



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Procesos Integrados de Biotransformación y  
Separación de Interés Industrial en Líquidos Iónicos  
y Disolventes Eutécticos Profundos**

**Integrated Biotransformation and Separation  
Processes in Ionic Liquids and Deep  
Eutectic Solvents with Industrial Interest**

**Dña. Elena Álvarez González  
2020**



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

Escuela Internacional de Doctorado

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (B) e  
Inmunología

**Procesos integrados de biotransformación y  
separación de interés industrial en líquidos iónicos y  
disolventes eutécticos profundos**

TESIS DOCTORAL

**Elena Álvarez González**

DIRECTORES:

Pedro Lozano Rodríguez  
Susana Nieto Cerón

Murcia, 2020





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

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

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Procesos integrados de biotransformación y separación de interés industrial en líquidos iónicos y disolventes eutécticos profundos / Integrated biotransformation and separation processes in ionic liquids and deep eutectic solvents with industrial interest", realizada por D. Elena Álvarez González, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 9 de Diciembre de 2019

Firmante: PEDRO LOZANO RODRIGUEZ; Fecha-hora: 17/12/2019 09:54:34; Emisor del certificado: CN=AC FNMU Usuarios,OU=Ceres,O=FNMU-RCM, C=ES



Código seguro de verificación: RUxFMjKa-HfeAgR8C-TXc3JZV6-Pdk1W3um

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

Mod: T-20





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D<sup>a</sup>. Susana Nieto Cerón, Doctora de Universidad del Área de Bioquímica y Biología Molecular en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (B) e Inmunología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Procesos integrados de biotransformación y separación de interés industrial en líquidos iónicos y disolventes eutécticos profundos / Integrated biotransformation and separation processes in ionic liquids and deep eutectic solvents with industrial interest ", realizada por D. Elena Álvarez González, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 9 de Diciembre de 2019

Firmante: SUSANA NIETO CERON. Fecha-hora: 17/12/2019 10:10:27. Emisor del certificado: CN=AC FNMT Usuarios,OU=Ceres,O=FNMT-RCM,C=ES



Código seguro de verificación: RUxFMilc-NM32P8NV-by6C9uLL-+bcsK068

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>





**Memoria presentada para acceder al Grado de Doctor  
en Química (mención internacional) por la Universidad  
de Murcia**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Elena Álvarez González', with a horizontal line crossing through the middle of the letters.

**Fdo: Elena Álvarez González**



Durante su doctorado, Elena Álvarez González ha disfrutado de un contrato predoctoral (FPI MINECO, ref. BES-2016-079034) asociado al proyecto MINECO ref. CTQ-2015-67927-R.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos CTQ-2015-67927-R, (MINECO/FEDER), RTI2018-098233-B-C21 (MICINN), 19278/PI/14 y 20790/PI/18 (Fundación SENECA CARM).



**Parte de los resultados de investigación contenidos en la presente memoria han sido objeto de las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos:**

**a) Publicaciones en revistas científicas:**

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

P. Lozano, E. Alvarez, S. Nieto, R. Villa, J. M. Bernal, A. Donaire. Biocatalytic synthesis of panthenyl monoacyl esters in ionic liquids and deep eutectic solvents. *Green Chem.*, **2019**, 21, 3353-3361.

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

P. Lozano, J. M. Bernal, C. Gomez, E. Alvarez, B. Markiv, E. Garcia-Verdugo, S.V. Luis. Green biocatalytic synthesis of biodiesel from microalgae in one-pot systems based on sponge-like ionic liquids, *Catal. Today*, **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2019.01.073>

E. Alvarez, R. Villa, S. Nieto, A. Donaire, E. Garcia-Verdugo, S.V. Luis, P. Lozano. The suitability of lipases for the synthesis of bioactive compounds with cosmeceutical applications. *Mini-Rev. Org. Chem.* (Enviado a revisión).

**b) Patente:**

P. Lozano, E. Alvarez, J.M. Bernal, S. Nieto, C. Gomez, A. Donaire. Procedimiento de síntesis enzimática de monoésteres de compuestos polihidroxilados/Method for enzymatic synthesis of monoesters of polyhydroxylated compounds. Patente WO 2019/243656 A1, **2019**.

**c) Congresos nacionales e internacionales:**

**Congresos internacionales:**

Rocio Villa, Elena Alvarez, Susana Nieto, Antonio Donaire and Pedro Lozano. Sustainable enzymatic synthesis of panthenyl monoesters in ionic liquids (Póster). *International Symposium on Green Chemistry (SIGC 2019)*, la Rochelle (Francia), 13-17 May **2019**.

Pedro Lozano, Susana Nieto, Elena Alvarez, Rocio Villa, Celia Gomez, Antonio Donaire, Eduardo Garcia-Verdugo and Santiago V. Luis. Clean biocatalytic processes using sponge-like ionic liquids and supercritical carbon dioxide (Comunicación oral).

*International Symposium on Green Chemistry (SIGC 2019)*, la Rochelle (Francia), 13-17 May **2019**.

Rocio Villa, Elena Alvarez, Susana Nieto, Antonio Donaire and Pedro Lozano. Biocatalytic synthesis of solketyl laurate by using ionic liquids and supercritical carbon dioxide technologies (Póster). *International Symposium on Green Chemistry (SIGC 2019)*, la Rochelle (Francia), 13-17 May **2019**.

Pedro Lozano, Elena Alvarez, Rocio Villa, Susana Nieto, Antonio Donaire, Eduardo Garcia-Verdugo and Santiago V. Luis. Sponge-like ionic liquids and supercritical carbon dioxide for clean biocatalytic Processes (Comunicación oral). *17<sup>th</sup> European Meeting on Supercritical Fluids/ 7th European Meeting High Pressure Technology*, Ciudad Real (Spain), 8-11 Feb **2019**.

Rocio Villa, Pedro Lozano, Elena Alvarez, Susana Nieto, Antonio Donaire, Eduardo Garcia-Verdugo and Santiago V. Luis. Biocatalytic synthesis of oxygenated biofuels from fatty acids by using ionic liquids and supercritical fluids (Póster). *17<sup>th</sup> European Meeting on Supercritical Fluids/ 7th European Meeting High Pressure Technology*, Ciudad Real (Spain), 8-11 Feb **2019**.

Elena Alvarez, José Romera, Celia Gomez, Susana Nieto, Rocio Villa, Gregorio Sanchez-Gomez, Pedro Lozano. Beyond the element: Ionic liquids as reaction media for clean biocatalyst synthesis of cinnamyl esters (Póster). *IUPAC International Symposium on Setting Their Table: Women and the Periodic Table of Elements*, Murcia (Spain), 11-12 Feb **2019**.

Rocio Villa, Elena Alvarez, Susana Nieto, Antonio Donaire, Gregorio Sanchez-Gomez, Pedro Lozano. Green efficient tools for the catalytic synthesis of fatty acid esters (Póster). *IUPAC International Symposium on Setting Their Table: Women and the Periodic Table of Elements*, Murcia (Spain), 11-12 Feb **2019**.

Susana Nieto, Antonio Donaire, Sonia Bermúdez, Elena Alvarez, Gregorio Sanchez-Gomez, Pedro Lozano. Increasing the atom efficiency for the sustainable synthesis of sorbitol esters (Póster). *IUPAC International Symposium on Setting Their Table: Women and the Periodic Table of Elements*, Murcia (Spain), 11-12 Feb **2019**.

María Romero, Elena Alvarez, Francesca Paradisi, Victor Sans. Non-conventional regeneration of redox cofactors for flow biocatalysis (Póster). *17<sup>th</sup> Annual Symposium on Centre of Science and Chemical Biology (CSCB)*, RCSI, Dublin (Ireland), 7 Dic **2018**.

Elena Alvarez, José Rodríguez, Celia Gomez, Susana Nieto, Juana M. Bernal, Antonio Donaire and Pedro Lozano. A green bioprocess for the synthesis of flavour esters in Sponge-Like ionic liquids (Póster y Comunicación oral). *IUPAC Posgraduate Summer School on Green Chemistry*, Venice (Italy) 7-14 Jul **2018**. PÓSTER PREMIADO EN POSICIÓN 3.

Susana Nieto, Elena Alvarez, Celia Gomez, Juana M. Bernal, Antonio Donaire and Pedro Lozano. Sponge-like ionic liquids, an efficient tool to develop green processes (Póster y Comunicación oral). *IUPAC Posgraduate Summer School on Green Chemistry*, Venice (Italy) 7-14 Jul **2018**. PÓSTER PREMIADO EN POSICIÓN 4/ PREMIO ENI.

Antonio Donaire, Bohdana Markiv, Celia Gomez, Elena Alvarez, Susana Nieto, Juana M. Bernal and Pedro Lozano. An integral green chemical process to obtain biodiesel from *Chlorella vulgaris microalgae* (Póster). *6<sup>th</sup> International Congress on Green Process Engineering* (GPE 2018), Toulouse (Francia), 3-6 Jun **2018**.

Susana Nieto, Celia Gomez, Elena Alvarez, Gregorio Sanchez Gomez, Juana M. Bernal and Pedro Lozano. Biodiesel green synthesis through biocatalysis in SLILs (Póster). *6<sup>th</sup> International Congress on Green Process Engineering* (GPE 2018), Toulouse (Francia), 3-6 Jun **2018**.

Celia Gomez, Elena Alvarez, Susana Nieto, Juana M. Bernal, Antonio Donaire and Pedro Lozano. Green Chemical synthesis of monoacylglycerides in sponge-like ionic liquids (Póster). *6<sup>th</sup> International Congress on Green Process Engineering* (GPE 2018), Toulouse (Francia), 3-6 Jun **2018**.

Elena Alvarez, Celia Gomez, Susana Nieto, Juana M. Bernal, Antonio Donaire, Pedro Lozano. Synthesis of panthenyl monoesters in Ionic Liquids (Póster). *6<sup>th</sup> International Congress on Green Process Engineering* (GPE 2018), Toulouse (Francia), 3-6 Jun **2018**.

### **Congresos nacionales:**

Elena Alvarez, Rocio Villa, Susana Nieto, Antonio Donaire and Pedro Lozano. Sponge-like ionic liquids for clean biocatalytic processes (Comunicación oral). *Reunión de Química Orgánica del Mediterráneo* (IX REQOMED), Murcia 23-25 Oct **2019**.

Elena Alvarez, Rocio Villa, Susana Nieto, Antonio Donaire, Gregorio Sanchez-Gomez and Pedro Lozano. Sustainable enzymatic synthesis of panthenyl monoesters in ionic liquids (Póster). *Congreso Nacional de Biotecnología* (BIOTEC 2019), Vigo (España), 10-13 Jun **2019**.

Susana Nieto, Elena Alvarez, Antonio Donaire, Sonia Bermúdez and Pedro Lozano. Sustainable approach for the synthesis of sorbitol monoesters in ionic liquids (Póster). *Congreso Nacional de Biotecnología* (BIOTEC 2019), Vigo (España), 10-13 Jun **2019**.

Rocio Villa, Elena Alvarez, Susana Nieto, Antonio Donaire, Gregorio Sanchez, Eduardo García-Verdugo, Santiago V. Luis y Pedro Lozano. Biocatalytic synthesis of oxygenated biofuels through the technologies of ionic liquids and supercritical carbon dioxide (Póster). *Congreso Nacional de Biotecnología* (BIOTEC 2019), Vigo (España), 10-13 Jun **2019**.

Rocio Villa, Pedro Lozano, Elena Alvarez, Susana Nieto, Gregorio Sanchez, Eduardo García-Verdugo, Santiago V. Luis. Síntesis biocatalítica de ésteres de solketal de ácidos grasos utilizando líquidos iónicos y dióxido de carbono supercrítico (scCO<sub>2</sub>). *V Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia*, Murcia (España), 29-31 May 2019.

Elena Alvarez, Susana Nieto, Rocio Villa, Antonio Donaire, Gregorio Sanchez-Gomez and Pedro Lozano. Síntesis enzimática de ésteres de pantenilo en líquidos iónicos y en sistemas libres de solvente (Póster). *V Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia*, Murcia (España), 29-31 May **2019**.

Pedro Lozano, Elena Alvarez, Antonio Donaire, Bohdana Markiv, Celia Gomez, Juana M. Bernal, Susana Nieto. Sustainable enzymatic synthesis of biodiesel from *Chlorella vulgaris* microalgae (Póster). *II Jornadas Españolas de Biocatálisis (JEB 2018)*, Oviedo (España), 25-26 Jun **2018**.

Elena Alvarez, José Rodríguez, Celia Gomez, Juana M. Bernal, Susana Nieto, Antonio Donaire, Gregorio Sanchez-Gomez, Pedro Lozano. Enzymatic synthesis of panthenyl monolaurate in sponge-like ionic liquids (Póster). *II Jornadas Españolas de Biocatálisis (JEB 2018)*, Oviedo (España), 25-26 Jun **2018**.

Elena Alvarez, Celia Gomez, Juana M. Bernal, Susana Nieto, Sanchez-Gomez, Pedro Lozano. Síntesis enzimática de ésteres aromáticos en líquidos iónicos tipo esponja (Póster). *IV Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia*, Murcia (España), 25-26 Jun **2018**.

Elena Alvarez, Maria Peran, Susana Nieto-Ceron, Gregorio Sanchez-Gomez, Pedro Lozano Rodriguez. Síntesis de monoésteres de pantenilo en líquidos iónicos (Póster). *Congreso Nacional de Biotecnología (BIOTEC 2017)*, Murcia (España), 18-21 Jun **2018**.



*“Equipado con sus cinco sentidos, el hombre explora el universo que lo rodea y a sus aventuras las llama ciencia “*

*Edwin Powell Hubble*



## AGRADECIMIENTOS

*Cuando comencé esta Tesis veía este día muy lejano. Ahora, a punto de finalizar siento la necesidad de agradecer a todas aquellas personas que, de una forma u otra, han estado presentes.*

*En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis. A Pedro, quien sin conocerme me dio la oportunidad de venir a Murcia e incorporarme a su grupo de investigación. Pedro, tú me has enseñado a luchar y no rendirme, a buscar siempre la novedad y la excelencia, pero, sobre todo, a disfrutar. También quiero dar la gracias a Susana por todo su apoyo y todas sus palabras de ánimo. Susana, gracias por ser además de mi directora, mi compañera. No puedo olvidar a Goyo, que me ayudó desde el primer día que pisé Murcia, sobre todo con los trámites y plazos de la EIDUM, sabías que siempre se me pasaban jeje. Ojalá hubieras podido ver el final de esta Tesis... aunque sé que allá donde estés, la estarás viendo.*

*En segundo lugar, quiero agradecer a todos mis compañeros del laboratorio por estar ahí en esta etapa, ayudándome y disfrutando conmigo cada día. Antonio, desde que te incorporaste al grupo me has ayudado en todo lo que has podido. Muchas gracias por todos los consejos y por nuestros debates, aunque a veces me agobie, son muy útiles. Juana Mari, tú has sido desde el principio como mi hermana mayor, ayudándome, enseñándome, animándome en los momentos más duros, haciéndome reír...En fin, podría decir mil cosas, pero lo que sí está claro es que lo que unió una simple michelada permanecerá siempre. Celia, mi gran compañera y amiga, muchas gracias por estar ahí siempre, incluso desde la distancia, gracias por tus palabras de ánimo y por enseñarme a luchar, siempre formarás parte del laboratorio 113. David, podría escribir otra tesis con todo lo que me gustaría decirte. Muchas gracias por ser como eres, sin tí mi paso por el laboratorio no habría sido igual, todos esos desayunos, esas risas, etc. Gracias por estar ahí siempre y por cuidarme. Rocío, mi compi de laboratorio, aunque llegaste al final de esta etapa, hemos podido compartir muchos momentos y espero de todo corazón poder seguir compartiendo muchos más.*

*No quiero pasar la oportunidad de agradecer a los compañeros de departamento: Gema, Julia, Rosa Alba, Ana, Teresa, Manolo por hacer del departamento un hogar. A todos los TFGs y TFMs: Dana, Pepe, Cristina, Andrés, Pablo, Sonia, María... por hacer el día a día más llevadero. Pepe, fuiste mi primer TFG, gracias por hacerme disfrutar enseñando y por toda tu paciencia, aunque no lo creas, tú también me enseñaste mucho. Dana, fuiste la primera persona que conocí en el laboratorio y desde ese día supe que había ganado una amiga, gracias por ser como eres. Cris, gracias por compartir conmigo el final de esta etapa, más que una alumna has sido mi hermanilla. Gracias por esos donuts que alteran mis analíticas (jeje) y sobre todo, gracias por esa sonrisa con la que vienes todas las mañanas y que me alegran el día. No puedo pasar por alto a Lucía que, aunque no sea del laboratorio ha compartido conmigo todos los desayunos, penas, alegrías... Muchas gracias por cuidarme, animarme y por todos esos*

consejos e intervenciones, me has demostrado que hay gente con un gran corazón.

Gracias también a todo el personal del PAS y mantenimiento por hacer posible que la universidad funcione día a día.

No puedo defender esta Tesis sin mencionar mi paso por Nottingham, sin duda una experiencia inolvidable. Por ello, me gustaría agradecer de todo corazón a Víctor, por aceptarme en su grupo y darme la oportunidad de aprender sobre temas muy diversos. Víctor, muchas gracias por darme alas y libertad, por mostrar tanta confianza en mí y, sobre todo, por enseñarme a no tener miedo a volar. Quiero agradecer al resto de compañeros del laboratorio: Andreas, Neelam, Sharad, Astrid, Meyke, Lais, Aki, Alex por todos los momentos compartidos, sobre todo por los "Friday pubs" jeje. Gracias a Isra y Carmen por acogerme nada más llegar, cuidarme y aconsejarme durante mi estancia y, sobre todo, por todas esas carcajadas que nos echábamos. Quiero agradecer a Francesca Paradisi y a su grupo por abrirme las puertas de su laboratorio y dejarme aprender. Pero, sobre todo, no puedo olvidar a María, mi gran compañera, posdoc, AMIGA. María, todo lo que ponga aquí es poco para expresar lo que siento, ya sabes que eres mi referente, mi ejemplo a seguir. Muchas gracias por todos tus consejos...por ese "caballo de Troya", echo mucho de menos nuestro ratito del café, daba para tanto... (jeje). Por último, me gustaría agradecer a Patricia, Fernando y Sofia, mi familia venezolana, por hacer tan especial y acogedora mi estancia en Nottingham.

También me gustaría dar las gracias a la Profesora Anne Wadouachi de la Université de Picardie Jules Verne (Amiens) y a su grupo de investigación por acogerme una semana, permitiéndome aprender al máximo y haciéndome pasar una experiencia increíble.

No puedo olvidar a mis amigos (Jose Luis, Ana, Maribel, Ángel, Lolo...) y a mi familia, por estar en los buenos y en los malos momentos de mi vida y durante esta tesis. En especial me gustaría agradecer a Jose Gea, por hacer mis inicios en Murcia mucho más llevaderos y por tener esa capacidad para hacerme reír cuando solo me apetece llorar. Gracias a mi madre y a mis hermanos por todo su apoyo y por aguantarme en los malos momentos, sé que, aunque estemos cada uno en un sitio siempre nos preocuparemos los unos por los otros. Por último, gracias a Abel por haber estado ahí en los buenos y en los malos momentos, por haberme apoyado y dado fuerzas. Muchas gracias por confiar en mí (incluso cuando yo no lo hago). Sé que a veces soy difícil de tratar, sobre todo este último año, pero tú me recuerdas día a día lo orgulloso que estás de mí. Muchas gracias por decirme siempre que soy tu guerrera, eso me da fuerzas para seguir adelante siempre.

**GRACIAS**

*A mí madre y a mí abuela, ejemplos de fortaleza  
y esperanza*



## SUMMARY

Sustainability is one of the most important challenges that scientific and technological development has to face in the 21<sup>st</sup> century, and its goals are included in the twelve Principles of Green Chemistry. The application of these principles is essential for the construction of cleaner and more sustainable industry, with the minimum risk and environmental impact, according to the *Environmental Protection Agency* (EPA) that proposes the “design products and processes that reduce or eliminate the use and/or generation of harmful substances”.

Solvents are essential materials for chemical synthesis (*e.g.* acting as media for mass- and heat-transport for reaction performance and product separation). It is important to point out that most of solvents used in chemical industry belong to the group of volatile organic compounds (VOCs). They provide the major contribution to the environmental performance of chemical processes in terms of health, safety, and process cost, as well as in air, water and earth impact. In this sense, the chemical industry is focussed on the development of new products, methodologies and technologies, preferably involving raw materials from renewable sources, whenever is possible. In addition, a reduction in energy consumption and the minimization of waste by-products and risks (in production processes, storage and transport) should be taken into account for designing new methodologies. Nevertheless, the substitution and/or elimination of VOCs is not an easy task, as they are key elements for chemical processes (*e.g.* solubilization of substrates and/or catalysts, to provide the appropriate environment for the reaction, etc.).

The aim of this memory has been the development of clean and sustainable approaches of selective biochemical transformations and separation processes to obtain highly valued products in cosmetic, pharmaceutical, food and biofuel industries.

In Chapter I, the main characteristics of ILs and DES, as well as their potential as green tool for different industrial applications, have been discussed. In addition, the interest of enzymes as natural catalysts is introduced, emphasizing the role of lipases in the improvement of food, cosmetic and pharmaceutical industrial methodologies.

Ionic liquids (ILs) are salts that have received great attention in recent years. ILs are entirely composed of ions and they usually are liquid at temperatures lower than 100 °C. These liquid salts present physicochemical properties (*e.g.* extremely low vapour

pressure, high thermal conductivity, high thermal and chemical stability, etc.), which made them more interesting than VOCs in a large amount of industrial applications (*e.g.* solvents in chemical reactions, separation processes, electrolytes in batteries, fuel cells, nuclear fuel recovery, etc.). Besides, through the appropriate selection of the cation and anion species, the most suitable IL can be designed with the physicochemical properties desired for different applications.

Deep eutectic solvents (DESs) are a new generation of green solvents that have emerged at the beginning of this century and have experienced a fast growth. DESs can be considered as a new class of supramolecular solvents, because they are typically composed of an organic salt (hydrogen bond acceptor) and at least one hydrogen bond donor (*e.g.* carbohydrates, etc.) connected by a wide matrix of hydrogen bonds. Thus, the generation of DESs is due to the formation of hydrogen bonds between the hydrogen bond donor and the hydrogen bond acceptor. As a consequence, the resulting viscous and liquid mixture is characterized by a melting point lower than any of its individual components. Generally, DESs are characterized by a large depression of freezing point and are liquid at temperatures lower than 150 °C. In addition, the rest of their physicochemical properties (*e.g.* low vapour pressure, bioavailability, most of them are biodegradables, low toxicity, synthesis with high atom economy, etc.) make them very interesting for a large amount of applications (*e.g.* solvents in (bio)transformations, compound extractions, etc.). Besides, similarly to ILs, through the appropriate selection of the hydrogen bond acceptor and hydrogen bond donor species, DESs with the desired physicochemical properties can be designed according to the application. In particular, those DESs obtained from primary metabolites (*e.g.* carbohydrates, amino acids, etc.) present great interest, as they come from renewable resources. From the point of view of Green Chemistry, these DESs are even more attractive than ILs since their synthesis is 100% atom economic, are easy to handle and no purification is required, making them suitable for their application in industry.

However, Green Chemistry goes far beyond replacing harmful solvents with environmentally benign ones. Selectivity of chemical processes also plays a key role in the development of sustainable processes, due to the necessity of avoid undesired reactions and/or by-products that needs further treatment (*e.g.* purification, wastes processing, etc.). In this sense, biocatalysts are potent tools for the development of chemical processes suitable with the Principles of Green Chemistry, as they improve the



efficiency and selectivity of a reaction, avoiding the use of stoichiometric amount of reagents and lowering the energy input required.

Nature is the widest source of inspiration for chemists, since any living system constitutes a complete repertoire of chemical transformations. The efficiency shown by enzymes in Nature for chemical processes may constitute the most powerful toolbox for the development of a cleaner and more sustainable chemical industry. The suitability of enzymes as catalysts in industrial processes lies in their ability to accelerate stereo-, chemo- and regioselectively chemical transformations under mild conditions (*e.g.* low temperature and pressure, aqueous medium, etc.). Interestingly, enzymes are able to perform their catalytic activity in non-aqueous media, increasing their range of biotransformations and technological applications. For this reason, the scientific and industrial development is focussed on the implementation of enzymes in different areas (*e.g.* drug design, food development, more sustainable processes of synthesis, etc.). In biocatalysis, lipases have received a great interest, since they can recognize a wide variety of substrates and they can catalyse different reactions with high selectivity (*e.g.* hydrolysis, esterification, transesterification, intersterification and aminolysis). Besides, lipases are capable to catalyse both the direct and the reverse reaction. In this way, the yield of a reaction can be improved through the control of the thermodynamic equilibrium.

Nevertheless, substitution of water for benign non-aqueous media is not always an easy task, because the native structure of the enzyme can be destroyed. In this way, the engineering of reaction media involves the design of non-aqueous solvents (*e.g.* in organic solvents, ILs, DESs, etc.) for developing new biocatalytic approaches with a high degree of enzyme performance. In particular, the development of biocatalytic processes using benign non-aqueous reaction medium, such as ILs or DESs, is strongly encouraged and many elements should be considered (*e.g.* continuous operations, integration of product separation steps, etc.) by using fully green approaches. In this context, Chapter II highlights technological developments in the field of Sustainable Chemistry based on the use of ILs, with special emphasis on SLILs, and DESs, as tools to integrate reaction and separation processes. In addition, the state-of-the-art is analyzed in this chapter, as a function of the excellent properties of many (bio)catalysts (*e. g.* stability, recovery and reuse, etc.), and how they can be greatly improved by their combination with ILs, scCO<sub>2</sub>,

ILs/scCO<sub>2</sub> and/or DESs, allowing smart designs of integrated synthesis/separation processes with more sustainable approaches.

ILs are non-aqueous solvents, which have demonstrated an extraordinary capacity to stabilize enzymes, even improving their activity in biotransformations when they are used as reaction medium. Thus, the combination of ILs with biocatalysts has emerged as a potent toolbox for developing cleaner and green chemical processes in industry. In this regard, hydrophobic ILs which show a sponge-like behaviour (SLILs) results greatly interesting because of their thermoregulable response that allows the design of easy and clean protocols for products separation, based on straightforward cooling/centrifugation steps, which results in the easy recovery of the biocatalyst/IL system for further reuse.

DESs are another class of green solvents employed in this memory, since it has been shown their suitability for a wide variety of applications, especially as a reaction medium, co-solvent or as a substrate and solvent at the same time. In addition, the ability of some DESs to stabilize enzymes has been demonstrated. In this sense, a wide range of enzymes has successfully been employed for biotransformation in DESs, highlighting the combination of DESs with lipases for the synthesis of esters by direct esterification and/or transesterification. However, these reactions present several challenges, since they are usually carried out in DESs composed of alcohols and/or carboxylic acids, that could be in competition with the substrates of the desired biotransformation.

According with the Principles of Green Chemistry, the development of sustainable processes requires the design of reaction systems that allow the reuse of the IL/biocatalyst system for long operation time. In this sense, the main aim of this work has been the application of SLILs and DESs technology for integrating the synthesis of products with cosmetic and/or cosmeceutical applications (panthenyl monoacyl esters and fragrance esters) and biofuels with the subsequent product separation, demonstrating the stability of the biocatalyst/SLIL system during long operation time.

Being defined the aims of this work in Chapter III, Chapter IV is focused on the implementation of both the SLILs and the DES technologies towards the selective synthesis of panthenyl monoesters. Panthenol, also called pro-vitamin B5, exhibits therapeutic, cosmetic and cosmeceutical properties, but due to its high hydrophilicity, its residence time in the skin and hair is very short. Panthenol esters remain longer in the

skin, improving its application as a cosmeceutical agent. In this sense, the combination of different ILs with a lipase has been evaluated herein to carry out the selective synthesis of panthenyl monoacyl esters by both direct esterification of fatty acids with panthenol and transesterification, using different acyl donors. The results obtained from this study allowed to reach the biocatalytic synthesis of panthenyl monoacyl esters with high yield and selectivity when ILs based on the cation imidazolium ( $[Xmim]^+$ ) and the anions  $[BF_4]^-$  and  $[NTf_2]^-$  were used as reaction media, and aliphatic vinyl esters as acyl donor. However, it should be taken into account that the esterification reaction constitutes a cleaner strategy with respect to the transesterification one, since natural compounds (*e.g.* aliphatic carboxylic acid) are directly used as substrates (against the ester derivatives used for transesterification, which should be chemically prepared), as well as because the reaction by-product of the esterification reaction is water. This work also proposes a protocol for separating the products from the IL- $[C_{12}mim][BF_4]$  reaction medium, obtaining panthenyl monoacyl esters almost IL free (*e.g.* 3.5% w/w in panthenyl monolaurate phase), with the subsequent recovery and reuse of the enzyme/IL system.

In this chapter, it was firstly demonstrated the ability of panthenol to form eutectic mixtures with fatty acids. Furthermore, it has also been demonstrated how these DESs, composed by a mixture of substrates from natural resources, were excellent reaction medium for carrying out the biocatalytic synthesis of panthenyl monoacyl esters, obtaining panthenyl monoacyl esters at high yield (>80%) and selectivity (>93%). It should be highlighted that these DESs are just composed of the substrates for the esterification reaction themselves, and therefore it is considered that the reaction occurs in the absence of any additional solvent. The ability of the designed DESs to maintain the native structure of the enzyme has also been demonstrated in this work, since the biocatalyst remained active during seven operational cycles of reuse for panthenol monoester production. The developed methodology can be considered as a clean and useful process for the sustainable industrial scaling up of panthenyl acyl ester production, since the product obtained can be directly incorporated into cosmetic formulations, without requiring separation steps.

The SLILs technology was also applied in Chapter V, being the aim of this chapter the development of an integral protocol for the synthesis/separation of sixteen flavour esters by direct esterification of aliphatic acids (*e.g.* acetic, propionic, etc.) with an alcohol (*e.g.* cinnamyl alcohol, benzyl alcohol, anisyl alcohol, rac-1-phenylethanol, or rac-sulcatol),

the main aim of this chapter. For this purpose, different SLILs were studied as a reaction medium and the different parameters that affect to the biocatalytic synthesis were optimized (*e.g.* substrates molar ratio, nature of the SLILs, etc.). Taking into account the unique sponge-like properties of these ILs and the excellences of membrane filtration technology, a separation protocol based on the centrifugation of the solid IL/flavour ester mixture through nylon membranes was successfully designed. By means of this approach, the clean separation of all flavour products from the solid reaction media was easily achieved (>95% extraction yield), while the recovered biocatalyst/SLIL system was successfully reused for six consecutive operational cycles. It is important to point out the renewable origin of all the substrates. Thus, this methodology opens the doors to a new pathway to produce “natural” flavours and fragrances in a sustainable and suitable approach to be developed at industrial level.

Chapter VI is devoted to the application of biocatalysis/SLIL technology to the production of green biofuels. Taking into account the limited energy reserves and the increasing environmental pressure on greenhouse gases from fossil fuels, biodiesel has been pointed as an alternative source of non-toxic, biodegradable and renewable fuel, as it significantly reduces emissions of greenhouse gases and particles. In addition, the raw materials used for the synthesis of biodiesel usually come from renewable sources (*e.g.* animal's or vegetable's fats). However, the use of non-edible biomass resources (*e.g.* microalgae) for producing biofuels is key target with regards to the social and economic impact of the use of biofuels in the near future.

Thus, in Chapter VI, binary mixtures of ILs have been used for developing one-pot system suitable for the direct extraction and biocatalytic transformation of microalgae oil into biodiesel without prior isolation. Usually, the synthesis of biodiesel is carried out by the transesterification between an oil and an alcohol (*e.g.* methanol). However, one of the main drawbacks of this process is derived from the low miscibility between both substrates and the deactivating nature of methanol that leads to a loss in enzymatic activity and stability. In this sense, taking into account the excellent suitability of the SLILs (*e.g.* [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]) to carry out the biocatalytic synthesis of biodiesel and the ability of [Bmim][Cl] IL for dissolving cellulosic biomass, different binary mixtures of ILs were evaluated for the extraction of microalgae oils (from *Chlorella vulgaris* or *Chlorella protothecoides* microalgae) and the *in situ* biodiesel synthesis. The developed methodology resulted in a fast and efficient biodiesel synthesis when a

[C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>]:[Bmim][Cl] (95:5 v/v) mixture was employed, and the subsequent cooling/centrifugation protocol at controlled temperatures led to the separation of the algae biodiesel from the IL/biocatalyst system, which was recovered and reused for five operational cycles.

The developed methodologies in this work can be considered as a stepforward in the development of a more sustainable industry, since they propose clean protocols that integrate biocatalytic synthesis and separation of products, with low energy consumption (*e. g.* temperature, pressure, etc.), avoiding the generation of by-products and maximizing the atom economy of the processes. In addition, in all the proposed strategies, the biocatalyst or the biocatalyst/IL system can be easily recovered and reused for further production cycles, reducing the economic cost of the processes. These methodologies are based on the Intensification Processes strategy, which allows the chemical process simplification, considerably improving their sustainability.

As conclusion, this PhD memory clearly demonstrates by several examples how green and sustainable chemical approaches of extraction, transformation and separation of added value materials can easily be carried out by combining both the enzyme and green solvents technologies. The unique ability of Sponge-Like Ionic Liquids and DES, as temperature switchable liquid/solid phase systems, opens up new sustainable platforms for the chemical synthesis and separation of products. The implementation of all these features in multi-enzymatic and/or multi-chemoenzymatic chemical transformations, mimicking the metabolic pathways found in nature, as well as the isolation of pure products by means of an easy and clean approach is a dream that is becoming closer, since the door to a true green chemical industry is quite open.



## LISTADO DE ABREVIATURAS MÁS EMPLEADAS

**BSTFA:** N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

**CALA:** Lipasa A de *Candida antarctica*

**CALB:** Lipasa B de *Candida antarctica*

**CG:** Cromatografía de Gases

**COVs:** Compuestos orgánicos volátiles

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

**DEP:** Diéster de pantenol

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

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

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

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

**IL:** Líquido iónico (del inglés, *Ionic Liquid*)

**MEP:** Monoéster de pantenol

**MS:** Molecular sieves

**NADES:** Disolvente eutéctico profundo natural (del inglés, *Natural Deep Eutectic Solvent*)

**RMN:** Resonancia magnética nuclear

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

**ScCO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono supercrítico (del inglés, *Supercritical Carbon Dioxide*)

**SCFs:** Fluidos supercríticos (del inglés, *Supercritical Fluids*)

**SF:** Medio libre de disolvente (del inglés, *Solvent Free*)

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

**TMSC:** Trimetilclorosilano

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

**[C<sub>12</sub>mim][BF<sub>4</sub>]:** Tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio

**[C<sub>10</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]:** Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-decil-3-metilimidazolio

**[C<sub>12</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]:** Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-dodecil-3-metilimidazolio

**[C<sub>14</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]:** Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-tetradecil-3-metilimidazolio

**[C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]:** Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-hexadecil-3-metilimidazolio

**[C<sub>18</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]:** Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-octadecil-3-metilimidazolio

**[C<sub>10</sub>tma][NTf<sub>2</sub>]:** Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de deciltrimetilamonio

**[C<sub>12</sub>tma][NTf<sub>2</sub>]:** Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de dodeciltrimetilamonio

**[C<sub>14</sub>tma][NTf<sub>2</sub>]:** Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de tetradeciltrimetilamonio

**[C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>]:** Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de hexadeciltrimetilamonio

**[C<sub>18</sub>tma][NTf<sub>2</sub>]:** Bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de octadeciltrimetilamonio

**[C<sub>16</sub>tma][PF<sub>6</sub>]:** Hexafluorofosfato de hexadeciltrimetilamonio



## Índice

Summary.....	i
Listado de abreviaturas más empleadas.....	ix
Índice.....	xi
<b>Capítulo I. Hacia una química más sostenible: una alternativa creíble</b>	<b>1</b>
1. Química sostenible: bases para un desarrollo sostenible .....	3
2. Disolventes neotéricos .....	7
3. Enzimas: catalizadores naturales .....	26
4. Conclusiones.....	36
5. Referencias .....	36
<b>Capítulo II. Procesos biocatalíticos limpios en disolventes neotéricos</b>	<b>45</b>
1. Introducción.....	47
2. Enzimas en medios no acuosos .....	47
3. Biocatálisis y líquidos iónicos .....	51
4. Estrategias integradas de reacción y separación basadas en líquidos iónicos .....	55
5. Biocatálisis y disolventes eutécticos profundos .....	68
6. Conclusiones.....	74
7. Referencias .....	75
<b>Capítulo III. Objetivos</b>	<b>83</b>
<b>Capítulo IV: Síntesis biocatalítica de monoésteres de pantenilo en líquidos iónicos y mezclas eutécticas profundas</b>	<b>89</b>
1. Resumen .....	91
2. Introducción.....	91
3. Parte experimental .....	95
4. Resultados y discusión .....	101
5. Conclusiones.....	113
6. Referencias .....	115
<b>Capítulo V: Diseño de un protocolo limpio para la síntesis/separación de ésteres de aromas en líquidos iónicos tipo esponja</b>	<b>119</b>
1. Resumen .....	121
2. Introducción.....	121
3. Parte experimental .....	124
4. Resultados y discusión .....	128
5. Conclusiones.....	142
6. Referencias .....	143
<b>Capítulo VI: Diseño de un proceso integrado de síntesis enzimática y separación de biodiesel a partir de microalgas en líquidos iónicos tipo esponja</b>	<b>145</b>
1. Resumen .....	147
2. Introducción.....	147
3. Parte experimental.....	150
4. Resultados y discusión .....	154
5. Conclusiones.....	160
6. Referencias .....	161
<b>Chapter VII: Conslusiones/Conclusions</b>	<b>165</b>
1. Conclusiones.....	167
2. Conclusions .....	170



# **CAPÍTULO I:**

## **“Hacia una química más sostenible: Una alternativa creíble”**



*“La ciencia no es solo una disciplina de razón, sino también de romance y pasión”*

*Stephen Hawking*



## 1. QUÍMICA SOSTENIBLE: BASES PARA UN DESARROLLO SOSTENIBLE

---

La Química es la ciencia que estudia la composición y las propiedades de la materia y de las transformaciones que ésta experimenta sin que se alteren los elementos que la forman. Es por ello que la Química no solo explica las bases de la vida, sino que desde su origen se ha convertido en el motor que ha hecho avanzar a la Humanidad. Esta ciencia contribuye a la mejora continua de la esperanza y calidad de vida del hombre, así como al desarrollo económico de un país. Su permanente evolución ha permitido elevar el nivel de bienestar social. La Química nos aporta los fármacos con los que curamos las enfermedades, alimentos, agua potable, abonos e insecticidas que han contribuido a la mejora de las producciones agrícolas, combustibles, productos de higiene y belleza, nuevos materiales, altas tecnologías de comunicación, etc. Nuestra calidad de vida depende totalmente de la Química, y la Química está llamada a seguir desempeñando un papel protagonista para afrontar los grandes desafíos de la humanidad y aportar las soluciones adecuadas a nuestras necesidades, basadas en criterios de sostenibilidad en el futuro inmediato [1,2].

El permanente avance de la Química y sus aplicaciones directas a la sociedad durante el siglo XX ha permitido tanto el incremento de la población mundial, como el incremento de la esperanza de vida en los países desarrollados. Sin embargo, hay muchas evidencias de cómo el mal uso de la Química, su uso irresponsable y la obtención de beneficio económico como único objetivo en algunos desarrollos industriales, han generado un importante impacto medioambiental de marcado rechazo social.

No obstante, tal y como reza el código de conducta de la *American Chemical Society* (ACS), "*los químicos tienen como responsabilidad profesional servir al interés público, al bienestar y al avance del conocimiento científico, preocuparse de la salud y el bienestar de sus compañeros, consumidores y la comunidad, comprender y anticiparse a las consecuencias medioambientales de su trabajo, evitar la polución y de proteger el medioambiente*" [3].

La Química Sostenible nació en la década de los noventa, como una filosofía enfocada al diseño de productos y procesos químicos que impliquen la reducción o eliminación de sustancias nocivas para el ser humano o el medio ambiente. De hecho, la Química

Sostenible surgió de la idea de que el desarrollo económico podría conducir a un deterioro en la calidad de vida, en vez de a una mejora. De ahí, la definición de Desarrollo Sostenible proporcionada por el informe Brundtland de la Comisión de las Naciones Unidas sobre medioambiente y desarrollo (1987): “*Desarrollo capaz de satisfacer las necesidades actuales sin comprometer la capacidad de las futuras generaciones para satisfacer sus propias necesidades*” [4].

Sin embargo, el término “Química Sostenible” es un concepto que en ocasiones se confunde con Química Verde. El término “sostenible” en el contexto de la química, conlleva la obligación ética de contribuir al desarrollo y bienestar del planeta sin afectar a las futuras generaciones. Para lograr este objetivo, un proceso sostenible debe incluir siempre que sea posible [2,5,6]:

- a) El empleo de recursos renovables de manera razonable, con una velocidad de consumo que no afecten a su suministro a largo plazo.
- b) La generación y disipación de residuos a velocidades tales que la naturaleza pueda asimilarla.

Por su parte, la misión de la Química Verde es “promover tecnologías químicas innovadoras que reduzcan o eliminen el uso o generación de sustancias dañinas en el diseño, fabricación y uso de productos químicos” [5]. Con este objetivo, la Agencia de Protección de Medioambiente (EPA, del inglés *Environmental Protection Agency*), en conjunto con la Sociedad de Química Americana, desarrolló la Química Verde, atendiendo a los doce principios que establecieron Paul T. Anastas y John C. Warner en 1998 (**Tabla 1**). Estos principios constituyen un marco de referencia para el diseño de productos que se aplican en todos los puntos del ciclo de vida del proceso, comenzando por la materia prima empleada y finalizando por la eficiencia y seguridad de la transformación química, teniendo en cuenta la toxicidad y biodegradabilidad de los reactivos empleados y los productos generados [7].

**Tabla 1.** Los doce principios de la Química Verde establecidos por Paul T. Anastas y John C. Warner [7].

<b>PRINCIPIOS DE LA QUÍMICA VERDE</b>	
<b>1. Prevención</b>	Prevención de la generación de residuos en lugar de tratarlos tras su formación.
<b>2. Eficiencia atómica</b>	Diseño de metodologías que incorporen todas las sustancias de partida en el producto final.
<b>3. Síntesis segura</b>	Diseño de metodologías sintéticas que sean seguras y no generen sustancias con baja toxicidad humana y mediambiental.
<b>4. Productos seguros</b>	Diseño de productos químicos que presenten baja toxicidad manteniendo la eficacia de su función.
<b>5. Disolventes seguros</b>	Evitar en la medida de lo posible el empleo de sustancias auxiliares o usar sustancias lo más inocuas posible.
<b>6. Eficiencia energética</b>	Las necesidades energéticas deben ser consideradas en relación a sus impactos ambientales y económicos, diseñando siempre que sea posible metodologías sintéticas a presión y temperatura ambiente.
<b>7. Fuentes renovables</b>	Siempre que sea viable técnica y económicamente se deben emplear sustancias de partida renovables.
<b>8. Evitar derivados</b>	Siempre que sea posible, se debe evitar el empleo de procesos que impliquen la formación de derivados (p. ej. bloqueo de grupos, protección/desprotección).
<b>9. Catalizadores</b>	Los reactivos catalíticos son superiores a los estequiométricos.
<b>10. Biodegradabilidad</b>	Diseño de productos químicos que, tras finalizar su función no persistan en el medio ambiente.
<b>11. Prevención de la polución</b>	Diseño de metodologías analíticas que permitan monitorizar a tiempo real, la formación de sustancias peligrosas.
<b>12. Prevención de accidentes</b>	Minimización de la posibilidad de accidentes mediante la apropiada selección del proceso químico y de las sustancias a emplear.

Los doce principios de la Química Verde han llegado a ser ampliamente aceptados como un código universal de buenas prácticas, ya que este movimiento se ha extendido desde Estados Unidos a Europa, Australia y Asia, y comienza a formar parte de los objetivos estratégicos de muchos sectores productivos (p. ej. industria cosmética). Esto evidencia que estos principios abarcan un concepto de sostenibilidad, mucho más amplio que la simple prevención de la contaminación [2].

Teniendo en cuenta lo mencionado hasta el momento, cabe destacar el creciente interés de la industria química por desarrollar no solo productos, sino también nuevos procesos de síntesis que superen las restricciones que actualmente condicionan su actividad, proponiendo soluciones dentro del marco del desarrollo sostenible. Es decir, que conlleven una mejora para la salud, seguridad y disminución del daño medioambiental, teniendo en cuenta además la variable socioeconómica. Para ello, también es necesario evaluar dichos procesos a largo plazo (para lo que se han introducido nuevos parámetros que aluden a la estequiometría del proceso, como son la “economía atómica” y el “factor

E”) [8], así como su interacción con la naturaleza, actuando con medidas correctoras cuando sea necesario. Por lo tanto, esta perspectiva de Química o Desarrollo sostenible requiere que se entienda una nueva relación entre industria y medioambiente [2].

Durante el siglo XIX, con la aparición de los disolventes orgánicos, se inició el estudio de reacciones que hasta el momento se encontraban vetadas por las limitadas cualidades del agua como disolvente. El empleo masivo de disolventes orgánicos volátiles en los múltiples desarrollos industriales ha generado un continuo deterioro ambiental (p. ej. aire, aguas, terrenos, etc.), como consecuencia de la ausencia de legislaciones y/o estrategias de recuperación y reutilización. Adicionalmente, la baja eficiencia y selectividad de muchas transformaciones químicas desarrolladas a nivel industrial, también se ha visto reflejada en el deterioro medioambiental, como consecuencia de la formación y acúmulo de productos indeseados.

En este sentido, la implementación técnica de los fundamentos de la Química Verde se ha venido sustentando en tres grandes pilares, a saber:

- I) La búsqueda y empleo de disolventes no acuosos sostenibles, también llamados disolventes verdes, preferencialmente procedentes de fuentes renovables, y que puedan ser totalmente recuperados y reutilizados (p. ej. líquidos iónicos, fluidos supercríticos, disolventes eutécticos profundos, etc).
  
- II) El empleo de (bio)catalizadores químicos con alto nivel de selectividad y especificidad para las transformaciones catalizadas, que sean fácilmente recuperables y reutilizables, y eviten la generación de subproductos en los procesos industriales. En este sentido, la naturaleza ha sido la principal fuente de inspiración para los químicos, ya que cualquier sistema vivo constituye un repertorio completo de transformaciones químicas. Así, el empleo de enzimas (catalizadores de las transformaciones químicas de la vida) en las transformaciones químicas de aplicación industrial, es una realidad que avanza a pasos agigantados [6,9]. Las excelentes propiedades de estos biocatalizadores (p. ej. biodegradabilidad, biocompatibilidad, etc.) y la alta selectividad (p. ej. enantio-, regio-, diastereoselectividad, etc.), impactan de modo muy positivo con diversos principios de la Química Verde (ver **Tabla 1**), posibilitando el desarrollo de metodologías químicas eficientes y aplicables a nivel industrial [7,10].



**III)** La integración de las etapas de transformación y de separación, mediante la estrategia denominada Intensificación de Procesos. Esta estrategia no solo permite la simplificación de los procesos químicos, sino que también determina una mejora considerable de la sostenibilidad de los mismos. La Intensificación de Procesos tiene por objetivo el desarrollo de procesos más seguros y más eficientes energéticamente, reduciendo el tamaño de los equipos y los costes de operación. Además, promueve la generación de una menor cantidad de residuos y la obtención de la mayor cantidad de productos con menor consumo de materia prima, lo que redundaría directamente en la implementación de diversos principios de la Química Verde [11].

## **2. DISOLVENTES NEOTÉRICOS**

---

La liberación de compuestos orgánicos volátiles (COVs) a la atmósfera constituye un gran problema medioambiental y para la salud de los seres vivos. A modo de ejemplo, en 2011 se liberaron 12.3 toneladas de COVs en EE.UU. [12]. Esto ha dado lugar a un creciente interés en la creación de una industria más prudente con el medio ambiente, centrándose en la búsqueda de nuevos medios de reacción que permitan diseñar procesos más sostenibles, respondiendo a las demandas de la sociedad [6,13]. En este sentido, los líquidos iónicos, los disolventes eutécticos profundos y los fluidos supercríticos, especialmente el dióxido de carbono supercrítico, son los disolventes neotéricos que más atención han recibido a nivel académico e industrial como alternativas al empleo de COVs [6,10].

### **2.1. Líquidos iónicos**

Los líquidos iónicos (ILs, del inglés, *Ionic Liquids*) son sales compuestas por cationes orgánicos y aniones orgánicos o inorgánicos, que son líquidas a temperaturas moderadas, normalmente inferiores a 100°C, incluso a temperatura ambiente [14].

El primer IL fue descubierto por Welton en 1914 [15], quien describió las propiedades fisicoquímicas del nitrato de etilamonio ( $[C_2H_5NH_3]NO_3$ ) a través de la reacción de la etilamina con ácido nítrico concentrado, resultando en una sal con un punto de fusión de 12 °C. Sin embargo, este descubrimiento no presentó gran interés para los científicos hasta la segunda mitad del siglo XX, cuando se fueron conociendo sus propiedades como

líquidos y se planteó la posibilidad de emplear estos ILs como medios en los que efectuar reacciones químicas.

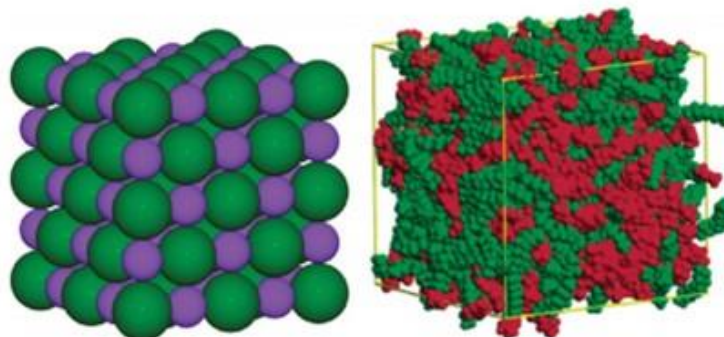
Los resultados preliminares obtenidos en diferentes reacciones químicas en ILs impulsaron el interés en la síntesis de este tipo de compuestos, utilizando diferentes precursores de especies catiónica y aniónica. Esto puso de manifiesto la capacidad de modular las propiedades de los ILs en base a la selección de sus constituyentes, lo que convierte a estas sales en una herramienta muy versátil [13]. Por ejemplo, se pueden obtener ILs totalmente miscibles, parcialmente miscibles o inmiscibles en agua, dependiendo del anión empleado (p. ej.  $\text{Cl}^-$ ,  $[\text{PF}_6]^-$ ). De forma similar, se puede modular la lipofilidad de un IL mediante la selección de la especie catiónica. Además, los ILs suelen ser inmiscibles con alcanos y otros disolventes orgánicos no polares, dando lugar a la formación de sistemas bifásicos de reacción y/o separación de productos [16].

Teniendo en cuenta las particularidades que presentan los ILs, éstos se muestran como una alternativa muy interesante a los COVs en una amplia variedad de procesos químicos industriales, empleándose como solventes en reacciones químicas, procesos de separación, extracción de compuestos, etc. [17]. Además, presentan multitud de aplicaciones (p. ej. aditivos de lubricación, electrolitos en baterías, células de combustible, recuperación de combustible nuclear, etc.) [18,19]. Es por ello que su estructura está siendo ampliamente estudiada, ya que la modificación de la misma puede traducirse en una variación en las propiedades fisicoquímicas, abriendo el campo de estudio a una nueva generación de disolventes de diseño. Sin embargo, también ha despertado un gran interés el estudio del posible efecto negativo (p. ej. toxicidad, biodegradabilidad, etc.) que pueda tener la utilización de estos disolventes en la industria química [20].

### **2.1.1. Estructura de los líquidos iónicos**

Los ILs son sales formadas por una especie catiónica orgánica y un anión orgánico o inorgánico. Sin embargo, gracias a la estructura asimétrica del catión, los ILs presentan baja tendencia a cristalizar. Esta es la principal diferencia entre los ILs, principalmente aquellos compuestos por cationes de imidazolio, y las sales convencionales. Además, la presencia de una red cooperativa de enlaces de hidrógeno entre las especies catiónicas y aniónicas de los ILs induce una direccionalidad estructural (“efecto entrópico”). Por el

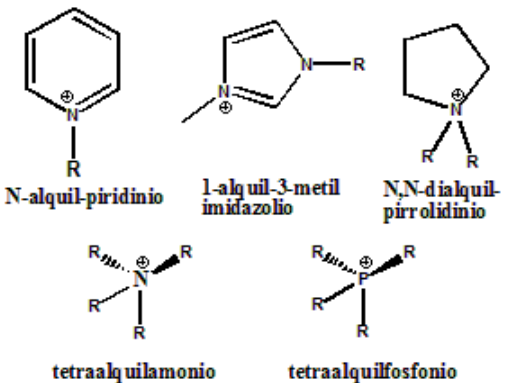
contrario, las sales clásicas están formadas solamente por enlaces iónicos (ver **Figura 1**) [18].



**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura tridimensional de un cristal iónico que muestra un ordenamiento estructural clásico (izquierda) y un IL 1-alkil-3-metilimidazolio (derecha) que presenta dominios polares (rojo) y apolares (verde) [18].

Mediante la apropiada selección de las especies iónicas se pueden modificar las propiedades fisicoquímicas de los ILs, siendo el anión el responsable de propiedades como la estabilidad en aire o agua y el catión el responsable de propiedades como la temperatura de fusión y la solubilidad de compuestos orgánicos. Es por ello, que se les considera “disolventes de diseño”, ya que se puede diseñar un IL con las propiedades deseadas para una aplicación concreta [17]. En la **Figura 2** se muestran las estructuras de algunos cationes y aniones que componen los ILs más comunes. Teniendo en cuenta la combinación de los cationes y aniones conocidos hasta la fecha, Plechkova y Seddon estimaron la existencia de más de un millón de ILs [21].

La mayoría de los ILs están basados en cationes imidazolio, piridinio, amonio, fosfonio, sulfonio, priazolio y oxazolio (**Figura 2**) [17]. Estos cationes suelen ser orgánicos y voluminosos, que además presentan baja simetría, la cual proporciona a los ILs bajos puntos de fusión. A su vez, la longitud del catión puede modular el punto de fusión [16].

Cationes comunmente empleados	Aniones comunmente empleados
 <p>N-alkuil-piridinio      1-alkuil-3-metilimidazolio      N,N-dialquil-pirrolidinio</p> <p>tetraalquilamonio      tetraalquilfosfonio</p>	<p>No miscibles en agua <math>\longrightarrow</math> Miscibles en agua</p> <p><math>[\text{PF}_6]^-</math>      <math>[\text{BF}_4]^-</math>      <math>[\text{Cl}]^-, [\text{Br}]^-, [\text{I}]^-</math></p> <p><math>[\text{N}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2]^-</math>      <math>[\text{TFO}]^-</math>      <math>[\text{CH}_3\text{CO}_2]^-</math></p> <p>   <math>[(\text{CN})_2\text{N}]^-</math>      <math>[\text{Al}_2\text{Cl}_7]^-</math></p> <p>   <math>[\text{CF}_3\text{SO}_2]^-</math>      <math>[\text{NO}_3]^-</math></p>

**Figura 2.** Algunas combinaciones comunes de cationes y aniones presentes en los ILs [21].

La selección del anión apropiado da lugar a una amplia variedad de ILs con diferentes propiedades físicoquímicas, (p. ej. hidrofobicidad, viscosidad, densidad y capacidad de solvatación de estas sales). De esta forma, en función del anión que componen estas sales, se pueden diferenciar fundamentalmente los siguientes grupos de ILs [17].

