

JOSÉ LUIS IBORRA PASTOR

**LA ESPERANZA VERDE
DE LA QUÍMICA**

LECCIÓN INAUGURAL
DEL CURSO ACADÉMICO 2007-2008

UNIVERSIDAD DE MURCIA

2007

**LA ESPERANZA VERDE
DE LA QUÍMICA**

JOSÉ LUIS IBORRA PASTOR
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular “B” e Inmunología

**LA ESPERANZA VERDE
DE LA QUÍMICA**

**LECCIÓN INAUGURAL
DEL CURSO ACADÉMICO 2007-2008**

UNIVERSIDAD DE MURCIA

2007

© José Luis Iborra Pastor
Universidad de Murcia
Servicio de Publicaciones, 2007

Depósito Legal: MU - 1700 - 2007

Imprime: Servicio de Publicaciones. Universidad de Murcia

SUMARIO

Presentación	9
La esperanza verde de la Química	11
¿Qué es la Química Verde?	12
¿Qué es la economía atómica?	13
Las enzimas son catalizadores verdes	15
Los solventes neotéricos	18
¿Qué es un fluido supercrítico?	20
¿Qué es un líquido iónico?	23
¿Cómo diseñar y realizar reacciones enzimáticas en líquidos iónicos?	25
Procesos continuos integrales de síntesis química verde con enzimas	32
Conclusiones	38
Bibliografía	41

Excmo. Sr. Presidente de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia,
Sr. Rector Magnífico de nuestra Universidad,
Excmos. e Ilmos. Señores,
Queridos amigos y compañeros de la Comunidad Universitaria,
Señoras y Señores:

Para mí es un gran honor y compromiso el ocupar hoy este lugar para leer la lección inaugural del Curso Académico 2007-2008, que me corresponde como Catedrático Numerario de mayor antigüedad de la Facultad de Química, siguiendo el turno riguroso que establece la normativa de la Universidad.

Antes de comenzar deseo expresar mis excusas hacia la parte de esta distinguida audiencia que hoy ha querido estar presente en este acto, y que dedicados a actividades lejanas a las Ciencias y más aún a la Bioquímica y la Biología Molecular, han de hacer acopio de paciencia para escuchar a un profesor tratar sobre un tema especializado. Pero, por otra parte, creo que la dignidad de este auditorio me obliga a realizar un esfuerzo científico y pedagógico, a intentar exponerles el tema objeto de esta Lección Inaugural con claridad y brevedad.

La elección de este tema surge al tomar en consideración algunos de los aspectos relacionados con una de las líneas de investigación que el grupo de "Biotecnología" de nuestro Departamento de Bioquímica y Biología Molecular "B" e Inmunología de la Universidad de Murcia viene desarrollando en la actualidad. Esta línea de investigación trata sobre la aplicación de las enzimas como catalizadores y de los nuevos solventes, como medios de reacción en los procesos de síntesis química, que abren unos horizontes esperanzadores hacia una "Química Verde", de diseño, manufactura y uso de sustancias químicas y procesos que reduzcan o eliminen el

uso o la regeneración de residuos y productos nocivos para el medio ambiente o la salud humana.

También quiero expresar mis agradecimientos a todos mis compañeros profesores del Departamento, y en especial al grupo de colaboradores de la Facultad de Química, que con su dedicación, honestidad y seriedad, así como con su amistad, lealtad, constancia, sacrificio y profundo sentido universitario, han contribuido a incrementar mi saber docente e investigador. Termino esta introducción para expresar mi gratitud y mi servicio a esta Universidad, y a todos sus miembros, por formar parte de ella, y enriquecerme con el prestigio y conocimientos de sus componentes.

Por ello, trataré de ser claro y breve.

LA ESPERANZA VERDE DE LA QUÍMICA

El 17 de abril de 2002, la revista *Nature*, en su sección *Science Update*, publicó una noticia titulada: *"Enzymes find pastures greener. Chemists put biological catalysts to work in clean industrial solvents"*. En ella se comentaba un trabajo de nuestro grupo de investigación, que se publicó en el mismo año en la revista *Chemical Communications*, y en la que, con el objetivo de desarrollar procesos químicos más limpios, se demuestra, por primera vez, cómo utilizar las enzimas como catalizadores mediante dos solventes "verdes": uno para disolver la enzima, el otro para disolver los materiales que la enzima transforma. En palabras del comentarista científico, "esta es una forma ideal de química verde, ya que se utilizan catalizadores naturales en solventes limpios".

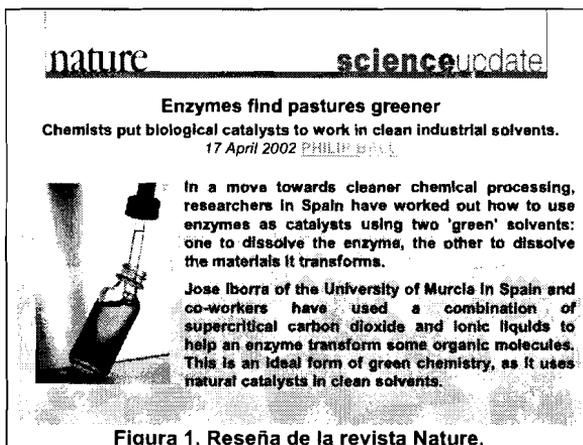


Figura 1. Reseña de la revista *Nature*.

El mismo trabajo ha sido considerado por especialistas como una idea interesante y fue resaltada en un artículo "highlight" en la revista *Angewandte Chemie, International Edition* del año 2003. Todo ello, me conduce a explicar qué relación existe entre la Bioquímica y la Química Verde, a través de la participación de las enzimas en procesos químicos de síntesis industrial.

¿Qué es la Química Verde?

Está ampliamente reconocido que en la actualidad hay una creciente necesidad de desarrollar procesos químicos industriales que sean aceptables medioambientalmente. Esta tendencia hacia lo que se viene conociendo como "Química Verde" o "Tecnología Sostenible" necesita de un cambio paradigmático, que va desde los conceptos tradicionales de eficiencia de proceso, medidos en su mayor extensión por el rendimiento químico, a los que asignan un valor económico a la eliminación de residuos y a la no utilización de sustancias tóxicas y peligrosas.

El término Química Verde fue acuñado por Anastas, de la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU., en 1991. La Química Verde o Química beneficiosa para el medio ambiente se ocupa del diseño de productos y procesos químicos que reducen o eliminan el uso y producción de sustancias peligrosas. La Química Verde es lógica desde el punto de vista científico, es más segura que los procesos convencionales, es de menor coste y compatible con un desarrollo sostenible. Este concepto se desarrolla en los 12 principios de la Química Verde, que pueden enumerarse como:

1. La prevención de formación de residuos en lugar de remediación.
2. La economía atómica.
3. La reducción de productos químicos tóxicos/peligrosos.
4. La generación de productos eficaces pero no tóxicos.
5. La reducción del uso de solventes volátiles y de sustancias auxiliares.
6. La disminución en el consumo energético.
7. La utilización de materias primas renovables.
8. La reducción del número de etapas de los procesos de síntesis y en concreto de las reacciones de derivatización.
9. La potenciación de la catálisis lo más selectiva posible, en lugar de reactivos estequiométricos.
10. La generación de productos biodegradables.
11. El desarrollo de metodologías analíticas para la prevención de la contaminación.
12. La minimización del riesgo de accidentes químicos.

Como se deduce de estos doce principios, la Química Verde se dirige principalmente al impacto ambiental de los productos químicos y de los procesos por los que se producen. La máxima que se aplica es: "Es mejor prevenir que curar". El término alternativo de "Tecnología Sostenible", más empleado por la industria química, se define como la tecnología necesaria para *cubrir las necesidades de la generación presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para conseguir sus propias necesidades*. Se puede decir que la Sostenibilidad es el objetivo y la Química Verde es el medio para conseguirla.

De estos doce principios, tres de ellos necesitan de una atención por su relación con la temática de esta Lección Inaugural. El primero de ellos es la economía atómica, como parámetro que mide el impacto ambiental que produce la obtención de un determinado producto, un centro de producción o una compañía industrial; el segundo es la cuestión de reducir la utilización de solventes volátiles tóxicos, y el tercero, la potenciación de la catálisis selectiva.

¿Qué es la economía atómica?

El diseño de un método de síntesis química debe tener presente la incorporación en el producto final de todos los materiales usados en el proceso, de forma que se minimice la formación de subproductos. Dos de las magnitudes más empleadas para medir la aceptabilidad medioambiental potencial de los procesos químicos son el factor E y la eficacia atómica. El *factor E* se define como la relación entre la masa de residuo producido y la del producto deseado obtenido, mientras que la *eficacia atómica* se calcula dividiendo el peso molecular del producto obtenido por la suma de los pesos moleculares de todas las sustancias producidas en la ecuación estequiométrica.

El factor E es la cantidad actual de residuo producido en el proceso de fabricación a excepción del producto deseado. Tiene en cuenta el rendimiento químico e incluye los reactivos, las pérdidas de solventes, todas las reacciones secundarias y, en principio cualquier gasto de energía, aunque este es difícil de cuantificar. Existe una excepción: el agua no está incluida en el factor E. Por ejemplo, cuando se considera un residuo acuoso, solamente se contabilizan las sales inorgánicas y los compuestos orgánicos que están contenidos en el agua; el agua se excluye. Cuanto

más alto es el valor del factor E más residuo se produce y, consecuentemente, mayor es el impacto ambiental negativo. El factor E ideal es cero.

