILs and mono-versus dicationic ILs.

4. Assessing dicationic ILs using the *Vibrio fischeri* inhibition test

Table 4.2

Log EC₅₀ values for monocationic ILs tested in each trial after 15 min of exposure of the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*, with respective 95% confidence limits (in brackets) and Log EC₅₀ mean values. Log EC₅₀ values found in the literature and Log EC₅₀ obtained using a group contribution method QSAR [25] are also shown. Toxicity is expressed as Log EC₅₀ (μM).

Ionic liquid	Log EC₅₀, this work (lower limit, upper limit)	Log EC₅₀, this work (average)	Log EC₅₀ from literature	Log EC₅₀ from QSAR [25]
C ₈ (MIm) Br	0.75 (0.45, 1.05)	0.71	0.63 [13]; 2.27 [34]	1.17
	0.78 (0.75, 0.80)			
	0.60 (0.30, 0.89)			
C ₈ (MIm) NTf ₂	0.99 (0.96, 1.02)	0.95	-	0.76
	0.93 (0.87, 1.00)			
	0.92 (0.89, 0.96)			
C ₈ (MIm) SbF ₆	0.96 (0.93, 0.99)	0.85	-	-
	0.83 (0.63, 1.02)			
	0.78 (0.61, 1.82)			
C ₈ (Pyr) Br	1.24 (1.01, 1.47)	1.27	1.89 [34]	0.95
	1.27 (1.09, 1.46)			
	1.30 (1.10, 1.50)			
C ₈ (Pyr) NTf ₂	1.47 (1.38, 1.57)	1.51	-	-
	1.48 (1.42, 1.54)			
	1.59 (1.49, 1.69)			
C ₈ (Pyr) SbF ₆	1.14 (0.99, 1.29)	1.13	-	-
	1.07 (0.99, 1.16)			
	1.18 (1.14, 1.22)			
C ₈ (MPyrr) Br	1.53 (1.46, 1.60)	1.66	2.26 [34]	1.96
	1.72 (1.60, 1.84)			
	1.74 (1.59, 1.87)			
C ₈ (MPyrr) NTf ₂	1.48 (1.45, 1.50)	1.53	1.58 [34]	0.34
	1.54 (1.37, 1.71)			
	1.58 (1.57, 1.60)			
C ₈ (MPyrr) SbF ₆	1.71 (1.13, 2.30)	1.69	-	-
	1.69 (0.75, 2.63)			
	1.67 (1.00, 2.34)			
	1.69 (0.73, 2.65)			

4. Assessing dicationic ILs using the *Vibrio fischeri* inhibition test

Table 4.3

Log EC₅₀ (μM) values for dicationic ILs tested in each trial after 15 min of exposure of the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*, with respective 95% confidence limits (in brackets).

Ionic liquid	Log EC₅₀(μM), this work (lower limit, upper limit)	Log EC₅₀(μM), this work (average)
C ₂ (MIm) ₂ Br ₂	5.35 (5.05, 5.64)	5.35
	5.40 (5.24, 5.56)	
C ₃ (MIm) ₂ Br ₂	5.30 (5.23, 5.37)	5.37
	5.41 (5.05, 5.77)	
C ₄ (MIm) ₂ Br ₂	5.02 (4.67, 5.36)	5.00
	5.06 (4.87, 5.25)	
	4.92 (4.53, 5.31)	
C ₆ (MIm) ₂ Br ₂	4.54 (4.09, 4.99)	4.56
	4.59 (4.14, 5.05)	
	4.56 (4.11, 5.01)	
C ₈ (MIm) ₂ Br ₂	2.33 (2.20, 2.45)	2.34
	2.34 (2.18, 2.49)	
	2.35 (2.21, 2.50)	
C ₃ (MPyrr) ₂ Br ₂	5.18 (5.14, 5.23)	5.07
	4.89 (4.61, 5.18)	
	5.13 (4.99, 5.28)	
	5.06 (4.99, 5.13)	
C ₄ (MPyrr) ₂ Br ₂	4.26 (3.97, 4.55)	4.31
	4.28 (3.88, 4.68)	
	4.36 (4.01, 4.70)	
C ₆ (MPyrr) ₂ Br ₂	4.33 (4.01, 4.65)	4.08
	4.17 (4.10, 4.23)	
	4.22 (4.04, 4.40)	
C ₈ (MPyrr) ₂ Br ₂	3.86 (3.69, 4.04)	3.77
	3.64 (2.63, 4.64)	
	3.69 (3.48, 3.90)	
	4.00 (3.78, 4.23)	
	3.82 (3.49, 4.14)	
C ₂ (Pyr) ₂ Br ₂	3.51 (3.22, 3.79)	5.40
	3.95 (3.77, 4.13)	
C ₃ (Pyr) ₂ Br ₂	5.37 (5.31, 5.42)	4.56
	5.42 (5.25, 5.60)	
C ₄ (Pyr) ₂ Br ₂	4.59 (4.48, 4.71)	5.04
	4.60 (4.49, 4.70)	
C ₆ (Pyr) ₂ Br ₂	4.48 (4.46, 4.50)	5.18
	4.93 (4.81, 5.05)	
	5.15 (5.04, 5.26)	
C ₈ (Pyr) ₂ Br ₂	5.03 (4.90, 5.17)	4.52
	5.11 (4.76, 5.46)	
	5.17 (4.94, 5.40)	
	5.31 (4.57, 6.05)	
C ₁₂ (Pyr) ₂ Br ₂	5.13 (4.90, 5.36)	2.07
	4.19 (3.32, 5.06)	
	4.64 (4.58, 4.71)	
C ₃ (Pyr) (MIm) Br ₂	4.39 (2.93, 5.85)	5.23
	4.62 (4.55, 4.68)	
	4.77 (4.76, 4.82)	
C ₃ (Pyr) (MPyrr) Br ₂	2.07 (2.04, 2.11)	4.55
	2.04 (2.01, 2.07)	
	2.09 (2.06, 2.13)	
C ₃ (Pyr) (MPyrr) Br ₂	5.18 (4.77, 5.59)	4.55
	5.24 (5.04, 5.44)	
	5.31 (5.28, 5.34)	
C ₃ (Pyr) (MPyrr) Br ₂	5.19 (5.04, 5.34)	4.55
	4.54 (4.51, 4.58)	
C ₃ (Pyr) (MPyrr) Br ₂	4.59 (4.57, 4.81)	4.55
	4.52 (4.19, 4.85)	

4. Assessing dicationic ILs using the *Vibrio fischeri* inhibition test

Table 4.4

Log EC₅₀ (μM) values for some VOCs from the literature [31].

Compound	Log EC ₅₀ (μM)
Ethanol	5.89
Acetonitrile	5.57
Acetone	5.17
Chloroform	4.16
Benzene	3.31
Toluene	2.33

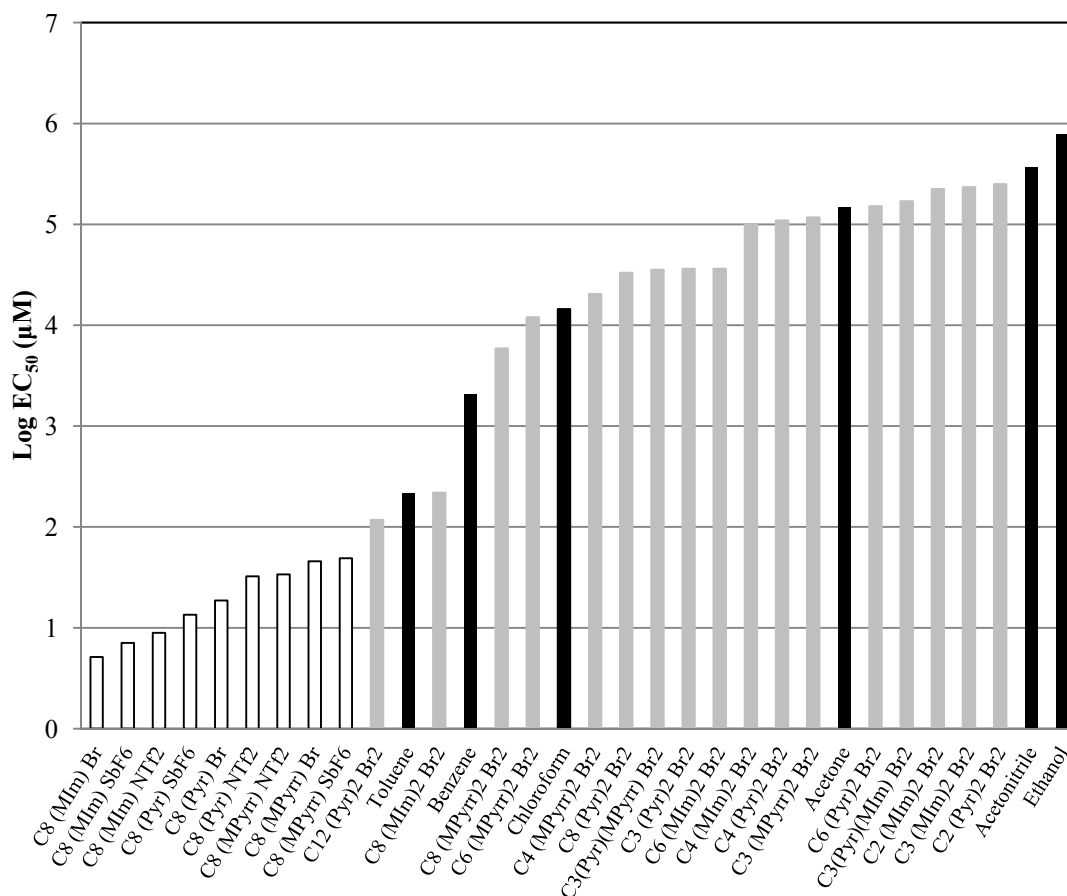


Figure 4.1. Comparison between Log EC₅₀ values of ILs (white and grey rectangles, monocationic and dicationic ILs, respectively) and COVs (black rectangles).

4.3.1. Monocationic ILs

The toxicity of monocationic ILs towards *Vibrio fischeri* has been widely screened in the present work. The Log EC₅₀ values of monocationic ILs (Table 4.2) reflect influence of two structural features on the bacterial toxicity: the influence of the cation core in ILs with the same anion and the influence of the anion in ILs with the same cation.

Analysis of the imidazolium, pyrrolidinium and pyridinium derivatives showed that, for the same anion, the most toxic ILs were imidazolium-based. The same trend was observed in each series of the three studied anions, C₈(MIm)⁺>C₈(MPyr)⁺. However, it is not possible to establish a comparison between these imidazolium and pyrrolidinium-based ILs with the pyridinium-based ones because the latter do not have a methyl group

connected to the pyridinium ring. In our assays, for all the anions, the imidazolium cation was more toxic than the pyrrolidinium cation. This agrees with the finding of several authors. For instance, Torrecilla *et al.* [35] found that pyrrolidinium-based ILs had lower IPC-81 cytotoxicity than imidazolium-based ILs, while Arning *et al.* [36] obtained similar results in inhibitory assays with acetylcholinesterase. In conclusion, aromatic rings on the cation seem to lead to higher toxicity of the monocationic ionic liquid towards *Vibrio fischeri*.

From Table 4.2, it can be observed that the Log EC₅₀ values for a given anion series are very similar and no general trend for the anion constituent of the monocationic ILs studied could be established concerning toxicity towards *Vibrio fischeri*. In our case, this may be due to the fact that the presence of a long alkyl chain (octyl) on the cation may have a stronger effect on toxicity than the effect of the anion. Indeed, many authors have suggested that the length of the alkyl chain of the cation has a much stronger effect on ionic liquid toxicity than the anion [13, 14, 28].

4.3.2. Dicationic ILs

The Log EC₅₀ values of dicationic ILs depicted in Table 4.3 allow to analyze the influence of two different structural features on the toxicity of the ILs towards the marine bacteria: i) the effect of the cation core in a widespread collection of dicationic ILs with the same anion (bromide) and ii) the influence of the alkyl linkage chain length in ILs with the same cation core.

In order to assess the influence of the cation core on the toxicity towards *Vibrio fischeri*, two families of dicationic ILs were synthesized: fifteen symmetrical (imidazolium, pyridinium and pyrrolidinium-based ILs) and two asymmetrical (pyridinium-imidazolium and pyridinium-pyrrolidinium ILs). Again, as it was mentioned before, it is not possible compare imidazolium and pyrrolidinium-based ILs with the pyridinium ones because of the presence of a methyl group connected to the pyridinium.

As it can be seen in Table 4.3 and Figure 4.2, the effect of the cation core over the *Vibrio fischeri* toxicity depends on the alkyl chain length of the cation. The following order was obtained for the toxicity of dicationic ILs with alkyl linkage chains comprising three atoms of carbon: C₃(Pyr)₂ Br₂ > C₃(mPyr)₂ Br₂ > C₃(MIm)₂ Br₂, while the opposite order for the analogous ILs with eight carbon atoms: C₈(MIm)₂ Br₂ > C₈(MPyr)₂ Br₂ > C₈(Pyr)₂ Br₂. A similar conclusion was previously suggested by Docherty and Kulpa [13] for monocationic ILs, who found that imidazolium and pyridinium toxicities could not be directly compared because, because according to their results, C₄(MIm)Br was significantly less toxic than C₄(MPyr)Br but C₆(MIm)Br was more toxic than C₆(MPyr)Br and, in the case of eight atoms of carbon, C₈(MIm)Br and C₈(MPyr)Br had similar toxicities.