- Sistemas basados en  $\text{AlCl}_3$  y sales orgánicas.** Representan los ILs de “primera generación” cuya acidez de Lewis puede variar según la cantidad relativa de sal orgánica/ $\text{AlCl}_3$ , siendo ácidos cuando se emplea un exceso molar de  $\text{AlCl}_3$ , básicos cuando se emplea un exceso de sal orgánica y neutros cuando ambas especies se presentan en relación equimolar. Estos ILs se caracterizan por ser extremadamente higroscópicos y por ello, su manejo se restringe a atmósferas secas.
- Sistemas basados en aniones como  $[\text{PF}_6]^-$ ,  $[\text{BF}_4]^-$  y  $[\text{SbF}_6]^-$ .** Estos ILs se caracterizan por ser casi neutros y estables al aire, aunque presentan el inconveniente de que reaccionan exotérmicamente con ácidos fuertes de Lewis, como el  $\text{AlCl}_3$  y con agua.
- Sistemas basados en aniones como  $[\text{SO}_3\text{CF}_3]^-$ ,  $[\text{N}(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2]^-$  y  $[\text{NTf}_2]^-$ .** Se caracterizan fundamentalmente por presentar una mayor estabilidad frente a muchas reacciones químicas, además de presentar bajos puntos de fusión, baja viscosidad y altas conductividades. Estas propiedades y la alta estabilidad se han atribuido a la deslocalización de la carga negativa en el núcleo S-N-S [22].

- d) Sistemas basados en aniones como alquilsulfatos y alquilsulfonatos.** Los ILs basados en este tipo de aniones se caracterizan por ser relativamente baratos y por no contener átomos de flúor. Además, se obtienen fácilmente bajo condiciones suaves de reacción y presentan una amplia ventana electroquímica y elevada estabilidad al aire.
- e) Sistemas basados en aminoácidos como aniones.** En los últimos años, ha crecido enormemente el interés por la obtención de ILs que no sean tóxicos y que se obtengan a partir de fuentes renovables. En este sentido, los aminoácidos se muestran como una excelente fuente de partida para la obtención de nuevos ILs, especialmente para su uso en síntesis (bio)catalítica. La colina es un componente esencial y biodegradable, que se encuentra en la naturaleza y que además no es tóxico. Hasta la fecha se han desarrollado diferentes ILs compuestos por colina y diferentes aminoácidos. Se ha observado que estos bio-ILs muestran unas excelentes propiedades fisicoquímicas que los proponen como unos disolventes muy prometedores para la extracción selectiva de la lignina de la lignocelulosa, ampliando el campo de aplicación de la lignocelulosa [23]. Por ejemplo, estos ILs se han empleado en el tratamiento de la paja del arroz, para la extracción de la lignina, observándose una mejora considerable de la velocidad y el grado de sacarificación de los residuos de arroz (p. ej. <90% para la celulosa y <60% para la xilanos) [24]. Además, la posterior hidrólisis enzimática del arroz pretratado con celulasas y xilanasas de *Trichoderma reesei* proporcionó glucosa y xilosa con rendimientos superiores al 80 y 30%, respectivamente. Por otro lado, cabe destacar que estos ILs muestran muy baja o nula toxicidad y son biodegradables [24].

La estructura tridimensional de los ILs ha sido ampliamente estudiada mediante técnicas espectroscópicas. Por ejemplo, se ha observado mediante espectroscopía de rayos X que los ILs que contienen el catión 1,3-dialquilimidazolio en su estructura, forman redes extendidas de cationes y aniones conectadas mediante enlaces de hidrógeno donde la unidad monomérica consiste en un catión imidazolio rodeado de al menos tres aniones y viceversa. Además, estas redes adoptan mayoritariamente dos ordenaciones tridimensionales: 1) formada por largas cadenas de anillos imidazolio entre las que se acomodan las cadenas de aniones y 2) formada por cadenas o columnas de cationes y aniones alternos. En ambos casos se generan volúmenes “huecos” que proporcionan “nano” regiones polares y apolares con un alto grado de direccionalidad. Además, se ha

observado la presencia de enlaces de hidrógeno entre cationes imidazolio y aniones (p. ej. [BMI][PF<sub>6</sub>] y [BMI][BF<sub>4</sub>]) mediante técnicas espectroscópicas [25]. Así, Dupont et al. [26,27], demostraron que incluso interacciones débiles C-H promueven la direccionalidad estructural en estas sales.

### **2.1.2. Propiedades de los líquidos iónicos**

Las propiedades de los ILs derivan de su composición y estructura. Describir y generalizar las propiedades de los ILs no es una tarea fácil ya que algunas de ellas, como la ventana electroquímica y la estabilidad térmica a largo plazo, están sujetas a debate. Además, la presencia de algunas impurezas como el agua, solventes orgánicos o ciertos aniones (p. ej. Cl<sup>-</sup>) pueden afectar a sus propiedades fisicoquímicas. No obstante, de forma genérica, las propiedades fisicoquímicas de los ILs son:

#### **a) Bajo punto de fusión:**

De forma general se acepta que los ILs presentan temperaturas de fusión inferiores a 100 °C, siendo muchos de ellos líquidos a temperatura ambiente. No obstante, el punto de fusión de muchos de ellos puede estar sujeto a modificación dependiendo de si éste se somete a un proceso de súper-enfriamiento y debido a la posible presencia de impurezas.

El punto de fusión de los ILs está fuertemente relacionado con la estructura y la composición química de los mismos, de tal forma, que un incremento en el tamaño de la especie aniónica conduce a una disminución en el punto de fusión del IL y éste aumenta con el incremento en la cadena alquílica de la especie catiónica [17]. Además, de forma general se puede afirmar que la deslocalización de las cargas y la existencia de puentes de hidrógeno conducen a un incremento en el punto de fusión del IL [21].

#### **b) Baja presión de vapor/volatilidad:**

Los ILs presentan una presión de vapor casi nula, incluso a temperaturas muy elevadas. Es por ello que se consideran disolventes no volátiles, generando un gran interés como solventes en el contexto de la Química Verde. Además, se descomponen antes de evaporarse, por lo que no contribuyen a la contaminación medioambiental por liberación de gases [28]. Esta baja presión de vapor también evita que sean inflamables a temperaturas superiores a la temperatura ambiente. Sin embargo, cuando se emplean a

muy elevadas temperaturas hay que tener en cuenta la posible liberación de vapores o productos de descomposición.

**c) Elevada estabilidad térmica:**

Por lo general, la mayoría de los ILs son estables a temperaturas superiores a 350 °C. Por ejemplo, [Emim][BF<sub>4</sub>], [Bmim][BF<sub>4</sub>] y 1,2-dimetil-3-propilimidazolio bis(trifluorosulfonil)imida son estables a temperaturas superiores a 420 °C, aunque la mayoría de los ILs solo toleran estas temperaturas tan elevadas durante cortos periodos de tiempo. Los ILs con baja estabilidad térmica son aquellos que presentan la estructura [Emim][X], donde X= [NTf<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, [Ms<sub>2</sub>N]<sup>-</sup>, y Br<sup>-</sup>. Además, los ILs basados en cationes fosfonio se descomponen liberando productos volátiles con mucha facilidad. Sin embargo, aquellos que están basados en cationes nitrogenados no descomponen tan fácilmente. Sin embargo, se ha observado que a medida que aumenta la hidrofiliidad de la especie aniónica, la estabilidad térmica estos ILs disminuye [29].

**d) Densidad:**

La densidad es una de las propiedades más estudiadas de los ILs, probablemente debido a que casi todas las aplicaciones requieren de su conocimiento. Por lo general, los ILs presentan una densidad mayor a la mayoría de los disolventes orgánicos y al agua, variando ésta en el rango entre 1-1,6 g/cm<sup>3</sup> [17]. Esta propiedad está estrechamente relacionada con la naturaleza de la especie catiónica, de tal forma que disminuye al incrementar su volumen o la longitud de su cadena alquílica. Por otro lado, la masa molar de la especie aniónica también afecta significativamente a esta propiedad de los ILs. Por ejemplo, las especies con [Ms<sub>2</sub>N]<sup>-</sup> presentan menor densidad que las sales compuestas por [NTf<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, ya que, aunque el volumen del anión sea similar, la masa molar del flúor es mayor.

Este comportamiento se atribuye al hecho de que el empaquetamiento se vuelve más compacto cuando el tamaño de las especies catiónica y aniónica es más uniforme [29].

**e) Viscosidad**

Uno de los mayores obstáculos en el empleo de los ILs surge de su elevada viscosidad, ya que puede producir una reducción en la velocidad de las reacciones orgánicas, así como en la velocidad de difusión de las especies redox. Además, la viscosidad de los ILs es

normalmente superior a la viscosidad de los disolventes convencionales y decrece con el incremento de la temperatura.

Se ha observado que el incremento de la viscosidad está relacionado con las fuerzas de Van der Waals, así como de los enlaces de hidrógeno y fuerzas electrostáticas entre ambas especies iónicas. Cabe destacar también, la influencia de la simetría del anión inorgánico, de tal forma que la viscosidad disminuye al disminuir el grado de simetría (p. ej.  $\text{Cl}^- > [\text{PF}_6]^- > [\text{BF}_4]^- > [\text{NTf}_2]^-$ ) [29].

#### **f) Polaridad**

La clave de un líquido que se va a emplear como solvente son las propiedades que determinan cómo interactuará con los solutos. En disolventes moleculares, la polaridad se expresa a través de su constante dieléctrica. Sin embargo, este parámetro no se puede utilizar en la caracterización cuantitativa de la polaridad de los ILs, haciendo que su determinación sea bastante compleja, ya que depende en parte de la estructura del IL [29].

De forma general, las medidas solvatocrómicas indican que la polaridad de los ILs es similar a la que se observa en disolventes moleculares polares como el etanol o la formamida [30]. Sin embargo, debido a que los ILs se pueden considerar nanomateriales con regiones polares y apolares, se ha descrito que estas sales también son capaces de comportarse como disolventes apolares con solutos apolares o como disolventes polares con solutos polares [31-33].

#### **g) Conductividad y propiedades electroquímicas**

Una propiedad muy atractiva de los ILs es su conductividad, en base a la cual éstos se pueden comportar como disolventes y como electrolitos en las reacciones electroquímicas [34]. Debido a que los ILs están compuestos completamente por iones, cabría esperar que éstos presentaran una conductividad más elevada si solo se tuviera en cuenta la alta concentración de iones y éstos estuvieran libres para moverse independientemente. Sin embargo, esto no ocurre así, ya que la conductividad de los ILs depende tanto de las propiedades fisicoquímicas derivadas de su estructura química (viscosidad, densidad, tamaño iónico, agregaciones, etc.) como de la dinámica de las especies iónicas que lo componen (número de portadores de carga, deslocalización de la carga y movilidad iónica). De tal forma que, al aumentar el tamaño de los iones que componen el IL, la



movilidad de los mismos se ve reducida, dando lugar a conductividades más bajas. Además, la conductividad también se ve reducida con la formación de pares iónicos y está inversamente relacionada con la viscosidad, siendo éste uno de los principales parámetros que afectan a la conductividad de los ILs [17]. Por otro lado, la conductividad proporciona información acerca del grado de apareamiento o agregación de los pares iónicos dentro del IL, siendo éstos responsables de que la conductividad observada no sea tan elevada como la que se esperaría si los iones se movieran independientemente [29].

La gran variedad de ILs da lugar a una ventana electroquímica muy amplia (4.5-5 V), similar o mayor a la observada para los disolventes orgánicos convencionales y mucho mayor que la encontrada para los electrolitos en disoluciones acuosas. Así, los ILs líquidos a temperatura ambiente (RTILs, del inglés, *Room Temperature Ionic Liquids*) facilitan la electrodeposición de metales y semiconductores a temperatura ambiente, que antes solo se conseguía tras fundir las sales a elevadas temperaturas [35].

#### **h) Toxicidad**

La principal característica que propone a los ILs como alternativa verde a los disolventes orgánicos volátiles es su casi nula presión de vapor. Sin embargo, la imagen verde de los ILs está siendo objeto de debate debido a que algunos de los precursores catiónicos y aniónicos empleados para su síntesis son tóxicos [36]. Es por ello que se está estudiando en profundidad la presencia de los ILs en el aire, agua y suelo, así como su (bio)degradación y (bio)acumulación en organismos acuáticos o terrestres y la ecotoxicidad de los mismos, ya que juegan un papel fundamental en el impacto medioambiental [35]. Numerosas investigaciones señalan que el impacto de los ILs sobre el medio ambiente depende en gran medida del carácter hidrofóbico-hidrofílico de los mismos, de tal forma que aquellos ILs más hidrofílicos presentan una mayor tendencia a penetrar en ecosistemas acuáticos. Además, se ha demostrado que la fuerza de absorción depende tanto de la estructura del IL como de sus propiedades fisicoquímicas. Hasta el momento, parece que la toxicidad de los ILs se ve más afectada por la estructura del catión que del anión, siendo la hidrofobicidad de la especie catiónica el parámetro más influyente [36]. Por ejemplo, Matzke et al. [37], determinaron la toxicidad de distintos cationes orgánicos e inorgánicos asociados al anión 1-alkil-3-metilimidazolio (p. ej.  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)\text{N}]^-$ ) en organismos terrestres y acuáticos, y confirmaron que la longitud de la cadena alquílica afecta considerablemente a la viabilidad. Sin embargo, no se mostró

una relación tan clara con el efecto de la especie aniónica. En este sentido, se ha demostrado que la (eco)toxicidad de un IL puede ser modificada alterando la hidrofobicidad de la cadena alquílica [20,36,37].

### **i) Coste y biodegradabilidad**

Otro aspecto a tener en cuenta es la degradación de los ILs. Debido a que una de las propiedades que los hace muy interesantes en reacciones de síntesis es su elevada estabilidad térmica, el tratamiento de los ILs tras su utilización es un gran inconveniente. Zalesca et al., fueron pioneros en este estudio y de sus investigaciones se ha descrito que el nivel de degradación de los ILs depende de la cadena alquílica del mismo, de tal forma que, al incrementar su longitud, la velocidad de degradación disminuye, haciéndose más persistentes en el medio. Sin embargo, también describieron que el tipo de anión empleado no afecta al proceso de degradación [38].

No obstante, aunque inicialmente los estudios se centraron en la búsqueda de metodologías de degradación térmica y oxidativa para la evaluación de la persistencia de estas sustancias en medios acuosos, la biodegradación resulta una técnica más sostenible [39]. Es por ello que actualmente el foco de interés se centra en el diseño de ILs que contengan cadenas biodegradables.

### **2.1.3. Aplicaciones de los líquidos iónicos**

Teniendo en cuenta las excelentes propiedades de los ILs, éstos juegan un papel fundamental en diversas aplicaciones, tales como [34]:

- a) Industria farmacéutica:** El bajo punto de fusión de estas sales despierta un gran interés para la síntesis de fármacos donde las especies catiónica o aniónica constituyen un ingrediente activo del fármaco evitando su cristalización. Además, el formato líquido del fármaco facilita su administración a los pacientes.
- b) Disolventes:** La naturaleza iónica de los ILs proporciona medios de solvatación únicos que los hacen más idóneos que los disolventes moleculares convencionales para su aplicación en una gran variedad de reacciones de síntesis (orgánicas, inorgánicas, biológicas, etc.). Resulta especialmente interesante su combinación con enzimas en reacciones de biocatálisis, aunque también se emplean como disolventes de extracción de productos de alto valor añadido y en la separación de

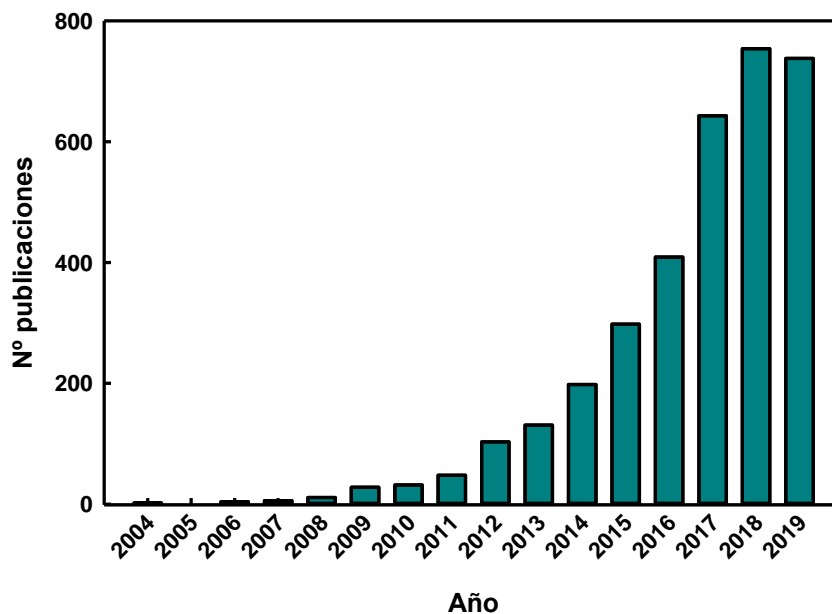
gases. Otra aplicación a destacar de los ILs es su capacidad de procesamiento de la biomasa, que por su composición (una mezcla compleja que contiene celulosa, hemicelulosa, queratina y lignina, entre otros) constituye un recurso renovable muy valioso. Algunos ILs han demostrado su capacidad para disolver este compuesto, a diferencia de los disolventes orgánicos convencionales.

- c) Dispositivos electroquímicos: La elevada estabilidad electroquímica de muchos ILs los hace muy útiles para su aplicación en dispositivos electroquímicos, procesos de electrodeposición, etc. A modo de ejemplo, los ILs presentan un gran interés en la producción de hidrógeno como combustible. Asimismo, los ILs ayudan a disminuir el sobrepotencial que se genera en la oxidación del agua, jugando así un papel fundamental en la fabricación de baterías de metal-aire.
  
- d) Empleo como catalizadores: Los ILs quirales (CILs, del inglés, *Chiral Ionic Liquids*) se pueden emplear como catalizadores debido a su capacidad para incorporar un resto quiral puro, que puede proceder de una fuente natural (p. ej. ILs basados en aminoácidos) o sintética, a la estructura iónica. Así, los CILs se han empleado para mejorar la enantioselectividad de algunas reacciones. Por ejemplo, Goodrich et al. [40] demostraron cómo un IL compuesto por cationes quirales mejoraba la enantioselectividad de la reacción asimétrica de Diels-Alder entre N-acriloyloxozolidinona y ciclopentadienona. Asimismo, los ILs quirales también se aplican en técnicas de cromatografía y espectroscopía (p. ej. reactivo de cambio quiral en RMN). No obstante, los ILs no solo participan en catálisis quiral, sino que también han sido ampliamente usados en biocatálisis homogénea (catalizada por enzimas o células enteras) y heterogénea. Esta aplicación está siendo actualmente muy explotada, destacando el empleo de ILs inmovilizados en un soporte sólido que contiene un catalizador metálico disuelto y el empleo de catalizadores sólidos recubiertos por ILs.

## 2.2. Disolventes eutécticos profundos

Los disolventes eutécticos profundos (DES, del inglés, *Deep Eutectic Solvents*) son otra clase de disolventes neotéricos cuyo interés ha crecido exponencialmente en la última década, teniendo, al igual que los ILs, grandes aplicaciones en diferentes campos, como síntesis de materiales, extracción de compuestos y en biotransformaciones [41-46]. Las

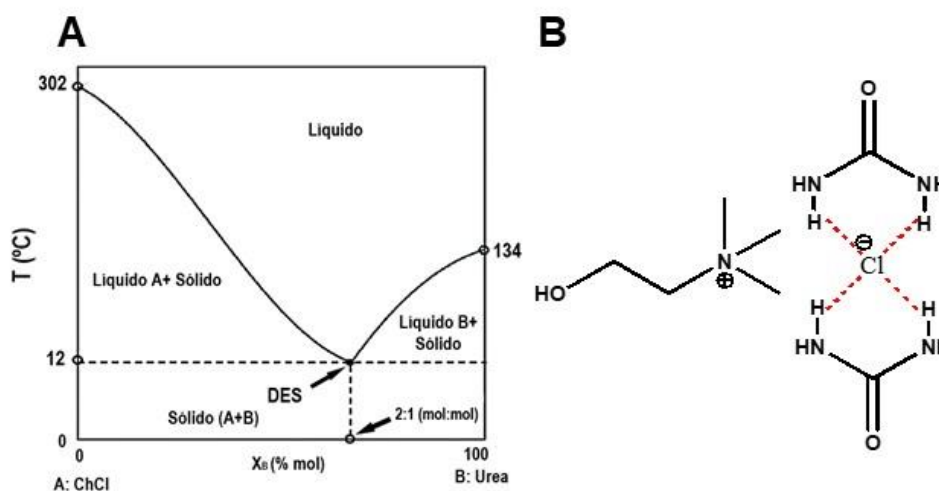
propiedades que presentan los DESs, han despertado un gran interés en la última década, que se refleja en el crecimiento del número de publicaciones destinadas al diseño de nuevos DESs y la evaluación de sus aplicaciones, sobre todo en procesos industriales (ver **Figura 3**).



**Figura 3.** Número de investigaciones sobre DESs publicadas en el periodo de tiempo comprendido entre 2004 y 2019 (Imagen adaptada de Web of Science).

### 2.2.1. Estructura y composición de los DESs

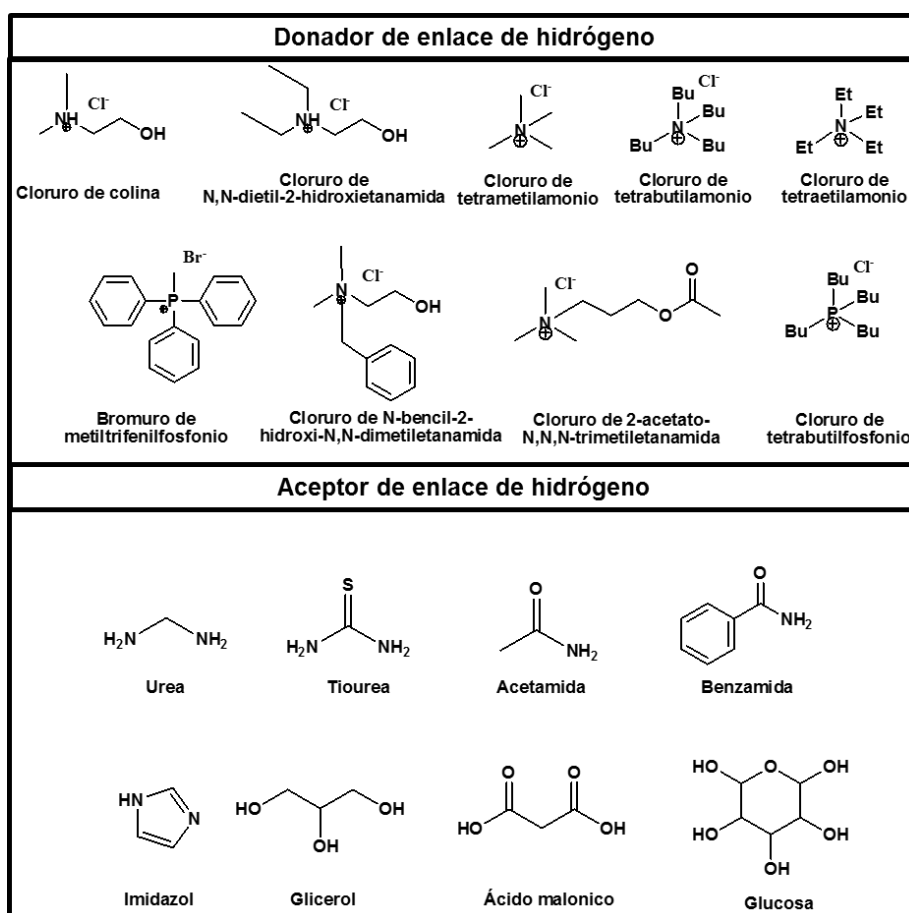
Los DESs son mezclas eutécticas formadas por enlaces no iónicos entre una sal o un aceptor de hidrógeno (HBA, del inglés, *Hydrogen Bond Acceptor*) (p. ej. sal de amonio cuaternaria) y un metal o un donador de enlace de hidrógeno (HBD, del inglés, *Hydrogen Bond Donnor*). Estos compuestos presentan la peculiar característica de poseer un punto de fusión más bajo que ambas especies por separado. Así, dos sustancias que son sólidas, forman una fase líquida a su temperatura eutéctica, mediante un proceso de equilibrio térmico, que puede ser usada como disolvente para diversas aplicaciones. Uno de los ejemplos más representativos es la mezcla de colina y urea (ChCl:U) (1:2 mol:mol) que presenta un punto de fusión de 12 °C, mientras que ambos compuestos por separado presentan puntos de fusión de 302 y 133 °C, respectivamente [47,48]. En la **Figura 4A** se muestra el diagrama de fases obtenido para la mezcla ChCl:U, donde se observa la caída en el punto de solidificación de la mezcla eutéctica formada. El punto eutéctico se debe a la formación de enlaces de hidrógeno entre el grupo amida de la urea y la sal de amonio cuaternaria (ChCl) (**Figura 4B**) [47,49].



**Figura 4.** Caracterización de la mezcla eutéctica formada por ChCl:Urea (1:2 mol:mol). **A)** Diagrama de fases; **B)** Posible enlace de hidrógeno entre ChCl y urea [49,50].

Los DESs presentan diferentes propiedades intrínsecas dependiendo del tipo de enlace de hidrógeno presente en su red. Normalmente, el enlace de hidrógeno se forma entre el HBD y la especie catiónica. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza de los grupos de partida, algunos DESs presentan interacciones por enlace de hidrógeno HBD-HBD. La estructura de estos disolventes les proporciona unas propiedades fisicoquímicas que los hace muy interesantes para su aplicación industrial.

Hasta la fecha, se ha diseñado una gran variedad de DESs con diferente composición y aplicaciones, destacando mayoritariamente aquellos compuestos por sales de amonio y ChCl. En la **Figura 5** se muestran algunas de las combinaciones de especiesceptoras (HBA/sales) y donadoras (HBD) de enlaces de hidrógeno más comunes.



**Figura 5.** Ejemplos de compuestos HBA y HBD empleados comúnmente en la preparación de DESs [48].

Los DESs compuestos por especies higroscópicas (p. ej. cloruro de colina (ChCl), glicerol (Gly), urea (U), etilenglicol (EG), etc.) son disolventes hidrofílicos [49]. Sin embargo, recientemente se han diseñado DESs hidrofóbicos basados en mezclas de ácidos grasos con sales de amonio de larga longitud de cadena [51] o con terpenos [52,53].

Dependiendo de la naturaleza de las especies empleadas en la preparación de estos disolventes, se pueden diferenciar cuatro clases de DESs (**Tabla 2**), siendo la clase III la que más atención ha recibido hasta la fecha. Esto se debe a la sencillez de su preparación, elevada biodegradabilidad, baja reactividad en agua y el bajo coste de los materiales de partida, entre otras ventajas. Las clases I y IV no han resultado muy interesantes hasta el momento, debido probablemente al carácter altamente higroscópico de las sales metálicas (p. ej.  $AlCl_3$ ) empleadas en su preparación, que a su vez, es la principal diferencia con la clase II [47,48].

**Tabla 2.** Clasificación de los principales tipos de DESs. (Cat<sup>+</sup>= catión amonio, fosfonio o sulfonio; X<sup>-</sup>= anión haluro) [54].

Clase	Fórmula	Ejemplos
I	Cat <sup>+</sup> X <sup>-</sup> <sub>z</sub> MCl <sub>x</sub>	M= Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In [ChCl][CoCl <sub>2</sub> ]
II	Cat <sup>+</sup> X <sup>-</sup> <sub>z</sub> MCl <sub>x</sub> yH <sub>2</sub> O	M= Cr, Co, Cu, Ni, Fe [ChCl][Li(H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> <sup>+</sup> ClO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]
III	Cat <sup>+</sup> X <sup>-</sup> <sub>z</sub> RZ	Z= CONH <sub>2</sub> , COOH, OH [ChCl][Amida/ácido carboxílico]
IV	MMCl <sub>x</sub> +RZ=MC <sup>+</sup> <sub>x-1</sub> ·RZ+ MC <sup>-</sup> <sub>x+1</sub>	M=Al, An Z= CONH <sub>2</sub> , OH [ZnCl <sub>2</sub> ][Urea]

Recientemente, se ha desarrollado una nueva clase de DESs que emplea metabolitos primarios (p. ej. aminoácidos azúcares, colina y sales orgánicas) como donadores de enlaces de hidrógeno y se ha definido como “disolventes eutécticos profundos naturales” (NADESs, del inglés, *Natural Deep Eutectic Solvents*). El descubrimiento de los NADESs resultó del intento de explicar la solubilidad de compuestos intracelulares que tienen polaridad intermedia y son insolubles tanto en agua como en fase lipídica. Así, Choi et al., [55] definieron los NADESs como una tercera fase líquida en células de las plantas para llevar a cabo diferentes procesos biológicos (p. ej. crioprotección resistencia a la deshidratación, germinación, etc.).

Hasta el momento, debido a que los estudios de caracterización fisicoquímica de los NADESs son muy escasos, resulta difícil incluirlos en la clasificación de DESs establecida según su estructura. Sin embargo, aquellos que contienen sales de amonio cuaternarias, pueden encajar en la clase III [47].

### 2.2.3. Propiedades fisicoquímicas de los DESs

De forma similar a los ILs, los DESs son disolventes de “diseño”, ya que con la adecuada combinación de una especie aceptora (HBA) (p. ej. una sal cuaternaria) y una especie donadora (HBD) de enlaces de hidrógeno, se pueden obtener DESs con las propiedades fisicoquímicas deseadas para una determinada aplicación. De forma general, entre las propiedades fisicoquímicas de los DESs destacan: su bajo punto de fusión, baja volatilidad, baja presión de vapor, naturaleza dipolar, elevada estabilidad térmica y química, solubilidad en una alta variedad de sustratos, baja toxicidad y elevada biodegradabilidad [47]. Cabe destacar que las bajas temperaturas de fusión se deben a la baja energía reticular de los iones asimétricos de las especies que forman los DESs,

mientras que las interacciones por enlaces de hidrógeno son las que dan lugar a la formación de DESs líquidos a temperatura ambiente [54].

A continuación, se discuten las principales propiedades fisicoquímicas de los DESs [56]:

**a) Temperatura de solidificación ( $T_f$ , del inglés, *freezing point*)**

Como se ha mencionado, un DES se forma cuando dos sólidos son capaces de mezclarse formando una fase líquida mediante interacción por enlaces de hidrógeno. Esta nueva fase se caracteriza por tener un  $T_f$  inferior al de los constituyentes por separado, que se debe principalmente a la interacción entre las especies aceptora (HBA) y donadora (HBD) de enlaces de hidrógeno. Hasta la fecha, los DESs desarrollados tienen temperaturas de congelación inferiores a 150 °C, aunque reciben gran interés aquellos cuyo  $T_f$  es inferior a 50 °C, ya que son muy útiles en numerosas aplicaciones. No obstante, cabe destacar que el número de DES que son líquidos a temperatura ambiente es actualmente muy limitado.

En la **Tabla 3** se puede observar que para una determinada especie HBA (p. ej. ChCl) la adecuada selección de la especie HBD es crucial en la obtención de DESs con un  $T_f$  determinado, de tal forma que cuando se emplean ácidos carboxílicos como HBD, se pueden obtener DESs líquidos a temperatura ambiente. Asimismo, para un determinado HBD (p. ej. urea), la naturaleza de las sales orgánicas (p. ej. sales de amonio o de fosfonio) pueden afectar a la  $T_f$ . También se observa en la **Tabla 3**, que la razón molar entre las especies HBA:HBD ejerce un impacto significativo sobre la  $T_f$  de los DESs.



**Tabla 3.** Temperatura de solidificación de algunos DESs, dependiendo de su composición y razón molar [56].

HBA	HBD	T <sub>m</sub> (°C) HBA	T <sub>m</sub> (°C) HBD	HBA:HBD mol:mol	T <sub>f</sub> (°C)
ChCl	Urea	300	133.0	1:2	12.0
ChCl	Glicerol	300	17.8	1:2	-1.0
ChCl	Glicerol	300	17.8	1:3	1.7
ChCl	Glicerol	300	17.8	1:4	2.0
ChCl	Ácido benzoico	300	122.0	1:1	95.0
ChCl	Ácido oxálico	300	190.0	1:1	34.0
ChCl	Xilitol	300	96.0	1:1	Líquido a T <sup>a</sup> ambiente
PPh <sub>3</sub> Br	Glicerol	232	17.8	1:2	4.0
PPh <sub>3</sub> Br	Glicerol	232	17.8	1:4	15.6
PPh <sub>3</sub> Br	Glicerol	232	17.8	1:5	50.0
PPh <sub>3</sub> Br	EG	232	-12.9	1:3	-46.0

\*Abreviaturas: T<sub>f</sub>, Temperatura de solidificación de un DES (del inglés, *Freezing Point*); T<sub>m</sub>, Temperatura de fusión (del inglés, *Melting Temperature*); ChCl, Cloruro de colina; PPh<sub>3</sub>Br, Bromuro de metiltrifenilfosfonio; EG, Etilenglicol.

## b) Densidad

La densidad es uno de los parámetros fisicoquímicos más importantes de un disolvente. La diferencia en las densidades de los DESs es consecuencia de la organización molecular o empaquetamiento de las especies aceptora (HBA) y donadora (HBD) de enlaces de hidrógeno que los constituyen. De forma similar a como ocurre en los ILs compuestos por sales de imidazolio, los DES contienen “vacantes” o “huecos”, de tal forma que un incremento en el radio de estos huecos conduce a una disminución en la densidad de los DESs. Por otro lado, la razón molar de las especies HBA:HBD, así como la temperatura, también ejercen un efecto significativo sobre la densidad de estas mezclas. A modo de ejemplo, en la **Tabla 4** se muestran las densidades de diferentes DES a 25 °C en función de la composición y proporción de los mismos.

**Tabla 4.** Densidades de algunos DESs a 25 °C [56].

HBA	HBD	HBA:HBD mol:mol	Densidad (g·cm <sup>-3</sup> )
ChCl	Glicerol	1:1	1.16
ChCl	Glicerol	1:2	1.18
ChCl	Glicerol	1:3	1.20
ChCl	Urea	1:2	1.21
ZnCl <sub>2</sub>	Urea	1:3.5	1.63
ZnCl <sub>2</sub>	Acetamida	1:4	1.36
ZnCl <sub>2</sub>	EG	1:4	1.45

### c) Viscosidad

La viscosidad de un DESs es un parámetro que condiciona sus aplicaciones como disolvente verde. La mayoría de los DESs presentan viscosidades elevadas (>100 cP) a temperatura ambiente. Esta elevada viscosidad se atribuye a la presencia de multitud de enlaces de hidrógeno entre los diferentes componentes del DES que da lugar a una disminución de la movilidad de las especies libres.

De forma general, la viscosidad de los DES se ve afectada por la naturaleza y razón molar de sus componentes, la temperatura, el contenido en agua y el volumen libre. Así, el empleo de cationes pequeños como especie donadora de enlaces de hidrógeno (HBD) puede dar lugar a la formación de DES con baja viscosidad. Además, la viscosidad de las mezclas eutécticas binarias está esencialmente gobernada por los enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas y de van der Waals, de tal forma que, al igual que ocurre en los ILs, un incremento en la temperatura disminuye la viscosidad del DES.

### d) Conductividad iónica

La conductividad de los DESs está estrechamente relacionada con la viscosidad de los mismos, de tal forma que, por lo general, la conductividad de los DESs también aumenta con el incremento de la temperatura. No obstante, la elevada viscosidad de la mayoría de los DESs, hace que éstos presenten bajas conductividades a temperatura ambiente (inferiores a 2 mS·cm<sup>-1</sup>). Además, teniendo en cuenta que la razón molar de las especies HBA:HBD influye notablemente en la viscosidad de los DESs, éste parámetro también ejerce un efecto significativo sobre la conductividad de los mismos [57].

### **e) Tensión superficial**

Hasta la fecha, los estudios relacionados con la tensión superficial de los DESs son muy escasos. De forma general se espera que la tensión superficial siga un comportamiento similar a la viscosidad, ya que depende de la fuerza de las interacciones moleculares que gobiernan la formación de estas mezclas. En este sentido, Abbot et al. [58] observaron que la tensión superficial de los DESs compuestos por ChCl:Glicerol mostraban una relación lineal con la temperatura y que el incremento de la concentración de ChCl aumentaba la tensión superficial del DES, debido probablemente a la desorganización de los enlaces de hidrógeno con el glicerol.

### **f) Toxicidad y biodegradabilidad de los DESs**

Además de las excelentes propiedades fisicoquímicas descritas, otro aspecto que potencia el carácter verde de los DESs reside en los materiales de partida que se emplean en su síntesis y en el proceso de síntesis en sí. La mayoría de los DESs se forman a través de una simple mezcla a determinadas relaciones molares (p. ej. 1:1 o 1:2 mol:mol HBA:HBD) a temperatura controlada. Por lo tanto, esta síntesis es 100% compatible con el principio de economía atómica propuesto por Anastas y Warner, ya que tampoco requiere procesos de purificación posteriores. Además, normalmente se emplean compuestos procedentes de fuentes naturales como materiales de partida, que reducen considerablemente el coste de producción (p. ej. glicerol, cloruro de colina, glucosa, ácido málico, etc.), especialmente en los recientemente descritos NADESs [48,59]. De esta forma, los DESs presentan dos principales ventajas frente a los ILs: la primera de ellas es que su preparación es más simple y la segunda es el bajo coste de dicha preparación [48].

Hasta la fecha, se conoce poco acerca de la toxicidad de los DESs, siendo escasos los grupos que han investigado en detalle las propiedades toxicológicas de estos solventes. En 2013 Hayyan et al. [60] fueron los primeros en investigar la toxicidad y citotoxicidad de los DESs basados en sales de fosfonio y colina, empleando como donadores de hidrógeno compuestos como la glicerina, etilenglicol y urea. Observaron que los DESs compuestos por ChCl son menos tóxicos que aquellos basados en sales de fosfonio, destacando así la importancia de la selección de los materiales de partida para la síntesis de DESs [60]. Sin embargo, la toxicidad de ciertos DESs puede resultar interesante para

desarrollar algunas aplicaciones (p. ej. en la síntesis de agentes con propiedades antibactericidas) [48].

Respecto a la (bio)degradabilidad de los DESs, otro parámetro fundamental cuando se habla de carácter “verde” de un disolvente, se considera que una gran parte de ellos son rápidamente biodegradables debido al origen natural de sus materiales de partida [61]. Por ejemplo, todos los componentes de partida de los NADESs son fácilmente metabolizados por diferentes organismos en la naturaleza. En el caso del glicerol, puede introducirse a la ruta glicolítica, o introducirse a la gluconeogénesis, dando como producto un azúcar, que también tiene aplicación directa [47,48].

Por lo tanto, de forma general se puede decir que los DESs presentan baja toxicidad en organismos a escala de laboratorio [61], y que la mayoría se pueden clasificar como disolventes biodegradables, mostrándose como excelentes disolventes “verdes”. Estas características han atraído la atención de los investigadores en su búsqueda de disolventes que solventen las limitaciones de los ILs, centrando el foco de investigación en la combinación de los DESs con enzimas para su aplicación en reacciones de síntesis biocatalítica, donde pueden jugar diferentes papeles (p. ej. solvente, co-solvente o sustrato).

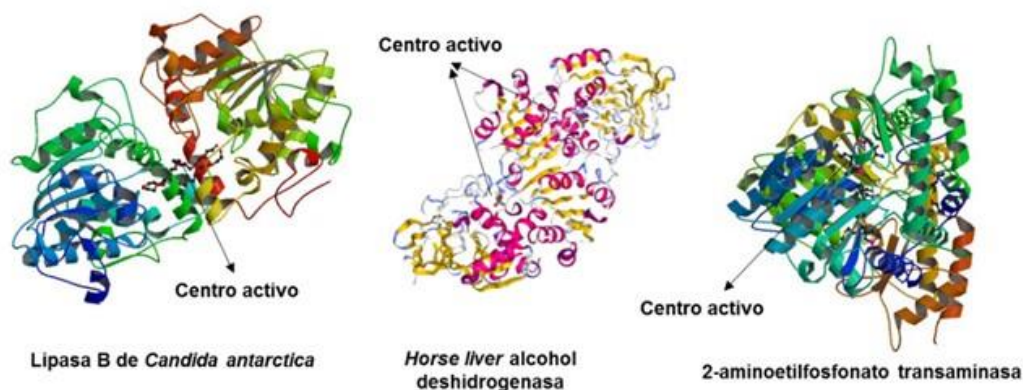
### **3. ENZIMAS: CATALIZADORES NATURALES**

---

Las enzimas son proteínas, macromoléculas poliméricas, basadas en unidades de aminoácidos con secuencias únicas y un alto nivel de organización en su estructura tridimensional. El sitio activo contiene los aminoácidos apropiados, donde las moléculas de sustrato se enlazan dando lugar a la reacción química mediante interacciones dinámicas. La particularidad de las enzimas es que no se afectan por la reacción que catalizan, pudiendo operar de manera continua. Esto se debe a que sus residuos pueden cambiar durante la reacción, pero se regeneran al final. Algunas enzimas requieren para su función la presencia de componentes no proteicos adicionales, conocidos como cofactores y coenzimas.

La actividad catalítica de una enzima es altamente dependiente de su estructura tridimensional o conformación nativa, que se encuentra mantenida por interacciones internas covalentes (enlaces disulfuro) y un elevado número de interacciones débiles (p. ej. enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas etc.), así

como de interacciones con otras moléculas. Además, los enlaces por puente de hidrógeno con el agua, principal disolvente de los organismos, ayudan a estabilizar su estructura [62]. En la **Figura 6** se muestra la estructura tridimensional de algunas enzimas comúnmente empleadas en reacciones de biocatálisis, entre las que destacan las oxidoreductasas (EC1), las transferasas (EC2) y las hidrolasas (EC3).



**Figura 6.** Estructura tridimensional de: **A)** Lipasas (EC 3.1.); **B)** alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.) y **C)** transaminasa (EC.2.6.). Imágenes obtenidas de: *Protein data bank* (PDB).

Además, las enzimas constituyen una herramienta muy potente para el desarrollo de procesos biocatalíticos sostenibles. Esto se debe principalmente a la elevada selectividad (p. ej. enantio-, regio y estereoselectividad) que caracteriza a las transformaciones que catalizan, así como al empleo de condiciones suaves en las mismas. Precisamente, su elevada selectividad evita la necesidad de emplear etapas de protección de grupos funcionales, simplificando y economizando las reacciones, evitando así la generación de productos no deseados. Estas características, junto con su elevada biodegradabilidad y baja toxicidad, derivadas de su origen natural, han despertado el interés de los científicos para su incorporación en el desarrollo de procesos de síntesis sostenible [6]. En la **Tabla 5** se muestran las aportaciones de las enzimas que dan respuesta a cada uno de los principios de la Química Verde propuestos por Anastas y Warner.

**Tabla 5.** Compatibilidad de los biocatalizadores con los principios de la Química Verde [6].

PRINCIPIOS DE LA QUÍMICA VERDE	BIOCATALIZADORES
1. <b>Prevención</b>	La elevada selectividad evita la generación de subproductos.
2. <b>Eficiencia atómica</b>	La selectividad mejora la economía atómica.
3. <b>Síntesis segura</b>	Permite llevar a cabo procesos de baja toxicidad y peligrosidad.
4. <b>Productos seguros</b>	Los productos de biocatálisis son seguros.
5. <b>Disolventes seguros</b>	Muchas reacciones se llevan a cabo en agua o en disolventes sostenibles.
6. <b>Eficiencia energética</b>	Las reacciones de biocatálisis se llevan a cabo en condiciones suaves de presión y temperatura.
7. <b>Fuentes renovables</b>	Proviene de fuentes renovables.
8. <b>Evitar derivados</b>	La selectividad evita la necesidad de proteger grupos funcionales.
9. <b>Catálisis</b>	Son catalizadores muy eficientes.
10. <b>Biodegradabilidad</b>	Son proteínas, y por tanto, biodegradables.
11. <b>Prevención de la contaminación</b>	Son consistentes con procesos biocatalíticos.
12. <b>Prevención de accidentes</b>	Las reacciones se llevan a cabo en condiciones suaves y seguras.

Entre los biocatalizadores de aplicación industrial cabe destacar el papel de las lipasas, enzimas objeto de estudio de esta memoria, para la síntesis de diferentes compuestos de gran interés (p. ej. biodiesel, fármacos, etc.) ya que son capaces de actuar sobre una amplia variedad de sustratos [63,64].

### 3.1. Lipasas

Las lipasas, también conocidas como glicerol-éster hidrolasas (E.C. 3.1.1.3) son una familia de hidrolasas que en condiciones normales catalizan la hidrólisis de enlaces ésteres carboxílicos (E.C. 3.1.1.) en compuestos hidrofóbicos, como los triglicéridos. Sin embargo, en medios no acuosos, su función se puede redirigir hacia la hidrólisis parcial o total de triacilglicéridos y reacciones de esterificación, transesterificación e interesterificación de los lípidos, así como de transferencia de grupos acilo a otros nucleófilos (p. ej. aminas, tioles, etc) [65].

El interés de las lipasas radica principalmente en su carácter polivalente a la hora de catalizar reacciones, siendo capaces de catalizar muchas de ellas en medios con muy baja o nula concentración de agua. Además, las lipasas no requieren de la presencia de un cofactor para dirigir selectivamente el sentido de la reacción. Es por ello que presentan grandes aplicaciones en la industria biotecnológica formando parte de aditivos alimentarios, síntesis de ésteres de alto valor añadido en la industria cosmética (p. ej.

antioxidantes, anti-inflamatorios, antiarrugas, etc.), síntesis de fármacos y en la síntesis de biocombustibles, entre otros [66].

La mayoría de las lipasas proceden de bacterias (p. ej. *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes*, *Serratia marcescens*, etc.) y de hongos (p. ej. *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Thermomyces lanuginosus*, etc.) [67]. En concreto, la lipasa de *Candida antarctica* es probablemente la más empleada en la catálisis de reacciones de esterificación y transesterificación, habiéndose descrito numerosas aplicaciones [68-72].

La levadura basidiomiceta *Candida antarctica* produce dos lipasas distintas, conocidas como lipasa A (CALA) y lipasa B (CALB). Como su propio nombre indica, la cepa se aisló por primera vez en la Antártida, con el objetivo de encontrar enzimas con propiedades singulares [73]. Como se puede observar en la **Tabla 6**, CALA y CALB presentan características y propiedades muy diferentes, siendo CALB la lipasa más empleada en el campo de la biocatálisis.

**Tabla 6.** Características de las lipasas A y B de *Candida antarctica* [73].

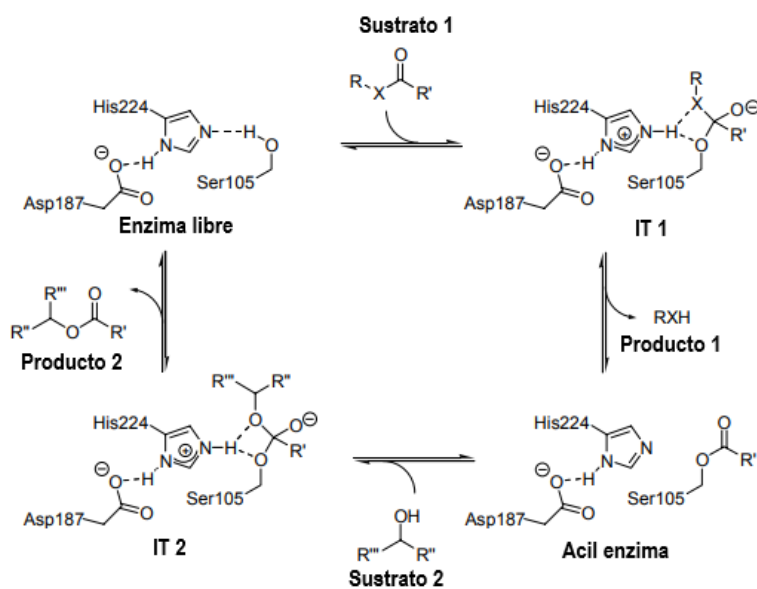
	CAL A	CALB
<b>Peso molecular (kDa)</b>	45.0	33.0
<b>Punto isoeléctrico (pI)</b>	7.5	6.0
<b>pH óptimo</b>	7.0	7.0
<b>Rango de pH estable<sup>a</sup></b>	6.0-9.0	7.0-10.0
<b>Actividad específica (LU/mg)</b>	420.0	435.0
<b>Posición específica frente a triglicéridos</b>	<i>Sn-2</i>	<i>Sn-3</i>

<sup>a</sup>pH al cual más del 75% de la actividad se mantiene tras la incubación a temperatura ambiente durante 20 horas.

En 1994, el grupo de investigación de Uppenberg [74] describió por primera vez las secuencias génica y aminoacídica de CALB. Mediante difracción de rayos X demostraron que esta lipasa está compuesta por 317 residuos de aminoácidos que proporcionan un peso molecular de 33 kDa. Este grupo describió también que el centro activo de la mayoría de las lipasas está constituido por: a) una triada catalítica de aminoácidos (Ser105-His224-Asp187), responsables de llevar a cabo la reacción, y b) aminoácidos residuales que configuran la arquitectura del centro catalítico, de tal forma que la orientación de los átomos de nitrógeno de los aminoácidos de las proteínas dirigen la

carga negativa del átomo de oxígeno del sustrato, formando lo que se conoce como hueco oxianiónico, para que este último pueda posicionarse convenientemente sobre el centro activo. Es decir, actúa estabilizando el estado de transición de la reacción [74,75].

CALB cataliza reacciones de transferencia de grupos acilo, de acuerdo con el mecanismo de ping-pong bi bi (**Figura 7**) a través del cual el primer sustrato entra en el centro activo de la lipasa y se forma un intermedio tetraédrico. A continuación, el centro activo de la enzima libera el primer producto y se forma un complejo acil-enzima que será deacetilado por el sustrato dos en la segunda etapa. En la segunda etapa, el segundo sustrato de la reacción entra al centro activo, formándose un segundo intermedio tetraédrico. Finalmente, el producto se libera del centro activo y la enzima queda libre para comenzar otro ciclo catalítico.



**Figura 7.** Mecanismo de acción de CALB. La reacción de esterificación o transesterificación ocurre a través de la formación de dos intermedios tetraédricos (IT1 y IT2) y de un intermediario acil-enzima [76].

Una diferencia significativa que presenta CALB frente a la mayoría de las lipasas reside en que el sitio de unión de sustratos hidrofóbicos en el centro activo está directamente expuesto al disolvente, mientras que en la mayoría de las lipasas se encuentra cubierto por una capa de aminoácidos. Esta diferencia resulta significativa para la promiscuidad biocatalítica de CALB y es la responsable de la gran multitud de aplicaciones que presenta en biocatálisis [66].



Como se ha comentado anteriormente, las lipasas son capaces de actuar en medios no acuosos. Esta actuación se debe principalmente a la capacidad que presentan para adsorber en su interfaz hidrofóbica a sustratos hidrofóbicos [77]. Esto se debe a que la interacción del centro activo de la enzima con los disolventes orgánicos provoca un cambio en la orientación de las cadenas de aminoácidos, modificándose así la afinidad de la enzima por el sustrato y su especificidad. Además, se ha demostrado que a diferencia de los medios hidrofílicos, los medios hidrofóbicos son capaces de conservar la capa de hidratación esencial de las enzimas manteniendo su actividad catalítica [78]. En este sentido, en 1984, Zaks et al. [79] estudiaron el comportamiento de una lipasa pancreática de cerdo en medios orgánicos, observando un incremento en la actividad y selectividad de la misma con respecto a la observada en medios acuosos. En 2008, Trodler et al. [80] demostraron el mantenimiento de la estabilidad de CALB en medios orgánicos hidrofóbicos. Estos resultados, junto con las características mencionadas anteriormente, sitúan a las lipasas en el foco de atención de la industria biotecnológica, especialmente en el desarrollo de procesos biocatalíticos en medios no acuosos. Además, se puede considerar la ingeniería del medio de reacción como herramienta para modular la actuación biocatalítica de las enzimas y diseñar procesos de síntesis más sostenibles.[81].

### **3.2. Aplicación de las lipasas para la síntesis de compuestos de interés en la industria cosmética y farmacéutica**

Los cosméticos se pueden clasificar, de forma general y de acuerdo a su aplicación, en cinco clases principales: I) cosméticos para el cuidado de la piel (p. ej. leches corporales, espumas de afeitado, protectores solares, etc.); II) cosméticos para el cabello (p. ej. champús, acondicionadores, etc.); III) cosméticos que proporcionan color (p. ej. maquillaje facial, esmaltes de uñas, pintalabios, etc.); IV) perfumes y fragancias y V) artículos de tocador (p. ej. geles de ducha, pastas de dientes, enjuagues bucales, etc.). Así, la gran diversidad de ingredientes que se emplean en los preparados cosméticos representan un mercado muy importante para la industria química. Además, en los preparados cosméticos, con frecuencia se suelen incluir componentes con actividades específicas (p. ej. derivados de vitaminas, extractos de plantas, aceites esenciales, etc.) que proporcionan un valor añadido al producto, siendo considerados entonces como productos cosmeceúticos [64,82].

Entre los diferentes compuestos empleados en cosmética, los ésteres presentan una amplia gama de aplicaciones. Entre estas aplicaciones destacan su uso como emolientes en cremas, fragancias en perfumes, tensioactivos en champús y como antioxidantes, entre otras, ya que suponen una mejora en las cualidades del producto final (p. ej. estabilidad, solubilidad, bioasimilación, etc.), con respecto al compuesto de partida (p. ej. alcohol, ácido, etc.). Sin embargo, la síntesis de estos productos, se lleva a cabo actualmente mediante enfoques de la química clásica que ponen en duda la sostenibilidad de los procesos. Esto se debe a que generalmente se emplean elevadas temperaturas y ácidos fuertes como catalizadores, incluyendo numerosos pasos de protección y desprotección de grupos funcionales en el proceso. Como consecuencia, se genera una ingente cantidad de productos indeseados en las reacciones, haciendo necesaria la aplicación de etapas de purificación que, junto con el consumo elevado de energía, suponen un encarecimiento del proceso [83].

En este sentido las enzimas, y en concreto las lipasas, pueden jugar un papel fundamental en el desarrollo de transformaciones químicas más sostenibles que permitan la síntesis selectiva y la separación de productos puros, empleando condiciones suaves de reacción, incluso a presión y temperatura ambiente [65]. Las lipasas poseen numerosas aplicaciones en la industria, pudiendo emplearse en la síntesis de detergentes, en el procesado de alimentos, la síntesis de fármacos y cosméticos, la síntesis de biocombustibles o en la síntesis de polímeros, entre otros. Por ejemplo, en la industria alimentaria las lipasas se pueden emplear para acelerar el desarrollo de notas aromáticas, así como para mejorar las propiedades de emulsión de los lípidos de la yema de huevo o para la producción de nuevos ingredientes y alimentos (p. ej. manteca de cerdo o cacao) [67,84].

En cuanto a sus aplicaciones en la industria cosmética, las lipasas se pueden emplear directamente como ingredientes activos en formulaciones cosméticas o bien como biocatalizadores en síntesis de compuestos activos. Sin embargo, cuando éstas se emplean como ingredientes activos, resulta complicado mantener su actividad y estabilidad sin afectar al resto de ingredientes de las formulaciones, aunque este problema se puede solventar empleando lipasas inmovilizadas en diferentes soportes [85-86].