En la Tabla 1 se expresan los valores del factor E típicos en varios sectores industriales de la industria química. Como se observa en la misma, los valores más elevados corresponden a los sectores de la química fina y de obtención de los productos farmacéuticos. Esto es debido a que en este tipo de industrias la síntesis de estos compuestos se realiza en procesos multi-etapas, a la enorme cantidad de residuos generados como consecuencia de la formación de sales inorgánicas derivadas de las reacciones de neutralización y a la necesidad de obtener los productos en la más elevada pureza, lo que implica un mayor número de etapas de purificación.

Tabla 1. El Factor E.

Sector Industrial	Tonelaje de producto ^{a)}	kg residuo ^{b)} /kg producto
Refinería petróleo	$10^6 - 10^8$	<0,1
Industria Química	$10^4 - 10^6$	<1 - 5
Química Fina	$10^2 - 10^4$	5→50
Farmacéuticos	$10 - 10^3$	25→100

a) Rango de volumen de producción anual de un producto.

b) Definido para todo residuo producido, a excepción del producto deseado.

La principal causa de la formación de esas grandes cantidades de residuos inorgánicos en la manufactura de los compuestos de química fina y farmacéuticos es el uso excesivo de reactivos inorgánicos bajo la tecnología "estequiométrica". La solución a este problema es evidente: la sustitución de la metodología estequiométrica clásica por alternativas catalíticas más limpias. Las hidrogenaciones catalíticas, las oxidaciones y carbonilaciones son buenos ejemplos de procesos con una alta eficiencia atómica y baja formación de sales. Pero la biocatálisis posee aún más ventajas en el contexto de la Química Verde, pues a menudo se utiliza un menor número de etapas que en los procesos químicos convencionales, ya que no se requiere la protección y desprotección de los grupos funcionales. Consecuentemente, los procedimientos químicos clásicos están siendo reemplazados por las alternativas biocatalíticas más limpias en la industria de la química fina. Una estimación reciente de las aplicaciones de la biocatálisis en la síntesis orgánica industrial es la comercialización de más de 130 procesos.

Las enzimas son catalizadores verdes

Efectivamente, las enzimas son proteínas que, además de mostrar las propiedades que son inherentes a los catalizadores químicos, poseen otras propiedades que las hacen considerar como catalizadores verdes, pues reúnen casi los 12 principios de la Química Verde. Entre ellas cabe destacar:

a) Su gran *eficacia catalítica*, pues aumentan la velocidad de las reacciones químicas específicas hasta un factor de 10^8 - 10^{10} veces superior a la reacción no catalizada, lo que implica que se necesita una menor concentración de catalizador para llevar a cabo el proceso, de tres a cuatro órdenes de magnitud menos.

b) Su *aceptabilidad medioambiental*, ya que al ser compuestos biológicos se degradan completamente en el medio.



El verdor comienza con los Catalizadores

ENZIMAS: PROTEÍNAS CATALÍTICAS DE LAS CÉLULAS VIVIENTES

!!Eficacia catalítica excelente!!

- * Alta actividad, selectividad (Estéreo-, Quimo-).
- * Condiciones suaves (H₂O, °C, pH).
- * Elevado número de enzimas (naturales y modificadas química- y genéticamente).
- * Biodegradables.

Biocatálisis ↔ **Estructura-3D**

¿Se puedan utilizar los **BIOCATALIZADORES** en los procesos químicos?

Condiciones duras para "la vida"

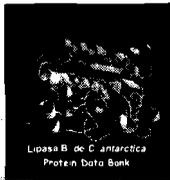


Figura 2. Las enzimas como catalizadores.

c) Su *actuación se realiza bajo condiciones suaves*, un pH típico alrededor de 7,0, y una temperatura entre 20 y 40 °C, por lo que disminuyen el consumo energético.

d) El *amplio espectro* de reacciones orgánicas que catalizan, a excepción del reordenamiento de Cope.

e) Su *especificidad de acción*, al reconocer un sustrato de forma quimo-, regio-, diastereo- y enantioselectiva, para poder realizar la transformación química selectiva del mismo.

f) Su *compatibilidad con otras enzimas*, al funcionar bajo similares condiciones, lo que permite realizar reacciones en cascada, por lo que se pueden reducir el número de etapas y las reacciones de derivatización en los procesos de síntesis.

g) Su *tolerancia* a trabajar con otros sustratos que no son los naturales y en otros medios que no son los acuosos.

Y, así, tras el descubrimiento, en los años ochenta, de la capacidad de algunas enzimas para actuar en medios orgánicos miscibles o no miscibles con agua y de "nuevas" actividades de una misma enzima, se han desarrollado procesos de química fina para la obtención de compuestos orgánicos no solubles en agua, tales como la producción de antibióticos semisintéticos, la resolución de mezclas racémicas o la síntesis de triglicéridos estructurados.

La biocatálisis en medios no acuosos

- En la década de los 80, se descubre que las enzimas son capaces de actuar en solventes orgánicos (benceno, acetona, etc).
- En estos medios las enzimas muestran "nuevas" actividades, p.ej., las **HIDROLASAS** actúan como **SINETASAS**.
- Son capaces de biotransformar "nuevos" sustratos, p.ej., penicilinas semisintéticas.
- Muestran actividades y especificidades buenas.

1) Sufren fenómenos de desactivación y desnaturalización.
 Para evitar estos fenómenos se necesita:

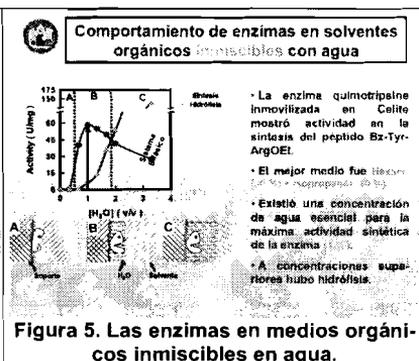
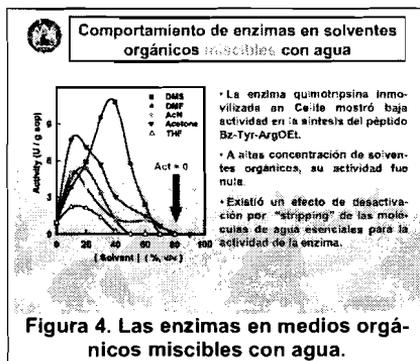
- 1) Controlar los parámetros relacionados con el agua: Log P, Aq. [H₂O].
- 2) Estabilizar las enzimas.

Figura 3. La biocatálisis en medios no acuosos.

El uso de enzimas, para lograr reacciones muy específicas en dichos medios, es ya en la actualidad de una gran utilidad en la industria farmacéutica. La mayoría de los procesos industriales se llevan a cabo en reactores bajo condiciones extremas de reacción, muy distintas de las que se dan en el ambiente natural de las enzimas. Cuando las enzimas se utilizan en solución bajo estas condiciones, se presentan una serie de dificultades a la hora de realizar y rentabilizar el proceso desde el punto de vista industrial. La primera de ellas es la presencia de factores químicos, y en especial de los solventes orgánicos. Estos solventes pueden provocar una alteración de la integridad estructural de las proteínas, que redundaría en las propiedades esenciales de

las enzimas, es decir, su actividad y estabilidad catalíticas; una pérdida de las mismas significaría un incremento de los costes de producción del proceso industrial. Las estrategias más empleadas para contrarrestar este efecto es la de intentar aumentar la *estabilidad de las enzimas*. La segunda de ellas viene derivada de que las enzimas son catalizadores naturales, cuyo proceso de obtención es normalmente costoso; su recuperación del medio de reacción es esencial para que de nuevo puedan ser utilizadas. El tener la enzima unida a una matriz sólida (*enzima inmovilizada*), insoluble en el medio de reacción, facilita que al final de la reacción pueda ser fácilmente recuperada y sometida a repetidos usos, lo que permite, además, que la solución final no contenga la proteína indicada. Muchas veces, la simple unión a la citada matriz puede también aumentar la estabilidad de la enzima.

Nuestro grupo de investigación posee desde los años 80 una gran experiencia en métodos de estabilización de enzimas por inmovilización en soportes sólidos insolubles en agua y su uso en la síntesis de compuestos de química fina. Al principio de la década de los años 90, el grupo inició el análisis de las enzimas solubles y estabilizadas por inmovilización, en medios constituidos por solventes orgánicos. Como ejemplo de ello, en las siguientes Figuras 4 y 5 se representan los comportamientos de una misma enzima, la quimotripsina inmovilizada en un soporte inorgánico, la tierra de diatomeas (Celite), y utilizada en la síntesis de un péptido, pero en presencia de solventes orgánicos tanto miscibles como inmiscibles con agua, respectivamente.



En solventes miscibles con agua, tales como dimetilsulfóxido, acetonitrilo o tetrahidrofurano, la enzima mostró baja actividad, dependiendo del solvente y de la concentración del mismo. Al aumentar su concentración, en todos ellos se produjo una pérdida total de la actividad de la enzima. Este efecto de inactivación se debe a

la eliminación de las moléculas de agua que son esenciales para que la enzima mantenga su estructura activa. En la lengua inglesa al efecto se le denomina “*water stripping*”. En el caso de los solventes inmiscibles con agua, como el hexano, la actividad de la enzima fue máxima a una concentración de agua esencial para mantener la estructura nativa de la proteína. A concentraciones superiores de agua la actividad sintética fue nula, al incrementarse paralelamente la actividad hidrolítica.