4. Assessing dicationic ILs using the *Vibrio fischeri* inhibition test

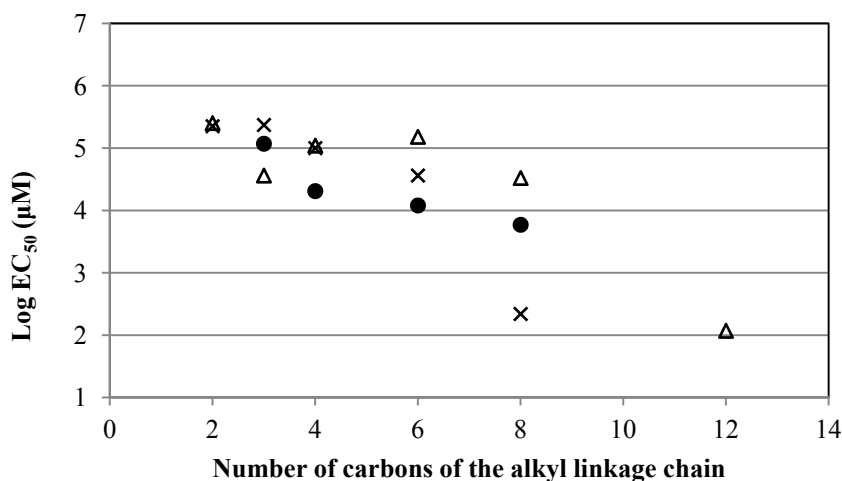


Figure 4.2. Effect of the number of carbons of the alkyl linkage chain on the aquatic toxicity (Log EC₅₀) of dicationic ILs with different cation cores;

× methylimidazolium, ● methylpyrrolidinium and Δ pyridinium.

Comparing symmetrical and asymmetrical dicationic ILs, the following toxicity order was established (see Table 4.3): C₃(Pyr)₂Br₂ > C₃(Pyr)(MIm)Br₂ > C₃(MIm)₂Br₂ and C₃(Pyr)₂Br₂ ≈ C₃(Pyr)(MPyrr)Br₂ > C₃(MPyrr)₂Br₂. This strongly suggests that, for short alkyl linkage chains, pyridinium-based ILs are more toxic than imidazolium and pyrrolidinium-based ones and is in close agreement with Docherty and Kulpa [13].

The effect of the alkyl linkage chain length on the toxicity of dicationic ILs towards the luminescent bacteria was investigated by comparing dicationic ILs containing the same cation core but different central chain. In this specific case, we examined the following series: from C₂(MIm)₂Br₂ to C₈(MIm)₂Br₂, from C₃(MPyrr)₂Br₂ to C₈(MPyrr)₂Br₂ and from C₂(Pyr)₂Br₂ to C₁₂(Pyr)₂Br₂ (Table 4.3 and Figure 4.2). The ecotoxicity of the ILs can be ranked as follows: C₈ > C₆ > C₄ > C₃ ≈ C₂ for the imidazolium-based ILs, C₈ > C₆ > C₄ > C₃ for the pyrrolidinium-based ILs and, finally, C₁₂ > C₈ ≈ C₃ > C₆ ≈ C₄ > C₂ for the pyridinium-based ILs.

According to these results, for the families of imidazolium and pyrrolidinium-based ILs tested in this work, toxicity towards *Vibrio fischeri* increases with the length of the alkyl linkage chain. However, in case of the pyridinium-based ILs studied, although the same general trend existed, the results were not so clear as for the other two families of ILs. Although, the results available in the literature related to dicationic ILs toxicity are scarce, their tendencies generally agree with our experimental data [4, 37, 38]. For instance, Steudte *et al.* [4] found that acetylcholinesterase inhibition and toxicity towards *Daphnia Magna* diminished with short alkyl linkage chains in some of the imidazolium-based dicationic ILs tested in this work. In addition, the results of e Silva *et al.* [38] showed the same trend for *Vibrio fischeri* toxicity in the case of cholinium-based dicationic ILs. Gindri *et al.* [37] also found the same tendency for MC3T3-E1 cytotoxicity of imidazolium-based dicationic ILs. Nevertheless, no previous studies have evaluated the *Vibrio fischeri* toxicity of the dicationic ILs tested in this work.

4.3.3. Mono- vs dicationic ILs

Comparisons of the ecotoxicity of mono- and dicationic ILs were made for the three different cation cores. More specifically, we compared ILs with the same cation core

(imidazolium, pyrrolidinium or pyridinium), alkyl chain length (octyl) and anion (bromide): $C_8(\text{MIm})\text{Br}$ vs $C_8(\text{MIm})_2\text{Br}_2$, $C_8(\text{Pyr})\text{Br}$ vs $C_8(\text{Pyr})_2\text{Br}_2$ and $C_8(\text{MPyrr})\text{Br}$ vs $C_8(\text{MPyrr})_2\text{Br}_2$. According to the results shown in Tables 4.2 and 4.3 and Figure 4.3, the dicationic ILs were less toxic toward the *Vibrio fischeri* bacterium than their monocationic counterparts. This is in good agreement with the results for cholinium-based ILs obtained by e Silva *et al.* [38], who suggested that the reason could be related to the size of the molecules of the ILs, which would restrict their interactions with the cell membranes. Other authors, including Steudte *et al.* [4], observed the same trend for mono- and dicationic ILs for their acute toxicity towards IPC-81, *S. vacuolatus* and *D. magna*. Recently, Gindri *et al.* [37] obtained similar results in a toxicity assay using MC3T3-E1 pre-osteoblast cells. In this case, the authors affirmed that the reduced toxicity of the ILs may be due to an increase in polarity of the ionic liquid structure.

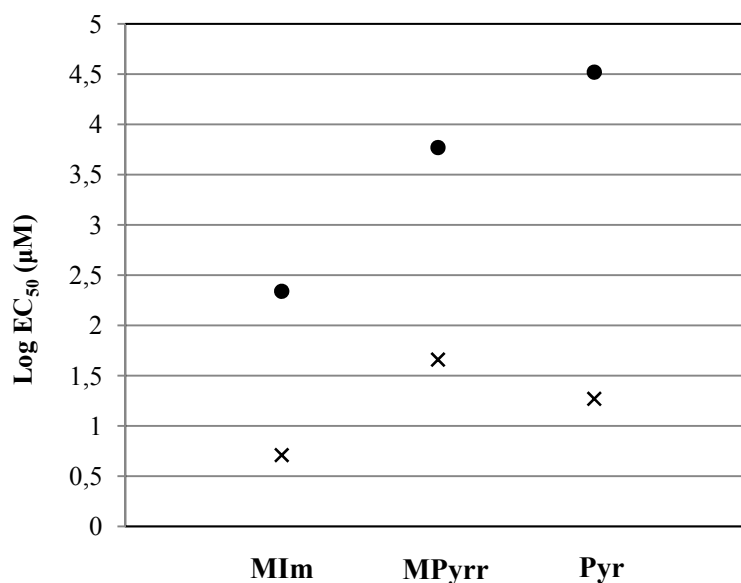


Figure 4.3. Effect of the cation core on the aquatic toxicity (Log EC₅₀) of monocationic and dicationic ILs; × Monocationic ILs, • Dicationic ILs.

4.3.4. Relationship between octanol water partition coefficient (K_{ow}) and *Vibrio fischeri* toxicity

Several authors have claimed that the *Vibrio fischeri* toxicity of ILs follows the same trend as their hydrophobicity: the more hydrophobic they are, the greater their toxicity [13, 37, 38]. The best parameter to represent the hydrophobicity of a compound is the octanol-water partition coefficient (K_{ow}) because the water saturated-octanol system closely represents very well the physico-chemical environment of living organisms [39]. In a previous study, the authors obtained an empirical correlation between the hydrophobicity (expressed as the Log K_{ow}) and the *Vibrio fischeri* toxicity (expressed as Log(1/EC₅₀)) based on experimental data of both parameters for a set of twenty-nine ILs:

$$\text{Log}(1/\text{EC}_{50}) = -1.436 + 0.859\text{Log}K_{ow} - 0.119(\text{Log}K_{ow})^2 \quad (1)$$

With the experimental data shown in Tables 4.2 and 4.3, we estimated the values of Log K_{ow} for all the ILs studied in this work using equation (1). The estimated values are shown in Table 4.5. Apart from by equation (1), two other approaches were used to

4. Assessing dicationic ILs using the *Vibrio fischeri* inhibition test

estimate K_{ow} : the web pages *molinspiration.com* [40] and *chemicalize.org* [41]. These approaches predict the toxicity of a given molecular structure by breaking it up into fragments or groups of atoms which have a previously assigned empirical constant and structural factor. Both approaches use SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) notation. These estimated values are also depicted in Table 4.5.

Table 4.5

Estimated values of K_{ow} using Equation (1), *molinspiration.com* [40] and *chemicalize.org* [41] for the studied ILs.

IL	Log K_{ow} (from Eq 1)	Log K_{ow} [40]	Log K_{ow} [41]
C ₈ (MIm) Br	9.78E-1	-0.02	-0.37
C ₈ (MIm) NTf ₂	6.19E-1	2.97	2.17
C ₈ (MIm) SbF ₆	7.63E-1	-0.02	-0.37
C ₈ (Pyr) Br	1.99E-1	-1.01	-0.09
C ₈ (Pyr) NTf ₂	-8.51E-2	2.97	2.17
C ₈ (Pyr) SbF ₆	3.76E-1	-1.01	-0.09
C ₈ (MPyrr) Br	-2.52E-1	0.23	-0.46
C ₈ (MPyrr) NTf ₂	-1.08E-1	2.97	-0.46
C ₈ (MPyrr) SbF ₆	5.19E-1	0.23	2.17
C ₂ (MIm) ₂ Br ₂	-3.17	-5.45	-7.11
C ₃ (MIm) ₂ Br ₂	-3.18	-5.39	-7.05
C ₄ (MIm) ₂ Br ₂	-2.95	-5.32	-6.53
C ₆ (MIm) ₂ Br ₂	-2.66	-5.00	-5.64
C ₈ (MIm) ₂ Br ₂	-0.93	-4.54	-4.76
C ₃ (MPyrr) ₂ Br ₂	-2.99	-5.25	-7.24
C ₄ (MPyrr) ₂ Br ₂	-2.49	-5.17	-6.73
C ₆ (MPyrr) ₂ Br ₂	-2.33	-4.8	-5.84
C ₈ (MPyrr) ₂ Br ₂	-2.10	-4.19	-4.95
C ₂ (Pyr) ₂ Br ₂	-3.20	-5.83	-6.55
C ₃ (Pyr) ₂ Br ₂	-2.66	-5.79	-6.49
C ₄ (Pyr) ₂ Br ₂	-2.97	-5.74	-5.97
C ₆ (Pyr) ₂ Br ₂	-3.06	-5.55	-5.08
C ₈ (Pyr) ₂ Br ₂	-2.63	-5.31	-4.19
C ₁₂ (Pyr) ₂ Br ₂	-0.67	-4.52	-2.41
C ₃ (Pyr) (MIm) Br ₂	-3.09	-5.61	-6.77
C ₃ (Pyr) (MPyrr) Br ₂	-2.65	-5.56	-6.87

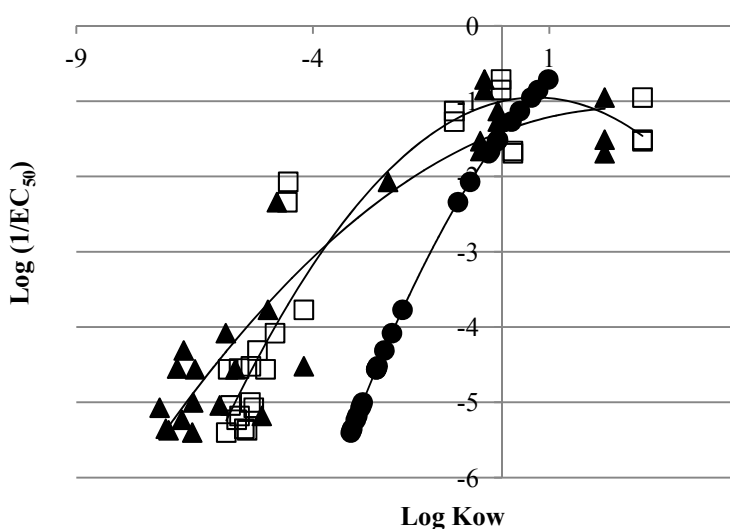


Figure 4.4. Relationship between the *Vibrio fischeri* toxicity (expressed as Log (1/EC₅₀)) and the estimated hydrophobicity (expressed as Log K_{ow}) for the ILs studied: ● K_{ow} by Equation (1); □ K_{ow} by *molinspiration.com*; ▲ K_{ow} by *chemicalize.org*.

As can be seen in Figure 4.4 and Table 4.5, the toxicity of ILs towards *Vibrio fischeri* increases with increasing hydrophobicity and alkyl chain length is the most important factor for homologous series.