Considerando la capacidad de las lipasas para llevar a cabo reacciones de hidrólisis, esterificación y acilación con elevada estereo-, quimio y regio-selectividad, éstas

muestran un gran potencial en la producción de ingredientes cosméticos. Hasta la fecha se han descrito una gran variedad de procesos de síntesis catalizados por lipasas, comercializándose muchos de los productos obtenidos [65,87]. En la **Tabla 7** se recogen algunos ejemplos de productos de alto valor añadido para la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica (p. ej. ésteres de azúcares, ésteres de aromas y ésteres de vitaminas), obtenidos mediante el empleo de lipasas como biocatalizadores de la reacción. En dicha tabla se puede observar cómo afectan diferentes parámetros (p. ej. método de reacción, medio de reacción, razón molar entre los sustratos, naturaleza de la enzima, temperatura y tiempo de reacción) a la reacción biocatalítica. A modo de ejemplo, se puede observar cerca de un 100% de rendimiento tras 72 horas de reacción en la síntesis de acetato de isoamilo mediante esterificación directa del ácido acético con alcohol de isoamilo catalizada por la lipasa de *Rhizopus oryzae* en un disolvente orgánico, mientras que este resultado se obtiene en 2 horas de reacción cuando se emplea el derivado inmovilizado Novozyme® 435 en un IL.

La naturaleza del donador de acilo es otro parámetro que influye en los rendimientos de síntesis. Por ejemplo, en la **Tabla 7** se muestra el efecto de la naturaleza del donador de acilo en la síntesis de ésteres de L-ascorbilo mediante transesterificación de trioleína y tripalmitina con ácido L-ascórbico obteniéndose, bajo las mismas condiciones de reacción, oleato de ascorbilo y palmitato de ascorbilo con rendimientos de síntesis de 60.4% y 50%, respectivamente.

**Tabla 7.** Síntesis biocatalítica de ésteres con aplicación en la industria cosmética.

Producto	Aceptor de grupo acilo	Donador de acilo	Mmol aceptor acilo	Mmol acyl donor	Enzima	Medio de reacción	T <sup>a</sup> (°C)	Tiempo (h)	Rendimiento (%)	Ref.
<b>Ésteres de carbohidratos con propiedades surfactantes</b>										
Oleato de galactosa	Galactosa	Ácido oleico	0.05	0.10	Lipozyme RM IM	ILs (0.05 %DMSO)	60	2	87.0	[88]
Palmitato de fructosa	Fructosa	Ácido palmítico	20	20	Novozyme 435	2-Metil-2butanol	40	72	78.0	[89]
Ésteres de sorbitol	Sorbitol	Ácido oleico	0	4	Lipasa de <i>Chromobacterium viscosum</i>	2-Pirrolidona	40	74	80.0	[90]
Caprato de xilitol	Xilitol	Ácido cáprico	0	1	Novozyme 435	Sin disolvente	60	29	74.1	[91]
6-O-Monobutirilmaltosa	Maltosa	Butanoato de etilo	0	4	Lipasa SP-435	<i>Tert</i> -butanol	40	24	93.0	[92]
<b>Ésteres de aromas y fragancias</b>										
Acetato de butilo	Butanol	Ácido acético	1	1	Lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i>	Sin disolvente	37	24	60.0	[93]
Acetato de cinamilo	Alcohol cinamilo	de Acetato de vinilo	10	20	Novozyme 435	Tolueno	40	1	96.0	[94]
Acetato de isoamilo	Alcohol isoamilo	de Ácido acético anhídrido	1	1	Lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i>	n-Heptano	40	72	>95.0	[95]
Acetato de geraniol	Geraniol	Ácido acético	3	2	Novozyme 435	ILs	50	2	>99.0	[71]
Acetato de isoamilo	Alcohol isoamilo	de Ácido acético	3	2	Novozyme 435	ILs	50	2	>99.0	[71]
Butirato de L-mentol	L-Mentol	Anhídrido butírico	1	2	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>	n-Hexano	37	8.7	72.6	[96]
Acetato de 2-feniletanol	2-Feniletanol	Acetato de vinilo	0.25	0.05	<i>Yarrowia lipolytica</i> KKP	n-Heptano	28	2	78.0	[97]

Continuación **Tabla 7.** Síntesis biocatalítica de ésteres con aplicación en la industria cosmética.

Producto	Aceptor de grupo acilo	Donador de acilo	Mmol aceptor acilo	Mmol acyl donor	Enzima	Medio de reacción	T <sup>a</sup> (°C)	Tiempo (h)	Rendimiento (%)	Ref.
<b>Ésteres de vitaminas y antioxidantes</b>										
Oleato de L-ascorbilo	Ácido L-ascórbico	Trioleína	1	3	Lipozyme TL IM	2-metil-2-butanol	40	120	60.4	[98]
Palmitato de L-ascorbilo	Ácido L-ascórbico	Tripalmitina	1	1	Lipozyme TL IM	2-metil-2-butanol	40	120	50.0	[98]
Oleato de L-ascorbilo	Ácido L-ascórbico (vitamina C)	Aceite de oliva	1	1	Novozyme 435	Alcohol <i>terc</i> -amílico	45	11	70.0	[99]
Succinato de vitamina E	Tocoferol (Vitamina E)	Ácido succínico	1	5	Novozyme 435 modificada	<i>Tert</i> -butanol:DMSO (2:3 v/v)	40	-	94.0	[100]
Ferulato de $\alpha$ -tocoferol	$\alpha$ -Tocoferol (Vitamina E)	Ferulato de etilo	5	1	Lipasa <i>Candida rugose</i>	Disolventes orgánicos	40	70	25.2	[100]
4'-O-acetilresveratrol	Resveratrol	Acetato de vinilo	1	15	Novozyme 435	2-metil-2-butanol	40	50	80.0	[101]
Palmitato de retinol	Acetato de retinol (derivado vitamina A)	Ácido palmítico	1	3	Lipasa <i>Candida sp.</i>	hexano	25	12	81.0	[102]
Ésteres de flavonoides	Rutina	Ácido $\alpha$ -linoleico	1	4	Novozyme 435	Acetone y 2-metil-2-butanol	50	48	92.5	[103]
Monopalmitato de ácido kójico	Ácido kójico	Ácido palmítico	1	3	Novozyme 435	Solvent free	80	4	43.0	[104]
Ésteres de pantenilo	Pantenol (provitamina B5)	Acetato de vinilo	15	30	Novozyme 435	Acetonitrile	30	1	>99.0	[105]
Laurato de tirosol	Tirosol	Ácido láurico	8	1	Novozyme 435	2-metil-2-propanol/hexane (50:50 v/v)	45	72	73.3	[106]

## 4. CONCLUSIONES

---

La Química es una de las Ciencias que más ha contribuido a la mejora en la calidad de vida. Sin embargo, el mal uso de los recursos que proporciona esta Ciencia ha dado lugar a que se le asocie con un incremento del deterioro medioambiental. En este sentido, el siglo XXI está destinado a ser el siglo de la sostenibilidad, siendo éste el principal objetivo de la química e ingeniería química para que las generaciones futuras puedan disfrutar de los mismos recursos y oportunidades. Así, la naturaleza es la mejor fuente de inspiración, ya que proporciona una gran variedad de biocatalizadores que constituyen una herramienta muy potente, gracias a la gran eficiencia catalítica en la obtención de productos de interés industrial con una generación mínima de desechos.

Uno de los propósitos de la Química Verde se centra en la búsqueda de nuevos disolventes con bajo impacto medioambiental y que puedan ser recuperados y reutilizados fácilmente. En este sentido, los ILs y los DESs han recibido un gran interés como medios de reacción no acuosos, alternativos a los COVs, gracias a sus excelentes propiedades (p. ej. baja presión de vapor, capacidad de mantener la actividad y estabilidad de las enzimas, etc.). Sin embargo, el objetivo de la Química Verde va mucho más allá de reemplazar disolventes perjudiciales para el medio ambiente, siendo necesario el desarrollo de nuevas metodologías limpias que consigan la transformación eficiente de sustratos, recuperación de productos y reutilización de todos los elementos del sistema de reacción.

## 5. REFERENCIAS

---

- [1] F. Garcia Calvo-Flores, J. A Dobado. Química sostenible: Una alternativa creíble. *An. Quim.*, **2008**, 104, 205-210.
- [2] J. H. Clark, D. J. Macquarrie. *Handbook of Green Chemistry and Technology*. John Wiley & Sons: New York, **2008**.
- [3] American Chemical Society. The chemical professional's code of conduct, **2007**.
- [4] Asamblea General. *Desarrollo, cooperación y medio ambiente*. Económica, **2000**.
- [5] R. Menestres. Química sostenible: Naturaleza, fines y ámbito. *Educ. Quím.*, **2013**, 24, 103-112.
- [6] P. Lozano, E. Alvarez, J. M. Bernal, S. Nieto, C. Gomez, G. Sanchez-Gomez. Ionic liquids for clean biocatalytic processes. *Curr. Green Chem.*, **2017**, 4, 116-129.
- [7] P. T. Anastas, J. C. Warner. *Green chemistry: Theory and practice*. Oxford University Press: New York, **1998**.

- [8] I. T. Horváth, E. Cséfalvay. *Sustainability of green synthetic processes and procedures*. En *Green synthetic processes and procedures*. The Royal Society of Chemistry: London, **2019**.
- [9] R. A. Sheldon, J. M. Woodley. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. *Chem. Rev.*, **2018**, 118, 801-838.
- [10] P. Lozano, J. M. Bernal, S. Nieto, C. Gomez, E. Garcia-Verdugo, S. V Luis. Active biopolymers in green non-conventional media: A sustainable tool for developing clean chemical processes. *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 17361-17374.
- [11] D. Reay, C. Ramshaw, A. Harvey. *Process intensification- an overview*. En *Process intensification. Engineering for efficiency, sustainability and flexibility*. Elsevier: Oxford, **2008**.
- [12] U.S. EPA 2018b. Obtenido de: 2014 Volatile organic compounds emissions. Acceso 2019 (<https://cfpub.epa.gov/roe/indicator.cfm?i=23#1>).
- [13] A. Romero-Salvador. Líquidos iónicos a temperatura ambiente: Un nuevo medio para las reacciones químicas. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. Esp.*, **2008**, 102,79-90.
- [14] D. D. Irge. Ionic liquids: A review on greener chemistry applications, quality ionic liquid synthesis and economical viability in a chemical processes. *Am. J. Phys. Chem.* **2016**, 5, 74-79.
- [15] T. Welton. Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2071-2084.
- [16] P. Wasserscheid, T. Welton. *Ionic liquids in synthesis*. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA: Weimheim, **2008**.
- [17] A. Mohammad, Inamuddin. *Green solvents II: properties and applications of ionic liquids*. Springer Science & Business Media: Dordrecht, **2012**.
- [18] J. Dupont. From molten salts to ionic liquids: A ‘nano’ journey. *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44, 1223-1231.
- [19] R. D. Rogers, K. R. Seddon. Ionic liquids- solvents of the future? *Science*, **2003**, 302, 792-793.
- [20] M. Mogharabi-Manzari, T. Sedaghat-Anbouhi, M. Vahidi, M. A. Faramarzi. Ionic. liquids and their toxicity on the enzyme activity and stability. *Trends Pep. Protein. Sci.*, **2017**, 2, 24-34.
- [21] N. V. Plechkova, K. R. Seddon. Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 123-150.
- [22] O. G. Polyakov, S. M. Ivanova, C. M. Gaudinski, S. M. Miller, O. P. Anderson, S. H. Strauss, “Cu(CO)<sub>2</sub>(N(SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). The first structurally characterized copper(I) polycarbonyl. *Organometallics*, **1999**, 18, 3769-3771.
- [23] Q-P. Liu, X-D. Hou, N. Li, M-H. Zong. Ionic liquids from renewable biomaterials: Synthesis, characterization and application in the pretreatment of biomass. *Green Chem.* **2014**, 14, 304-307.
- [24] X-D. Hou, T.J Smith, N. Li, M-H Zong. Novel renewable ionic liquids as highly effective solvents for pretreatment of rice straw biomass by selective removal of lignin. *Biotechnol.*

- Bioeng.*, **2012**, 109, 2484-2493.
- [25] K. M. Dieter, C. J. Dymek, N. E. Heimer, J. W. Rovang, J. S. Wilkes. Ionic structure and interactions in 1-methyl-3-ethylimidazolium Chloride-AlCl<sub>3</sub> molten salts. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 110, 2722-2726.
- [26] J. Dupont, P. A. Suarez, R. F. De Souza, R. A. Burrow, J. P. Kintzinger. C-H- $\pi$  interactions in 1-n-butyl-3-methylimidazolium tetraphenylborate molten salt: Solid and solution structures. *Chemistry*, **2000**, 6, 2377-2381.
- [27] C. S. Consorti, P. A. Suarez, R. F. de Souza, R. A. Burrow, D. H. Farrar, A. J. Lough, W. Loh, L. H. M. da Silva, J. Dupont. Identification of 1,3-dialkylimidazolium salt supramolecular aggregates in solution. *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 4341-4349.
- [28] P. Kubisa. Application of ionic liquids as solvents for polymerization processes. *Prog. Polym. Sci.*, **2004**, 29, 3-12.
- [29] C. Chiappe, D. Pieraccini. Ionic liquids: Solvent properties and organic reactivity. *J. Phys. Org. Chem.*, **2005**, 18, 275-297.
- [30] C. F. Poole. Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1037, 49-82.
- [31] J. Dupont. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2004**, 15, 341-350.
- [32] F. van Rantwijk, R. A. Sheldon. Biocatalysis in ionic liquids. *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 2757-2785.
- [33] C. Chiappe, M. Malvaldi, C. S. Pomelli. Ionic liquids: Solvation ability and polarity. *Pure Appl. Chem.*, **2014**, 81, 767-776.
- [34] D. MacFarlane, M. Kar, J. M. Pringle. *An introduction to ionic liquids*. En *Fundamentals of ionic liquids: From chemistry to applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA: Weinheim, **2017**.
- [35] S. Mallakpour, M. Dinari. *Ionic liquids as green solvents: Progress and prospects*. En *Green Solvents II*. Springer: Dordrecht, **2012**.
- [36] M. Cvjetko Bubalo, K. Radosevic, I. Radojic Redovnikovic, J. Halambek, V. Gaurina Sreck. A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotox. Environ. Safe.*, **2014**, 99, 1-12.
- [37] M. Matzke, S. Stolte, K. Thiele, T. Juffernholz, J. Arning, J. Ranke, R. 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.*, **2007**, 9, 1198-1207.
- [38] P. Stepnowski, A. Zaleska. Comparison of different advanced oxidation processes for the degradation of room temperature ionic liquids. *J. Photochem. Photobio. A Chem.*, **2005**, 170, 45-50.
- [39] T. P. Thuy Pham, C. Cho, Y.S. Yun. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water Res.*, **2010**, 352-372.
- [40] P. Lozano, E. Garcia-Verdugo, J. M. Bernal, D.F. Izquierzo, M. I. Burguete, G. Sanchez-



- Gomez, S. V. Luis. Immobilised lipase on structured supports containing covalently attached ionic liquids for the continuous synthesis of biodiesel in scCO<sub>2</sub>. *ChemSusChem*, **2012**, 5, 790-798.
- [41] M. Atilhan, S. Aparicio. Deep eutectic solvents on the surface of face centered cubic metals. *J. Phys. Chem. C*, **2016**, 19, 10400-10409.
- [42] D. Carriazo, M. C. Serrano, M. C. Gutierrez, M. L. Ferrer, F. del Monte. Deep-eutectic solvents playing multiple roles in the synthesis of polymers and related materials. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 4996-5014.
- [43] G. Garcia, S. Aparicio, R. Ullah, M. Atilhan. Deep eutectic solvents: Physicochemical properties and gas separation applications. *Energ. Fuels*, **2015**, 29, 2616-2644.
- [44] Y. Dai, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Y. H. Choi. Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Annals Chem.*, **2013**, 85, 6272-6278.
- [45] Y. Dai, B. Huan, H. S. Zhang, Y. C. He. Effective biotransformation of ethyl 4-chloro-3 oxobutanoate into ethyl (S)-4-chloro-3 hydroxybutanoate by recombinant E-coli CCZU-T15 whole cells in ChCl Gly-water media. *App. Biochem. Biotechnol.*, **2017**, 181, 1347-1359.
- [46] D. Gonzalez-Martinez, V. Gotor, V. Gotor-Fernandez. Application of deep eutectic solvents in promiscuous lipase-catalysed aldol reactions. *Eur. J. Org. Chem.*, **2016**, 1513-1519.
- [47] Y. P. Mbous, M. Hayyan, A. Hayyan, W. F. Wong, M. A. Hashim, C. Y. Looi. Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering - Promises and challenges. *Biotechnol. Adv.*, **2017**, 35, 105-134.
- [48] P. Xu, G.-W. Zheng, M.-H. Zong, N. Li, and W- Y. Lou. Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis. *Bioresour. Bioprocess.*, **2017**, 4, Art. num. 34.
- [49] M. Pätzold, S. Siebenhaller, S. Kara, A. Liese, C. Syldatk, D. Holtmann. Deep eutectic solvents as efficient solvents in biocatalysis. *Biochem. Sci.*, **2019**, 37, 943-959.
- [50] S. Dutta, K. Nath. Prospect of ionic liquids and deep eutectic solvents as new generation draw solution in forward osmosis process. *J. Water Process Eng.*, **2018**, 21, 163-176.
- [51] D. J. G. P. van Osch, L. F. Zubeir, A. van den Bruinhorst, M. A. A. Rocha, M. C. Kroon, Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants. *Green Chem.*, **2015**, 17, 4518-4521.
- [52] B. D. Ribeiro, C. Florindo, L. C. Iff, M. A. Z. Coelho, I. M. Marrucho. Menthol-based eutectic mixtures: Hydrophobic low viscosity solvents. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2015**, 3, 2469-2477.
- [53] M. A. R. Martins, E. A. Crespo, P. V. A. Pontes, L. P. Silva, M. Bülow, G. J. Maximo, E. A. C. Batosta, C. Held, S. P. Pinho, J. A. P. Coutinho. Tunable hydrophobic eutectic solvents based on terpenes and monocarboxylic acids. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2018**, 6, 8836-8846.
- [54] E. L. Smith, A. P. Abbot, K. S. Ryder. Deep eutectic solvents (DESS) and their applications. *Chem. Rev.*, **2014**, 114, 11060-1082.

- [55] Y. H. Choi, J. van Spronsen, Y. Dai, M. Verberne, F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol.*, **2011**, 156, 1701-1705.
- [56] Q. Zhang, K. de Oliveira Vigier, S. Royer, and F. Jérôme. Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chemical Soc. Rev.*, **2012**, 41, 7108-7146.
- [57] A. P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 9142-9147.
- [58] A. P. Abbott, R. C. Harris, K. S. Ryder, C. D'Agostino, L. F. Gladden, M. D. Mantle. Glycerol eutectics as sustainable solvent systems. *Green Chem.*, **2011**, 13, 82-90.
- [59] Y. Dai, J. van Spronsen, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Y. H. Choi. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology, *Anal. Chim. Acta*, **2013**, 766, 61-68.
- [60] M. Hayyan., M. A. Hashim, M.A, Al-Saadi, A. Hayyan, I. M. AlNashef, M. E, Mirghani. Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium based deep eutectic solvents. *Chemosphere*, **2013**, 93, 455-459.
- [61] K. Radosevic, B. Cvjetko, V. Gaurina Sreck, D. Grgas, T. Landeka Dragicevic, R. I. Redovinikovic. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotox. Environ. Safe.*, **2015**, 112, 46-53.
- [62] A. S. Bommarius, B. R. Riebel-Bommarius. *Biocatalysis: Fundamentals and applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2004**.
- [63] J. M. Bernal, P. Lozano, E. Garcia-Verdugo, M. I. Burguete, G. Sanchez-Gomez, G. Lopez-Lopez, M. Pucheault, M. Vaultier, S. V. Luis. Supercritical synthesis of biodiesel. *Molecules*, **2012**, 17, 8696-8719.
- [64] N. R. Khan, V. K. Rathod. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. *Process Biochem.*, **2015**, 50, 1793-1806.
- [65] M. B. Ansorge-Schumacher, O. Thum. Immobilised lipases in the cosmetics industry. *Chem. Rev.*, **2013**, 42, 6475-6490.
- [66] A. Kundys, E. Bialecka-Florjanczyk, A. Fabiszewska, J. Małajowicz. *Candida antarctica* lipase B as catalyst for cyclic esters synthesis, their polymerization and degradation of aliphatic polyesters. *J. Polym. Environ.*, **2018**, 26, 396-407.
- [67] F. Hasan, A. A. Shah, A. Hameed. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, **2006**, 39, 235-251.
- [68] A. G. A. Sa, A. C. de Meneses, L. A. Lerin, P. H. H. de Araujo, C. Sayer, D. de Oliveira. Biocatalysis of aromatic benzyl-propionate ester by different immobilized lipases. *Bioproc. Biosys. Eng.*, **2018**, 41, 585-591.
- [69] L. R. Madeira, F. van Rantwijk, K. Seddon, R. A. Sheldon. Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. *Org. Lett.*, **2000**, 2, 4189-4191.
- [70] E. Durand, J. Lecomte, B. Barea, G. Piombo, E. Dubreucq, P. Villeneuve. Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. *Process Biochem.*, **2012**, 47, 2081-2089.

- [71] P. Lozano, J. M. Bernal, A. Navarro. A clean enzymatic process for producing flavour esters by direct esterification in switchable ionic liquid/solid phases. *Green Chem.*, **2012**, 14, 3026-3033.
- [72] P. Lozano, C. Gomez, A. Nicolas, R. Polo, J. M. Bernal, E. Garcia-Verdugo, S. V. Luis. Clean enzymatic preparation of oxygenated biofuels from vegetable and waste cooking oils by using spongelike ionic liquids technology. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2016**, 4, 6125-6132.
- [73] O. Kirk, M. W. Christensen. Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. *Org. Process Res. Dev.*, **2002**, 6, 446-451.
- [74] J. Uppenberg, T. Bergfors, T.A. Jones. Crystallization and preliminary X-ray studies of Lipase B from *Candida antarctica*. *J. Mol. Biol.*, **1994**, 235, 790-792.
- [75] P. Strzelczyk, G. D. Bujacz, P. Kielbasiński, J. Blaszczyk. Crystal and molecular structure of hexagonal form of lipase B from *Candida antarctica*. *Acta Biochim. Pol.*, 63, 103-109.
- [76] D. Rotticci. *Understanding and engineering the enantioselectivity of Candida antarctica Lipase B towards sec-alcohols*. PhD Thesis, Royal Institute of Technology: Stockholm, **2000**.
- [77] R. Fernandez-Lafuente. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2010**, 62, 197-212.
- [78] A. M. Klivbanov. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, **2001**, 409, 241-246.
- [79] A. Zaks, A. M. Klivbanov. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science*, **1984**, 224, 1249-1251.
- [80] P. Trodler, J. Pleiss. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Struct. Biol.*, **2008**, 8, 1-10.
- [81] J. Dupont, T. Itoh, P. Lozano, S. V. Malhotra. *Environmentally friendly syntheses using ionic liquids*. CRC Press: New York, **2014**.
- [82] O. Thum. Enzymatic production of care specialties based on fatty acid esters. *Tenside Surfact. Det.*, **2004**, 6, 287-290.
- [83] K. R. Kiran, S. Divkar. Lipase catalyzed synthesis of organic acid esters of lactic acid in non-aqueous media. *J. Biotechnol.*, **2001**, 87, 109-121.
- [84] A. Pandey, S. Benjamin, C. R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger, V. T. Soccol. The real of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **1999**, 29, 119-131.
- [85] E. Maurin, D. Sera, G. Guth. Topical application products containing a lipase and a hydroxyacid precursor. Patent. num. FR2725898A1, **1996**.
- [86] L. L. Cao. *Carrier-bound immobilized enzymes*. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA: Weinheim, **2005**.
- [87] R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2010**, 64, 1-22.
- [88] E. Abdulmalek, H. S. Mohd Saupi, B. A. Tejo, M. Basri, A. B. Salleh, R. N. Z. Raja Abd

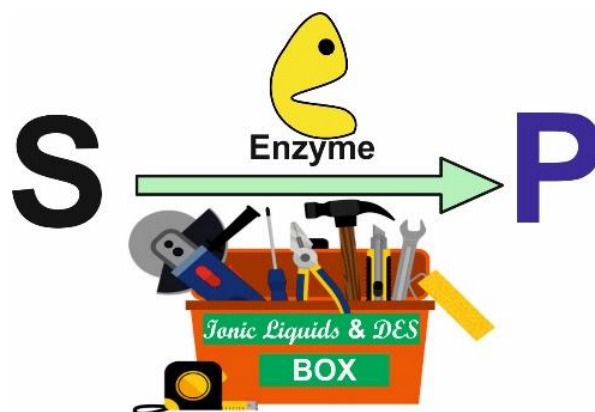
- Rahman, M. B. Rahman. Improved enzymatic galactose oleate ester synthesis in ionic liquids. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2012**, 76, 37-43.
- [89] S. Sabeder, M. Habulin, Z. Knez. The lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters in organic media and in supercritical carbon dioxide. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.*, **2006**, 12, 147-151.
- [90] A. E. M. Janssen, C. Klabbers, M. C. R. Franssen, and K. van't Riet. Enzymatic synthesis of carbohydrate esters in 2-pyrrolidone. *Enzyme Microb. Technol.*, **1991**, 13, 565-572.
- [91] A. Adnani, M. Basri, N. Chaibakhsh, H. A. Ahangar, A. B. Salleh, R.N.Z.R.A. Rahman, M. B. Abdul Rahman. Chemometric analysis of lipase-catalyzed synthesis of xylitol esters in a solvent-free system. *Carbohydr. Res.*, **2011**, 346, 472-479.
- [92] M. W. Oosterom, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon. Regioselective acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, 49, 328-333.
- [93] R. Ben Salah, H. Ghamghui, N. Miled, H. Mejdoub, Y. Gargouri. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryza*. *J. Biosci. Bioeng.*, **2007**, 103, 368-372.
- [94] G. D. Yadav, S. Devendran. Lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification in non-aqueous medium. *Process Biochem.*, **2012**, 47, 496-502.
- [95] S. H. Krishna, S. Divakar, S. G. Prapulla, N. G. Karanth. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *J. Biotechnol.*, **2001**, 87, 193-201.
- [96] I.-L. Shih, S.-H. Hung, F.-Y. Chen, H.-Y. Ju, C.-J. Shieh. Optimized synthesis of lipase-catalyzed L-menthyl butyrate by *Candia rugosa* lipase. *Food Chem.*, **2007**, 100, 1223-1228.
- [97] E. Białecka-Florjańczyk, J. Krzyczkowska, I. Stolarzewicz, A. Kapturowska. Synthesis of 2-phenylethyl acetate in the presence of *Yarrowia lipolytica* KKP 379 biomass. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2012**, 74, 241-245.
- [98] D. Reyes-Duarte, N. Lopez-Cortes, P. Torres, F. Comelles, J. L. Parra, S. Peña, A. V. Ugidos, A. Ballesteros, F. J. Plou. Synthesis and properties of ascorbyl esters catalyzed by lipozyme TL IM using triglycerides as acyl donors. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2011**, 88, 57-64.
- [99] S. Moreno-Perez, M. Filice, J. M. Guisan, G. Fernandez-Lorente. Synthesis of ascorbyl oleate by transesterification of olive oil with ascorbic acid in polar organic media catalyzed by immobilized lipases. *Chem. Phys. Lipids*, **2013**, 174, 48-54.
- [100] C. Yin, C. Zhang, M. Gao. Enzyme-catalyzed synthesis of vitamin E succinate using a chemically modified Novozym-435. *Chin. J. Chem. Eng.*, **2011**, 19, 135-139.
- [101] P. Torres, A. Poveda, J. Jimenez-Barbero, A. Ballesteros, F. J. Plou. Regioselective lipase-catalyzed synthesis of 3-o-acyl derivatives of resveratrol and study of their antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58, 807-813.
- [102] C. Yin, T. Liu, T. Tan. Synthesis of vitamin A esters by immobilized *Candida sp.* lipase in organic media. *Chin. J. Chem. Eng.*, **2006**, 14, 81-86.

- [103] M.-M. Zheng, L. Wang, F.-H. Huang, P.M. Guo, F. Wei, Q.-C. Deng, C. Zheng, C.-Y. Wan. Ultrasound irradiation promoted lipase-catalyzed synthesis of flavonoid esters with unsaturated fatty acids. *J. Mol. Catal B-Enzym.*, **2013**, 95, 82-88.
- [104] A. F. B. Lajis, M. Hamid, S. Ahmad, A. B. Ariff. Lipase-catalyzed synthesis of kojic acid derivative in bioreactors and the analysis of its depigmenting and antioxidant activities. *Cosmetics*, **2017**, 4, Art. num. 3.
- [105] T. Diego, A. Manjon, J. L. Iborra. Selective synthesis of panthenyl esters by a kinetically controlled enzymatic process. *Biotechnol. Lett.*, **2013**, 31, 175-180.
- [106] I. Aissa, R. Sghair, M. Bouaziz, D. Laouini, S. Sayadi, Y. Gargouri. Synthesis of lipophilic tyrosyl esters derivatives and assessment of their antimicrobial and antileishmania activities. *Lipids Health Dis.*, **2012**, 11, Art. num. 13.



## CAPÍTULO II

### “Procesos biocatalíticos limpios en disolventes neotéricos”



*“En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que queremos durante toda la vida”*

*Lee Smolin*

Parte de los resultados presentados en este capítulo se encuentran recogidos en la publicación:

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





## 1. INTRODUCCIÓN

---

Dentro del campo de la Química Verde, la biocatálisis presenta unas características muy atractivas debido al carácter renovable de las enzimas, así como a la elevada eficiencia que aporta a las transformaciones químicas. Por otro lado, los ILs y los DESs, debido a sus propiedades únicas como disolventes, se presentan como unos excepcionales medios de reacción no acuosos en biotransformaciones.

Como se ha comentado en el **Capítulo I** de esta memoria, la Química Verde va mucho más allá de reemplazar disolventes perjudiciales para la salud y el medio ambiente por otros benignos, siendo necesario el diseño de metodologías limpias que cumplan con los requisitos del desarrollo sostenible. Para ello, estas metodologías deben incluir transformación eficiente de los sustratos, la recuperación de los productos y la reutilización de todos los elementos que constituyen el sistema de reacción. En este sentido, la combinación de enzimas con disolventes neotéricos (p. ej. DESs, SLILs, ILs y/o  $\text{scCO}_2$ ) se presenta como una estrategia para el desarrollo integral de nuevos procesos verdes de síntesis catalítica de interés industrial [1].

En este capítulo se discute la idoneidad de las enzimas, prestando especial interés en las lipasas, para llevar a cabo reacciones de biocatálisis en disolventes neotéricos. Además, se describe como estas estrategias se pueden explotar para diseñar protocolos limpios que integren la síntesis y separación de productos de gran interés en la industria (p. ej. cosmética, alimentaria, farmacéutica, biocombustibles, etc.) recuperando y reutilizando el sistema compuesto por el biocatalizador y el medio de reacción.

## 2. ENZIMAS EN MEDIOS NO ACUOSOS

---

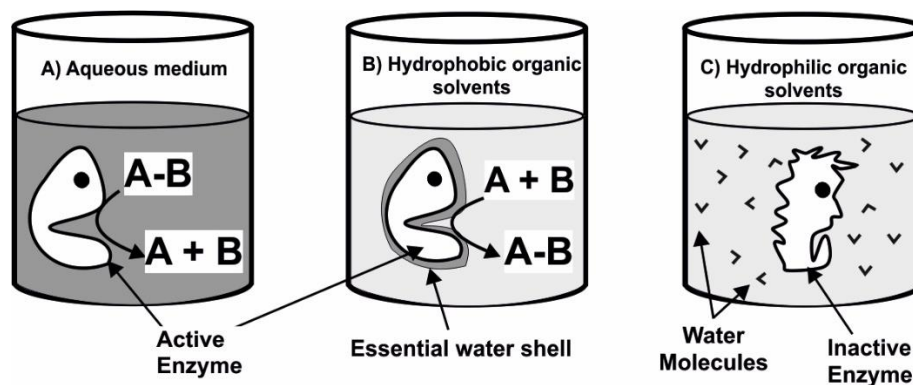
Las enzimas están diseñadas para actuar en disoluciones acuosas, en un rango de pH, temperatura y presión ambientales, ya que fuera de estos rangos pierden su conformación nativa y, por tanto, su actividad. Es por ello que la industria alimentaria ha sido, hasta el momento, el campo mayoritario de aplicación de las enzimas (p. ej. la clarificación de zumos de frutas, obtención de harinas texturizadas, jarabe de fructosa, etc.) [2,3].

Sin embargo, a pesar de su naturaleza proteica, se ha descrito la capacidad de las enzimas para catalizar transformaciones químicas en medios no acuosos, aumentando así

el abanico de aplicaciones. Además, el continuo desarrollo y los avances realizados en el campo de la ingeniería genética, así como el conocimiento de la biodiversidad natural han dado lugar a una gran mejora en la disponibilidad de enzimas con mayor actividad, estabilidad y especificidad en una gran variedad de aplicaciones industriales [4,5].

No obstante, teniendo en cuenta que los organismos vivos son la principal fuente de suministro de enzimas, el agua juega un papel fundamental en el mantenimiento de la conformación activa de las mismas. La estructura interna del sitio activo de las proteínas se mantiene por interacciones con las moléculas de agua que constituyen la capa esencial de hidratación, contribuyendo así al mantenimiento de la actividad enzimática. Cabe destacar que las proteínas deshidratadas son completamente inactivas y que solo logran su actividad biológica completa cuando la capa de hidratación está compuesta por aproximadamente la misma masa de agua que dicha proteína [6]. En este sentido, la presencia de unas pocas moléculas de agua en medios no acuosos explicaría cómo las enzimas son capaces de mantener su actividad catalítica en dicho entorno.

Sin embargo, la sustitución del agua por disolventes no acuosos como medio de reacción para verificar transformaciones catalizadas por enzimas, no es un problema fácil de resolver. Esto se debe a que los disolventes hidrofílicos son capaces de retirar las moléculas de agua que conforman la capa de hidratación esencial, provocando un cambio en la estructura tridimensional, que conduce a una desactivación rápida del biocatalizador. Por el contrario, los disolventes hidrofóbicos, no miscibles en agua, generalmente conducen a una mayor actividad enzimática, asumiéndose que la enzima hidratada y en un sistema hidrófobo seco queda atrapada en su estado nativo, donde es capaz de mantener su actividad catalítica (ver **Figura 1**) [1,7,8].



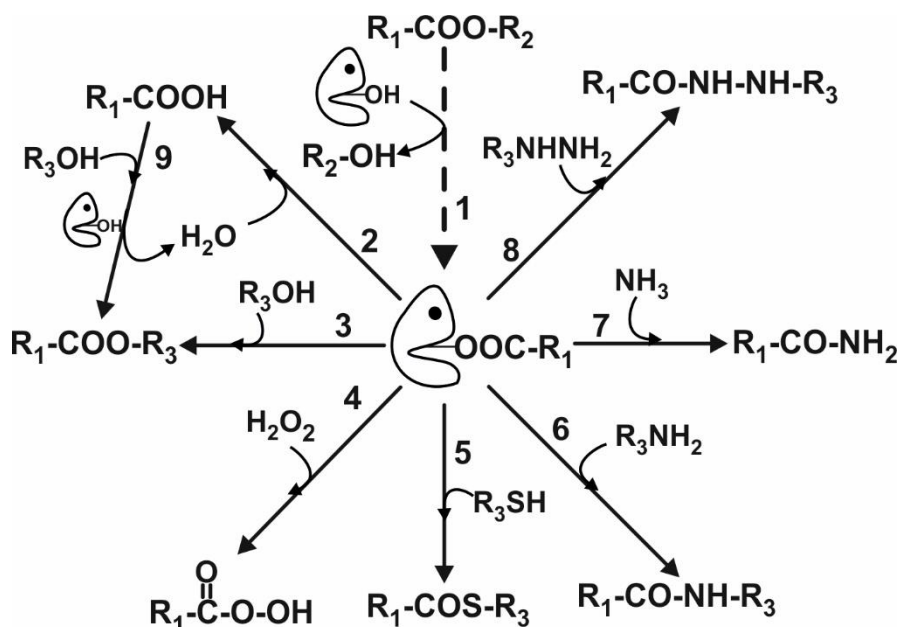
**Figura 1.** Representación esquemática del papel del agua sobre la actividad enzimática en un medio de reacción: **A)** Acuoso; **B)** Disolvente orgánico hidrofóbico; **C)** Disolvente orgánico hidrofílico [1].

Teniendo en cuenta lo mencionado hasta el momento, el empleo de enzimas en medios no acuosos da lugar a una ampliación en la gama de sustratos que pueden ser transformados enzimáticamente (p. ej. reacciones con sustratos hidrófobos), mejorando al mismo tiempo el rendimiento, selectividad y las condiciones de reacción.

Cabe destacar el interés que presentan las enzimas hidrolíticas (p. ej. lipasas, esterasas, proteasas, glicolasas, etc.) en ambientes no acuosos, donde el papel agua como reactivo es prácticamente inexistente. Esto da lugar a que las hidrolasas sean capaces de acelerar la reacción en sentido directo e inverso, modificando la velocidad de la misma, gracias a la reversibilidad del equilibrio. Por lo tanto, en ausencia de agua y presencia de nucleófilos alternativos, (p. ej. alcoholes, aminas, tioles, etc.) el equilibrio se desplazará hacia la formación del producto de síntesis (ver **Figura 2**) [1].

Muchas enzimas de la familia de las hidrolasas (EC.3) (p. ej. lipasas, proteasas, glucosidasas, etc.) han demostrado su capacidad para actuar en síntesis orgánica en ambientes no acuosos [7,9,10]. Entre ellas, destacan las lipasas debido al extenso abanico de sustratos que pueden transformar y al interés de los productos sintetizados. Como se puede observar en la **Figura 2**, las lipasas son capaces de catalizar reacciones de transferencia de grupos acilo. Así, dependiendo de los grupos sustituyentes ( $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$ ) estas enzimas catalizarán diferentes reacciones (p. ej. aminólisis, hidrólisis, transesterificación, etc.). Cabe destacar que las lipasas juegan un papel muy importante como biocatalizadores en la síntesis de ésteres de alto valor añadido en la industria (p. ej. ésteres de aromas, biodiesel, derivados esterificados de vitaminas, etc.) [11,12]. En este sentido, la obtención de ésteres, reacción objeto de estudio en la presente memoria, puede

tener lugar mediante esterificación (**Figura 2.9**) o mediante transesterificación (**Figura 2.3**), dependiendo del donador de acilo empleado, mientras que, en ambos casos se emplea un alcohol como aceptor nucleofílico de la reacción.



**Figura 2.** Esquema de reacciones químicas catalizadas por serina-hidrolasas. 1) Formación del intermediario acilo-enzima; 2) Reacción de hidrólisis; 3) Transesterificación; 4) Perhidrólisis; 5) Tiolisis; 6) Aminólisis; 7) Aminólisis; 8) Hidrazinolisis; 9) Esterificación [1].

Las reacciones de síntesis de ésteres mediante transesterificación catalizada por una hidrolasa (p. ej. lipasa) emplean, como sustratos, donadores de acilo químicamente modificados (p. ej. ésteres de vinilo, ésteres de metilo o isopropenilo, etc.). No obstante, el empleo de derivados de ácidos carboxílicos como sustratos donadores de acilo, supone un encarecimiento de los procesos y una pérdida considerable en la sostenibilidad de los mismos, como consecuencia de la necesidad de emplear mayor número de etapas de purificación de los productos (ver **Figura 2.3**) [13].

Por su parte, la síntesis de ésteres mediante el mecanismo de esterificación enzimática emplea ácidos carboxílicos libres como sustratos donadores de acilo, de tal forma que la esterificación directa entre estos ácidos y un alcohol constituye un mecanismo de control termodinámico sencillo, barato y sostenible. Esto se debe a que se pueden emplear directamente sustratos naturales y no se genera ningún tipo de subproducto indeseado que sea necesario eliminar tras la reacción. No obstante, teniendo en cuenta que las reacciones

de síntesis e hidrólisis están en equilibrio (ver **Figura 2.9**), el desplazamiento del mismo hacia la obtención del éster deseado se puede favorecer mediante la retirada del agua del medio. En este sentido, se ha demostrado que se pueden llevar a cabo procesos de síntesis biocatalítica de ésteres, mediante este mecanismo, con rendimientos cercanos al 100% cuando el medio de reacción está compuesto por disolventes hidrofóbicos (p. ej. disolventes orgánicos, ILs), ya que se produce una retirada continua del agua generada en dicha reacción [14-16].

Sin embargo, el coste económico de las enzimas supone un gran inconveniente cuando se emplean en procesos industriales, traduciéndose en un incremento del precio final del producto. Además, la presencia permanente de la enzima en el producto final puede dar lugar a posteriores alteraciones no controladas del mismo. Es por ello que la inmovilización se ha convertido en un aspecto fundamental para optimizar el rendimiento operacional de las enzimas, particularmente cuando éstas se emplean en medios no acuosos, ya que permite su fácil recuperación y su potencial reutilización. De esta forma, se han desarrollado una gran variedad de metodologías de inmovilización enzimática (p. ej. mediante enlace covalente o iónico sobre soportes porosos prefabricados, atrapamiento en matrices poliméricas orgánicas o inorgánicas, hidrogeles o polímeros inteligentes, entrecruzamiento entre las moléculas de la enzima, etc.). El objetivo final es la obtención de catalizadores heterogéneos activos y estables para llevar a cabo reacciones de síntesis química durante un largo periodo de tiempo [17]. Así, las principales ventajas que presenta el empleo de enzimas inmovilizadas son: el incremento en la estabilidad enzimática, la separación sencilla y la capacidad para ser reutilizada en procesos de síntesis posteriores [18].

### **3. BIOCATÁLISIS Y LÍQUIDOS IÓNICOS**

---

A pesar de que las enzimas son herramientas verdes que proporcionan un gran número de ventajas en procesos biocatalíticos, el empleo de ciertos disolventes puede constituir un serio inconveniente para la sostenibilidad de los mismos [19].

Los disolventes juegan un papel fundamental en los procesos químicos industriales, actuando como medios donde tiene lugar la reacción y/o separación de los productos [20]. Por lo tanto, son uno de los principales responsables del problema medioambiental asociado a la industria química, así como de la seguridad y salud de las personas, además

de ejercer un gran impacto en el coste económico de los productos [21]. Es por ello que, desde principios de siglo, es prioritario el empleo de disolventes no acuosos, medioambientalmente benignos y capaces de ser reutilizados. Dentro de estos disolventes neotéricos, los ILs, los fluidos supercríticos y los DESs, han despertado un gran interés a nivel académico e industrial [22-24].

### 3.1. Enzimas en líquidos iónicos: actividad y estabilidad

La idoneidad de los ILs como medio de reacción en catálisis enzimática fue demostrada por primera vez en el año 2000 por los grupos de investigación de Russel y Sheldon [25,26]. A partir de entonces, los estudios de biocatálisis en ILs han crecido exponencialmente y en la actualidad existen más de 5000 artículos que hacen referencia al empleo de diversas enzimas (p. ej. lipasas, proteasas, peroxidasas, deshidrogenasas, etc.) en diferentes tipos de reacciones (p. ej. esterificación, aminólisis, resolución cinética, oxidaciones, hidrólisis, reducciones, etc.) en ILs. Itoh et al. [27] fueron los primeros en demostrar la capacidad de las lipasas para catalizar la transesterificación asimétrica de un alcohol alílico (*rac*-5-fenil-1-penten-3-ol) con acetato de vinilo en diferentes ILs hidrófobos. En el mismo año, Lozano et al. [28] demostraron por primera vez la capacidad los ILs inmiscibles en agua para “súper” estabilizar a las enzimas en medios anhidros, empleando como reacción modelo la síntesis de butirato de butilo catalizada por una lipasa.

Los resultados obtenidos por ambos grupos de investigación muestran de forma representativa las ventajas del empleo de ILs en biocatálisis, entre las que se pueden destacar [1]:

- a) Idoneidad de los ILs inmiscibles en agua como medio de reacción biocatalítica. Los ILs inmiscibles en agua (p. ej. [Bmim][NTf<sub>2</sub>], [Bmim][PF<sub>6</sub>], etc.) han mostrado ser excelentes medios de reacción para llevar a cabo reacciones de biocatálisis, mientras que los ILs miscibles en agua (p. ej. [Bmim][TFA], [Bmim][TfO], [Bmim][Cl], etc.) normalmente promueven la desactivación enzimática.
- b) Idoneidad de los ILs hidrofóbicos para mantener anclada la enzima en su red iónica, manteniendo su actividad y permitiendo su reutilización.

- c) Separación sencilla de los productos y reutilización del IL. Los ILs permiten diseñar protocolos de extracción de los productos de síntesis mediante extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos no miscibles con el IL, quedando este último disponible para su posterior reutilización.

Tras el éxito de estos trabajos de investigación ([25,26,28]) la actividad científica se ha centrado en el estudio de la idoneidad de los ILs como medio de reacción en transformaciones biocatalíticas, demostrando el excelente comportamiento de los biocatalizadores en algunos ILs. Actualmente la comunidad científica se muestra especialmente interesada en el desarrollo de procesos sostenibles que integren la biotransformación y la separación del producto evitando el empleo de disolventes orgánicos volátiles [1,10,29]. En este sentido, se ha demostrado que, por lo general, los ILs inmiscibles en agua (p. ej. [Bmim][NTf<sub>2</sub>], [Btma][NTf<sub>2</sub>], etc.) constituyen excelentes medios de reacción en biocatálisis, mejorando en algunos casos los resultados obtenidos con algunos de los disolventes orgánicos comúnmente empleados [30-32].

Se ha demostrado, mediante técnicas espectroscópicas (p. ej. dicroísmo circular, espectroscopía infrarroja y espectroscopía de fluorescencia), el papel que juegan diferentes ILs hidrofóbicos en el mantenimiento de la estructura nativa de las enzimas (p. ej. CALB, celulasa, alfa-amilasa, etc.) [5, 33-35]. Esto se debe a que los ILs, incluso los inmiscibles en agua, son disolventes higroscópicos que pueden absorber y preservar un pequeño porcentaje de agua, el cual resulta esencial para el mantenimiento de la estructura nativa de las enzimas [22]. En la **Tabla 1** se muestra el contenido en agua que es capaz de disolver algunas sales compuestas por el anión [NTf<sub>2</sub>] y diferentes cationes imidazolio. A modo de ejemplo, el IL inmiscible en agua, 1-metil-3-butylimidazolio bis((trifluorometil)sulfonil)imida ha demostrado ser capaz de disolver un 1.4% (m/v) de agua [36]. Esta característica resulta fundamental para entender la idoneidad de los ILs en biocatálisis.

**Tabla 1.** Contenido másico en agua (% masa) de algunas sales de imidazolio, líquidas a 20 °C [36].

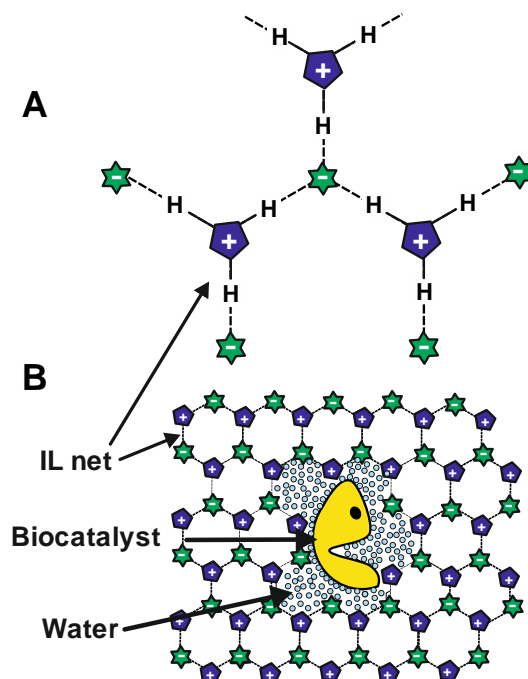
<b>[Im]<sup>+</sup> [NTf<sub>2</sub>]<sup>-</sup></b>	<b>% agua (m/v)</b>
1-Metil-3-metilimidazolio bis((trifluorometil)sulfonyl)imida	2.5
1-Etil-3-metilimidazolio bis((trifluorometil)sulfonyl)imida	1.4
1-Butil-3-metilimidazolio bis((trifluorometil)sulfonyl)imida	1.4
1-Etil-3-etilimidazolio bis((trifluorometil)sulfonyl)imida	2.0
1-Butil-3-etilimidazolio bis((trifluorometil)sulfonyl)imida	1.3
3-Metil-etil-2-metilimidazolio bis((trifluorometil)sulfonyl)imida	1.8

De esta manera, los ILs hidrófobos, inmiscibles en agua, son capaces de exaltar tanto la actividad como la estabilidad enzimática [34]. Por el contrario, los ILs miscibles en agua promueven la desactivación rápida de la enzima, probablemente debido a la pérdida de las moléculas de agua que conforman la capa esencial de hidratación en la superficie de las mismas [32]. No obstante, la actividad enzimática en este tipo de ILs se puede asegurar modulando la naturaleza y concentración de los iones. Por ejemplo, la actividad óptima de la lacasa para la oxidación del catecol se obtiene cuando se emplea una concentración comprendida entre el 10% y 20% (v/v) del IL ([Bmim][Br] o [Bmim][N(CN)<sub>2</sub>]) en agua, como medio de reacción, lo que sin duda constituye una disolución iónica más que un IL [37].

Estos resultados se pueden explicar atendiendo a la estructura de los ILs, que se han descrito como redes iónicas que se mantienen mediante interacciones de hidrógeno. En estas redes iónicas, se pueden incorporar otras moléculas que dan lugar a la formación de regiones polares y no polares, generándose así una direccionalidad en dicha red (ver **Capítulo I**). Así, los ILs se comportan como materiales nano-estructurados que permiten que moléculas neutras residan en las regiones menos polares y que las especies iónicas o polares presenten una difusión más rápida hacia las regiones polares. La **Figura 3** muestra cómo las enzimas se pueden acomodar en los huecos hidrofílicos de la red iónica, donde se encuentran ancladas mediante fuertes interacciones con la misma. De esta forma, la ordenación de la estructura supramolecular de los ILs en fase líquida actúa como un “molde”, ya que las regiones hidrófobas repelen las moléculas de agua y evitan el aumento de su energía cinética. Así, las moléculas de agua permanecen adheridas a la superficie enzimática, manteniendo la estructura tridimensional, incluso a temperaturas de reacción superiores a la temperatura óptima. En este sentido, la suspensión de las



enzimas en ILs se puede considerar como un tipo de inmovilización enzimática, ya que el anclaje del biocatalizador en la red iónica permite su recuperación junto al IL para su reutilización en diferentes procesos de síntesis [38].



**Figura 3.** Representación esquemática de una enzima en ILs hidrofóbicos [39].

#### 4. ESTRATEGIAS INTEGRADAS DE REACCIÓN Y SEPARACIÓN BASADAS EN LÍQUIDOS IÓNICOS

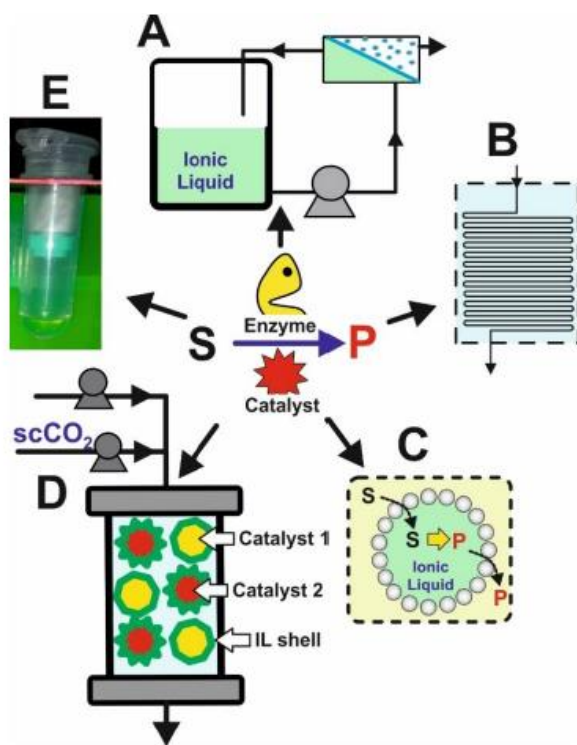
A pesar de las excelentes propiedades catalíticas mostradas por las enzimas en ILs, la recuperación de los productos constituye un factor clave en el desarrollo de cualquier proceso limpio. En este sentido, se pueden explotar las excelentes propiedades de los ILs para diseñar procesos que integren transformaciones (bio)catalíticas y la separación de los productos, recuperando y reutilizando el sistema (bio)catalizador/IL. En la **Figura 4** se muestran diferentes metodologías basadas en la integración de procesos de transformación/separación en ILs. Por ejemplo, se puede aprovechar la casi nula volatilidad de los ILs con respecto a la alta presión de vapor que presentan muchos compuestos moleculares (p. ej. aromas, etc.) para diseñar procesos de síntesis/separación de los productos empleando reactores de membrana (**Figura 4A**), de tal forma que la combinación del catalizador soportado en ILs con membranas permite llevar a cabo la separación de los productos y la recuperación del sistema catalítico, mejorando la eficiencia de la reacción química [40]. Por otro lado, la baja miscibilidad de los ILs en

muchos disolventes moleculares (p. ej. octano), permite el diseño de procesos integrados de síntesis/separación en dispositivos microfluídicos (**Figura 4B**) [41]. Las dimensiones de estos dispositivos permiten llevar a cabo la mezcla eficiente de todos los componentes de la reacción, así como el intercambio de calor rápido y controlado (gracias a la relación superficie/volumen). Esto se traduce en la mejora de la velocidad y rendimiento de las reacciones químicas, en comparación con los reactores tradicionales, así como se evita la aparición de fugas [41]. Además, estos dispositivos permiten separar fácilmente los productos [42].

La **Figura 4C** muestra el empleo de ILs en microsistemas de emulsión Pickering [41]. La emulsión Pickering consiste en la formación de dispersiones libres de surfactantes de dos fluidos inmiscibles entre sí, que son cinéticamente estabilizadas mediante partículas coloidales. Estos sistemas presentan la capacidad de llevar a cabo reacciones en cascada, proporcionando la separación de los productos del sistema catalítico [43-45].

Otra característica que presentan los ILs es que pueden formar sistemas bifásicos con el dióxido de carbono supercrítico (scCO<sub>2</sub>) en cualquier condición, ya que aunque el scCO<sub>2</sub> sea soluble en un determinado IL, el mismo IL no es soluble en scCO<sub>2</sub> [46,47]. Además, se ha descrito la idoneidad de los sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub> en el caso de ILs soportados en superficie polimérica (SILLPs, del inglés, *Supported Ionic Liquid-Like Phases*) [48], para diseñar sistemas catalíticos de flujo continuo que integran procesos de reacción y separación en una sola unidad (**Figura 4D**) [24].

Otra técnica basada en el empleo de ILs y que permite llevar a cabo procesos de reacción/separación se basa en el empleo de ILs hidrofóbicos con cationes de larga longitud de cadena alquílica (SLILs, del inglés, *Sponge-Like Ionic Liquids*). Estos ILs presentan la peculiaridad de formar fases sólidas o líquidas modificando la temperatura. Estos SLILs han demostrado ser excelentes medios de reacción en reacciones biocatalíticas a temperaturas superiores a sus puntos de fusión. Además, su capacidad de solidificar al disminuir la temperatura permite el diseño de protocolos sencillos de separación basados en etapas de enfriamiento y centrifugación del medio de reacción en estado sólido, obteniéndose productos casi puros (**Figura 4E**) [49].