Además, la utilización de solventes orgánicos, como medios de reacción de las biotransformaciones específicas en la manufacturación de productos farmacéuticos, lleva implícitos unos riesgos de toxicidad inherente, flamabilidad, explosión, disminución de las concentraciones de ozono en la atmósfera y la estratosfera, etc.

Los solventes neotéricos

Los investigadores de la academia y la industria, teniendo en cuenta los principios de la Química Verde, han desarrollado solventes o sistemas de *solventes neotéricos* (del latín *neotericus*, y este del griego νεωτερικός, que significa nuevo, reciente, moderno), que reducen los riesgos intrínsecos que están asociados a los solventes tradicionales.

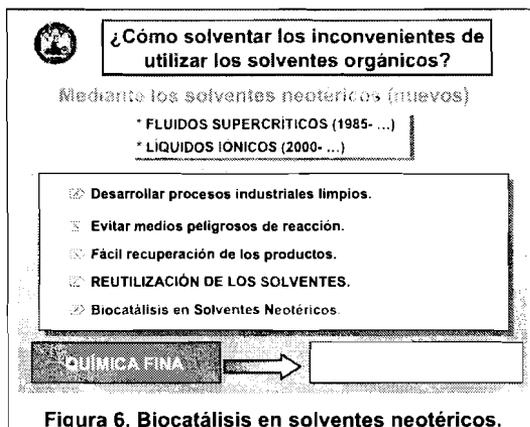
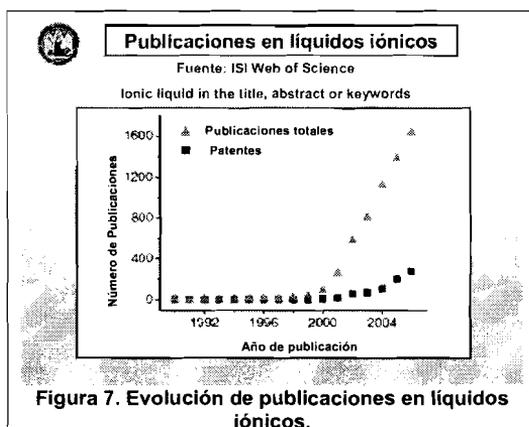


Figura 6. Biotálisis en solventes neotéricos.

¿Cuál es el interés en estos solventes neotéricos? Pues, obviamente, que constituyen una alternativa verde o sostenible a los solventes orgánicos volátiles

usualmente empleados en la industria química, y por tanto, van a permitir el desarrollo de procesos industriales limpios, sin emanaciones de solventes volátiles a la atmósfera. Como dato, es conocido que cada año en la UE se liberan a la atmósfera 10 millones de toneladas de solventes orgánicos volátiles. Además, los solventes neotéricos al no ser inflamables, permiten la realización de reacciones químicas en condiciones seguras para los operarios. Obviamente, dado que no se evaporan, van a permitir una fácil separación de los productos por operaciones simples, como destilación, pervaporación, filtración, etc. Y la parte más importante, una vez finalizado el proceso, el solvente es totalmente recuperado y reutilizado en el proceso. Además, en nuestro caso, la utilización de biocatalizadores puede permitir la incorporación de todas las ventajas de eficacia y selectividad de los catalizadores de los seres vivos a los procesos químicos industriales, por lo que se consigue desarrollar, desde el catalizador hasta el solvente, un proceso integral verde.

Entre dichos solventes cabe destacar, en primer lugar, los *fluidos supercríticos*, cuya aplicación en procesos enzimáticos se inició a principios de los noventa, aunque su empleo en procesos de extracción como el de la cafeína del café o la nicotina del tabaco, se viene realizando desde los años setenta. Los otros solventes neotéricos son los *líquidos iónicos*. El interés en estos compuestos se puede deducir de la revisión, en la ISI Web of Science, del número de publicaciones que contienen el término "ionic liquid" en el título, resumen o palabras clave, desde el año 1990. La evolución en el tiempo indica un crecimiento exponencial de las mismas, a partir del año 2.000, que es cuando se publica el primer artículo de utilización de los líquidos iónicos como medios de reacción en las biotransformaciones enzimáticas.

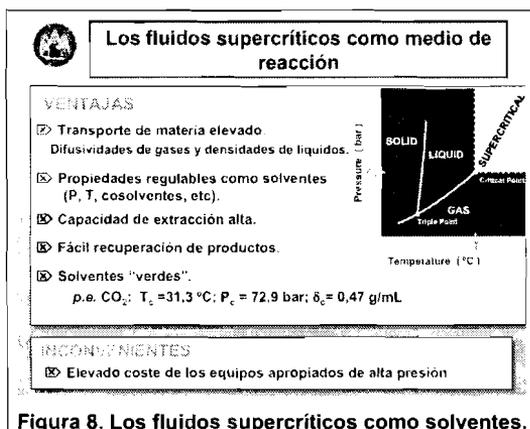


¿Qué es un fluido supercrítico?

El concepto de *fluido supercrítico* hace referencia a un estado de la materia en el cual el compuesto se comporta como un fluido, no es gas, ni es líquido, sino ambas cosas a la vez, pues muestra propiedades de ser al mismo tiempo un gas y un líquido. En un diagrama de fases de un compuesto se representan las condiciones de presión y de temperatura por las cuales el compuesto está en cada uno de los tres estados, sólido, líquido y gaseoso. Todos los materiales tienen *puntos críticos* que determinan su comportamiento de fases. Si el punto crítico representa aquel valor de presión y temperatura en el cual no existe una clara diferenciación entre los estados líquido y gaseoso, las condiciones supercríticas hacen referencia a condiciones de presión y temperatura superiores al punto crítico, en las que tienen existencia los fluidos supercríticos.

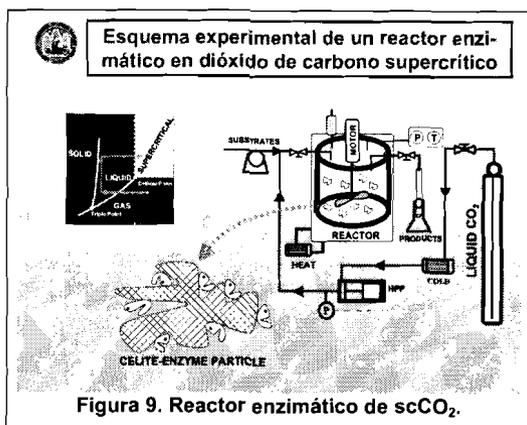
En estas condiciones, los fluidos presentan unas propiedades muy interesantes para su aplicación en procesos de reacción y extracción, entre las que cabe destacar:

- Permiten unas elevadas velocidades de transferencia de masa, puesto que difunden como los gases y poseen unos valores de densidad correspondientes a los líquidos.
- Sus capacidades como solventes son modulables, es decir, se puede modificar su carácter polar o apolar, en función de las condiciones de presión y temperatura a las que se sometan, propiedad que también varía con la adición de otros posibles solventes (cosolventes) al fluido, para ayudar a solubilizar un determinado compuesto.



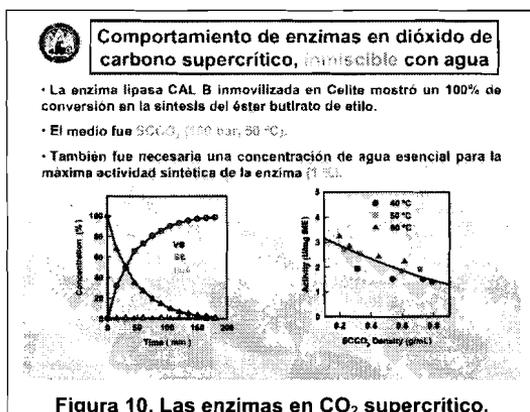
- c) Como consecuencia de las dos propiedades anteriores, los fluidos supercríticos adquieren una alta capacidad extractiva, por lo que sus principales aplicaciones van desde la extracción de principios activos de materiales naturales a los procesos de oxidación de aguas residuales industriales.
- d) Gran facilidad para la recuperación de los productos extraídos, ya que, con solo cambiar la presión, el fluido pierde su condición supercrítica y precipitan los productos disueltos en el mismo.
- e) Los fluidos son totalmente reutilizables con la simple presurización del sistema para volver a las condiciones supercríticas.
- f) Se puede seleccionar un determinado fluido que sea inocuo frente al deterioro medioambiental y utilizable con los biocatalizadores, como es el caso del dióxido de carbono.
- g) Sin embargo, el inconveniente del uso de los fluidos en condiciones supercríticas es el elevado coste de los equipos, ya que se necesitan instalaciones adecuadas de alta presión, con sistemas de control que garanticen las condiciones de seguridad exigidas.

La experiencia conseguida en los laboratorios de la Universidad ha conducido al diseño de varios tipos de reactores, que se consideran los más adecuados para los fines que se persiguen. En la Figura 9 se representa un *reactor de tanque agitado* para su uso con fluidos supercríticos, que opera con partículas de enzima inmovilizada, por ejemplo, enzima adsorbida sobre tierra de diatomeas.