4.4. CONCLUSIONS

The *Vibrio fischeri* toxicity, reported as Log EC₅₀, of twenty-six monocationic and dicationic ILs ranged between 0.71 and 5.37. The experimental values showed very good agreement with those estimated using the QSAR method. Some trends relating the composition and chemical structure of the ILs with their *Vibrio fischeri* ecotoxicity could be established. According to our results, the strongest influences on the ecotoxicity of the ILs studied are the length of the alkyl chain and the existence of one or two cation cores. The toxicity of ILs increased as a function of alkyl chain length of the substituent of the cation and was mainly related to the cation and not to the nature of the anion. Finally, it was established that the EC₅₀ of dicationic ILs was lower than that observed for the homologous monocationics.

The hydrophobicity of ILs, reported as K_{ow} , was estimated using three approaches and the Log (1/EC₅₀) was seen to be related with Log K_{ow} . Because the EC₅₀ values are of the same order as VOCs, we conclude that the aquatic toxicity of these ILs is quite similar to that of industrial VOCs, particularly, dicationic ones. This means that dicationic ILs can be designed for practical and environmentally friendly industrial applications.

4.5. REFERENCES

- [1] B.-S. Lee, S.-T. Lin, A priori prediction of the octanol–water partition coefficient (K_{ow}) of ionic liquids, *Fluid Phase Equilib.* 363 (2014) 233–238.
- [2] G. Viswanathan, S. Murugesan, V. Pushparaj, O. Nalamasu, P.M. Ajayan, R.J. Linhardt, Preparation of biopolymer fibers by electrospinning from room temperature ionic liquids, *Biomacromolecules* 7 (2006) 415–418.
- [3] S.P.M. Ventura, C.S. Marques, A.A. Rosatella, C.A.M. Afonso, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, Toxicity assessment of various ionic liquid families towards *Vibrio fischeri* marine bacteria, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76 (2012) 162–168.
- [4] S. Steudte, S. Bemowsky, M. Mahrova, U. Bottin-Weber, E. Tojo-Suárez, P. Stepnowski, S. Stolte, Toxicity and biodegradability of dicationic ionic liquids, *RSC Adv.* 4 (2014) 5198-5205.
- [5] X. Han, D.W. Armstrong, Using geminal dicationic ionic liquids as solvents for high-temperature organic reactions, *Org. Lett.* 7 (2005) 4205–4208.
- [6] T.P. Thuy Pham, C.-W. Cho, Y.-S. Yun, Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review, *Water Res.* 44 (2010) 352–372.

4. Assessing dicationic ILs using the *Vibrio fischeri* inhibition test

- [7] M.G. Freire, P.J. Carvalho, A.M.S. Silva, L.M.N.B.F. Santos, L.P.N. Rebelo, I.M. Marrucho, J.A.P. Coutinho, Ion specific effects on the mutual solubilities of water and hydrophobic ionic liquids, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 202–211.
- [8] S.P.M. Ventura, R.L. Gardas, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, Ecotoxicological risk profile of ionic liquids: octanol-water distribution coefficients and toxicological data, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86 (2011) 957–963.
- [9] S.H. Lee, S.B. Lee, Octanol/water partition coefficients of ionic liquids, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (2009) 202–207.
- [10] C. Samorì, A. Pasteris, P. Galletti, E. Tagliavini, Acute toxicity of oxygenated and nonoxygenated imidazolium-based ionic liquids to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*, *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (2007) 2379–2382.
- [11] P.C.A.G. Pinto, S.P.F. Costa, J.L.F.C. Lima, M.L.M.F.S. Saraiva, Automated high-throughput *Vibrio fischeri* assay for (eco)toxicity screening: Application to ionic liquids, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80 (2012) 97–102.
- [12] M.T. Garcia, N. Gathergood, P.J. Scammells, Biodegradable ionic liquids: Part II. Effect of the anion and toxicology, *Green Chem.* 7 (2005) 9–14.
- [13] K.M. Docherty, C.F. Kulpa, Jr., Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 185–189.
- [14] A. Romero, A. Santos, J. Tojo, A. Rodríguez, Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids, *J. Hazard. Mater.* 151 (2008) 268–273.
- [15] S. Stolte, M. Matzke, J. Arning, A. Bösch, W.-R. Pitner, U. Welz-Biermann, B. Jastorff, J. Ranke, Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids, *Green Chem.* 9 (2007) 1170–1179.
- [16] P. Luis, I. Ortiz, R. Aldaco, A. Irabien, A novel group contribution method in the development of a QSAR for predicting the toxicity (*Vibrio fischeri* EC50) of ionic liquids, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67 (2007) 423–429.
- [17] S.P.M. Ventura, F.A. e Silva, A.M.M. Gonçalves, J.L. Pereira, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine bacteria, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 102 (2014) 48–54.
- [18] C. Pretti, M. Renzi, S.E. Focardi, A. Giovani, G. Monni, B. Melai, S. Rajamani, C. Chiappe, Acute toxicity and biodegradability of N-alkyl-N-methylmorpholinium and N-alkyl-DABCO based ionic liquids, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74 (2011) 748–753.
- [19] T.P.T. Pham, C.-W. Cho, J. Min, and Y.-S. Yun, Alkyl-chain length effects of imidazolium and pyridinium ionic liquids on photosynthetic response of *pseudokirchneriella subcapitata*, *J. Biosci. Bioeng.* 105 (2008) 425–428.

- [20] J.H. Larson, P.C. Frost, G.A. Lamberti, Variable toxicity of ionic liquid-forming chemicals to *Lemna minor* and the influence of dissolved organic matter, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 676–681.
- [21] B. Zhang, X. Li, D. Chen, J. Wang, Effects of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide on the antioxidant system of *Lemna minor*, *Protoplasma*, 250 (2013) 103–110.
- [22] A.S. Wells, V.T. Coombe, On the Freshwater Ecotoxicity and Biodegradation Properties of Some Common Ionic Liquids, *Org. Process Res. Dev.* 10 (2006) 794–798.
- [23] C. Pretti, C. Chiappe, D. Pieraccini, M. Gregori, F. Abramo, G. Monni, L. Intorre, Acute toxicity of ionic liquids to the zebrafish (*Danio rerio*), *Green Chem.* 8 (2006) 238–240.
- [24] X.-Y. Li, J. Zhou, M. Yu, J.-J. Wang, Y. C. Pei, Toxic effects of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on the early embryonic development of the frog *Rana nigromaculata*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (2009) 552–556.
- [25] P. Luis, A. Garea, A. Irabien, Quantitative structure–activity relationships (QSARs) to estimate ionic liquids ecotoxicity EC50 (*Vibrio fischeri*), *J. Mol. Liq.* 152 (2010) 28–33.
- [26] A.-M. Lacrămă, M.V. Putz, V. Ostafe, A spectral-SAR model for the anionic-cationic interaction in ionic liquids: application to *Vibrio fischeri* ecotoxicity, *Int. J. Mol. Sci.* 8 (2007) 842–863.
- [27] M. Ismail Hossain, B.B. Samir, M. El-Harbawi, A.N. Masri, M.I. Abdul Mutalib, G. Hefter, C.-Y. Yin, Development of a novel mathematical model using a group contribution method for prediction of ionic liquid toxicities, *Chemosphere* 85 (2011) 990–994.
- [28] D.J. Couling, R.J. Bernot, K.M. Docherty, J.K. Dixon, E.J. Maginn, Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure-property relationship modeling, *Green Chem.* 8 (2006) 82–90.
- [29] S. Bruzzone, C. Chiappe, S.E. Focardi, C. Pretti, M. Renzi, Theoretical descriptor for the correlation of aquatic toxicity of ionic liquids by quantitative structure–toxicity relationships, *Chem. Eng. J.* 175 (2011) 17–23.
- [30] A. Fuentes, M. Lloréns, J. Sáez, M.I. Aguilar, A.B. Pérez-Marín, J.F. Ortuño, V.F. Meseguer, Ecotoxicity, phytotoxicity and extractability of heavy metals from different stabilised sewage sludges, *Environ. Pollut.* 143 (2006) 355–360.
- [31] K.L.E. Kaiser, V.S. Palabrica, *Photobacterium phosphoreum* toxicity data index, *Water Qual. Res. J. Canada* 26 (1991) 361–431.
- [32] ISO 11348-3. Water quality. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Part 3: Method using freeze-dried bacteria. Geneva, 2007.

4. Assessing dicationic ILs using the *Vibrio fischeri* inhibition test

- [33] S. Parvez, C. Venkataraman, S. Mukherji, A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environ. Int.* 32 (2006) 265–268.
- [34] S. Viboud, N. Papaiconomou, A. Cortesi, G. Chatel, M. Draye, D. Fontvieille, Correlating the structure and composition of ionic liquids with their toxicity on *Vibrio fischeri*: A systematic study, *J. Hazard. Mater.* 215–216 (2012) 40–48.
- [35] J.S. Torrecilla, J. Palomar, J. Lemus, F. Rodriguez, A quantum-chemical-based guide to analyze/quantify the cytotoxicity of ionic liquids, *Green Chem.* 12 (2010) 123–134.
- [36] J. Arning, S. Stolte, A. Bösch, F. Stock, W.-R. Pitner, U. Welz-Biermann, B. Jastorff, J. Ranke, Qualitative and quantitative structure activity relationships for the inhibitory effects of cationic head groups, functionalised side chains and anions of ionic liquids on acetylcholinesterase, *Green Chem.* 10 (2008) 47–58.
- [37] I.M. Gindri, D.A. Siddiqui, P. Bhardwaj, L.C. Rodriguez, K.L. Palmer, C.P. Frizzo, M.A.P. Martins, D.C. Rodrigues, Dicationic imidazolium-based ionic liquids: a new strategy for non-toxic and antimicrobial materials, *RSC Adv.* 4 (2014) 62594–62602.
- [38] F.A. e Silva, F. Siopa, B.F.H.T. Figueiredo, A.M.M. Gonçalves, J.L. Pereira, F. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, C.A.M. Afonso, S.P.M. Ventura, Sustainable design for environment-friendly mono and dicationic cholinium-based ionic liquids, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108 (2014) 302–310.
- [39] M.G. Montalbán, M. Collado-González, R. Trigo, F.G. Díaz Baños, G. Villora, Experimental Measurements of Octanol-Water Partition Coefficients of Ionic Liquids, *J. Adv. Chem. Eng.* 5:133 (2015) 1-9.
- [40] <http://www.molinspiration.com/services/logp.html>, (accessed in 2015).
- [41] <http://www.chemicalize.org/>, (accessed in 2015).

5

Production of silk fibroin nanoparticles using ionic liquids and high-power ultrasounds

Biopolymeric nanoparticles have attracted great research interest in the last few years due to their multiple applications. This article describes how high-power ultrasounds are capable of enhancing the dissolution process of silk proteins in ionic liquids (ILs) and how silk fibroin nanoparticles (SFNs) can be obtained directly from the silk/ionic liquid solution (SIL) by rapid desolvation in polar organic solvents. The silk fibroin integrity is highly preserved during the dissolution process, as confirmed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the SIL. These regenerated SFNs are insoluble in water and other common organic solvents and are indistinguishable from the classical SFNs with respect to their diameter (180 ± 5 nm), Zeta potential (-25 ± 3 mV), high degree of β -sheet and low cytotoxicity. Large amounts of silk can be turned into biomaterials directly from the SIL solution for use in a wide range of applications, while the ILs can be recovered from the coagulant solution under reduced pressure and reused without loss of their solvent properties.

5. PRODUCTION OF SILK FIBROIN NANOPARTICLES USING IONIC LIQUIDS AND HIGH-POWER ULTRASOUNDS

5.1. INTRODUCTION

Due to its excellent biocompatibility and mechanical properties, silk is an attractive biomaterial for use in biomedical and tissue engineering applications [1]. Silk fibroin (SF) obtained from *Bombyx mori* cocoons has a unique combination of mechanical and biological properties, including non-toxicity, biocompatibility and biodegradability. This biomaterial, formulated as particles, has potential applications in medicine for its capacity to adsorb, transport and deliver a wide range of bioactive molecules [2]. Silks are insoluble in most solvents, including water, dilute acid and alkali. The enhanced stability of silk biomaterials is attributed to their extensive hydrogen bonding, the hydrophobic nature of much of the protein and a significant degree of crystallinity [3].

Traditionally, two solvent systems have been used to dissolve degummed silk fibres: *ionic aqueous solutions*, such as 9.3 M LiBr or 50 %wt CaCl₂ solution [4], and *ionic hydro-alcoholic solutions*, such as a CaCl₂/ethanol/water mixture (Ajisawa's reagent) [5]. These solutions require extensive dialysis in deionised water before being concentrated to the required level. However, the processes of both dialysis and concentration are time-consuming and the solutions are unstable, with a short half-life before the protein becomes unstable and aggregates to a gel state. But without post-drawing, the fibres [6,7] and films [8] produced from these regenerated SF aqueous solutions are generally brittle. Alternatively, for long-term storage, aqueous solutions of SF can be lyophilised and redissolved in organic solvents such as 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP). However, these solvents are toxic and extremely corrosive, requiring considerable care in handling [9].