**Figura 4.** Esquema de diferentes metodologías que emplean ILs como herramienta en procesos de reacción/separación. **A)** Reactores de membrana; **B)** Dispositivos microfluídicos; **C)** Microsistemas de emulsión Pickering con partículas sólidas; **D)** Reactores bifásicos compuestos por IL/ $scCO_2$  empleando líquidos iónicos soportados; **E)** SLILs [50].

#### 4.1. Biocatálisis en sistemas formados por líquidos iónicos y fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico (SCF, del inglés, *Supercritical Fluid*) se define como el estado de la materia a presión y temperatura por encima de su punto crítico, pero por debajo de la presión que se requiere para condensarla en estado sólido. Los SCFs presentan una serie de propiedades que hacen de ellos una alternativa más sostenible al empleo de COVs para llevar a cabo procesos de síntesis química. Entre estas propiedades cabe destacar que presentan difusividad similar a un gas, viscosidad similar a un líquido y capacidad de solvatación en un rango tan amplio que cubre la mayoría de los solventes orgánicos. Además, estas propiedades se pueden modular ajustando la presión y temperatura, permitiendo así el empleo de los SFCs para llevar a cabo procesos de extracción, reacción, fraccionamiento y procesos analíticos [56].

Entre las moléculas que se pueden usar en la tecnología de los SCFs, el dióxido de carbono supercrítico ha sido reconocido como una alternativa muy interesante a los disolventes orgánicos en procesos de síntesis biocatalítica y extracción de productos [57].

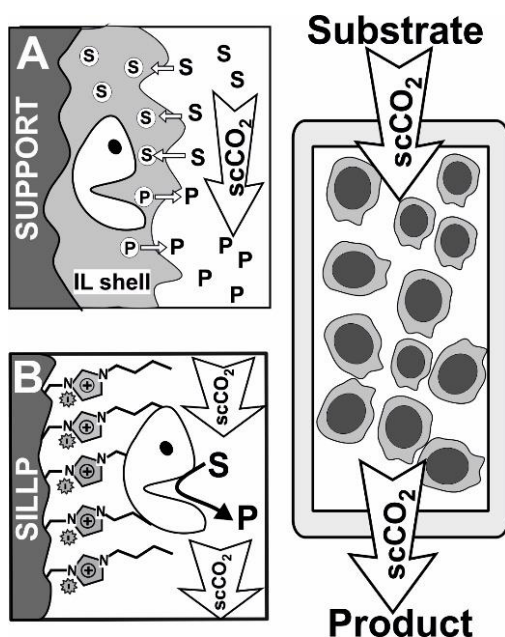
Esto se debe a que el CO<sub>2</sub> es químicamente inerte, no es tóxico ni inflamable y alcanza el punto crítico a presión y temperatura no muy elevadas (scCO<sub>2</sub>, P<sub>c</sub>=73.8 bar, T<sub>c</sub>=31.0 °C), por lo que resulta energéticamente económico, y además es una sustancia segura y fácilmente accesible [38].

El CO<sub>2</sub> es un gas de efecto invernadero, que se produce en grandes cantidades como subproducto de la síntesis de amoníaco a nivel industrial y, por tanto, es una sustancia barata. Además, a presión atmosférica es una sustancia gaseosa, lo que significa que mediante una simple despresurización se puede llevar a cabo la separación de los solutos del scCO<sub>2</sub>, permitiéndose la recuperación del CO<sub>2</sub> y posterior presurización hasta las condiciones supercríticas, para ser reutilizado. Cabe destacar que, mediante la modificación de la densidad aparente o mediante la adición de un cosolvente (p. ej. etanol, acetona, etc.), se pueden modular sus propiedades como solvente (p. ej. polaridad, afinidad por sustancias aromáticas, etc.). Sin embargo, el elevado coste económico de los equipos necesarios para trabajar a presiones elevadas, limita considerablemente la aplicación del scCO<sub>2</sub> a nivel industrial [11,38,58].

El empleo de scCO<sub>2</sub> como medio de reacción en biocatálisis presenta ciertas limitaciones, debido a que éste puede provocar modificaciones químicas en la superficie enzimática (p. ej. disminución del pH de la capa de hidratación superficial de la enzima) o cambios conformacionales durante el proceso de presurización/despresurización, que se traducen en una pérdida de actividad del biocatalizador [60,61]. En este sentido, se puede aprovechar la capacidad que presentan los ILs para estabilizar a las enzimas y diseñar sistemas bifásicos con el scCO<sub>2</sub>, de tal forma que el scCO<sub>2</sub> se utilice para extraer compuestos hidrofóbicos disueltos previamente en ILs [46,62]. Así, puede concluirse que el empleo de sistemas bifásicos compuestos por ILs y scCO<sub>2</sub>, ofrece dos ventajas principales para desarrollar procesos biocatalíticos más sostenibles; por una parte, la estabilización enzimática en los ILs y, en segundo lugar, la capacidad del scCO<sub>2</sub> para extraer selectivamente los compuestos disueltos en ILs. Además, cabe destacar que, en estos sistemas bifásicos, tanto el IL como el CO<sub>2</sub> pueden ser reciclados, permitiendo la recuperación de los productos totalmente libres de disolvente [1].

Teniendo en cuenta las ventajas de la combinación de ILs y scCO<sub>2</sub> en biocatálisis, en el año 2002 los grupos de P. Lozano [63] y W. Leitner [64] desarrollaron simultáneamente, y por primera vez, el concepto de biocatálisis en sistemas bifásicos no

acuosos. En estos sistemas, el biocatalizador se encuentra inmovilizado en el IL, constituyendo la fase catalítica, mientras que los sustratos y los productos permanecen en gran parte en el scCO<sub>2</sub>, que constituye la fase de alimentación y extracción, proporcionando directamente los productos (**Figura 5A**). En estos procesos, el flujo de scCO<sub>2</sub> permite tanto el transporte de los sustratos a la fase compuesta por el IL y el biocatalizador como la extracción de los productos de dicha fase, obteniéndose así productos totalmente libres de IL y pudiéndose reciclar el CO<sub>2</sub> mediante recompresión del gas [1].



**Figura 5.** Esquema de un reactor continuo para biocatálisis empleando scCO<sub>2</sub> como fase de extracción y como biocatalizador: **A)** Una enzima inmovilizada en partículas sólidas recubiertas de IL; **B)** Enzima adsorbida en un IL inmovilizado mediante adsorción en la superficie de un soporte sólido (SILLP, del inglés, *Supported Ionic Liquid Like-Phase*) [1].

Hasta la fecha, se han desarrollado muchos procesos biocatalíticos basados en sistemas bifásicos ILs/scCO<sub>2</sub>. Un ejemplo de ello, es la síntesis de ésteres alifáticos mediante transesterificación catalizada por CALB entre alcoholes alifáticos primarios (p. ej. 1-butanol) y ésteres de vinilo (p. ej. butirato de vinilo) [63].

Cabe señalar que la inmovilización del IL en un soporte (p. ej. adsorción del IL en la superficie de un soporte poroso, impregnación húmeda o mediante encapsulación del IL durante la síntesis de un material poroso), presenta grandes ventajas, ya que permite minimizar la cantidad de IL necesaria, así como mejorar la separación de productos [50].

En este sentido, el desarrollo de ILs soportados en fase sólida (SILPs, del inglés, *Supported Ionic Liquid Phases*), ya sea mediante funcionalización de la superficie de estireno-divinilbenceno con ILs (p. ej. imidazolio) o mediante polimerización de los correspondientes monómeros funcionales, abre una nueva vía de exploración para desarrollar nuevos procesos químicos sostenibles [1,24,50]. En la **Figura 5B** se muestra el esquema del sistema de reacción en continuo en el que la enzima está soportada en un SILLP y como fase de extracción se emplea scCO<sub>2</sub>. Esta metodología se ha empleado en biocatálisis heterogénea con el derivado inmovilizado de CALB-SILLP para el desarrollo de procesos sostenibles (p. ej. DKR del 1-feniletanol [48], síntesis de biodiesel [69], etc.), empleando un flujo continuo de scCO<sub>2</sub>.

No obstante, hay que recordar que la aplicación a nivel industrial de la combinación de ILs y SCFs se encuentra limitada por el coste económico de los equipos necesarios. Es por ello que, se precisa del desarrollo de nuevas alternativas sostenibles, sencillas y económicamente viables que integren procesos de síntesis catalítica y separación de productos (p. ej. ILs termosensibles y DESs [23,49,70]).

### **4.2. Biocatálisis en líquidos iónicos tipo esponja**

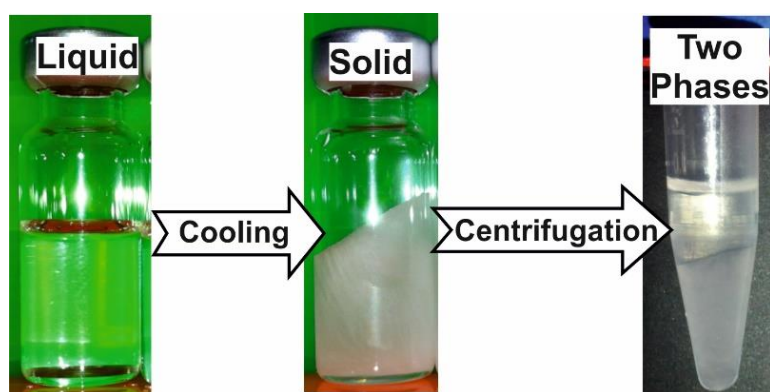
Los líquidos iónicos con comportamiento tipo esponja (SLILs) son una clase de ILs que han ganado gran fuerza en los últimos años debido a que presentan un comportamiento termorregulable. Es decir, pueden formar mezclas homogéneas con los reactivos y los productos a la temperatura de reacción y posteriormente separarse de los mismos, generando distintas fases mediante la modificación de la temperatura y el empleo de técnicas de centrifugación. Este comportamiento ofrece un enfoque muy interesante para solventar los problemas de separación de los productos del IL en procesos catalíticos, así como para la recuperación y reutilización del sistema (bio)catalizador/IL [71].

El término SLIL engloba aquellos ILs hidrofóbicos compuestos por cationes de larga longitud de cadena alquílica y que poseen temperaturas de fusión superiores a temperatura ambiente. De esta forma, se pueden obtener fases líquidas o sólidas mediante la regulación de la temperatura [49,71]. Algunos ejemplos de SLIL y sus temperaturas de fusión se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Puntos de fusión (P.F.) de algunos líquidos iónicos con comportamiento tipo esponja [1,14,72].

SLIL	Abreviatura	P.F. (°C)
1-Metil-3-octadecilimidazolio bis((trifluorometil)sulfonyl)imida	[C <sub>18</sub> mim][NTf <sub>2</sub> ]	53
1-Hexadecil-3-metilimidazolio bis((trifluorometil)sulfonyl)imida	[C <sub>16</sub> mim][NTf <sub>2</sub> ]	46
1-Tetradecil-3-metilimidazolio bis((trifluorometil)sulfonyl)imida	[C <sub>14</sub> mim][NTf <sub>2</sub> ]	33
1-Hexadecil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato	[C <sub>16</sub> mim][PF <sub>6</sub> ]	74
1-Tetradecil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato	[C <sub>14</sub> mim][PF <sub>6</sub> ]	67
1-Dodecil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato	[C <sub>12</sub> mim][PF <sub>6</sub> ]	58
1-Metil-3-octadecilimidazolio tetrafluoroborato	[C <sub>18</sub> mim][BF <sub>4</sub> ]	60
1-Hexadecil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato	[C <sub>16</sub> mim][BF <sub>4</sub> ]	49
1-Tetradecil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato	[C <sub>14</sub> mim][BF <sub>4</sub> ]	36
1-Dodecil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato	[C <sub>12</sub> mim][BF <sub>4</sub> ]	30
Octadeciltrimetilamonio bis((trifluorometil)sulfonyl)imida	[C <sub>18</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	74
Hexadeciltrimetilamonio bis((trifluorometil)sulfonyl)imida	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	64
Tetradeciltrimetilamonio bis((trifluorometil)sulfonyl)imida	[C <sub>14</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	52

Estos ILs muestran una excelente capacidad para disolver compuestos hidrofóbicos (p. ej. oleato de metilo, geraniol, citronelol, alcohol de cinamilo, etc.) dando como resultado un sistema monofásico, compuesto por el SLIL/sustratos-productos, que es líquido cuando se calienta por encima de su punto de fusión (**Figura 6A**). Sin embargo, cuando este sistema monofásico se enfría por debajo de 25 °C solidifica, permaneciendo los sustratos y los productos retenidos en la red iónica sólida del SLIL (**Figura 6B**). Lo que hace interesante a los SLILs ocurre cuando la mezcla sólida se centrifuga a temperaturas inferiores a temperatura ambiente, ya que el SLIL presenta un comportamiento similar al de una esponja, compactándose para liberar los compuestos líquidos que quedan en la fase superior y permaneciendo el SLIL sólido precipitado en la inferior (**Figura 6C**) [49].



**Figura 6.** Comportamiento tipo esponja de una mezcla de acetato de geranilo/[C<sub>18</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] (50/50 m/m) a: **A)** 60 °C; **B)** 25 °C; **C)** Después de cuatro ciclos de centrifugación a temperatura ambiente, 21, 10 y 4 °C, respectivamente [1].

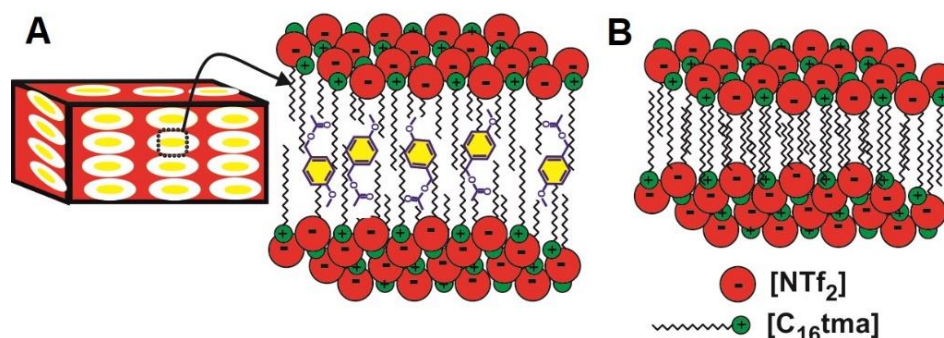
Por lo tanto, la eficacia de esta clase de ILs viene dada por la capacidad de desarrollar protocolos sencillos y limpios para la extracción de los productos, sin necesidad de emplear COVs. Esta excelente propiedad que presentan los SLILs, fue demostrada por primera vez en 2012 por Lozano et al. [14] en la separación de ésteres de aromas. Para ello, analizaron la eficiencia y selectividad del proceso en la separación de una mezcla que contenía [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>]/acetato de geranilo (50/50 m/m) tras cuatro pasos de centrifugación consecutivos a 25, 21, 10 y 4 °C. Comprobaron (mediante análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de <sup>19</sup>F) que el acetato de geranilo liberado a la fase superior estaba totalmente libre de IL. Sin embargo, no se consiguió la extracción completa del producto sintetizado, ya que parte de él quedaba "empapando" la red iónica, de manera similar a una esponja que queda húmeda tras ser escurrida. También demostraron que la combinación de las propiedades tipo esponja que presenta el [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] con el empleo de filtros centrífuga en la separación de una mezcla de [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>]/acetato de isoamilo (50:50 m/m) incrementaba el rendimiento de extracción del producto hasta un 93%. No obstante, la selectividad del proceso empeoró, observándose un 3.1% (m/m) de SLIL en el producto [1,14].

La separación de moléculas hidrofóbicas disueltas en SLILs mediante el acoplamiento de los procesos de enfriamiento y centrifugación se puede explicar entendiendo la organización estructural sólido/líquido de los mismos, así como sus interacciones con los solutos [22,73]. La organización estructural de los ILs basados en cationes imidazolio en estado sólido y líquido fue descrita por J. Dupont [74], quien estableció que estos ILs forman una red de cationes y aniones que interaccionan mediante enlaces de hidrógeno. En las estructuras supramoleculares, las interacciones de apilamiento  $\pi/\pi$  también se



mantienen mediante interacciones típicas entre anillos heterocíclicos, permitiendo así la incorporación de otras moléculas a la red del IL, que inducen un cambio en su organización estructural, causando la formación de regiones polares y apolares adecuadas para albergar compuestos moleculares (ver **Capítulo I**) [75]. En este sentido, Hayes et al. [73], mediante el empleo de la difracción de neutrones, también describieron la organización de la estructura de los ILs para formar una nanoestructura bicontinua, que contiene dominios polares y apolares, donde el alargamiento de la cadena alquílica del catión afecta de positivamente a dicha estructura, mientras que los cambios en la especie aniónica presentan poco efecto.

En la **Figura 7A** se muestra cómo los compuestos hidrofóbicos pueden retenerse en el IL, de tal forma que, mediante un descenso de la temperatura, se provoca una compactación del IL y una disminución del volumen libre de la red iónica en estado sólido (**Figura 7B**), que mediante centrifugación da lugar a la liberación de los productos.



**Figura 7.** Esquema hipotético de la organización estructural de un SLIL mostrando **A)** la interacción entre las cadenas alquílicas hidrofóbicas con el acetato de anisilo; **B)** la nanoestructura del SLIL compactado tras expulsar los productos por centrifugación [1,76].

Estas observaciones, junto con los resultados obtenidos de otros grupos de investigación, explican el hecho de que las redes iónicas de estas sales se puedan considerar como nano-esponjas que contienen huecos de volumen variable, los cuales permiten alojar o expulsar moléculas hidrofóbicas en función de su grado de compactación, a través de la acción de la fuerza centrífuga [77,78]. Por ello, debido a que este comportamiento se asemeja al escurrido de una esponja, el grupo de investigación de P. Lozano acuñó el término *Sponge-Like Ionic Liquid* para esta clase de sistemas [49].

El conocimiento de esta estructura también explica el bajo rendimiento de extracción de los productos de la red iónica, ya que las mismas interacciones hidrofóbicas que alojan a los sustratos en la red iónica, son también responsables de acomodar y retener a los productos de la reacción. Estas interacciones entre los productos y las largas cadenas alquílicas del catión impiden su total liberación y disminuyen la eficiencia en la recuperación de productos. Este hecho es aún más evidente cuando aumenta la longitud de la cadena alquílica del producto ya que se incrementa el número de interacciones y éste queda más fuertemente retenido. Por ejemplo, los rendimientos de extracción de los ésteres de aromas obtenidos por Lozano et al. [14] fueron del 82%, 60%, 59% y 51%, para el acetato de isoamilo, acetato de nerilo, acetato de citronelol, y acetato de geraniol, respectivamente.

Llegados a este punto, cabe destacar que el proceso de separación de una mezcla homogénea de disolventes moleculares (p. ej. isopropanol/agua) normalmente requiere etapas en las que se aplique calor (p. ej. destilación), que resultan muy costosas energéticamente. En cambio, los SLILs muestran un gran potencial en el desarrollo de procesos de separación de compuestos moleculares más sostenibles, a partir de protocolos sencillos de enfriamiento y centrifugación. Una característica muy importante de estos ILs es que han demostrado ser unos excelentes medios para llevar a cabo procesos de síntesis biocatalítica. Además, se ha demostrado que los SLILs, debido a su naturaleza hidrofóbica, contribuyen a la protección de las enzimas contra la desnaturalización por fenómenos de concentración de ácido y temperatura [22].

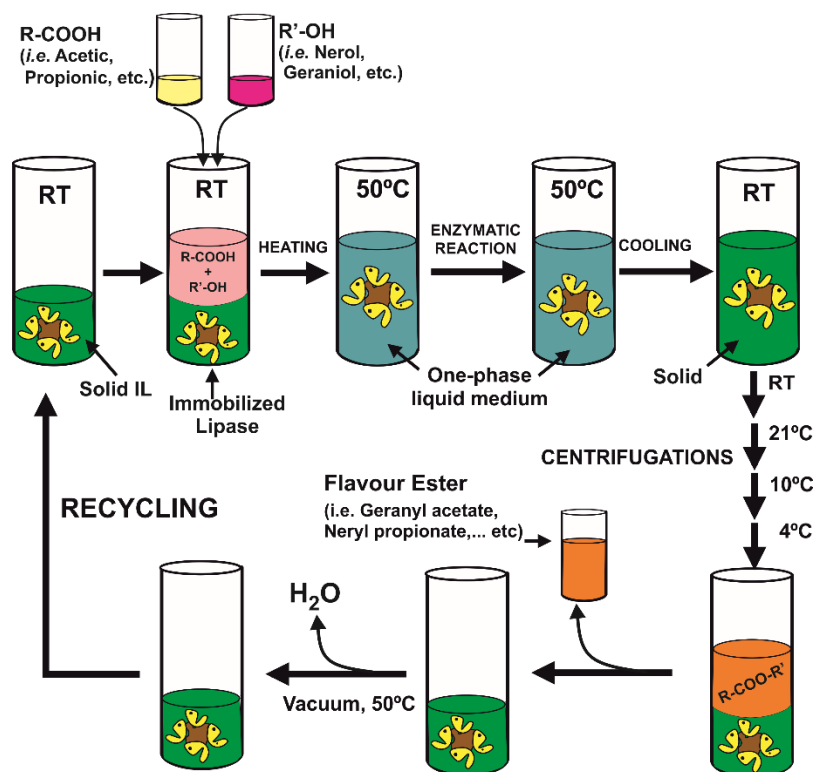
Por lo tanto, los SLILs se muestran como una excelente alternativa en el desarrollo de protocolos sostenibles que integren la síntesis biocatalítica y la separación de compuestos de interés industrial que permitan la recuperación y reutilización del sistema biocatalizador/SLIL. En este capítulo se discute la combinación de las excelentes propiedades de los SLILs, como medio de reacción/separación, con las ventajas que presentan las enzimas como biocatalizadores. Para ello se abordan dos ejemplos: la síntesis biocatalítica de ésteres de aromas y de biodiesel.

#### 4.2.1. Síntesis biocatalítica de ésteres de aromas en SLILs

Los ésteres de aromas naturales tienen un gran valor en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. La extracción de estos compuestos de sus fuentes naturales puede ser una tarea compleja y económicamente inviable. Además, la elevada demanda de estos compuestos hace necesario el desarrollo de metodologías sintéticas sostenibles y aplicables a nivel industrial. Sin embargo, hasta la fecha estos compuestos se sintetizan mayoritariamente mediante procesos químicos no muy sostenibles, ya que suelen emplear COVs. En este sentido, una posible solución es la combinación de los SLILs con un biocatalizador (p. ej. una lipasa) [1].

En 2012, Lozano et al. [14] llevaron a cabo la síntesis de acetato de geranilo, acetato de citronelol, acetato de isoamilo y acetato de nerilo a través de la esterificación del ácido acético con un alcohol (p. ej. alcohol de geranilo, citronelol, etc.) catalizada por un preparado inmovilizado de la lipasa B de *Candida antarctica* en diferentes SLILs (p. ej. [C<sub>14</sub>tma][NTf<sub>2</sub>], [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>], [C<sub>18</sub>tma][NTf<sub>2</sub>]), consiguiendo rendimientos de síntesis superiores al 80% después de 2 horas de reacción. Además, demostraron que la aplicación de microondas durante la síntesis podía incrementar la velocidad de la reacción enzimática [76]. También demostraron la eficacia de los SLILs con estructura [C<sub>x</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] (x=14,16,18), en el desarrollo de un método sostenible y sencillo de separación de algunos ésteres de aromas. El protocolo llevado a cabo se muestra en la **Figura 8** y describe cómo la mezcla monofásica obtenida tras la reacción biocatalítica (p. ej. acetato de geranilo/[C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] 50:50 m/m), tras ser sometida a cuatro ciclos consecutivos de centrifugación (10 min, 14 000 rpm a 25, 21, 10 y 4 °C), se separa en una fase compuesta por el producto de síntesis completamente libre de SLIL, permaneciendo el IL sólido en la fase inferior.

Por último, demostraron la eficacia de recuperación y reutilización del sistema biocatalizador/SLIL en diferentes ciclos operacionales de síntesis/separación (ver **Figura 8**). Estos resultados abrieron las puertas a la aplicación de esta tecnología termosensible al desarrollo de procesos que integren la síntesis y separación sostenible de una gran variedad de productos a nivel industrial.



**Figura 8.** Esquema del protocolo cíclico para la síntesis biocatalítica y separación de ésteres de aromas en SLILs, reutilizando el sistema enzima/IL [1,14].

#### 4.2.2. Síntesis biocatalítica de biodiesel en SLILs

La síntesis biocatalítica de biodiesel en SLILs conlleva un gran número de ventajas frente a los métodos de síntesis convencionales. El biodiesel está formado por una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs, del inglés, *Fatty Acid Methyl Esters*) y normalmente se produce mediante la transesterificación de triacilglicéridos presentes en aceites vegetales con metanol, generando glicerol como subproducto de la reacción. Para conseguir la conversión total de las moléculas de triglicéridos en biodiesel se necesitan tres transesterificaciones consecutivas (mediante catálisis química o enzimática) en presencia de un exceso de alcohol que desplace el equilibrio hacia la formación del producto. El primer problema que surge en esta reacción está relacionado con la inmiscibilidad de los sustratos de reacción, es decir, entre el aceite vegetal y el metanol. Esto da lugar a la formación de un sistema bifásico de reacción que, con el tiempo forma otro sistema bifásico compuesto por FAMEs y glicerol [1,49].

Actualmente el biodiesel se sintetiza a nivel industrial mediante catálisis química con bastante éxito. Sin embargo, es común el empleo de catalizadores homogéneos alcalinos (p. ej. KOH), que dan lugar a reacciones secundarias indeseadas (p. ej. formación de

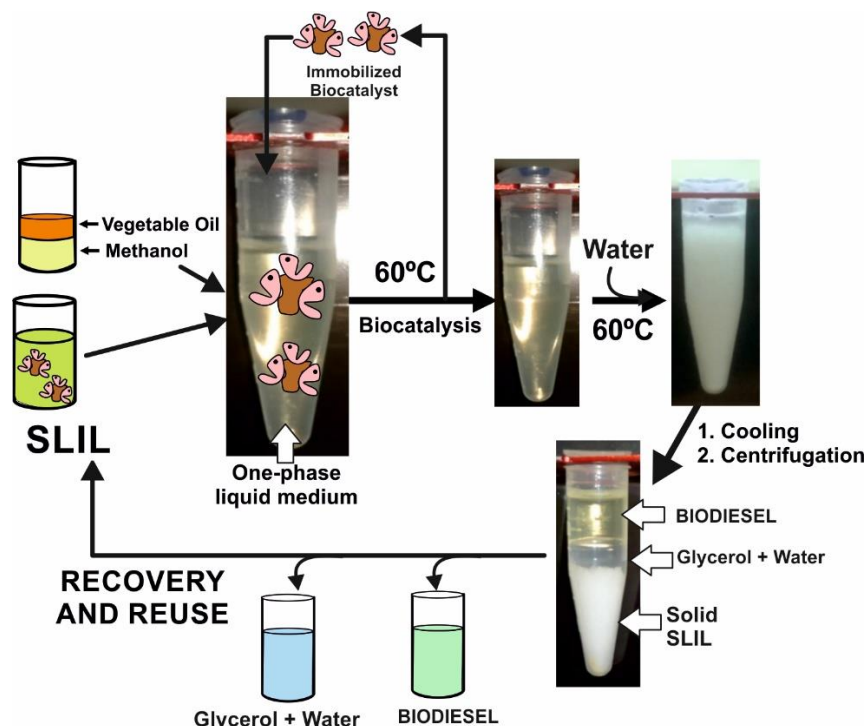
jabones, etc.). Además, existen otros inconvenientes como la recuperación del glicerol o la eliminación de sales inorgánicas, que afectan a los rendimientos de producción y que derivan en un incremento del gasto energético y de agua, poniendo en duda la sostenibilidad del proceso a nivel industrial.

En este sentido, aunque la biocatálisis puede mejorar el rendimiento y selectividad de las transformaciones químicas, esta herramienta tiene difícil aplicación en la síntesis de biodiesel, debido a la desactivación del biocatalizador. Esta desactivación tiene lugar como consecuencia del contacto directo de las enzimas con el metanol presente en el sistema de reacción bifásica, que da lugar a la sustitución de las moléculas de agua de la capa de hidratación esencial de la enzima [79]. Como consecuencia, existe un gran interés en el desarrollo de procesos de síntesis biocatalítica de biodiesel en sistemas que aseguren la completa estabilidad y reutilización del biocatalizador.

A este respecto, los ILs han demostrado su idoneidad para desarrollar procesos más sostenibles de síntesis de biodiesel. En concreto, los SLILs (p. ej.  $[\text{C}_{16}\text{mim}][\text{NTf}_2]$ ,  $[\text{C}_{18}\text{mim}][\text{NTf}_2]$ ) han demostrado una gran capacidad para formar sistemas monofásicos, disolviendo ambos sustratos (aceite y metanol), a diferencia de los ILs empleados comúnmente en biocatálisis (p. ej.  $[\text{Bmim}][\text{NTf}_2]$ ), que dan lugar a sistemas bifásicos. Así, los SLILs, al formar un sistema monofásico, proporcionan un microambiente de características excelentes para llevar a cabo la síntesis biocatalítica de biodiesel, alcanzando rendimientos de síntesis de hasta el 92% en 8 horas de reacción [80]. En este sentido, se ha descrito la idoneidad de los ILs compuestos por la combinación de un catión amonio o imidazolio, de longitud de cadena alquílica superior a 12 carbonos, y el anión  $[\text{NTf}_2]^-$  en la formación de sistemas monofásicos capaces de disolver aceites vegetales y metanol simultáneamente [72].

Así, Lozano et al. [81], desarrollaron una metodología de síntesis biocatalítica y separación de biodiesel empleando la tecnología de los SLILs. Habida cuenta de que, en la reacción de síntesis de biodiesel también se genera glicerol como subproducto, la metodología de separación propuesta incluye la adición de agua, como disolvente verde de extracción para la recuperación del glicerol generado. La **Figura 9** esquematiza el protocolo que integra las etapas de síntesis y de extracción de biodiesel. Se muestra cómo la adición de agua a 60 °C al sistema de reacción monofásico resultante del proceso biocatalítico, da lugar a una emulsión que, tras un proceso iterativo de

enfriamiento/centrifugación se separa en tres fases. Una fase superior compuesta por el biodiesel, una fase acuosa intermedia que contiene el glicerol generado como subproducto y una fase inferior constituida por el SLIL precipitado, pudiendo ser reutilizado en procesos de síntesis biocatalítica/separación posteriores [76,82,83].



**Figura 9.** Protocolo que integra la síntesis biocatalítica sostenible de biodiesel en SLILs y su separación, recuperando y reutilizando el sistema biocatalizador/SLIL [1,50,81,83].

Lozano et al. [81], también demostraron que el sistema formado por el biocatalizador/SLIL podía recuperarse y reutilizarse sin ninguna pérdida de actividad, destacando así la idoneidad de esta metodología para producir biodiesel, que podría ser fácilmente aplicable a nivel industrial. Además, las dos etapas integradas de síntesis y separación no requieren de un gasto energético elevado.

## 5. BIOCATALÍISIS Y DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS

Como se menciona en el **Capítulo I** de esta memoria, los DESs son disolventes formados por la combinación de una especie donadora de enlaces de hidrógeno (HBD) (p. ej. metal, alcohol, ácido carboxílico, amida, etc.) y una especie aceptora de enlaces de hidrógeno (HBA) (p. ej. una sal). La mezcla resultante presenta la peculiaridad de poseer

una temperatura de fusión inferior a la de cada una de las especies por separado, como consecuencia de la deslocalización de las cargas de las especies que lo componen. La estructura y composición de los DESs determinan sus propiedades fisicoquímicas, por lo que, al igual que los ILs, se consideran disolventes de “diseño”, ya que con la selección apropiada de las especies aceptora (HBA) y donadora (HBD) de enlaces de hidrógeno se pueden obtener DESs con las propiedades más adecuadas para una aplicación concreta. Además, las excelentes propiedades de los DESs (p. ej. baja toxicidad, no-inflamables, baja presión de vapor, elevada biodegradabilidad, etc.) posibilitan el empleo de estos disolventes neotéricos en una multitud de aplicaciones bioquímicas. En concreto, el empleo de DESs en biotransformaciones constituye un área de investigación emergente que está recibiendo un gran interés por parte de la comunidad científica. Por ello, es importante destacar cómo afectan estos disolventes a la actividad biológica del biocatalizador.

### 5.1. Enzimas en disolventes eutécticos profundos

Se ha observado que los DESs son capaces de modificar la estructura secundaria de las enzimas. Por ejemplo, los DESs compuestos por cloruro de colina (ChCl) han mostrado que el incremento de la razón molar de este HBD se relaciona con un aumento en el número de hélices  $\alpha$  y una disminución en el número de láminas  $\beta$  en la enzima peroxidasa de rábano (HRP, del inglés, *horseradish peroxidase*), traducándose en una mayor actividad y estabilidad [51]. Sin embargo, otros estudios han descrito que el ChCl tiene un efecto disruptivo sobre las hélices  $\alpha$  provocando la pérdida de actividad enzimática [52]. Por su parte, el glicerol, que actúa como especie aceptora de enlaces de hidrógeno (HBA), también es capaz de incrementar la actividad del biocatalizador mediante la modificación de su estructura secundaria (disminución de láminas  $\beta$  e incremento de hélices  $\alpha$ ). Estos resultados demuestran que el balance entre las especies aceptora (HBA) y donadora (HBD) de enlaces de hidrógeno puede modificar de forma positiva o negativa la actividad y estabilidad de las enzimas [52].

Otro aspecto a destacar de los DESs, es su efecto sobre la estructura tridimensional de las enzimas en sistemas acuosos. Se ha demostrado mediante el empleo de técnicas espectroscópicas (espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular [53]), que la concentración de un determinado DES en una disolución acuosa influye en el proceso de plegamiento y desplegamiento de la enzima. Así, Esquembre et al. [53], observaron que

las bandas en el espectro de emisión de fluorescencia de los residuos de triptófano de una lisozima expuestos a un medio acuoso (máximo de emisión de 335 nm) manifiestan un desplazamiento a 332 y 329 nm cuando la enzima se encuentra en DESs compuestos por cloruro de colina y urea (ChCl:U) y cloruro de colina y glicina (ChCl:Gly), respectivamente. Es importante señalar que una concentración baja de agua puede provocar un despliegue reversible, mientras que una concentración muy elevada de la misma puede causar un despliegue irreversible a elevadas temperaturas, provocando así la pérdida de actividad enzimática [52,53].

Hasta la fecha, se han obtenido resultados muy prometedores respecto a la estabilidad y actividad biocatalítica de una gran variedad de enzimas en DESs [51-53]. Por lo tanto, estos medios se muestran como una alternativa muy potente a los disolventes orgánicos para desarrollar procesos biocatalíticos de síntesis de compuestos de interés industrial más sostenibles. Sin embargo, para el escalado de estos procesos a nivel industrial se precisa de una caracterización más profunda de las propiedades fisicoquímicas de estos disolventes, ya que pueden limitar notablemente su empleo como medio de reacción en síntesis enzimática (p. ej. la viscosidad produce cambios en el fenómeno de transferencia de masa, dispersión o solubilidad). En este sentido, es necesario obtener más resultados acerca de la toxicidad de los DESs, así como profundizar en la relación existente entre la estructura y la función de las enzimas y los DESs [51,54,55].

### **5.2. Síntesis biocatalítica en disolventes eutécticos profundos**

Desde que el grupo de investigación de Abbot describiera por primera vez los DESs en 2003 [87], el interés por este nuevo tipo de disolventes ha incrementado considerablemente, sobre todo desde que, en 2008, Kazlauskas et al. [53] demostraran la idoneidad de estos solventes como medios de reacción en síntesis biocatalítica. Este grupo estudió la transesterificación del valerato de etilo con 1-butanol, obteniendo rendimientos de síntesis superiores a los obtenidos en algunos disolventes orgánicos (p. ej. 5% en tolueno). Además, demostraron que cuando se disminuye la concentración de 1-butanol, la reacción catalizada por una lipasa conduce a un rendimiento de síntesis similar, debido probablemente a las interacciones de hidrógeno formadas entre el alcohol y los sustratos. De esta forma, nació una nueva clase de disolventes para llevar a cabo reacciones biocatalíticas (p. ej. esterificación [88], transesterificación [49], hidrólisis de epóxidos



[89], perhidrólisis [90], dehalogenación, síntesis de péptidos [91], formación de enlaces C-C [92], oxidación [43]).

En particular, la comunidad científica ha manifestado un especial interés en la síntesis de ésteres mediante esterificación directa y transesterificación empleando DESs como disolvente, co-solvente o incluso como sustrato y disolvente al mismo tiempo [84]. En la **Tabla 3** se recoge la obtención de diferentes productos de síntesis catalizadas por lipasas (libres o inmovilizadas) en DESs, así como el papel que juegan dichos DESs en cada síntesis. No obstante, empleo de DESs como medio de reacción presenta varios retos. Por ejemplo, los alcoholes o ácidos presentes en la composición de los DESs pueden competir con los sustratos en las reacciones de esterificación y transesterificación [85]. No obstante, se ha demostrado la eficacia de los DESs compuestos por glicerol en la síntesis de biodiesel catalizada por una lipasa. Además, estos medios de reacción permiten la separación del biodiesel sintetizado de manera sencilla, al retirar las moléculas de glicerol generadas como subproducto e incorporarlas en la fase DES, siendo éste un factor muy relevante para su implementación a escala industrial [86-89]. Cabe destacar que los DESs se ajustan a los términos de economía de procesos, en el sentido de que son medios de reacción económicos y al ser compatibles con las enzimas, permiten sustituir los catalizadores alcalinos, produciendo el biodiesel en condiciones suaves de presión y temperatura [84,85].

**Tabla 3.** Ejemplos de reacciones catalizadas por lipasas en DESs.

Reacción	Sustrato	Producto	enzima	DES	Función DES	Ref.
Reacción aldólisis	Aldehídos y cetonas	Aldoles	Lipasa de páncreas de porcino (PPL)	ChCl:Gly/agua (5% v/v)	Disolvente de reacción	[90]
Reacción de Henry (nitro-aldol)	Aldehídos	Nitroalcoholes	Lipasa de <i>A. niger</i>	ChCl:Gly ChCl:U ChCl:EG	Disolvente y/o co-disolvente con diferentes concentraciones de agua	[91]
Transesterificación (alcohólisis, aminólisis)	Dihidromiricetina	16-acetato de dihidromiricetina	Lipasa <i>A. niger</i> inmovilizada	ChCl:U; ChCl:Gly; ChCl:xilitol	Co-solvente	[92]
	Alcoholes y ésteres de vinilo	ésteres	Lipasa <i>B. Candida antarctica</i> inmovilizada	ChCl:U; ChCl:Gly; ChCl:EG;	Disolvente de reacción	[54,85]
	Glucosa y hexanoato de vinilo;	Glucosa-6-O-hexanoato;	Lipasa <i>B. Candida antarctica</i> inmovilizada	ChCl:U; ChCl:Gly; ChCl:glucosa; ChCl:EG; ChCl:rabinosa; ChCl:manosa; ChCl:xilosa; Betaina: EG	Como disolvente *Los DES que contienen azúcares actúan como disolvente y sustrato	[93,94]
	Ésteres de ácidos grasos	Glicolípidos				
	Aceite de soja	Biodiesel	Lipasa <i>B. Candida antarctica</i> inmovilizada	ChCl:Gly	Disolvente	[86]
	1-butanol y ácido acético anhidro	Acetato de butilo	Lipasa <i>B. Candida antarctica</i> inmovilizada	ChCl:U; ChCl:Gly; ChCl:EG	Disolvente de reacción con adición de agua como co-solvente	[95]
Esterificación/hidrólisis	p- nitrofenol	Palmitato de p-nitrofenol	Lipasa <i>Candida rugosa</i>	ChCl:U; ChCl:Gly; ChCl:EG; ChCl:U:formamida; ChCl:U:tiourea; ChCl:Gly:EG; ChCl:Gly:formamida; ChCl:Gly:tiourea; ChCl:EG:formamida; ChCl:EG:tiourea	Como co-solvente (Buffer conteniendo 10% (v/v) DES)	[96]
	Ácido oleico y decanol	Oleato de decilo	Lipasa <i>B. Candida antarctica</i> inmovilizada	ChCl:U; ChCl:Gly	Como disolvente de reacción con más de un 1% (v/v) de agua	[97]

Otro ejemplo del empleo de DESs como medio de reacción en transformaciones biocatalíticas, es la síntesis de glicolípidos, que tienen aplicación como detergentes y biosurfactantes. Así, en 2013 Siebenhaler et al. [93] desarrollaron un sistema de reacción basado en DESs compuestos por ChCl y varios azúcares, donde el azúcar actúa como disolvente y como sustrato al mismo tiempo (ver **Tabla 3**). De esta forma, al estar el disolvente compuesto por el propio sustrato, se solventa el problema de solubilidad de los azúcares en medios no acuosos y al mismo tiempo se evita la necesidad de emplear disolventes orgánicos para su extracción. Estudios posteriores han demostrado la posibilidad de formar DESs con algunos carbohidratos presentes en la madera o en la miel, permitiendo así el desarrollo de procesos de síntesis enzimática benignos donde todos los materiales de partida son naturales y se obtienen de fuentes renovables [93,96].

También se han estudiado otras reacciones catalizadas por lipasas (p. ej. formación de enlaces C-C, aldólisis o la reacción de Henry) en este tipo de solventes neotéricos [44,90,97]. Por ejemplo, González-Martínez et al. [97], evaluaron la actividad enzimática de diferentes lipasas en la reacción de aldólisis entre el 4-nitrobenzaldehído y acetona en un DES formado por ChCl:Glicerol. en diferentes razones molares (1:1.5 y 1:2 mol:mol), ya que la relación molar entre las especies donadora (HBD) y aceptora (HBA) de enlaces de hidrógeno conlleva un cambio en la formación de enlaces de hidrógeno que puede alterar la estructura estereoquímica de la enzima, afectando así a su actividad enzimática [44]. No obstante, se obtuvieron rendimientos de síntesis similares, observando que la razón molar no era un parámetro determinante para llevar a cabo la reacción de aldólisis seleccionada [97].

Como se ha comentado previamente, el agua es un factor determinante a controlar en los DESs, ya que su concentración puede afectar considerablemente a la eficacia del proceso biocatalítico. Así, un incremento en la cantidad de agua puede actuar disminuyendo la viscosidad de los DESs, pero al mismo tiempo puede ayudar a mejorar la interacción la enzima y el sustrato. En este sentido, Durand et al. [49] evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de agua para la reacción de alcoholólisis del p-cumarato de metilo con octanol catalizada por una lipasa en dos DESs distintos (ChCl:U y ChCl:Gly, 1:2 mol:mol) observando en ambos casos un incremento en el rendimiento de síntesis con el incremento del contenido en agua (de 20 a 100% de rendimiento al pasar de 2 a >8% (v/v) agua y de 30 a 62% de rendimiento al pasar de 2 a 10% (v/v) agua,

respectivamente) [49]. Sin embargo, un incremento excesivo de agua dio lugar a una disminución del rendimiento de reacción. Esto se debe a que se produce la hidrólisis del producto y a que el agua actúa rompiendo las interacciones de hidrógeno que conforman el DES, traduciéndose en una pérdida de las propiedades del mismo [44,93].

De este modo, se ha demostrado la adecuación de los DESs para el diseño de procesos biocatalíticos eficaces en los que este medio actúa como solvente o co-solvente, gracias a la modulación de sus propiedades a través de la selección apropiada de las especies donadora y aceptora de enlaces de hidrógeno. Además, la razón molar de estas especies puede afectar a las propiedades solvatocrómicas y a la formación de enlaces de hidrógeno entre las mezclas, que a su vez juegan un papel muy importante en la estabilización de las enzimas [97]. Así, la combinación de lipasas con DESs como medio de reacción, se presenta como una alternativa a los COVs muy prometedora que abre las puertas al desarrollo de nuevos procesos de síntesis biocatalítica sostenibles de compuestos de interés industrial.

## **6. CONCLUSIONES**

---

La gran variedad de reacciones que catalizan las enzimas en medios no acuosos permite el desarrollo de nuevos procesos biocatalíticos altamente eficientes para obtención de productos de alto valor añadido. La combinación de enzimas con ILs, scCO<sub>2</sub>, ILs/scCO<sub>2</sub> y DESs, permite además el diseño de protocolos sostenibles que integran procesos limpios de síntesis y separación. En particular, el comportamiento tipo esponja de ciertos ILs hidrofóbicos facilita la separación eficiente de compuestos orgánicos hidrofóbicos mediante un sencillo procedimiento basado en etapas de enfriamiento y centrifugación, proporcionando una metodología altamente sostenible que se puede transferir a escala industrial. Además, los SLILs son inmiscibles en agua, sólidos a temperatura ambiente y fáciles de recuperar en el caso de fuga o accidente. No obstante, su eco-toxicidad está siendo estudiada.

Por su parte, los DESs, constituyen una alternativa muy interesante a los COVs como medio de reacción en transformaciones biocatalíticas, sobre todo, aquellos en los que el disolvente está compuesto por los propios sustratos.

Por lo tanto, el diseño de metodologías basadas en la combinación de los biocatalizadores con disolventes neotéricos, abre las puertas al desarrollo e

implementación a gran escala de nuevos procesos de síntesis y separación más limpios y sostenibles.

## 7. REFERENCIAS

---

- [1] P. Lozano, E. Alvarez, J. M. Bernal, S. Nieto, C. Gomez, G. Sanchez-Gomez. Ionic liquids for clean biocatalytic Processes. *Curr. Green Chem.*, **2017**, 4, 116-129.
- [2] P. Lozano, A. Manjon, F. Romojaro, M. Canovas, J. L. Iborra. A cross-flow reactor with immobilized pectolytic enzymes for juice clarification. *Biotechnol. Lett.*, **1987**, 9, 875-880.
- [3] J. M. Filice, C. C. Aragon, C. Mateo, J.M. Palomo. Enzymatic transformations in food chemistry. *Curr. Org. Chem.*, **2017**, 21, 139-148.
- [4] R. A. Sheldon, P. C. Pereira. Biocatalysis engineering: The big picture. *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, 46, 2678-2691.
- [5] P. Molina-Espeja, J. Viña-Gonzalez, B. J. Gomez-Fernandez, J. Martin-Diaz, E. Garcia-Ruiz, M. Alcalde. Beyond the outer limits of nature by directed evolution. *Biotechnol. Adv.*, **2016**, 34, 754-767.
- [6] H. Frauenfelder, G. Chen, J. Berendzen, P. W. Fenimore, H. Jansson, B. H. McMahon, I. R. Stroe, J. Swenson, R. D. Younf. A unified model of protein dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2009**, 106, 5129-5134.
- [7] T. Ke, A. M. Klivanov. On enzymatic activity in organic solvents as a function of enzyme history. *Biotechnol. Bioeng.*, **1998**, 57, 746-750.
- [8] A. M. Klivanov. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, **2001**, 409, 241-246.
- [9] M. Ghaffari-Moghaddam, H. Eslahi, Y. A. Aydin, D. Saloglu. Enzymatic processes in alternative reaction media: A mini review. *J. Biol. Meth.*, **2015**, 2, Art. num. 25.
- [10] M. Naushad, Z. A. ALOthman, A. B. Khan, M. Ali. Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: A review. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2012**, 51, 555-560.
- [11] J. M. Bernal, P. Lozano, E. Garcia-Verdugo, M. I. Burguete, G. Sanchez-Gomez, G. Lopez-Lopez, M. Pucheault, M. Vaultier, S. V. Luis. Supercritical synthesis of biodiesel. *Molecules*, **2012**, 17, 8696-8719.
- [12] N. R. Khan, V. K. Rathod. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. *Process Biochem.*, **2015**, 50, 1793-1806.
- [13] P. Parmar, A. Prasad, N. K. Sharma, K. S. Bisht, R. Sinha, P. Taneja. Potential applications of enzyme-mediated transesterifications in the synthesis of bioactive compounds. *Pure Appl. Chem.*, **1992**, 64, 1135-1139.
- [14] P. Lozano, J. M. Bernal, A. Navarro. A clean enzymatic process for producing flavour esters by direct esterification in switchable ionic liquid/solid phases. *Green Chem.*, **2012**, 14, 3026-3033.

- [15] E. Alvarez, J. Rodriguez, R. Villa, C. Gomez, S. Nieto, A. Donaire, P. Lozano. Clean enzymatic production of flavor esters in spongelike ionic liquids. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2019**, 7, 13307-13314.
- [16] P. Lozano, C. Gomez, S. Nieto, G. Sanchez-Gomez, E. García-Verdugo, S. V. Luis. Highly selective biocatalytic synthesis of monoacylglycerides in sponge-like ionic liquids. *Green Chem.*, **2017**, 19, 390-396.
- [17] R. A. Sheldon, S. van Pelt. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 6223-6235.
- [18] R. C. Rodrigues, C. Ortiz, R. Ferna, C. Ortiz. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 6290-6307.
- [19] P. Dominguez de Maria, Z. Maugeri. Ionic liquids in biotransformations: From proof-of-concept to emerging deep-eutectic-solvents. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2011**, 15, 220-225.
- [20] P. Dominguez de Maria, F. Hollmann. On the (un)greenness of biocatalysis: Some challenging figures and some promising options. *Front. Microbiol.*, **2015**, 12, Art. num. 1257.
- [21] U.S. EPA **2018b**. Obtenido de: 2014 Volatile organic compounds emissions. Acceso 2019 (<https://cfpub.epa.gov/roe/indicator.cfm?i=23#1>).
- [22] P. Lozano, J. M. Bernal, S. Nieto, C. Gomez, E. Garcia-Verdugo, S. V Luis. Active biopolymers in green non-conventional media: A sustainable tool for developing clean chemical processes. *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 17361-17374.
- [23] P. T. Anastas, J. C. Warner. *Green chemistry: Theory and practice*. Oxford University Press: New York, **1998**.
- [24] E. Garcia-Verdugo, B. Altava, M. I. Burguete, P. Lozano, S. V. Luis. Ionic liquids and continuous flow processes: A good marriage to design sustainable processes. *Green Chem.*, **2015**, 17, 2693-2713.
- [25] M. Erbedinger, A. J. Mesiano, A. J. Russell. Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid - an alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. *Biotechnol. Prog.*, **2000**, 16, 1129-1131.
- [26] L. R. Madeira, F. van Rantwijk, K. R. Seddon, R. A. Sheldon. Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. *Org. Lett.*, **2000**, 2, 4189-4191.
- [27] 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.*, **2002**, 30, 262-263.
- [28] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrie, M. Vaultier, J. Iborra. Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnol. Lett.*, **2001**, 23, 1529-1533.
- [29] J. Dupont, T. Itoh, P. Lozano, S. V. Malhotra. *Environmentally friendly syntheses using ionic liquids*. CRC Press: New York, **2014**.
- [30] F. van Rantwijk, R. A. Sheldon. Biocatalysis in ionic liquids. *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 2757-2785.

- [31] M. Sureshkumar, C. K. Lee. Biocatalytic reactions in hydrophobic ionic liquids. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2009**, 60, 1-12.
- [32] H. Zhao. Protein stabilization and enzyme activation in ionic liquids: Specific ion effects. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2016**, 91, 25-50.
- [33] T. De Diego, P. Lozano, S. Gmouh, M. Vaultier. Understanding structure-stability relationships of *Candida antartica* lipase B in ionic liquids. *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 1457-1464.
- [34] B. Dabirmanesh, S. Daneshjou, A. A. Sepahi, B. Ranjbar, R. A. Khavari-Nejad, P. Gill, A. Heydari, K. Khajeh. Effect of ionic liquids on the structure, stability and activity of two related  $\alpha$ -amylases. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2011**, 48, 93-97.
- [35] M. B. Turner, S. K. Spear, J. G. Huddleston, J. D. Holbrey, R. D. Rogers. Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from *Trichoderma reesei*. *Green Chem.*, **2003**, 5, 443-447.
- [36] P. Bonhote, A.-P. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyanasundaram, M. Grätzel. Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts. *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 1168-1178.
- [37] S. Shipovskov, H. Q. N. Gunaratne, K. R. Seddon, G. Stephens. Catalytic activity of laccases in aqueous solutions of ionic liquids. *Green Chem.*, **2008**, 10, 806-810.
- [38] P. Lozano. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. *Green Chem.*, **2010**, 12, 555-569.
- [39] S. Nieto, E. Alvarez, J. M. Bernal, A. Donaire, P. Lozano. *Sponge-like ionic liquids for clean biocatalytic processes*. En *Sustainable catalysis in ionic liquids*. CRC Press: New York, **2019**.
- [40] L. Gubicza, K. Belafi-Bako, E. Feher, T. Frater. Waste-free process for continuous flow enzymatic esterification using a double pervaporation system. *Green Chem.*, **2008**, 10, 1284-1287.
- [41] C. Yao, Y. Zhao, G. Chen. Multiphase processes with ionic liquids in microreactors: Hydrodynamics, mass transfer and applications. *Chem. Eng. Sci.*, **2018**, 189, 340-359.
- [42] P. L. Suryawanshi, S. P. Gumfekar, B. A. Bhanvase, S. H. Sonawane, M. S. Pimplapure. A review on microreactors: Reactor fabrication, design, and cutting-edge applications. *Chem. Eng. Sci.*, **2018**, 189, 431-448.
- [43] M. Zhang, L. Wei, H. Chen, Z. Du, B.P. Binks, H. Yang. Compartmentalized droplets for continuous flow liquid-liquid interface catalysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139, 17387-17396.
- [44] P. A. Zapata, J. Faria, M. P. Ruiz, D. E. Resasco. Condensation/hydrogenation of biomass-derived oxygenates in water/oil emulsions stabilized by nanohybrid catalysts. *Top. Catal.*, **2012**, 55, 38-52.
- [45] J. Faria, M. P. Ruiz, D. E. Resasco. Phase-selective catalysis in emulsions stabilized by Janus silica-nanoparticles. *Adv. Synth. Catal.*, **2010**, 352, 2359-2364.
- [46] L. A. Blanchard, D. Hancu, E. J. Beckman, J. F. Brennecke. Green processing using ionic liquids and CO<sub>2</sub>. *Nature*, **1999**, 399, 28-29.