Para el funcionamiento del mismo, es necesario llenar el reactor mediante una bomba de alta presión, con dióxido de carbono líquido enfriado previamente. A continuación, el reactor se presuriza y se termostata a las condiciones establecidas para situar el fluido en la condición supercrítica determinada, de acuerdo con el diagrama de fases correspondiente. Una vez alcanzadas las condiciones, seguidamente se introducen los sustratos con una segunda bomba de alta presión, con lo que se inicia la reacción. Una vez terminada la misma, el reactor se despresuriza y los productos de la reacción se recogen, mediante un restrictor termostaticado, sobre un solvente adecuado. El fluido supercrítico pasa a fase gaseosa, que o bien se recicla, o se expulsa a la atmósfera.

¿Qué comportamiento poseen las enzimas en el dióxido de carbono supercrítico? Pues la enzima lipasa inmovilizada en la tierra de diatomeas es capaz de catalizar la síntesis del aroma butirato de etilo con un 100% de conversión, en unas condiciones de 100 bares de presión, y a 50°C de temperatura. Su actividad es dependiente de la densidad del scCO₂, que es función de la presión y temperatura a las que se sitúe el fluido, pero también de una concentración de agua esencial para que mostrara la máxima actividad sintética. Es decir, el dióxido de carbono, de acuerdo con su estructura, se comporta con las enzimas al igual que un solvente orgánico que sea inmiscible con agua.



¿Qué es un líquido iónico?

Los líquidos iónicos son sustancias líquidas formadas exclusivamente por iones. El ejemplo más común es la sal, cloruro sódico, que a temperatura ambiente es sólida, pero si se calienta por encima de su punto de fusión, 800°C, se funde y se convierte en un líquido que sigue teniendo su carácter iónico. Sin embargo, cuando se disuelve un cristal de sal en agua se obtiene una solución iónica, es decir, iones que se rodean por un número determinado de moléculas de agua.

Los líquidos iónicos como medio de reacción

Son líquidos formados completamente por iones

- ✓ NO son VOLÁTILES, ni inflamables. Alta estabilidad térmica.
- ✓ Amplio rango de temperatura en fase líquida.
- ✓ Buenos solventes.
- ✓ Propiedad como solvente regulable.
- ✓ Carga eléctrica deslocalizada.

[Biomim]		
[PE]		
Ethan		

- Polaridad.
- Viscosidad.
- Densidad.
- Miscibilidad con H₂O

✓ Excelente medio no acuoso para las biotransformaciones.

Figura 11. Los líquidos iónicos como solventes.

Los líquidos iónicos son sales que permanecen en estado líquido en un amplio rango de temperaturas, incluida la temperatura ambiente. Esto es debido a su gran tamaño y a la flexibilidad conformacional de los iones, que conducen a pequeñas variaciones de entalpías cristalinas y grandes variaciones de entropía que favorecen el estado líquido.

Obviamente, estos líquidos iónicos están constituidos por un catión y un anión, por lo que las combinaciones posibles son muy elevadas. Una estimación realizada nos habla de una cifra de un trillón de posibilidades. Las propiedades físicas y químicas que posean estos líquidos son función de la naturaleza del tipo del catión y del anión, lo cual permite seleccionarlos de acuerdo con las aplicaciones.

¿Y cuáles son estas propiedades que los hacen interesantes para su aplicación industrial? Pues en primer lugar, poseen una alta conductividad iónica y una amplia ventana electroquímica, propiedades que son lógicamente consecuencia de su natu-

raleza iónica, lo que hace que se empleen en baterías de última generación. Pero además poseen una tensión de vapor prácticamente nula, es decir, no se evaporan y no son inflamables, se mantienen en estado líquido en un amplio rango de temperatura, con una alta estabilidad térmica, que en muchos casos supera los 300 °C. Por encima de esta temperatura suelen descomponerse. Estas propiedades los han convertido especialmente útiles para su empleo como líquidos refrigerantes en motores de alta precisión de la industria militar y aeroespacial. Sin embargo, la propiedad más relevante es la de poseer un alto poder disolvente con distintas materias orgánicas e inorgánicas, dentro de un amplio espectro de sustancias, desde carbón hasta plásticos, muchos metales e incluso, rocas.

Entre todas las propiedades físicas y químicas de los líquidos iónicos, probablemente tanto su polaridad como su relación con el agua sean las más importantes para las aplicaciones biotecnológicas de estos solventes neotéricos.

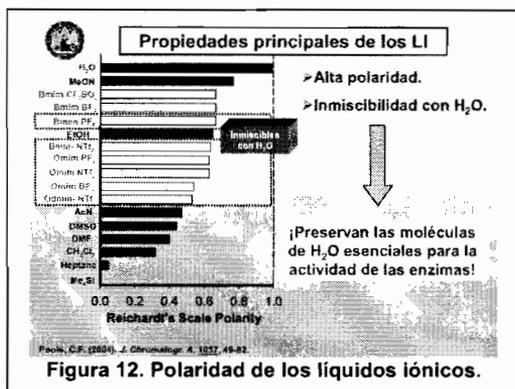


Figura 12. Polaridad de los líquidos iónicos.

Recordemos que el agua es el disolvente donde ocurre la vida, y la presencia de un número mínimo de moléculas de agua en el entorno proteico es necesaria para su actividad. Según la escala de polaridad de Reichardt, que otorga el valor 1 al agua como compuesto más polar, y 0 al tetrametilsilano como compuesto más apolar, los líquidos iónicos ocupan en la citada escala valores correspondientes a compuestos polares, con polaridad intermedia entre el etanol y el acetonitrilo, dos disolventes clásicos utilizados en Química y que son miscibles con el agua. Sin embargo, es de destacar que muchos de estos líquidos iónicos no son miscibles con agua. Son enormemente higroscópicos, tienen una tendencia a hidratarse hasta alcanzar un contenido en agua del 2-3 %, pero no se disuelven en el agua. Este hecho es de

enorme importancia para la verificación de las reacciones enzimáticas, ya que los líquidos iónicos son capaces de preservar la esfera de hidratación de las proteínas, sin desproverlas de las moléculas de agua esenciales para el mantenimiento de su estructura tridimensional, y por tanto, de su actividad catalítica.

Las altas polaridades e inmiscibilidades en agua de los líquidos iónicos son las propiedades que han conducido a un gran número de publicaciones en los últimos ocho años, en las que se han desarrollado procesos de biotransformaciones enzimáticas en líquidos iónicos.

Utilización de enzimas en líquidos iónicos		
Enzima (SE or IME)	Líquido iónico	Reacción
Protetas	[bmim][PF ₆]	Síntesis de Z-aspartame
Termolimina	[omim][PF ₆]	Síntesis de ésteres de aminoácidos
α -Quinolimpasina	[emim][NTf ₂]	Resolución de ésteres de aminoácidos
Alcalasa	[bmim][NTf ₂]	Síntesis de ésteres alifáticos
Lipases	[bmim][NTf ₂]	Resolución de 1-hexilhexanol
C. antarctica	[C ₂ mea][NTf ₂]	Activación de alcoholes alifáticos
M. Mielhei	[C ₂ mea][NTf ₂]	Síntesis de políester
P. cepacia	[emim][BF ₄]	Resolución de rac-2-pentanol
C. rugosa	[emim][BF ₄]	Resolución de rac-tetrahidroquinona
Otros	[bmim][BF ₄]	Síntesis de piridato de ascorbato
Other enzymes	[omim][BF ₄]	Esterificación de 8-hidroxinoleno
Peroxidasas	[apy][CF ₃ CO ₂]	Oxidación de 5-hidroxifenol
Lacasa C	[apy][CF ₃ CO ₂]	Oxidación de Guayacil
Citocromo C oxidasa	[emim][BF ₄]	Actividad redox Fe(II)/Fe(III)
Alcohol Dehidasa	[mimim][MeSO ₂]	Reducción de 2-octanone
Morfina Difasa	[bmim][OxSO ₂]	Síntesis de codeína
β -Galactosidasa	Otros	Síntesis de N-acetilgalactosamina
Epóxido hidrolasa		Hidrólisis de óxido de β -maltotetraose
Mandelato racemasa		Resolución del ácido rac-mandélico
Penicilina acilasa		

Figura 13. Reacciones enzimáticas en líquidos iónicos.

Y a modo de ejemplos, en la Figura 13 se presentan una serie de aplicaciones de las diversas clases de enzimas, tales como hidrolasas, oxido-reductasas, racemasas, etc, en una gran variedad de líquidos iónicos, solubles e insolubles en agua, para la obtención de una diversidad de compuestos de interés industrial, tales como aminoácidos, antibióticos, péptidos, polímeros, etc.

¿Cómo diseñar y realizar reacciones enzimáticas en líquidos iónicos?

Desde el comienzo de las investigaciones de nuestro grupo de investigación en este siglo, el objetivo planteado ha sido el diseño de nuevos procesos biocatalíticos que reúnan las condiciones que establecen los principios de la Química Verde, es decir, la utilización de enzimas en líquidos iónicos en procesos continuos de síntesis

siglo XIX, la vida es quiral, es decir asimétrica. En este sentido, las enzimas también han sido capaces de resolver mezclas racémicas de alcoholes secundarios quirales, es decir, reconocer específicamente a uno de los dos compuestos idénticos que constituyen la mezcla racémica, y que solo se diferencian en su capacidad para desviar la luz polarizada en un sentido o en otro. Así, se ha realizado la resolución cinética de 2-pentanol, 1-fenil etanol y glicidol. Además, en el caso del 1-feniletanol, se ha realizado un proceso quimio-enzimático capaz de resolver la mezcla racémica, pero obteniendo unos rendimientos en producto superiores al 50%.