The degradation of fibroin molecules caused by high-temperature dissolution in inorganic-salt systems is the origin of the poor mechanical properties of SF-based biomaterials [10, 11]. Previously, silks were dissolved in Ionic Liquids (ILs) such as 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([bmim⁺][Cl⁻]), to form a stable SF solution [12-16]. Silkworm SF solubility in ILs is attributed to the ability of the anion (mainly halogens or small carboxylates) to disrupt the hydrogen bonds in the SF β -sheets [17]. The main advantage of using ILs as solvents is that the total number of steps required for the dissolution process is reduced, as the cocoon can be dissolved directly in the selected ILs.

The use of ILs for silk dissolution is also a considerably greener option compared with using HFIP, a volatile, corrosive and toxic solvent, since it presents unnecessary pollution [18]. But, complete dissolution of silk proteins using the above-described methods takes several hours, even with intense heating at 100 °C [12], resulting in the loss of protein integrity. Long treatments lead to breakage of the peptidic chains and poor mechanical properties of the resulting biomaterials. The silk-ionic liquid (SIL) solution is highly viscous and this viscosity increases at high protein concentrations, which is a drawback for industrial application. For this reason, the process of silk dissolution was improved by applying high-power ultrasounds to the SIL mixture - to accelerate the process, thus avoiding long heating treatments - and by adding water to reduce the viscosity.

High-power ultrasounds have two important synergistic effects on the mixture: rapid heating and efficient disruption of the fibres at the same time. The ultrasonication rapidly raises the temperature of ILs and helps to introduce the ILs into cohesively bound SF threads and disrupt the hydrogen bonds until their complete dissolution. ILs have also proved their applicability as solvents for other biopolymers, such as cellulose. Swatlosky *et al.* [19] reported that the method used to prepare the solution greatly affected the solubility. In particular, these authors used microwave heating on a [bmim⁺][Cl⁻]/cellulose mixture to dissolve 25% (w/w) cellulose and compared the results with those obtained for a 10% (w/w) cellulose solution heated in an oil bath at 100 °C. However, the peak temperature reached during the microwave dissolution step was not reported and neither did the authors analyse the extent of cellulose degradation. Novel composites can also be prepared by mixing different polymer solutions in ILs, such as cellulose, polyvinyl acetate (PVA) or polyurethane and SF [20].

Ultrasonication has been applied to dissolve cellulose in ILs and was capable of enhancing the dissolution process of water-insoluble biopolymers with a high number of hydrogen bonds [21]. To date, ultrasonication has only been applied to an aqueous SF solution, with the aim of promoting gelation of the biopolymer [9]. Although SF dissolved in ILs has been regenerated in films, sponges and fibres [12-15], particle coagulation from the IL-dissolved SF has not been reported.

By applying the precipitation method commonly used for the coagulation of an aqueous SF solution in a water-miscible organic solvent, it is possible to obtain particles of regenerated SF [22]. Previous data suggest that silk films obtained from an ionic liquid solution have no detrimental effect on cell viability, differentiation or gene expression, and the use of ILs as a solvent for SF dissolution provides an avenue for the fabrication of silk scaffolds for tissue engineering applications [14]. Regenerated SFNs obtained from coagulation of the SIL solution in methanol should show a similar lack of effect on cell viability, although further experiments are necessary to confirm this.

The first part of the study is dedicated to the comparison of the classical dissolution process, using an oil bath as heat source, with high-power ultrasounds and to the characterisation of SILs mixtures. The SF integrity is highly preserved during the dissolution process, as confirmed by sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the SIL and HPLC/MS of the selected bands. The second part is dedicated to the preparation of SFNs directly from the SIL solution, by rapid desolvation in polar organic solvents. These new SFNs are insoluble in water and other common organic solvents and are indistinguishable from the classical SFNs regarding their diameter, zeta potential, high degree of β -sheet and low cytotoxicity. The ILs can be recovered from the coagulant solution under reduced pressure and reused without loss of their solvent properties.

5.2. EXPERIMENTAL

5.2.1. Material

White silk cocoons (SC) were obtained from silkworms of *B. mori* reared in the sericulture facilities of the IMIDA (Murcia, Spain) and raised on a diet of natural *Morus alba* L. fresh leaves. The intact pupae were extracted from the cocoons two to seven days after spinning, by cutting open the cocoons. This method avoids possible

contamination and thermal degradation from the industrial process of baking the pupae in the cocoons. Degummed silk (SF) was used for the solubility test. Briefly, raw white silk cocoons (SC) were boiled twice in a 0.05 M Na₂CO₃ aqueous solution for 45 minutes. The remaining SF was rinsed thoroughly with ultrapure water and dried prior to use. In the dissolution experiments using ultrasonication, the SC and SF were cut into small pieces (~100 mg) and added to the ILs. All the ILs (97% purity) were purchased from IoliTec GmbH (Germany) and were used without further purification. Purified water (18.2 MΩ·cm at 25 °C; from a Millipore Direct-Q1 ultra-pure water system, Billerica, MA) was used throughout. All other chemicals and solvents were of analytical grade and were used without further purification.

5.2.2. Test of the silk fibroin solubility in ILs

To test SF solubility, dissolution experiments were conducted in an open glass vessel. To determine the solubility of the SF in the selected ILs, protein was added slowly to the melted ionic liquid - while providing magnetic agitation. The temperature of the mixture was maintained at 90 °C with a temperature-controlled oil bath. The resultant SIL solutions were clear and amber in colour, and - above 10% (w/w) - were quite viscous.

5.2.3. Dissolution of silk proteins in ILs using pulsed ultrasonication

Small pieces of ~100 mg of silk cocoon or degummed SF were added sequentially to 5 g of molten IL, in a vessel resistant to high temperature and high-power ultrasounds. After each addition, the mixture was treated on a Sonifier Branson 450D (Emmerson Ultrasonic Corporation, Dansbury, USA) subjected to a pulsating ultrasonication steps at 30% amplitude, with a 3/8" tapered horn and temperature automatically limited to 100 °C (see Supporting information, Figure 5.S1), until complete dissolution. Complete dissolution of silk fibres was confirmed by microscopy, using a Nikon Eclipse 50i microscope (equipped with a CCD camera DS-Fi1) and NIS-Elements Ver. 2.0 software.

5.2.4. Characterisation of SIL solutions

Silk protein integrity in the SIL solutions was confirmed by SDS-PAGE, followed by trypsin digestion and HPLC-MS identification of the protein fragments in selected bands. The SDS-PAGE was performed according to the Laemmli protocol, with a 4-20% gradient acrylamide gel (Amersham GE-HC) [23]. The set-up used was a horizontal Gel-Box electrophoresis chamber (Amersham GE-HC). After electrophoresis, the gels were stained with 0.25% Coomassie Brilliant Blue (Acros Organics, Belgium). Two molecular-weight markers were loaded: ColorBurst™ Electrophoresis Marker (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO) and BenchMark™ protein ladder (Invitrogen). Protein concentrations in the samples were unified at 50 µg per lane, by diluting the different ionic liquid solutions of SF with MilliQ water. These samples were loaded under denaturing conditions by adding β-mercaptoethanol (10% v/v) to the loading buffer and heating at 100 °C for 5 min immediately before electrophoresis.

Selected gel bands were cut and digested with Trypsin Gold (Promega), according to the manufacturer's protocol for mass spectrometry analysis. Using Proteome Discoverer

5. Production of silk fibroin nanoparticles using ILs and high-power ultrasounds

Ver. 1.3 software and searching in the SwissProt Data Bank (2011) [24], the searching tolerance was set to ± 1.5 Da for precursors and ± 0.8 Da for fragments. A filter for FDR $p < 0.01$ was established and at least two unique peptides per protein.

5.2.5. Preparation of silk fibroin nanoparticles

Figure 5.1 summarises the overall process of SFNs preparation from SIL solutions. The preparation of SFNs was based on the method described previously by Zhang *et al.*, with modifications [22].

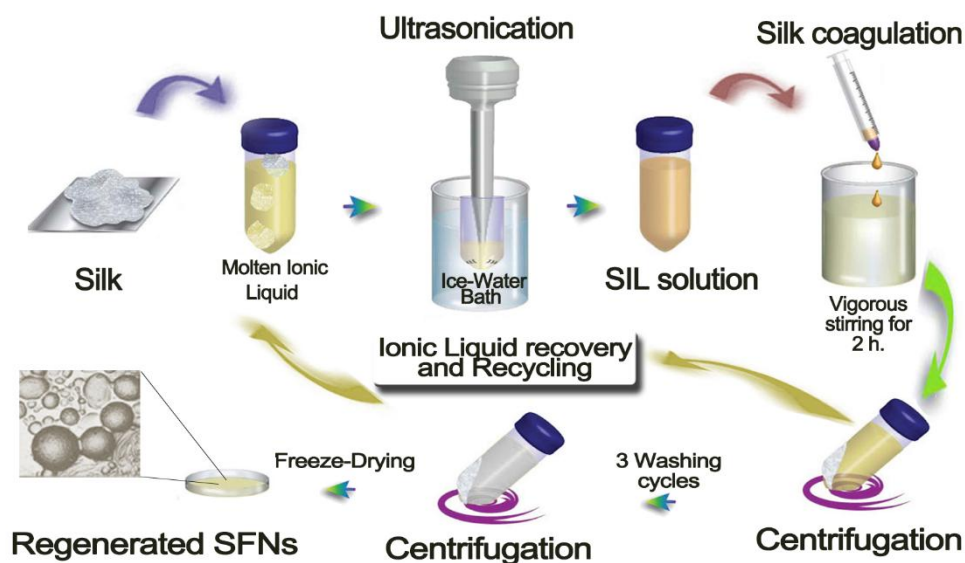


Figure 5.1. Scheme of the overall process of SF dissolution, using ILs and ultrasonication, and consequent SFNs preparation from SIL solutions.

Briefly, to the freshly-prepared SIL solution, ultrapure water (MilliQ, $18.2 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}$) was slowly added, to reduce viscosity. After cooling to $\sim 45^\circ\text{C}$, the SIL solution was dripped (~ 1 drop every 2 s) onto 100 mL of gently-stirred cold MeOH. A milky-white suspension appeared after a few drops and the suspension was allowed to reach room temperature while stirring for 2 hours. Then, the particle suspension was transferred to centrifuge vials and centrifuged at $18,000g$ for 15 minutes, at 4°C (Eppendorf Centrifuge 5810R equipped with an F-34-6-38 rotor).

The supernatant - free of particles - was removed, filtered ($0.22 \mu\text{m}$ disposable PTFE filters) and reserved for subsequent recycling of the IL. An equal volume of fresh methanol was added to the vial and the white precipitate was suspended by vigorous stirring in a vortex mixer for 2 minutes. The centrifugation was repeated under the same conditions. The white precipitate was subjected to successive rinses with ultrapure water in a water/RSF mixture (ratio of 20:1) until no AgCl precipitate was observed after the addition of 0.1 N AgNO_3 to the washing water after centrifugation. The particles were lyophilised in an Edwards Modulyo 4K Freeze Dryer for 72 h, at -55°C and 0.5 mbar , and regenerated SF was obtained as lyophilised dry particles. The methanolic fractions were mixed before recovery of the IL, by removal of the

methanol/water on a rotary evaporator at 80 °C and 80 mbar. The ILs were kept in a desiccator until reuse.

5.2.6. Characterisation of silk particles

The particles were characterised by Scanning Electron Microscopy (SEM), Dynamic Light Scattering (DLS) and Infrared Spectroscopy (FTIR). A morphological examination of the nanoparticles was made using a Scanning Electron Microscope (JEOL-JSM-6100; JEOL-Japan). One drop of nanoparticle suspension was fixed on an aluminium stub, coated with gold (under vacuum, by an auto fine coater) and examined at different magnifications. The mean diameter, size distribution and Zeta potential were measured using a Malvern Zetasizer Nano ZS instrument. All measurements were performed in purified water at 25 °C or in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (without Fetal Bovine Serum (FBS) supplementation) at 37 °C. The Z-average and polydispersity were obtained with the software provided by the manufacturer. The Z-average diameter and Zeta potential values were calculated from the measurements performed in quintuplicate. The infrared spectra of the pure ionic liquid, SFNs from SIL solutions and SFNs obtained from the Ajisawa's solvent system [22] were recorded using a Perkin-Elmer Spectrum 100 Series FTIR spectrometer (Norwalk, CT, USA) controlled with Spectrum Software Ver. 6.1.0.0038. Samples (~2 mg) were mixed with ~198 mg of KBr (Sigma-Aldrich) and ground into a fine powder using a mortar and pestle, before being compressed into a disc (Perkin Elmer 15.011, USA). Each spectrum was acquired in transmittance mode (10 scans) with a resolution of 4.0 cm⁻¹ and a spectral range of 4000-500 cm⁻¹. The analysis was finally focused in the 2000-500 cm⁻¹ range, which is the most informative in the SF spectrum.

5.2.7. Cell viability/cytotoxicity studies

Murine fibroblasts (cell line L929) were chosen for cell culture studies, as these fibroblasts are highly stable, fast growing and commonly used for cytotoxicity experiments. The fibroblasts were seeded onto 48-well tissue culture plates at a density of 3.0·10⁴ cells/well for 24 h, after which the growth medium was removed and replaced with the medium containing SFNs obtained from a SIL solution coagulated in methanol. Classical SFNs were obtained by following *Zhang's* method [22] and growth medium without nanoparticles was used as the control. The culture medium used was Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL), at 37 °C in a 7.5%-CO₂ atmosphere.

The MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) assay was used to measure the cell cytotoxicity. L929 murine fibroblasts were plated at a density of 3.0·10⁴ cells/well in 48-well plates, at 37 °C in a 7.5%-CO₂ atmosphere. After 24 h, the culture medium of each well was replaced with fresh medium containing nanoparticles of selected concentrations (100 and 200 µg/mL). The SFNs prepared with the newly-developed method of silk dissolution in different ILs were used, to analyse their cytotoxicity. After 24 h, the medium was removed and 500 µL of MTT (Sigma, St. Louis, MO) dye solution (1 mg/mL in DMEM without phenol red) were added to each well, followed by incubation for 4 h at 37 °C and 7.5% CO₂. Then, the MTT solution was removed and formazan crystals were solubilised with 200 µL of DMSO per well, vigorously shaking the plates for 5 min to dissolve the reacted dye. The absorbance of

5. Production of silk fibroin nanoparticles using ILs and high-power ultrasounds

each well was read on a microplate reader (BMG Fluostar Galaxy) at 570 nm; the reference wavelength was 690 nm. The data are presented as means \pm SD (standard deviation), calculated from five samples per condition. The assumptions of normality (Kolmogorov-Smirnov, $p > 0.05$) and homocedasticity (Levene, $p > 0.05$) were met and the statistical significance was determined using the Tukey ($p < 0.05$) and ANOVA ($p < 0.05$) parametric tests.

5.3. RESULTS AND DISCUSSION

5.3.1. Test of the solubility of silk fibroin in ILs

The dissolution of *Bombyx mori* SF using an oil bath as the heat source was investigated in the assembled state of the fibres. Table 5.1 summarises the results. Dissolution of the SF samples was confirmed by observation of fibre dissolution under an optical microscope. Complete dissolution took over 1 h at 100 °C, as described by Phillips *et al.* [12]. The saturated solubilities by weight for SF in 1-alkyl-3-methylimidazolium chlorides are dependent on the length of the alkyl substituent of the imidazolium ring, as can be seen in Table 5.1. Of the chlorides, [emim⁺][Cl⁻] showed the highest solvent capacity, reaching 25% (w/w). These results are concordant with those described previously in the literature [12].

Table 5.1

Solubility (% wt) of silk fibroin in selected ILs at 90 °C (heated in an oil bath)

IL	SF solubility (wt%)	IL	SF solubility (wt%)
[mim ⁺][Cl ⁻]	S(>12%)	[eim ⁺][Cl ⁻]	Is
[emim ⁺][Cl ⁻]	S(>23%)	[emim ⁺]EtSO ₄ ⁻	Is
[pmim ⁺][Cl ⁻]	S(>15%)	[emim ⁺]TfO ⁻	Is
[bmim ⁺][Cl ⁻]	S(>12%)	[bmim ⁺]OctSO ₄ ⁻	Is
[hmim ⁺][Cl ⁻]	S(>11%)	[bBmim ⁺]PF ₆ ⁻	Is
[omim ⁺][Cl ⁻]	Is	[3-MEP ⁺]EtSO ₄ ⁻	Is
[dmim ⁺][Cl ⁻]	Is	ETAN	Is

Is - Insoluble after 24 h at 90 °C; S – Soluble

The results confirm that 1-alkyl-3-methyl imidazolium chlorides act as good solvents for silk dissolution when the length of the alkyl chain is less than eight carbons [12]. The disruption of protein hydrogen bonds requires mid-high polarity and greater lengths increase the hydrophobicity of the organic cation, so that long-aliphatic-chain ILs cannot act as solvents for SF. In the same way, when ILs have highly-hydrophobic anions they are not able to dissolve SF.

5.3.2. Dissolution of silk proteins using ultrasonication

To test the effect of ultrasonication on the silk fibres, the ILs with the greatest ability to act as solvents for SF were selected. Thus, silk proteins were also successfully dissolved in the 1-alkyl-3-methylimidazolium chlorides (where 1-alkyl is: *methyl* [mim⁺][Cl⁻]; *ethyl* [emim⁺][Cl⁻]; *propyl* [pmim⁺][Cl⁻]; *butyl* [bmim⁺][Cl⁻] or *hexyl* [hmim⁺][Cl⁻]), using pulsed ultrasonic treatment to heat the solution efficiently and achieve fast disruption of the fibres. The saturated solubility by weight and the time required for silk dissolution in selected ILs are listed in Table 5.2.

5. Production of silk fibroin nanoparticles using ILs and high-power ultrasounds

Table 5.2

Solubility and time required for dissolution of silk proteins, in selected ILs

Solvent	<i>Silk fibroin (SF)</i>		<i>Silk Cocoon (SC)</i>	
	Solubility (%wt)	Time (min.)	Solubility (%wt)	Time (min.)
[mim ⁺][Cl ⁻]	12.5 ± 0.1	4	12.5 ± 0.1	17
[emim ⁺][Cl ⁻]	23.0 ± 0.3	17	18.7 ± 0.6	67
[pmim ⁺][Cl ⁻]	15.2 ± 0.3	14	17.6 ± 0.1	27
[bmim ⁺][Cl ⁻]	12.7 ± 0.6	5	12.9 ± 0.4	24
[hmim ⁺][Cl ⁻]	10.9 ± 0.2	8	11.1 ± 0.3	20

Solubility is presented as the average value ± SD (standard deviation) of 3 independent experiments.

While the classical heating method needed hours to complete the dissolution, the application of ultrasounds to the mixture achieved a significant reduction in the time necessary to complete the SF dissolution process in ILs at 100 °C. The solvent effect of the cations and anions of the ILs that break the β -sheet hydrogen bonds network was enhanced by the ultrasounds. The ILs with greater solvent ability took longer to reach saturation due to the increase in viscosity of the SIL solution (see Supporting information). After recycling, ILs can be used without the loss of their solvent properties in at least four successive processes (see Supporting information for details).

Although the solubility of SF was highest in [emim⁺][Cl⁻], for particle formation it is not necessary to reach a concentration higher than 10% (w/w), since increased viscosity represents a handicap for handling. For SFNs preparation, 10% (w/w) SIL solutions were prepared by following the above-mentioned procedure.

5.3.3. Characterisation of SIL solutions

In the SDS-PAGE experiments, it was found that shorter protein dissolution times at high temperatures prevented the high degree of peptidic chain fragmentation that occurs with the dissolution methods commonly used. As can be observed in Figure 5.2, the molecular masses of the fragments of the SIL solutions are almost identical to that of the SF present in the silkworm gland [25].

5. Production of silk fibroin nanoparticles using ILs and high-power ultrasounds

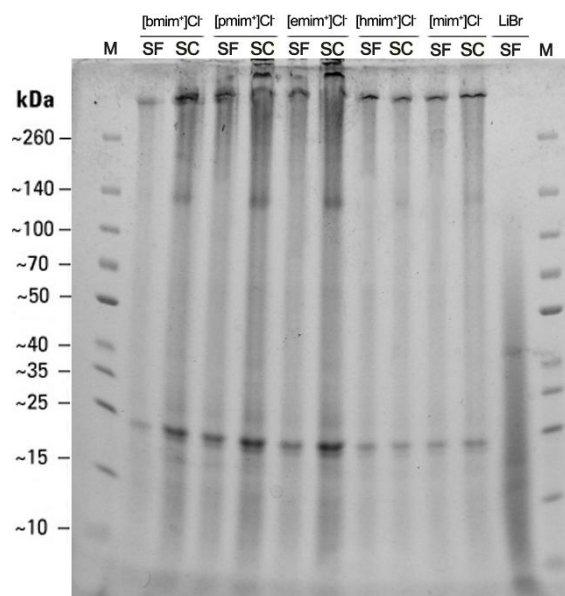


Figure 5.2. SDS-PAGE analysis of the protein components of silk fibroin (SF) and white silk cocoons (WC) after ultrasonication in the selected ionic liquids: [bmim⁺][Cl⁻], [pmim⁺][Cl⁻], [emim⁺][Cl⁻], [hmim⁺][Cl⁻] and [mim⁺][Cl⁻]. Lane M: Spectra Multicolor Protein Ladder 10-260 KDa (Thermo), (4-20% gradient Gel Amersham GE-HC).

The peptide distribution in the polyacrylamide gel shows discrete bands that were identified by HPLC/MS (see Supporting information) as highly-conserved SF heavy chain (390.1 KDa), SF light chain (27.7 KDa) and fibrohexamerin P25 (25.1KDa) in the degummed SF solution. The silk protein solution prepared by dissolution of whole cocoons with ILs and ultrasonication showed the above -mentioned SF peptides and also peptidic chains of sericin 1 (119.1 KDa) [26]. The heavy chain of SF is composed of 5263 aminoacidic residues and it is very sensitive to thermal treatment and the solvent system composition [11]. As can be seen in Figure 5.2 (Lane LiBr SF), the classical methods of SF dissolution in hydroalcoholic/salts solvent systems showed an SDS-PAGE with a continuous smear of fragments of multiple sizes in contrast with the new, short-time dissolution method which conserved the integrity of the proteins [11].

5.3.4. Preparation of silk fibroin nanoparticles

The scheme of Figure 5.1 summarises the overall process of SFNs preparation from SIL solutions. When a SIL solution is rapidly poured into an excess of a polar organic solvent, such as methanol, ethanol or acetone, a milky-white suspension of silk protein is formed immediately. The SF regeneration in the form of particles was achieved by pouring SIL solution into an excess of methanol. The organic solvent dissolves the IL and the protein chains are able to reconstitute the hydrogen bonds network and change from a random coil structure to the highly-ordered and solid β -sheet conformation in the particles [22]. The viscosity of the mixture also played an important role in nanoparticle formation. The lower the viscosity of the SIL, the more efficient the mixing, and the desolvation of the peptidic chains was faster, leading to the efficient formation of nanoparticles when the SIL viscosity was below 0.5 Pa·s (see Supporting information). Higher viscosities induced poor mixing of the precipitating solvent and the protein solution, leading to the formation of aggregates of micrometric to millimetric size.

5. Production of silk fibroin nanoparticles using ILs and high-power ultrasounds

The SFNs formation after coagulation of the SIL mixtures in these solvents was an efficient process, with a protein recovery higher than 85% after freeze-drying. Most of the ~15% by weight of nanoparticles was lost in the washing process because the smaller particles needed higher *g*-forces to promote their sedimentation in water. But this washing process is essential, to prevent the ILs from being retained in the SFNs and affecting the biomedical application of the particles. The FTIR analysis of the SFNs obtained discounted the presence of ILs in the particles.

After protein precipitation and separation from the coagulant solvent by centrifugation and filtration through a 0.22- μ m PTFE filter, to eliminate protein particles, the ILs were recovered with high yields, in excess of 98%, by rotoevaporation under vacuum - because of their negligible vapour pressure [18]. The stability of the ILs was checked routinely by NMR analysis in deuterated methanol which showed no significant differences from the commercial ILs (data not shown). The ILs were reused, with no decrease in their solvent properties at least in four process (see Supporting information).

5.3.5. Characterisation of silk fibroin nanoparticles

Scanning electronic microscopy (SEM) showed that the silk particles were globular granules of a quite-homogeneous size (Figure. 5.3). The stability of the particles was also tested in DMEM culture media. In MilliQ water at 25 °C, the SF particles had an average size of 170–184 nm (Zsizer ZS, Malvern). The results indicate that the particles were slightly larger (183–341 nm) when dispersed in DMEM (see Table 5.3); these values are almost identical to those described previously in the corresponding literature [22, 28, 29].

Table 5.3

Comparative values for the particle size (diameter), polydispersity (PdI) and Zeta potential of classical SFNs [22] obtained from CaCl₂/EtOH/H₂O solvent and SFNs produced from SIL solutions.

Solvent used	MilliQ water at 25 °C			DMEM ^c (without FBS) at 37 °C		
	Diameter ^a (nm)	PdI ^b	Zpot ^a (mV)	Diameter ^a (nm)	PdI ^b	Zpot ^a (mV)
CaCl ₂ /EtOH/H ₂ O	174 ± 2	0.121	-26.23± 0.59	183 ± 3	0.140	-12.02± 0.42
[mim ⁺][Cl]	177 ± 4	0.153	-27.15± 0.74	208 ± 4	0.115	-12.08± 1.50
[emim ⁺][Cl]	181 ± 3	0.230	-25.65± 0.90	341 ± 9	0.393	-12.00± 2.12
[pmim ⁺][Cl]	175 ± 4	0.129	-27.53± 0.66	211± 4	0.076	-12.22± 1.09
[bmim ⁺][Cl]	184 ± 5	0.212	-24.53± 1.42	235± 4	0.245	-12.24± 1.66
[hmim ⁺][Cl]	176 ± 3	0.140	-27.90± 0.82	200± 3	0.133	-11.28± 0.55

^a Z-average ± SD (n=5) and accumulation times=100. ^b Average value. ^c Dulbecco's modified Eagle's medium.