- [47] L. A. Blanchard, Z. Gu, J. F. Brennecke. High-pressure phase behavior of ionic liquid/CO<sub>2</sub> systems. *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, 2437-2444.
- [48] P. Lozano, E. Garcia-Verdugo, N. Karbass, K. Montague, T. de Diego, M. I. Burguete, S. V. Luis. Supported ionic liquid-like phases (SILLPs) for enzymatic processes: Continuous KR and DKR in SILLP-scCO<sub>2</sub> systems. *Green Chem.*, **2010**, 10, 1803-1810.
- [49] P. Lozano, J. M. Bernal, E. Garcia-Verdugo, G. Sanchez-Gomez, M. Vaultier, M. I. Burguete, S. V. Luis. Sponge-like ionic liquids: A new platform for green biocatalytic chemical processes. *Green Chem.*, **2010**, 17, 3706-3717.
- [50] R. Villa, E. Alvarez, R. Porcar, E. Garcia-Verdugo, S. V. Luis, P. Lozano. Ionic liquids as an enabling tool to integrate reaction and separation processes. *Green Chem.*, **2019**, 21, 6527-6544.
- [51] B. Wu, Q. Wen, H. Xu, Z. Yang. Insights into the impact of deep eutectic solvents on horseradish peroxidase: Activity, stability and structure. *J. Mol. Cat. B-Enzym.*, **2014**, 101, 101-107.
- [52] P. Xu, G.-W. Zheng, M.-H. Zong, N. Li, W.-Y. Lou. Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis. *Bioresour. Bioprocess.*, **2017**, 4, 1-18.
- [53] R. Esquembre, J. M. Sanz, J. G. Wal, F. del Monte, C. R. Mateo, M. L. Ferrer. Thermal unfolding and refolding of lysozyme in deep eutectic solvents and their aqueous dilutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2013**, 15, 11248-11256.
- [54] Z.-L. Huang, B.-P. Wu, Q. Wen, T.-X. Yang, Z. Yang. Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers: DESs can be enzyme activators and stabilizers. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2014**, 89, 1975-1981.
- [55] I. Juneidi, M. Hayyan, M. A. Hashim. Intensification of biotransformations using deep eutectic solvents: Overview and outlook. *Process Biochem.*, **2018**, 66, 33-60.
- [56] P. T. Anastas, W. Leitner, P. Jessop. *Supercritical Solvents*. En *Handbook of Green Chemistry & Technology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: Weinheim, **2010**.
- [57] S. Keskin, D. Kayrak-Talay. A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications. *J. Supercrit. Fluids*, **2007**, 43, 150-180.
- [58] E. J. Beckman. Supercritical and near-critical CO<sub>2</sub> in green chemical synthesis and processing. *J. Supercrit. Fluids*, **2004**, 28, 121-191.
- [59] T. W. Randolph, H. W. Blanch, J. M. Prausnitz, C. R. Wilke. Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. *Biotechnol. Lett.*, **1985**, 7, 325-328.
- [60] S. Kamat, G. Critchley, E. J. Beckman, A. J. Russell. Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids: III. Does carbon dioxide covalently modify enzymes? *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, 46, 610-620.
- [61] P. Lozano, A. Avellaneda, R. Pascual, J. L. Iborra. Stability of immobilized alpha-chymotrypsin in supercritical carbon dioxide. *Biotechnol. Lett.*, **1996**, 18, 1345-1350.
- [62] S. N. V. K. Aki, B. R. Mellein, E. M. Saurer, J. F. Brennecke. High pressure phase behavior of carbon dioxide with imidazolium-based ionic liquids. *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, 20355-20365.



- [63] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrié, J. L. Iborra. Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Chem. Commun.*, **2002**, 7, 692-693.
- [64] 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**, 9, 992-993.
- [65] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrie, M. Vaultier. Lipase catalysis in ionic liquids and supercritical carbon dioxide at 150 °C. *Biotechnol. Prog.*, **2003**, 19, 380-382.
- [66] M. T. Reetz, W. Wiesenhöfer, G. Franciò, W. Leitner. Continuous flow enzymatic kinetic resolution and enantiomer separation using ionic liquid/supercritical carbon dioxide media. *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, 345, 1221-1228.
- [67] P. Lozano, E. Garcia-Verdugo, S. V. Luis, M. Pucheault, M. Vaultier. (Bio)catalytic continuous flow processes in scCO<sub>2</sub> and/or ILs: Towards sustainable (bio)catalytic synthetic platforms. *Curr. Org. Chem.*, **2012**, 8, 810-823.
- [68] P. Lozano, T. De Diego, C. Mira, K. Montague. Long term continuous chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of rac-1-phenylethanol using ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Green Chem.*, **2009**, 4, 538-542.
- [69] P. Lozano, E. Garcia-Verdugo, J. M. Bernal, D.F. Izquierzo, M. I. Burguete, G. Sanchez-Gomez, S. V. Luis. Immobilised lipase on structured supports containing covalently attached ionic liquids for the continuous synthesis of biodiesel in scCO<sub>2</sub>. *ChemSusChem*, **2012**, 5, 790-798.
- [70] Y. P. Mbous, M. Hayyan, A. Hayyan, W. F. Wong, M. A. Hashim, C. Y. Looi. Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering- promises and challenges. *Biotechnol. Adv.*, **2017**, 5, 105-134.
- [71] Y. Qiao, W. Ma, N. Theyssen, C. Chen, Z. Hou. Temperature-responsive ionic liquids: Fundamental behaviors and catalytic applications. *Chem. Rev.*, **2017**, 117, 6881-6928.
- [72] P. Lozano, J. M. Bernal, M. Vaultier. Towards continuous sustainable processes for enzymatic synthesis of biodiesel in hydrophobic ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic system. *Fuel*, **2011**, 90, 3461-3467.
- [73] R. Hayes, G. G. Warr, R. Atkin. Structure and nanostructure in ionic liquids. *Chem. Rev.*, **2015**, 115, 6357-6426.
- [74] J. Dupont. From molten salts to ionic liquids: A 'nano' journey. *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 1223-1231.
- [75] J. Dupont. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2004**, 15, 341-350.
- [76] P. Lozano, J. M. Bernal, A. Lajarin, D. Romera, E. Garcia-Verdugo, G. Sanchez-Gomez, M. Pucheault, M. Vaultier, M. I. Burguete, S. V. Luis. A green approach for producing solvent-free anisyl acetate by enzyme-catalyzed direct esterification in sponge-like ionic liquids under conventional and microwave heating. *Curr. Green Chem.*, **2014**, 1, 145-154.
- [77] T. Iwahashi, T. Nishi, H. Yamane, K. Kanai, K. Seki, D. Kim, Y. Ouchi. Surface structural study on ionic liquids using metastable atom electron spectroscopy. *J. Phys. Chem. C*, **2009**, 113, 19237-19243.

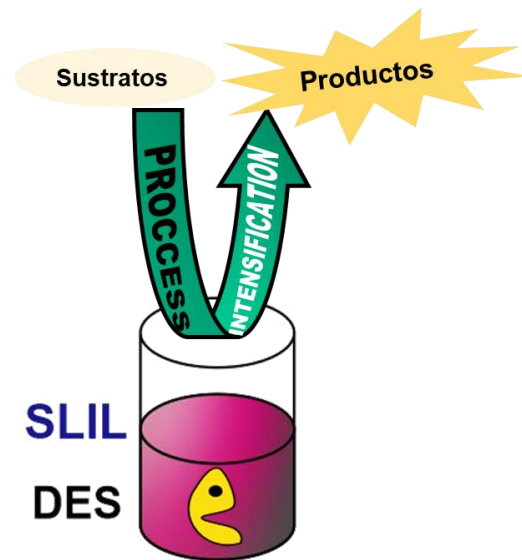
- [78] C. Zhang, S. Zhang, L. Yu, P. Zhang, Z. Zhang, Z. Wu. Tribological behavior of 1-methyl-3 hexadecylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid crystal as a neat lubricant and as an additive of liquid paraffin. *Tribology Lett.*, **2012**, 46, 49-54.
- [79] M. Lotti, J. Pleiss, F. Valero, P. Ferrer. Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. *Biotechnol. J.*, **2015**, 10, 22-30.
- [80] P. Lozano, J. M. Bernal, R. Piamtongkam, D. Fetzer, M. Vaultier. One-phase ionic liquid reaction medium for biocatalytic production of biodiesel. *ChemSusChem*. **2010**, 3, 1359-1363.
- [81] P. Lozano, C. Gomez, A. Nicolas, R. Polo, J. M. Bernal, E. Garcia-Verdugo, S. V. Luis. Clean enzymatic preparation of oxygenated biofuels from vegetable and waste cooking oils by using spongelike ionic liquids technology. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2016**, 4, 6125-6132.
- [82] R. A. Sheldon, J. M. Woodley. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. *Chem. Rev.*, **2018**, 118, 801-838.
- [83] P. Lozano, J. M. Bernal, G. Sanchez-Gomez, G. Lopez-Lopez, M. Vaultier. How to produce biodiesel easily using a green biocatalytic approach in sponge-like ionic liquids. *Energ. Environ. Sci.*, **2013**, 6, 1328-1338.
- [84] M. Patzold, S. Siebenhaller, S. Kara, A. Liese, C. Syldatk, D. Holtmann. Deep eutectic solvents as efficient solvents in biocatalysis. *Trends Biotechnol.*, **2019**, 37, 943-959.
- [85] E. Durand, J. Lecomte, B. Barea, G. Piombo, E. Dubreucq, P. Villeneuve. Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. *Proc. Biochem.*, **2012**, 47, 2081-2089.
- [86] H. Zhao, C. Zhang, T. D. Crittle. Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. *J. Mol. Cat. B-Enzym.*, **2013**, 85, 243-247.
- [87] H. Zhao, A. Baker, S. Holmes. New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel. *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 9, 1908-1916.
- [88] F. Merza, A. Fawzy, I. Alnashef, S. Al-zuhair, H. Taher. Effectiveness of using deep eutectic solvents as an alternative to conventional solvents in enzymatic biodiesel production from waste oils. *Energy Reports*, **2018**, 4, 77-83.
- [89] Y. Zhang, X. Xia, M. Duan, Y. Han, J. Liu, M. Luo, C. Zhao, Y. Zu, Y. Fu. Green deep eutectic solvent assisted enzymatic preparation of biodiesel from yellow horn seed oil with microwave irradiation. *J. Mol. Cat. B-Enzym.*, **2016**, 123, 35-40.
- [90] D. Gonzalez-Martinez, V. Gotor, V. Gotor-Fernandez. Application of deep eutectic solvents in promiscuous lipase-catalysed aldol reactions. *Eur. J. Org. Chem.*, **2016**, 8, 1513-1519.
- [91] X. Tian, S. Zhang, L. Zheng. Enzyme-catalyzed Henry reaction in choline chloride-based deep eutectic solvents. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2016**, 26, 80-88.
- [92] S.-L. Cao, X. Deng, P. Xu, Z.-X. Huang, J. Zhou, X.-H. Li, M.-H. Zong, W.-Y. Lou. Highly efficient enzymatic acylation of dihydromyricetin by the immobilized lipase with deep eutectic solvents as cosolvent. *J. Agric. Food Chem.*, **2017**, 65, 2084-2088.
- [93] S. Siebenhaller, C. Muhle-Goll, B. Luy, F. Kirschhofer, G. Brenner-Weiss, E. Hiller, M.

- Gunther, S. Rupp, S. Zibek, C. Sylđatk. Sustainable enzymatic synthesis of glycolipids in a deep eutectic solvent system. *J. Mol. Cat. B-Enzym.*, **2017**, 133, 281-287.
- [94] M. Pöhnlein, J. Ulrich, F. Kirschhofer, M. Nusser, C. Muhle-Goll, B. Kannengiesser, G. Brenner-Weiss, B. Luy, A. Liese, C. Sylđatk, R. Hausmann. Lipase-catalyzed synthesis of glucose-6-O-hexanoate in deep eutectic solvents. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2015**, 117, 161-166.
- [95] M. Cvjetko Bubalo, K. Jurinjak Tusek, M. Vinkovic, K. Radosevic, V. Gaurina Srcek, I. Radojic Redovnikovic. Cholinium-based deep eutectic solvents and ionic liquids for lipase-catalyzed synthesis of butyl acetate. *J. Mol. Cat. B-Enzym.*, **2015**, 122, 188-198.
- [96] S. H. Kim, S. Park, H. Yu, J. H. Kim, Y.-H. Yang, Y. H. Kim, E. Kan, S. H. Lee. Effect of deep eutectic solvent mixtures on lipase activity and stability. *J. Mol. Cat. B-Enzym.*, **2016**, 128, 65-72.
- [97] B. Kleiner, U. Schorken. Native lipase dissolved in hydrophilic green solvents: A versatile 2-phase reaction system for high yield ester synthesis. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2015**, 117, 167-177.



# CAPÍTULO III:

## Objetivos



*"La imaginación es más importante que el conocimiento. El conocimiento es limitado, la imaginación rodea el mundo"*

*Albert Einstein*



Uno de los principales retos a los que se enfrenta el desarrollo industrial es la sostenibilidad química, que se encuentra perfectamente definida dentro de los Principios de la Química Verde. La aplicación de dichos principios es fundamental para la construcción de una industria química limpia y eficaz, que deje la menor huella medioambiental. En este sentido, la combinación de la elevada actividad y selectividad de las enzimas con las excelentes cualidades de los líquidos iónicos y de los disolventes eutécticos profundos, empleados como medio de reacción, supone una herramienta muy interesante en el desarrollo de procesos que permitan la obtención directa de productos de interés en la industria química, así como la reutilización de todos los elementos del sistema.

La reacción de esterificación directa entre un ácido carboxílico y un alcohol catalizada por enzimas es una de las estrategias más atractivas para la obtención de productos destinados al uso alimentario, cosmético y farmacéutico. Esto se debe a que se pueden emplear moléculas obtenidas de fuentes naturales como sustratos de la reacción y a que el subproducto generado en la reacción es agua.

No obstante, a pesar de que los procesos más sostenibles son aquellos que ocurren en ausencia de solvente, la reacción de esterificación directa requiere normalmente la presencia de un disolvente. Esto se debe a que el empleo de mezclas equimolares de algunos sustratos en ausencia de disolvente puede ejercer un poder desactivante sobre la enzima. Sin embargo, el empleo de medios de reacción hidrofóbicos disminuye la concentración de ácido en el medio, además de estabilizar a las enzimas. Otro factor a tener en cuenta en la reacción de esterificación es el papel del agua que se genera como subproducto, ya que ésta favorece la reacción de hidrólisis del producto, impidiendo alcanzar los rendimientos de síntesis deseados. En este sentido, se pueden aprovechar las excelentes propiedades fisicoquímicas de los ILs hidrofóbicos y los disolventes eutécticos profundos (DESs) como alternativa los disolventes orgánicos convencionales en la síntesis biocatalítica de estos compuestos.

Por lo tanto, esta Tesis Doctoral tiene como objetivo fundamental el desarrollo de nuevos procesos químicos sostenibles de interés industrial basados en la combinación de sistemas biocatalíticos con sistemas basados en líquidos iónicos con comportamiento tipo esponja (SLILs) o DESs. Dicho objetivo conlleva la tarea de establecer protocolos sencillos y eficientes de separación de los productos y que permitan recuperar los SLILs

para su reutilización. Así, la presente memoria se centra en el desarrollo de reacciones biocatalíticas de esterificación entre ácidos grasos y compuestos polihidroxiados (p. ej. pantenol o xilitol) para la obtención de moléculas con propiedades cosmeceúticas, surfactantes y tensioactivos biodegradables, así como para la síntesis de fragancias de interés en la industria cosmética y alimentaria. Esta memoria también abarca el estudio de la transesterificación entre aceites vegetales y metanol para la producción de biocombustibles a partir de biomasa. Para alcanzar el objetivo global se definen los siguientes objetivos parciales, coincidiendo con los diferentes capítulos desarrollados en la memoria:

- 1) Estudio del arte de los diferentes procesos operacionales que integran la síntesis y separación de productos de elevado interés en la industria, centrándose en aquellos que emplean tecnologías limpias y sostenibles, permitiendo la recuperación y reutilización del catalizador y medio de reacción (**Capítulo II**).
- 2) Diseño de un protocolo de síntesis enzimática y separación de monoésteres de pantenilo en líquidos iónicos (**Capítulo IV**).
- 3) Obtención de una mezcla eutéctica formada por pantenol y un ácido graso de larga longitud de cadena y diseño de un protocolo de síntesis biocatalítica de monoésteres de polioles (p. ej. monoésteres de pantenol, monoésteres de xilitol, etc.) en sistemas libres de disolvente. (**Capítulo IV**).
- 4) Diseño de un protocolo limpio de síntesis biocatalítica de ésteres de aromas en SLILs (**Capítulo V**).
- 5) Diseño de un protocolo de separación de ésteres de aromas combinando las propiedades de los SLILs con el empleo de membranas de filtración (**Capítulo V**).
- 6) Diseño un protocolo que integre la extracción de aceite de microalgas y la síntesis biocatalítica *in situ* de biodiesel en mezclas binarias de ILs (**Capítulo VI**).
- 7) Diseño de un protocolo sencillo de separación de biodiesel y posterior reutilización del sistema biocatalizador/ILs. (**Capítulo VI**).

Para alcanzar estos objetivos, se estudiará la idoneidad de diferentes ILs hidrofóbicos en el diseño de procesos de síntesis biocatalítica de monoésteres de pantenol, ésteres de



fragancias (p. ej. ésteres de cinamilo, ésteres de bencilo, etc.) y biodiesel. Teniendo en cuenta la naturaleza hidrofóbica de los SLILs, éstos resultan ser unos excelentes medios de reacción en sistemas compuestos por sustratos hidrofóbicos. Además, los ILs hidrofóbicos permiten reducir el papel del agua en las reacciones catalizadas por enzimas hidrolíticas, desplazando el equilibrio termodinámico hacia la reacción de síntesis y disminuyendo las posibles reacciones secundarias. Es por ello que, la combinación entre los ILs hidrofóbicos y las enzimas supone una herramienta muy interesante para ser aplicada a nivel industrial en reacciones de transesterificación, esterificación, resoluciones cinéticas, etc.

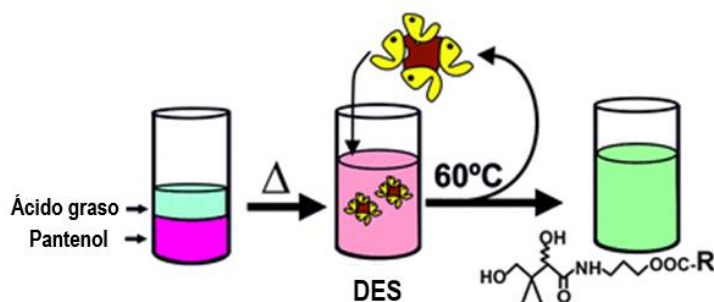
Las reacciones de esterificación y/o transesterificación objeto de esta memoria responden al elevado interés y consumo de los productos de síntesis por parte de la sociedad. El pantenol (pro-vitamina B5), debido a sus propiedades bioactivas (p. ej. mejora el aspecto del cabello y la piel) es un compuesto que presenta un gran interés tanto en la industria cosmética como farmacéutica. Sin embargo, su elevada hidrofiliidad reduce considerablemente su tiempo de permanencia en la piel y el cabello. Por el contrario, los ésteres de pantenilo, al ser menos hidrofílicos son capaces de permanecer en la piel por un tiempo más prolongado, mejorando así sus propiedades como agentes cosmeceúticos. La gran hidrofiliidad del pantenol (totalmente soluble en agua y parcialmente soluble en disolventes orgánicos) limita su solubilización conjunta con compuestos hidrofóbicos. En este sentido, los ILs y los DESs se presentan como una alternativa muy interesante en la síntesis biocatalítica de ésteres de pantenol mediante esterificación o transesterificación. Por ello, se evaluará la síntesis selectiva de monoésteres de pantenilo catalizada por una lipasa en diferentes ILs y la posibilidad de formar DESs entre este poliol y un ácido graso de cadena carbonada larga. Asimismo, se evaluará la idoneidad de estas mezclas como medio de reacción para la síntesis de monoésteres de pantenilo catalizada por una lipasa.

Los SLILs, al combinarse perfectamente con las enzimas, permiten el diseño de procesos sencillos y eficaces que integren la síntesis y separación de los productos hidrofóbicos. Por lo tanto, estos líquidos iónicos juegan un papel fundamental en la obtención de ésteres de aromas para la industria comética y farmacéutica, mediante esterificación de un ácido carboxílico y un alcohol (alifático o aromático).

Por último, existe un gran interés en el desarrollo y optimización de procesos de obtención de biodiesel que sean más limpios y sostenibles a nivel económico y medioambiental, respecto a los procedimientos existentes en la actualidad. En este sentido, es fundamental el empleo de materiales no comestibles como fuente de partida, así como el diseño de protocolos que integren la síntesis y separación del biodiesel. Además, estas metodologías deben emplear disolventes seguros, recuperables y reutilizables, así como evitar la generación de subproductos. No obstante, los principales inconvenientes que presenta la síntesis de biodiesel son el bajo rendimiento de la reacción y la baja estabilidad del biocatalizador, que son consecuencia de la inmiscibilidad entre los propios sustratos de la reacción, del carácter desactivante del metanol (sustrato de la reacción) y la acumulación del glicerol (subproducto de la reacción) sobre la superficie del biocatalizador. Con el objetivo de solventar estos problemas, se estudiará la combinación de ILs de naturaleza hidrofílica con ILs hidrofóbicos para la extracción de aceite de microalgas y síntesis *in situ* de biodiesel, así como se diseñará un protocolo sencillo de separación de los productos, basado en la tecnología de los SLILs.

## CAPÍTULO IV

### “Síntesis biocatalítica de monoésteres de pantenilo en líquidos iónicos y mezclas eutécticas profundas”



*“El maquillaje más hermoso para una mujer es la pasión.*

*Pero los cosméticos son más fáciles de comprar”*

*Yves Saint Laurent*

Los resultados presentados en este capítulo se recogen en las siguientes publicaciones:

P. Lozano, **E. Alvarez**, S. Nieto, R. Villa, J.M. Bernal, A. Donaire. Biocatalytic synthesis of panthenyl monoacyl esters in ionic liquids and deep eutectic solvents. *Green Chem.*, **2019**, 21, 3353-3361.

P. Lozano, **E. Alvarez**, J.M. Bernal, S. Nieto, C. Gomez, A. Donaire. Procedimiento de síntesis enzimática de monoésteres de compuestos polihidroxilados/Method for enzymatic synthesis of monoesters of polyhydroxylated compounds. Patente WO 2019/243656 A1, **2019**.



## 1. RESUMEN

---

En este capítulo se describe la síntesis biocatalítica de seis monoésteres de pantenilo (MEP) mediante la esterificación directa de ácidos grasos de diferente longitud de cadena alquílica (cáprico, láurico, mirístico, palmítico, oleico y linoleico) con pantenol, en ILs compuestos por cationes de larga longitud de cadena alquílica (p. ej.  $[C_{12}mim][BF_4]$ ). Todos los ILs estudiados han demostrado su idoneidad como medio de reacción para la síntesis de MEPs catalizada por Novozyme<sup>®</sup> 435, mostrando en las condiciones óptimas de reacción, conversiones cercanas al 90% y 100% de selectividad, permitiendo la recuperación sencilla y reutilización del sistema biocatalizador/IL.

Alternativamente, se ha descrito la formación de mezclas eutécticas mediante la combinación del pantenol con diferentes ácidos grasos, que además han demostrado ser un excelente medio de reacción para la síntesis de MEPs (p. ej. se han alcanzado conversiones superiores al 83% en la síntesis de monolaurato de pantenilo, con un 98% de selectividad). También se ha demostrado que la actividad enzimática en el DES formado por pantenol y un ácido graso permanece constante después de siete ciclos biocatalíticos consecutivos. Finalmente, esta metodología se ha aplicado con éxito a la síntesis biocatalítica de monoésteres de otros polioles, en concreto, a la síntesis de monoésteres de xilitol y monoésteres de sorbitol. Cabe destacar que la síntesis se ha llevado a cabo en sistemas libres de disolvente, ya que los componentes del DES son los propios sustratos de la reacción. Además, los sustratos empleados para formar estos DESs provienen de fuentes renovables y, por tanto, esta metodología se puede considerar como un proceso limpio y sostenible para llevar a cabo la síntesis de monoésteres de pantenilo a escala industrial.

## 2. INTRODUCCIÓN

---

El pantenol (2,4-dihidroxi-N-(3-hidroxipropil)-3,3-dimetilbutanamida), también conocido como la pro-vitamina B5, es un sólido blanco, muy higroscópico, totalmente soluble en agua y parcialmente soluble en disolventes orgánicos (p. ej. acetona, acetonitrilo, etc.). Este compuesto, debido a sus propiedades bioactivas presenta un gran interés terapéutico tanto en la industria cosmética como farmacéutica. Es por ello que se encuentra formando parte como ingrediente cosmeceútico en cremas solares, champús, acondicionadores capilares y en cremas corporales, mejorando la apariencia de la piel y

del cabello. Otra propiedad muy interesante del pantenol, es su capacidad de promover la proliferación de fibroblastos para la cicatrización de heridas [1].

La elevada solubilidad del pantenol en agua hace que su tiempo de interacción con la piel o el cabello sea muy corto [3,4]. En cambio, los derivados hidrofóbicos de pantenol, especialmente los ésteres de pantenilo, son capaces de adherirse y permanecer en ellos durante más tiempo, incluso después del lavado, mejorando considerablemente su actividad biológica (p. ej. mayor efecto regenerador que el pantenol) [5]. No obstante, a pesar del gran interés que presentan los derivados esterificados del pantenol, hasta la fecha se han descrito muy pocas metodologías para su obtención y, además, estas metodologías emplean procedimientos químicos que comprometen seriamente la sostenibilidad de los procesos. El triacetato de pantenilo es el derivado acetilado del pantenol que más se ha sintetizado en la industria [6-8]. Este compuesto se obtiene mediante reacción exotérmica entre el pantenol con ácido acético anhidro en presencia de catalizadores heterogéneos que contienen grupos metilaminopiridinio y a elevadas temperaturas (p. ej. 110 °C) [8]. También se ha patentado la síntesis del docohexanoato de pantenilo (Patente US20130137768A1) mediante un procedimiento químico convencional que transcurre en tres etapas [6]. La primera de ellas se basa en la protección selectiva de dos grupos hidroxilo del pantenol con trimetilclorosilano; la segunda etapa consiste en la esterificación selectiva del grupo hidroxilo que permanece libre con ácido docosahexaenoico en acetona y empleando una amina como catalizador; y por último, tiene lugar la etapa de desprotección de los dos grupos hidroxilo funcionales previamente bloqueados. Mediante esta metodología se obtiene el derivado del pantenol con un 54% de rendimiento.

Con el objetivo de solventar los problemas que genera la síntesis química convencional (p. ej. empleo de disolventes orgánicos, etapas de protección/desprotección, generación de subproductos, etc.) se ha descrito y patentado (Patente WO2008053051) un procedimiento de síntesis biocatalítica de ésteres de pantenol. En este procedimiento, se emplean lipasas como catalizadores de la reacción, que permiten la esterificación selectiva y controlada de los dos grupos hidroxilo primarios del pantenol para obtener monoésteres de pantenilo anfipáticos. Esta metodología se basa en una estrategia de transesterificación enzimática del pantenol con ésteres alifáticos de cadena corta (p. ej. acetato de isopropilo, acrilato de metilo, etc.) empleando COVs (p. ej. acetonitrilo, acetona, etc.) como medio de reacción [7-9]. Sin embargo, a pesar del elevado

rendimiento en la síntesis de monoésteres (p. ej. 60-96%) y diésteres (4-40%) de pantenol, el empleo de COVs y de derivados de ácidos carboxílicos (p. ej. ésteres vinílicos, ésteres isopropenílicos, ésteres alquílicos, etc.) como donadores de acilo en las reacciones de transesterificación, no solo supone un encarecimiento de los procesos frente al empleo de ácidos grasos libres, sino que también supone una pérdida de sostenibilidad de los mismos. Esto se debe a que dichos derivados se obtienen mediante síntesis química a partir de los ácidos carboxílicos libres, lo que redundaría en un mayor consumo de reactivos y disolventes [10]. Por lo tanto, esta metodología no es compatible con los principios de la Química Verde propuestos por P. Anastas y J.C. Warner [11].

Actualmente, la sostenibilidad juega un papel fundamental en la industria cosmética y farmacéutica, sobre todo cuando su aplicación se refiere a productos de cuidado personal. De esta forma, resulta esencial el desarrollo de protocolos de síntesis donde destaquen: la rapidez y selectividad (p. ej. mediante (bio)catálisis), empleo de disolventes inocuos que sean fáciles de recuperar y reutilizar (o sistemas libres de disolvente, siempre que sea posible) y la separación de los productos de síntesis mediante protocolos sencillos, etc.) [12-14].

En este sentido, los ILs, en particular los SLILs, son unos medios de reacción muy apropiados para el desarrollo de procesos sencillos, económicos y limpios para la síntesis biocatalítica y separación de productos puros [15-17]. Como se ha descrito en el **Capítulo II** de esta memoria, los SLILs permiten diseñar protocolos de separación sencillos y limpios basados en etapas de enfriamiento y centrifugación a temperaturas controladas [16,18-20]. Cabe destacar que el carácter verde de los ILs está sometido a debate debido a su baja biodegradabilidad y propiedades (eco)toxicológicas de los ILs [21-23]. Sin embargo, la baja o nula solubilidad de los SLILs en agua, junto con sus bajos puntos de fusión, permiten su total recuperación en estado sólido tras una reacción, un posible accidente o fuga durante su manejo, minimizando también el riesgo de contaminación.

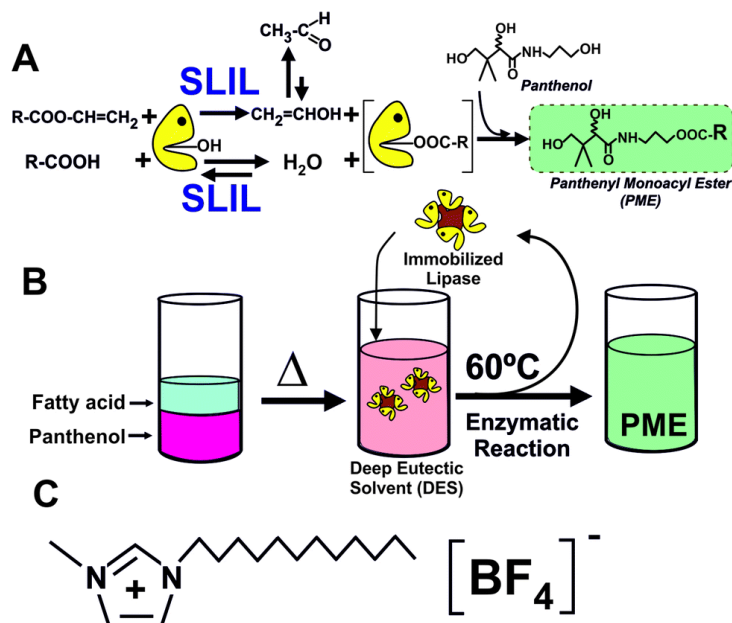
Los disolventes eutécticos profundos (DESs) son otro tipo de disolventes neotéricos que han emergido con gran interés en las últimas décadas, debido a la multitud de aplicaciones que presentan a nivel industrial (p. ej. biocatálisis, síntesis de polímeros, etc.). Entre estas aplicaciones, destaca su empleo como medio de reacción biocatalítica [24]. Como se ha comentado en los **Capítulos I y II** de esta memoria, los DESs están constituidos por una mezcla de una especie aceptora de enlaces de hidrógenos (HBA) y

una especie donadora de enlaces de hidrógeno (HBD) en las proporciones molares adecuadas. Lo que caracteriza principalmente a estos disolventes es la disminución en el punto de fusión de la mezcla que se forma, con respecto al de sus componentes por separado [25]. En particular, resultan especialmente interesantes aquellos DESs que contienen sales orgánicas como especie HDB (p. ej. ácidos carboxílicos, carbohidratos, aminas o polioles), ya que proceden de fuentes renovables. Además, se ha demostrado su idoneidad como medio de reacción en biocatálisis, empleando condiciones suaves de presión y temperatura [26,27]. En este sentido, esta clase de DESs presenta un gran número de ventajas frente a los ILs convencionales, entre las que destacan: su baja toxicidad, su biodegradabilidad y el bajo coste de los sustratos [25,28,29].

En este capítulo se proponen dos alternativas sostenibles a las metodologías convencionales para la síntesis enzimática de seis monoésteres de pantenilo. La primera metodología emplea SLILs como medio de reacción (**Figura 1A**), mediante esterificación directa de ácidos grasos de larga longitud de cadena carbonada (ácido cáprico, láurico, mirístico, palmítico, oleico y linoleico respectivamente) con pantenol y mediante transesterificación, empleando diferentes ésteres alifáticos como especies donadoras de grupos acilo (p. ej. laurato de metilo, laurato de vinilo, etc.). Para ello, se ha analizado la idoneidad de diferentes SLILs (p. ej. [C<sub>12</sub>mim][BF<sub>4</sub>], [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>], etc.) como medio de reacción.

La segunda metodología propuesta está basada la síntesis selectiva de monoésteres de pantenilo, mediante esterificación directa de ácidos grasos de larga longitud de cadena (p. ej. ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, etc.) con pantenol (**Figura 1B**) en DESs formados por los propios sustratos de la reacción. En este sentido, cabe destacar la capacidad del pantenol para formar mezclas eutécticas con ácidos grasos de larga longitud de cadena carbonada, saturada o insaturada, así como la idoneidad de estas mezclas para llevar a cabo la síntesis enzimática de monoésteres de pantenilo, en un sistema libre de disolvente.





**Figura 1.** A) Esquema de síntesis de monoésteres de pantenilo (MEPs) mediante esterificación directa de ácidos grasos con pantenol, catalizada por una lipasa inmovilizada en SLILs; B) Esquema de la síntesis enzimática de MEPs en DES; C) Estructura del IL  $[C_{12}mim][BF_4]$ , como ejemplo representativo de SLIL empleado en la síntesis enzimática de MEPs [2].

Para lograr la máxima conversión y selectividad en la síntesis de monoésteres de pantenol, en este capítulo se ha evaluado la influencia de los diferentes parámetros que afectan a la reacción biocatalítica. Además, se ha llevado a cabo una comparación entre las dos metodologías desarrolladas, con el objetivo de proponer un procedimiento más sostenible, sencillo y económico para la síntesis de monoésteres de pantenol, que pueda ser fácilmente aplicable a nivel industrial.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Reactivos

El derivado inmovilizado de la lipasa B de *Candida antarctica* (Novozyme<sup>®</sup> 435, EC 3.1.1.3) fue donado por Novozymes S.A. (España). D,L-Pantenol (99% pureza, punto de fusión (p.f.) 69 °C), ácido cáprico (98% pureza, p.f. 31.6 °C), ácido láurico (98% pureza, p.f. 43.2 °C), ácido mirístico (99% pureza, p.f. 54.4 °C), ácido palmítico (99% pureza, p.f. 62.9 °C), ácido oleico (90% pureza, p.f. 13.4 °C), ácido linoleico (90%, p.f. -5.0 °C), caprato de vinilo (99% pureza), laurato de vinilo (99% pureza), caprato de etilo (99% pureza), molecular sieves 13x (MS13X; 10 Å de tamaño de poro, 270 mg de adsorción de H<sub>2</sub>O/g), el reactivo BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida)+TMCS

(trimetilclorosilano), disolventes y otros reactivos fueron suministrados por Sigma-Aldrich-Fluka (España).

Los ILs, tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio ( $[\text{C}_{12}\text{mim}][\text{BF}_4]$ , 99% pureza), bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-decil-3-metilimidazolio ( $[\text{C}_{10}\text{mim}][\text{NTf}_2]$ , 99% pureza), bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-dodecil-3-metilimidazolio ( $[\text{C}_{12}\text{mim}][\text{NTf}_2]$ , 99% pureza), bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-tetradecil-3-metilimidazolio, ( $[\text{C}_{14}\text{mim}][\text{NTf}_2]$  99% pureza, bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-hexadecil-3-metilimidazolio, ( $[\text{C}_{16}\text{mim}][\text{NTf}_2]$ , 99% pureza), bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-octadecil-3-metilimidazolio ( $[\text{C}_{18}\text{mim}][\text{NTf}_2]$ , 99% pureza) fueron suministrados por IoLiTec GmbH (Alemania).

### 3.2. Síntesis enzimática de monoésteres de pantenilo en líquidos iónicos

Se introdujeron 0.5 o 1 mmol del correspondiente donador de acilo (ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico, caprato de vinilo, laurato de vinilo, caprato de etilo o laurato de metilo, respectivamente) en viales de 4 mL de capacidad, con tapón de rosca y septum de silicona-teflón y se mezclaron con la correspondiente cantidad de D,L-pantenol, para obtener una razón molar final 1:2 o 1:3 de donador de acilo:pantenol. A continuación, se añadió la correspondiente cantidad del IL objeto de estudio ( $[\text{C}_{10}\text{mim}][\text{NTf}_2]$ ,  $[\text{C}_{12}\text{mim}][\text{NTf}_2]$ ,  $[\text{C}_{14}\text{mim}][\text{NTf}_2]$ ,  $[\text{C}_{16}\text{mim}][\text{NTf}_2]$ ,  $[\text{C}_{18}\text{mim}][\text{NTf}_2]$  y  $[\text{C}_{12}\text{mim}][\text{BF}_4]$ , respectivamente), de modo que alcanzase una concentración final del 50% (m/m) con respecto a la masa total de la reacción. Las mezclas de reacción resultantes se pre-incubaron a 60 °C durante 1 hora hasta conseguir un sistema monofásico. Posteriormente, se añadieron 240 mg del agente desecante MS13X y la reacción comenzó con la adición del biocatalizador Novozyme® 435 (60 mg por mmol de donador de acilo). Las reacciones se mantuvieron en agitación (250 rpm) durante 4 horas a 60 °C y en condiciones de vacío.

Con el objetivo de obtener los perfiles cinéticos de las reacciones de esterificación y transesterificación, se cogieron alícuotas de 15  $\mu\text{L}$  en intervalos de tiempo regulares y se suspendieron en 485  $\mu\text{L}$  de una disolución de dodecano:THF (95:5 v/v). La mezcla bifásica resultante se agitó fuertemente durante 3 min y se centrifugó a 15 000 rpm durante 15 min a 15 °C para precipitar el IL. Finalmente, se recogieron 300  $\mu\text{L}$  para su análisis por cromatografía de gases (CG).

### 3.3. Extracción de los monoésteres de pantenilo del líquido iónico

Se depositaron 0.3 gramos de la mezcla de reacción monoéster de pantenilo/[C<sub>12</sub>mim][BF<sub>4</sub>] en un vial de 2 mL de capacidad y dicho vial se incubó a 60 °C hasta obtener una fase líquida homogénea. Posteriormente, se añadieron 0.5 mL de agua y 0.5 mL de dodecano y se agitó fuertemente durante 30 min a 60 °C. La mezcla resultante se enfrió a 0 °C en un baño de hielo y se centrifugó a 15 000 rpm durante 15 min a 0 °C, dando como resultado 3 fases diferenciales: una fase sólida en el fondo del vial, que contenía el IL, una fase acuosa intermedia con el pantenol no reaccionado y una fase orgánica superior que contenía el monoéster de pantenilo.

Se analizó la presencia de IL en la fase superior mediante RMN de <sup>19</sup>F. La preparación de las muestras para su análisis por RMN de <sup>19</sup>F se llevó a cabo adicionando 50 µL del extracto a 450 µL de una disolución de acetona-δ<sub>6</sub> conteniendo 40 µL de TFA (estándar interno). El análisis de las muestras se llevó a cabo a 300 MHz por RMN de <sup>19</sup>F en un espectrómetro Bruker AC 200 E. Para la cuantificación del IL residual se empleó como referencia una disolución estándar de [C<sub>12</sub>mim][BF<sub>4</sub>] en la misma disolución de acetona-δ<sub>6</sub> con TFA.

### 3.4. Formación de un DES entre compuestos polihidroxiados y ácidos grasos

Se introdujeron 1, 2 o 4 mmol del ácido graso (ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido oleico o ácido linoleico) en un vial de 10 mL de capacidad y se mezclaron con la correspondiente cantidad de pantenol, xilitol o sorbitol, hasta alcanzar una razón molar ácido graso:polialcohol de 1:1, 1:2 o 1:3. Las mezclas resultantes se mantuvieron a temperatura controlada (80, 85 y 95 °C, respectivamente) durante 60 min a 600 rpm, hasta obtener un sistema monofásico líquido y viscoso. Finalmente, las mezclas se acondicionaron a 60 °C, hasta obtener una mezcla homogénea y líquida.

### 3.5. Síntesis enzimática de monoésteres de compuestos polihidroxiados en DES

Una vez obtenida la mezcla líquida y viscosa del polialcohol con el correspondiente ácido graso a partir del protocolo descrito en la **sección 3.4**, se añadió molecular sieves MS13X (5% m/m) y las reacciones comenzaron con la adición de Novozyme<sup>®</sup> 435 (60 mg por mmol de ácido graso). Las reacciones de síntesis de monoésteres de pantenol se

mantuvieron en agitación (250 rpm) a 60 °C durante 4 horas en condiciones de vacío. Para obtener los perfiles cinéticos, se recogieron alícuotas de 15 µL en intervalos de tiempo regulares y se suspendieron en 985 µL de una disolución de dodecano:THF (1:1 v/v) y fueron analizadas mediante CG.

Las reacciones de síntesis de monoésteres de xilitol y sorbitol se mantuvieron en agitación (250 rpm) a 60 °C durante 12 horas en condiciones de vacío. Transcurridas 12 horas de reacción, las mezclas se filtraron a través de una membrana de 0.45 µm de tamaño de poro para separar la fracción sólida (enzima y MS13X). Finalmente, 15 µL de las fracciones líquidas resultantes se suspendieron en 985 µL de una mezcla de acetonitrilo:metanol:agua (45:35:20 v/v/v) y se analizaron por HPLC-ELSD.

### **3.6. Separación del pantenol no reaccionado del DES**

Para describir el protocolo de separación de monoésteres de pantenilo, se ha tomado como referencia la reacción de síntesis de monolaurato de pantenilo. Para ello, se mezclaron 100 µL del medio de reacción que contenía monolaurato de pantenilo y pantenol no reaccionado con 1 mL de limoneno. La mezcla resultante se agitó vigorosamente durante 60 min a 60 °C y se enfrió en un baño de hielo durante 30 min. A continuación, se centrifugó a 15 000 rpm durante 10 min a 0 °C, generándose dos fases: una fase inferior viscosa compuesta por el pantenol no reaccionado y una fase superior de limoneno que contenía el producto (monolaurato de pantenilo). El monoéster de pantenilo se separó de la fase de limoneno mediante precipitación, tras congelar a -20 °C durante 6 horas y posterior centrifugación (15 000, 5 min a 0 °C). Finalmente, la identidad del producto de reacción se corroboró mediante análisis de RMN de <sup>1</sup>H y RMN de <sup>13</sup>C. Para ello, se cogieron alícuotas de 20 mg del producto precipitado y se disolvieron en 500 µL de acetona- δ<sub>6</sub>.

### **3.7. Análisis mediante cromatografía de gases**

Previo al análisis mediante CG, se recogieron alícuotas de 25 µL de cada medio de reacción y se añadieron a una disolución de 275 µL de dodecano:THF (1:1) y 200 µL de reactivo BSTFA+ TMCS (99:1 v/v). Las mezclas resultantes se incubaron durante 1 hora a 70 °C hasta conseguir la trimetilsilanización de los grupos alcoholes del pantenol y ésteres de pantenilo [30].

Las muestras derivatizadas se analizaron mediante CG, en un cromatógrafo Shimadzu GC-2010 (Shimadzu Europa, Alemania) equipado con un detector FID y un inyector automático. Para el análisis se utilizó una columna capilar TRB-Biodiesel (10 m x 0.28 mm x 0.1  $\mu\text{m}$ , Teknokroma, España) bajo las siguientes condiciones: gas portador (He) a 28.6 kPa (flujo total: 40  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ); temperatura del inyector, 290  $^{\circ}\text{C}$ ; programa de temperatura: 100  $^{\circ}\text{C}$ , 10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , 200  $^{\circ}\text{C}$ , 15  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , 370  $^{\circ}\text{C}$ , relación de separación variable (80:1 a 10:1); temperatura del detector, 370  $^{\circ}\text{C}$ . Los tiempos de retención (min) para los sustratos y productos fueron: decanoato de etilo (estándar interno), 1.1; pantenol, 5.0 y 5.3; ácido cáprico, 1.9; ácido láurico, 2.7; ácido mirístico, 4.3; ácido palmítico, 6.2; ácido oleico, 7.5; ácido linoleico, 7.0; caprato de vinilo, 2.4; laurato de vinilo 3.3; laurato de metilo, 1.9, monocaprato de pantenilo, 11.6; dicaprato de pantenilo, 16.5; monolaurato de pantenilo, 12.6; dilaurato de pantenilo, 18.2; trilaurato de pantenilo, 22.3; monomiristato de pantenilo, 14.0; dimiristato de pantenilo, 20.4, monopalmitato de pantenilo, 15.4; dipalmitato de pantenilo, 22.1; monooleato de pantenilo, 16.2; dioleato de pantenilo, 23.5; trioleato de pantenilo, 28.1; monolinoleato de pantenilo, 16.7; dilinoleato de pantenilo, 20.9.

### 3.8. Identificación de los monoésteres de pantenilo mediante HPLC-MS

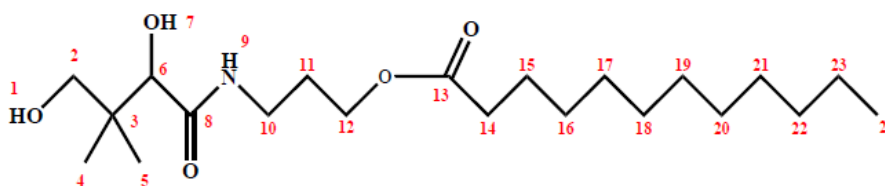
La identificación de los MEPs mediante HPLC-MS se llevó a cabo en un equipo de HPLC Agilent 1200 acoplado a un detector Agilent 6220 ESI-TOF (Agilent, USA). Las fases móviles estaban compuestas por: A, disolución de 20 mM de acetato de amonio en agua; y B, disolución de 20 mM de acetato de amonio en acetonitrilo. El gradiente de disolventes empleado para la elución de los compuestos del medio de reacción fue el siguiente: 0-5 min 40% A, 60% B; 5-8 min: 11% B  $\cdot\text{min}^{-1}$  hasta 10% A, 90% B; 8-30 min 10% A, 90% B. La detección de sustratos y productos se llevó a cabo empleando un detector TOF-MS (temperatura del gas: 350  $^{\circ}\text{C}$ ; flujo del gas: 12  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) a 205 nm.

Para el análisis de las muestras mediante el método descrito, se recogieron alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  de los ácidos grasos libres, pantenol y de los medios de reacción (conteniendo mono-, di- y triéster de pantenilo) y se disolvieron en 980  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo. La señal iónica total de las muestras se obtuvo analizando los correspondientes valores de m/z en el rango desde 100 a 1000 en modo de ión negativo. Asimismo, cada pico de éster de pantenilo, xilitilo o sorbetilo se identificó en comparación con el espectro de masas obtenido en la base de datos (biblioteca NIST). Los tiempos de retención ( $T_r$ , min) e iones

positivos (m/z) para las diferentes especies fueron los siguientes: Pantenol, Tr (min): 4.72; ión positivo (m/z): 204.12; xilitol, Tr (min): 4,26; ión positivo (m/z): 151.06; sorbitol, Tr (min): 4.20 ;ión positivo (m/z): 181.17; ácido cáprico, Tr (min): 8.6; ión positivo (m/z): 171.14; ácido láurico, Tr (min): 11.7; (m/z): 199.1; ácido mirístico, Tr (min): 14.22; (m/z): 227.2; ácido palmítico, Tr (min): 17.82; (m/z): 256.2; ácido oleico, Tr (min): 18.7; (m/z): 281.2; ácido linoleico, Tr (min): 15.4; (m/z) 279.3, monocaprato de pantenilo, Tr (min): 10.6; (m/z): 358.26; dicaprato de pantenilo, Tr (min): 18.9; (m/z): 512.40; monolaurato de pantenilo, Tr (min): 14.02; (m/z): 386.29; dilaurato de pantenilo, Tr (min): 36.6; (m/z): 568.46; monomiristato de pantenilo, Tr (min): 15.0; (m/z): 414.32; monopalmitato de pantenilo, Tr (min): 16.8; (m/z): 442.36; monooleato de pantenilo, Tr (min): 18.6; (m/z): 468.37; monooleato de pantenilo, Tr (min): 16.28; (m/z): 466.3; monolaurato de xilitilo, Tr (min): 5.8; (m/z): 333; dilaurato de xilitilo, Tr (min):17.7; (m/z): 515; monolaurato de sorbitilo, Tr (min): 4.85; (m/z): 363.24; dilaurato de sorbitilo, Tr (min): 13.28; (m/z): 545.41.

### 3.9. Caracterización de los productos mediante análisis RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$

Se identificó el monolaurato de pantenilo (**Figura 2**) de su espectro de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ . Los experimentos de correlación homonuclear  $^1\text{H}$ , así como los experimentos heteronucleares  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance 600 MHz. Para ello, las muestras de monoésteres de pantenol extraídas de la fase limoneno (ver **sección 3.6**) se disolvieron en 500  $\mu\text{L}$  de acetona- $\delta_6$  y la asignación de los protones y carbonos se consiguió mediante experimentos homonucleares TOCSY y NOESY, así como a través de los espectros  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC.  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  (ppm): 0.88 (s, 3H, H4 o H5); 0.89 (t, 3H, H24); 0.96 (s, 3H, H4 o H5); 1.27–1.33 (desde H17 hasta H23, indistinguibles); 1.59 (m, 2H, H16); 1.69 (m, 2H, H11); 2.05 (m, 2H, H15); 2.31 (t, 2H, H14); 3.38 (m, 2H, H10); 3.43 (d, 2H, H2); 3.96 (d, 1H, H6); 4.11 (t, 2H, H12); 4.18 (t, 1H, H1); 4.83 (d, 1H, H7); 7.64 (d, H1, H9).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  (ppm): 13.7 (C24); 20.1 (C5); 20.8 (C4); 25.5 (C16); 29.6–32.3 (desde C17 hasta C23, indistinguibles); 30.0 (C15); 33.1 (C11); 34.1 (C14); 36.0 (C10); 61.9 (C12); 70.0 (C2); 75.4 (C6).



**Figura 2.** Numeración empleada para asignar los protones y carbonos del monolaurato de pantenilo [2].

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Síntesis enzimática de monoésteres de pantenilo en líquidos iónicos

Se evaluó la idoneidad de la síntesis de diferentes monoésteres de pantenilo (MEPs) catalizada por el derivado inmovilizado de la lipasa B de *Candida antarctica* (Novozyme<sup>®</sup> 435) empleando seis SLILs diferentes como medio de reacción a 60 °C: [C<sub>12</sub>mim][BF<sub>4</sub>], [C<sub>10</sub>mim][NTf<sub>2</sub>], [C<sub>12</sub>mim][NTf<sub>2</sub>], [C<sub>14</sub>mim][NTf<sub>2</sub>], [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>] y [C<sub>18</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]. Además, como método de síntesis se estudió la esterificación directa de ácidos grasos (ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico y ácido palmítico) y la transesterificación de ésteres de ácidos grasos (caprato de etilo, caprato de vinilo, laurato de metilo y laurato de vinilo) con pantenol.

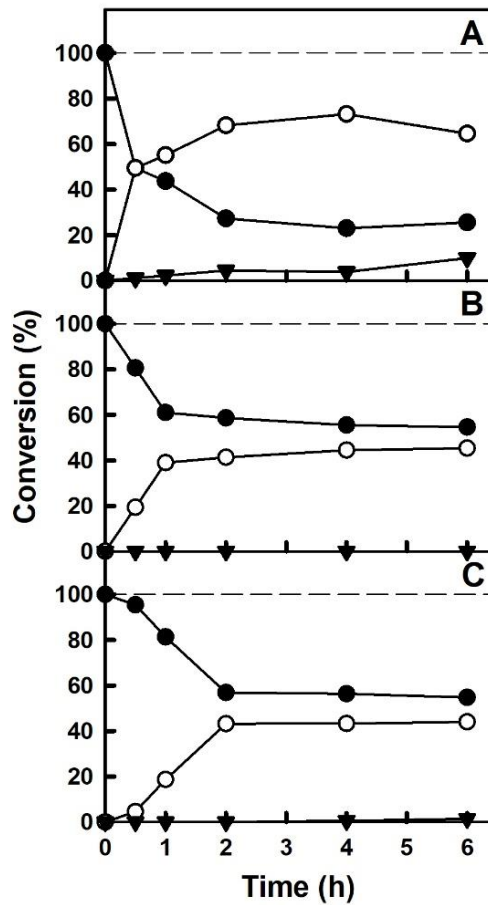
En la **Figura 1A** se muestra el mecanismo de reacción de las lipasas, que ocurre a través de un intermedio enzima-acilo unido covalentemente. Este intermedio se desacila a través del ataque de un nucleófilo (p. ej. agua, pantenol). Cuando se emplea un derivado de un ácido carboxílico como donador de acilo, por ejemplo, un éster de vinilo, el alcohol vinílico que se libera en la etapa de acilación de la enzima tautomeriza a acetaldehído, que no puede actuar como sustrato para la enzima. Esta vía sintética puede considerarse como un proceso cinéticamente controlado, donde resultan esenciales el intermedio enzima-acilo, la ausencia de agua y una concentración elevada de alcohol [31]. Por el contrario, cuando el donador de acilo es un ácido carboxílico, la reacción enzimática de acilación consiste en un equilibrio (control termodinámico), siendo necesario eliminar el agua que se genera como subproducto de esta etapa (p. ej. mediante la adición de un agente desecante) para desplazar el equilibrio de reacción hacia la formación del producto [20]. Independientemente del mecanismo de reacción seleccionado, el empleo de concentraciones de donador de acilo superiores a la concentración de pantenol da lugar a la di- y tri-esterificación de la misma molécula de pantenol. Por ello, con el objetivo de

obtener la síntesis selectiva de monoésteres de pantenol se seleccionó una razón molar 1:2 de donador de acilo:pantenol.

En la **Figura 3** se muestra el perfil cinético obtenido para la síntesis enzimática de monolaurato de pantenilo cuando se emplea laurato de vinilo (**Figura 3A**), laurato de metilo (**Figura 3B**) y ácido láurico (**Figura 3C**) como donadores de acilo, en una razón molar 1:2 (donador de acilo:pantenol) y empleando  $[\text{C}_{12}\text{mim}][\text{BF}_4]$  como medio de reacción.

En la **Figura 3A** se observa que el laurato de vinilo fue el donador de acilo que mostró mayor velocidad de síntesis de monolaurato de pantenilo durante la primera hora de reacción ( $18.4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ), obteniendo la máxima conversión (70%) tras 4 horas de reacción. Con el avance del tiempo se observa la formación de dilaurato de pantenilo (hasta 13.4% tras 6 horas de reacción) con la consiguiente disminución en la selectividad de la síntesis de monolaurato de pantenilo. Cuando se empleó laurato de metilo como donador de acilo (**Figura 3B**), la velocidad de reacción fue inferior ( $6.7 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ), produciendo un 45.5% de monolaurato de pantenilo tras 6 horas de reacción y sin la formación de dilaurato de pantenilo. Asimismo, la velocidad de reacción en la esterificación directa de ácido láurico con pantenol (**Figura 3C**) fue inferior ( $3.7 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ) a la mostrada mediante el mecanismo de transesterificación, consiguiéndose un 45.5% de monolaurato de pantenilo tras 6 horas de reacción y un 3.1% de dilaurato de pantenilo (ver **Tabla 1**, entradas 1-3).





**Figura 3.** Perfiles cinéticos obtenidos para la síntesis catalizada por Novozyme<sup>®</sup> 435, de monolaurato de pantenilo (○), dilaurato de pantenilo (▼), usando como donador de acilo (●): **A)** laurato de vinilo; **B)** laurato de metilo; **C)** ácido láurico, respectivamente, en [C<sub>12</sub>mim][BF<sub>4</sub>], a 60 °C. Razón molar donador de acilo:pantenol 1:2 (mol:mol) [2].