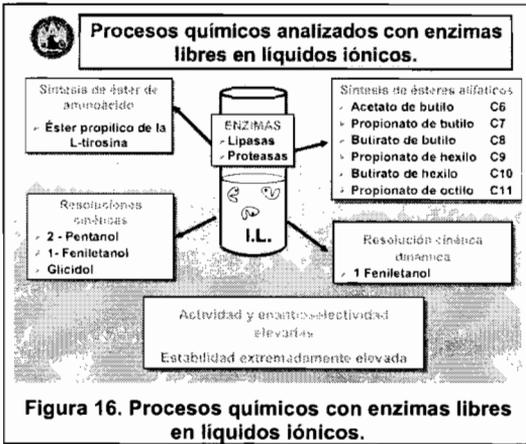


Figura 16. Procesos químicos con enzimas libres en líquidos iónicos.

En la verificación de estos procesos, las enzimas han mostrado un alto nivel de actividad y enantioselectividad, pero lo más sorprendente ha sido la excelente estabilidad de las enzimas, en un medio no convencional como son los líquidos iónicos.



Figura 17. Actividad enzimática en líquidos iónicos funcionalizados.

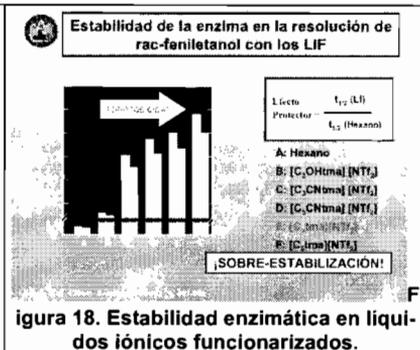
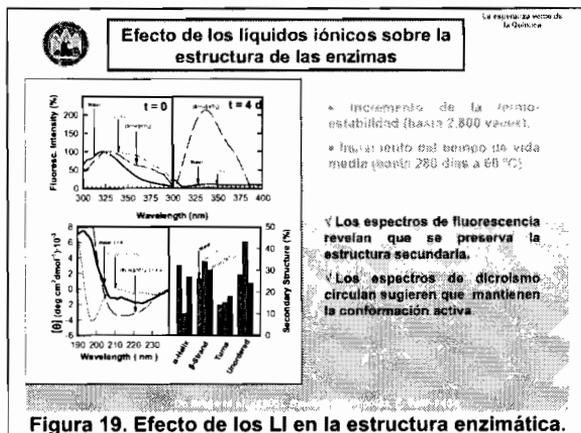


Figura 18. Estabilidad enzimática en líquidos iónicos funcionalizados.

Y, así, las enzimas en líquidos iónicos muestran un incremento de termoestabilidad hasta 2.800 veces mayor respecto a la que tienen en los solventes orgánicos normalmente utilizados, lo que supone, además, que su tiempo de vida media operacional se incrementa considerablemente, llegando a alcanzarse, en algunos casos, los 280 días a 60 °C de temperatura.



Los estudios espectroscópicos realizados para conocer si los líquidos iónicos afectan a la estructura de las enzimas revelaron que los líquidos iónicos preservaban la conformación tridimensional de la estructura nativa de la enzima, frente a la alteración estructural que se observa cuando las enzimas están en presencia de un solvente orgánico tal como el hexano. Por tanto, los líquidos iónicos mantienen estable la conformación activa de las enzimas.

Pero, ¿todos los líquidos iónicos son adecuados para realizar biotransformaciones enzimáticas?. Obviamente la respuesta es no. Y las razones hay que encontrarlas en esa estrecha relación que mantienen con el agua, la cual a su vez, es necesaria para las enzimas. Así, se ha podido observar que los líquidos iónicos miscibles con agua han resultado ser medios inadecuados de reacción para los procesos enzimáticos, tanto con enzimas liofilizadas, disueltas en agua o inmovilizadas, dado que eliminan las moléculas de agua esenciales para las enzimas, provocando su desactivación por el fenómeno ya mencionado como "water stripping".

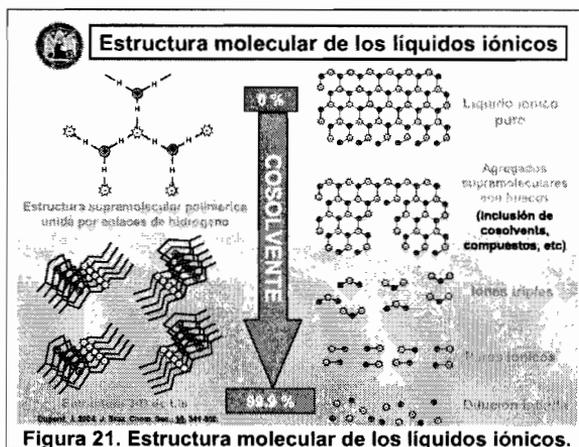
 Nivel de actividad de enzimas en líquidos iónicos según su solubilidad en agua			
ENZIMA	LÍQUIDOS IÓNICOS [H ₂ O] < 3 % v/v		SOLUCIONES IÓNICAS [H ₂ O] > 3 % v/v
	INMISCIBLE EN H ₂ O	MISCIBLE EN H ₂ O	DISUELTA EN AGUA
LIOFILIZADA 	++	-	+
SOLUCIÓN ACUOSA 	+++	+	+
INMOVILIZADA 	+++	-	+

Figura 20. Nivel de actividad de enzimas en líquidos iónicos.

Sin embargo, los líquidos iónicos inmiscibles con agua resultan ser excelentes medios de reacción para las enzimas. Las líquidos iónicos miscibles con agua y utilizados disueltos en agua a elevada concentración, no son líquidos iónicos, son soluciones iónicas, y no son objeto de nuestro interés.

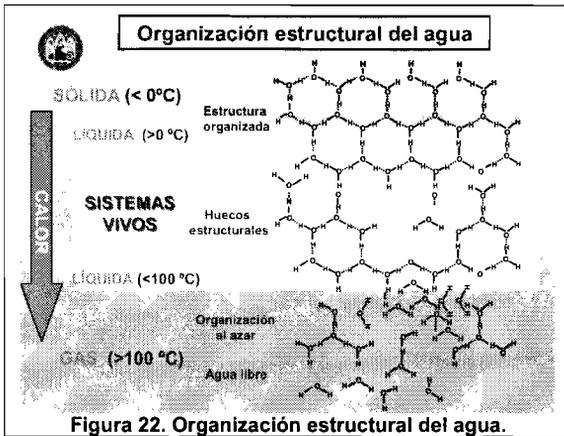
Entonces, si el medio natural de actuación de las enzimas es el acuoso, y los líquidos iónicos inmiscibles en agua son el medio en el que las enzimas muestran una mayor actividad y estabilidad, ¿cómo explicar este contrasentido?. Se puede establecer una respuesta hipotética si se tienen en cuenta las estructuras plausibles de los líquidos iónicos, la del agua y las interacciones de ambos con las enzimas.

¿Cuál es la estructura molecular de los líquidos iónicos? El Profesor Jairton Dupont de la Universidad de Porto Alegre de Brasil ha sido el primer investigador en describir un modelo estructural de los líquidos iónicos. La hipótesis establecida por el citado investigador consiste en aceptar que un líquido iónico puro es una matriz líquida supramolecular polimérica, mantenida por enlaces por puente de hidrógeno entre los cationes y los aniones organizados en el espacio en una red dinámica tridimensional. En esencia, los líquidos iónicos no se organizan como los solventes moleculares.

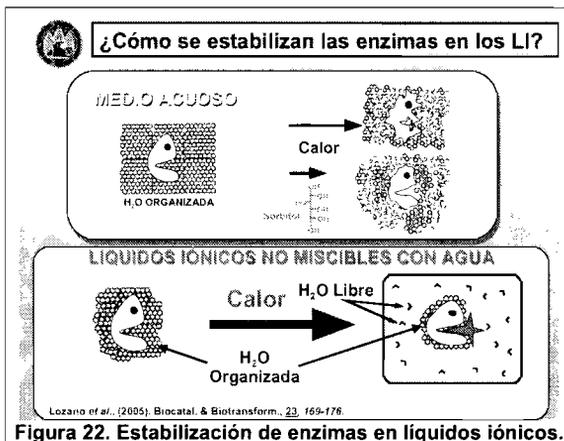


Según esta hipótesis, cuando un compuesto o un cosolvente se adiciona a un líquido iónico, no se solubiliza como tal, por interacción con los iones, sino que queda atrapado e incluido en los pequeños huecos de la red tridimensional. Una mayor adición de cosolvente provocaría la ruptura de la red con la aparición de iones triples, pares iónicos o los iones dispersos, conforme aumenta la concentración de cosolvente. Este modelo de estructura ordenada de los líquidos iónicos es muy similar a la estructura del solvente universal de los seres vivos, el agua.

Efectivamente, el agua también se organiza gracias a la formación de enlaces por puente de hidrógeno entre las moléculas y dicho orden se modifica en función de la temperatura. Así, el máximo estado de organización de las moléculas de agua ocurre por debajo de los 0°C , es decir en estado sólido, mientras que el máximo grado de desorganización ocurre por encima de los 100°C , es decir, en estado gaseoso. Pero en ambos estados, sólido y gas, no hay vida, la vida ocurre en estado líquido, y en ese estado, las moléculas de agua modifican su nivel de organización en función de la temperatura. A mayor temperatura, mayor es la energía cinética de las moléculas, y por tanto, menor es la estabilidad de los enlaces por puente de hidrógeno que soportan su estructura.