The polydispersity values of the silk nanoparticles were similar in all cases, demonstrating that the particles were well dispersed in the medium, with no aggregation. The zeta potential range of the SF particles varied from -25.6 to -27.9 mV in water and from -11.2 to -12.2 mV in DMEM (Table 5.3); the values were slightly lower in DMEM due to the salting effect of the buffer solution and the shielding effect of the serum components [29]. Negatively-charged SF particles facilitate the interaction of nanoparticles with positively-charged cells and hence increase the rate and extent of internalisation that would be effective for drug delivery.

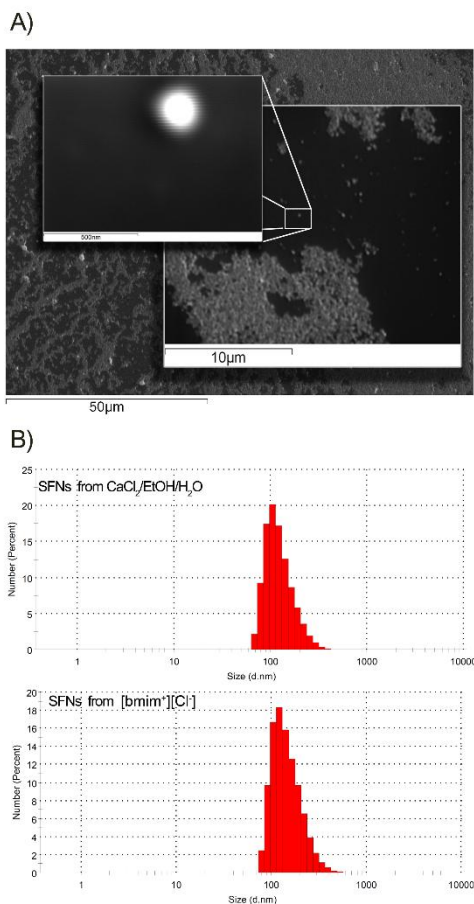


Figure 5.3. A) Sequence of SEM images of SFNs regenerated from SF/[bmim⁺][Cl⁻] solution (Sequential scale bars: 50 μm, 10 μm and 500 nm). B) Comparative size distributions of classical SFNs regenerated from the Ajisawa solvent system [22] and from SF/[bmim⁺][Cl⁻] solution (Malvern Zetasizer ZS).

The FTIR spectra of pure [bmim⁺][Cl⁻], SFNs produced from a SIL solution in [bmim⁺][Cl⁻] and SFNs obtained using the classical Zhang's method [22] are given in Figure 5.4. The secondary structure of the SF was predominantly β -sheet in both kinds of particles, with strong peaks at 1626 cm⁻¹ (Amide I, C=O Stretching), 1516 cm⁻¹ (Amide II, N-H Bending) and 1230 cm⁻¹ (Amide III, C-H Stretching) - which are characteristic of the β -sheet structure of stable and insoluble SILK II [27]. The peak profile was similar to that of SFNs obtained by precipitation in methanol of SF dissolved in the Ajisawa solvent system [22, 27]. Characteristic signals of ILs (1572, 1465 and 1170 cm⁻¹) were absent in the recorded spectrum of SFNs obtained from [bmim⁺][Cl⁻], indicating that the IL was efficiently washed out from the particles.

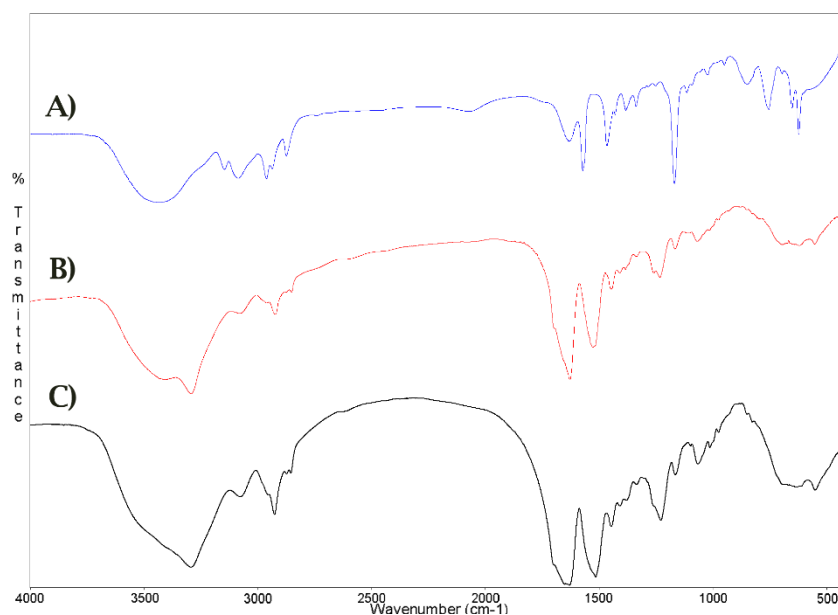


Figure 5.4. Comparative FTIR spectra of A) Only [bmim⁺][Cl⁻]; B) SFNs regenerated from SF/[bmim⁺][Cl⁻] solution; C) SFNs regenerated from classical CaCl₂/EtOH/H₂O solution [22], measured in a Perkin Elmer 100 Series Spectrometer.

5.3.6. Cell viability/cytotoxicity studies

To study the potential cytotoxicity of the SFNs resulting from different methodologies, MTT assays were performed at two different concentrations (100 and 200 µg/mL), based on similar experiments developed by Kundu *et al.*[28].

The MTT assay is commonly used to evaluate the toxicity of biomaterials, based on their mitochondrial activity - which influences metabolic activity and cell viability [30, 31]. To determine the toxicity of the newly-synthesised SFNs, we conducted this well-known assay with L929 fibroblast cells, as previously explained. Cell viability was monitored by absorbance measurements obtained in MTT assays. The absorbance values of negative controls (without nanoparticles) were assumed as 100% viability after 24 h of incubation (Figure 5.5). No significant differences were found between the cell viability of negative controls and that of the cells incubated with SFN at 100 µg/mL (Tukey, $p > 0.05$), which means that no cytotoxicity was detected at this concentration. However, at 200 µg/mL, the cell viability was decreased significantly in all the treatments when compared with both the negative control (Tukey, $p < 0.05$) and the incubation at 100 µg/mL, for each kind of fibroin nanoparticle (ANOVA, $p < 0.05$). The viability of the cells incubated with particles at 200 µg/mL ranged from 50% to 74%, as shown in Figure 5.5, while significantly-lower viability was detected in the cells exposed to the nanoparticles produced using [emim⁺][Cl⁻], compared with the other treatments (Tukey, $p < 0.05$).

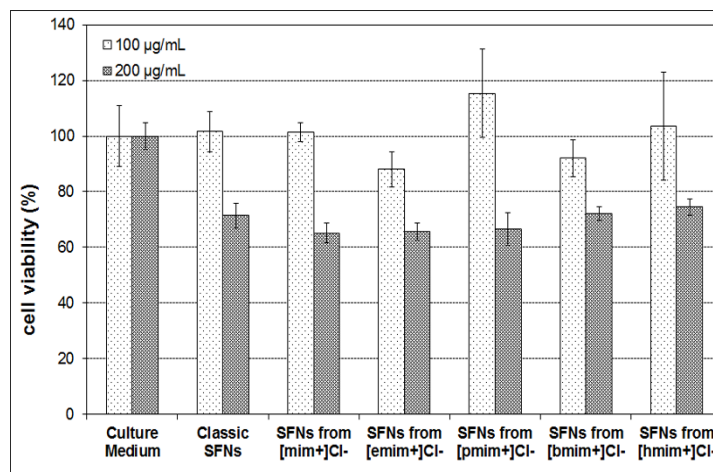


Figure 5.5. Cell viability (%) of murine L929 mouse fibroblasts after 24 h of incubation with SFNs (classical and obtained from SIL solutions) relative to the control cells without nanoparticles, as determined by the MTT assay (mean \pm SD of $n=6$).

Our results agree with the viability data mentioned by Kundu *et al.* [28], who used nanoparticles produced by Zhang's method [22], thus confirming the potential of our new protocol to produce SFNs for biomedical applications.

5.4. CONCLUSIONS

Our new methodology involves the application of high-power ultrasounds to a mixture of IL and SF, to enhance the dissolution of the protein. Then, SFNs can be easily obtained from the mixture using a simple desolvation method with polar organic solvents. The regenerated SF micro- or nanoparticles obtained show a degree of β -sheet similar to that of the SF threads and are almost identical to the silk nanoparticles previously described in the literature. After desolvation, the ILs can be efficiently recovered under reduced pressure and reused without losing their solvent property, which considerably enhances the overall efficiency of the process. Large amounts of silk can be turned into biomaterials directly from the dissolved SIL solution, for use in a wide range of applications.

5.5. REFERENCES

- [1] F.G. Omenetto, D.L. Kaplan, New opportunities for an ancient material, *Science* 329 (2010) 528–531.
- [2] S. Hofmann, C. Foo, F. Rossetti, M. Textor, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, H. P. Merkle, L. Meinel, Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery, *J. Control. Release* 111 (2006) 219–227.
- [3] G.H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R.L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D.L. Kaplan, Silk-based biomaterials, *Biomaterials* 24 (2003) 401–416.
- [4] T. Asakura, Y. Watanabe, A. Uchida, H. Minagawa, NMR of silk fibroin. 2. ^{13}C NMR study of the chain dynamics and solution structure of Bombyx mori silk fibroin, *Macromolecules* 17 (1984) 1075–1081.
- [5] A. Ajisawa, Dissolution of silk fibroin with calcium chloride/ethanol aqueous solution, *J. Seric. Sci. Jpn.* 67 (1998) 91–94.

- [6] G.Q. Zhou, Z.Z. Shao, D.P. Knight, J.P. Yan, X. Chen, Silk fibers extruded artificially from aqueous solutions of regenerated *Bombyx mori* silk fibroin are tougher than their natural counterparts, *Adv. Mater.* 21 (2009) 366–370.
- [7] J.P. Yan, G.Q. Zhou, D.P. Knight, Z.Z. Shao, X. Chen, Wet-spinning of regenerated silk fiber from aqueous silk fibroin solution: discussion of spinning parameters, *Biomacromolecules* 11 (2010) 1–5.
- [8] J.W. Yin, E. Q. Chen, D. Porter, Z.Z. Shao, Enhancing the toughness of regenerated silk Fibroin film through uniaxial extension, *Biomacromolecules* 11 (2010) 2890–2895.
- [9] D.N. Rockwood, R.C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M.L. Lovett, D.L. Kaplan, Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin, *Nat. Protoc.* 6 (2011) 1612–1631.
- [10] C.A. Holland, E. Terry, D. Porter, F. Vollrath, Natural and unnatural Silks, *Polymer* 48 (2007) 3388–3392.
- [11] S.D. Aznar-Cervantes, D. Vicente-Cervantes, L. Meseguer-Olmo, J.L. Cenis, A.A. Lozano-Pérez, Influence of the protocol used for fibroin extraction on the mechanical properties and fiber sizes of electrospun silk mats, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 1945–1950.
- [12] D.M. Phillips, L.F. Drummy, D.G. Conrady, D.M. Fox, R.R. Naik, M.O. Stone, P.C. Trulove, H.C. De Long, R.A. Mantz, Dissolution and regeneration of *Bombyx mori* silk fibroin using ionic liquids, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 14350–14351.
- [13] D.M. Phillips, L.F. Drummy, R.R. Naik, H.C. De Long, D.M. Fox, P.C. Trulove, R.A. Mantz, Regenerated silk fiber wet spinning from an ionic liquid solution, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 4206–4208.
- [14] M.K. Gupta, S.K. Khokhar, D.M. Phillips, L.A. Sowards, L.F. Drummy, M.P. Kadakia, R.R. Naik, Patterned silk films cast from ionic liquid solubilized fibroin as scaffolds for cell growth, *Langmuir*, 23 (2007) 1315–1359.
- [15] US Pat. 7 671 178, 2010.
- [16] N. Goujon, X. Wang, R. Rajkova, N. Byrne, Regenerated silk fibroin using protic ionic liquids solvents: towards an all-ionic-liquid process for producing silk with tunable properties, *Chem. Commun.* 48 (2012) 1278–1280.
- [17] Q. Wang, Y. Yang, X. Chen, Z. Shao, Investigation of rheological properties and conformation of silk fibroin in the solution of AmimCl, *Biomacromolecules* 13 (2012) 1875–1881.
- [18] R.D. Rogers, K.R. Seddon, Ionic liquids – Solvents of the future?, *Science* 302 (2003) 792–793.
- [19] R.P. Swatlowky, S.K. Spear, J.D. Holbrey, R.D. Rogers, Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 4974–4975.
- [20] S. Shang, L. Zhu, J. Fan, Physical properties of silk fibroin/cellulose blend films regenerated from the hydrophilic ionic liquid, *Carbohydr. Polym.* 86 (2011) 462–468.
- [21] J. Mikkola, A. Kirilin, J.C. Tuuf, A. Pranovich, B. Holmbom, L.M.D. Kustov, Y. Murzina, T. Salmi, Ultrasound enhancement of cellulose processing in ionic liquids: from dissolution towards functionalization, *Green Chem.* 9 (2007) 1229–1237.