En la **Tabla 1** se muestran los rendimientos obtenidos en la síntesis de diferentes monoésteres de pantenilo mediante esterificación y transesterificación, empleando donadores de acilo de diferente longitud de cadena alquílica. Se puede observar que para la síntesis de monocaprato de pantenilo se obtuvieron resultados de conversión y selectividad similares a los obtenidos en la síntesis de monolaurato de pantenilo cuando se emplearon caprato de vinilo, caprato de metilo y ácido cáprico como donadores de acilo (**Tabla 1**, entradas 4-6). Sin embargo, al aumentar la longitud de la cadena alquílica del donador de acilo, como fue el caso de los ácidos mirístico y palmítico (**Tabla 1**, entradas 7 y 8, respectivamente), tanto la conversión (>53.4%) como el contenido en monoéster de pantenilo (>20.6 m/m) fueron superiores a los obtenidos con ácido láurico y ácido cáprico.

**Tabla 1.** Síntesis biocatalítica de monoésteres de pantenilo (MEP) y diésteres de pantenilo (DEP) empleando diferentes donadores de acilo tras 6 h. de reacción en ILs a 60 °C (ver **sección 3.2**).

Entrada	IL	Donador de acilo <sup>a</sup>	Conversión <sup>b</sup> (%)	MEP (%)	DEP (%)	MEP <sup>c</sup> (% m/m)
1	[C <sub>12</sub> mim][BF <sub>4</sub> ] <sup>d</sup>	LV	74.5	86.6	13.4	21.1
2	[C <sub>12</sub> mim][BF <sub>4</sub> ] <sup>d</sup>	LM	45.5	100	0	15.9
3	[C <sub>12</sub> mim][BF <sub>4</sub> ] <sup>d</sup>	AL	45.4	96.9	3.1	15.5
4	[C <sub>12</sub> mim][BF <sub>4</sub> ] <sup>d</sup>	CV	83.1	91.5	8.5	24.4
5	[C <sub>12</sub> mim][BF <sub>4</sub> ] <sup>d</sup>	CE	45.8	100	0	14.7
6	[C <sub>12</sub> mim][BF <sub>4</sub> ] <sup>d</sup>	AC	45.4	97.3	2.7	16.5
7	[C <sub>12</sub> mim][BF <sub>4</sub> ] <sup>d</sup>	AM	54.3	100	0	19.8
8	[C <sub>12</sub> mim][BF <sub>4</sub> ] <sup>d</sup>	AP	54.1	100	0	20.6
9	[C <sub>10</sub> mim][NTf <sub>2</sub> ] <sup>e</sup>	AL	90.0	82.8	17.2	16.0
10	[C <sub>12</sub> mim][NTf <sub>2</sub> ] <sup>e</sup>	AL	92.9	88.3	11.7	17.6
11	[C <sub>14</sub> mim][NTf <sub>2</sub> ] <sup>e</sup>	AL	91.1	87.2	12.8	16.9
12	[C <sub>16</sub> mim][NTf <sub>2</sub> ] <sup>e</sup>	AL	90.1	89.5	10.5	17.2
13	[C <sub>18</sub> mim][NTf <sub>2</sub> ] <sup>e</sup>	AL	87.0	87.3	12.7	16.3

<sup>a</sup>Donador de acilo: ácido láurico (AL); ácido cáprico (AC); decanoato de etilo (DE); caprato de etilo (CE); caprato de vinilo (CV); laurato de metilo (LM); laurato de vinilo (LV). <sup>b</sup>Conversión (rendimiento) con respecto al donador de acilo inicial. <sup>c</sup>Contenido de MEP en el medio de reacción. <sup>d</sup>Razón molar donador de acilo:pantenol, 1:3 (mol:mol); <sup>e</sup>Razón molar donador de acilo:pantenol, 1:2 (mol:mol).

Los resultados obtenidos están estrechamente relacionados tanto con fenómenos de transferencia de masa, a través de la difusión alrededor del centro activo de la enzima, como con la velocidad de reacción mostrada por el biocatalizador en cada caso. De tal forma que, una velocidad de biocatálisis elevada, combinada con una baja velocidad de difusión del monoéster de pantenilo (MEP) desde el microambiente de la enzima hasta el medio de reacción, da como resultado la formación de diéster de pantenilo (DEP). Esto explicaría el alto contenido en diésteres de pantenilo (DEPs) cuando se emplean ésteres de vinilo como donadores de acilo. Además, el carácter hidrofóbico de los ILs compuestos por cationes de longitud de cadena alquílica C<sub>12</sub> también puede contribuir a la baja velocidad de transferencia de masa del pantenol, ya que éste es un compuesto muy hidrofílico. Como resultado, pocas moléculas de pantenol difunden al microambiente del centro activo de la enzima y se produce una segunda acilación sobre la molécula de producto (MEP) recién sintetizado, que está más accesible.

Estos resultados se han corroborado cuando se emplean como medio de reacción ILs compuestos por el anión hidrofóbico [NTf<sub>2</sub>], para la síntesis enzimática de monolaurato de pantenilo, mediante esterificación directa de ácido láurico con pantenol (**Tabla 1**, entradas 9-13). En este caso, la presencia de un agente desecante (MS13X), así como el trabajo en condiciones de vacío, fueron fundamentales para eliminar el agua generada

como subproducto y así, desplazar el equilibrio de reacción hacia la formación de los productos de esterificación [20].

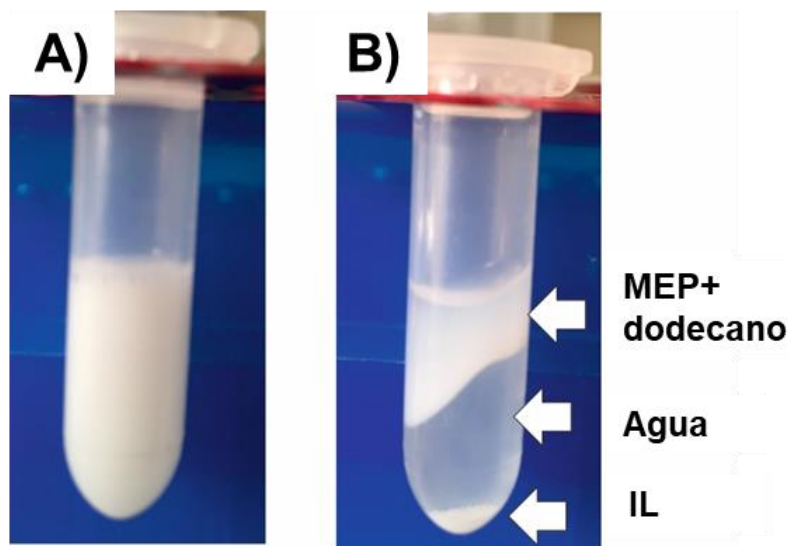
Por otro lado, la **Tabla 1** muestra cómo un incremento en la razón molar ácido láurico:pantenol dio lugar a un incremento en la conversión de producto para todos los ILs-[NTf<sub>2</sub>] estudiados. Por ejemplo, se obtuvo un 92.9% de monolaurato de pantenilo cuando se empleó [C<sub>12</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]. Sin embargo, también se observó un mayor contenido de dilaurato de pantenilo. Por lo tanto, la velocidad de reacción enzimática, la hidrofobicidad del IL y la razón molar de los sustratos son parámetros fundamentales para controlar la selectividad en la síntesis enzimática de MEPs.

Cabe destacar que todos estos experimentos se llevaron a cabo conteniendo un 50% (m/m) de IL con respecto a la masa total del medio de reacción, dando lugar a un contenido de MEP comprendido entre el 14 y 24% (m/m) en dicho medio. Esta circunstancia determina la necesidad de diseñar un proceso posterior para la separación del producto. Además, en el desarrollo de cualquier proceso sostenible, se debe demostrar la eficacia y selectividad de la transformación química y que todos los elementos involucrados se puedan recuperar y reutilizar de forma sencilla. En este sentido, se ha descrito cómo los ILs con cationes de larga longitud de cadena alquílica y aniones [NTf<sub>2</sub>]<sup>-</sup> o [BF<sub>4</sub>]<sup>-</sup> proporcionan una excelente estabilidad operacional para Novozyme<sup>®</sup> 435 en la síntesis de terpenos [16], biodiesel [18], biocombustibles oxigenados [19] e incluso en la síntesis de monoglicéridos [20]. También se ha descrito que la estructura supramolecular de estos ILs en fase líquida podría actuar como un “molde”, estabilizando la estructura tridimensional de la enzima en nanoambientes no acuosos [15,32,33] (ver **Capítulo II**).

#### 4.2. Separación de monoésteres de pantenilo del líquido iónico

En este capítulo se ha propuesto la separación de monolaurato de pantenilo (**Tabla 1**, entrada 3) de un medio de reacción que contiene un [C<sub>12</sub>mim][BF<sub>4</sub>] (50% m/m), (ver **sección 3.3**) [15,17]. El protocolo de separación llevado a cabo consistió en la adición de una mezcla de dodecano:agua (50:50 v/v) a 60 °C al medio de reacción (ver **Figura 4A**). Posteriormente, se enfrió a 0 °C y se centrifugó a 15 000 rpm durante 15 min a 0 °C. En la **Figura 4B** se observa el sistema trifásico obtenido tras el proceso de separación. Mediante este protocolo se obtuvo un precipitado sólido compuesto principalmente por

el IL, una fase intermedia acuosa que contenía el pantenilo no reaccionado y una fase superior orgánica compuesta por dodecano, que contenía el monoéster de pantenilo.



**Figura 4.** Mezcla de reacción monolaurato de pantenilo/[C<sub>12</sub>mim][BF<sub>4</sub>] (Tabla 1, entrada 3): **A)** tras la adición de 1 mL de disolución agua:dodecano (50:50 v/v); y **B)** tras enfriar y centrifugar a 0 °C (15 000 rpm, 15 min) [2].

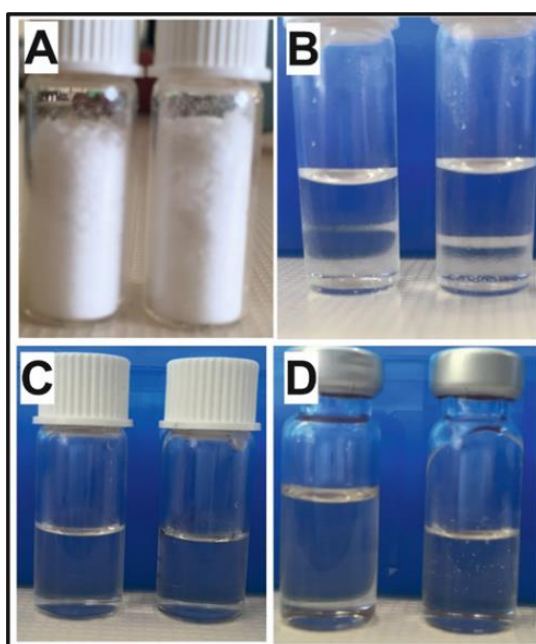
Para garantizar que el producto de reacción estaba totalmente libre de IL, se analizó el espectro de RMN de <sup>19</sup>F de una alícuota de la fase superior (que contenía el monoéster de pantenilo). De este análisis se observó que la separación del IL fue casi total, ya que se obtuvo un 3.5% (m/m) de IL residual en la fase del producto de síntesis.

Por lo tanto, mediante este protocolo, se puede recuperar fácilmente el IL para su reutilización. Además, el IL residual en la fase dodecano que contiene al monoéster de pantenilo se puede reducir incrementando las etapas de lavado con agua. Este resultado es similar al publicado para la separación de monolaurina en el mismo IL [20], permitiendo así la recuperación del IL para su posterior reutilización.

#### 4.3. Síntesis enzimática de monoésteres de pantenilo en DESs

En primer lugar, se evaluó la idoneidad del pantenilo para formar mezclas eutécticas con seis ácidos grasos: ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido pamítico, ácido oleico y ácido linoleico, siguiendo el procedimiento descrito en la parte experimental (ver sección 3.5).

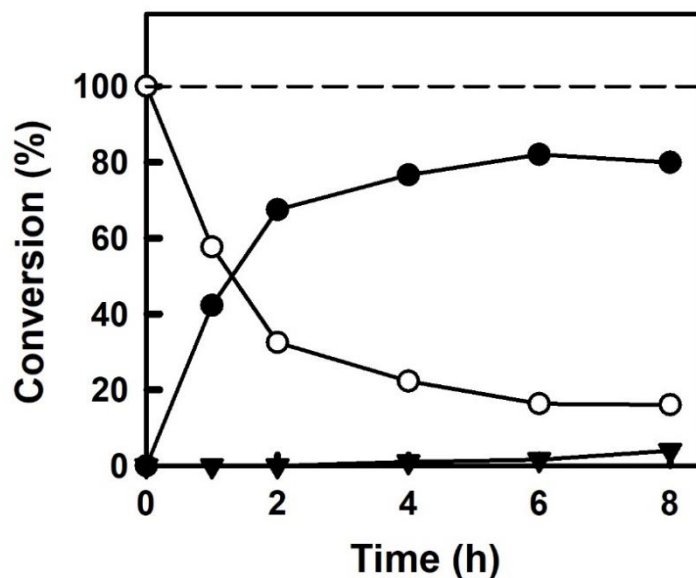
En la **Figura 5A** se muestra el procedimiento de formación de las mezclas eutécticas compuestas por pantenol y dos ácidos grasos (ácido láurico y ácido palmítico, respectivamente) en una razón molar 2:1. En la **Figura 5B** se observa que, tras calentar a 80 °C la mezcla inicial formada por los sustratos sólidos, se formó un sistema líquido bifásico, que tras agitar vigorosamente durante 1 hora a dicha temperatura, dio lugar a un sistema líquido monofásico (**Figura 5C**), que se mantuvo inalterado al enfriar a temperatura ambiente [10].



**Figura 5.** Comportamiento de fases en la formación de un DES compuesto por una mezcla (1:2 mol:mol) de ácido láurico:pantenol (izquierda) y ácido palmítico:pantenol (derecha) a: **A**) temperatura ambiente; **B**) calentando a 80 °C; **C**) tras agitar a 80 °C durante 1h; **D**) después de la reacción enzimática a 60 °C (ver **sección 3.5**) [2].

Una vez demostrada la idoneidad del pantenol para formar DES con diferentes ácidos grasos, se evaluó la idoneidad de estos DESs como medio de reacción en la síntesis selectiva de monoésteres de pantenilo catalizada por Novozyme<sup>®</sup> 435. En la **Figura 6** se muestra el perfil cinético obtenido para la síntesis de monolaurato de pantenilo en el DES formado por ácido láurico:pantenol (1:2 mol:mol) a 60 °C. Como se puede observar, este DES demostró ser un excelente medio de reacción para la síntesis biocatalítica de monolaurato de pantenilo, donde la velocidad de reacción enzimática ( $18.4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  en la primera hora) fue bastante superior a la obtenida en ILs ( $6.7 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Además, se alcanzó la máxima conversión (83%) tras 6 horas de reacción, decayendo ligeramente

la selectividad del monoéster de pantenilo a tiempos de reacción superiores, debido a la formación de dilaurato de pantenilo (3.9% a 8 horas de reacción).



**Figura 6.** Perfil cinético obtenido en la síntesis de monoéster de pantenilo (●) y dilaurato de pantenilo (▼) mediante esterificación directa de ácido láurico (○) con pantenol catalizada por Novozyme® 435 en un DES-pantenol a 60 °C. Razón molar ácido láurico:pantenol, 1:2 (mol:mol) [2].

Se evaluó el efecto de la razón molar ácido graso:pantenol en la formación del DES (1:1, 1:2 y 1:3 mol:mol) y su aplicación como medio de reacción en la síntesis biocatalítica de diferentes monoésteres de pantenilo. La **Tabla 2** muestra los resultados de conversión y selectividad obtenidos en la síntesis de diferentes ésteres de pantenilo, así como el contenido de los mismos en la mezcla. En dicha tabla se puede observar que cuando se empleó un DES formado por ácido láurico y pantenol en diferentes razones molares (**Tabla 2**, entradas 1-4), el incremento en la concentración de pantenol conducía a una mayor conversión en monoéster de pantenilo (de 59.1 % razón molar ácido láurico:pantenol 1:1 a 83.6% razón molar ácido láurico:pantenol 1:3). Sin embargo, dicho aumento también provocaba una reducción en el contenido final del producto en el medio de reacción (p. ej. 54.4 % para una razón molar ácido láurico:pantenol 1:1 y 38.5% para una razón molar ácido láurico:pantenol 1:3). Por otro lado, el incremento en la longitud de la cadena alquílica del donador de acilo dio como resultado un ligero incremento en la selectividad de la síntesis de MEPs (ver **Tabla 2**, entradas 5-8), aunque la conversión del ácido a su respectivo MEP fue similar en todos los casos. De esta forma, se obtuvo un

93% de monocaprato de pantenilo, incrementándose a 97.7% en la síntesis de monooleato de pantenilo. Además, el valor de selectividad más elevado se obtuvo en la síntesis de monolinoleato de pantenilo (99.7%).

**Tabla 2.** Síntesis biocatalítica de monoésteres de pantenilo (MEP) y diésteres de pantenilo (DEP) empleando diferentes donadores de acilo y en diferente razón molar, tras 6 h de reacción en DESs compuestos por pantenol y ácidos grasos a 60 °C (ver **sección 3.5**).

Entrada	DA <sup>a</sup>	Pantenol:DA	Conversión <sup>b</sup> (%)	MEP (%)	DEP (%)	MEP <sup>c</sup> (% m/m)
1	AL	1:1	59.1	96.5	3.5	54.4
2	AL	3:2	68.9	98.1	1.9	51.1
3	AL	2:1	80.3	95.0	5.0	48.4
4	AL	3:1	83.6	98.1	1.9	38.5
5	AC	2:1	83.0	93.0	7.0	47.1
6	AM	2:1	79.9	95.1	4.8	49.4
7	AP	2:1	73.0	94.2	5.8	45.7
8	AO	2:1	80.9	97.7	1.7	53.6
9	ALn	3:1	77.4	99.6	0.4	40.3

<sup>a</sup>Donador de acilo (DA): ácido láurico (AL); ácido cáprico (AC); ácido mirístico (AM); ácido palmítico (AP); ácido oleico (AO); ácido linoleico (ALn). <sup>b</sup>Conversión (rendimiento) con respecto a la concentración de donador de acilo inicial. <sup>c</sup>Contenido en MEP en el medio de reacción.

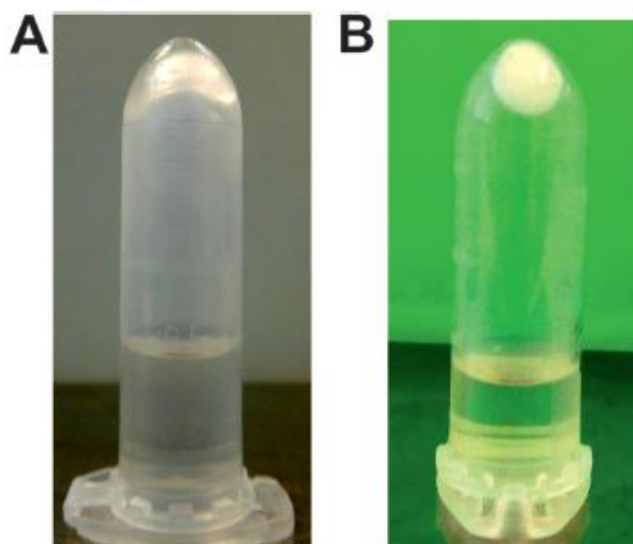
Cabe destacar que, en los ensayos llevados a cabo en estos DESs (razón molar 1:2 ácido:pantenol), el medio de reacción resultante de la reacción de esterificación enzimática contenía cerca de un 50% (m/m) del MEP con respecto al medio total, un valor casi tres veces superior al que se obtenía cuando se emplearon ILs como medio de reacción.

Con el objetivo de extrapolar este protocolo a la esterificación de otros polialcoholes de interés en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria, se evaluó la síntesis de monoésteres de dos compuestos polihidroxilados: xilitol y sorbitol. De acuerdo con la metodología descrita en la **sección 3.5**, para la reacción de esterificación de 1 mmol de ácido láurico con 2 mmol de xilitol o sorbitol, se obtuvieron rendimientos de síntesis del 90 y 60.4 %, respectivamente. Sin embargo, la selectividad de los monoésteres de xilitol y sorbitol (60 y 61%, respectivamente) fue inferior a la obtenida en la síntesis de monoésteres de pantenol (>90%).

#### 4.4. Separación del pantenol no reaccionado del DES

El monoéster de pantenilo (MEP) en el medio de reacción compuesto por los DESs (1:2 mol:mol, ácido graso:pantenol) constituye aproximadamente el 50% (m/m) en todos los casos estudiados. Además, tanto el pantenol como los MEPs son moléculas bioactivas, pudiéndose emplear directamente en la formulación de productos cosméticos. No obstante, se consiguió incrementar el contenido de monoésteres de pantenilo en estos medios de reacción, a través de la precipitación selectiva del pantenol no reaccionado. Para ello, siguiendo el protocolo descrito en la **sección 3.6**, se observó que la adición de limoneno al medio de reacción a 60 °C, seguido de un sencillo paso de enfriamiento/centrifugación a 0 °C dio lugar a la precipitación del pantenol no reaccionado (con aspecto de gel), mientras que el MEP quedó disuelto en la fase superior de limoneno. Tomando como referencia la reacción de síntesis de monolaurato de pantenilo en un DES formado por ácido láurico:pantenol (1:2 mol:mol), (**Tabla 2**, entrada 3), la aplicación del procedimiento descrito permitió precipitar un 89.2% del pantenol que no había reaccionado (**Figura 7A**). Posteriormente, el monolaurato de pantenilo se separó de la fase limoneno mediante un segundo paso de enfriamiento a -20 °C y posterior centrifugación (**Figura 7B**). La identidad del producto sintetizado (monolaurato de pantenilo) se corroboró mediante análisis de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , así como mediante el análisis de HPLC-MS [2,10].





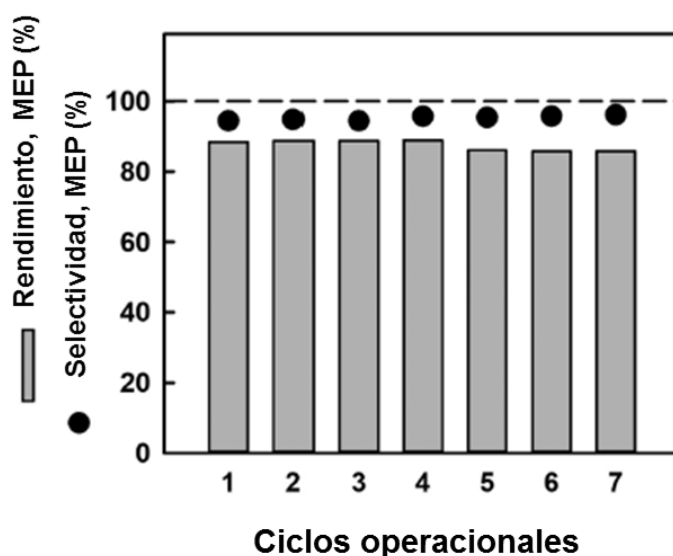
**Figura 7.** **A)** Separación del pantenol no reaccionado en una mezcla de reacción que contiene monolaurato de pantenilo (**Tabla**, entrada 3) disuelto en limoneno, tras incubar a 60 °C, 1 h y posterior enfriamiento y centrifugación a 0 °C (15 000 rpm, 10 min); **B)** Separación de monolaurato de pantenilo (fase superior) de la fase limoneno resultante del proceso descrito en A, tras enfriar a -20 °C durante 6h y centrifugar a 0°C (15000, 5 min) [2].

Los DESs compuestos por los propios sustratos de la reacción muestran una vía muy interesante para llevar a cabo reacciones de biocatálisis sostenibles. Por ejemplo, Hummer et al. [34] describieron la eficacia de los DES formados por mentol y ácidos grasos para llevar a cabo la biosíntesis de ésteres de mentol, obteniendo conversiones superiores al 83% tras 7 días de reacción. También se ha descrito la eficacia del empleo de DESs compuestos por ChCl:azúcares que actúan como medio de reacción y sustratos al mismo tiempo en la síntesis de glicolípidos [35,36]. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con los DESs compuestos por ChCl:azúcares, el DES propuesto en este capítulo, compuesto por pantenol y ácidos grasos consiste en un sistema formado únicamente por los sustratos de la reacción, sin necesidad de adicionar un aditivo (p. ej. ChCl).

#### 4.5. Estabilidad operacional del biocatalizador en DES

Se evaluó la idoneidad de los DESs compuestos por pantenol y ácidos grasos como medio de reacción en la síntesis de monoésteres de pantenilo, mediante la reutilización del biocatalizador en diferentes ciclos operacionales. La **Figura 8** muestra el perfil de estabilidad operacional del biocatalizador Novozyme<sup>®</sup> 435 en un DES compuesto por pantenol y ácido láurico (2:1 mol:mol). Como se puede observar, los resultados de

conversión y selectividad de síntesis de monolaurato de pantenilo se mantuvieron constantes durante siete ciclos operacionales consecutivos.



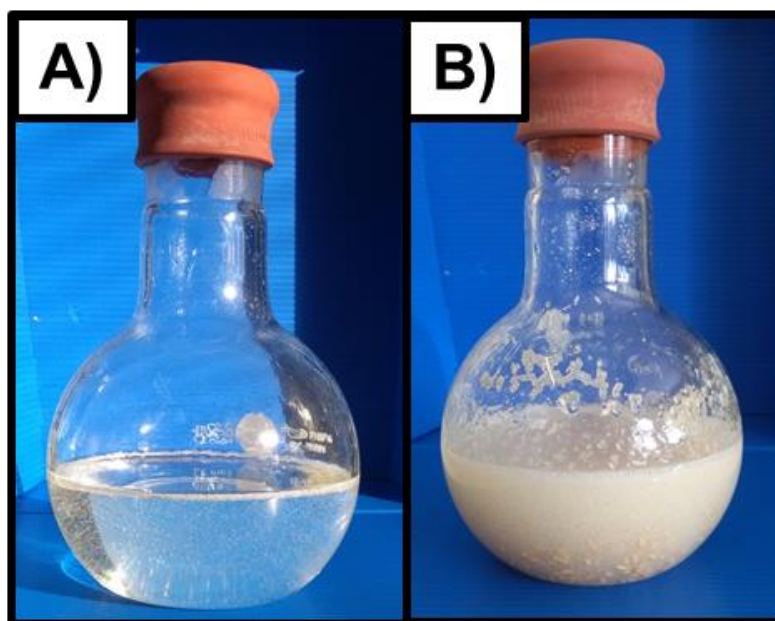
**Figura 8.** Rendimiento de síntesis de laurato de pantenilo (barra gris) y selectividad de monolaurato de pantenilo (círculo negro) durante siete ciclos operacionales consecutivos para la esterificación de ácido láurico con pantenol catalizada por Novozyme® 435, en el DES compuesto por ácido láurico:pantenol, 1:2 (mol:mol) [2].

Estos resultados demuestran la idoneidad de estos DESs para estabilizar la actividad catalítica. De hecho, se ha publicado que los polioles (p. ej. xilitol, sorbitol, pantenol, etc) [37] y los DESs (p. ej. ChCl:Urea) [38] son excelentes medios para la estabilización del biocatalizador, ya que actúan protegiéndolo de la pérdida de actividad, como resultado de la red formada por los puentes de hidrógeno alrededor de las enzimas. Esta red mantiene la capa de solvatación necesaria para mantener la conformación nativa de la enzima. Por lo tanto, la excelente estabilidad operacional mostrada por la enzima a 60 °C en el DES-pantenol diseñado en este trabajo puede atribuirse al mismo fenómeno.

#### 4.6. Síntesis de monoésteres de pantenol en DESs a mayor escala

Con el objetivo de evaluar la aplicación a mayor escala de esta metodología, se llevó a cabo la síntesis de monolaurato de pantenilo mediante la esterificación directa de 17 gramos de ácido láurico con 34 gramos de pantenol. Para ello, la mezcla de los sustratos sólidos se calentó a 75 °C hasta su fusión total, siguiendo el protocolo descrito en la **sección 3.4** y se enfrió a la temperatura de biocatálisis (**Figura 9A**). La reacción

biocatalítica se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en la **sección 3.5 (Figura 9B)**, obteniéndose resultados de conversión (80%) y selectividad (96.99%) similares a los obtenidos a escala de milimoles. Por lo tanto, con este estudio se demuestra la idoneidad de la metodología desarrollada para la síntesis sostenible de monoésteres de pantenol y su posible aplicación a gran escala.



**Figura 9.** **A)** Mezcla eutéctica formada por pantenol y ácido láurico (2:1 mol:mol) a 40 °C. **B)** Medio de reacción tras 6 horas de reacción de esterificación de 17 g de ácido láurico con 34 g de pantenol catalizada por Novozyme® 435 a 60 °C, 250 rpm.

## 5. CONCLUSIONES

El desarrollo de procesos limpios y sostenibles para la síntesis de moléculas bioactivas es reto tanto para la industria cosmética como farmacéutica. Además, los nuevos sistemas implementados deben de integrar reacciones y separaciones sencillas, efectivas y sostenibles al mismo tiempo.

En este capítulo se han descrito dos alternativas sostenibles para la síntesis selectiva de monoésteres de pantenilo, compuestos de gran interés cosmeceútico, mediante la combinación de la eficiencia de la catálisis enzimática con las excelentes propiedades que presenta el empleo de ILs y DESs como medios de reacción en biocatálisis.

En una primera aproximación, se han empleado SLILs como medio de reacción no acuoso. Estos medios de reacción son ampliamente conocidos por su gran capacidad de

preservar la actividad catalítica de las enzimas [15-17,20]. En este estudio, los SLILs han demostrado ser unos excelentes medios para la solubilización de los sustratos de la reacción estudiada (ácidos grasos y pantenol). La combinación de las especies catiónica y aniónica de estos SLILs contribuye al control de los procesos de transferencia de masa del producto desde el centro activo de la enzima al medio de reacción, que favorece la síntesis selectiva de monoésteres de pantenilo (p. ej. aproximadamente 100% en la síntesis de monolaurato de pantenilo en  $[C_{12}mim][BF_4]$ ). Además, su comportamiento tipo esponja permite diseñar protocolos sencillos de separación de los monoésteres de pantenilo, basados en etapas de enfriamiento y centrifugación, así como la recuperación del SLIL para ser reutilizado en síntesis posteriores.

Por otro lado, en este capítulo se ha descrito la capacidad del pantenol para formar mezclas eutécticas con ácidos grasos de larga longitud de cadena alquílica. Además, se ha demostrado la idoneidad de estos DESs en la síntesis selectiva de monoésteres de pantenilo catalizada por una lipasa. Se considera que la reacción transcurre en un sistema libre de disolvente debido a que los propios sustratos actúan como medio de reacción. Los rendimientos (>83%) y las selectividades (93-99%) obtenidos, junto a la ausencia de disolventes, hacen de esta aproximación una alternativa muy útil, económica y sostenible para la síntesis selectiva de monoésteres de pantenilo.

Respecto a la sostenibilidad de los dos procesos descritos en este capítulo, la metodología basada en DESs parece ser más sostenible que la basada en SLILs, ya que solo se emplea una mezcla de sustratos y biocatalizador inmovilizado, sin la necesidad de emplear ningún tipo de disolvente. Además, teniendo en cuenta que tanto el pantenol como los monoésteres de pantenilo son ingredientes presentes en formulaciones cosméticas, la mezcla resultante de la reacción enzimática (p. ej. 51.1% m/m monolaurato de pantenilo y con pantenol no reaccionado, (ver **Tabla 2**, entrada 2) se podría utilizar directamente como ingrediente en preparaciones cosméticas.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este capítulo proporcionan grandes oportunidades sinérgicas que abren el camino al empleo de nuevas plataformas verdes para el desarrollo de procesos químicos sostenibles de interés industrial.

## 6. REFERENCIAS

---

- [1] F. B. Camargo Jr, L. R. Gaspar, M. Campos, Patricia M. B. Maia Campos. Skin moisturizing effects of panthenol-based formulations. *J. Cosmet. Sci.*, **2011**, 62, 361-370.
- [2] P. Lozano, E. Alvarez, S. Nieto, R. Villa, J. M. Bernal, A. Donaire. Biocatalytic synthesis of panthenyl monoacyl esters in ionic liquids and deep eutectic solvents. *Green Chem.*, **2019**, 21, 353-3361.
- [3] J. Pavlackova, P. Egner, T. Sedlacek, P. Mokrejs, J. Sedlarikova, J. Polaskova. In vivo efficacy and properties of semisolid formulations containing panthenol. *J. Cosmet. Derm.*, **2019**, 346-354.
- [4] D. L. Bissett. Common cosmeceuticals. *Clinic. Derm.*, **2009**, 5, 435-445.
- [5] E. Ortega. Cosmetic composition for hair treatment. Patente US20050048015A1, **2005**.
- [6] F. Lantoine-Adam, R. Letienne, E. Dupont-Passelaigue. Panthenyl docosahexaeneoate and its use for treating and preventing cardiovascular diseases. Patente US20130137768A1, **2013**.
- [7] D. Haring, S. Nguyen-Kim, I. Garcia-Castro. Panthenol esters of unsaturated carboxylic acids. Patente WO 2008053051A2, **2008**.
- [8] J. K. Smit, Z. Z. Liu, M. Vedachalam, D. Compton. Process of making D-panthenyl triacetate. Patente US6982346B2, **2006**.
- [9] T. Diego, A. Manjon, J. L. Iborra. Selective synthesis of panthenyl esters by a kinetically controlled enzymatic process. *Biotechnol. Lett.*, **2013**, 31, 175-180.
- [10] P. Lozano, E. Alvarez, J. M. Bernal, S. Nieto, C. Gomez, A. Donaire, Procedimiento de síntesis enzimática de monoésteres de compuestos polihidroxilados//Method for enzymatic synthesis of monoesters of polyhydroxylated compounds. Patente WO 2019/243656 A1, **2019**.
- [11] P. T. Anastas, J. C. Warner. *Green chemistry: Theory and practice*. Oxford University Press: New York, **1998**.
- [12] A. Sahaota. *Sustainability: How the cosmetics industry is greening up*. John Wiley & Sons Ltd.: London, **2014**.
- [13] J. H. Clark, D. J. Macquarrie. *Handbook of green chemistry and technology*. John Wiley & Sons: New York, **2008**.
- [14] M. B. Ansorge-Schumacher, O. Thum. Immobilised lipases in the cosmetics industry. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 6475-6490.
- [15] P. Lozano, J. M. Bernal, S. Nieto, C. Gomez, E. Garcia-Verdugo, S. V Luis. Active biopolymers in green non-conventional media : A sustainable tool for developing clean chemical processes. *Chem. Comm.*, **2015**, 51, 17361-17374.
- [16] P. Lozano, J. M. Bernal, A. Navarro. A clean enzymatic process for producing flavour esters by direct esterification in switchable ionic liquid/solid phases. *Green Chem.*, **2012**, 14, 3026-3033.

- [17] P. Lozano, J. M. Bernal, E. Garcia-Verdugo, G. Sanchez-Gomez, M. Vaultier, M. I. Burguete, S. V. Luis. Sponge-like ionic liquids: A new platform for green biocatalytic chemical processes. *Green Chem.*, **2015**, 17, 3706-3717..
- [18] P. Lozano, J. M. Bernal, G. Sanchez-Gomez, G. Lopez-Lopez, M. Vaultier. How to produce biodiesel easily using a green biocatalytic approach in sponge-like ionic liquids. *Energ. Environ. Sci.*, **2013**, 6, 1328-1338.
- [19] P. Lozano, C. Gomez, A. Nicolas, R. Polo, J. M. Bernal, E. Garcia-Verdugo, S. V. Luis. Clean enzymatic preparation of oxygenated biofuels from vegetable and waste cooking oils by using spongelike ionic liquids technology. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2016**, 4, 6125-6132.
- [20] P. Lozano, C. Gomez, S. Nieto, G. Sanchez-Gomez, E. García-Verdugo, S. V. Luis,. Highly selective biocatalytic synthesis of monoacylglycerides in sponge-like ionic liquids. *Green Chem.*, **2017**, 19, 390-396.
- [21] T. P. Thuy Pham, C. Cho, Y. S. Yun. Environmental fate and toxicity of ionic liquids : A review. *Water Res.*, **2010**, 352-372.
- [22] A. Mohammad, Inamuddin. *Green solvents II: Properties and applications of ionic liquids*. Springer Science & Business Media: Dordrecht, **2012**.
- [23] K. S. Egorova, V. P. Ananikov. Toxicity of ionic liquids: Eco (cyto) activity as complicated, but unavoidable parameter for task-specific optimization. *ChemSusChem*, **2014**, 7, 336-360.
- [24] A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, V. Tambyrajah. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun.*, **2003**, 70-71.
- [25] Y. P. Mbous, M. Hayyan, A. Hayyan, W. F. Wong, M. A. Hashim, C. Y. Looi. Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering- Promises and challenges. *Biotechnol. Adv.*, **2017**, 35, 105-134.
- [26] J. T. Gorke, F. Sreenc, R. J. Kazlauskas. Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chem. Commun.*, **2008**, 1235-1237.
- [27] S. Siebenhaller, T. Hajek, C. Muhle-Goll, M. Himmelsbach, B. Luy, F. Kirschhofer, G. Brenner-Wei, T. Hahn, S. Zibek, C. Syldatk. Beechwood carbohydrates for enzymatic synthesis of sustainable glycolipids. *Bioresour. Bioprocess.*, **2017**, 4, 1-9.
- [28] N. Guajardo, C. R. Müller, R. Schrebler, C. Carlesi, P. Dominguez, D. Maria. Deep eutectic solvents for organocatalysis, biotransformations, and multistep organocatalyst/enzyme combinations. *ChemCatChem*, **2016**, 8, 1020-1027.
- [29] P. Xu, G.-W. Zheng, M.-H. Zong, N. Li, W- Y. Lou. Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis. *Bioresour. Bioprocess.*, **2017**, 4, Art. num. 34.
- [30] K. Blau, J. Halket. *Handbook of derivatives for chromatography*. John Wiley & Sons: New York, **1993**.
- [31] P. Lozano, R. Piamtongkam, K. Kohns, T. De Diego, M. Vaultier, J. L. Iborra. Ionic liquids improve citronellyl ester synthesis catalyzed by immobilized *C. antarctica* lipase B in solvent-free media. *Green Chem.*, **2007**, 9, 780-784.
- [32] J. Dupont. From molten salts to ionic liquids: A ‘nano’ journey. *Acc. Chem. Res.* **2011**,

44, 1223-1231.

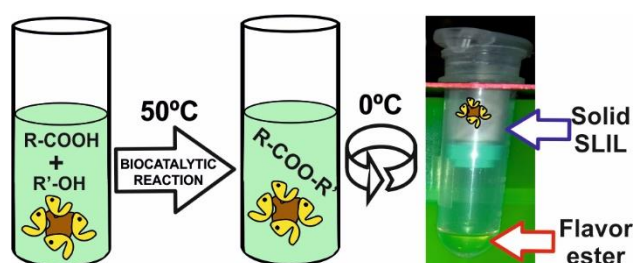
- [33] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrie, M. Vaultier, J. L. Iborra. Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnol. Lett.*, **2001**, 23, 1529-1533.
- [34] M. Hummer, S. Kara, A. Liese, I. Huth, J. Schrader, D. Holtmann. Synthesis of (-)-menthol fatty acid esters in and from (-)-menthol and fatty acids - novel concept for lipase catalyzed esterification based on eutectic solvents. *Mol. Catal.*, **2018**, 458, 67-72.
- [35] S. Siebenhaller, C. Muhle-Goll, B. Luy, F. Kirschhofer, G. Brenner-Wei, E. Hiller, M. Günther, S. Rupp, S. Zibek, C. Syldatk. Sustainable enzymatic synthesis of glycolipids in a deep eutectic solvent system. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2017**, 133, S281-S287.
- [36] M. Pöhnlein, J. Ulrich, F. Kirschhofer, M. Nusser, C. Muhle-Goll, B. Kannengiesser, G. Brenner-Wei, B. Luy, A. Liese, C. Syldatk, R. Hausmann. Lipase-catalyzed synthesis of glucose-6-O-hexanoate in deep eutectic solvents. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2015**, 117, 161-166.
- [37] P. Lozano, D. Combes, J. L. Iborra. Effect of polyols on alpha-chymotrypsin thermostability: A mechanistic analysis of the enzyme stabilization. *J. Biotechnol.*, **1994**, 35, 9-18.
- [38] H. Monhemi, M. R. Housaindokht, A. A. Moosavi-Movahedi, M. R. Bozorgmehr. How a protein can remain stable in a solvent with high content of urea: insights from molecular dynamics simulation of *Candida antarctica* lipase B in urea:choline chloride deep eutectic solvent. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2014**, 16, 14882-14893.





## CAPÍTULO V

# “Diseño de un protocolo limpio para la síntesis/separación de ésteres de aromas en líquidos iónicos tipo esponja”



*“La mayoría de la gente dice que el intelecto es lo que hace a un gran científico. Están equivocados: es el carácter”*

*Albert Einstein*

Los resultados presentados en este capítulo se recogen en la siguiente publicación:

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



## 1. RESUMEN

---

El trabajo presentado en este capítulo tiene como objetivo el diseño de un protocolo de síntesis biocatalítica de diferentes ésteres de aromas y su separación simultánea empleando la tecnología de los SLILs. Para ello, se ha llevado a cabo la síntesis de dieciséis ésteres de aromas mediante la esterificación de ácidos alifáticos (p. ej. ácido acético y ácido propiónico) con un alcohol (alcohol de cinamilo, alcohol de bencilo, alcohol de anisilo, *rac*-1-feniletanol o *rac*-sulcatol) en ILs hidrofóbicos con cationes amonio o imidazolio, de larga longitud de cadena carbonada (p. ej. [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>]). Estos ILs, resultan ser excelentes medios de reacción, formando sistemas monofásicos para la síntesis biocatalítica de ésteres de aromas. Así, mediante la selección apropiada de las condiciones de reacción (p. ej. naturaleza de la enzima, razón molar de los sustratos, naturaleza del SLIL, temperatura, etc.) se obtuvieron rendimientos cercanos al 100% para todos los productos sintetizados.

Teniendo en cuenta las propiedades únicas de los SLILs en la separación de compuestos hidrofóbicos, se ha diseñado un protocolo de separación basado en la combinación de dichas propiedades con la centrifugación de la mezcla sólida compuesta por el IL/éster de aroma empleando membranas de filtración. Mediante este enfoque, se ha conseguido de forma sencilla y limpia la separación de los ésteres de aromas producidos, recuperándose el sistema SLIL/biocatalizador, que se reutilizó durante seis ciclos operacionales sin mostrar pérdida en la actividad catalítica.

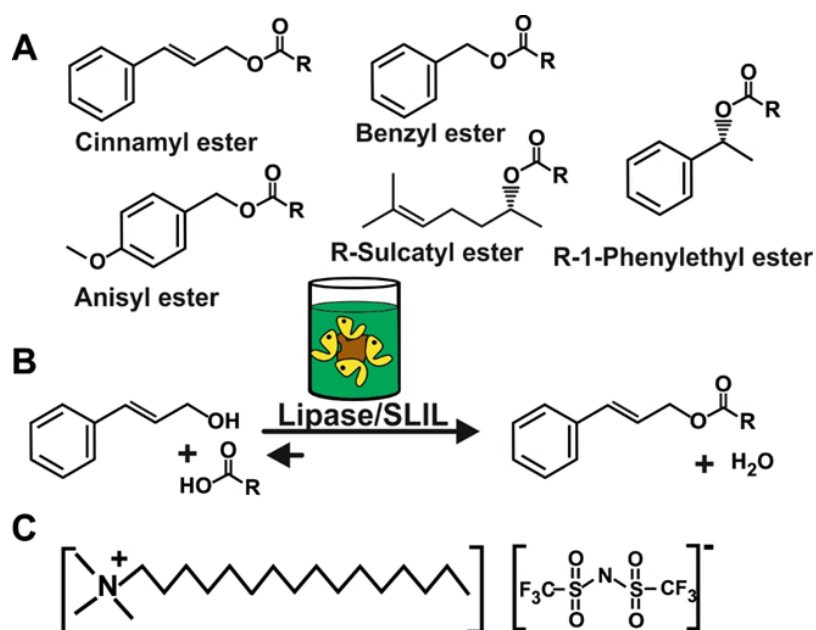
## 2. INTRODUCCIÓN

---

Los ésteres de aromas derivados de ácidos carboxílicos de corta longitud de cadena (p. ej. acetato de geranilo, propionato de cinamilo, acetato de anisilo, etc.) (**Figura 1A**) presentan aromas frutales y florales que los hacen muy valiosos en la industria cosmética (p. ej. en lociones corporales, desodorantes, champús, barras de labios, etc.), alimentaria (p. ej. en bebidas, alimentos, etc.) y farmacéutica [1]. Tal es el interés de estos compuestos, que el mercado global de aromas y fragancias en 2015 estaba valorado en 26 billones de dólares y se espera que incremente hasta 37 billones de dólares en el año 2021 [2].

Al crecimiento del mercado de los aromas, se le suma el creciente interés de la sociedad por consumir productos que contengan compuestos naturales, así como la aplicación de enfoques sostenibles para su producción. Sin embargo, la mayoría de los ésteres de aromas se producen mediante síntesis química convencional, empleando de derivados de ácidos carboxílicos (p. ej. haluros de acilo, derivados anhídridos, etc.) y compuestos orgánicos volátiles como medio de reacción, que legalmente perjudican la etiqueta de los productos comercializados como “naturales” [3]. Además, las normativas europea [4] y de estadounidense [5] indican que solo se pueden considerar fragancias “naturales” aquellas que hayan sido obtenidas mediante procesos físicos a partir de fuentes naturales o mediante transformación enzimática o microbiana de precursores aislados de la naturaleza y sin empleo de COVs. Por lo tanto, la sociedad actual está totalmente interesada en el desarrollo de nuevas metodologías que empleen enfoques limpios y sostenibles a escala industrial.

Como se ha comentado en el **Capítulo II** de esta memoria, las enzimas constituyen una potente herramienta para la catálisis sostenible de muchas transformaciones químicas. Dentro de la gran multitud de enzimas disponibles en la naturaleza, las lipasas constituyen uno de los biocatalizadores más importantes para la síntesis de ésteres de aromas y fragancias mediante esterificación y transesterificación en medios de reacción con bajo contenido en agua [6-8]. La transesterificación catalizada por lipasas conlleva el empleo de sustratos no naturales (p. ej. ésteres de vinilo, derivados anhídridos, etc.) que suponen un inconveniente a la hora de obtener productos “naturales”, especialmente cuando la reacción tiene lugar en presencia de disolventes orgánicos volátiles. Por el contrario, la esterificación directa (**Figura 1B**) se considera la alternativa más sostenible para producir ésteres de aromas y fragancias “naturales”, sobre todo si se lleva a cabo en sistemas libres de cualquier solvente, debido a que se parte de compuestos naturales (ácidos carboxílicos y alcoholes) como sustratos que a su vez constituyen el medio de reacción [9].



**Figura 1.** A) Estructuras de diferentes ésteres de aromas obtenidos mediante esterificación directa catalizada por lipasas. B) Esquema de síntesis de ésteres de cinamilo mediante esterificación de ácidos carboxílicos con alcohol de cinamilo, catalizada por lipasas inmovilizadas. C) Estructura del SLIL  $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ , empleado como medio de reacción en la síntesis biocatalítica de ésteres de aromas [10].

En el diseño de protocolos de esterificación, un factor clave es el desplazamiento del equilibrio de la reacción hacia la síntesis de los productos mediante la eliminación del agua que se genera como subproducto. Además, en ausencia de solventes, la necesidad de emplear concentraciones altas de ácidos carboxílicos conduce a la desactivación enzimática, lo que constituye un problema a la hora de sintetizar ésteres de aromas con los elevados rendimientos que requiere la industria (ver **Capítulo II**). Por ejemplo, se ha descrito que el rendimiento máximo de la síntesis de propionato de bencilo en medio libre de disolvente, mediante esterificación directa de ácido propiónico con alcohol de bencilo catalizada por una lipasa fue de 45%, tras 24 horas de reacción a 50 °C [11]. Sin embargo, se ha observado que los rendimientos de síntesis pueden mejorar cuando se emplea un disolvente orgánico como medio de reacción. Así, se ha descrito que la síntesis de butirato de cinamilo mediante esterificación directa de ácido butírico y alcohol de cinamilo en hexano proporciona un 90% de rendimiento de síntesis tras 12 horas de reacción a 50 °C [12]. No obstante, el empleo de disolventes orgánicos disminuye considerablemente el carácter sostenible del proceso de síntesis [3].

Teniendo en cuenta lo comentado hasta el momento, el empleo de ILs como medios de reacción no acuosos resulta una alternativa muy interesante a los COVs para llevar a

cabo transformaciones biocatalíticas [13]. Además, el comportamiento tipo esponja que presentan los ILs hidrofóbicos con larga longitud de cadena alquílica (p. ej. [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>], [C<sub>18</sub>mim][NTf<sub>2</sub>], etc., ver **Figura 1C**) supone un gran avance en el diseño de procesos sencillos y limpios de separación para la obtención de productos puros [7,9,14] (ver **Capítulo II**).

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es el diseño de un protocolo que suponga un enfoque más sostenible, mediante la integración de la síntesis biocatalítica de dieciséis ésteres de aromas y la separación de estos productos empleando la tecnología de los SLILs. Para ello, se ha llevado a cabo la esterificación directa de ácidos carboxílicos con alcoholes aromáticos y alifáticos (alcohol de cinamilo, alcohol de bencilo, alcohol de anisilo, *rac*-1-feniletanol y *rac*-sulcatol), evaluando la influencia de diferentes parámetros que influyen en el rendimiento de la reacción. Además, con el objetivo de mejorar la eficiencia en la recuperación de los productos, se ha introducido el empleo de filtros de membrana durante la etapa de separación de los mismos, así como se ha evaluado la reutilización del sistema biocatalizador/SLIL.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

---

#### 3.1. Reactivos

Los derivados inmovilizados de las lipasas (EC. 3.1.1.3) de *Candida antarctica* (Novozyme<sup>®</sup> 435) *Thermomyces lanuginosus* (Lypozyme<sup>®</sup> TL IM), y *Mucor miehei* (Lypozyme<sup>®</sup> RM IM) fueron cedidas por Novozymes S.A. (España). El alcohol de bencilo (>99% CG) y *rac*-sulcatol (*rac*-6-metil-5-hepten-2-ol, >99%, CG) fueron suministrados por Merck KGaA (Alemania). El alcohol de cinamilo (98%, CG), alcohol de anisilo (>98% CG), *rac*-1-feniletanol (>98%, CG), ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, molecular sieves 13x (MS13X; 10 Å de tamaño de poro, 270 mg de adsorción de H<sub>2</sub>O/g), disolventes y otros reactivos fueron suministrados por Sigma-Aldrich-Fluka (España).

Los ILs, bis[(trifluorometilsulfonil)imida] de dodeciltrimetilamonio ([C<sub>12</sub>tma][NTf<sub>2</sub>], 99% pureza), bis[(trifluorometilsulfonil)imida] de tetradeciltrimetilamonio ([C<sub>14</sub>tma][NTf<sub>2</sub>], 99% pureza), bis[(trifluorometilsulfonil)imida] de hexadeciltrimetilamonio ([C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>], 99% pureza), bis[(trifluorometilsulfonil)imida] de octadeciltrimetilamonio ([C<sub>18</sub>tma][NTf<sub>2</sub>], 99%

pureza), 1-dodecil-3-metilimidazolio bis[(trifluorometilsulfonil)imida] ([C<sub>12</sub>mim][NTf<sub>2</sub>], 99% pureza) y hexafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio ([C<sub>16</sub>mim][PF<sub>6</sub>], >98% pureza) fueron suministrados por IoLiTec GmbH (Alemania). Los filtros centrifuga de membranas de nylon (3 kDa, 10 kDa, 30 kDa and 0.2 µm de tamaño de poro) fueron suministrados por VWR Int. (Barcelona, España).

### 3.2. Síntesis enzimática de ésteres de aromas en SLILs

Se introdujeron 3 mmol del correspondiente alcohol de aroma (alcohol de cinamilo, 394 µL; alcohol de anisilo, 369 µL; alcohol de bencilo, 315 µL; *rac*-1-feniletanol, 370 µL o *rac*-sulcatol, 455 µL) en viales de 4 mL de capacidad, con tapón de rosca y septum de silicona-teflón, que se mezclaron con 1, 2 o 3 mmol de ácido acético (58, 116 o 174 µL, respectivamente), ácido propiónico (75, 150 o 225 µL, respectivamente) ácido butírico (93, 186 o 278 µL, respectivamente) ácido valérico (110, 220 o 330 µL, respectivamente), ácido hexanoico (125, 250 o 375 µL, respectivamente) ácido heptanoico (142, 284 o 425 µL, respectivamente) y/o ácido octanoico (155, 310 o 466 µL, respectivamente). Posteriormente, se añadió la correspondiente cantidad de SLIL ([C<sub>12</sub>tma][NTf<sub>2</sub>], [C<sub>14</sub>tma][NTf<sub>2</sub>], [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>], [C<sub>18</sub>tma][NTf<sub>2</sub>], [C<sub>12</sub>mim][NTf<sub>2</sub>], [C<sub>12</sub>mim][BF<sub>4</sub>] o [C<sub>16</sub>mim][PF<sub>6</sub>]), constituyendo éste un 50% (m/m) con respecto a la masa de los sustratos. La mezcla de reacción se pre-incubó a 50 °C durante 15 minutos hasta obtener un sistema monofásico, al cual se añadió un agente desecante, MS13X (120 mg/mmol donador de acilo), y la reacción comenzó con la adición de la enzima inmovilizada (Novozyme<sup>®</sup> 435, Lipozyme<sup>®</sup> RM IM o Lipozyme<sup>®</sup> TL IM, respectivamente) en una proporción de 15% (m/m) con respecto a la masa del donador de acilo. La mezcla de reacción se incubó a 50 °C y 300 rpm durante 4 horas.

Con el objetivo de obtener un perfil cinético de las reacciones de esterificación, se recogieron alícuotas de 20 µL en intervalos de tiempo regulares y se suspendieron en 480 µL de octano:isopropanol (95:5 v/v). La mezcla bifásica resultante se agitó vigorosamente durante 1 min y se centrifugó a 15 000 rpm durante 10 min a 15 °C, para extraer los productos del IL. Finalmente, se mezclaron 300 µL del sobrenadante con 200 µL de una disolución 100 mM de decanoato de etilo (empleado como estándar de la reacción) en octano y las muestras se analizaron mediante CG-FID.

Una unidad de actividad de síntesis se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de éster de aroma por minuto.

### **3.3. Protocolo de separación de las mezclas SLIL/éster de aroma**

Con el objetivo de separar los productos de reacción del medio conteniendo el SLIL, se introdujo una alícuota de 0.5 mL del medio de reacción en un vial de centrifuga de 1 mL de capacidad, equipado con un filtro de nylon (3 kDa, 10 kDa o 30 kDa o 0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, respectivamente). El sistema se enfrió a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas hasta obtener una mezcla sólida, que se centrifugó a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  (15 000 rpm, 5 min) obteniéndose el éster de aroma filtrado, como fase líquida, mientras que el SLIL sólido permaneció retenido en el filtro de nylon.

El contenido de SLIL residual en el producto filtrado se determinó mediante análisis de RMN de  $^{19}\text{F}$  a 282 MHz, en un espectrómetro Bruker AC 300E. Para ello, se disolvió una muestra de 20 mg del filtrado en 0.8 mL de una disolución de acetona- $\delta_6$  conteniendo 1% (v/v) de ácido trifluoroacético, que se empleó como estándar interno.