En base a todo esto, ¿qué ocurre con las enzimas cuando se disuelven en presencia de un líquido iónico? ¿Por qué se desnaturalizan por el calor? Y ¿por qué los líquidos iónicos no miscibles con agua ejercen un efecto protector frente a la desnaturalización? En el caso de una enzima disuelta en agua en condiciones suaves de temperatura, la acción del calor provoca su desnaturalización y desactivación, fundamentalmente por la pérdida de la estructura del medio que la soporta, ya que el incremento de la energía cinética de las moléculas de agua destruye las interacciones que mantienen la conformación activa de la enzima. En este sentido, la presencia de sustancias formadoras de enlaces por puente de hidrógeno con el agua, como es el polialcohol sorbitol, ejercen un efecto estabilizador de las enzimas.

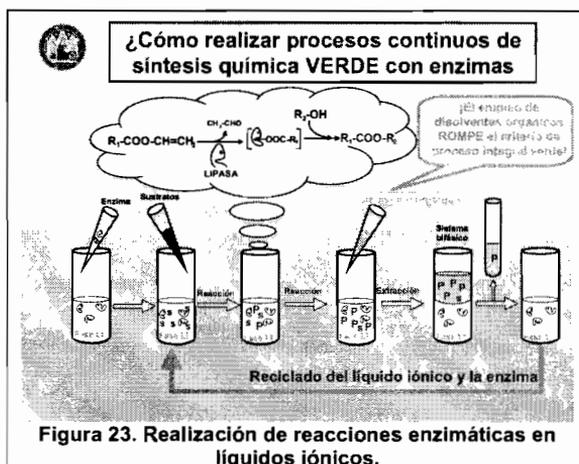


Lozano et al., (2005). *Biocatal. & Biotransform.* 23, 169-178.

Por el contrario, los líquidos iónicos no miscibles con agua mantienen oculta a la enzima en su red supramolecular, por lo que mantienen las moléculas de agua en el microentorno de la estructura enzimática. Además, al comportarse los líquidos iónicos como una red dinámica, el incremento de la temperatura no destruye su estructura, y las moléculas de agua permanecen alrededor de la enzima, y por tanto, la enzima es fuertemente estabilizada.

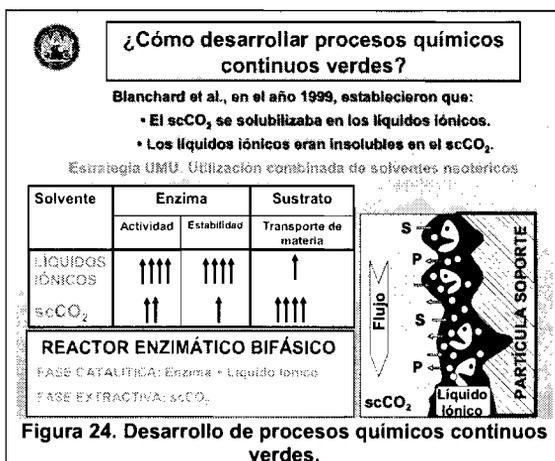
Procesos continuos integrales de síntesis química verde con enzimas

Las reacciones enzimáticas que se han presentado anteriormente son eso, reacciones químicas catalizadas por enzimas. En ellas se muestran las excelencias de las enzimas y de los solventes neotéricos empleados. Pero obviamente, el interés de cualquier industria química está en el desarrollo de un proceso en continuo. Además, en el proceso esquematizado en la Figura 15 donde se planteaba previamente la reutilización del sistema líquido iónico - enzima, se empleaban solventes orgánicos para extraer los productos de la reacción enzimática. Este hecho rompe el criterio de proceso integral verde. Es decir, se evitaban los solventes orgánicos como medio de reacción, pero se utilizaban en la recuperación de los productos.



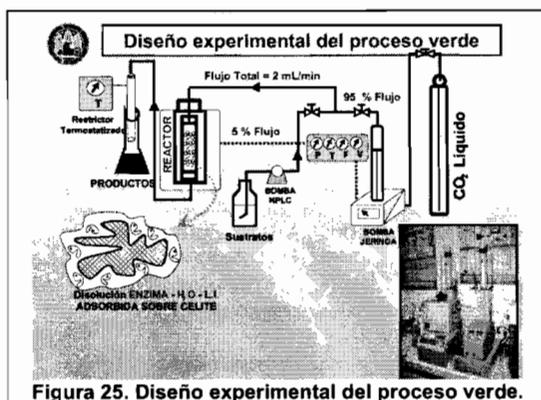
¿Cómo se pueden realizar procesos continuos de síntesis química verde de modo integral y utilizando enzimas como catalizadores? Para el desarrollo de procesos continuos verdes fue clave el descubrimiento del equipo de la Profesora Joan Brenecke en la Universidad de Notre-Dame en EE.UU., según la cual, los fluidos supercríticos eran capaces de penetrar en un líquido iónico y extraer las sustancias disueltas en él, dejando intacto el líquido iónico, es decir, los fluidos supercríticos se solubilizaban en el líquido iónico, mientras que los líquidos iónicos eran insolubles en el $scCO_2$.

Conocidas las ventajas de los líquidos iónicos en la actividad y estabilidad de las enzimas, así como de la eficacia del $scCO_2$ para transportar sustancias disueltas en el mismo, planteamos la estrategia de combinar ambos fluidos para desarrollar un reactor enzimático con dos fases claramente diferenciadas: a) la fase catalítica constituida por la enzima inmovilizada sobre un soporte sólido y suspendida en el líquido iónico, y en la que la enzima llevaría a cabo las biotransformaciones, y b) la fase extractiva, en la que $scCO_2$ llevaría a cabo el suministro de sustratos hasta el microentorno de la enzima y la extracción de los productos, una vez que la enzima hubiese verificado la biotransformación.



Para el desarrollo de esta idea, se diseñó un dispositivo experimental constituido por una botella de dióxido de carbono líquido presurizada a 100 bares conectada a una bomba de jeringa, que es capaz de suministrar CO_2 supercrítico hasta una presión de 500 bares. Este circuito está acoplado a un segundo circuito de suministro

tro de los sustratos mediante una bomba de HPLC, y los flujos totales de ambas bombas se combinan de tal manera, que los sustratos se solubilizan continuamente en la fase supercrítica en el punto donde se encuentran, al mismo tiempo que son suministrados de modo continuo al reactor termostatzado en la temperatura deseada. Esta fase extractiva con los sustratos disueltos en el dióxido de carbono supercrítico entra en contacto con la fase catalítica, que contiene las enzimas recubiertas con líquido iónico, lo que permite que al mismo tiempo, éstas catalicen la biotransformación y se extraigan los productos de la reacción. El proceso termina cuando el flujo de dióxido de carbono supercrítico, que contiene los productos disueltos, se despresuriza a través de un restrictor termostatzado, por lo que se elimina el dióxido de carbono y se recoge el producto obtenido con el 100% de pureza y exento de cualquier traza de solvente.



Obviamente, en los procesos industriales, la etapa de despresurización se realiza en tanques específicos que permiten la recuperación del dióxido de carbono para su reutilización una vez presurizado. Mediante este diseño experimental, se realizaron diversos procesos de síntesis enzimática. Uno de ellos fue la síntesis del aroma alimentario butirato de butilo en el sistema líquido iónico/fluido supercrítico. La enzima lipasa en forma soluble, no solo fue capaz de catalizar el proceso, tal como indican los valores de actividad, sino que, además dicha actividad se incrementó con el aumento de la temperatura, alcanzando su máximo valor a 100 °C. La temperatura de 100 °C no es un valor usual para la actividad de los sistemas biológicos, lo cual volvía a mostrar las excelencias de los líquidos iónicos para estabilizar a las enzimas.

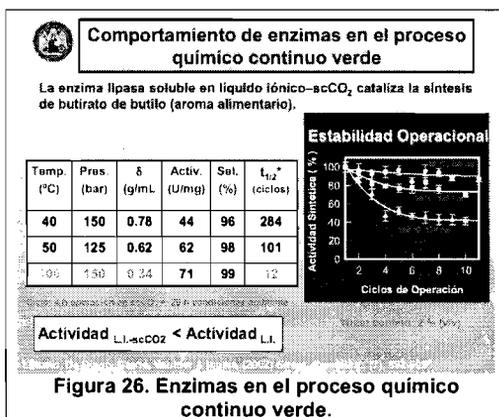
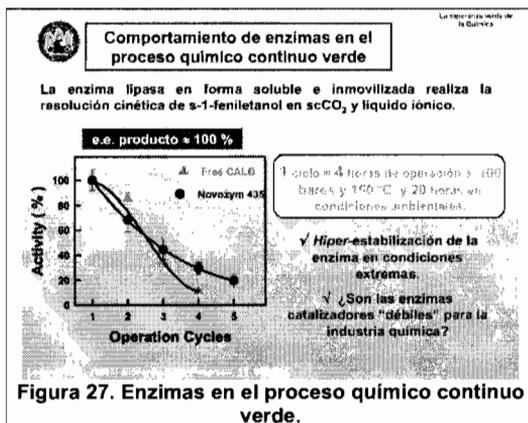


Figura 26. Enzimas en el proceso químico continuo verde.