5. Production of silk fibroin nanoparticles using ILs and high-power ultrasounds

- [22] Y.-Q. Zhang, W.-D. Shen, R.-L. Xiang, L.-J. Zhuge, W.-J. Gao, W.-B. Wang, Formation of silk fibroin nanoparticles in water-miscible organic solvent and their characterization, *J Nanopart. Res.* 9 (2007) 885–900.
- [23] U.K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [24] M.L. Huynh, P. Russell, B. Walsh, Tryptic digestion of in-gel proteins for mass spectrometry analysis, *Methods Mol. Biol.* 519 (2009) 507–513.
- [25] H. Yamada, H. Nakao, Y. Takasu, K. Tsubouchi, Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons, *Mater. Sci. Eng. C* 14 (2001) 41–46.
- [26] Y. Takasu, H. Yamada, K. Tsubouchi, Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (2002) 2715–2718.
- [27] Z. Cao, X. Chen, J. Yao, L. Huang, Z. Shao, The preparation of regenerated silk fibroin microspheres, *Soft Matter*. 3 (2007) 910–915.
- [28] J. Kundu, Y.I. Chung, Y.H. Kim, G. Tae, S.C. Kundu, Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release, *Int. J. Pharm.* 388 (2010) 242–250.
- [29] B. Subia, S.C. Kundu, Loading and release on tumor cells using silk fibroin–albumin nanoparticles as carriers, *Nanotechnology* 24 (2013) 035103–035114.
- [30] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 95 (1983) 55–63.
- [31] A.K. Gupta, M. Gupta, S.J. Yarwood, A.S. Curtis, Effect of cellular uptake of gelatin nanoparticles on adhesion, morphology and cytoskeleton organisation of human fibroblasts, *J. Control. Release.* 95 (2004) 197–207.

5.6. SUPPORTING INFORMATION

5.6.1. Dissolution of silk proteins in ionic liquids using pulsed ultrasonication

Small pieces of silk cocoon or degummed SF were added sequentially to 5 g of molten IL, in a vessel resistant to high temperature and high-power ultrasounds. After each addition, the mixture was subjected to a pulsating ultrasonication step at 30% amplitude, with a tapered horn of a Branson 450D ultrasonicator (temperature limited to 100 °C), until complete dissolution.

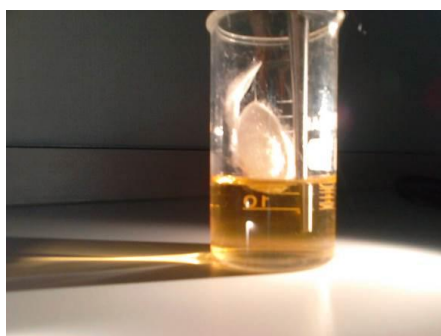


Figure 5.S1. Dissolution of silk proteins using ILs and ultrasounds.

5. Production of silk fibroin nanoparticles using ILs and high-power ultrasounds

Complete dissolution of silk fibres was confirmed by microscopy, using a Nikon Eclipse 50i microscope (equipped with a CCD camera DS-Fi1) and NIS-Elements Ver. 2.0 software.

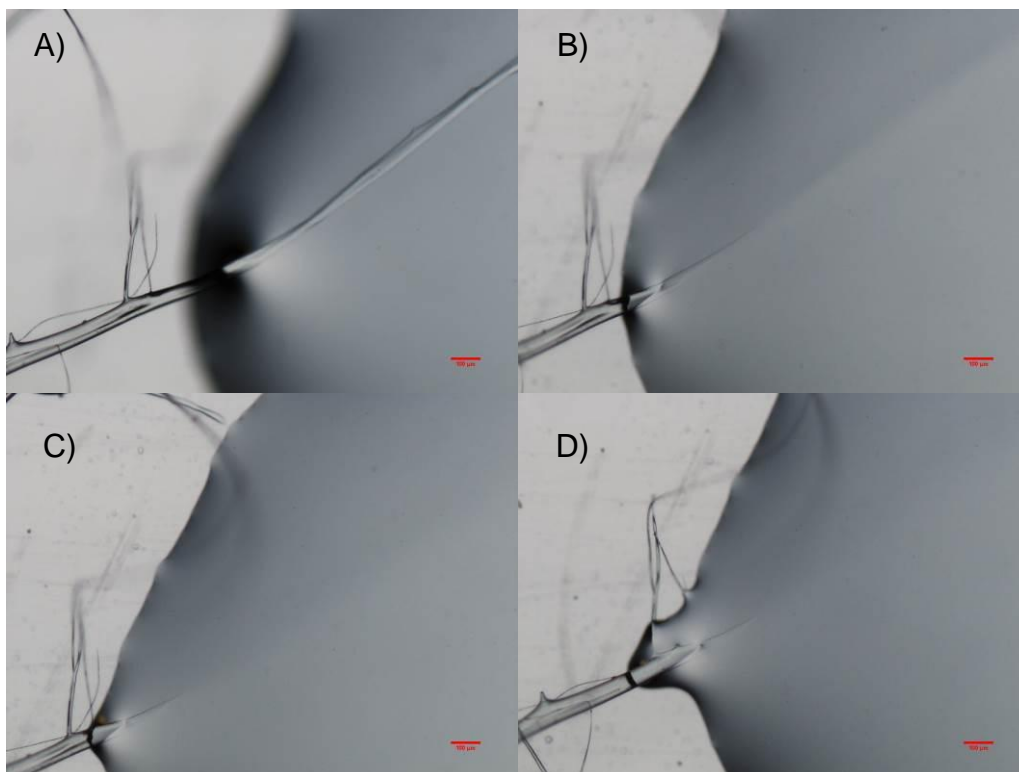


Figure 5.S2. Sequential images of SIL solution in [bmim⁺]Cl. A) Silk immersion; B) After 5 minutes at 90°C, C) After 30 minutes at 90°C and D) After 1h at 90°C. (Magnification 5x, scale bar 100 μ m).

5.6.2. Solvent properties of recycled ILs

After recycling, ILs can be used without the loss of their solvent properties in at least four successive processes of protein dissolution (including precipitation, separation, centrifugation, filtration to remove particles of protein and rotary evaporation to removing methanol and water. The solubility (%wt) of SF in recycled ILS using ultrasonication is presented in Figure 5.S3.

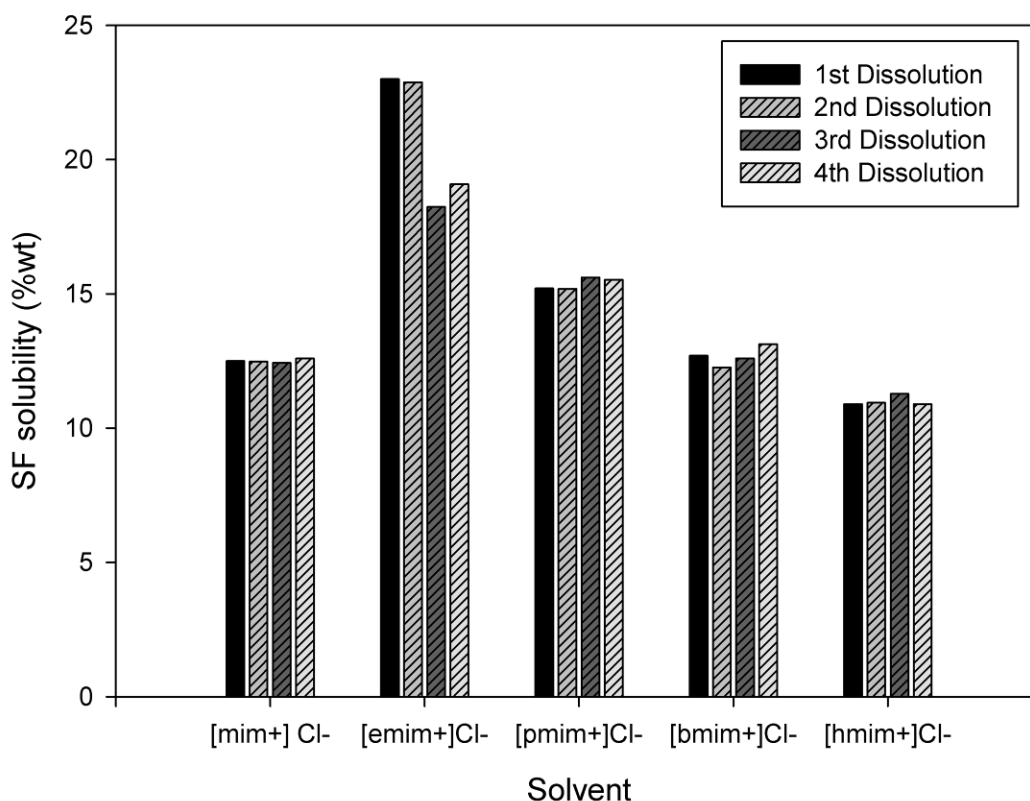


Figure 5.S3. Solubility (% wt) of SF in recycled ILS using high-power ultrasonication in four consecutive processes.

After first recycling process, ionic liquids need longer ultrasounds treatments (~5% longer than the commercial ILs) to dissolve the same amount of protein due the higher water content. Used ILs are very hydrophilic - retain water after the recovery process - but the small amount of water present in ILs after recycling - in the range of 218-512 ppm - has no effect upon the disruption of hydrogen bond network in the SF. The water content of the ILs after recycling phase was measured with a Metrohm 831 KF coulometric Karl Fischer apparatus. For that an exactly weighed sample was titrated using HYDRANAL-Coulomat AG (Sigma-Aldrich Chemicals Co., Madrid, Spain) as the Karl Fischer reagent.

5.6.3. Identification of silk proteins using SDS-PAGE-HPLC/MS

Peptide distribution in the polyacrylamide gel shows discrete bands that were identified in HPLC/MS analysis after Trypsin digestion.

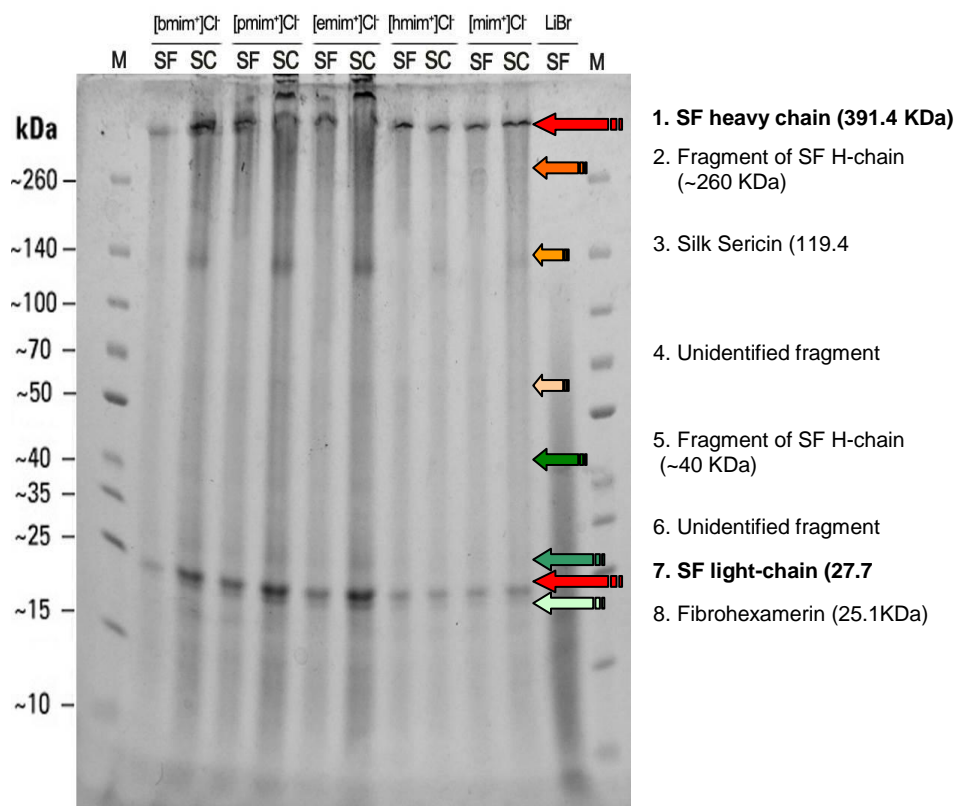


Figure 5.S4. Selected gel bands used for HPLC/MS analysis and their identification.

Selected gel bands were cut and digested with Trypsin Gold (Promega), according to the manufacturer's protocol for mass spectrometry analysis using Proteome Discoverer Ver. 1.3 software and searching in SwissProt Data Bank (2013). Searching tolerance was set to ± 1.5 Da for precursors and ± 0.8 Da for fragments. A filter for FDR $p < 0.01$ was established and at least two unique peptides per protein. Table 5.S1 includes the obtained data for the analysed gel bands.

5. Production of silk fibroin nanoparticles using ILs and high-power ultrasounds

Table 5.S1

Detailed data obtained in the HPLC/MS analysis of the gel bands.