### **3.4. Análisis mediante cromatografía de gases**

Las muestras se analizaron mediante CG, en un cromatógrafo Shimadzu GC-2010 (Shimadzu Europa, Alemania) equipado con un detector FID y un inyector automático. Para el análisis se empleó una columna CP-Chirasil-DEX CB (25 m x 0.32  $\mu\text{m}$  x 0.25  $\mu\text{m}$ , Teknocrroma, España) bajo las siguientes condiciones: gas portador (He) a  $294.6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; relación de separación variable, 100; programa de temperatura:  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 min,  $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10 min.

Bajo estas condiciones se obtuvieron los siguientes tiempos de retención (min): alcohol de cinamilo, 14.2; acetato de cinamilo, 14.3; propionato de cinamilo, 16.1; butirato de cinamilo, 17.9; valerato de cinamilo, 19.9; hexanoato de cinamilo, 21.7; heptanoato de cinamilo, 23.5; octanoato de cinamilo, 25.1; alcohol de bencilo, 8.6; acetato de bencilo 6.8; propionato de bencilo, 8.9; butirato de bencilo, 11.1; alcohol de anisilo, 13.6; acetato de anisilo, 13.2; propionato de anisilo 15.0; butirato de anisilo, 16.8; ácido acético, 1.3; ácido propiónico, 1.8; ácido butírico; 3.3; ácido valérico, 6.1; ácido hexanoico 8.9; ácido heptanoico, 11.3; ácido octanoico, 13.3; 1-feniletanol, 8.8-9.3; propionato de 1-feniletanol, 9.4 y decanoato de etilo, 11.6, respectivamente.



Para el análisis de *rac*-sulcatol y sus productos, el programa de temperatura empleado fue el siguiente: 80 °C, 5 min; 5 °C·min<sup>-1</sup>; 200 °C, 10 min, y los tiempos de retención (min) fueron: S-sulcatol: 11.0 y R-sulcatol: 11.9; propionato de R-sulcatol: 21.8; hexanoato de R-sulcatol: 32.3.

### 3.5. Caracterización de los productos mediante CG-MS

Con el objetivo de confirmar la identidad de los ésteres de aromas sintetizados, se analizaron las muestras mediante CG-MS. Este análisis se llevó a cabo en un CG-6890 (Agilent, EE.UU.) acoplado a detector de MS-5973 (Agilent, EE.UU.). Para el análisis se empleó una columna HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Agilent, EE.UU.) bajo las siguientes condiciones: Gas portador (He) a 103 mL·min<sup>-1</sup>; relación de separación variable, 100:1; programa de temperatura: 100 °C, 5 min; 5 °C·min<sup>-1</sup>, 200 °C, 10 min; Energía de la fuente de ionización de MS, 70 eV; tiempo de escáner, 0.5 s.; rango de masas, 40-800 uma. Bajo estas condiciones, se seleccionó como ejemplo representativo el éster propiónico de cada alcohol estudiado, siendo identificado mediante comparación de su espectro de masas con los proporcionados por la base de datos NIST. Los tiempos de retención (Tr, min) y relación masa/carga (m/z) fueron los siguientes: propionato de cinamilo: Tr, 16.3 e ión positivo (m/z): 57.1, 77.1, 91.0, 115.1, 133.1, 148.1, 161.2, 177.1, 190.2; Propionato de bencilo: Tr, 8.7 y (m/z): 57.1, 66.1, 79.1, 91.1, 108.1, 117.1, 135.1, 164.2; Propionato de anisilo: Tr, 11.3 y (m/z): 39.0; 51.0; 77.0; 91.0; 107.0; 123.0; 137.0; 152.0; propionato de R-1-feniletanol: Tr, 9.4 y (m/z): 57.1, 77.1, 91.1, 105.2, 122.2, 163.1, 178.2.

### 3.6. Estabilidad operacional del sistema [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>]/Novozyme<sup>®</sup> 435

Se seleccionó la reacción de síntesis de propionato de cinamilo para evaluar la estabilidad operacional del sistema SLIL/Novozyme<sup>®</sup> 435. Para ello, se llevó a cabo una serie de ciclos consecutivos de síntesis biocatalítica y separación, reutilizando el sistema SLIL/enzima (ver **Figura 8**).

La etapa biocatalítica se llevó a cabo según el protocolo descrito en la **sección 3.2** del presente capítulo. Para ello, se añadieron 3 mmol de alcohol de cinamilo y 2 mmol de ácido propiónico en un vial de 4 mL de capacidad, con tapón de rosca y septum de teflón, junto al IL [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] (50% m/m con respecto a la masa total de los sustratos). La mezcla se pre-incubó durante 15 min a 50 °C hasta alcanzar un sistema monofásico

líquido. Posteriormente, se añadió agente desecante MS13X y la reacción comenzó con la adición del biocatalizador Novozyme<sup>®</sup> 435 (20% m/m con respecto a la masa del donador de acilo). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a 300 rpm durante 24 horas a 50 °C. A continuación, dicha mezcla se enfrió a -20 °C durante 2 horas y el medio sólido resultante se centrifugó, en un vial de centrífuga acoplado a un filtro de nylon de 0.2 µm de tamaño de poro, a 15 000 rpm durante 10 minutos a 0 °C (ver **sección 3.3**). Tras la etapa de centrifugación, el sistema SLIL/Novozyme<sup>®</sup> 435/MS13X permaneció como fase sólida en el filtro, mientras que el producto líquido y los reactivos no reaccionados se recogieron en el vial. Finalmente, el sistema SLIL/Novozyme<sup>®</sup> 435/MS13X se recogió y se secó bajo una corriente de vacío a 80 °C durante 4 horas y este sistema se reutilizó para un nuevo ciclo biocatalítico de síntesis/separación de propionato de cinamilo.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

En este capítulo se han combinado las excelentes características que presentan las lipasas inmovilizadas con las propiedades únicas de los SLILs para desarrollar un protocolo que integre la transformación biocatalítica y la separación de diferentes ésteres de aromas. Para lograr este objetivo, se evaluó en primera instancia la naturaleza del biocatalizador inmovilizado, así como la influencia de la naturaleza y la concentración del SLIL empleado como medio de reacción en la etapa biocatalítica. Por otro lado, teniendo en cuenta las propiedades genuinas de los SLILs en la separación de compuestos moleculares mediante sencillos pasos de enfriamiento/centrifugación, en este capítulo se evaluó el empleo de filtros de membrana en la etapa de centrifugación, con el objetivo de incrementar el rendimiento de extracción de productos, así como la recuperación total del SLIL para su posterior reutilización. Este estudio incluye tanto la evaluación del tamaño de poro de membrana del filtro empleado, como la influencia de la temperatura durante la etapa de centrifugación.

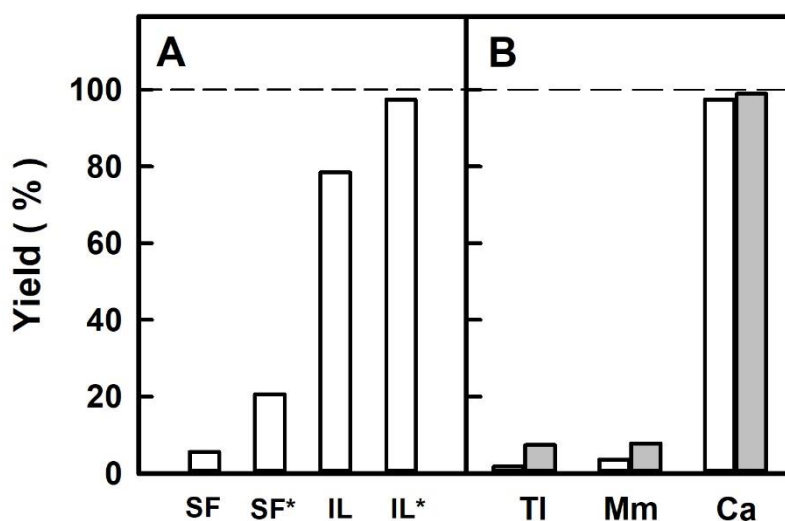
### **4.1. Síntesis de ésteres de aromas mediante esterificación catalizada por lipasas**

Para evaluar y optimizar los parámetros que afectan a la etapa biocatalítica se seleccionó la síntesis de propionato de cinamilo como reacción representativa de obtención de ésteres de aromas. La síntesis se llevó a cabo mediante esterificación directa

de un ácido carboxílico (ácido propiónico) con el alcohol de cinamilo, catalizada por una lipasa (ver **Figura 1B**).

En primer lugar, se evaluó la naturaleza del medio de reacción en la esterificación de 2 mmol de ácido propiónico con 3 mmol de alcohol de cinamilo a 50 °C. En la **Figura 2A** se muestra que la reacción, en ausencia de disolvente, proporcionó un rendimiento muy bajo (5.6% tras 4 horas de reacción). Este rendimiento se incrementó hasta un 20.6% al incorporar un agente desecante (MS13X) al medio de reacción, que ayuda a desplazar el equilibrio hacia la formación de productos, gracias a su capacidad para adsorber el agua generada. Sin embargo, estos resultados no mejoraron con tiempos de reacción más largos, probablemente debido a la desactivación de la enzima en presencia de altas concentraciones de ácido carboxílico [7,15]. No obstante, cuando se empleó el IL [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] como medio de reacción en la síntesis de propionato de cinamilo, y en presencia de MS13X, se obtuvo un rendimiento cercano al 100%, en 4 horas de reacción.

Estos resultados reflejan la idoneidad de los SLILs como medio de reacción en la síntesis de aromas mediante esterificación catalizada por lipasas, constituyendo una alternativa muy interesante a la síntesis convencional. [9]. Por ejemplo, Sá et al. [11] consiguieron producir propionato de bencilo mediante esterificación, catalizada por Novozyme<sup>®</sup> 435, de ácido propiónico con alcohol de bencilo en ausencia de solvente y en tert-butanol como medio de reacción, consiguiendo rendimientos superiores al 31% , en ambos casos, tras 24 horas de reacción a 50 °C. Además, mediante el empleo de un agente desecante e incrementando la temperatura de reacción a 65 °C, consiguieron la síntesis de butirato de bencilo con un 65% de rendimiento tras 24 horas y en ausencia de solvente. En este sentido, los SLILs no solo mejoran el rendimiento de reacción respecto a estos resultados, sino que también suponen una mejora en la eficiencia energética, ya que permiten disminuir la temperatura y el tiempo de reacción. Además, gracias a su carácter hidrofóbico, los SLILs no solo permiten solubilizar a los sustratos, sino que contribuyen a la estabilidad del biocatalizador, debido a su capacidad para mantener la estructura nativa de las mismas (ver **Capítulo II**).

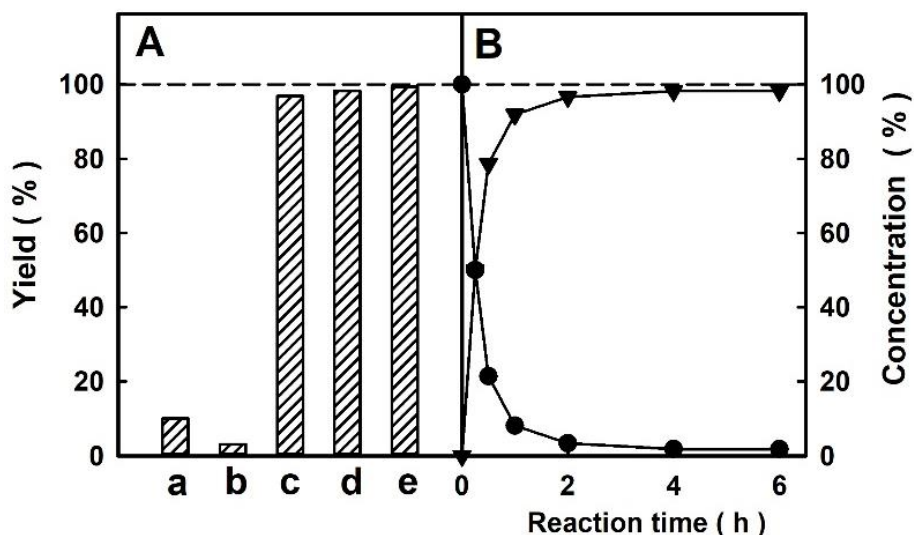


**Figura 2.** **A)** Rendimiento de síntesis de propionato de cinamilo obtenido mediante la esterificación del alcohol de cinamilo con ácido propiónico (3:2 mol:mol) catalizada por Novozyme<sup>®</sup> 435, tras 4 horas de reacción a 50 °C. SF, sistema libre de disolvente (del inglés, *Solvent-free*); SF\*, SF con MS13X; IL, 50% (m/m) [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>]; IL\*, 50% (m/m) [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] con MS13X. **B)** Rendimiento de síntesis de propionato de cinamilo catalizada por los preparados inmovilizados comerciales de las lipasas: *Thermomyces lanuginosus* (**TI**), *Mucor miehei* (**Mm**) y *Candida antarctica* (**Ca**), respectivamente, en 50% (m/m) [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] tras 4 (barras blancas) y 24 (barras grises) horas de reacción a 50 °C [10].

Por otro lado, se evaluó la capacidad de diferentes lipasas inmovilizadas en la síntesis de propionato de cinamilo mediante esterificación directa del ácido propiónico con alcohol de cinamilo. En la **Figura 2B** se observa la idoneidad de la lipasa B inmovilizada de *Candida antarctica* (Novozyme<sup>®</sup> 435) con respecto a las lipasas inmovilizadas de *Thermomyces lanuginosus* (Lypozyme<sup>®</sup> TL IM) y *Mucor miehei* (Lypozyme<sup>®</sup> RM IM). Mientras que Lypozyme<sup>®</sup> TL IM y Lypozyme<sup>®</sup> RM IM solo consiguieron catalizar la síntesis de propionato de cinamilo con un 7% de producto tras 24 horas de reacción, esta síntesis catalizada por Novozyme<sup>®</sup> 435 condujo a rendimientos de producto cercanos al 100% en 24 horas de reacción, en las mismas condiciones. Las diferencias observadas en la eficiencia catalítica de las lipasas inmovilizadas estudiadas se puede atribuir a diferentes factores, como son la fuente enzimática, el método de inmovilización empleado y la naturaleza del soporte, ya que dichos factores modifican las propiedades de las enzimas, así como su actividad, incluso en condiciones de reacción similares [6].

#### 4.2. Influencia de la naturaleza del líquido iónico tipo esponja en la síntesis enzimática de propionato de cinamilo

Los ILs son disolventes de diseño cuyas propiedades pueden modificarse en base a la selección de sus constituyentes. Por ello, con el objetivo de encontrar el SLIL más apropiado para la síntesis y separación de ésteres de aromas, asegurando la estabilidad del biocatalizador, se evaluó el efecto de la naturaleza de la especie catiónica y aniónica de cinco SLILs en la síntesis de propionato de cinamilo catalizada por Novozyme<sup>®</sup> 435, mediante esterificación directa del ácido propiónico con alcohol de cinamilo, a 50 °C, siguiendo el protocolo descrito en la **sección 3.2**. Como resultado de este estudio, en la **Figura 3A** se observa que los rendimientos de síntesis de propionato de cinamilo en ILs compuestos por los aniones  $[\text{BF}_4]^-$  y  $[\text{PF}_6]^-$  fueron inferiores al 10%, mientras que cuando el medio de reacción estaba compuesto por ILs formados por el anión  $[\text{NTf}_2]^-$  se alcanzaron rendimientos superiores al 96% en todos los casos estudiados. Además, se observó un ligero incremento en el rendimiento de síntesis al incrementar la longitud de la cadena alquílica de la especie catiónica de estos ILs.

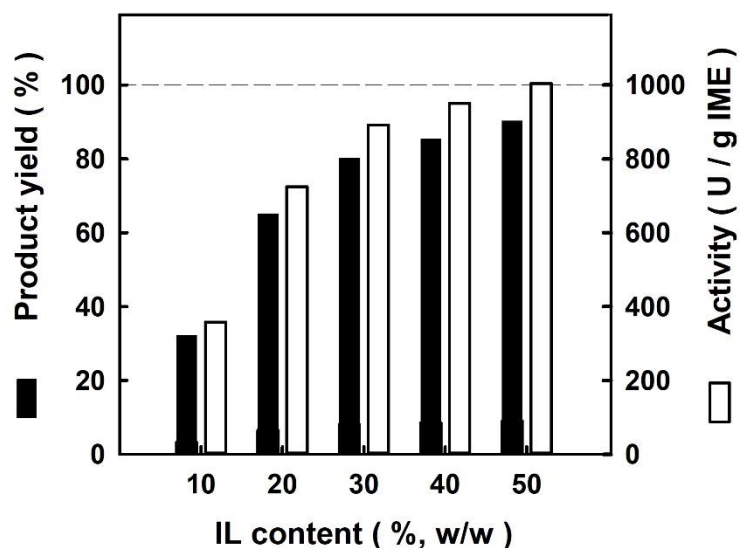


**Figura 3.** A) Influencia de la naturaleza del IL (50% m/m) en el rendimiento de síntesis de propionato de cinamilo, obtenido mediante esterificación de ácido propiónico con alcohol de cinamilo (2:3 mol:mol) catalizada por Novozyme<sup>®</sup> 435, tras dos horas de reacción a 50 °C (a, [C<sub>12</sub>mim][BF<sub>4</sub>]; b, [C<sub>16</sub>mim][PF<sub>6</sub>]; c, [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]; d, [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>]; e, [C<sub>18</sub>tma][NTf<sub>2</sub>]). B) Perfil cinético obtenido en la síntesis de propionato de cinamilo (▼) resultante de la esterificación de ácido propiónico (●) con alcohol de cinamilo (2:3 mol:mol) catalizada Novozyme<sup>®</sup> 435 en 50% (m/m) [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] a 50 °C. Todas las reacciones se llevaron a cabo en presencia de 240 mg de MS13X [10].

Estos resultados coinciden con los publicados en la síntesis de oleato de metilo mediante metanólisis de trioleína catalizada por Novozyme<sup>®</sup> 435 [16], atribuyéndose el bajo rendimiento a la alta polaridad de los aniones  $[\text{BF}_4]^-$  y  $[\text{PF}_6]^-$  con respecto al anión  $[\text{NTf}_2]^-$ , que puede haber influido en la capa de hidratación de la enzima, afectando así a su actividad.

En la **Figura 3B** se muestra el perfil cinético de la esterificación del ácido propiónico con alcohol de cinamilo (2:3 mol:mol) catalizada por Novozyme<sup>®</sup> 435 en  $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$  (50% m/m) a 50 °C. Este estudio demuestra la rapidez de esta reacción, obteniéndose un 96% de propionato de cinamilo (con respecto al ácido propiónico inicial) en solo 2 horas de reacción y alcanzando el 99% de rendimiento tras 6 horas de reacción.

Teniendo en cuenta estos resultados y con el objetivo de proponer un protocolo más sostenible a nivel económico y medioambiental, se evaluó la concentración de IL en el medio de reacción. Para ello, se estudió la influencia de diferentes concentraciones de  $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$  (10, 20, 30, 40 y 50%, m/m, respectivamente) en la síntesis de propionato de cinamilo, como reacción modelo. En la **Figura 4** se observa que, tras 1 hora de reacción, tanto la actividad como el rendimiento de síntesis mejoraron con el incremento de la concentración de IL en el medio, obteniéndose los mejores resultados (90% de rendimiento de síntesis y 1004 U/g(Novozyme<sup>®</sup> 435)) cuando el medio de reacción contenía un 50% (m/m) de  $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ . Los resultados obtenidos se pueden relacionar con el efecto protector que ejercen los ILs hidrofóbicos sobre la enzima en medios no acuosos, evitando el fenómeno de desactivación que algunos disolventes orgánicos promueven [7].



**Figura 4.** Influencia del porcentaje en peso de  $[C_{16}mim][NTf_2]$  en el medio de reacción sobre la actividad biocatalítica (blanco) y sobre el rendimiento del producto (negro) para la síntesis de propionato de cinamilo, mediante esterificación de ácido propiónico con alcohol de cinamilo (2:3 mol:mol) catalizada por Novozyme<sup>®</sup> 435, tras una hora de reacción a 50 °C [10].

#### 4.3. Influencia de la razón molar de los sustratos

Teniendo en cuenta que uno de los principios de la Química Verde es apostar por la economía atómica de los procesos, se evaluó también la influencia de la razón molar ácido:alcohol en la síntesis de propionato de cinamilo. De esta forma, siguiendo el protocolo descrito en la **sección 3.2**, se llevó a cabo la esterificación del ácido propiónico con alcohol de cinamilo (1:1, 2:3, 1:2 y 1:3 mol:mol, respectivamente) catalizada por Novozyme<sup>®</sup> 435 en de  $[C_{16}mim][NTf_2]$  (50% m/m) a 50 °C y en presencia de agente desecante MS13X. De este estudio se observó que empleando una razón molar 1:1 (ácido propiónico:alcohol de cinamilo) el rendimiento de síntesis obtenido tras 4 horas fue de 89% y no incrementaba con tiempos de reacción superiores. Sin embargo, cuando la reacción tenía lugar empleando razones molares 2:3, 1:2 y 1:3 (ácido propiónico:alcohol de cinamilo), el rendimiento de reacción era superior al 99% después de 4 horas, por lo que, de acuerdo al principio de economía atómica de los procesos, se seleccionó la razón molar 2:3 como óptima en la metodología desarrollada. Estos resultados mejoran claramente los publicados por Waghmare et al. [12] para la síntesis de butirato de cinamilo (90%, rendimiento en 24 horas) mediante esterificación de ácido butírico con alcohol de cinamilo (1:2 mol:mol) catalizada por Novozyme<sup>®</sup> 435 en hexano a 50 °C.

#### 4.4. Aplicación de la metodología desarrollada a la síntesis de ésteres de aromas

Se evaluó la idoneidad de la metodología desarrollada en la síntesis biocatalítica de 16 ésteres de aromas, mediante la esterificación de un ácido carboxílico (p. ej. ácido acético, ácido propiónico, etc.) con tres alcoholes primarios (alcohol de cinamilo, alcohol de anisilo y alcohol de bencilo) y dos sec-alcoholes (*rac*-1-feniletanol y *rac*-sulcatol).

La **Tabla 1** muestra el rendimiento de síntesis de los ésteres de aromas sintetizados, siendo éste superior al 95% en todos los casos estudiados. Cabe destacar que el incremento de la longitud de la cadena alquílica de la especie catiónica del IL (entradas 1-4) supone un incremento en el rendimiento de síntesis de propionato de cinamilo, destacando así el efecto que ejerce el medio hidrofóbico sobre la actividad del biocatalizador [7,13,14]. Sin embargo, para un mismo IL, el incremento en la longitud de la cadena del ácido no supuso cambios notables sobre el rendimiento de síntesis de ésteres de cinamilo (entradas 5-10), obteniendo en todos los casos rendimientos cercanos al 99%. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la síntesis de ésteres de bencilo (entradas 11-13) y anisilo (entradas 14-18) mediante esterificación de diferentes ácidos carboxílicos con los alcoholes de bencilo y anisilo, respectivamente. De forma similar, cabe destacar la excelente enantioselectividad mostrada por el biocatalizador Novozyme<sup>®</sup> 435 en la resolución cinética de *rac*-1-feniletanol (entrada 17) y *rac*-sulcatol (entradas 18-19) cuando se emplea [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>] como medio de reacción, ya que se obtuvieron rendimientos de síntesis cercanos al 50% con un exceso enantiomérico (ee) superior al 99%.

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede concluir que los ILs compuestos por la combinación de cationes de larga longitud de cadena alquílica y el anión [NTf<sub>2</sub>]<sup>-</sup> constituyen excelentes medios de reacción para este derivado inmovilizado de la lipasa B de *Candida antarctica*, obteniéndose rendimientos de síntesis cercanos al 100% en tiempos de reacción cortos para todos los ésteres de aromas sintetizados.



**Tabla 1.** Rendimientos obtenidos en la síntesis de ésteres de aromas mediante esterificación catalizada por Novozyme® 435 en 50% (m/m) SLILs tras 4 horas a 50 °C (ver **sección 3.2**) [10].

Entrada	SLIL	Éster de aroma	Rendimiento (%)
1	[C <sub>12</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Propionato de cinamilo	98.0
2	[C <sub>14</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Propionato de cinamilo	98.4
3	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Propionato de cinamilo	98.6
4	[C <sub>18</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Propionato de cinamilo	99.3
5	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Acetato de cinamilo	99.0
6	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Butirato de cinamilo	96.1
7	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Valerato de cinamilo	98.9
8	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Hexanoato de cinamilo	98.5
9	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Heptanoato de cinamilo	98.5
10	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Octanoato de cinamilo	98.6
11	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Acetato de bencilo	99.5
12	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Propionato de bencilo	99.8
13	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Butirato de bencilo	99.6
14	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Acetato de anisilo	99.0
15	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Propionato de anisilo	99.1
16	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Butirato de anisilo	98.9
17	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Propionato de R-1-feniletanol	49.5 (ee > 99)
18	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Propionato de R-Sulcatol	48.9 (ee > 99)
19	[C <sub>16</sub> tma][NTf <sub>2</sub> ]	Hexanoato de R-Sulcatol	49.7 (ee > 99)

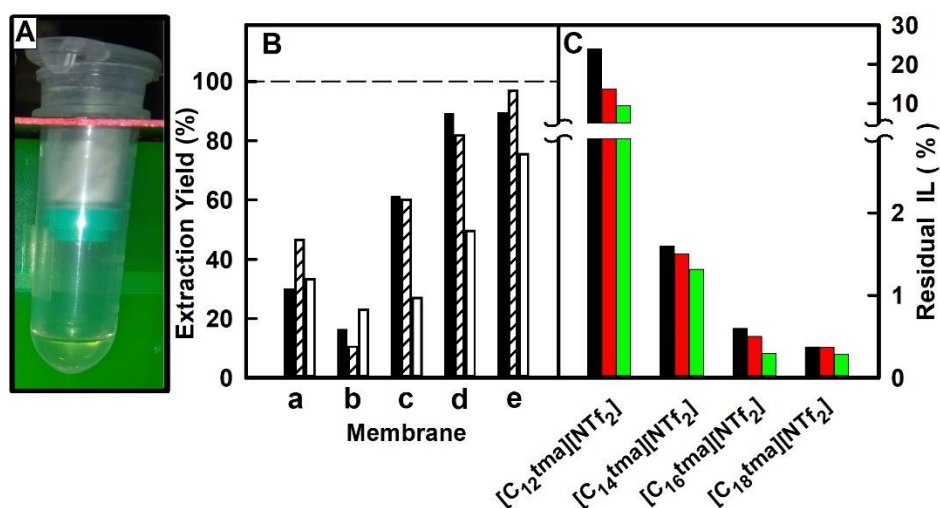
Debido a que el objetivo final de la metodología desarrollada es su aplicación a gran escala, se llevó a cabo la síntesis de propionato de cinamilo a una escala 50 veces superior a la empleada en los experimentos descritos en este capítulo, obteniéndose el éster de aroma con un rendimiento de 99.6% tras 4 horas de reacción. Por lo tanto, la metodología desarrollada supone una nueva vía para la síntesis de ésteres aromas “naturales” que podría ser aplicada a nivel industrial.

#### 4.5. Recuperación y reutilización del sistema SLIL/biocatalizador

##### 4.5.1. Diseño de un protocolo de recuperación del sistema SLIL/biocatalizador

Como se ha comentado previamente, en el desarrollo de procesos más sostenibles en la industria es fundamental la integración de la síntesis y separación de productos mediante enfoques limpios y sencillos, que permitan la reutilización de todos los elementos que forman el sistema de reacción (p. ej. (bio)catalizadores, disolventes, etc.).

Hasta la fecha se ha aplicado la tecnología de los SLILs en la separación de ésteres de aromas, obteniéndose productos prácticamente puros, pero con bajos rendimientos de extracción (ver **Capítulo II**). Por ello, con el objetivo de mejorar los rendimientos de extracción de los ésteres de aromas del sistema SLIL/biocatalizador, así como la pureza de los mismos, en este capítulo se ha evaluado la influencia del empleo de filtros de membrana para la recuperación del SLIL en la etapa de centrifugación. De esta forma, siguiendo el protocolo descrito en la **sección 3.3.**, se congeló (-20 °C) la mezcla de reacción compuesta por propionato de cinamilo y [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] y se centrifugó (15 000 rpm, 5 min a 0°C) en un filtro de nylon de 0.2 μm de tamaño de poro. En la **Figura 5A** se observa cómo el producto filtró, obteniéndose una fase líquida, mientras que el SLIL sólido quedó retenido en el filtro.



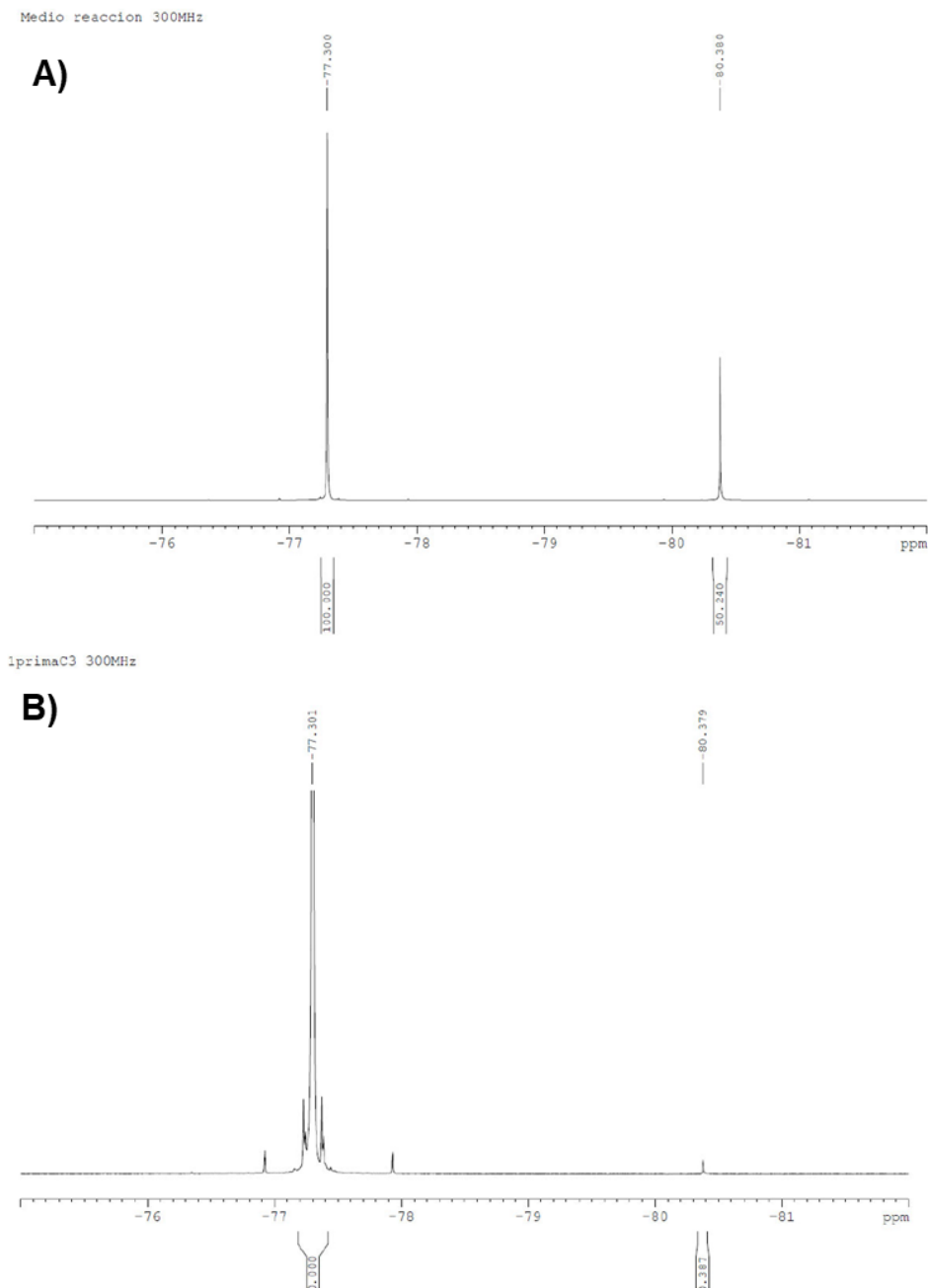
**Figura 5.** **A)** Imagen del SLIL [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] (sólido blanco de la parte superior) y propionato de cinamilo (fase líquida inferior) tras la etapa de enfriamiento a -20°C y centrifugación (15 000 rpm, 15 min a 0 °C) en un filtro de nylon de 0.2 μm de tamaño de poro. **B)** Rendimiento de extracción obtenido en el proceso de separación de propionato de anisilo (negro), propionato de bencilo (rayas) y propionato de cinamilo (blanco) de [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] (50% m/m) mediante el empleo de filtros de membrana con diferente tamaño de poro: **a**, sin filtro de membrana; **b**, 3 kDa; **c**, 10 kDa; **e**, 0.2 μm) tras congelar a -20 °C y centrifugar (15 000 rpm, 15 min) a 0 °C. **C)** Contenido de IL residual en la fracción líquida (propionato de cinamilo) separada de diferentes SLILs, tras tres ciclos de enfriamiento/centrifugación consecutivos (primer ciclo: barra negra; segundo ciclo: barra roja y tercer ciclo: barra verde) empleando diferentes filtros de centrifugación de 0.2 μm de tamaño de poro [10].

Por otro lado, con el objetivo de mejorar la eficiencia del proceso de separación de la mezcla compuesta por el éster de aroma/[C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] se evaluó la influencia que ejerce

el tamaño de poro de la membrana de filtración sobre el rendimiento de extracción de los productos. En la **Figura 5B** se muestran los rendimientos de extracción de los diferentes aromas (propionato de anisilo, propionato de bencilo y propionato de cinamilo, respectivamente), tras la separación de los mismos del medio de reacción del medio de reacción que contiene el IL  $[C_{16}tma][NTf_2]$  (50% m/m), siguiendo el protocolo descrito en la **sección 3.3.** y evaluando el empleo o ausencia de filtros de membrana con diferentes tamaños de poro (3, 10, 30 kDa y 0.2  $\mu m$ ). Como se puede observar en esta figura, cuando el protocolo de enfriamiento/centrifugación se llevó a cabo en ausencia de filtro de membrana, el rendimiento de extracción de los ésteres de aromas estudiados, fue inferior al 50% en todos los casos. Estos resultados coinciden con los publicados en la separación de ésteres de terpenos [15]. Sin embargo, el empleo de filtros de membrana durante la etapa de centrifugación mejoró considerablemente el rendimiento de extracción de los ésteres de aromas. Además, se observó que el rendimiento de extracción de estos productos incrementaba al aumentar el tamaño de poro de la membrana de filtración, obteniéndose los mejores resultados cuando la etapa de centrifugación se realizó en una membrana de nylon de 0.2  $\mu m$  de tamaño de poro.

La eficiencia del protocolo de separación se evaluó mediante la determinación del contenido en SLIL residual, a través del análisis de RMN de  $^{19}F$ . Para ello, se estudió la extracción de propionato de cinamilo de cuatro SLILs diferentes ( $[C_{12}tma][NTf_2]$ ,  $[C_{14}tma][NTf_2]$ ,  $[C_{16}tma][NTf_2]$  y  $[C_{18}tma][NTf_2]$ ) empleando filtros centrífugos de nylon de 0.2  $\mu m$  de tamaño de poro, durante tres ciclos de separación consecutivos. En la **Figura 5C** se observa que el incremento de la longitud de la cadena alquílica de la especie catiónica del SLIL condujo a una disminución en el contenido de SLIL residual en el aroma extraído tras el primer ciclo de enfriamiento/centrifugación. Esta disminución puede estar relacionada con el incremento en el punto de fusión de estos ILs [16]. Además, la repetición consecutiva del protocolo de separación del propionato de cinamilo en  $[C_{16}tma][NTf_2]$  y  $[C_{18}tma][NTf_2]$  permitió la obtención del producto con contenidos en IL similares (0.4 y 0.3% m/m, respectivamente). Sin embargo, el rendimiento de extracción del aroma sintetizado fue superior cuando se empleó  $[C_{16}tma][NTf_2]$  (75.5%), en comparación al obtenido en la extracción del mismo producto del SLIL  $[C_{18}tma][NTf_2]$  (56.6%), mostrándose el  $[C_{16}tma][NTf_2]$  como el SLIL más idóneo para llevar a cabo el proceso integrado de síntesis/separación de ésteres de aromas. La **Figura 6** muestra, a modo de ejemplo, el espectro de RMN de  $^{19}F$  obtenido tras tres ciclos de

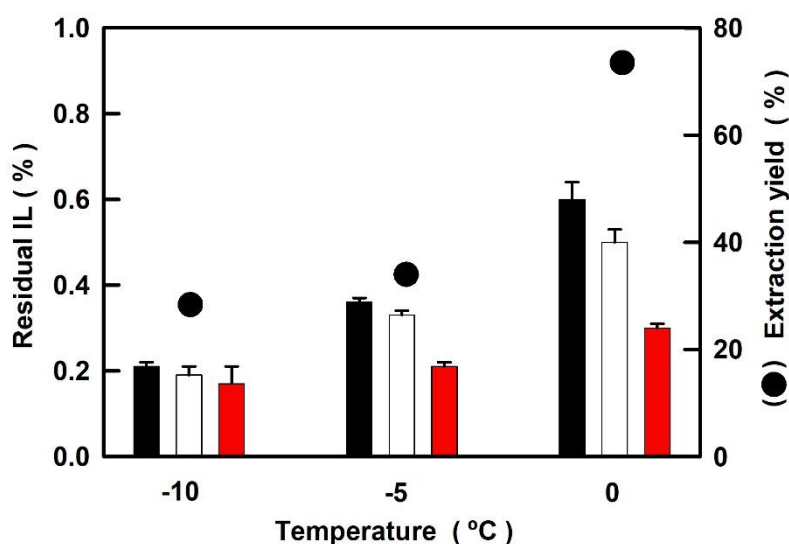
enfriamiento/centrifugación de un medio de reacción con propionato de cinamilo en  $[C_{16}tma][NTf_2]$ .



**Figura 6.** Espectro de RMN de  $^{19}F$  obtenido de: **A)** un medio de reacción que contiene propionato de cinamilo en  $[C_{16}tma][NTf_2]$  (50% m/m) y **B)** un medio de reacción que contiene propionato de cinamilo en  $[C_{16}tma][NTf_2]$  (50% m/m) después de tres ciclos consecutivos de enfriamiento/centrifugación a 0 °C en membranas de filtración de 0.2  $\mu m$  de tamaño de poro [10].

También se evaluó la influencia que ejerce la temperatura de centrifugación (0, -5 o -10 °C) sobre el rendimiento de extracción de propionato de cinamilo del medio de

reacción ( $[C_{16}tma][NTf_2]$ , 50% m/m) y sobre el contenido de IL residual, durante tres ciclos de enfriamiento/centrifugación consecutivos, empleando filtros de membrana de  $0.2 \mu m$  de tamaño de poro. En la **Figura 7** se observa que la disminución de la temperatura de centrifugación se tradujo en una disminución en el contenido de SLIL en el aroma extraído y que, además, éste se puede reducir aún más incrementando el número de ciclos de enfriamiento/centrifugación. Así, se obtuvo propionato de cinamilo con un contenido en SLIL de 0.2% (m/m) tras tres ciclos consecutivos de enfriamiento/centrifugación a  $-10 \text{ }^\circ C$ . Sin embargo, cabe destacar que el rendimiento de extracción de este producto decayó al disminuir la temperatura de centrifugación (de 73.5% a  $0 \text{ }^\circ C$  a 28.4% a  $-10 \text{ }^\circ C$ ), por lo que se seleccionó  $0 \text{ }^\circ C$  como temperatura de centrifugación óptima en la separación de ésteres de aromas del medio de reacción  $[C_{16}tma][NTf_2]$ .



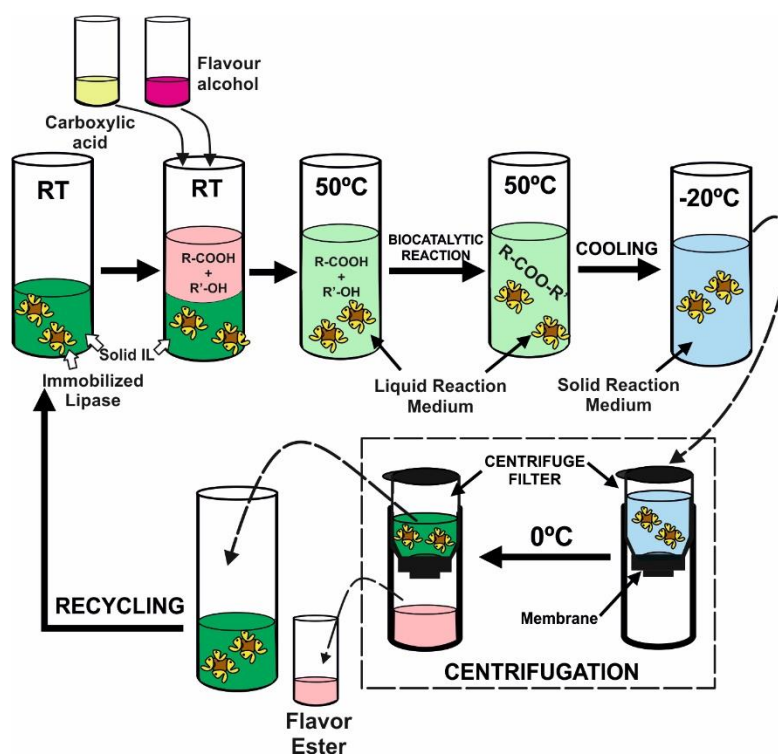
**Figura 7.** Influencia de la temperatura de centrifugación sobre el contenido de IL residual y el rendimiento de separación de una mezcla de propionato de cinamilo: $[C_{16}tma][NTf_2]$  (1:1, m/m), previamente congelada a  $-20 \text{ }^\circ C$ , durante tres ciclos consecutivos de enfriamiento/centrifugación (negro, primer ciclo; blanco, segundo ciclo; rojo, tercer ciclo). La etapa de centrifugación se llevó a cabo a 15 000 rpm durante 15 min en filtros de nylon de  $0.2 \mu m$  de tamaño de poro [10].

Los resultados obtenidos reflejan la idoneidad de los SLILs para disolver ésteres de aromas y liberarlos posteriormente mediante un sencillo protocolo de enfriamiento y centrifugación de la mezcla sólida. Cabe destacar que las mezclas de disolventes moleculares, como por ejemplo etanol:agua (50:50 v/v), también solidifican al disminuir la temperatura, pero no son capaces de separar el producto mediante centrifugación, teniendo que recurrir a procedimientos menos sostenibles, como la destilación. Esta propiedad única que presentan los SLILs y que permite extraer de manera sencilla

moléculas hidrofóbicas, puede explicarse atendiendo a la organización estructural de los mismos y su interacción con los solutos [7]. Tal y como se describe en el **Capítulo I** de esta memoria, los ILs son materiales nanoestructurados que permiten que moléculas neutras residan en regiones poco polares, mientras que las especies iónicas experimentan una difusión más rápida en las regiones polares [17,18]. Este hecho explicaría cómo los SLILs son capaces de albergar a los ésteres de aromas en regiones apolares, no solo en estado líquido, sino también en estado sólido, así como también explicaría cómo la compactación de la red iónica permite la liberación de los mismos. De esta forma, la extracción de un soluto de la red iónica del SLIL tiene lugar cuando el empuje de la fuerza de centrifugación es superior a la fuerza de atracción de la interacción hidrofóbica del soluto con el IL. Por lo tanto, los rendimientos de separación varían en función de la estructura molecular del éster de aroma y su interacción con la red del SLIL [14].

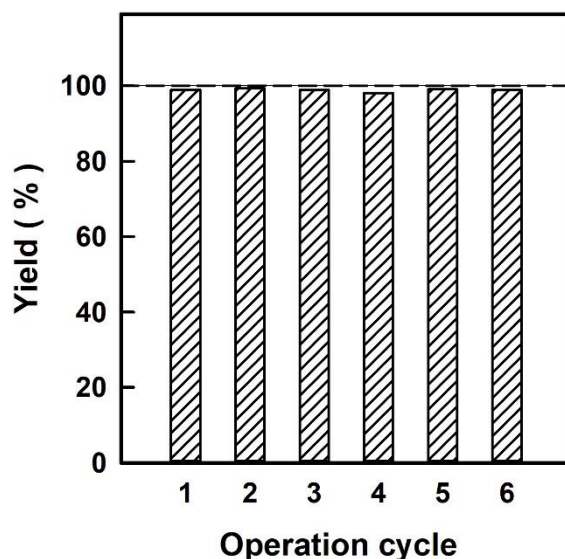
#### **4.5.2. Reutilización del sistema SLIL/biocatalizador**

En este capítulo se ha propuesto un protocolo cíclico que integra tanto la síntesis biocatalítica y la separación del propionato de cinamilo como la recuperación y reutilización del sistema biocatalizador/SLIL (**Figura 8**). Para ello, en primer lugar se llevó a cabo la etapa biocatalítica mediante la adición de una mezcla de ácido propiónico/alcohol de cinamilo (2:3 mol:mol) a la correspondiente cantidad de  $[C_{16}tma][NTf_2]$  (50% m/m con respecto a la masa total de los sustratos) y de biocatalizador. Posteriormente, el sistema se incubó durante 24 horas a 50 °C en agitación. Seguidamente se llevó a cabo la etapa de separación mediante enfriamiento del medio de reacción a – 20 °C durante 3 horas y la mezcla se centrifugó utilizando un filtro de nylon de 0.2  $\mu m$  de tamaño de poro, permitiendo la recuperación sencilla del éster de aroma en la parte inferior del vial. Finalmente, la fase sólida se sometió a vacío para eliminar cualquier resto de sustratos o productos retenidos, obteniendo el sistema Novozyme<sup>®</sup> 435/ $[C_{16}tma][NTf_2]$  listo para ser reutilizado en un nuevo ciclo de producción.



**Figura 8.** Esquema del protocolo cíclico para la producción de propionato de cinamilo mediante la esterificación de ácido propiónico con alcohol de cinamilo catalizada por Novozyme® 435 en  $[C_{16}tma][NTf_2]$  (50% m/m) a 50 °C, incluyendo la recuperación y reutilización del sistema biocatalizador/SILIL (ver sección 3.6) [10].

Siguiendo el protocolo cíclico descrito (ver sección 3.6.) se demostró la idoneidad de sistema Novozyme® 435/ $[C_{16}tma][NTf_2]$  durante seis ciclos operacionales de síntesis/separación, ya que no se mostró pérdida significativa de actividad enzimática (Figura 9). De esta forma, se demuestra una vez más, la capacidad de los SLILs para preservar la actividad enzimática en medios no acuosos y permitir la separación de los productos mediante un procedimiento sencillo y limpio. Además, cabe destacar que el propionato de cinamilo obtenido tras cada ciclo operacional de síntesis/separación está libre de cualquier resto de ácido propiónico, obteniéndose una mezcla de propionato de cinamilo (aproximadamente 0.763 g/mL) en alcohol de cinamilo que tiene aplicación directa en la industria cosmética.



**Figura 9.** Estabilidad operacional del sistema Novozyme® 435/[C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] en la producción de propionato de cinamilo mediante esterificación directa de ácido propiónico con alcohol de cinamilo (2:3 mol:mol) durante 24 horas de reacción a 50 °C [10].

## 5. CONCLUSIONES

---

El trabajo desarrollado en este capítulo presenta un protocolo de producción biocatalítica de diferentes ésteres de aromas mediante esterificación directa de ácidos carboxílicos con alcoholes en SLILs, proporcionando productos prácticamente libres de ILs (pureza >99%) y rendimientos superiores al 95% en todos los casos estudiados. La obtención de estos resultados ha sido posible gracias a las propiedades únicas de los ILs hidrofóbicos, compuestos por la combinación de cationes de larga longitud de cadena alquílica y el anión [NTf<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, que proporcionan un excelente microambiente a la lipasa B de *Candida antarctica* para que pueda llevar con éxito su actividad catalítica. Además, se ha confirmado la capacidad de los SLILs para estabilizar enzimas, ya que la actividad catalítica del sistema [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>]/Novozyme® 435 se mantuvo constante durante seis ciclos operacionales de síntesis/separación de ésteres de aromas.

El comportamiento tipo esponja de estos ILs permitió desarrollar un protocolo para la separación limpia de los ésteres de aromas sintetizados mediante sencillos pasos de enfriamiento/centrifugación, empleando filtros de membrana en la etapa de centrifugación. Este protocolo se puede considerar a nivel industrial como una alternativa muy interesante a los procesos de extracción convencionales (p. ej. extracción líquido-



líquido con disolventes orgánicos), ya que permite la obtención de productos prácticamente libres de IL, mientras que el sistema SLIL/biocatalizador se puede reutilizar en procesos de síntesis posteriores.

A la vista de los resultados obtenidos, la metodología propuesta apunta hacia una nueva vía de producir de manera sostenible aromas y fragancias “naturales” a nivel industrial, ya que se emplean sustratos obtenidos de fuentes renovables y en el proceso de síntesis participa un biocatalizador.

## 6. REFERENCIAS

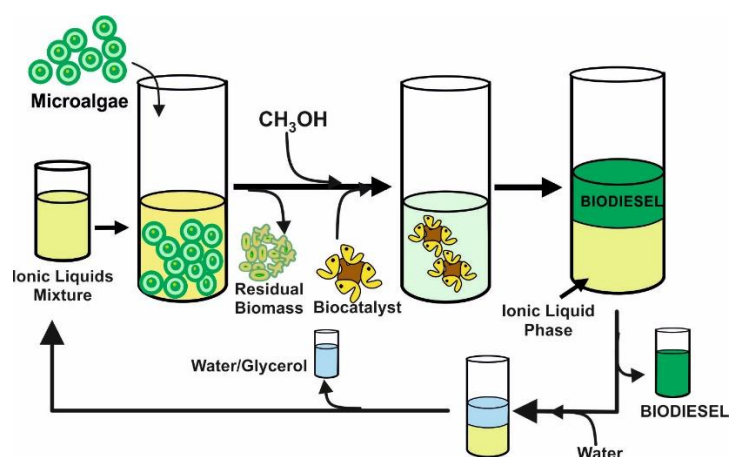
---

- [1] N. R. Khan, V. K. Rathod. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. *Process Biochem.*, **2015**, 50, 1793-1806.
- [2] BCC Research. Global markets for flavors and fragrances, CHM034E, **2016**.
- [3] A. G. A. Sa, A. C. de Meneses, P. H. H. de Araujo, D. de Oliveira. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. *Trends Food Sci. Technol.*, **2017**, 69, 95-105.
- [4] Council of the European Union. Council directive 88/388/EEC of 22 June 1988 on the approximation of the laws of the member states relating to flavourings for use in foodstuffs and to source materials for their production, 88/388/EEC, **1998**.
- [5] U.S. Food and Drug Administration. *Code of Federal Regulations - Title 21 - Food and Drugs*, 21CFR101.22, **1985**.
- [6] R. C. Rodrigues, C. Ortiz, R. Ferna, C. Ortiz. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 6290-6307.
- [7] P. Lozano, J. M. Bernal, S. Nieto, C. Gomez, E. Garcia-Verdugo, S. V Luis. Active biopolymers in green non-conventional media: A sustainable tool for developing clean chemical processes. *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 17361-17374.
- [8] R. A. Sheldon, J. M. Woodley. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. *Chem. Rev.*, **2018**, 118, 801-838.
- [9] P. Lozano, J. M. Bernal, E. Garcia-Verdugo, G. Sanchez-Gomez, M. Vaultier, M. I. Burguete, S. V. Luis. Sponge-like ionic liquids: A new platform for green biocatalytic chemical processes. *Green Chem.*, 2015, 17, 3706-3717.
- [10] E. Alvarez, J. Rodriguez, R. Villa, C. Gomez, S. Nieto, A. Donaire, P. Lozano. Clean enzymatic production of flavour esters in spongelike ionic liquids. *ACS Sust. Chem. Eng.*, **2019**, 7, 13307-13314.
- [11] A. G. A. Sa, A. C. de Meneses, L. A. Lerin, P. H. H. de Araujo, C. Sayer, D. de Oliveira. Biocatalysis of aromatic benzyl-propionate ester by different immobilized lipases. *Bioproc. Biosys. Eng.*, **2018**, 41, 585-591.
- [12] G. V Waghmare, A. Chatterji. Kinetics of enzymatic synthesis of cinnmyl butyrate by

- immobilized lipase. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2017**, 183, 792–806.
- [13] P. Lozano. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. *Green Chem.*, **2010**, 12, 555-569.
- [14] P. Lozano, J. M. Bernal, C. Gomez, E. Garcia-Verdugo, M. I. Burguete, G. Sanchez, M. Vaultier, S. V. Luis. Green bioprocesses in sponge-like ionic liquids. *Catal. Today*, **2015**, 255, 54-59.
- [15] P. Lozano, J. M. Bernal, A. Navarro. A clean enzymatic process for producing flavour esters by direct esterification in switchable ionic liquid/solid phases. *Green Chem.*, **2012**, 14, 3026-3033.
- [16] P. Lozano, J. M. Bernal, M. Vaultier. Towards continuous sustainable processes for enzymatic synthesis of biodiesel in hydrophobic ionic liquids/supercritical carbon dioxide biphasic systems. *Fuel*, **2011**, 90, 3461-3467.
- [17] J. Dupont. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2004**, 15, 341-350.
- [18] J. Dupont. From molten salts to ionic liquids: A ‘nano’ journey. *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 1223-1231.

## CAPÍTULO VI

# “Diseño de un proceso integrado de síntesis enzimática y separación de biodiesel a partir de microalgas en líquidos iónicos tipo esponja”



*“Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano”*

*Isaac Newton*

Los resultados mostrados en este capítulo se recogen en la siguiente publicación científica:

P. Lozano, J. M. Bernal, C. Gomez, **E. Alvarez**, B. Markiv, E. García-Verdugo, S.V. Luis. Green biocatalytic synthesis of biodiesel from microalgae in one-pot systems based on sponge-like ionic liquids, *Catal. Today*, **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2019.01.073>



## 1. RESUMEN

---

En este capítulo se describe por primera vez el diseño de un protocolo integral que abarca desde la extracción de aceite de microalgas hasta síntesis *in situ* de biodiesel en mezclas binarias de ILs, así como la recuperación y reutilización de la mezcla de ILs y del biocatalizador. Las mezclas de ILs empleadas se basan en la combinación de SLILs (p. ej. 1-hexadecil-3-metilimidazolio bis (trifluorometilsulfonil)imida, [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]) con el IL cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio ([Bmim][Cl]), debido a la idoneidad de los primeros para llevar a cabo la síntesis biocatalítica de biodiesel y la capacidad del [Bmim][Cl] para disolver la biomasa.

En este trabajo, la extracción de aceite de alga se llevó a cabo incubando la microalga (*Chlorella vulgaris* o *Chlorella protothecoides*) deshidratada en la mezcla de ILs apropiada a 110 °C. Posteriormente, la mezcla de ILs con el aceite extraído, se enfrió a 60 °C permitiendo la transformación a biodiesel, gracias a la acción de una lipasa inmovilizada. Esta metodología obtuvo rendimientos de síntesis del 100% en 2 horas de reacción. Tras un sencillo paso de enfriamiento del medio de reacción a temperatura ambiente, y centrifugaciones consecutivas a 20 y 18 °C, se consiguió separar el biodiesel líquido de la mezcla de ILs. La mezcla de ILs y el biocatalizador se recuperaron y reutilizaron en posteriores ciclos operacionales.