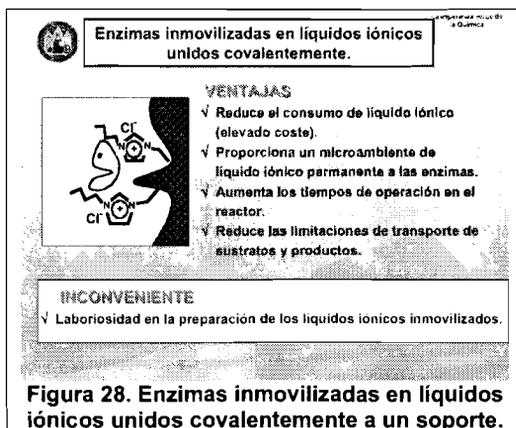
Este fenómeno puede verse claramente reflejado en la figura, que muestra la variación de la actividad con el número de ciclos de utilización. El sistema se ensayó en ciclos de 4 horas durante 10 días. Como puede observarse, el perfil de actividad fue prácticamente constante a 40 °C, mientras que a 50 °C, y sobre todo a 100 °C, la enzima mostró una pérdida inicial de actividad, para alcanzar después un nivel estable de actividad. No es normal que una enzima de origen no extremófilo mostrase este perfil de actividad en condiciones tan adversas, de scCO₂ a 150 bares de presión, 100 °C de temperatura y en ausencia de agua.

Con objeto de corroborar estos resultados de exaltación de la estabilidad de la enzima, se llevó a cabo una reacción de síntesis estereoespecífica de resolución cinética del s-1-feniletanol, en las mismas condiciones adversas de la reacción de síntesis del butirato de butilo, a saber dióxido de carbono a 100 bares de presión, 150 °C de temperatura y en ausencia de agua, condiciones existentes en la superficie del planeta Venus. Pues bien, bajo estas condiciones, la enzima lipasa también fue capaz de catalizar dicha reacción con el máximo nivel de estereoselectividad durante varios ciclos de 4 horas de operación. Es decir, una proteína obtenida de un ser vivo y utilizada tanto en forma libre como inmovilizada fue catalíticamente activa durante más de 20 horas en condiciones extremadamente adversas.



Estos resultados vienen a corroborar la eficacia de los líquidos iónicos como agentes hiper-estabilizadores de las enzimas, y por supuesto, que las enzimas no son catalizadores débiles para las condiciones usualmente empleadas en los procesos químicos industriales.

Pero para que este proceso de síntesis sea mucho más rentable desde el punto de vista industrial, no sólo ha de ser continuo, sino que, además, los reactivos que se utilicen han de ser de bajo coste. No es el caso de los líquidos iónicos cuyo coste de producción es muy elevado, factor que limita su uso a escala industrial en los procesos químicos. Una de las maneras de reducir costes es la de minimizar la cantidad de líquido iónico que se utiliza en las biotransformaciones. Y, así, se han obtenido una serie de soportes sólidos de inmovilización que contienen los líquidos iónicos unidos covalentemente y que proporcionan una fase líquida en su superficie. Esto permite, además de reducir el consumo de líquido iónico, el de proporcionar en el microentorno de la enzima la cantidad mínima necesaria de líquido iónico para preservar las cualidades catalíticas de dicha enzima en condiciones supercríticas. También se aumentan los tiempos de operación, ya que la estabilidad de la capa de líquido iónico acoplada covalentemente sobre el soporte es mucho mayor que si dicha capa está solo adsorbida.



Asimismo, la reducción del espesor de dicha capa de líquido iónico permite una serie de ventajas operacionales, como es la reducción de los problemas de transporte de materia, para facilitar el acceso de los sustratos al centro catalítico y la salida de los productos del mismo tras la acción de la enzima. La principal desventaja de esta estrategia es la laboriosidad en la preparación del soporte, que anteriormente se obtenía por simple adsorción del líquido iónico sobre la enzima.

En la Figura 29 se presenta el dispositivo experimental desarrollado, en el cual, adicionalmente a las bombas que suministran el dióxido de carbono supercrítico y los sustratos en las condiciones deseadas, también se ha incorporado un reactor tubular conteniendo un monolito, es decir, una matriz polimérica continua que contiene los líquidos iónicos unidos covalentemente a la superficie externa, y sobre la que se ubica la enzima. De este modo los sustratos son nuevamente transportados por la fase supercrítica, y tras la acción catalítica se recogen los productos.

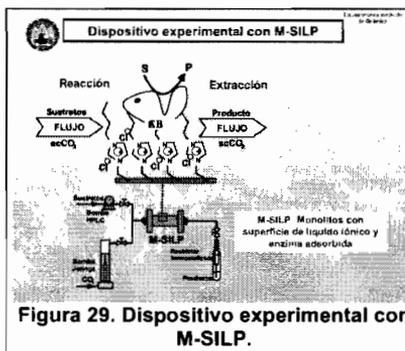


Figura 29. Dispositivo experimental con M-SILP.

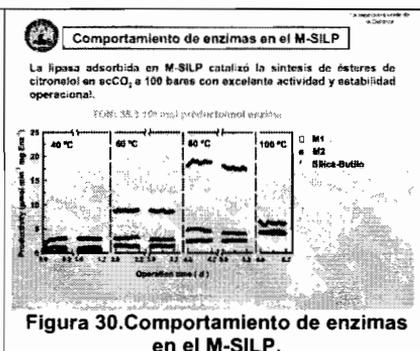


Figura 30. Comportamiento de enzimas en el M-SILP.

Este sistema ha sido ensayado para la síntesis de diversos ésteres del citronelol, que es un alcohol terpénico comúnmente utilizado en perfumería. En la Figura 30 se presentan los perfiles de la operación continua a diferentes temperaturas, y en los que se compara la actividad de la enzima sobre dos monolitos distintos, respecto a la obtenida por el procedimiento clásico de adsorción del líquido iónico sobre la superficie de un soporte sólido. Como se observa, para todos los casos ensayados los monolitos con el líquido iónico inmovilizado rindieron mejores resultados, lo que demuestra que es posible transferir las cualidades del líquido iónico a una matriz sólida. A modo de curiosidad, los moles de producto obtenidos por mol de enzima durante todo el tiempo en el que se realizó la reacción enzimática ("turnover number" o número de recambio) fueron de varios órdenes de magnitud superiores a los que usualmente muestran los catalizadores químicos, tal como se ha comentado en las propiedades de las enzimas.

Conclusiones

A lo largo de la presente lección hemos puesto de manifiesto que:

a) Las enzimas en los líquidos iónicos permanecen estables y son catalíticamente activas, aunque no lo son en los solventes orgánicos convencionales.

b) Los líquidos iónicos y los fluidos supercríticos permiten realizar reacciones catalizadas por enzimas de sustratos polares en medios no acuosos. Tales reacciones son de importancia creciente puesto que las sustancias naturales tales como péptidos, azúcares, nucleótidos e intermedios bioquímicos, son los materiales im-

portantes de partida para la síntesis de nuevos productos de química fina e interés farmacéutico.

c) La tecnología enzimática con líquidos iónicos y fluidos supercríticos como solventes permite realizar múltiples reacciones de forma eficaz, continua y con reutilización de los solventes, bajo los principios de la Química Verde.

¿A qué desafíos se enfrenta la Química Verde? Los desafíos futuros a los que se enfrenta la Química Verde son tan diversos como lo es la imaginación científica, y se dirigen a resolver los problemas de la sostenibilidad. Debido a su amplitud, no es una sorpresa que los desafíos estén orientados por razonamientos que van desde los estrictamente económicos a los puramente científicos. Sin embargo, vamos a agruparlos bajo dos aspectos específicos relacionados con los objetivos de un universitario: el docente y el investigador.

Respecto a la educación, los estudiantes de todos los niveles deben educarse en la filosofía y práctica de la química verde. Los educadores necesitan de las herramientas apropiadas, entrenamiento y materiales para integrar la química verde en su enseñanza e investigación. Algunos de los puntos importantes que se deben incluir en los planes de estudio son:

- a) El reconocimiento sistemático del riesgo/toxicidad como una propiedad físico/química de la estructura molecular, que puede ser diseñada y manipulada.
- b) El desarrollo y la utilización de experimentos de laboratorio para ilustrar los principios de la química verde.
- c) La introducción de ecuaciones equilibradas en los libros de texto y la sustitución de la magnitud "rendimiento" por "economía atómica".
- d) La introducción de conceptos básicos de toxicología química y las bases moleculares del riesgo.
- e) La incorporación de temas sobre química verde en los cursos y exámenes de certificación profesional.
- f) La educación de los legisladores en los beneficios de la Química Verde.

Con relación a los desafíos de investigación necesarios para conseguir los principios de la Química Verde, se puede decir, en principio, que son numerosos, por lo que no es posible realizar una discusión detallada de los mismos. Sin embargo, se incluye una reseña de algunos de ellos, que suministra una ilustración de los problemas actuales y pueden ayudar a estimular el pensamiento en otros nuevos:

- a) El desarrollo de transformaciones que utilicen la energía mejor que la materia.
- b) El diseño de sistemas de solventes con transferencia de materia y calor eficaces, y con integración de la catálisis y la separación de productos.
- c) El desarrollo de metodologías sintéticas que incluyan la economía atómica y sean benignas para la salud humana y el medio ambiente.
- d) El desarrollo de una "toxicología preventiva", en la que incremento del conocimiento de los mecanismos de su acciones biológica y medioambiental se incorporen de manera continua en el diseño de los productos químicos.
- e) La manufacturación de células fotovoltaicas que sean más eficaces.
- f) El desarrollo de transformaciones que preserven la funcionalidad sensitiva sin la utilización de grupos protectores.
- g) El desarrollo de superficies y materiales que sean durables y limpios.
- h) El diseño de plásticos y polímeros biodegradables y sin aditivos.