<i>Band number</i>	<i>Accession number</i>	<i>Description</i>	<i>Score</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Unique Peptides</i>	<i>MW (Da)</i>
1	P05790	Fibroin heavy chain precursor - <i>Bombyx mori</i> (silk moth) [FIBH-BOMMO]	1033.32	0.65%	2	391367
2	P05790	Fibroin heavy chain precursor - <i>Bombyx mori</i> (silk moth) [FIBH-BOMMO]	582.29	1.27%	4	391367
3	P07856	Sericin 1 precursor - <i>Bombyx mori</i> (silk moth) [SERI1-BOMMO]	16.04	3.79%	4	119417
4	-	-	-	-	-	-
5	P05790	Fibroin heavy chain precursor - <i>Bombyx mori</i> (silk moth) [FIBH-BOMMO]	8.38	0.65%	2	391367
6	-	-	-	-	-	-
7	P21828	Fibroin light chain precursor - <i>Bombyx mori</i> (silk moth) [FIBL-BOMMO]	674.99	27.86%	6	27652
8	P04148	Fibrohexamerin precursor <i>Bombyx mori</i> (silk moth) [SI25-BOMMO]	39.07	4.55%	2	25151

A comparative SDS-PAGE analysis of SF dissolved by application of conventional solvent systems (Ajisawa's, CaCl₂ 50% (w/w) and LiBr 9.3M), IL + oil bath heating (90°C) and IL + ultrasonication has been done. Next figure shows the lower degree of chain fragmentation of silk peptides when shorter times of treatments are applied. Lanes 5 and 8 show highly conserved fragments, which correspond with the ILs + ultrasonication treatment. Although the treatment with IL+ oil bath heating (lanes 4 and 7) show clearer bands of conserved fragments than traditional solvent systems (lanes 1-3) are much more diffuse than the bands showed in the shorter ultrasonication treatment.

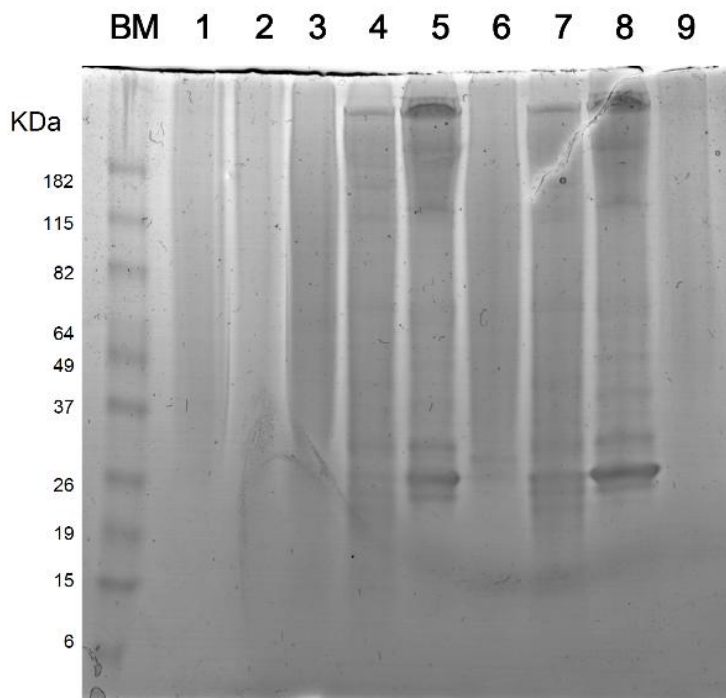


Figure 5.S5. SDS-PAGE analysis of the protein components of dissolved silk fibroin (SF) and white silk cocoons (WC). Lane BM: Spectra Multicolor Protein Ladder 10-260 KDa (Thermo); Lane 1: SF dissolved in Ajisawa’s solvent system; Lane 2: SF dissolved in CaCl₂ 50% (w/w) solvent system; Lane 3: SF dissolved in LiBr 9.3M solvent system; Lane 4: SF dissolved in the ionic liquid [bmim⁺][Cl⁻] in oil bath at 90°C, 4h; Lane 5: SF dissolved in the ionic liquid [bmim⁺][Cl⁻] applying ultrasonication, <100°C, 5’; Lane 6: WC dissolved in Ajisawa’s solvent system; ; Lane 7: WC dissolved in the ionic liquid [bmim⁺][Cl⁻] in oil bath at 90°C, 4h; Lane 8: WC dissolved in the ionic liquid [bmim⁺][Cl⁻] applying ultrasonication, <100°C, 24’; Lane 9: Same as Lane 1. (4-20% gradient Gel Amersham GE-HC).

5.6.4. Rheology of silk ionic liquids solutions

Shear viscosity of SIL solutions was measured on a BOHLIN Visco 88 Rotational Viscometer (Malvern Instruments, UK). The viscosity of the SIL solutions showed a strong dependence on temperature and composition. A solution of 10 %wt SF in [bmim⁺][Cl⁻] showed a viscosity of 53.9 Pa·s at 30 °C but only 3.2 Pa·s at 60 °C. Further addition of water to the mixture decreased the viscosity below 0.5 Pa·s, allowing the efficient dispersion of silk nanoparticles in the precipitating agent at room temperature (see next paragraph).

Table 5.S2

Dependence of viscosity of SIL solutions on the composition and temperature of samples.

%wt SF	Viscosity (Pa·s)						
	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C	60 °C
0	2.198	1.437	0.939	0.614	0.401	0.262	0.171
1	1.388	0.885	0.564	0.360	0.229	0.146	0.093
3	11.174	5.981	3.202	1.714	0.917	0.491	0.263
7	38.879	22.999	13.605	8.048	4.761	2.816	1.666
10	91.663	62.759	40.041	23.511	13.167	11.041	9.011

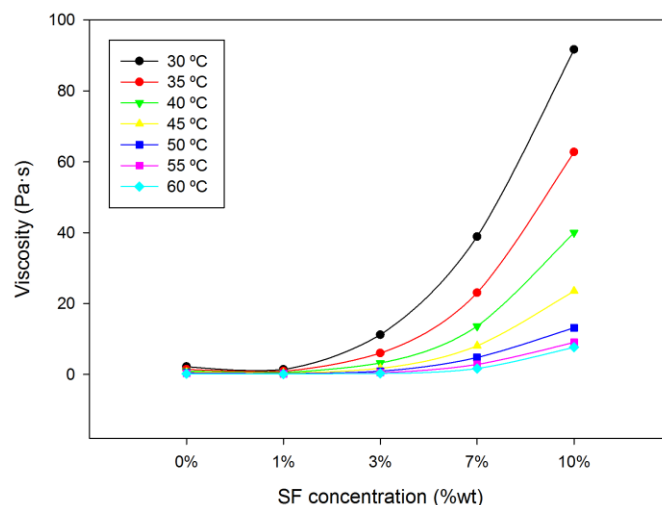


Figure 5.S6. Representation of the effect of the composition (% wt SF) and temperature (°C) on the viscosity of SIL solutions.

Binary mixtures of 10% SF in [bmim+][Cl⁻] showed a refraction index of 1.5 and a density values that varied slightly around 1.08 g/cm³.

5.6.5. Effect of viscosity of SIL in the size of silk particles

Rheological measurements revealed that viscosity of SIL solution plays a crucial role in the ability to form SFNs. Measurements of the viscosity of SIL solutions with different amount of added water and the visualization of macroscopic effect in the formed particles leads to the affirmation that viscosity limit to form SFNs is about 0.5 Pa·s.

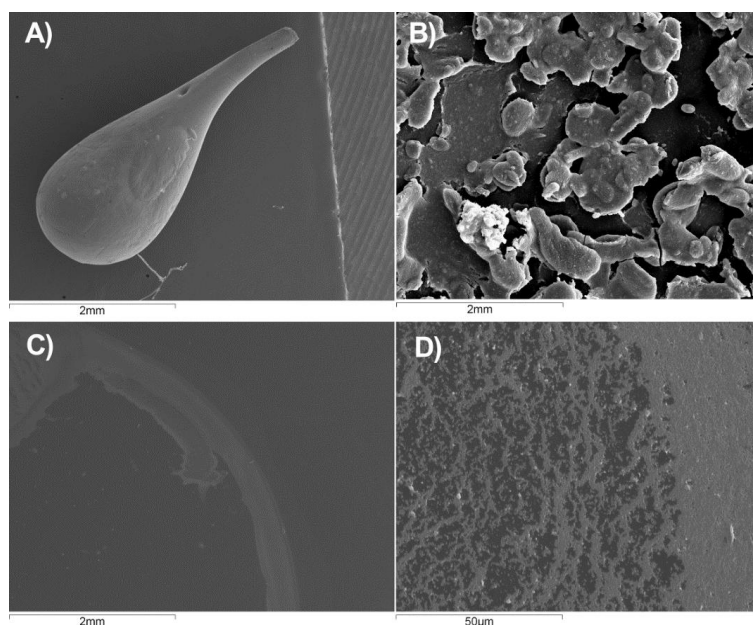


Figure 5.S7. SEM images of particles obtained from SIL solutions with different content of added water. A) View of a single silk bead formed from SIL solution without added water. B) View of amorphous silk particles obtained from SIL solution with 8% wt of added water. C) View of SFNs formed from SIL solution with 15.3% of added water. D) Enlarged area of C. (A-C images were acquired with Magnification 25x and D with 1000x).

5. Production of silk fibroin nanoparticles using ILs and high-power ultrasounds

Detailed data of viscosities of SIL solutions after the addition of water are listed in the next table. Viscosity decreases with the heating of the solution and with the water addition.

Table 5.S3

Effect of water content on the viscosity (Pa·s) of SIL solutions.

T (°C)	Water content (%wt)						
	0%	8.3%	15.3%	21.4%	26.6%	31.3%	35.3%
30	91.6630	2.3058	0.4370	0.1631	0.0978	0.0633	0.0377
35	62.7590	1.4697	0.3121	0.1212	0.0793	0.0518	0.0313
40	40.0410	0.9833	0.2250	0.0914	0.0632	0.0429	0.0268
45	23.5110	0.6401	0.1654	0.0684	0.0527	0.0369	0.0232

6

Conclusions

6. CONCLUSIONS

This doctoral thesis is focused on the physico-chemical characterization of ionic liquids (density and refractive index), on the study of two parameters related to their toxicity (octanol-water partition coefficient and *Vibrio fischeri* toxicity) and on the synthesis and characterization of silk fibroin nanoparticles from ionic liquid-silk fibroin solutions.

In **Chapter 1** we have determined the density and refractive index of some imidazolium-based ionic liquids and checked the effect of temperature, the anion nature and the alkyl chain length on the behavior of the studied properties. We have found a procedure to explain the behavior of the density of the ionic liquids studied based on the molecular volume that makes possible to predict, prior to synthesis, the density and molecular volumes for an ionic liquid with an alkyl imidazolium cation and with different anions and combinations of ions of similar chemical structure in a wide range of temperatures from easily accessible theoretical calculations of the structure of the proposed ions. Our results support the idea that ionic liquids can be designed with adjustable properties based on the structure of the cation and anion constituent. The data obtained may provide valuable contributions for the design and study of present and future ionic liquids.

The major contribution found in **Chapter 2** is that the ionic liquids studied are fairly hydrophilic and, for this reason, their octanol-water partition coefficients are lower than in commonly used industrial solvents and they will not accumulate or concentrate in the biota.

Chapter 3 reveals that pyridinium-based ionic liquids show higher *Vibrio fischeri* toxicity than imidazolium-based ionic liquids being ethylammonium nitrate one of the most environmentally friendly of all the ionic liquids studied. *Vibrio fischeri* toxicity increases as the length of the alkyl substituent of the cation increases having the nature of the anion much less influence on the EC_{50} of the ionic liquids, especially when the alkyl chain length of the cation increases. On the other hand, because the EC_{50} values are of the same order than volatile organic compounds, we can conclude that the aquatic toxicity of these ionic liquids are quite similar to that of industrial volatile organic compounds and will not be accumulated in the environment.

Results in **Chapter 4** confirm the trend also found in Chapter 3 that the toxicity of ionic liquids increases as a function of alkyl chain length of the substituent of the cation and is mainly related to the cation and not to the nature of the anion. Apart from that, it was also established that the EC_{50} of dicationic ionic liquids is lower than that observed for the homologous monocationics. The hydrophobicity of ionic liquids, reported as K_{ow} , was estimated using three approaches and the $\text{Log}(1/EC_{50})$ was seen to be related with $\text{Log } K_{ow}$. For the ionic liquids studied, it was observed that the aquatic toxicity of these ionic liquids is also quite similar to that of industrial volatile organic compounds, particularly, dicationic ones. This means that dicationic ionic liquids can be designed for practical and environmentally friendly industrial applications.

Finally, it was developed in **Chapter 5** a new methodology which involves the application of high-power ultrasounds to a mixture of ionic liquid and silk fibroin, to enhance the dissolution of the protein. Then, silk fibroin nanoparticles can be easily obtained from the mixture using a simple desolvation method with polar organic

6. Conclusions

solvents. The regenerated silk fibroin micro- or nanoparticles obtained show a degree of β -sheet similar to that of the silk fibroin threads and are almost identical to the silk nanoparticles previously described in the literature. After desolvation, the ionic liquids can be efficiently recovered under reduced pressure and reused without losing their solvent property, which considerably enhances the overall efficiency of the process. In this way, large amounts of silk can be turned into biomaterials directly from the dissolved silk-ionic liquid solution, for use in a wide range of applications.