## 2. INTRODUCCIÓN

---

El biodiesel está compuesto por ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs, del inglés, *Fatty Acid Methyl Esters*) y se caracteriza porque su obtención se lleva a cabo a partir de fuentes renovables (p. ej. aceites vegetales, grasas, etc.) mediante transesterificación catalítica con alcoholes primarios (p. ej. metanol). Debido a que el biodiesel se puede emplear directamente en motores de diésel convencional sin necesidad de llevar a cabo ninguna modificación, se ha convertido en una de las mejores alternativas al empleo de combustibles fósiles [1]. Sin embargo, su producción a nivel industrial debe llevarse a cabo a partir de procedimientos limpios y verdes y a partir de fuentes o residuos no comestibles (p. ej. desechos de aceite cocinado, microalgas, etc.). Estos criterios suponen un importante reto para producción sostenible de biodiesel [2], ya que el empleo de aceites comestibles (p. ej. aceite de oliva, aceite de semillas, etc.) en la producción de biodiesel

afecta al mercado de la alimentación, incrementándose el precio de los alimentos que los contienen [3]. Además, la síntesis de biodiesel se lleva a cabo con éxito a nivel industrial mediante catálisis química, principalmente empleando catalizadores alcalinos (p. ej. hidróxido potásico). En estos procesos, las reacciones secundarias indeseadas (p. ej. formación de jabones), la necesidad de recuperar el glicerol y la eliminación de sales inorgánicas son aún un gran problema, ya que no solo afectan al rendimiento de la reacción, sino que suponen un consumo elevado de agua y energía [4].

Con el objetivo de solventar los problemas mencionados, las enzimas se muestran como una alternativa muy interesante en la síntesis biocatalítica de biodiesel mediante metanólisis de triglicéridos, debido a la elevada actividad y selectividad que han mostrado muchas de ellas [5,6]. Sin embargo, tal y como se comenta en el **Capítulo II** de esta memoria, uno de los principales inconvenientes del empleo de biocatalizadores en esta síntesis es su baja estabilidad operacional, dificultando la explotación de esta alternativa a escala industrial. La pérdida de actividad del biocatalizador se produce principalmente a causa de la inmiscibilidad de los triglicéridos y el metanol, que forman un sistema bifásico en el cual se favorece la interacción de la enzima con el metanol. Como consecuencia, el metanol actúa desnaturalizando la proteína y, por tanto, la enzima pierde su actividad. Además, los productos finales de la reacción son el biodiesel y el glicerol (generado como subproducto), que tampoco son miscibles, adsorbiéndose el glicerol sobre la enzima inmovilizada, promoviendo la desactivación de la misma [7,8].

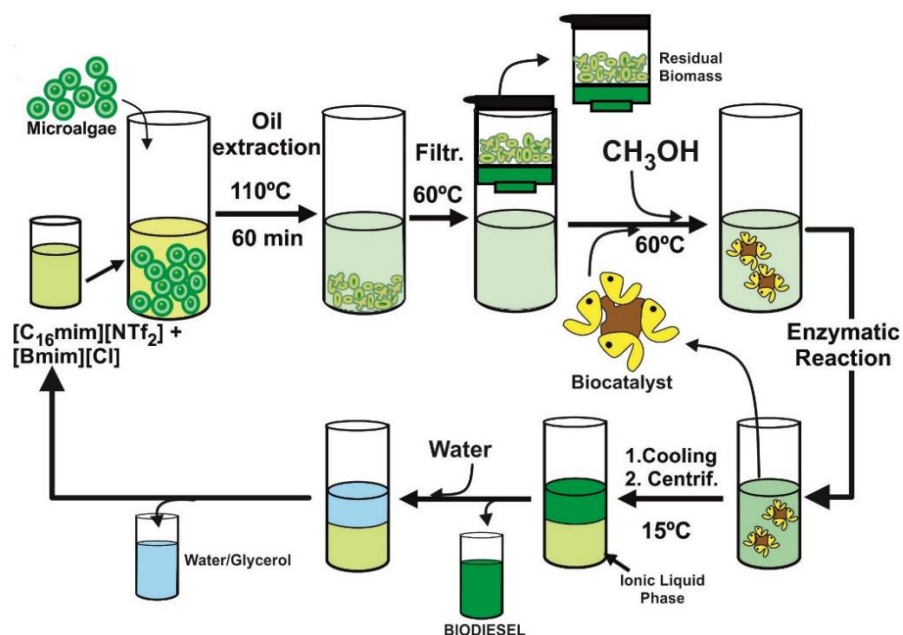
En este sentido, se ha descrito el empleo SLILs (p. ej.  $[C_{16}mim][NTf_2]$ ) como medio de reacción en la síntesis de biodiesel catalizada por una lipasa, obteniéndose rendimientos de síntesis del 100%. Cabe destacar el papel de estos ILs en la estabilización de la actividad enzimática, habiéndose obtenido un tiempo de vida media de 1370 días a 60 °C [9-13]. Estos resultados se han atribuido a la excelente capacidad de estos ILs para disolver tanto el metanol como los aceites vegetales, favoreciendo la formación de un medio de reacción monofásico, donde la enzima no está en contacto directo con elevadas concentraciones de metanol [14]. Además, en el **Capítulo II** de esta memoria se ha descrito cómo la adición de agua, combinada con centrifugaciones iterativas a temperatura controlada, conduce a la separación total del biodiesel producido [13,15].

Para la producción sostenible de biodiesel, un aspecto fundamental es el empleo de fuentes renovables como materiales de partida. En este sentido, las microalgas, debido a

su alto contenido en lípidos (superior a 90% del peso en seco para algunas especies) suponen una fuente de partida muy interesante [2]. Sin embargo, la extracción del aceite de microalgas actualmente supone un gran reto, debido a la dificultad de romper la pared celular de las mismas. Para ello, hasta el momento se han empleado diferentes técnicas, entre las que destacan: el empleo de disolventes orgánicos, microondas, ultrasonidos y  $scCO_2$ , entre otros [16-18]. Por otro lado, debido a la capacidad de algunos ILs, como el [Bmim][Cl] para disolver la celulosa [19], se ha considerado el empleo de ILs hidrofílicos para desarrollar métodos de extracción de aceite de microalgas [20-22]. No obstante, la combinación de la extracción del aceite de microalgas a través de la lisis celular con la consiguiente transformación *in situ* de este aceite en biodiesel constituye uno de los enfoques más interesantes de la aplicación de los ILs [23-25]. Por ejemplo, para la extracción de aceites de microalgas se han empleado ILs hidrofílicos, como el [Bmim][Cl] o el [Emim][MeSO<sub>4</sub>], calentando a elevadas temperaturas (superiores a 200 °C) [23] o mediante la aplicación de microondas [25]. Además, la transformación posterior del aceite en biodiesel catalizada por ILs ácidos (p. ej. hidrogenosulfato de 1-butil-3-metilimidazolio, ([Bmim][HSO<sub>4</sub>]) ha proporcionado, en el mejor de los casos, un 40% de rendimiento de síntesis.

En el trabajo descrito en este capítulo se presenta una aproximación más sostenible para la extracción de aceites de microalgas y su transformación *in situ* en biodiesel, mediante la combinación de una tecnología basada en mezclas binarias de ILs y biocatálisis. Para ello, se han empleado como fuente de partida, dos microalgas (*Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides*) con diferente capacidad de producir y almacenar triglicéridos (20 y 50% m/m, respectivamente) [16-18]. Siguiendo el esquema mostrado en la **Figura 1**, en una primera etapa, se emplearon mezclas de ILs en diferentes proporciones en masa, compuestas por el IL hidrofílico [Bmim][Cl] con SLILs (p. ej. [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]) a 110 °C, para romper la pared celular y extraer el aceite de las microalgas estudiadas. A continuación, se separó la biomasa residual de la mezcla que contenía los ILs y el aceite mediante filtración. La mezcla de ILs con el aceite se utilizó directamente como medio de reacción para la síntesis de biodiesel mediante alcoholisis, catalizada por una lipasa. Tras la reacción, el biodiesel producido se separó de la mezcla de ILs siguiendo un protocolo de enfriamiento y centrifugación [12-13]. Además, el sistema biocatalizador/ILs se pudo recuperar para ser reutilizado en ciclos operacionales

posteriores, demostrándose la idoneidad de la metodología desarrollada como un enfoque más sostenible para la producción de biodiesel a partir de microalgas.



**Figura 1.** Esquema del protocolo cíclico de síntesis biocatalítica y separación de biodiesel en SLIL+[Bmim][Cl], incluyendo la recuperación total y reutilización del sistema formado por la enzima y la mezcla de ILs [26].

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Reactivos

Las microalgas (*Chlorella vulgaris* o *Chlorella protothecoides*) liofilizadas fueron donadas por el Profesor E. Molina-Grima (Grupo de Biotecnología de microalgas marinas, Universidad de Almería, España) y se utilizaron sin previa purificación. El derivado inmovilizado de la lipasa B de *Candida antarctica* (Novozyme<sup>®</sup> 435, EC 3.1.1.3) fue donado por Novozymes S.A. (España). La trioleína (65% pureza), disolventes y otros reactivos fueron suministrados por Sigma-Aldrich-Fluka (España). Los ILs, cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio ([Bmim][Cl]), bis[(trifluoro)metilsulfonyl]imida de 1-tetradecil-3-metilimidazolio, ([C<sub>14</sub>mim][NTf<sub>2</sub>], 99% pureza) y bis[(trifluoro)metilsulfonyl]imida de 1-hexadecil-3-metilimidazolio, ([C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>], 99% pureza), fueron suministrados por IoLiTec GmbH (Alemania).



### 3.2. Extracción del aceite de alga y síntesis *in situ* de biodiesel en líquidos iónicos

Se adicionó 1 gramo de una mezcla de [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]:[Bmim][Cl] en diferentes razones másicas (97.5:2.5, 95:5 y 90:10 m/m, respectivamente) en viales de 4 mL de capacidad con tapón de rosca y septum de silicona-teflón. Posteriormente, se añadieron 0.5 g de polvo de microalga, *Chlorella vulgaris* o *Chlorella protothecoides*, deshidratada. Para cada caso, la suspensión resultante se incubó bajo agitación magnética a 110 °C a tiempos controlados, y se enfrió finalmente a 60 °C. La mezcla líquida resultante, que contenía el aceite de alga y la mezcla de ILs, se separó de la biomasa residual sólida mediante centrifugación (15 min a 15 000 rpm), empleando filtros de nylon de 0.2 µm de tamaño de poro. Además, los residuos de biomasa se lavaron con 1 mL de metanol a 60 °C durante 60 min y se separaron mediante filtración. El metanol se eliminó del filtrado aplicando una corriente de N<sub>2</sub> y la fracción sólida (que contenía un 3% m/m de la mezcla inicial de ILs) se incorporó a la disolución de aceite de alga en las mezclas de ILs. Debido a que el análisis mediante CG-FID del aceite de algas proporciona principalmente triglicéridos, que coinciden con los tiempos de retención de la trioleína, la cuantificación y el rendimiento de extracción de los triglicéridos obtenidos se llevó a cabo mediante empleando la correspondiente recta de calibrado realizada con la trioleína, que se utilizó como estándar.

La síntesis biocatalítica de biodiesel a partir del aceite de alga extraído se llevó a cabo adicionando metanol (razón molar 1:6 aceite de alga:metanol) y Novozyme<sup>®</sup> 435 (18% m/m, con respecto a la cantidad de aceite de alga) a la disolución de aceite de alga en la mezcla de ILs. La mezcla resultante se incubó a 60 °C con agitación orbital (IKA KS4000i, Germany) a 100 rpm. Con el objetivo de obtener el perfil cinético de la reacción, se recogieron alícuotas de 20 µL en intervalos de tiempo regulares y se suspendieron en 480 µL de una disolución de dodecano:isopropanol (95:5 v/v). Las mezclas resultantes se agitaron vigorosamente durante 3 min y se centrifugaron a 15 000 rpm durante 10 min para extraer el biodiesel. Finalmente, se recogieron 350 µL del extracto (fase superior) en dodecano:isopropanol y se añadieron 150 µL de una disolución de dodecano:isopropanol (95:5 v/v) conteniendo 10 mM de decanoato de etilo y 100 mM de tributirina, empleados como estándares. La disolución final se analizó mediante CG-FID. Debido a que el análisis de biodiesel obtenido proporciona principalmente picos de FAMES correspondientes con el tiempo de retención del oleato de metilo, la

cuantificación del biodiesel se llevó a cabo utilizando la recta de calibrado realizada con el estándar de este FAME.

### **3.3. Estabilidad enzimática en mezclas [C<sub>16</sub>mimNTf<sub>2</sub>]/[Bmim][Cl]**

Los estudios de estabilidad enzimática en mezclas binarias de ILs se llevaron a cabo adicionando 50 mg de trioleína (56 μmol) y 0.5 g de mezclas de [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]:[Bmim][Cl] en distintos porcentajes en masa (100:0, 97.5:2.5, 95:5 o 90:10 m/m) en viales de 4 mL de capacidad con tapón de rosca y septum de silicona-teflón. Las mezclas se incubaron en un termobloque a 60 °C durante 30 minutos hasta conseguir una disolución homogénea. Posteriormente, se adicionaron a cada vial 15 mg de Novozyme<sup>®</sup> 435 y las mezclas resultantes se mantuvieron a 60 °C durante 8 días. Se añadieron 11 mg de metanol (336 μL) a cada vial a diferentes tiempos de incubación, comenzando así la síntesis biocatalítica de biodiesel, tal y como se describe en la **sección 3.2** de este capítulo.

### **3.4. Protocolo de separación de biodiesel de las mezclas de líquidos iónicos**

Para llevar a cabo la separación del biodiesel del medio de reacción ([C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]:[Bmim][Cl] (95:5, m/m)) obtenido al finalizar la síntesis biocatalítica a partir de aceite de *Chlorella vulgaris* o *Chlorella protothecoides*, se incubó una muestra de 0.5 g de cada medio de reacción en agitación durante 15 min a 60 °C, hasta obtener un sistema líquido monofásico. Posteriormente, los viales se enfriaron a temperatura ambiente y las mezclas heterogéneas fueron sometidas a tres ciclos de centrifugación consecutivos (temperatura ambiente, 18 y 15 °C) de 50 min cada uno y a 15 000 rpm. Como resultado, en cada caso se obtuvo una fase líquida superior formada por el biodiesel sintetizado y una fase sólida precipitada que contenía la mezcla de ILs. Finalmente, la fase sólida compuesta por ILs se lavó con 0.5 mL de agua para extraer el glicerol producido como subproducto de reacción y la mezcla de ILs se recuperó, mediante centrifugación a 15 °C durante 15 min y 15 000 rpm, para ser reutilizada posteriormente.

### **3.5. Estabilidad operacional de Novozyme<sup>®</sup> 435 en mezclas compuestas por aceite de alga y líquidos iónicos**

Para llevar a cabo el estudio de estabilidad operacional del biocatalizador Novozyme<sup>®</sup> 435 en la síntesis de biodiesel, se preparó un medio de reacción estándar a partir del aceite extraído de microalgas y en mezclas de ILs, tal y como se describe a continuación. En

primer lugar, se incubó una mezcla de 4.75 g de  $[C_{16}mim][NTf_2]$  y 0.25 g de  $[Bmim][Cl]$  (95:5, m/m) durante 10 min a 100 °C, hasta obtener una disolución monofásica. Posteriormente, se añadieron 2.5 g de microalga *Chlorella protothecoides* y la suspensión resultante se agitó magnéticamente a 110 °C durante 24 h, para extraer los lípidos del alga. La suspensión se enfrió a 60 °C, se mezcló con 675  $\mu$ L de metanol (16.7 mmol, razón molar aceite:metanol 1:6, mol:mol) y se agitó durante 10 min. La fracción líquida resultante, que contenía el aceite de alga en disolución con metanol y la mezcla de ILs (50% m/m) fue separada de la biomasa sólida mediante centrifugación (15 000 rpm, 15 min a 60 °C) en membranas de nylon de 0.2  $\mu$ m de tamaño de poro. La fracción filtrada se utilizó directamente como medio para la síntesis biocatalítica de biodiesel en diferentes ciclos operacionales consecutivos.

Para cada ciclo operacional, siguiendo el protocolo descrito en la **sección 3.2**, se mezcló 1 g del medio de reacción con 100 mg de Novozyme<sup>®</sup> 435, comenzando así la reacción biocatalítica. Las mezclas se incubaron en agitación orbital (IKA KS4000i, Germany) a 1000 rpm y 60 °C durante 24 horas. Posteriormente, la enzima inmovilizada se separó del medio de reacción mediante centrifugación empleando filtros de nylon de 0.2  $\mu$ m de tamaño de poro, y centrifugando 15 min a 15 000 rpm. La enzima filtrada se lavó con *t*-butanol y se recuperó para ser reutilizada en el siguiente ciclo operacional.

### 3.6. Análisis mediante cromatografía de gases

El análisis de las muestras de biodiesel mediante CG se llevó a cabo en un cromatógrafo Shimadzu GC-2010 (Shimadzu Europa, Alemania) equipado con un detector FID y un inyector automático. Las muestras (1  $\mu$ L, 20 mM FAMES) se analizaron sin previa derivatización en una columna capilar TRB-Biodiesel (10 m x 0.28 mm x 0.1  $\mu$ m, Teknokroma, España), usando tributirina y decanoato de etilo como estándar interno bajo las siguientes condiciones: gas portador (He) a 28.6 kPa (flujo total: 40 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>); programa de temperatura: 100 °C, 10 °C $\cdot$ min<sup>-1</sup>, 200 °C, 15 °C $\cdot$ min<sup>-1</sup>, 370 °C; relación de separación variable (10:1); detector, 380 °C [12,26].

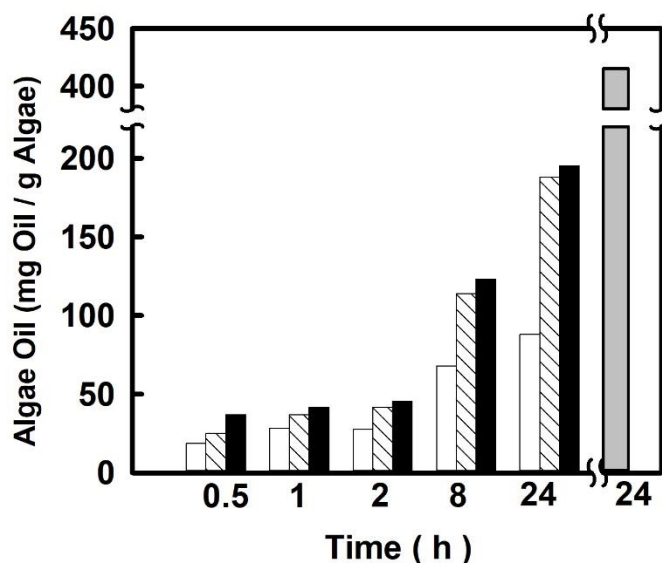
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 4.1. Extracción del aceite de alga con líquidos iónicos

Teniendo en cuenta la capacidad del [Bmim][Cl] para disolver la celulosa bajo condiciones anhídridas y temperaturas superiores a 100 °C [19,27] y la idoneidad demostrada de los SLILs (p. ej. [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]) para la disolución de triglicéridos [11,15], se estudió la capacidad de diferentes mezclas de estos ILs para romper la pared celular de las algas estudiadas y extraer los triglicéridos. Para realizar este estudio se siguió el protocolo de extracción de aceite de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides* descrito en la **sección 3.2.** de este capítulo.

En la **Figura 2** se muestra que el [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>] fue capaz de extraer una pequeña cantidad de triglicéridos del alga *Chlorella vulgaris*, aumentando el rendimiento al incrementarse el tiempo de incubación (p. ej. 87 mg/g(alga) en 24 h). Sin embargo, la presencia de un pequeño porcentaje (p. ej. 5 o 10% m/m de [Bmim][Cl] en el medio de extracción, [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>], dio lugar a un incremento muy significativo en el rendimiento de extracción del aceite (188 y 195 mg/g(alga) en 24 horas para 5 y 10% m/m de [Bmim][Cl], respectivamente). En el caso del alga *Chlorella protothecoides*, en la extracción del aceite con [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>] conteniendo un 5% (m/m) de [Bmim][Cl] durante 24 horas a 110 °C, se obtuvo un rendimiento de 415 mg/g(alga), comparable con los obtenidos a través de extracción con disolventes orgánicos [26,28].



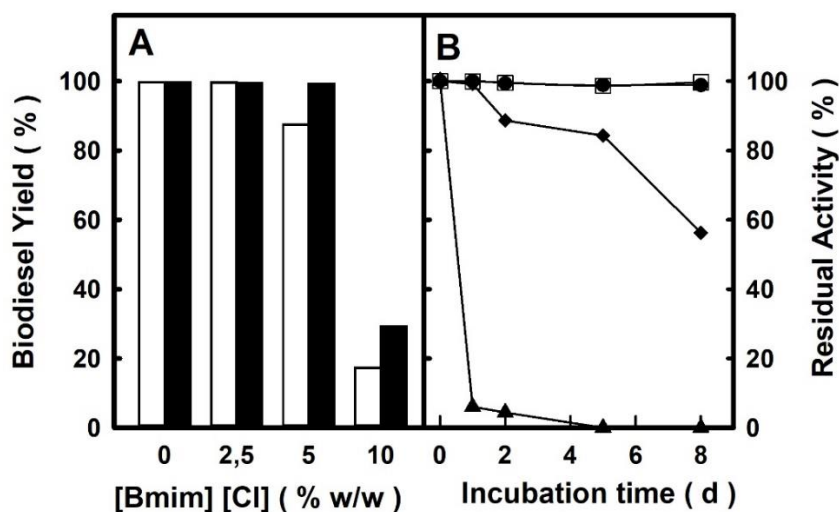
**Figura 2.** Perfil obtenido para la extracción de aceite de *Chlorella vulgaris* empleando mezclas de [Bmin][Cl] (0, blanco; 5, rallado; 10% (m/m), negro) en [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>] como medio de extracción a 110 °C. La barra gris representa el rendimiento de extracción de aceite de *Chlorella protothecoides* empleando una mezcla de [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>] conteniendo un 5% (m/m) de [Bmin][Cl] como medio de extracción, después de 24 horas a 110 °C [26].

El empleo de los ILs como medio de extracción alternativo a los disolventes orgánicos en procesos de extracción de aceite de algas ha sido ampliamente estudiado. A modo de ejemplo, Kim et al. [29] consiguieron un rendimiento de extracción de aceite de *Chlorella vulgaris* del 19% (m/m) tras el tratamiento del alga con una mezcla de metanol conteniendo un 50% (v/v) de un IL hidrofílico ([Bmim][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]) durante 18 horas a 60 °C. En otro estudio, este mismo grupo obtuvo resultados similares (200.6 mg/g(alga)) al emplear una mezcla de ILs (hidrogenosulfato de 1-etil-3-metilimidazolio y tiocianato de 1-etil-3-metilimidazolio 50:50 v/v) [22], demostrándose así la idoneidad de los ILs hidrofílicos en la ruptura de la pared celular. Sin embargo, el principal inconveniente de estos ILs en biocatálisis recae en que promueven la desactivación de las enzimas, al retirar las moléculas de agua que componen el microambiente esencial de las mismas [5,9].

#### 4.2. Síntesis biocatalítica de biodiesel a partir de aceite algas en líquidos iónicos

Siguiendo el protocolo descrito en la **sección 3.2.** se evaluó la idoneidad de la combinación de los SLILs, [C<sub>14</sub>mim][NTf<sub>2</sub>] y [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>], con el IL hidrofílico [Bmim][Cl], como medio de reacción para la síntesis biocatalítica de biodiesel. Para ello, se estudió como sistema modelo la síntesis de biodiesel a partir de trioleína y metanol en

diferentes mezclas de ILs formadas por un SLIL ( $[C_{14}mim][NTf_2]$  y  $[C_{16}mim][NTf_2]$ ) y diferentes proporciones en peso de  $[Bmim][Cl]$ . En la **Figura 3A** se muestra el rendimiento de síntesis de biodiesel después de 8 horas de reacción para las mezclas obtenidas con los dos SLILs estudiados, en función de la concentración de  $[Bmim][Cl]$ . Como se puede observar, tanto el  $[C_{14}mim][NTf_2]$  como el  $[C_{16}mim][NTf_2]$  demostraron ser excelentes medios de reacción para la síntesis de oleato de metilo (biodiesel) catalizada por Novozyme<sup>®</sup> 435, obteniéndose rendimientos de síntesis del 100% en ausencia de  $[Bmim][Cl]$ . Estos resultados coinciden con datos publicados previamente [30]. Sin embargo, la presencia de  $[Bmim][Cl]$  en el medio de reacción afectó negativamente a la actividad enzimática, dando lugar a la caída del rendimiento de producción de biodiesel a medida que la concentración de este IL aumentaba en el medio. No obstante, se observó que este efecto negativo del  $[Bmim][Cl]$  sobre la actividad enzimática era más débil cuando se combinaba con el IL más hidrofóbico ( $[C_{16}mim][NTf_2]$ ).



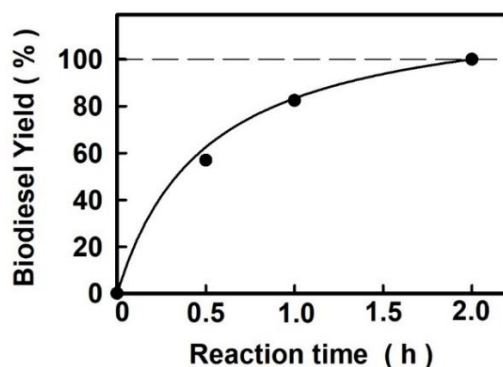
**Figura 3.** A) Influencia del contenido de  $[Bmim][Cl]$  en  $[C_{14}mim][NTf_2]$  (blanco) y  $[C_{16}mim][NTf_2]$  (negro), en el medio de reacción para la síntesis de biodiesel catalizada por una lipasa inmovilizada mediante metanólisis de la trioleína durante 8 horas a 60 °C; B) Perfiles de actividad residual de Novozyme<sup>®</sup> 435 en la síntesis biocatalítica de biodiesel tras su incubación en mezclas  $[C_{16}mim][NTf_2]:[Bmim][Cl]$  (●, 100:0; □, 97.5:2.5; ◆, 95:5; ▲, 90:10 m/m) conteniendo trioleína (3.73  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  enzima inmovilizada en una mezcla de ILs 80% m/m), a 60 °C [26].

Por otro lado, para escalar el proceso de síntesis de biodiesel a nivel industrial, es fundamental garantizar la estabilidad y reciclabilidad de los biocatalizadores. Por ello, se evaluó la influencia de la concentración de  $[Bmim][Cl]$  presente en el medio de reacción ( $[C_{16}mim][NTf_2]$ ) sobre la estabilidad del biocatalizador empleado en la síntesis de

biodiesel. La **Figura 3B** muestra el perfil de actividad residual de la lipasa inmovilizada (Novozyme<sup>®</sup> 435) a diferentes tiempos de incubación en disoluciones de trioleína/[C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]:Bmim][Cl] a 60 °C, observándose claramente la influencia negativa del IL hidrofílico a elevadas concentraciones (p. ej. 5 y 10% m/m). De hecho, aunque se ha demostrado que los SLILs, como el [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>], son excelentes estabilizantes de la actividad catalítica [12,31], la presencia simultánea de un 10% (m/m) de [Bmim][Cl] condujo a la desactivación total de la enzima tras un día de incubación a 60 °C. Sin embargo, en ausencia o presencia de una concentración muy pequeña (p. ej. 2.5% m/m) de [Bmim][Cl] la actividad catalítica de la enzima no se vio prácticamente afectada.

Por ello, teniendo en cuenta el papel que juega el [Bmim][Cl] en la ruptura de la pared celular de las algas y los rendimientos de extracción de aceite obtenidos (ver **sección 4.1**), así como el poder que éste IL tiene para desactivar enzimas, se seleccionó una mezcla de [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]:[Bmim][Cl] (95:5 m/m) como sistema óptimo para llevar a cabo la extracción de aceite de alga y su biotransformación *in situ* en biodiesel. Con este sistema se estudió el perfil cinético en la síntesis de biodiesel catalizada por una lipasa inmovilizada (Novozyme<sup>®</sup> 435), mediante transesterificación de aceite extraído de *Chlorella protothecoides* con metanol a 60 °C. En la **Figura 4** se muestra el continuo incremento en el rendimiento de producción de biodiesel con el tiempo, hasta alcanzar la transformación total del aceite extraído después de 2 horas de reacción.

Los resultados obtenidos destacan la idoneidad de esta mezcla de ILs como medio de reacción para síntesis biocatalítica de biodiesel, mejorando los resultados obtenidos cuando solo se emplean ILs anfífilicos (p. ej. cloruro de 1-octil-3(propil-3-sulfonil)imidazolio) [23].



**Figura 4.** Perfil cinético obtenido en la síntesis de biodiesel mediante transesterificación de aceite de *Chlorella protohecooides* con metanol en una mezcla binaria (80% m/m) de  $[C_{16}mim][NTf_2]:[Bmim][Cl]$  (95:5 m/m) catalizada por Novozyme<sup>®</sup> 435 a 60 °C [26].

#### 4.3. Producción cíclica de biodiesel a partir de algas mediante biocatálisis en líquidos iónicos tipo esponja

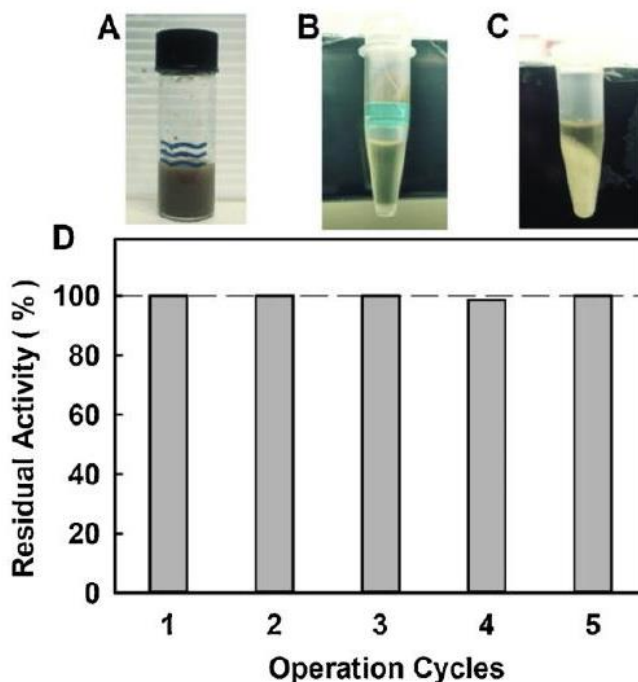
Un aspecto clave en la producción de biodiesel a nivel industrial es el abaratamiento de los costes, mediante la recuperación y reutilización de todos los componentes del sistema que participan en el proceso. En este sentido, los SLILs, como es el  $[C_{16}mim][NTf_2]$ , permiten la separación total del biodiesel mediante sencillos pasos de centrifugación/filtración del sistema sólido obtenido tras enfriar el medio de reacción [12-14,31].

Por ello, en este capítulo se ha desarrollado un protocolo cíclico que integra la extracción de aceite de algas y la transformación biocatalítica *in situ* en biodiesel, así como la extracción del biodiesel producido y la recuperación y reutilización del sistema biocatalizador/IL ( $[C_{16}mim][NTf_2]:[Bmim][Cl]$ , 95:5 m/m) ( ver **Figura 1**).

La **Figura 5A** muestra el sistema heterogéneo formado por la biomasa residual del alga, tras el proceso de extracción del aceite. Esta suspensión se filtró mediante centrifugación en membranas de nylon de 0.2  $\mu m$  de tamaño de poro, permitiendo la separación del aceite de alga en la mezcla de IL, quedando la biomasa residual retenida en el filtro centrífugo (**Figura 5B**). El aceite filtrado se utilizó directamente en la síntesis biocatalítica de biodiesel (ver **sección 3.2**). Tras la reacción biocatalítica, se separó el biocatalizador inmovilizado mediante decantación, para su reutilización en el siguiente ciclo operacional. Teniendo en cuenta la peculiaridad de los SLILs para cambiar de estado



líquido a sólido con la temperatura, manteniendo los productos en su red iónica, se llevó a cabo la separación del biodiesel siguiendo el protocolo de enfriamiento/centrifugación descrito en la **sección 3.4**. Se observó que tras enfriar a temperatura ambiente (p.f. [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>], 46 °C) el medio de reacción solidificaba, permitiendo la separación del biodiesel sintetizado de la mezcla de ILs (**Figura 5C**).



**Figura 5.** **A)** Suspensión de *Chlorella protothecoides* tras la extracción del aceite en [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]:[Bmim][Cl] (95:5 m/m) a 110 °C durante 24 horas; **B)** Disolución del aceite de alga en la mezcla de ILs tras filtrar el medio obtenido en A, en filtros centrífuga de nylon (0.2 μm de tamaño de poro); **C)** Separación del biodiesel sintetizado de la mezcla de ILs mediante centrifugaciones iterativas (15 000 rpm, 30 min) a temperatura ambiente, 20 y 18 °C, respectivamente. **D)** Reutilización del biocatalizador Novozyme® 435 en ([C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]:[Bmim][Cl] (95:5 m/m) durante 5 ciclos operacionales de producción de biodiesel mediante metanólisis del aceite de *Chlorella protothecoides*, incluyendo la síntesis biocatalítica seguida de la separación del producto para cada ciclo operacional (ver **Figura 1**). La enzima inmovilizada se lavó con *t*-butanol después de cada ciclo para eliminar el glicerol adsorbido en su superficie (ver **Sección 3.5**) [26].

Por lo tanto, en este capítulo se ha desarrollado un protocolo cíclico que integra la extracción del aceite de dos algas y su transformación biocatalítica en biodiesel en una mezclas de [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>]:[Bmim][Cl] (95:5, m/m), así como la separación del biodiesel y recuperación del sistema biocatalizador/ILs. En la **Figura 5D**, se observa que el sistema propuesto permitió la conversión total del aceite extraído de *Chlorella protothecoides* en biodiesel durante cinco ciclos operacionales de síntesis/separación

consecutivos. No obstante, es necesario tener en cuenta que el glicerol generado como subproducto de reacción da lugar a un continuo envenenamiento del biocatalizador [12]. Por ello, las partículas de enzima inmovilizada se lavaron con *t*-butanol antes de ser reutilizadas en el siguiente ciclo biocatalítico.

La idoneidad del protocolo desarrollado recae en la excelente estabilidad operacional del biocatalizador inmovilizado puede deberse principalmente al efecto protector que ejerce el IL hidrofóbico frente a la desactivación que ejerce el [Bmim][Cl]. Además, con la metodología propuesta se ha conseguido recuperar totalmente y reutilizar el sistema biocatalizador/ILs.

## **5. CONCLUSIONES**

---

El trabajo descrito en el presente capítulo muestra una estrategia para la extracción de triglicéridos de algas y su consiguiente biotransformación *in situ* en biodiesel, empleando como medio de extracción/reacción una mezcla binaria compuesta por el SLIL [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>] y el IL hidrofílico [Bmim][Cl]. La mezcla de ILs seleccionada combina la capacidad del [Bmim][Cl] para disolver celulosa con la idoneidad de los ILs hidrofóbicos compuestos por el anión [NTf<sub>2</sub>]<sup>-</sup> y cationes de larga longitud de cadena alquílica, para proporcionar excelentes medios de reacción para la síntesis de biodiesel.

De esta forma, se ha conseguido la síntesis de biodiesel con rendimientos del 100% en 2 horas de reacción a 60 °C. Además, gracias al comportamiento tipo esponja del [C<sub>16</sub>mim][NTf<sub>2</sub>], se ha llevado a cabo la separación del biodiesel producido mediante un protocolo sencillo y limpio de enfriamiento y centrifugación del medio de reacción, recuperando sistema biocatalizador/ILs. También se ha demostrado que el sistema formado por el biocatalizador inmovilizado y la mezcla de ILs es estable durante cinco ciclos operacionales de extracción de aceite/síntesis biocatalítica/separación.

De esta forma queda demostrada una vez más que las excelentes propiedades de los ILs, en combinación con el empleo de biocatalizadores, proporcionan una alternativa muy interesante para la síntesis de biodiesel a partir de biomasa, dando un paso más en el desarrollo de métodos sostenibles para la obtención de biodiesel a nivel industrial.

## 6. REFERENCIAS

---

- [1] I. Ambat, V. Srivastava, M. Sillanpaa. Recent advancement in biodiesel production methodologies using various feedstock: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **2018**, 90, 356-369.
- [2] R. Sakthivel, K. Ramesh, R. Purnachandran, P.M. Shameer. A review on the properties, performance and emission aspects of the third generation biodiesel. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **2018**, 82, 2970-2992.
- [3] T. Mathimani, N. Mallick. A comprehensive review on harvesting of microalgae for biodiesel: Key challenges and future directions. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **2018**, 91, 1103-1120.
- [4] I. M. Atadashi, M. K. Aroua, A. R. A. Aziz, N. M. N. Sulaiman. Refining technologies for the purification of crude biodiesel. *Appl. Energy*, **2011**, 88, 4239-4251.
- [5] J. M. Bernal, P. Lozano, E. Garcia-Verdugo, M.I. Burguete, G. Sanchez-Gómez, G. Lopez-Lopez, M. Pucheault, M. Vaultier, S. V. Luis. Supercritical synthesis of biodiesel. *Molecules*, **2012**, 17, 8696-8719.
- [6] P. Lozano, J. M. Bernal, S. Nieto, C. Gomez, E. Garcia-Verdugo, S. V Luis. Active biopolymers in green non-conventional media: A sustainable tool for developing clean chemical processes. *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 17361-17374.
- [7] M. Lotti, J. Pleiss, F. Valero, P. Ferrer. Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. *Biotechnol. J.*, **2015**, 10, 22-30.
- [8] P. Lozano, E. Garcia-Verdugo, J. M. Bernal, D. F. Izquierzo, M. I. Burguete, G. Sanchez-Gomez, S. V. Luis. Immobilised lipase on structured supports containing covalently attached ionic liquids for the continuous synthesis of biodiesel in scCO<sub>2</sub>. *ChemSusChem*, **2012**, 5, 790-798.
- [9] P. Lozano. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. *Green Chem.*, **2010**, 12, 555-569.
- [10] J. Dupont. From molten salts to ionic liquids: A 'nano' journey. *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 1223-1231.
- [11] P. Lozano, J. M. Bernal, R. Piamtongkam, D. Fetzer, M. Vaultier. One-phase ionic liquid reaction medium for biocatalytic production of biodiesel. *ChemSusChem*, **2010**, 3, 1359-1363.
- [12] P. Lozano, B. Bernal, J. M. Bernal, G. Sanchez-Gomez, G. Lopez-Lopez, M. Vaultier. How to produce biodiesel easily using a green biocatalytic approach in sponge-like ionic liquids. *Energ. Environ. Sci.*, **2013**, 6, 1328-1338.
- [13] P. Lozano, C. Gomez, A. Nicolas, R. Polo, S. Nieto, J. M. Bernal, E. Garcia-Verdugo, S. V. Luis. Clean enzymatic preparation of oxygenated biofuels from vegetable and waste cooking oils by using spongelike ionic liquids technology. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2016**, 4, 6125-6132.
- [14] J. Dupont, P. A. Z. Suarez, M .R. Meneghetti, S. M. P. Meneghetti. Catalytic production of biodiesel and diesel-like hydrocarbons from triglycerides. *Energy Environ. Sci.*, **2009**, 2, 1258-1265.

- [15] P. Lozano, J. M. Bernal, E. Garcia-Verdugo, G. Sanchez-Gomez, M. Vaultier, M. I. Burguete, S. V. Luis. Sponge-like ionic liquids: A new platform for green biocatalytic chemical processes. *Green Chem.*, **2015**, 17, 3706-3717.
- [16] M. J. J. Callejon, A. R. Medina, M. D. M. Sanchez, E. H. Pena, L. E. Cerdan, P. A. G. Moreno, E. M. Grima. Extraction of saponifiable lipids from wet microalgal biomass for biodiesel production. *Bioresour. Technol.*, **2014**, 169, 198-205.
- [17] S. P. J. Kumar, V. K. Garlapati, A. Dash, P. Scholz, R. Banerjee. Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review. *Algal Res.*, **2017**, 21, 138-147.
- [18] E. N. Lopez, A. R. Medina, P. A. G. Moreno, L. E. Cerdan, E. M. Grima. Extraction of microalgal lipids and the influence of polar lipids on biodiesel production by lipase-catalyzed transesterification. *Bioresour. Technol.*, **2016**, 216, 904-913.
- [19] P. Lozano, J. M. Bernal, M. Pucheault, M. Vaultier. Stabilizing immobilized cellulase by ionic liquids for saccharification of cellulose solutions in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Green Chem.*, **2011**, 13, 1406-1410.
- [20] M. Shankar, P. K. Chhotaray, A. Agrawal, R. L. Gardas, K. Tamilarasan, M. Rajesh. Protic ionic liquid-assisted cell disruption and lipid extraction from fresh water *Chlorella* and *Chlorococcum* microalgae. *Algal Res.*, **2017**, 25, 228-236.
- [21] V. C. A. Orr, N. V. Plechkova, K. R. Seddon, L. Rehmman. Disruption and wet extraction of the microalgae *Chlorella vulgaris* using room-temperature ionic liquids. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2016**, 4, 591-600.
- [22] S. A. Choi, Y. K. Oh, M. J. Jeong, S.W. Kim, J. S. Lee, J. Y. Park, Effects of ionic liquid mixtures on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renew. Energy*, **2014**, 65, 169-174.
- [23] G. Bauer, S. Lima, J. Chenevard, M. Sugnaux, F. Fischer. Biodiesel via *in situ* wet microalgae biotransformation: Zwitter-type ionic liquid supported extraction and transesterification. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2017**, 5, 1931-1937.
- [24] Y. Q. Sun, C. Y. Xu, T. Igou, P. L. Liu, Z. X. Hu, S. W. Van Ginkel, Y. S. Chen. Effect of water content on [Bmim][HSO<sub>4</sub>] assisted in-situ transesterification of wet *Nannochloropsis oceanica*. *Appl. Energy*, **2018**, 226, 461-468.
- [25] S. Wahidin, A. Idris, and R. S. M. Shaleh. Ionic liquid as a promising biobased green solvent in combination with microwave irradiation for direct biodiesel production. *Bioresour. Technol.*, **2016**, 206, 150-154.
- [26] P. Lozano, J. M. Bernal, C. Gomez, E. Alvarez, B. Markiv, E. García-Verdugo, S. V. Luis. Green biocatalytic synthesis of biodiesel from microalgae in one-pot systems based on sponge-like ionic liquids, *Catal. Today*, **2019**, <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2019.01.073>.
- [27] R. P. Swatloski, S. K. Spear, J. D. Holbrey, R. D. Rogers. Dissolution of cellulose with ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 4974-4975.
- [28] M. C. Ceron-Garcia, M. D. Macias-Sanchez, A. Sanchez-Miron, F. Garcia-Camacho, E. Molina-Grima. A process for biodiesel production involving the heterotrophic fermentation of *Chlorella protothecoides* with glycerol as the carbon source. *Appl. Energy*, **2013**, 103, 341-349.

- [29] S. A. Choi, Y. K. Oh, M. J. Jeong, S. W. Kim, J. S. Lee, J. Y. Park. Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass. *Bioresour. Technol.*, **2012**, 109, 312-315.
- [30] P. Lozano, J. M. Bernal, M. Vaultier. Towards continuous sustainable processes for enzymatic synthesis of biodiesel in hydrophobic ionic liquids/supercritical carbon dioxide biphasic systems. *Fuel*, **2011**, 90, 3461-3467.
- [31] P. Lozano, J. M. Bernal, C. Gomez, E. Garcia-Verdugo, M. I. Burguete, G. Sanchez, M. Vaultier, S. V. Luis. Green bioprocesses in sponge-like ionic liquids. *Catal. Today*, **2015**, 255, 54-59.



# CAPÍTULO VII/CHAPTER VII

## “Conclusiones/Conclusions”



*“La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más comunicable”*

*Leonardo da Vinci*





## 1. CONCLUSIONES

---

En esta memoria se han propuesto y desarrollado con éxito cuatro metodologías que integran la síntesis y separación de productos de gran interés en la industria cosmética, farmacéutica, alimentaria y de combustibles. Estas metodologías proponen alternativas limpias, económicas y eficientes que suponen un gran avance en el desarrollo y aplicación de procedimientos sostenibles de síntesis química selectiva, y de separación de productos con fácil implementación a nivel industrial. A continuación, se numeran las principales conclusiones obtenidas:

1. La combinación de la tecnología enzimática con la tecnología de los disolventes verdes no acuosos, como son los ILs y los DESs, permite el diseño de procedimientos limpios y sostenibles que integran la síntesis y separación de productos, y que podrían ser directamente aplicados a nivel industrial. En concreto, los ILs hidrofóbicos que presentan un comportamiento tipo esponja permiten diseñar protocolos de separación sencillos y eficientes (basados en etapas de enfriamiento y centrifugación a temperaturas controladas) de compuestos orgánicos hidrofóbicos, con la recuperación y reutilización integral de todos los elementos del sistema. Por su parte, los DESs muestran una serie de propiedades que los hace altamente interesantes para su aplicación como medio de reacción en transformaciones biocatalíticas, sobre todo, aquellos en los que el disolvente está compuesto por los propios sustratos de la reacción.
2. Se ha desarrollado una metodología que integra la síntesis biocatalítica de monoésteres de pantenol en diferentes ILs hidrofóbicos, la separación del producto y la recuperación completa del sistema biocatalizador/IL. Para ello se han evaluado dos estrategias: esterificación directa de ácidos grasos con pantenol y transesterificación de derivados de ácidos grasos (p.ej. laurato de vinilo o laurato de metilo) con pantenol. Los resultados de este estudio muestran la velocidad de reacción máxima cuando se emplea un éster de vinilo como dador de acilo (p. ej. 70% de conversión tras 4 horas de reacción en la síntesis de monolaurato de pantenilo). Sin embargo, la esterificación directa entre los ácidos carboxílicos y el pantenol también ha proporcionado buenos rendimientos de reacción en la síntesis de monoésteres de pantenilo (>80%) y selectividades (próximas al 100%), evitando

el empleo de derivados químicos de ácidos grasos, como sustratos de la reacción, así como la generación de subproductos indeseados (p. ej. acetaldehído), por lo que resulta un enfoque más apropiado para la síntesis de ésteres de pantenol.

3. Se ha descrito la capacidad del pantenol para formar mezclas eutécticas (DESS) con diferentes ácidos grasos y en diferentes estequiometrías, resultando óptima la razón molar 1:2 (ácido graso:pantenol). Además, se ha demostrado que estos DESS pueden combinarse perfectamente con el derivado inmovilizado de lipasa B de *Candida antarctica* (Novozyme<sup>®</sup> 435) para llevar a cabo la síntesis selectiva de monoésteres de pantenilo con elevados rendimientos de síntesis y en un sistema libre de solvente.
4. Se ha desarrollado un protocolo que integra la síntesis y separación de dieciséis ésteres de aromas en medios de reacción basados en SLILs, y empleando sustratos y catalizadores obtenidos de fuentes renovables. Se han estudiado diferentes lipasas inmovilizadas, observándose cómo la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (Novozyme<sup>®</sup> 435) fue capaz de catalizar la esterificación directa de ácidos carboxílicos con diferentes alcoholes de fragancias, obteniendo rendimientos próximos al 100% tras dos horas de reacción a 50 °C. Asimismo, se ha evaluado la naturaleza del medio de reacción, demostrándose la capacidad de los SLILs para preservar la actividad y selectividad del biocatalizador frente al ambiente ácido que proporcionan los ácidos carboxílicos.
5. Se ha diseñado un protocolo para la separación de ésteres de fragancias obtenidos en sistemas de reacción basados en SLILs, empleando membranas de filtración. La aplicación de la filtración centrífuga con membranas de tamaño de poro controlado ha permitido la obtención de productos prácticamente puros. Para el caso de SLIL [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] se obtuvieron rendimientos de extracción superiores al 90% tras tres sencillos ciclos de enfriamiento a -20°C y centrifugación a 0 °C al emplear filtros de 0.2 µm de tamaño de poro. Además, el sistema biocatalizador/IL se pudo reutilizar durante seis ciclos operacionales de síntesis/separación de ésteres de aromas.
6. Se ha desarrollado una metodología que integra la extracción de aceite contenido en dos tipos diferentes microalgas, la síntesis biocatalítica *in situ* de biodiesel en

mezclas de ILs compuestas por SLILs (p. ej. [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] y [Bmim][Cl] y la separación del biodiesel producido, así como la recuperación y reutilización del sistema biocatalizador/IL. Se ha demostrado que la excelencia del IL hidrofílico [Bmim][Cl] para disolver biomasa lignocelulósica, se puede aplicar a la extracción de los triglicéridos contenidos en las algas, y que se puede combinar con la idoneidad de los SLILs para estabilizar enzimas, de tal forma que, con la mezcla de ILs óptima ([C<sub>16</sub>tmaNTf<sub>2</sub>][BmimCl] 95:5 m/m) se han obtenido rendimientos de extracción de triglicéridos de 87 mg/g(alga) y 415 mg/g(alga) de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides*, respectivamente. Además, dicha mezcla ha permitido llevar a cabo la transesterificación catalizada por una lipasa, del aceite de *Chlorella protothecoides* con metanol, obteniéndose un 100% de biodiesel tras 2 horas de reacción a 60 °C.

7. Gracias al comportamiento tipo esponja del IL [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>], se ha llevado a cabo la separación del biodiesel producido a partir del aceite de algas, mediante un protocolo sencillo y limpio, que también permite la recuperación del glicerol producido como subproducto para su revalorización. Asimismo, a pesar de que los ILs hidrofílicos contribuyen a la desnaturalización enzimática, se ha demostrado que la mezcla de [C<sub>16</sub>tmaNTf<sub>2</sub>]:[BmimCl] (95:5 m/m) fue capaz de mantener la actividad de la lipasa B de *Candida antarctica* durante cinco ciclos operacionales.
8. Los líquidos iónicos y los DESs empleados en esta memoria han demostrado ser una excelente herramienta para el desarrollo de procesos biocatalíticos sencillos y limpios de transformación química y de separación de los productos de reacción, con implementación directa en la industria. Por lo tanto, se adaptan a los criterios de producción sostenible que deben imperar los desarrollos industriales de este siglo XXI.

## 2. CONCLUSIONS

---

In this memory, four sustainable methodologies for integrating synthesis and separation of products with high interest in cosmetic, pharmaceutical, food and biofuel industries have been successfully developed. Those approaches suggest clean, economic and efficient alternatives to conventional methodologies, which clearly point to an imply breakthrough in the development and application of sustainable procedures involving selective chemical synthesis and separation of products with easy implementation at an industrial level. The main conclusions obtained in this memory are discussed below:

1. The combination of enzymes with green non-aqueous solvents technology, such as ILs and DESs, allows the design of clean and sustainable approaches that integrate the synthesis and separation of products, which can be directly applied at industrial level. Specifically, the hydrophobic ILs with sponge-like behaviour permit the design of methodologies for the simple and efficient separation of hydrophobic organic compounds by applying straightforward and green methods (based on cooling and centrifugation steps at controlled temperatures), that allow the recovery and integral reuse of all the system elements. On the other hand, DESs show excellent features that convert them into highly interesting reaction media for biocatalytic transformations, in particular, in those media in which the solvents are composed of the substrates of the reaction.
2. An integral methodology for the biocatalytic synthesis of panthenyl monoacyl esters in hydrophobic ILs, the the separation of their reaction products has been developed, allowing the full recuperation of the biocatalyst/IL system for further reuse. Thus, two approaches have been evaluated: the direct esterification of free fatty acids with panthenol and its transesterification with fatty acid derivatives (*e.g.* vinyl or methyl laurates). The results showed that the highest reaction rate reaction was reached for the esterification with the vinyl ester (*e.g.* 70% yield for the panthenyl monolaurate synthesis after 4 hours of reaction). However, direct esterification between carboxylic acids and panthenol in their corresponding monoesters has also provided high yields (>80%) and selectivities (close to 100%). This methodology avoids the use of chemical fatty acids

- derivatives as substrates of the reaction, as well as the by-products generation (*e.g.* acetaldehyde), being this approach more suitable for panthenyl esters synthesis.
3. The suitability of panthenol to form deep eutectic solvents (DESs) with fatty acids and at different stoichiometries has been described, being 1:2 (mol:mol fatty acid:panthenol) the optimal molar ratio. Moreover, it has been demonstrated that the resulting DESs can combine with immobilized *Candidada antarctica* lipase B (Novozyme<sup>®</sup> 435) providing a free solvent system in which the selective synthesis of panthenyl monoacyl esters with elevated yields is appropriately performed.
  4. A protocol that integrates the synthesis and separation of sixteen flavour esters in different SLILs as reaction media has been designed, using substrates and catalysts obtained from renewable sources. Different immobilized lipases have been studied, noticing how the immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozyme<sup>®</sup> 435) catalysed the direct esterification of carboxylic acids with different fragrance alcohols, providing yields close to 100% after two reaction hours at 50 °C. Furthermore, the nature of the reaction medium has been evaluated, demonstrating the ability of SLILs to preserve the activity and selectivity of the biocatalyst against the acidic environment provided by the carboxylic acids.
  5. A protocol for the separation of fragrance esters obtained in SLILs has been designed. This protocol is based on filtration through membranes. The combination of centrifugal filtration and membranes with the appropriate pore size has allowed the extraction of practically pure products. The sponge-like behavior of these ILs permitted to obtain a straightforward approach for the clean separation of the flavour ester products by cooling/centrifugation using membrane filters. In the case of the [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] SLIL, extraction yields up to 90% were obtained after three simple cooling cycles at -20 °C, followed by centrifugation at 0 °C and by using 0.2 µm pore size filters. Even more, the biocatalyst/IL system could be reused for six operational synthesis/separation cycles for producing fragrance esters.
  6. By using ILs mixtures (*e.g.* [C<sub>16</sub>tma][NTf<sub>2</sub>] and [Bmim][Cl] IL), an integral methodology for the oil extraction contained in two different microalgae, their *in situ* biotransformation into biodiesel and the separation of the biodiesel produced, as well as the recovery and reuse of biocatalyst/IL system has been designed. It has

been demonstrated that the excellence of the hydrophilic IL [Bmim][Cl] for dissolving lignocellulosic biomass, allowing the extraction of triglycerides contained in algae can be combined with the suitability of hydrophobic ILs to stabilize enzymes. In this sense, extraction yields of algae triglycerides of 87 mg/g(algae) and 415 mg/g(algae) have been obtained for *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides* microalgae, respectively. Besides, the ILs mixture selected proved to be an excellent medium for the lipase-catalyzed transesterification of triglycerides from *Chlorella protothecoides* microalgae with methanol, providing a yield of 100% biodiesel after 2 hours of reaction at 60 °C.

7. Due the sponge-like IL behaviour of [C<sub>16</sub>tmaNTf<sub>2</sub>] IL, a simple and clean protocol for separating the biodiesel produced from the microalgae oil has been designed. This protocol also allows the recovery of the glycerol byproduct, which can be further revalorized. Finally, although hydrophilic ILs can produce enzyme denaturalization, it has been demonstrated that the [C<sub>16</sub>tmaNTf<sub>2</sub>]:[BmimCl] (95:5 m/m) mixture was able to maintain the *Candida antarctica* lipase B activity during five operational cycles.
8. The Ionic liquids and DESs employed in this memory have proven to be excellent sustainable tools for the development of simply and clean biocatalytic processes for the chemical transformation and separation of the reaction products, with direct implementation in industry. Thus, they adapt to the criteria of sustainable production that govern the industrial development of the 21<sup>st</sup> century.