El crecimiento de la Química Verde a lo largo de la década pasada necesita de una aceleración si se quiere que la ciencias moleculares consigan el desafío de la sostenibilidad. Se ha dicho que la revolución de un día se convierte en la ortodoxia del siguiente. Cuando los 12 Principios de la Química Verde se incorporen simplemente como una parte integrada de la química diaria ya no habrá necesidad de insistir, resaltar y hablar de la química verde. Y cuando dicho día llegue, no podemos imaginarnos los desafíos que la Química encontrará.

Bibliografía.

- Abraham M.A., Moens, L. (Eds.) (2002) *Clean Solvents. Alternative Media for Chemical Reactions and Processing*. ACS Symposium Series 819. American Chemical Society, Washington DC.
- Anastas, P.T., Kirchoff, M.M. (2002) "Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry". *Accounts Chemical Research*, **35**, 686-694.
- Anastas, P.T., Warner, J.C. (Eds.) (1998) *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press. Oxford.
- Anastas, P.T., Heine, L.G., Williamson, T.C. (Eds.) (2000) *Green Chemical Processes*. American Chemical Society, Washington DC.
- Ball, P. (2002) "Enzymes find pastures greener. Chemists put biological catalysts to work in clean industrial solvents". *Nature. Science Update*, 17 April.
- Blanchard, L.A., Hancu, D., Beckman, E.J., Brennecke, J.F. (1999) "Green Processing Using Ionic liquids and CO₂". *Nature*. **399**, 28-29.
- De Diego, T., Lozano, P., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2004) "Fluorescence and CD Spectroscopic Analysis of the α -Chymotrypsin Stabilization by the Ionic Liquid, 1-Ethyl-3-methylimidazolium Bis[(trifluoromethylimidazolium)sulfonyl]amide". *Biotechnology and Bioengineering*, **88**, 916-924.
- De Diego, T., Lozano, P., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2005) "Understanding Structure-Stability Relationship of *Candida Antarctica* Lipase B in Ionic Liquids". *Biomacromolecules*, **6**: 1457-1464.
- (T) Dupont, J. (2004) "On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **15**, 341-350.
- Dzyuba, S.V., Bartsch, R.A. (2003) "Recent Advances in Applications of Room-Temperature Ionic Liquids/Supercritical CO₂ Systems". *Angewandte Chemie, International Edition*, **42**, 148-150.
- Hoobs, H.R., Thomas, N.R. (2007) "Biocatalysis in Supercritical Fluids, in Fluorous Solvents, and Under Solvent-Free Conditions". *Chemical Reviews*, **107**, 2786-2820.
- Levitsky, V., Lozano, P., Iborra, J.L. (2000) Designing enzymatic kyotorphin synthesis in organic media with low water content". *Enzyme Microbial Technology*, **26**, 608-613.
- Lozano, P., De Diego, T., Iborra, J.L. (1997) "Hydrophobicity and water activity relationships of water-miscible aprotic solvents on kyotorphin synthesis catalyzed by α -chymotrypsin". *Biotechnology Letters*, **19**, 1005-1009.
- Lozano, P., De Diego, T., Guegan, J-P., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2001) "Stabilization of α -Chymotrypsin by Ionic Liquids in Transesterification Reactions". *Biotechnology and Bioengineering*, **75**, 563-569.

- Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2001) "Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis". *Biotechnology Letters*, **23**, 1529-1533.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2002) "Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide". *Chemical Communications*, **7**, 692-693.
- Lozano, P., Pérez-Marín, A. B., De Diego, T., Gómez, D., Paolucci-Jeanjean, D., Belleville, M. P., Rios, G.M., Iborra, J.L. (2002) "Active membranes with immobilized *Candida antarctica* lipase B: preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media". *Journal of Membrane Science*, **201**, 55-64.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2003) "Enzymatic ester synthesis in ionic liquids". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **21**, 9-13.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2003) "Lipase Catalysis in Ionic Liquids and Supercritical Carbon Dioxide at 150°C". *Biotechnology Progress*, **19**, 380-382.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2003). "Enzymatic Catalysis in Ionic Liquids and Supercritical Carbon Dioxide". In: *Ionic Liquids as Green Solvents: Progress & Prospects* (Eds. R.D. Rogers y K.R. Seddon). ACS SYMPOSIUM SERIES **856**, pp. 239 - 250. American Chemical Society, Washington, DC.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2004) "Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide". *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **214**, 113-119..
- Lozano, P., De Diego, T., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2004) "Criteria to Design Green Enzymatic Processes in Ionic Liquid/Supercritical Carbon Dioxide Systems". *Biotechnology Progress*, **20**, 661-669.
- Lozano, P., Villora, G., Gómez, D., Gayo, A.B., Sánchez-Conesa, J.A., Rubio, M., Iborra, J.L. (2004) "Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide". *Journal of Supercritical Fluids*, **29**, 121-128.
- Lozano, P., De Diego, T., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2005) "Dynamic structure-function relationship in enzyme stabilization by ionic liquids". *Biocatalysis and Biotransformations*, **23**, 169-176.
- Lozano, P., De Diego, T., Iborra, J.L. (2006) "Immobilization of Enzymes for Use in Ionic Liquids". In: *Immobilization of Enzymes and Cells* (2nd Edition). Chapter 23, pp. 257-268. Humana Press.
- Lozano, P., De Diego, T., Iborra, J.L. (2006) "Immobilization of Enzymes for Use in Supercritical Fluids". In: *Immobilization of Enzymes and Cells* (2nd Edition). Chapter 23, pp. 269-281. Humana Press.
- Lozano, P., De Diego, T., Carnicol, M., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2006) "Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of rac-1-phenylethanol in ionic liquids and ionic liquids/supercritical carbon dioxide systems". *Biotechnology Letters*, **28**, 19-1565.

- Lozano, P., De Diego, T., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2007) "Toward Green Processes for Fine Chemicals Synthesis: Biocatalysis in Ionic Liquid-Supercritical Carbon Dioxide Biphasic Systems". In: *Ionic Liquids in Organic Synthesis* (S.V., Malhotra, Ed). ACS SYMPOSIUM SERIES **950**, pp. 209 - 223. American Chemical Society, Washington, DC.
- Lozano, P., De Diego, T., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2007) "Green biocatalytic processes in neoteric solvents: Lipase-catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethanol in ionic liquid/scCO₂ systems". In: *Récents Progrès en Génie des Procédés*. N° 94. pp. 1-7. Ed. SFGP. Paris. France.
- Lozano, P., De Diego, T., Sauer, T., Vaultier, M., Gmouh, S., Iborra, J.L. (2007) "On the importance of the supporting material for activity of immobilized *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid/hexane and ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic media". *Journal of Supercritical Fluids*, **40**, 93-100.
- Lozano, P., García-Verdugo, E., Piamtongkam, R., Karbass, N., De Diego, T., Burquete, I., Luis, S.V., Iborra, J.L. (2007) "Bioreactors Based on Monolith-Supported Ionic Liquid Phase for Enzyme Catalysis in Supercritical Carbon Dioxide". *Advances in Synthesis and Catalysis*, **349**, 1077-1084.
- Lozano, P., Piamtongkam, R., Kohns, K., De Diego, T., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2007) "Ionic liquids improve citronellol ester synthesis catalyzed by immobilized *Candida Antarctica* lipase B in solvent-free media" *Green Chemistry*, **9**, 780-784.
- Noël, M., Lozano, P., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2004) "Kinetic resolution of rac-2-pentanol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bis((trifluoromethyl)sulfonyl)amide" *Biotechnology Letters*, **26**, 301-306.
- Oberholz, A. (2006) "Sustainable Chemistry Strategic Research Agenda". *The European Technology Platform for Sustainable Chemistry- SusChem*. <http://www.suschem.org/>.
- Park, S., Kazlauskas, R.M. (2003) "Biocatalysis in ionic liquids -Advantages beyond green technology". *Current Opinion in Biotechnology*, **14**, 432-437.
- Poole, C.F. (2004) "Chromatographic and Spectroscopic Methods for the Determination of Solvent Properties of Room Temperature Ionic Liquids: A review". *Journal of Chromatography: A*, **1037**, 49-82.
- Rogers, R.D., Seddon, K.R. (Eds.) (2003) *Ionic Liquids as Green Solvents: Progress & Prospects*. ACS SYMPOSIUM SERIES **856**. American Chemical Society, Washington, DC.
- Sheldon, R.A., Arends, I., Hanefeld, U. (Eds.) (2007) *Green Chemistry and Catalysis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim, Germany.
- Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., (2007) "Biocatalysis in Ionic Liquids". *Chemical Reviews*, **107**, 2757-2785.
- Wasserscheid, P., Welton, T. (Eds.) (2003) *Ionic Liquids in Synthesis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim, Germany.

